

NATÁLIA FERRÃO CASTELO BRANCO MELO

**BIOATIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE GEL E
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO
DE UVAS (*Vitis labrusca* L.)**

RECIFE – PE

2016

NATÁLIA FERRÃO CASTELO BRANCO MELO

**BIOATIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE GEL E
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO
DE UVAS (*Vitis labrusca* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

RECIFE

2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M528b Melo, Natália Ferrão Castelo Branco.
Bioatividade da associação de gel e nanopartículas de quitosana na conservação de uvas (*Vitis labrusca* L.) / Natália Ferrão Castelo Branco Melo. – 2016.
176 f.; il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Nanotecnologia. 2. Salmonella. 3. Escherichia coli. 4. Frutas. 5. HET-CAM. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-082)

NATÁLIA FERRÃO CASTELO BRANCO MELO

**Bioatividade da associação de gel e nanopartículas de quitosana na
conservação de uvas (*Vitis labrusca L.*)**

Dissertação aprovada em: 22 de fevereiro de 2016

Profa. Dra. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud- UFPE

Profa. Dra. Lúcia Raquel Berger - UFPB

Profa. Dra. Margarida Angélica da Silva Vasconcelos- UFPE

RECIFE - PE

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO –UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Reitor

Prof.º Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-reitor

Prof.º Silvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof.º Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof.º Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof.^a Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Nutrição

Prof.^a Alda Verônica Souza Livera

Vice-Chefe do Departamento de Nutrição

Prof.^a Juliana Maria Carrazzone Borba

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof.^a Elizabeth do Nascimento

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof.^a Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

***Com carinho, dedico esse trabalho a Deus e aos meus queridos pais
Maria do Carmo e Rodolfo.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda sua proteção, iluminação, paz e amor que me concebeu durante toda a caminhada da vida.

À minha amada mãe, Maria do Carmo, pelo seu amor, compreensão, dedicação, conselhos e apoio, que me dão forças para prosseguir. Sua luz faz de mim uma pessoa melhor.

Ao meu querido pai, Rodolfo, que conferiu paciência e apoio durante todo tempo. Obrigada por todas as idas na Universidade, durante os feriados e finais de semana necessários.

À minha tia Fátima, por todo incentivo e orientação sobre a vida acadêmica.

À meu querido tio Tutuca, sempre carinhoso e disponível em ajudar aos outros.

À todos os outros familiares, em especial a Tia Dora, vovó Lindalva, Luizinho, Vinicius, Davi e Lucas que mesmo distante estiveram torcendo pelo meu sucesso.

À Naércio, por seus conselhos, paciência, apoio e carinho.

Às professoras Thayza e Thatiana pela preciosa orientação e oportunidade de aprendizado, sempre com muita simpatia e paciência.

À professora Tânia que sempre dedicou atenção e realizou sábias sugestões para os alunos que trabalham em seu laboratório. Sua generosidade transforma os alunos em pessoas cada vez melhores.

À Miguel Flores pela sua paciência, simpatia e generosidade em ajudar durante toda a pesquisa. Sua disponibilidade de tempo e do laboratório foi imprescindível para produção e análise das nanopartículas.

Aos meus queridos técnicos Vivaldo e Camilo, pelas preciosas orientações e apoio durante as análises físico-químicas e microbiológicas. Que suas generosidades se multipliquem em bons acontecimentos em suas vidas. Vocês foram grandes professores para mim!

Ao Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) pela disponibilidade de equipamentos e materiais na realização das análises necessárias. Obrigada a todos os outros técnicos: Alexandre, Arthur, Olivia, Moisés.

À todos os integrantes do laboratório de microbiologia do departamento de nutrição, em especial a Bruna, Michelle, Fernanda, Karine e Darlley. Agradeço pela disposição em ajudar nos experimentos e nos momentos de dificuldades.

Às professoras Marcela Sarmiento, Viviane Padilha e Silvana Salgado pela oportunidade de realização do estágio de docência na disciplina Noções de Química dos Alimentos e Bebidas. Foi um momento muito enriquecedor!

Ao pessoal do Laboratório de Solos de Agronomia da UFRPE, em especial ao Professor Newton Stamford, as pós-graduandas Emanuella e Marta pela disponibilidade em me ajudar na liofilização das nanopartículas.

À empresa Kitozyme pelo fornecimento da quitosana microbiológica.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição pela oportunidade em desenvolver essa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo incentivo a pesquisa e pelo financiamento e bolsa concedidos.

Aos membros da banca que se dispuseram a participar e conferir importantes sugestões para melhoria deste trabalho.

Agradeço imensamente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização da pesquisa.

***“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa
transformam-se em oportunidades”***

Maxwell Maltz

RESUMO

As uvas são frutas economicamente importantes, perecíveis e susceptíveis a deterioração microbiana. O uso de coberturas comestíveis a base de gel de quitosana tem sido estudado na conservação de frutas, devido a sua ação antimicrobiana e baixa toxicidade. Essas propriedades podem ser potencializadas quando a quitosana apresenta-se no formato de nanopartículas. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana e potencializadora de cobertura comestível formada da associação de gel e nanopartículas de quitosana na conservação de uvas. As quitosanas fúngicas foram cedidas pela empresa Kitozyme[®], (Kiofine[®] e Kionutrime[®]) as quais foram obtidas da parede celular do *Aspergillus niger*. A caracterização das quitosanas foram realizadas para determinação do grau de desacetilação, características estruturais e peso molecular, respectivamente pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, Espectroscopia de Infra-vermelho e viscosidade. As nanopartículas foram preparadas pelo método de gelatinização iônica e posteriormente passaram por um tratamento térmico (50°C/900rpm/30min). Sua caracterização foi feita através das técnicas de Medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz e Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão. O teste de microdiluição foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) das nanopartículas de quitosana, gel de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas frente a bactérias patogênicas de origem alimentar. As nanopartículas em diferentes concentrações (CIM/2, CIM, 2CIM) foram misturadas ao gel de quitosana (20mg/ml) para formação das coberturas aplicadas nas uvas. Foram avaliados os aspectos físico-químicos, sensoriais e a bioatividade das uvas (com e sem coberturas) frente à *Escherichia coli* e *Salmonella spp*, durante o armazenamento em temperatura ambiente (25°C – 12 dias) e refrigerada (12° - 24 dias). Foi analisado também a citotoxicidade das coberturas através do teste da Membrana Corioalantoide do ovo de galinha (HET-CAM) fecundado e incubado por um período de 9-10 dias. Para determinar o grau de irritabilidade pelo HET-CAM, foram observadas a presença de vasoconstricção, coagulação e hemorragia, até 5 minutos após a exposição às substâncias testes. As quitosanas Kiofine[®] e Kionutrime[®] apresentaram, respectivamente, grau de desacetilação de 89,5% e 86% e peso molecular de $4,35 \times 10^4$ g/mol e 4×10^3 g/mol, sendo consideradas de baixo peso molar. As nanopartículas produzidas apresentaram formato esférico e tamanho médio de 101,7nm. As coberturas testes se apresentaram atóxica pelo método do HET-CAM, preservaram a qualidade físico-química e sensorial das frutas e inibiram o crescimento de *Salmonella spp*. e *E. coli* em uvas artificialmente infectadas. Os resultados obtidos no estudo demonstraram a efetividade do gel enriquecido com nanopartículas em diferentes concentrações (CIM/2, CIM, 2CIM) em inibir o crescimento de bactérias patogênicas de origem alimentar e prolongar a vida de prateleira de uvas durante o período estudado, tornando-se um alternativa promissora para conservação pós-colheita desse fruto.

Palavras-chave: Nanotecnologia. *Salmonella*. *Escherichia coli*. Frutas. HET-CAM.

ABSTRACT

The grapes stand out as an economically important fruit, perishable and susceptible to microbial spoilage. The use of edible coatings chitosan gel has been studied in the preservation of fruits, due to its antimicrobial activity and low toxicity. These properties can be potentiated when the chitosan are presented in the format of nanoparticles. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial action and potentiated of edible coatings formed by the association of chitosan gel and chitosan nanoparticles to the conservation of grapes. The fungal chitosan, Kiofine[®] and Kionutrime[®], were obtained from the cell wall of *Aspergillus niger*, and were provided by Kitozyme[®]. The characterizations of chitosan were performed to determine the degree of deacetylation, structural characteristics and molecular weight, respectively by the techniques, Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance, Infra-red spectroscopy and viscosity. The nanoparticles were prepared by ionic gelation method and thereafter underwent a thermal treatment (50 °C / 900rpm / 30min). Its characterization was carried out by Dynamic Light Scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM). The microdilution test was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (MBC) of nanoparticles of chitosan, chitosan-gel and gel enriched with nanoparticles against food-borne pathogenic bacteria. Nanoparticles at different concentrations (MIC/2, MIC, 2MIC) were mixed with chitosan gel (20 mg/ml) for the formation of the edible coating applied to grapes. We evaluated the physical and chemical aspects, sensory and grapes (with or without covers) bioactivity against *Escherichia coli* and *Salmonella*, during storage at room temperature (25 °C - 12 days) and refrigerated (12°C - 24 days). It was also examined the cytotoxicity of the edibles by Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) fertilized and incubated for a period of 9-10 days. To determine the degree of irritability by the HET-CAM were observed the presence of lysis, coagulation and bleeding, up to 5 minutes after exposure to the test substances. Chitosan, Kiofine[®] e Kionutrime[®] presented, respectively, deacetylation degree of 89.5% and 86% and a molecular weight of 4.35×10^4 g/mol and 4×10^3 g/mol, being considered of low molecular weight. The produced nanoparticles have spherical shape and medium size of 101,7nm. The edibles coatings tests are non-toxic by the HET-CAM method, preserved the physicochemical and sensory quality of fruits and inhibited the growth of *Salmonella* spp. and *E. coli* in artificially infected grapes. The results obtained in this study demonstrated the effectiveness of the gel enriched with nanoparticles at different concentrations (MIC/2, MIC, 2MIC) to inhibit the growth of pathogenic food-borne bacteria and extend shelf life of grapes, becoming a promising alternative for post-harvest conservation of this fruit.

Keywords: Nanotechnology. *Salmonella*. *Escherichia coli*. Fruits. HET-CAM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag.
Figura 1. Estrutura molecular da quitosana	23
Figura 2. Fluxograma simplificado do processo de obtenção da quitosana	26
Figura 3. Interação iônica entre a quitosana e o TPP	31
Figura 4. Espectro do RMN ^1H da quitosana Kiofine utilizada para produção das nanopartículas	48
Figura 5. Espectro de RMN ^1H da quitosana Kionutrimex utilizada para produção do gel de quitosana	48
Figura 6. Espectro do infravermelho da quitosana Kiofine	51
Figura 7. Espectro do infravermelho da quitosana Kionutrimex	51
Figura 8. MET das nanopartículas de quitosana sem tratamento térmico	56
Figura 9. MEV das nanopartículas de quitosana sem (A) e com (B) tratamento térmico	57
Figura 10. Resultados do HET-CAM para as nanopartículas de quitosana (A) e para o gel de quitosana enriquecido com nanopartículas (B)	59
Figura 11. Sobrevivência da <i>Salmonella spp.</i> em uvas não refrigeradas (A) e refrigeradas (B) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas	78

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Integração dos picos do espectro de RMN ^1H da quitosana Kiofine e Kionutrimex para o cálculo do grau de desacetilação	49
Tabela 2. Valores dos graus de desacetilação em porcentagem das quitosanas determinados por RMN ^1H , a partir das duas equações distintas	49
Tabela 3. Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana Kiofine e Kionutrimex	52
Tabela 4. Valores da viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica média das quitosanas estudadas	54
Tabela 5. Média de tamanho das nanopartículas com e sem tratamento térmico	56
Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) do gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas	61
Tabela 7. Concentração bactericida mínima (CBM) do gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas	61
Tabela 8. Média dos valores dos parâmetros físico-químico das uvas armazenadas a temperatura ambiente (25°C) por 12 dias	65
Tabela 9. Média dos valores dos parâmetros físico-químico das uvas armazenadas em refrigeração (12°C) por 24 dias	66
Tabela 10. Efeito das coberturas comestíveis a base de nanopartículas de quitosana (CIM/2, CIM, 2CIM) sobre a cor das uvas armazenadas a temperatura ambiente (25°C) por 12 dias	70
Tabela 11. Efeito das coberturas comestíveis a base de nanopartículas de quitosana (CIM/2, CIM, 2CIM) sobre a cor das uvas armazenadas em refrigeração (12°C) por 24 dias	71
Tabela 12. Sobrevivência de <i>E.coli</i> (NMP/g) em uvas não refrigeradas (25°C) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas	75
Tabela 13. Sobrevivência de <i>E.coli</i> (NMP/g) em uvas refrigeradas (12°C) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas	75

Tabela 14. Efeito das coberturas comestíveis nos atributos sensoriais das uvas refrigeradas (12°C) **80**

SUMÁRIO

	Página
1. APRESENTAÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 Novas perspectivas da qualidade e segurança microbiológica de frutos.....	22
3.2 Quitosana.....	23
3.2.1 Considerações gerais e histórico.....	23
3.2.2 Produção da quitosana.....	24
3.2.3 Propriedades da quitosana.....	27
3.3 Quitosana na nanotecnologia.....	29
3.3.1 Aspectos gerais.....	29
3.3.2 Nanopartículas de quitosana.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Materiais.....	33
4.2 Métodos.....	33
4.2.1 Caracterização das quitosana fúngicas.....	33
4.2.1.1 Determinação do grau de desacetilação.....	34
4.2.1.2 Determinação das características estruturais.....	35
4.2.1.3 Determinação do peso molecular.....	35
4.2.2 Preparação das nanopartículas de quitosana.....	37
4.2.3 Caracterização das nanopartículas de quitosana.....	37
4.2.3.1 Medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	37
4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	38
4.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
4.2.4 Teste de citotoxicidade da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM).....	38
4.2.5 Determinação da atividade antimicrobiana.....	39

4.2.6	Efeito da cobertura comestível sobre os parâmetros físico químico das uvas.....	40
4.2.6.1	Umidade.....	41
4.2.6.2	pH.....	41
4.2.6.3	Acidez total titulável.....	41
4.2.6.4	Sólidos solúveis.....	41
4.2.6.5	Açúcar redutor.....	41
4.2.6.6	Antocianina.....	42
4.2.6.7	Evolução da cor.....	42
4.2.6.8	Perda de peso.....	43
4.2.6.9	Percentual de decomposição.....	43
4.2.7	Bioatividade das coberturas comestíveis sobre o crescimento bacteriano nas uvas.....	43
4.2.8	Considerações éticas.....	44
4.2.9	Análise sensorial.....	44
4.2.10	Análise estatística.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE.....	111
	Apêndice A - Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	111
	Apêndice B - Ficha de aceitabilidade, preferência e intenção de compra.....	114
	Apêndice C – Artigo 1	115
	Apêndice D –Artigo 2	142
	ANEXO.....	174
	Anexo 1 – Parecer do comitê de ética.....	174

Apresentação

1. APRESENTAÇÃO

Existe cada vez mais uma elevada demanda por parte da indústria alimentícia e dos consumidores por melhorias na qualidade e segurança dos alimentos, paralelamente há um aumento na oferta por produtos com prolongada vida de prateleira (THERON & LUES, 2007; FAI et al., 2008; VELICKOVA et al., 2013). Esta demanda pode ser claramente observada no grupo das frutas, pois mesmo após a colheita seu metabolismo continua a ocorrer de forma intensa, favorecendo o escurecimento, perda de flavor e perda de textura deste alimento. Além disso, a presença de microrganismos na superfície dos frutos pode comprometer a segurança microbiológica e a qualidade final do produto (SHIEKH et al., 2013).

As uvas destacam-se como uma das frutas mais economicamente importantes, com uma produção anual em torno de 69 milhões de toneladas (NOWSHEHRI et al., 2015). São considerados frutos não climatéricos altamente perecíveis com reduzida vida de prateleira devido à perda de firmeza, queda da baga, descoloração do pedúnculo, dessecação e deterioração microbiana (MENG et al., 2008; PASTOR et al., 2011). Assim como outros produtos naturais, as uvas são vulneráveis a contaminação esporádica com patógenos alimentares, direta ou indiretamente, através de animais do solo, água ou contaminação cruzada devido a manipulação humana (PINTO et al., 2006).

Para atender essa demanda é preciso garantir a segurança microbiológica dos alimentos, que por muito tempo foi obtida por processos químicos e/ou físicos. Dentre esses, destacam-se o uso de aditivos químicos, agrotóxicos e o processamento de alimentos em altas ou baixas temperaturas (VELICKOVA et al., 2013). No entanto, os processos físico e/ou químicos utilizados podem ocasionar perdas nutricionais, reações indesejáveis (por exemplo: oxidação lipídica, reação de Maillard) e efeitos tóxicos ao organismo humano (MARINO et al., 2001; VICENTE et al., 2005). Surge, então, uma pressão sob a indústria alimentícia para adoção de alternativas mais naturais que garantam os requisitos impostos pelos consumidores e ao mesmo tempo apresentem baixa toxicidade para o homem e o meio ambiente (MOHAMED; RABEA, 2011).

Dentre essas alternativas naturais destaca-se a quitosana, heteropolímero natural, composto por unidade β -1,4-D-glucosamina ligadas a resíduos N-acetilglucosamina. Este polissacarídeo é naturalmente encontrada na parede celular de fungos ou extraída a partir

da desacetilação da quitina presente no exoesqueleto de invertebrados marinhos e na estrutura de celenterados, anelídeos, moluscos e artrópodes (MUZZARELLI et al., 2012).

O processo de obtenção da quitosana a partir de fungos apresenta-se como alternativa promissora, pois, diferentemente da extração a partir da quitina, tem demonstrado grandes vantagens, a citar: extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala e maior grau de pureza (AMORIM et al., 2000; AMORIM, et al, 2006; STAMFORD, et al., 2007; CARDOSO et al., 2012).

A quitosana apresenta propriedades como, atividade antimicrobiana, bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade que revelam seu potencial para inúmeras aplicações (DIAS et al., 2013). Essas propriedades podem ser empregadas efetivamente para o controle da deterioração de frutos, já que estes são organismos vivos que apresentam intenso metabolismo e conseqüentemente alta probabilidade de deterioração (JIANGLIAN; SHAOYING, 2013).

Devido as notáveis propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana, existe uma grande variedade de produção de materiais a base desse polímero, como hidrogéis, filmes, fibras, membranas e nanopartículas (BUGNICOURT et al., 2014). As nanopartículas de quitosana apresentam como vantagem uma atividade antimicrobiana intensificada quando comparada a quitosana na sua forma original. Isso ocorre devido à elevada área superficial e a sua densidade de carga que interage efetivamente com as cargas negativas da superfície das células bacterianas (SHI et al., 2006; DU et al., 2009).

Apesar de existir diversos estudos a respeito da quitosana e sua atividade antimicrobiana, atualmente poucas pesquisas tem descrito a atuação antimicrobiana desse polímero na sua forma de nanopartículas, a qual influenciaria nos resultados previstos (CRUZ-ROMERO et al, 2013). Portanto, frente ao reconhecido potencial biológico da quitosana e sua possível utilização na forma de nanopartículas, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a ação antimicrobiana e potencializadora de cobertura comestível formada da associação de gel e nanopartículas de quitosana na conservação de uvas, atendendo desta forma as novas exigências dos consumidores e indústria alimentícia por alimentos com melhor qualidade.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antimicrobiana de cobertura comestível formada a base de gel e nanopartículas de quitosana na conservação de uvas.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o gel e as nanopartículas de quitosana fúngica;
- Determinar a atividade antimicrobiana do gel de quitosana, das nanopartículas de quitosana e do gel enriquecido com nanopartículas frente cepas de bactérias patogênicas de origem alimentar;
- Determinar a citotoxicidade da cobertura comestível;
- Avaliar o efeito da aplicação da cobertura comestível sobre os parâmetros físico-químicos e organolépticos das uvas;
- Avaliar o efeito das coberturas comestíveis no crescimento bacteriano em uvas infectadas artificialmente.

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Novas perspectivas da qualidade e segurança microbiológica de frutos

Existe cada vez mais uma elevada demanda por parte da indústria alimentícia e dos consumidores por melhorias na qualidade e segurança dos alimentos, paralelamente a um aumento na oferta por produtos com prolongada vida de prateleira (THERON; LUES, 2007). Esta demanda pode ser claramente observada no grupo das frutas, pois mesmo após a colheita seu metabolismo continua a ocorrer de forma intensa (JIANGLIAN; SHAOYING, 2013), favorecendo a ocorrência de processos capazes de alterar a integridade deste alimento e produzir efeitos negativos como escurecimento, perda de flavor e perda de textura. Além disso, a presença de microrganismos na superfície dos frutos pode comprometer a segurança microbiológica e a qualidade final do produto (SHIEKH et al., 2013).

As uvas destacam-se como uma das frutas mais economicamente importantes, com uma produção anual em torno de 69 milhões de toneladas (NOWSHEHRI et al., 2015). São considerados frutas não climatéricas, altamente perecíveis com reduzida vida de prateleira devido à perda de firmeza, queda da baga, descoloração do pedúnculo, dessecação e deterioração microbiana (MENG et al., 2008; SOUSA et al., 2013). Apresentam importantes vitaminas e minerais (DANG et al., 2014; JARA-PALACIOS et al., 2014) e são ricas em polifenóis incluindo as antocianinas, que exercem efeitos benéficos para os sistemas inflamatório, cardiovascular e intestinal (CHUANG; MCINTOSH, 2011).

Assim como outros produtos naturais, as uvas são vulneráveis a contaminação esporádica com patógenos alimentares, direta ou indiretamente, através de animais, do solo, da água ou da contaminação cruzada através da manipulação humana (PINTO et al., 2006). Um tratamento que melhore a qualidade dos frutos durante o armazenamento e segurança microbiológica contra os agentes patogênicos de origem alimentar é um dos maiores interesses dos produtores, distribuidores e consumidores deste produto (SERRANO et al., 2006).

Por muito tempo, a manutenção da qualidade de diversos produtos alimentícios durante sua vida útil só foi possível graças ao uso de aditivos químicos, agrotóxicos e

processos físicos (resfriamento, congelamento, uso de altas temperaturas, etc.). Desta forma foi originado um paradoxo, uma vez que os consumidores exigem que os alimentos sejam nutritivos, mantenham suas características organolépticas, apresentem uma extensa vida de prateleira e ao mesmo tempo sejam isentos de substâncias nocivas ao organismo humano e meio ambiente (MARINO et al., 2001; FAI et al., 2008; VELICKOVA et al., 2013).

Diante desses aspectos, surgem opções inovadoras isentas de efeitos tóxicos ao organismo humano e capazes de manter a qualidade dos alimentos. Dentre essas opções, uma alternativa emergente tem sido o uso de protetores naturais com potencialidade antimicrobiana e o uso de embalagens ativas (coberturas comestíveis) (AIDER, 2010) obtidas a partir de compostos naturais, como, por exemplo, a quitosana (ASSIS; LEONI, 2003; FAI et al., 2008).

3.2 Quitosana

3.2.1 Considerações gerais e histórico

A quitosana é um heteropolímero biodegradável formado a partir de unidades glucosaminas ($\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucopirranose) ligadas a resíduos de unidades N-acetilglucosamina ($\beta(1,4)$ -2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopirranose) unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β ($1 \rightarrow 4$), como observado na figura 1 (THARANATHAN; KITTUR, 2003; FAI et al., 2011). A estrutura molecular da quitosana é considerada uma poliamina linear com grupos amino e hidroxilas reativos, sendo insolúvel em água, mas dissolve-se em soluções aquosas de ácidos orgânicos, entre eles o ácido acético, além de ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico diluído, resultando em soluções viscosas (SANTOS et al., 2003).

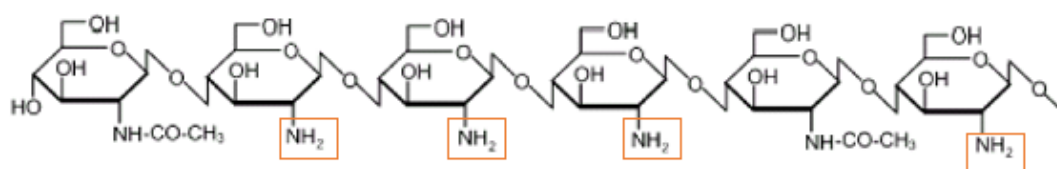


Figura 1: Estrutura molecular da quitosana (THARANATHAN; KITTUR, 2003).

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água (SORLIER et al., 2001; SANTOS et al., 2003; KONG et al., 2015).

A história da descoberta científica da quitosana iniciou em 1811 com a descoberta de um novo polissacarídeo. Nesta época, o químico e farmacêutico francês Henri Braconnot, trabalhando com fungos, isolou pela primeira vez a quitina e a denominou inicialmente de fungina (KNORR, 1991; MUZZARELLI, 2012). Em 1823, um pesquisador chamado Antoine Odier isolou uma substância insolúvel presente na carapaça de insetos e a denominou quitina que, em grego, significa túnica, envelope ou cobertura. Não se sabe ao certo se este pesquisador tinha conhecimento da substância isolada por Braconnot 12 anos antes, pois em seus relatos não fazem referência a trabalhos anteriores. Posteriormente, Odier descobre ainda, a presença de quitina na carapaça de caranguejo e conclui que este seria um material básico na formação do exoesqueleto de todos os insetos e provavelmente dos aracnídeos. Em 1843 o físico e matemático francês Anselme Payen detectou a presença de nitrogênio na quitina e verificou semelhança entre o polímero com a fibra vegetal denominada celulose (FERRARO et al., 2010; MUZZARELLI, 2012).

A quitina encontrada por Odier foi obtida através de múltiplos tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado, o que deixa dúvidas se o que foi encontrado era realmente quitina ou quitosana, já que a quitina tratada em meio alcalino concentrado pode sofrer desacetilação e dar origem a quitosana. No entanto, a quitosana só foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget e o seu nome foi proposto apenas em 1894 por Hoppe-Seyler (BADAWEY; RABEA, 2011; MUZZARELLI, 2012). Contudo, a estrutura química da quitina só foi identificada em 1950 pelo químico Albert Hofmann ao utilizar técnicas de difração de raio X, espectrometria de infra-vermelho e análises enzimáticas (KHOUSHAB; MONTAROP, 2010).

3.2.2 Produção da quitosana

A quitosana pode ser obtida a partir da parede celular de fungos da Ordem Mucorales ou através da extração, purificação e desacetilação da quitina (COSTA-SILVA

et al., 2006; HAMED et al., 2016). A quitina é encontrada na estrutura de celenterados, anelídeos, moluscos, artrópodes, insetos e microrganismos. No entanto, comercialmente, esse polissacarídeo é extraído basicamente do exoesqueleto de crustáceos, principalmente camarão e caranguejo, devido à vasta produção de resíduos como subproduto do processamento desses animais (DIAS et al., 2013; SHIEKH et al., 2013).

A constituição da casca dos crustáceos varia de acordo com a espécie, porém de uma forma geral é formada por 30 – 40% de proteínas, 30 – 50% de carbonato de cálcio e de 20 – 30% de pigmentos de natureza lipídica (carotenóides) (SHIEKH et al., 2013; VANI; STANLEY, 2013). A extração da quitina a partir do exoesqueleto de crustáceos inicia-se com um tratamento ácido, geralmente utilizando ácido clorídrico (HCl), para dissolver o carbonato de cálcio e o fosfato de cálcio presentes na carapaça. Em seguida, é feita uma extração alcalina, normalmente utilizando hidróxido de sódio (NaOH), para dissolução das proteínas, depois é utilizado acetona e etanol para que a despigmentação ocorra. Por fim, é realizado a desacetilação da quitina dando origem a quitosana, como mostra a figura 2 (GOY, et al., 2009; SHIEKH et al., 2013; HAMED et al., 2016).

A desacetilação consiste na remoção dos grupos acetil (COCH_3) da cadeia molecular da quitina, permanecendo os grupos amino ($-\text{NH}_2$), o que dá origem a uma nova cadeia polimérica chamada de quitosana. Normalmente emprega-se NaOH concentrado e altas temperaturas para que essa reação ocorra. No entanto, o nível de desacetilação final da quitosana irá depender de vários fatores, como, por exemplo: a concentração da base utilizada, o tempo de reação, a temperatura, o tamanho da partícula e a densidade (SHIEKH et al., 2013).

A importância do grau de desacetilação da quitosana se deve a influência que essa característica exerce sob os aspectos físico-químicos, a solubilidade e a aplicabilidade da quitosana. Os grupos aminos formados durante esse processo são reativos, auxiliando na natureza catiônica da quitosana e contribuindo para o desenvolvimento de suas propriedades (GOY et al., 2009; SHIEK et al., 2013).

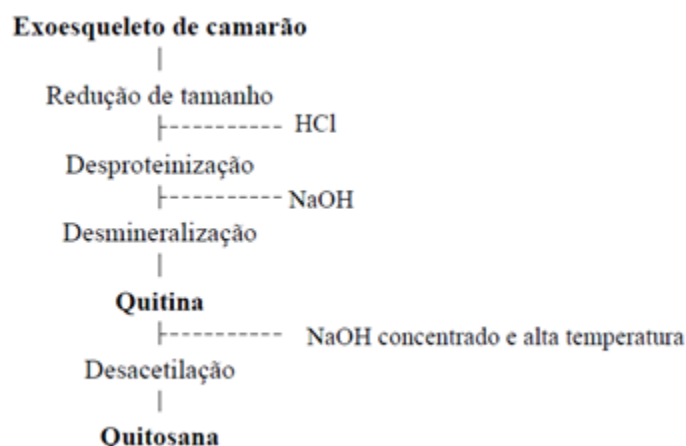


Figura 2: Fluxograma simplificado do processo de obtenção da quitosana (KNOOR, 1991)

Existem algumas limitações relativas à obtenção da quitosana de crustáceo durante a extração, purificação e desacetilação da quitina. Problemas sazonais, poluição causada pelo descarte de resíduos dos solventes utilizados na extração da quitosana, custos elevados de produção e possibilidade de degradar a cadeia polimérica da quitosana, são alguns exemplos dessas limitações, as quais levam a heterogeneidade das propriedades físico-químicas desse heteropolímero (STREIT, 2004; SILVA, 2007).

Uma alternativa viável e isenta dessas limitações inerentes ao processo de obtenção da quitosana a partir da quitina é a extração da quitosana da parede celular de fungos. A quitosana, assim como a quitina estão presentes na parede celular de fungos, apresentando a função de proteção e suporte. Os fungos da classe dos Zygomycetos são os que apresentam maior quantidade de quitosana, destacando-se *Rhizopus arrhizus* (SILVA, 2007; FAI et al., 2008; CARDOSO et al., 2012).

Para extrair a quitosana da parede celular de fungos é necessário o emprego de um pH alcalino que é capaz de desnaturar as proteínas e remover outros componentes celulares. Em seguida a exposição ao ácido irá proporcionar a retirada dos componentes estruturais remanescentes (quitina e β -glucana), pois esses componentes são insolúveis em pH ácido diferentemente da quitosana que apresenta solubilidade em $\text{pH} < 5,5$ (STREIT, 2004). As vantagens desse processo de obtenção de quitosana são inúmeras, dentre elas destacam-se: o fácil cultivo dos fungos utilizando substratos simples e baratos; a possibilidade de extração durante todo o ano independente da sazonalidade e a facilidade do tratamento ácido empregado, já que os fungos, diferentemente dos

crustáceos, não apresentam carbonato de cálcio (NADARAJAH et al., 2001; STREIT, 2004; STAMFORD et al., 2007).

3.2.3 Propriedades da quitosana

Dentre as inúmeras características que distinguem a quitosana e seus derivados, dos demais polissacarídeos, destacam-se: a sua bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e potencial como antimicrobiano (COSTA SILVA, 2006; DIAS et al., 2013). Vários estudos mostram que a quitosana apresenta uma atividade antimicrobiana contra um vasto número de microrganismos. No entanto, o mecanismo exato dessa ação ainda encontra-se desconhecido, mas diferentes hipóteses têm surgido para sua elucidação (AIDER, 2010; KONG et al., 2010). Uma dessas hipóteses refere-se a uma possível interação entre a carga positiva do grupo amino da molécula de quitosana com a carga negativa da membrana celular dos microrganismos, causando, desta forma, um vazamento de proteínas e outros constituintes das células microbianas (SHAHIDI et al., 1999; LI et al., 2015).

Apesar de todas as divergências existentes, atualmente é reconhecido que a ação antimicrobiana da quitosana depende do microrganismo sob o qual ela irá interagir. As leveduras e os bolores são os grupos mais sensíveis a essa ação, seguidos pelas bactérias gram-positivas e gram-negativas (AIDER, 2010). O efeito da quitosana é distinto para esses dois tipos de bactérias. Nas bactérias gram-positivas, a quitosana de alta massa molecular liga-se a parede celular, obstruindo os poros, o que seria capaz de inibir a absorção dos nutrientes pelo microrganismo. Enquanto que, a quitosana de baixa massa molecular penetraria mais facilmente em bactérias gram-negativas, ligando-se ao DNA e impedindo sua transcrição e tradução e, assim, alterando o metabolismo celular (SUDARSHAN et al., 1992; ZHENG; ZHU, 2003).

Para que a quitosana exerça sua ação antimicrobiana devem ser levados em consideração vários fatores interferentes, entre eles: o tipo de microrganismo, como já relatado, o peso molecular e o grau de desacetilação da quitosana e as condições do meio onde ela será aplicada (pH, temperatura, matriz alimentar, atividade de água, umidade do substrato) (DUTTA et al., 2009; AIDER, 2010; KIM et al., 2011; HOSSEINNEJAD; JARAFI, 2016).

Quitosana de baixo peso molecular apresenta uma maior solubilidade, propriedade importante para reagir com os sítios ativos dos microrganismos, enquanto que a quitosana com alto grau de desacetilação têm também uma alta solubilidade e densidade, fatores importantes para adesão desse polímero à célula microbiana. Portanto, esses dois tipos de quitosanas são os que apresentam uma maior ação antimicrobiana (AIDER, 2010; YOUNES et al., 2014). Quanto às condições do meio, destaca-se uma característica: o valor de pH, pois, quanto mais baixo este valor, mais grupos aminos são protonados e consequentemente maior é a ação antimicrobiana do polímero (DEVLIEGHERE et al., 2004; KONG et al., 2008).

A propriedade antimicrobiana da quitosana tem sido vastamente utilizada pela indústria alimentícia em diversos alimentos, especialmente em frutos, pois se mostra efetiva no controle de sua deterioração (DEVLIEGHERE et al., 2004; DOTTO et al., 2015). A quitosana age com efeito duplo, pois interfere diretamente no crescimento de patógenos e ativa várias respostas de defesa que induzem ou inibem diferentes atividades bioquímicas durante a interação da fruta com o patógeno (BATISTA-BAÑOS et al., 2006; CERQUEIRA et al., 2011). A quitosana também age formando uma película semipermeável que regula as trocas gasosas e reduz as perdas por transpiração o que diminui a taxa de respiração e a perda de água, consequentemente retarda o amadurecimento das frutas (BATISTA-BAÑOS et al., 2006; ROJAS-GRAÜ et al., 2009).

A possibilidade do uso da quitosana em alimentos deve-se também a outras propriedades, que são a biocompatibilidade, biodegradabilidade e sua atoxicidade. A toxicidade da quitosana é menor do que a da glicose, pois a dose letal de glicose em mamíferos é em torno de 8 a 12g, enquanto que 18g de quitosana por quilograma de massa corporal não mostra qualquer sinal de toxicidade (YADAV; BHISE, 2004). A toxicidade da quitosana só é evidente quando é utilizada de forma inadequada ou em grandes quantidades. Os efeitos relatados decorrentes do seu consumo excessivo foram desidratação gástrica e a formação de um gel no estômago, pois a quitosana consiste em uma fibra natural que em meio ácido se expande (COSTA; SILVA, 2006; FAI et al., 2008).

Todas essas propriedades da quitosana que atraem o interesse da indústria alimentícia são enriquecidas pelo fato de que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas. Os principais tipos de preparo do polímero são na forma de géis, filmes,

membranas, microesferas e nanopartículas, criando, desta forma, diversas possibilidades de aplicações (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

3.3 Quitosana na Nanotecnologia

3.3.1 Aspectos gerais

A nanotecnologia é um ramo da nanociência cujo objetivo é a caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica (SAHOO et al., 2007). O prefixo “nano” empregado nesse termo está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro (10^{-9}). As estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas, não encontradas na escala macro (CHAU et al., 2007). Além disso, é possível entender e visualizar fenômenos na sua unidade básica (FARIA – TISCHER; TISCHER, 2012).

Dentro do campo de estudo da nanotecnologia encontra-se uma linha de pesquisa que estuda na escala nanométrica apenas os fenômenos biológicos, ou seja, a nanobiotecnologia. Essa tecnologia envolve além da compreensão dos fenômenos biológicos, o estudo das propriedades físico-químicas das biomoléculas, criando uma confluência entre a ciência dos materiais com as ciências biológicas (FARIA – TISCHER; TISCHER, 2012).

Na escala nanométrica, os nanomateriais são definidos como um material com uma ou mais dimensões externas em nanoescala. Os materiais que contém as três dimensões em escala nanométrica são classificados como nanopartículas. Essas partículas possuem uma área superficial muito maior quando comparado com os materiais na escala macro e isso as torna mais disponíveis e susceptíveis para interação com outras moléculas, partículas, sistemas, células, etc. (CHAUDRY et al., 2010). Esse aumento de área superficial pode causar, também, algum efeito tóxico ao organismo humano, já que o pequeno tamanho das nanopartículas seria capaz de atravessar barreiras biológicas e comprometer os processos celulares (SOZER; KOKINI, 2009).

As nanopartículas são definidas como uma entidade discreta que tem 3 dimensões da ordem de 100 nm. É este pequeno tamanho em combinação com a estrutura e composição química que fornece as nanopartículas suas características únicas e seu

potencial para várias aplicações (BOUWMEESTER et al., 2009). O potencial de aplicação das nanopartículas depende de muitos fatores, incluindo: o tipo do material, a concentração utilizada, o formato e o tamanho das partículas (YANG et al., 2010). Dentre os vários materiais utilizados para produção de nanopartículas, a quitosana destaca-se por sua bioatividade e biocompatibilidade, por sua habilidade em aumentar a penetração de grandes moléculas por superfícies mucosas e por possibilitar a utilização de métodos alternativos de formulações que não requerem a utilização de solventes orgânicos e de surfactantes (HU et al., 2002; ARNAUD-STAMFORD; STAMFORD, 2010).

3.3.2 Nanopartículas de quitosana

A preparação das nanopartículas de quitosana pode ser por diferentes métodos, como por exemplo: a emulsificação/reticulação, precipitação/coacervação, complexação polieletrólítica e a gelatinização iônica (ALONSO et al., 1997; VALENTE et al., 2013). Dentre estes, a gelatinização iônica destaca-se por não necessitar da utilização de solventes orgânicos e de surfactantes. Além disso, produz partículas com uma pequena distribuição de tamanho e alta carga superficial positiva (FAN et al., 2012).

O método de gelatinização iônica foi descrito pela primeira vez por Calvo et al. (1997) e consiste na adição por gotejamento de um poliânion a uma solução de quitosana. Geralmente, o poliânion mais utilizado nesse processo é o tripolifosfato de sódio (TPP), que é considerado um agente ligante não tóxico e surgiu como substituto ao glutaraldeído anteriormente utilizado apesar de sua toxicidade (BANERJEE et al., 2002; BUGNICOURT et al., 2014).

No processo de gelatinização iônica as partículas são formadas rápida e espontaneamente e estabelecidas através das várias interações iônicas entre as cadeias de quitosana e as moléculas de TPP (Figura 3). Outra vantagem dessa técnica é a sua ocorrência em meio aquoso o que evita o uso de solventes orgânicos tóxicos ao organismo humano, possibilitando a aplicação dessas nanopartículas de quitosana em alimentos (BUGNICOURT et al., 2014).

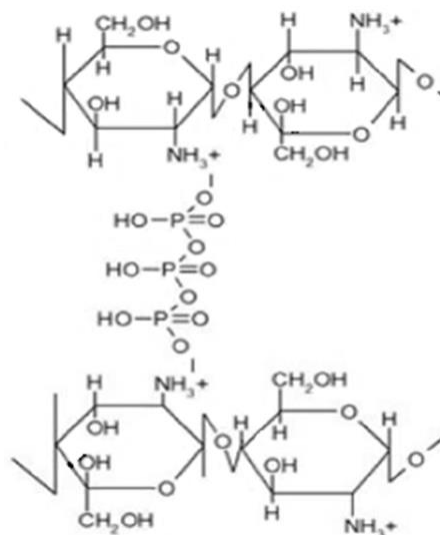


Figura 3: Interação iônica entre a quitosana e o TPP (AZEVEDO et al., 2010).

As 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 (LOREVICE et al., 2012).

Nanopartículas de quitosana também apresentam ação antimicrobiana intensificada, pois o pequeno tamanho das partículas possibilita a entrada da quitosana mais facilmente na célula microbiana, interagindo com o DNA, e consequentemente, inibindo a síntese de RNAm e a transcrição do DNA, ou seja, as nanoquitosanas promovem distúrbios no metabolismo celular que são capazes de levar à morte do microrganismo (CRUZ-ROMERO et al, 2013).

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As uvas (*Vitis labrusca* L.) foram adquiridas da CEASA/PE (Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco) e selecionadas de acordo com o tamanho e cor homogênea, ausência de infecções visíveis e estágio de maturação.

As quitosanas (Kiofine® e Kionutrime®) foram fornecidas pela empresa Kitozyme e ambas são de origem fúngica (*Aspergillus niger*). Todas as outras substâncias utilizadas (ácido acético, ácido clorídrico, tripolifosfato de sódio (TPP), ácido fosfotungstico, dimetilsulfóxido, hidróxido de sódio (NaOH), resazurina, fenoftaleína, etanol, acetato de zinco, ferrocianeto de potássio, sulfato de cobre, tartarato de sódio e potássio, sulfato de cobre, caldo lactose, caldo cérebro coração (BHI), ágar de desoxicolato lisina xilose, ágar bismuto sulfito, ágar hektoen entérico, lauril sulfato triptose, caldo EC, caldo selenito, caldo tetracionato Muller Kauffmann) foram obtidas através de fontes comerciais.

As cepas bacterianas testes, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7664, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella* spp. - ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizadas na atividade antimicrobiana pertencem ao banco de cultura da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)/ Departamento de nutrição.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização das quitosanas fúngicas

As quitosanas (Kiofine® e Kionutrime®) foram caracterizadas individualmente através da determinação do grau de desacetilação, das características estruturais e do peso molecular.

4.2.1.1 Determinação do grau de desacetilação

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por Ressonância Magnética Nuclear, na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, segundo metodologia descrita por Signini et al. (2000).

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 10mg de quitosana em água deuterada (D_2O) contendo 1% HCl (37%), permanecendo 24 horas em agitação formando uma solução viscosa. Uma alíquota dessa solução foi colocada em tubo de 5 mm de diâmetro para a realização da análise de acordo com os seguintes parâmetros programados no equipamento (Varian Unity Plus em 3000MHz): temperatura de 50 °C, tempo de relaxação de 6 segundos e pulso de 90° (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

O grau de desacetilação foi calculado pela equação 1 proposta por Hirai et al. (1991), que utiliza os sinais dos prótons H^2 , H^3 , H^4 , H^5 , H^6 , $H^{6'}$ (H^{2-6}) de ambos os monômeros e o pico referente aos núcleos do hidrogênio do grupo acetoamido (H^{ac}).

$$GD(\%) = \left(1 - \left(\frac{1}{3} H^{ac} / \frac{1}{6} H^{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

E pela equação 2 proposta por Signini et al. (2000), que utiliza a área do pico na região de 2ppm atribuído aos núcleos de hidrogênio do grupo acetoamido (H^{ac}) e a área do pico em 3,4ppm referente ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicopiranosídico (H^2).

$$GD\% = \left(1 - \left(\frac{H^{ac}}{3H^2} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

4.2.1.2 Determinação das características estruturais

Para determinação das características estruturais da quitosana foi realizada a técnica da Espectroscopia vibracional na região do infravermelho, segundo a metodologia de Santos et al. (2003) em um espectrofotômetro BRUKER Mod.IFS 66, na região entre 4000cm^{-1} e 400cm^{-1} .

A quitosana (1,5 mg) foi seca em estufa a vácuo durante 15 horas a 60°C . Depois, foi adicionado 100mg de brometo de potássio (KBr), a mistura homogeneizada em almofariz de ágata e deixada na estufa a vácuo a 110°C durante 20 horas. O espectro do pó da quitosana foi obtido utilizando pastilha de KBr como suporte. A medida foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

4.2.1.3 Determinação do Peso Molecular

O peso molecular foi determinado por medida de viscosidade, segundo a metodologia proposta por Santos et al. (2003), utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske ($d_{\text{interno}} = 1,01\text{mm}$) termostatizado a $(25 \pm 0,01)^{\circ}\text{C}$, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte.

Para a determinação da viscosidade intrínseca, $[\eta]$, foram preparadas soluções de quitosana em 25ml de solução de ácido clorídrico 1% sob agitação constante por 15h, com posterior aquecimento por 2 minutos a 80°C , para obtenção de soluções de concentração final variando de 0,1 a 1,0mg/mL. Alíquotas de 15ml de cada solução foram utilizadas nos capilares para medição do tempo de escoamento expresso em segundos, e estabelecido através da média dos valores obtidos em três repetições (SANTOS et al., 2003).

A razão do tempo de escoamento da solução do polímero pelo tempo de escoamento da solução do solvente é chamada de viscosidade relativa. As viscosidades específicas de cada quitosana foram calculadas aplicando a média dos tempos de escoamento na fórmula abaixo (Equação 3). Ambas as viscosidades são adimensionais.

$$\eta_{\text{esp}} = \left(\frac{t - t_0}{t_0} \right) \text{ (Eq. 3)}$$

Onde:

η_{esp} = viscosidade específica da amostra

t = tempo de escoamento da solução no viscosímetro

t_0 = tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro

Já a viscosidade reduzida foi encontrada através da divisão da viscosidade específica pela concentração e tem como dimensão o inverso da concentração (Equação 4).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

η_{red} = viscosidade reduzida da amostra.

C = concentração em gramas de polímero em 100 mL de solução.

As viscosidades intrínsecas das quitosanas foram encontradas pela extrapolação do gráfico de viscosidade reduzida versus concentração à diluição infinita, com base na equação 5 de Huggins (1942).

$$\eta_{red} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad (\text{Eq. 5})$$

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionada com a massa molar viscosimétrica média, através da equação de Mark-Houving (Eq. 6), proposta por Rinaudo et al. (2001). O valor da constante K e a dependem do polímero, do solvente e da temperatura. Nesta pesquisa o solvente utilizado foi o ácido clorídrico na temperatura de 25°C o qual apresenta os valores de $1,81 \times 10^{-5}$ e 0,93 para K e a , respectivamente.

$$[\eta] = K (\bar{M}_v)^a \quad (\text{Eq. 6})$$

4.2.2 Preparação das nanopartículas de quitosana

As nanopartículas de quitosana foram produzidas a partir da quitosana fúngica Kiofine®, cedida pela KitoZyme, seguindo o método de gelificação iônica descrito por Yang et al. (2010) e adaptado por Stamford et al. (2012).

Inicialmente 0,5g de quitosana de baixo peso molecular foi dissolvido em 50ml de ácido acético à 2% em agitação durante 30 minutos. Em seguida, 20ml de tripolifosfato de sódio (TPP) à 1% foi adicionado à solução de quitosana por gotejamento através de uma bomba peristáltica na velocidade aproximada de 0,3ml/min (CALVO et al., 1997).

Logo após o gotejamento a solução foi mantida sob agitação durante 2 horas. Passado esse período a solução foi transferida para eppendorfs e centrifugada durante 10 minutos em uma velocidade de 13.400rpm. Depois, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentada água destilada para a lavagem com posterior centrifugação (13.400rpm/5min). O processo de lavagem foi repetido aproximadamente 5 vezes.

Posteriormente, as nanopartículas foram ressuspensas em água destilada e foi realizado um tratamento térmico (30min/50°C/900rpm) para individualização e reestruturação das partículas, segundo o método descrito por BUGNICOURT et al. (2014). Por fim, essas nanopartículas de quitosana foram liofilizadas para posterior utilização nos demais experimentos. As nanopartículas sem tratamento térmico foram utilizadas apenas no processo de caracterização para comparação com as nanopartículas com tratamento térmico.

4.2.3 Caracterização das nanopartículas de quitosana

4.2.3.1 Medidas de Tamanho por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os tamanhos dos raios hidrodinâmicos das nanopartículas de quitosana, com e sem tratamento térmico, foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS-Dynamic Light Scattering). As amostras foram diluídas em água MiliQ acidificada com ácido acético 1% (16 μ mol/L). As medidas de DLS foram operadas com o comprimento de onda de 633nm a 25°C com um ângulo de detecção de 90°C, utilizando o Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK). Três medidas subsequentes foram determinadas para cada

amostra (STAMFORD-ARNAUD, 2012). Todo o procedimento foi realizado no Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET - FEI Morgagni) foi usada para observar a morfologia das nanopartículas de quitosana de cada tratamento. 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 fosfotungstico 1% (PTA). As amostras foram gotejadas em grades de cobre e para remover o excesso foi usado papel de filtro (STAMFORD-ARNAUD, 2012). A MET foi realizada no CETENE.

4.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-QUANTA 200FEG) foi usada para observar a morfologia das nanopartículas de quitosana. As nanopartículas, com e sem tratamento térmico, foram liofilizadas e fixadas individualmente em stubs com fita dupla-face de carbono e cobertas com uma camada de 10nm de platina usando um sistema de metalização Bal-Tec MED 020. Em seguida, foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV-QUANTA 200FEG). A MEV foi realizada no CETENE.

4.2.4 Teste de citotoxicidade pelo método da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM)

O teste do HET-CAM foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Steiling et al. (1999). Foram testadas as nanopartículas de quitosana (20mg/ml^{-1}) diluídas em água destilada e o gel de quitosana (quitosana - 20mg/ml^{-1} - diluída em ácido acético 1% com pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N) enriquecido com nanopartículas na maior concentração (2CIM) que foi utilizado como cobertura comestível nas uvas.

O teste foi feito no décimo dia de incubação dos ovos fecundados. Inicialmente, o reservatório acima do espaço aéreo do ovo foi removido. A membrana corioalantóide do ovo foi exposta e umedecida com solução salina fisiológica a 0,9%. Uma alíquota de

200µL das substâncias testadas foram aplicada na membrana corioalantóide. Em seguida, a membrana foi observada por 5 minutos afim de identificar sinais de vasoconstrição, hemorragia e coagulação. O tempo (em segundos) que cada um dos sinais iniciou foi aplicado na Equação 7 (VARGAS et al., 2007).

$$\frac{[(301-hemorragia) \times 5] + [(303-lise) \times 7] + [(301-coagulação) \times 9]}{300} \quad (\text{Eq. 7})$$

Através desta fórmula foi quantificado o potencial de irritação observado. O índice de irritação é determinado de acordo com os valores a seguir: 0.0-0.9, sem irritação; 1.0-4.9, leve irritação; 5.0-8.9, irritação moderada; e 9.0-21.0, grave irritação (STEILING et al. 1999). Todos os ensaios foram repetidos 5 vezes para cada amostra.

4.2.5 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada separadamente para as nanopartículas de quitosana, gel de quitosana e gel de quitosana enriquecido com nanopartículas, frente a bactérias patogênicas de origem alimentar (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7664, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella spp.* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922).

A quitosana foi diluída em ácido acético 1%, sendo o pH ajustado para 5,8 para obtenção da solução mãe (20mg/ml⁻¹) que deu origem ao gel de quitosana (SHIGEMASA; MINAMI, 1996). As nanopartículas foram diluída em água destilada e no gel de quitosana ambas na concentração de 20mg/ml⁻¹.

Para determinar as concentrações mínimas inibitórias (CIM) e mínimas bactericidas (CBM) foi realizado o teste de microdiluição em microplacas de 96 poços. As bactérias testadas foram cultivadas em BHI por 24h, a 37°C e em seguida padronizado o inóculo a 10⁸ UFC/ml (ALVES et al., 2008). Em cada um dos micropoços foram inseridos inicialmente a substância teste cuja concentração variou de 0 a 0,6mg/mL, em seguida foi adicionado o meio BHI e o inóculo de cada uma das bactérias, de forma que o volume final de cada poço fosse de 100µL.

A microplaca contendo as bactérias e as substâncias teste foi incubada a 37°C por 24 horas, depois foi adicionado 30µL de resazurina em cada poço e incubada novamente

a 37°C por 1 hora. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO et al., 2002). Portanto, a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano enquanto que as variações de rosa e roxo indicam a presença de células viáveis para crescimento. Depois de 1 hora da aplicação da resazurina foi feita a análise da mudança da cor e determinação da CIM, considerado a primeira concentração na qual não houve crescimento visível.

Para o controle de esterilidade foram adicionados separadamente 100µL do meio e 100µL da substância teste e para o controle de crescimento 80µL do meio + 20 µL do inóculo. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após a determinação do CIM, a primeira concentração que houve crescimento visível e as concentrações sem crescimento visível, foram cultivadas em placas de petri contendo ágar BHI para determinação do CBM. Foram transferidos 20µL das cavidades da microplaca (sem resazurina) para as placas de petri e estas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A determinação da CBM corresponde a menor concentração a partir da qual não foi observado crescimento microbiano após cultivo na ausência das substâncias testes (FERNANDES et al., 2008).

4.2.6 Efeito das coberturas comestíveis sobre os parâmetro físico-químico das uvas

Os frutos um dia após a colheita foram previamente selecionados de acordo com a sua coloração e higienizados com hipoclorito de sódio (1% v/v) durante 15 minutos, lavados com água potável e deixados para secar durante 2 horas. As uvas, exceto o controle, foram imersas no gel de quitosana (20mg/ml⁻¹) enriquecido com nanopartículas nas concentrações de CIM/2, CIM e 2CIM, durante 3 minutos deixados para secar por 30 minutos em temperatura ambiente.

Cada tratamento incluiu 40 uvas que foram armazenadas durante o período de 12 dias a temperatura ambiente (25°C), e durante o período de 24 dias a temperatura de refrigeração (12°C). Durante esse período foram realizadas análises físico-químicas a cada 6 dias (VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

As frutas foram examinadas quanto ao teor de umidade, pH, acidez total titulável, sólido solúveis, açúcar redutor, de acordo com normas preconizadas pela AOAC (2012), antocianina (LEES; FRANCIS, 1972), evolução da cor (CIE 1986), perda de peso (MENG et al., 2008) e percentual de decomposição (GOL et al., 2013).

4.2.6.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado por aquecimento dos frutos em estufa à 70°C por 24 horas até a obtenção de massa seca (Método 934.06).

4.2.6.2 pH

A amostra foi diluída em água destilada e o pH foi determinado por pHmetro digital da marca MICRONAL B474 (Método 981.12).

4.2.6.3 Acidez total titulável

A amostra diluída em água destilada foi acrescida do indicador fenolftaleína. A acidez total titulável, foi determinada por meio da titulação com solução de NaOH 0,1N, seguida da determinação do ponto de viragem em pH 8,2 utilizando um pHmetro digital (MICRONAL B474) (Método 920.149). Os resultados foram expressos em percentual de ácido tartárico.

4.2.6.4 Sólidos solúveis

Determinados por meio da leitura em refratômetro de bancada modelo MODEIIausJENA, com os resultados expressos em °Brix (Método 932.12).

4.2.6.5 Açúcar redutor

Inicialmente, foi pesado 5g da amostra de uva triturada e adicionado 50ml de água destilada. Em seguida, essa mistura foi aquecida (40-50°C) em banho-maria durante 1 hora. Após esse período, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 250ml e

foi acrescentado 10ml das soluções de ferrocianeto de potássio a 15% (Carrez I) e acetato de zinco a 30% (Carrez II). O conteúdo do balão foi agitado manualmente e o seu volume foi completado com água destilada para 250ml. Após 15 minutos o seu conteúdo foi filtrado em papel de filtro para um erlenmeyer e depois transferido para uma bureta.

Paralelamente foi preparado em outro erlenmeyer uma solução composta de 40ml de água destilada e 10ml da solução de Fehling A (Sulfato de cobre) mais 10ml da solução de Fehling B (Tartarato duplo de sódio e potássio + hidróxido de sódio). Esse erlenmeyer contendo as soluções de Fehling A e B foi aquecido e quando iniciou a ebulição começou a titulação da solução da amostra preparada contida na bureta. A titulação permaneceu até a formação de um precipitado de coloração vermelho-tijolo e o resultado da análise foi expresso em g/100g (Método 923.09).

4.2.6.6 Antocianinas

O total de antocianinas presentes nas uvas foi estimado pelo método de Lees e Francis (1972). Inicialmente, 1 grama da polpa da fruta foi misturado com 20ml do solvente extrator (95% etanol: 1,5N HCl, 85:15) e a mistura foi deixada a uma temperatura de 4°C durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas em balão volumétrico e protegidas da luz (coberta com papel alumínio). Os resíduos remanescentes foram lavados com o solvente extrator para a completa remoção dos pigmentos. O volume do balão foi completado para 100ml com o mesmo solvente e a absorbância foi medida a 535nm para a quantificação do teor de antocianina. Os resultados foram expressos em mg/100g.

4.2.6.7 Evolução da cor

A cor das uvas foi medida em 3 diferentes posições da fruta com o Sistema CIELab (L^* , a^* e b^*), utilizando um colorímetro (MINOLTA Co., Osaka, Japão) que calcula a cor do espectro de reflectância. O parâmetro L^* está associado à luminosidade das amostras, a coordenada cromática a^* está associada à dimensão verde-vermelho e a coordenada cromática b^* está associada à dimensão azul-amarelo.

4.2.6.8 Perda de peso

A perda de peso foi medida durante todo o intervalo de tempo de armazenamento das uvas e calculada de acordo com o preconizado por Meng et al. (2008). As uvas foram pesadas no dia da aplicação das coberturas e a cada 6 dias, seguindo o mesmo período de tempo determinado para as demais análises físico-químicas. O resultado foi calculado com a base no percentual de perda de peso em relação ao peso inicial das frutas (peso referente ao dia da aplicação da cobertura).

4.2.6.9 Percentual de decomposição

O número de frutas com sinais de decomposição visíveis devido a infecções por microrganismos foi calculado através da divisão do número inicial de frutas pelo número de uvas em decomposição multiplicado por 100. Os resultados foram expresso em porcentagem, de acordo com Gol et al. (2013).

4.2.7 Bioatividade das coberturas comestíveis sobre o crescimento bacteriano nas uvas

As uvas foram higienizadas com hipoclorito de sódio (1% v/v) por 15 minutos, lavados com água potável e deixadas para secar por 2 horas. Em seguida, foram imersas na solução do inóculo bacteriano (*E.coli* ou *Salmonella spp.* - 10^8 UFC/ml) sob agitação, onde permaneceram por 1 minuto (SANTOS et al., 2012; VASCONCELOS de OLIVEIRA et al., 2014; KIM et al., 2014).

Após aplicação do inóculo, as uvas foram imersas durante 3 minutos no gel de quitosana enriquecido com nanopartículas nas concentrações CIM/2, CIM e 2CIM. Um grupo de uvas foi imerso apenas na solução do inóculo, servindo como grupo controle, o que totalizou 4 amostras para análise (3 tratamentos e 1 controle) (SANTOS et al., 2012; VASCONCELOS de OLIVEIRA et al., 2014).

A infecção bacteriana causada nas uvas foi realizada separadamente para cada espécie bacteriana analisada (*E.coli* e *Salmonella spp.*). A escolha dessas espécies de

bactérias foi de acordo com a legislação RDC 212, que preconiza que em uvas sejam analisadas esses tipos de bactérias (BRASIL, 2001).

O crescimento bacteriano nas uvas foi avaliado durante 12 dias nas frutas armazenadas a temperatura ambiente e 24 dias nas uvas refrigeradas, com um intervalo de 2 e 3 dias entre as análises, respectivamente. A determinação de coliformes termotolerantes foi feita através do Método do Número Mais Provável (NMP) presente no Bacteriological Analytical Manual (FDA 2010) e os resultados expressos em NMP/g. A contagem de *Salmonella spp.* foi realizada através da contagem em placas, adaptado do método do BAM/FDA (ANDREWS; HAMMACK, 2006).

4.2.8. Considerações éticas

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e obteve aprovação através do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número: 42618415.2.0000.5208. Todos os provadores voluntários foram informados sobre a análise e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), conforme a Resolução 466/12 da CONEP. Após a realização das análises foi emitido o parecer consubstanciado com a aprovação do relatório final da pesquisa pelo Comitê de Ética (Anexo 2).

4.2.9 Análise sensorial

As uvas controle e as tratadas com coberturas comestíveis nas mesmas concentrações das análises físico-químicas e da bioatividade (CIM/2, CIM e 2CIM) foram submetidas a análise sensorial 3 dias após aplicação das coberturas e em armazenamento refrigerado. Cada avaliador recebeu 4 uvas cada uma com os diferentes tratamentos e codificadas com números de 3 dígitos aleatórios.

Foi realizado os testes afetivos de aceitação, intenção de compra e teste de ordenação de preferência com 100 provadores não treinados selecionados de forma aleatória entre alunos e professores do Departamento de Nutrição da UFPE. Todos os testes foram feitos sobre condições controladas de luz e temperatura no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFPE.

Para o teste de aceitação foi utilizado uma escala hedônica de 9 pontos, sendo avaliado os atributos de aparência, textura, preferência global, sabor, sabor residual e aroma. Para o teste intenção de compra foi empregado uma escala hedônica de 5 pontos (DUTCOSKY, 2013) (Apêndice B).

4.2.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com estatística descritiva (média e desvio padrão) e testes inferencial (ANOVA seguido pelo teste de tukey) para determinação das diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e foi utilizado o software SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA). Os resultados foram expressos como a média estimada $\pm$ desvio padrão.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão produzidos durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado estão expostos nos tópicos abaixo e em formato de artigos científicos (Apêndice C e Apêndice D).

5.1 Caracterização das quitosanas fúngicas

5.1.1 Determinação do grau de desacetilação

O grau de desacetilação é definido como o número de grupos amino em relação aos grupos amida da cadeia polimérica. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem efeito na solubilidade e nas propriedades das soluções de quitosana (SANTOS et al., 2003). Essa proporção entre os grupos da cadeia polimérica pode ser determinada por várias técnicas, dentre elas a Ressonância Magnética Nuclear destaca-se por não ser destrutiva e invasiva mostrando-se sensível, precisa e fornecendo resultados exatos, sem a necessidade de purificação da quitosana analisada (as impurezas não apresentam o mesmo deslocamento químico dos picos relevantes da quitosana) (KASAAI, 2010). Portanto, no presente trabalho, analisou-se os graus de desacetilação através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H).

Nas figuras 4 e 5 encontram-se os espectros de RMN ^1H das quitosanas, Kiofine[®] e Kionutrime[®], utilizadas para produção das nanopartículas e para produção do gel, respectivamente. Na tabela 1, podemos observar a integração dos picos do espectro de RMN ^1H da quitosana Kiofine[®] e Kionutrime[®] para o cálculo do grau de desacetilação. O pico HDO refere-se ao pico da água deuterada utilizada para preparação da amostra, portanto, esse pico não está presente na tabela 1.

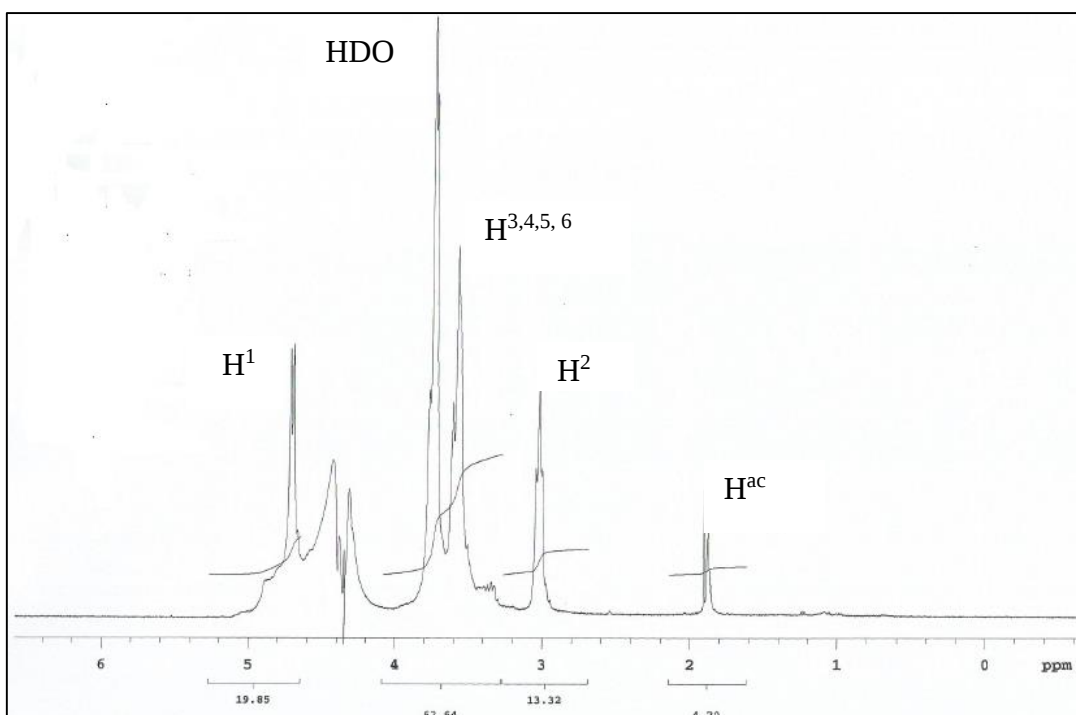


Figura 4: Espectro de RMN ^1H da quitosana Kiofine[®] utilizada para produção das nanopartículas.

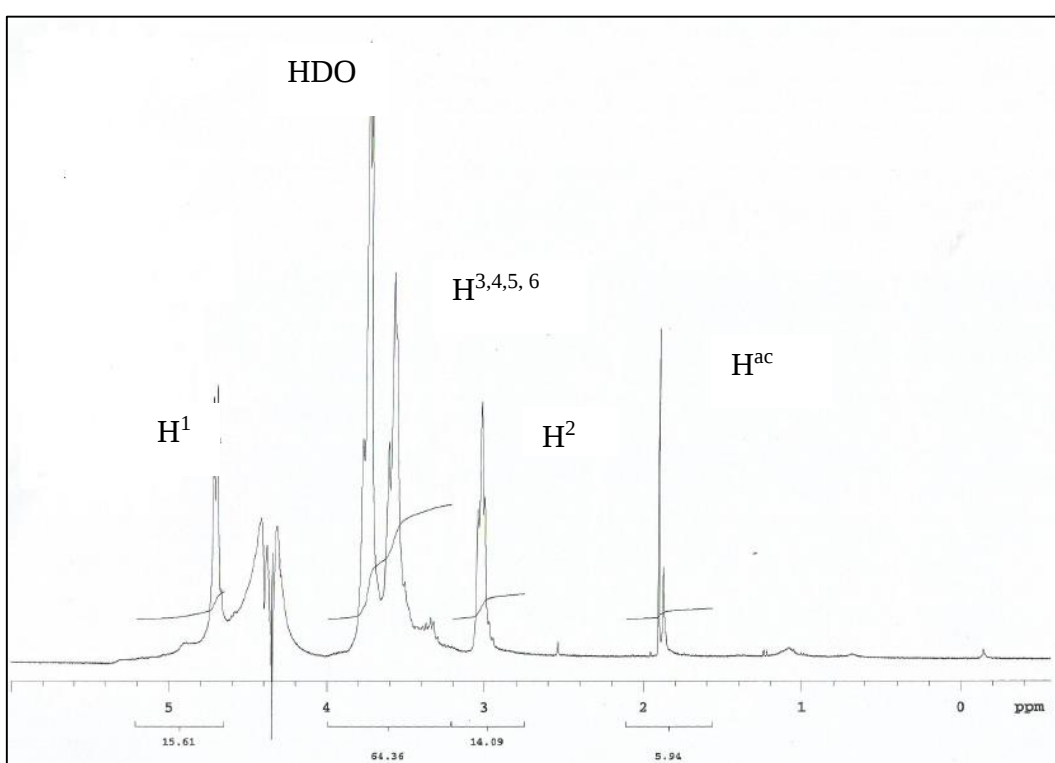


Figura 5: Espectro de RMN ^1H da quitosana Kionutrim[®] utilizada para produção do gel de quitosana.

Tabela 1: Integração dos picos do espectro de RMN ^1H das quitosanas Kiofine[®] e Kionutrime[®] para o cálculo do grau de desacetilação.

Hidrogênios	Integração dos picos	
	Quitosana Kiofine [®]	Quitosana Kionutrime [®]
H ^{ac}	4,2	5,94
H ²	13,32	14,09
$\Sigma \text{H}^{2,3,4,5,6}$	75,96	78,45

A tabela 2 mostra os graus de desacetilação calculados a partir da Equação 1 proposta por Hirai et al. (1991) e da Equação 2 proposta por Signini et al. (2000). Segundo Shimahara et al. (1989), Fai et al. (2011) e Berger et al. (2014) o grau de desacetilação de quitosana de origem microbiológica encontra-se entre 78 – 91%, portanto os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com esses valores. Crestini et al. (1996) e Stamford et al. (2013), relatam que valores acima de 80% de grau de desacetilação e consequentemente a alta densidade de cargas positivas presentes na quitosana fúngica, viabiliza o uso desse tipo de quitosana como agente antimicrobiano.

Tabela 2: Valores dos graus de desacetilação em porcentagem das quitosanas Kiofine[®] e Kionutrime[®] determinados por RMN ^1H , a partir de duas equações distintas.

Quitosana	Eq.(1)	Eq. (2)
Kiofine [®]	89,01%	89,5%
Kionutrime [®]	84,86%	86%

Vários são os fungos utilizados para extração de quitosana, dentre eles podemos citar o *Rhizopus arrhizus*, *Mucor circinelloides* e o *Aspergillus niger*. O grau de desacetilação da quitosana microbiológica sofre influência das condições de cultivo do fungo e do método de extração da quitosana (CRESTINI et al., 1996; AMORIM et al., 2000; ANDRADE et al., 2000; AMORIM et al., 2006; STAMFORD et al., 2007; FAI et al., 2011; BERGER et al., 2014).

Cardoso et al. (2010) trabalhando com quitosana extraída de *Rhizopus arrhizus* encontrou um grau de desacetilação de 78%, no entanto Cardoso et al. (2012) encontrou um valor de 86%. Da mesma forma, Vasconcelos de Oliveira et al. (2014) extraiu quitosana do *Mucor circinelloides* e obteve um grau de desacetilação de 82%, abaixo do que foi encontrado por Fai et al. (2011) que também trabalhou com o mesmo fungo e obteve quitosana com grau de desacetilação de 83%.

No presente trabalho, as quitosanas microbiológicas utilizadas foram provenientes do *Aspergillus niger*, microrganismo promissor na produção de quitosana, no entanto também apresentam pequenas diferenças nos seus graus de desacetilação. Esses resultados corroboram com o preconizado por Logesh et al. (2012), que explica que os diferentes graus de desacetilação para uma mesma espécie fúngica ocorrem devido as diferenças entre as condições de cultivo do microrganismo o que pode influenciar na produção da quitosana.

Outro fator que influencia no grau de desacetilação da quitosana fúngica, como preconizado por Crestini et al. (1996), é o método de extração deste polímero. Cai et al. (2006) fez a extração da quitosana de *Aspergillus niger* através do método químico e enzimático e encontrou graus de desacetilação de 76,8% e 73,6%, respectivamente, os quais foram inferiores ao encontrado no trabalho atual.

Portanto, na presente pesquisa os diferentes graus de desacetilação encontrados para as quitosanas microbiológicas utilizadas (Kiofine® e Kionutrime®) estão de acordo com os resultados encontrados na literatura para outras quitosanas extraídas de fungos. Além disso, os resultados reforçam a justificativa fornecida por Crestini et al. (1996) e Logesh et al. (2012).

5.1.2 Determinação das características estruturais

A espectroscopia na região do infravermelho permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana. Segundo Signini e Campana Filho (1998), a análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornece, através de um simples exame do espectro, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula.

O espectro do infravermelho é obtido pela passagem da radiação pela amostra analisada, registrando os comprimentos de onda para os quais as bandas de absorção aparecem. As bandas são geradas pela absorção da radiação e sua conversão em movimentos específicos das ligações químicas (RATNER et al., 2004).

As figuras 6 e 7 mostram o espectro de infravermelho das quitosanas Kiofine® e Kionutrim®, respectivamente, e a tabela 3 mostra as bandas observadas no espectro de cada uma das quitosanas utilizadas.

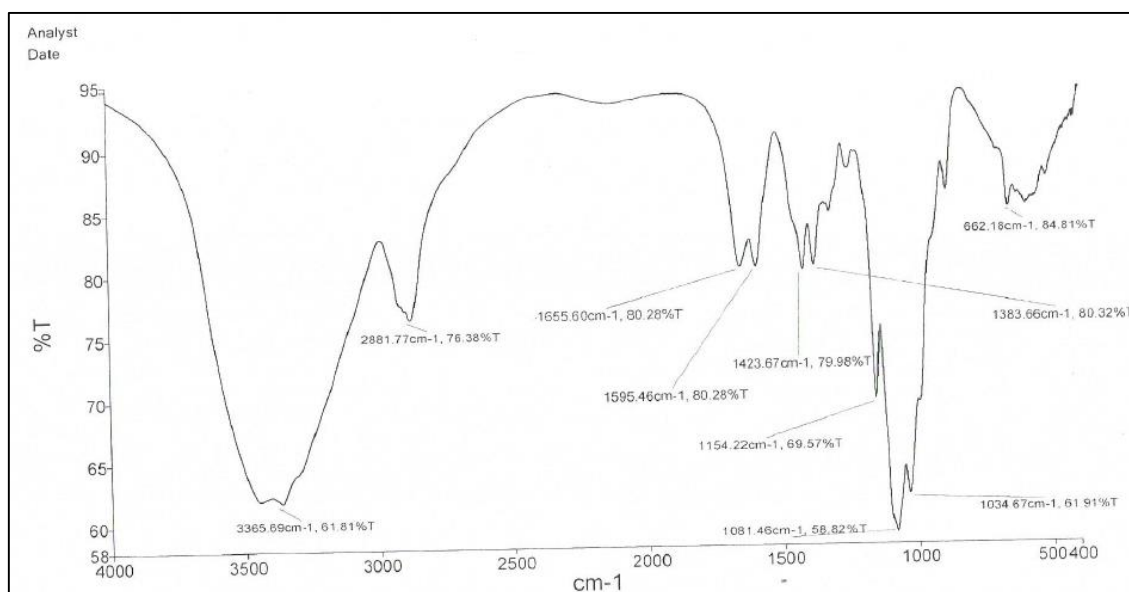


Figura 6: Espectro do infravermelho da quitosana Kiofine®.

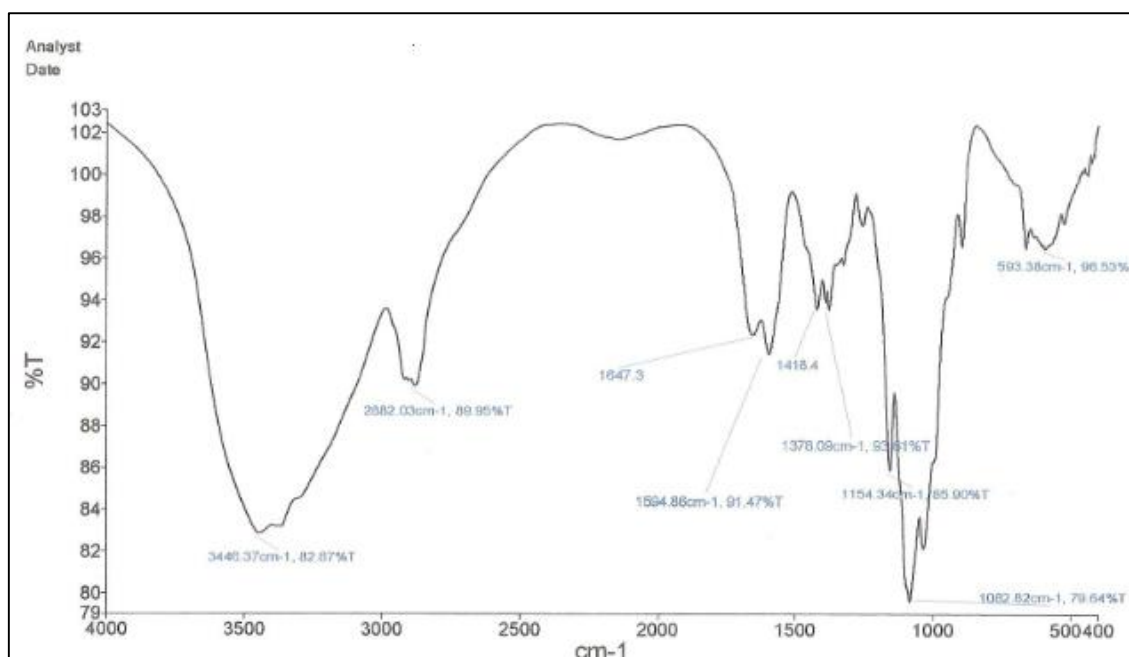


Figura 7: Espectro do infravermelho da quitosana Kionutrim®.

Tabela 3: Atribuição das bandas do infravermelho das quitosanas Kiofine® e Kionutrim®.

Atribuições	Comprimento de onda Kiofine-B® (cm ⁻¹)	Comprimento de onda Kionutrim® (cm ⁻¹)
Anéis piranosídicos	662 a 1081	593,38 a 1082,82
(-CH ₂ – OH) ν_{C-O}	1383	1378
(amida) ν_{C-N}	1423	1418,4
(amida II) δ_{NH}	1595	1595
(amida I) $\nu_{C=O}$	1655	1647,3
ν_{C-H}	2881	2882
ν_{O-H}	3365	3446
(amina) δ_{NH}		

Os espectros obtidos para a Kiofine® e Kionutrim® mostram, respectivamente, um pico largo em 3365 e 3446 cm⁻¹, na região correspondente ao estiramento OH. Esses valores são semelhantes ao encontrado por Vasconcelos de Oliveira et al. (2014), que analisou também quitosana fúngica, porém extraída do *Mucor circinelloides* e por Berger et al. (2014) que utilizou quitosanas provenientes de *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans*.

Já os picos em 2881 e 2882 cm⁻¹ representam o estiramento C-H alifático das amostras Kiofine® e Kionutrim®, respectivamente. Os picos em 1655 e 1647,3 cm⁻¹ correspondem ao grupo amina acetilado da quitina indicando que as amostras não estão totalmente desacetiladas (FIGUEIREDO, 2002).

Stamford et al (2007) e Abreu et al. (2013) encontraram resultados semelhantes a deformação axial C=O (amida I), em torno de 1655 cm⁻¹. Assim como o modo vibracional da deformação angular da ligação N-H (amida II) com valor de 1607 cm⁻¹ e 1596 cm⁻¹, respectivamente, semelhante ao encontrado no presente estudo.

Os picos 1383 e 1378 cm^{-1} representam o estiramento C-O do grupo alcóolico primário (-CH₂ – OH) das quitosanas Kiofine[®] e Kionutrime[®], respectivamente. A deformação axial C-N da amida apresenta valores de 1423 e 1418,4 cm^{-1} para a Kiofine[®] e Kionutrime[®], respectivamente. Segundo Shigemasa et al. (1996), os valores de 662 a 1081 cm^{-1} e 593,38 a 1082,82 cm^{-1} encontrados no espectro do infravermelho para as quitosanas analisadas referem-se a banda intensa dos anéis piranosídicos.

Observa-se que os espectros das duas quitosanas utilizadas no presente trabalho são semelhantes, corroborando com Silverstein et al. (1994), que refere-se ao espectro de infravermelho como uma impressão digital da molécula de quitosana, devido aos seus vários picos de absorção. Portanto, uma mesma substância deve apresentar os mesmos grupos químicos e semelhança estrutural entre os picos de absorção na espectroscopia.

Todos estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura quando se comparam os espectros de infravermelho, tanto para a quitina e quitosana obtidas por via microbiológica, assim como para os polissacarídeos obtidos a partir de crustáceos, que são consideradas as fontes mais tradicionais para obtenção desses polímeros (SYNOWIECKI; AL-KHATTEB 1997; AMORIM et al., 2000; ANDRADE et al., 2000; AMORIM et al., 2006; FAI et al., 2011; STAMFORD et al., 2013; BERGER et al., 2014).

5.1.3 Determinação do peso molecular

A viscosidade de soluções poliméricas é mensurada através do volume hidrodinâmico (tamanho ou extensão no espaço) do polímero em solução. A viscosidade de soluções poliméricas diluídas é muito maior que a do solvente puro, ou de soluções diluídas de pequenas moléculas, devido à grande diferença de tamanho entre as moléculas do polímero e a do solvente. A viscosidade aumenta à medida que as dimensões das moléculas poliméricas em solução aumentam. Portanto, a viscosidade polimérica é o resultado da comparação entre o tempo de escoamento do solvente em um capilar e o tempo de escoamento da solução polimérica a determinada concentração e temperatura (STAMFORD-ARNAUD, 2012).

Apesar de não ser um método absoluto, podemos utilizar essa mediada para estimar/determinar a massa molar média de polímeros, utilizando-se um viscosímetro e um capilar tipo Cannon-Fenske (STAMFORD-ARNAUD, 2012). Na tabela 4,

encontram-se os resultados da viscosidade intrínseca e massa molar média de cada quitosana utilizada no presente trabalho. Os valores encontrados para a quitosana Kiofine[®] são semelhantes aos encontrados por outros autores que também trabalharam com quitosana fúngica. Vasconcelos de Oliveira et al. (2014) extraiu a quitosana do *Mucor circinelloides* e encontrou uma massa molar de $1,7 \times 10^4$ g/mol. Da mesma forma, Tayel et al. (2010) trabalhando com *Muccor rouxii*, obteve quitosana com peso molecular que variou entre $1,9 \times 10^5$ g/mol a $2,1 \times 10^4$ g/mol.

Pesquisas que utilizaram quitosana de crustáceo também encontraram resultados semelhantes. Um exemplo é o trabalho de Assis et al. (2008), cuja quitosana de crustáceo utilizada apresentou uma massa molar viscosimétrica próxima de $4,6 \times 10^4$ g/mol.

Tabela 4: Valores da viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica média das quitosanas fungicas Kiofine[®] e Kionutrime[®].

Quitosana	Viscosidade intrínseca (mL/g)	Massa molar média (g/mol)
Kiofine B [®]	0,464	$4,35 \times 10^4$
Kionutrime [®]	0,039	4×10^3

Berger et al. (2014) obteve uma massa molar viscosimétrica de $4,08 \times 10^4$ g/mol e $5,05 \times 10^3$ g/mol, valores parecidos com os encontrados para as quitosanas do presente trabalho. Essas diferenças de massa molar viscosimétrica encontrada por Berger et al. (2014), ocorreu devido a diferentes métodos de extração da quitosana. A quitosana de massa molar mais alta refere-se a um método de extração que utiliza temperaturas mais amenas, enquanto que a quitosana de peso molar menor refere-se à quitosana extraída através de um método que utilizada autoclave e consequentemente temperaturas mais altas, fracionando mais a cadeia polimérica.

No presente trabalho, ambas as quitosanas foram extraídas do *Aspergillus niger* e são caracterizadas como de baixo peso molecular, no entanto há diferenças entre as viscosidades intrínsecas e a massa molar viscosimétrica das duas quitosanas. Isso pode ocorrer devido a diferenças no método de extração empregado pela empresa fornecedora

das quitosanas. Diferentes métodos de extração de quitosana fúngica influenciam nas características físico-químicas do polímero e repercute sobre sua massa molar viscosimétrica (Berger et al., 2014).

A massa molar viscosimétrica é uma importante propriedade da quitosana usada em coberturas para frutas, porque a quitosana com uma baixa massa molar viscosimétrica pode reduzir a resistência a tração ao longo da película de cobertura sem aumentar a permeabilidade (POCHANAVANICH; SUNTORNUSUK, 2002). Além disso, a determinação do peso molecular é importante, porque segundo alguns autores a quitosana de baixo peso molecular, como a encontrada na presente pesquisa, apresenta uma maior atividade antimicrobiana, ou seja, quanto menor o peso molecular desse polímero maior sua atividade antimicrobiana (LIU et al., 2006; CAO; SUN, 2009; GANAN et al., 2009; TAYEL et al., 2010). Isso ocorre devido a maior solubilidade que a quitosana de baixo peso molecular apresenta, proporcionando uma maior interação desse polímero com os sítios ativos do microrganismo (AIDER, 2010; YOUNES et al., 2014).

5.4 Caracterização das nanopartículas de quitosana

Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Medidas de tamanho por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Enquanto a microscopia eletrônica fornece apenas uma imagem da partícula isolada do meio, o DLS possibilita a determinação dos raios hidrodinâmicos das partículas em suspensão, demonstrando uma média de tamanho das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

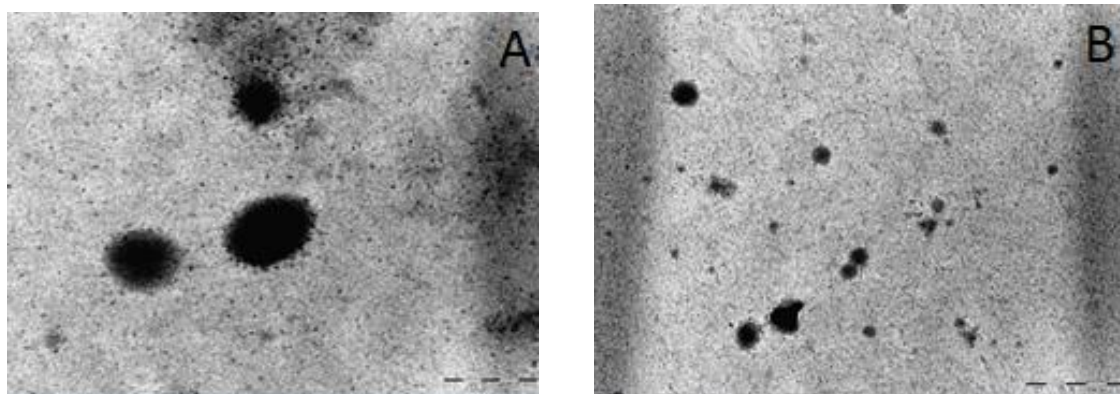
Segundo a distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana (Tabela 5), foram encontrados diâmetro médio de 139,1 e 101,7nm para as partículas sem e com tratamento térmico, respectivamente. Resultados semelhantes às nanopartículas sem tratamento térmico foram encontrados por Yang et al. (2010), Fan et al. (2012), e por Rampino et al. (2013).

Tabela 5: Média de tamanho das nanopartículas com e sem tratamento térmico.

Nanopartículas	Média de tamanho (nm)
Sem tratamento térmico	139,1 ± 14,74
Com tratamento térmico	101,7 ± 5,05

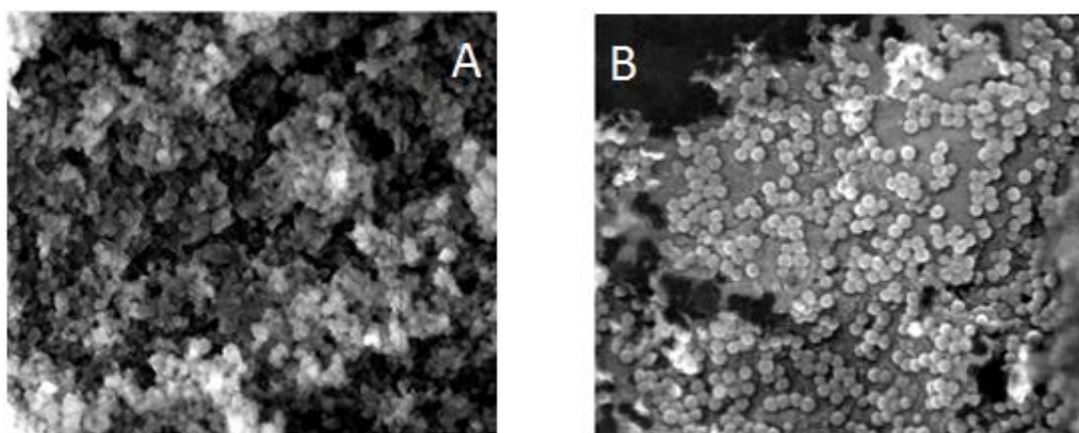
As nanopartículas com tratamento térmico apresentaram um diâmetro médio inferior as partículas sem tratamento e semelhante ao descrito por Ramezani et al. (2015), que ao produzirem nanopartículas de quitosana para conservação de filés de peixe obteve um diâmetro médio de 108,6nm. Contudo, Mohammadi et al. (2015), produziram nanopartículas de quitosana com e sem a encapsulação de óleo essencial de *Zataria multiflora* para conservação de morangos. Os diâmetros apresentados variaram entre 124,67 a 174,03nm para as partículas com diferentes quantidades do óleo encapsulado e um diâmetro de 96,93nm para as nanopartículas de quitosana sem o óleo, valores semelhantes ao encontrado em nosso estudo e utilizados também para conservação de um fruto.

A MET é outra forma de visualização das nanopartículas e através dela podemos observar também a morfologia das partículas. Na figura 8A, observamos partículas com tamanho de 100, 160 e 200nm cuja média é semelhante ao que foi encontrado no DLS. Na figura 8B verifica-se uma parte da amostra com várias partículas dispersas sem a formação de agregados.

Figura 8: MET das nanopartículas de quitosana sem tratamento térmico.

A morfologia das partículas pode ser observada também pela MEV (Figura 9). Essa microscopia mostra resultados semelhantes ao encontrado pelo DLS e MET. As nanopartículas com tratamento térmico (9B) mostram-se mais homogêneas, circulares e menores em relação ao grupo sem tratamento térmico (9A). No outro grupo, observa-se partículas com formato não esférico, tamanhos bastante diversos e formação de agregados, diferentemente ao que foi visto na figura 9B.

Figura 9: MEV das nanopartículas de quitosana sem (A) e com (B) tratamento térmico.



A MEV confirma o que Bugnicourt et al. (2014) preconizam em relação ao tratamento térmico empregado nas nanopartículas, que esse processo serve para reduzir os agregados e com isso individualizar as partículas. Isso ocorre devido à reestruturação das cadeias de quitosana que com o aumento da temperatura, o efeito hidrofóbico entre as cadeias pode ser predominante e as cadeias poliméricas podem colapsar na superfície das nanopartículas. A redução de tamanho nas nanopartículas com tratamento térmico também foi observada por, Bugnicourt et al. (2014), que obtiveram partículas de 143nm antes do tratamento e de 129nm após o tratamento, valores semelhantes ao encontrado em nosso estudo.

Normalmente, as nanopartículas apresentam diâmetro médio entre 100 e 300nm, no entanto, pode-se obter partículas com diâmetros entre 50 e 70nm (DU et al., 2008). Um fator determinante do diâmetro médio é a metodologia empregada. Vários fatores podem ser manipulados durante o processo de preparação, entre eles, a concentração de

quitosana, pH da solução e proporção entre quitosana:TPP (GAN et al., 2005; GREHA et al., 2005; NASTI et al., 2009).

Neves et al., (2014), realizou um planejamento fatorial para determinar as melhores condições para produção das nanopartículas de quitosana para utilização na área farmacêutica e constatou que a proporção de quitosana:TPP de 3:1 foi a melhor para produção das partículas que obtiveram diâmetros de 82,5nm. Além disso, Neves et al. (2014) salienta que essa proporção encontrada depende do grau de desacetilação e massa molecular da quitosana. Com relação ao tamanho das nanopartículas, sabe-se que partículas com tamanho menor que 80nm permite sua penetração em tecidos através de finos capilares, o que viabiliza sua utilização na área farmacêutica (GAN et al., 2005). Contudo, na área de alimentos essa característica não é desejável.

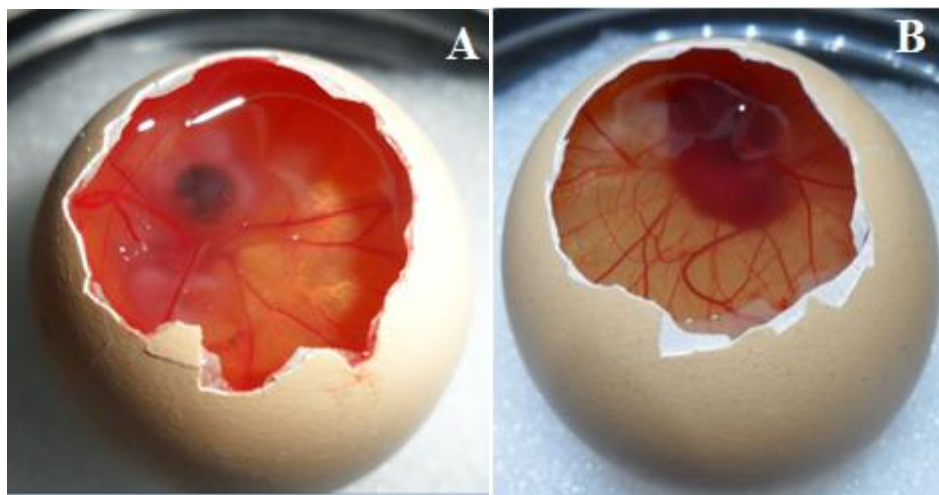
No presente trabalho, a utilização das nanopartículas tem função conservante, como antimicrobiano, com a intenção de preservação das uvas sem causar danos ou acúmulo ao organismo humano. Portanto, foi escolhido para a utilização nos demais experimentos as nanopartículas que passaram por tratamento térmico e que apresentaram tamanho homogêneo, acima de 80 nm e que de acordo com a microscopia apresentaram morfologia esférica e estrutura compacta, compatível com as características de nanopartículas de quitosana.

5.3 Teste de citotoxicidade da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM)

O HET-CAM caracteriza-se como um ensaio de citotoxicidade de grande interesse científico devido ao baixo custo, efetividade e rapidez da análise quando comparada com outros testes *in vivo* (VARGAS et al., 2007; SAW et al., 2008). Os efeitos agudos induzidos por uma substância teste sobre os pequenos vasos sanguíneos e proteínas da membrana coriolantóide são propostos para ser semelhantes ao teste do olho do coelho, contudo apresenta a vantagem de ser mais universalmente aceitável como um teste não animal. As leis atuais que regulam a experimentação animal permitem a utilização de embriões de galinha com até 10 dias de fecundação sem a autorização dos comitês de experimentação animal (BAGLEY et al., 1994).

O ensaio foi utilizado para análise de efeitos inflamatórios e vasculares causados pelas nanopartículas de quitosana e gel de quitosana enriquecido com as nanopartículas. Não foi observado nenhuma mudança na membrana coriolantóide do embrião, sem sinal de ocorrência de hemorragia, vasoconstrição e coagulação (Figura 10). Resultado semelhante foi encontrado para as nanopartículas de quitosana produzidas por Rampino et al. (2013) e Baptista da Silva et al. (2016).

Figura 10: Resultados do HET-CAM para as nanopartículas de quitosana (A) e para o gel de quitosana enriquecido com nanopartículas (B).



É de extrema importância a avaliação toxicológica de materiais nanoestruturados, devido a seu tamanho e formato, capazes muitas vezes de penetrar em tecidos e causar danos celulares (RAMPINO et al., 2013). No presente estudo, as nanopartículas de quitosana sozinhas ou na presença do gel mostraram-se não-tóxicas de acordo com o HET-CAM, o que possibilita seu uso em alimentos e consequentemente para consumo humano.

Com relação ao gel de quitosana, já é bem descrito na literatura que seu uso é seguro e não-tóxico ao organismo humano. Segundo YADAV & BISHE, (2004), 18g de quitosana por quilograma de massa corporal não mostra qualquer sinal de toxicidade, o que também viabiliza sua utilização pela indústria de alimentos. Atualmente, o Japão, a Itália e a Finlândia aprovaram o uso desse polímero em aplicações dietéticas (KEAN; THANOU, 2010).

5.4 Atividade Antimicrobiana

A crescente demanda dos consumidores por alimentos sem conservantes químicos tem direcionado as pesquisas para produtos de origem natural com ação antimicrobiana (WANG 1992). Atualmente é bem documentado na literatura a ação antimicrobiana da quitosana contra fungos e bactérias (TSAI et al., 2002; LOPEZ-CABLLERO et al., 2005; OJAGH et al., 2010). Essa ação antimicrobiana depende de vários fatores entre eles, o tipo de quitosana, grau de desacetilação, peso molecular, pH do meio e microrganismo envolvido (HOSSEINNEJAD; JARAFI, 2016).

Os resultados do CIM e CBM encontram-se nas tabelas 6 e 7, respectivamente. O gel de quitosana apresentou os melhores resultados para *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S.aureus* e os maiores valores de CIM e CBM para a *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*. Alguns autores relatam que a quitosana possui um maior efeito antimicrobiano contra bactérias gram-positivas, do que para gram-negativas. Isso deve-se as diferentes características da superfície bacteriana, que no caso da bactéria gram-negativa apresenta uma membrana externa lipopolissacarídica com carga negativa (NO et al., 2002; ZHONG et al., 2008).

Contudo, outros estudos referem que a ação antimicrobiana da quitosana é maior contra bactérias gram-negativas (DEVLIEGHERE et al., 2004; LI et al., 2010). Esse tipo de bactéria apresenta uma membrana constituída essencialmente de lipopolissacarídeos contendo fosfato e pirofosfato, os quais conferem uma densidade de cargas negativas superior a observada nas bactérias gram-positivas (membrana composta de peptideoglicanos associado a polissacarídeos). A maior densidade de cargas negativas favorece a ligação da quitosana a célula microbiana, causando vazamento do material intracelular e portanto, maior efeito inibitório (CHUNG et al., 2004; GOY et al., 2009).

No presente trabalho, o gel de quitosana obteve o menor CIM e CBM (3mg/ml) para bactérias gram-negativas, porém a *Salmonella spp.* que também faz parte desse grupo de bactérias obteve um dos maiores valores de CIM e CBM (6mg/ml). Esses resultados estão de acordo com o preconizado por Devlieghere et al. (2004), que relata que a ação antimicrobiana da quitosana depende também de outros fatores como a cepa utilizada e a espécie analisada. Segundo Goy et al. (2009), em ambos os tipos de bactérias (gram-negativa e gram-positiva), a quitosana parece agir diferentemente na superfície bacteriana, mas de forma satisfatória.

Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM) do gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas.

Bactéria	Gel (mg/ml)	Nanopartículas (mg/ml)	Gel + nanopartículas (mg/ml)
<i>E.coli</i>	3,0	3,0	2,0
<i>Salmonella spp.</i>	6,0	3,0	3,0
<i>P. aeruginosa</i>	3,0	3,0	2,0
<i>S. aureus</i>	4,0	2,0	1,0
<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3,0	2,0

Tabela 7: Concentração bactericida mínima (CBM) do gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas.

Bactéria	Gel (mg/ml)	Nanopartículas (mg/ml)	Gel + nanopartículas (mg/ml)
<i>E.coli</i>	4	3	4
<i>Salmonella spp.</i>	6	6	6
<i>P. aeruginosa</i>	3	4	4
<i>S. aureus</i>	4	6	2
<i>L. monocytogenes</i>	6	6	2

Apesar da divergência em torno do mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana em relação às bactérias gram-positivas e gram-negativas, sabe-se que a quitosana é capaz de causar enfraquecimento e danos na parede celular e até provocar lise celular (EATON et al., 2008). Uma vez perdida a proteção da parede celular, a membrana pode ser modificada e ocorrer alteração de sua permeabilidade. O aumento da permeabilidade celular leva a desestabilização da membrana e vazamento de substância intracelular, ocasionando a morte da célula (KONG et al., 2008).

Portanto, o mecanismo de ação da quitosana não é simples e resulta em diversos eventos que ocorrem simultaneamente e/ou sucessivamente. Resumidamente ele ocorre da seguinte forma: (1) adsorção na superfície da célula bacteriana, (2) difusão através da

parede celular, (3) adsorção dentro da membrana do citoplasma, (4) ruptura da membrana citoplasmática, (5) vazamento dos constituintes citoplasmático e (6) morte celular (IKEDA; TAZUKE, 1984).

Além disso, a quitosana de baixo peso molecular pode penetrar no citoplasma bacteriano e inibir a síntese de RNAm e proteínas. Pode também causar a morte do microrganismo formando uma barreira externa, quelante de metais, que provoca a supressão de nutrientes essenciais para o crescimento da bactéria (GOY et al., 2009).

Apesar da ação antimicrobiana do gel de quitosana está bem descrito na literatura, as propriedades antimicrobianas das nanopartículas ainda são limitadas. Contudo, quando a atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana é estimada, normalmente, refere-se a microrganismos patogênicos como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* (MORITZ et al., 2013). Essas bactérias são responsáveis pela maioria das várias infecções em humanos e representam uma das maiores ameaças a saúde dos consumidores de alimentos, o que justifica a escolha e importância destas bactérias no presente trabalho.

Os resultados encontrados mostram uma melhora na ação antimicrobiana das nanopartículas quando comparado ao gel. Houve uma diminuição no CIM para *Salmonella spp.*, *S.aureus* e *L. monocytogenes* e no CBM para *E.coli* frente as nanopartículas quando comparada ao gel. Qi et al. (2004), também obtiveram resultados melhores com as nanopartículas para *E.coli.*, *S. aureus* e *Salmonella spp.*, do que com o gel de quitosana. Essa melhora da atividade antimicrobiana deve-se a maior área superficial e densidade de carga das nanopartículas de quitosana, pois há uma maior interação dessas partículas com a célula bacteriana, o que causa vazamento de componentes intracelulares, ocasionando a morte do microrganismo (QI et al., 2004; SHI et al., 2006; BARANI et al., 2012).

As nanopartículas de quitosana apresentam CIM de 2,0mg/mL para *S. aureus*, sendo estes resultados melhores do que os encontrados (2,5mg/ml) por Madureira et al. (2015), quando produziu nanopartículas de quitosana de alto peso molecular. Para *E.coli* foi encontrado CBM (3,0mg/ml) ligeiramente superior ao de Madureira et al. (2015) (2,8mg/ml), contudo as diluições testadas na presente pesquisa foram de 3 e 2,5mg/mL, não sendo abrangida a concentração de 2,8mg/mL. Com relação ao gel de quitosana diferenças entre os valores de CIM também foram encontrados na literatura e na presente

pesquisa. Um exemplo é a pesquisa descrita por Tayel et al. (2010), que trabalhando com *E.coli* e *P. aeruginosa* obtiveram CIM igual a 2mg/ml para ambas as bactérias, cujo valor é de 1mg/ml inferior ao encontrado na presente pesquisa.

Essas discrepâncias entre os resultados de CIM e CBM relatados na literatura são explicadas por Devlieghere et al. (2004). Segundo esse autor, comparar os valores de CIM e CBM de diferentes estudos é difícil, por causa da possibilidade de diferenças nas características da quitosana utilizada, na temperatura de incubação, pH, solvente, cepa e espécies analisadas.

Com relação ao gel de quitosana enriquecido com nanopartículas, percebemos que a melhora na ação antimicrobiana ocorreu em quase todas as bactérias, com exceção da *Salmonella spp.*, cujos valores de CIM e CBM mantiveram-se iguais aos determinados para as nanopartículas puras. Os valores de CBM da *E.coli* e *P. aeruginosa* permaneceram iguais aos valores de CBM, respectivamente encontrados, para o gel e para as nanopartículas sozinhas. No gel de quitosana as nanopartículas apresentam-se mais dispersas e segundo Lee et al. (2010), as nanopartículas quando bem dispersas na solução são mais eficientemente transportadas para a parede celular da bactéria causando distúrbios e levando a uma maior atividade antimicrobiana.

Em relação à atividade antimicrobiana, uma cobertura mais homogênea é desejável, pois fornece uma proteção mais efetiva entre a fruta e o ambiente externo (Tezotto-Uliana et al., 2014), como consequência, a transferência de oxigênio e a atividade respiratória do microrganismo são prejudicadas (Aquino et al., 2015). Portanto, tendo em vista estes aspectos, no presente trabalho foi escolhido o gel de quitosana enriquecido com nanopartículas para posterior aplicação nas uvas.

5.5 Efeito da cobertura comestível sobre os parâmetros físico-químico das uvas

5.5.1 Análise da umidade, pH, acidez total titulável, sólidos solúveis, açúcar redutor e antocianinas

Algumas mudanças nos parâmetros físico-químicos foram observadas nas uvas com e sem cobertura a base de nanopartículas, durante o armazenamento a temperatura ambiente (25°C – 12 dias) (Tabela 8) e de refrigeração (12°C – 24 dias) (Tabela 9).

A determinação do teor de umidade mostrou que as uvas controle, armazenadas em ambas as temperaturas, apresentaram o menor percentual de umidade ($p < 0,05$). A única exceção foi o tempo 0 e 6 (12°C), em que o controle não teve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras CIM/2 e CIM. As uvas 2CIM destacaram-se como as amostras que apresentaram maior teor de umidade na maioria dos dias analisados e muitas vezes sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre 2CIM e CIM, demonstrando a importância da cobertura comestível na manutenção da umidade da fruta.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ali et al. (2011) trabalhando com quitosana para cobertura comestível em mamão e por Velickova et al. (2013) que utilizou quitosana e cera de abelha para formação de cobertura comestível aplicada em morangos. Normalmente, as mudanças gasosas entre a fruta e atmosfera ocorrem devido a poros abertos e a maior permeabilidade através da pele da fruta (AMARANTE et al., 2001). Portanto, a cobertura comestível formada de nanopartículas bloqueia esses poros presentes na uva, evitando a perda de umidade e controlando a taxa respiratória da fruta.

Nos tempos zero (refrigerado e não refrigerado) e 12 (não refrigerado), o conteúdo de sólidos solúveis não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre as uvas com e sem coberturas comestíveis com nanopartículas de quitosana. No entanto, nos outros tempos analisados foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de sólidos solúveis das uvas com e sem cobertura. Os menores valores foram encontrados na amostra com nanopartículas na concentração 2CIM e CIM.

A diminuição no conteúdo de sólidos solúveis em uvas induzidas pela quitosana ocorre devido a uma diminuição da atividade respiratória e metabólica da fruta, retardando o processo de amadurecimento (Vasconcelos de Oliveira et al., 2014). Essa propriedade é potencializada quando a quitosana apresenta-se no formato de nanopartículas, o que pode ser confirmado pelas menores concentrações de sólidos solúveis observada na amostra com a maior concentração de nanopartículas (2CIM). Além disso, a propriedade filmogênica da cobertura comestível de gel e nanopartículas de quitosana permite que se forme uma barreira semipermeável em torno da uva, modificando a atmosfera interna com a diminuição do gás oxigênio e/ou aumento do gás carbônico e supressão da produção de etileno (DONG et al., 2004).

Tabela 8 – Média dos valores dos parâmetros físico-químico das uvas armazenadas a temperatura ambiente (25°C) por 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	6	12
Sólidos solúveis (°Brix)			
Controle	13 ($\pm 1,00$) ^{abA}	15 ($\pm 1,00$) ^{aA}	12 ($\pm 0,00$) ^{bA}
CIM/2	13 ($\pm 0,50$) ^{bA}	15 ($\pm 0,50$) ^{aA}	12 ($\pm 0,00$) ^{bA}
CIM	12,5 ($\pm 0,50$) ^{aA}	12,6 ($\pm 0,00$) ^{aB}	12 ($\pm 0,00$) ^{aA}
2CIM	11,5 ($\pm 0,00$) ^{bA}	13 ($\pm 0,50$) ^{aB}	11,5 ($\pm 0,50$) ^{bA}
Acidez titulável (% ác. tartárico)			
Controle	0,9 ($\pm 0,01$) ^{aA}	0,69($\pm 0,00$) ^{cA}	0,77 ($\pm 0,00$) ^{bA}
CIM/2	0,99 ($\pm 0,02$) ^{aA}	0,74($\pm 0,06$) ^{bA}	0,80 ($\pm 0,03$) ^{bA}
CIM	0,84 ($\pm 0,02$) ^{aB}	0,66($\pm 0,06$) ^{bA}	0,74 ($\pm 0,02$) ^{bAB}
2CIM	0,90 ($\pm 0,01$) ^{aA}	0,70($\pm 0,03$) ^{bA}	0,71 ($\pm 0,00$) ^{bB}
pH			
Controle	3,84 ($\pm 0,18$) ^{aA}	4,09($\pm 0,00$) ^{aA}	4,04 ($\pm 0,01$) ^{aB}
CIM/2	3,87 ($\pm 0,01$) ^{bA}	3,93($\pm 0,07$) ^{bA}	4,04 ($\pm 0,04$) ^{aB}
CIM	3,76 ($\pm 0,10$) ^{aA}	3,75($\pm 0,25$) ^{aA}	4,08 ($\pm 0,00$) ^{aA}
2CIM	3,88 ($\pm 0,05$) ^{cA}	4,00($\pm 0,00$) ^{bA}	4,07 ($\pm 0,00$) ^{aA}
Umidade (%)			
Controle	84,20 ($\pm 0,07$) ^{bB}	84,5 ($\pm 0,30$) ^{bC}	86,65 ($\pm 0,68$) ^{aB}
CIM/2	88,28 ($\pm 0,38$) ^{aA}	86,7 ($\pm 0,22$) ^{bB}	88,66 ($\pm 0,07$) ^{aA}
CIM	88,18 ($\pm 0,30$) ^{aA}	88,0 ($\pm 0,43$) ^{aA}	88,03($\pm 0,04$) ^{aA}
2CIM	88,56 ($\pm 0,15$) ^{aA}	88,0 ($\pm 0,20$) ^{aA}	88,81($\pm 0,63$) ^{aA}
Açúcar redutor (g/100g)			
Controle	13,11 ($\pm 0,13$) ^{aA}	12,21($\pm 0,0$) ^{bA}	9,81 ($\pm 0,22$) ^{cA}
CIM/2	10,42 ($\pm 0,73$) ^{aB}	10,44($\pm 0,34$) ^{aB}	9,04 ($\pm 0,05$) ^{bB}
CIM	11,49 ($\pm 1,53$) ^{aAB}	9,7($\pm 0,25$) ^{abC}	9,05 ($\pm 0,36$) ^{bB}
2CIM	9,24 ($\pm 0,52$) ^{aB}	8,38($\pm 0,04$) ^{bD}	8,76 ($\pm 0,01$) ^{abB}
Antocianina (mg/100g)			
Controle	111,16 ($\pm 5,92$) ^{cA}	218,7($\pm 1,62$) ^{aB}	147,68 ($\pm 5,67$) ^{bB}
CIM/2	113,19 ($\pm 6,23$) ^{cA}	224,75($\pm 12,9$) ^{aAB}	164,08 ($\pm 6,93$) ^{bA}
CIM	107,73($\pm 3,26$) ^{cA}	267,37($\pm 0,91$) ^{aA}	120,63 ($\pm 1,92$) ^{bC}
2CIM	117,24 ($\pm 7,29$) ^{bA}	249,69($\pm 22,81$) ^{aAB}	130,64 ($\pm 3,64$) ^{bC}

^{a-c} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey. ^{A-D} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Tabela 9 – Média dos valores dos parâmetros físico-químico das uvas armazenadas em refrigeração (12°C) por 24 dias.

Tratamento	Dias de armazenamento				
	0	6	12	18	24
Sólidos solúveis (°Brix)					
Controle	16,0 (±0,50) ^{bA}	16,0 (±0,10) ^{bA}	16,4(±0,01) ^{abA}	17,0 (±0,10) ^{aA}	16,2 (±0,20) ^{bA}
CIM/2	16,6 (±0,01) ^{aA}	16,0 (±0,10) ^{abA}	16,6 (±0,76) ^{aA}	15,8 (±0,01) ^{abB}	15,0 (±0,50) ^{bB}
CIM	16,6 (±0,01) ^{aA}	15,8 (±0,01) ^{bB}	14,6 (±0,01) ^{eB}	15,6 (±0,01) ^{cC}	15,0 (±0,10) ^{dB}
2CIM	17,4 (±0,00) ^{aA}	14,6 (±0,00) ^{cC}	14,8 (±0,20) ^{cB}	15,2 (±0,01) ^{bD}	13,0 (±0,10) ^{dC}
Acidez titulável (% ác. tartárico)					
Controle	0,59 (±0,00) ^{bB}	0,59 (±0,00) ^{bD}	0,60 (±0,01) ^{bC}	0,55 (±0,00) ^{bD}	0,62 (±0,00) ^{aB}
CIM/2	0,63 (±0,00) ^{bA}	0,61 (±0,00) ^{bC}	0,66 (±0,02) ^{bB}	0,66 (±0,00) ^{bC}	0,73 (±0,01) ^{aA}
CIM	0,63 (±0,02) ^{cA}	0,70 (±0,00) ^{bB}	0,76 (±0,00) ^{aA}	0,72 (±0,00) ^{bB}	0,64 (±0,01) ^{cB}
2CIM	0,66 (±0,00) ^{bA}	0,72 (±0,00) ^{aA}	0,67 (±0,00) ^{bB}	0,76 (±0,01) ^{aA}	0,73 (±0,00) ^{aA}
pH					
Controle	3,45 (±0,00) ^{bA}	3,42 (±0,00) ^{bB}	3,43 (±0,00) ^{bB}	3,60 (±0,02) ^{aA}	3,46 (±0,02) ^{bA}
CIM/2	3,45 (±0,00) ^{bA}	3,45 (±0,00) ^{bA}	3,50 (±0,00) ^{aA}	3,51 (±0,00) ^{aB}	3,40 (±0,02) ^{cB}
CIM	3,41 (±0,01) ^{aB}	3,34 (±0,01) ^{bC}	3,36 (±0,00) ^{bD}	3,42 (±0,01) ^{aC}	3,43 (±0,01) ^{aAB}
2CIM	3,47 (±0,01) ^{aA}	3,27 (±0,01) ^{dD}	3,40 (±0,00) ^{bC}	3,40 (±0,00) ^{bC}	3,35 (±0,00) ^{cC}
Umidade (%)					
Controle	84,46(±0,04) ^{aA}	83,59(±0,11) ^{bC}	82,54(±0,14) ^{cC}	82,59(±0,25) ^{cB}	83,03(±0,47) ^{bcC}
CIM/2	84,15(±0,42) ^{aAB}	83,86(±0,32) ^{aBC}	84,37(±0,04) ^{aB}	84,72(±0,11) ^{aA}	84,98(±0,91) ^{aB}
CIM	84,24(±0,30) ^{bAB}	84,35(±0,42) ^{bB}	84,94(±0,05) ^{abA}	85,46(±0,11) ^{aA}	85,06(±0,25) ^{aB}
2CIM	83,58(±0,23) ^{cB}	85,41(±0,12) ^{bA}	85,05(±0,38) ^{bA}	84,93(±0,58) ^{bA}	87,77(±0,32) ^{aA}
Açúcar redutor (g/100g)					
Controle	12,83(±0,21) ^{aB}	12,02(±0,56) ^{bA}	12,54(±0,17) ^{abA}	12,93(±0,11) ^{aA}	12,61(±0,11) ^{abA}
CIM/2	13,37(±0,35) ^{aAB}	11,29(±0,63) ^{cA}	11,64(±0,15) ^{bcB}	12,54(±0,17) ^{bA}	11,54(±0,33) ^{cB}
CIM	14,24(±0,28) ^{aA}	9,95 (±0,01) ^{dB}	11,19(±0,03) ^{cBC}	11,99(±0,29) ^{bcB}	12,57(±0,58) ^{bA}
2CIM	13,51(±0,60) ^{aAB}	9,64 (±0,33) ^{cB}	11,05(±0,26) ^{bC}	11,61(±0,15) ^{bB}	9,88 (±0,10) ^{cC}
Antocianina (mg/100g)					
Controle	164,32(±2,86) ^{bA}	262,58(±3,36) ^{aA}	183,60(±1,61) ^{bA}	164,28(±1,32) ^{bB}	276,34(±17,44) ^{aA}
CIM/2	120,90(±3,11) ^{dB}	212,52(±5,04) ^{bB}	105,12(±7,49) ^{cC}	149,45(±3,32) ^{cC}	248,95(±8,32) ^{aA}
CIM	112,59(±9,98) ^{dB}	166,83(±3,49) ^{bD}	127,96(±12,18) ^{cdB}	140,96(±1,08) ^{cC}	207,09 (±7,71) ^{aB}
2CIM	103,59(±4,11) ^{cC}	182,58(±2,20) ^{bC}	97,45 (±9,12) ^{cD}	232,88(±5,46) ^{aA}	187,42(±11,56) ^{bB}

^{a-e} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey. ^{A-D} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Em muitos estudos a quitosana vem sendo utilizada junto a outros constituintes como os óleos essenciais, para potencializar seus efeitos antimicrobianos em relação as frutas. No entanto, Aquino et al. (2015) constatou que goiabas cobertas com quitosana, com ou sem óleo essencial misturado foi efetiva em diminuir o teor de sólidos solúveis. Isso mostra que o potencial efeito na diminuição dos sólidos solúveis deve-se principalmente a quitosana e, portanto, as nanopartículas constituídas de quitosana podem potencializar esses efeitos inerentes a quitosana, mostrando a importância da cobertura escolhida neste estudo.

Durante todo o armazenamento, em ambas as temperaturas, a amostra 2CIM apresentou os menores valores de açúcar redutor, diferindo significativamente das uvas controle ($p < 0,05$), com exceção apenas do tempo zero das uvas armazenadas em temperatura de refrigeração. Além disso, nos tempos 0, 6, 12 e 18, refrigerado, e 0 e 12, não refrigerado, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre CIM e 2CIM. Os resultados encontrados mostram que as maiores concentrações de nanopartículas de quitosana (CIM e 2CIM) foram responsáveis pela diminuição no conteúdo de açúcar redutor. Essa diminuição pode ser explicada pela supressão da taxa respiratória da fruta, causada pelas nanopartículas de quitosana, que diminui também a atividade metabólica, reduzindo a hidrólise de carboidratos em açúcar (HONG et al., 2012; NEETA et al., 2013).

A determinação de açúcares em frutas é um importante parâmetro para avaliar o estágio de maturação desse alimento (GAUTIER et al., 2008). Vários estudos mostram um aumento da frutose e glicose em estágios avançados de maturação (GLEWA et al., 2003; BASSON et al., 2010; ZHANG et al., 2010; WU et al., 2011). Além disso, os açúcares redutores juntamente com os ácidos orgânicos são componentes importantes de gosto e aroma, apresentando relevante papel na manutenção da qualidade de frutos e de seu valor nutritivo (ASHOOR; KNOX, 1982; WU et al., 2012).

Portanto, em nosso trabalho percebemos que as uvas contendo as maiores concentrações de nanopartículas de quitosana retardaram o estágio de maturação da fruta, o que levou a diminuição dos sólidos solúveis e açúcar redutor.

As coberturas produzidas diminuíram ($p < 0,05$) também as perdas de acidez titulável nas uvas armazenadas em refrigeração. Comportamento diferente foi observado nas uvas em temperatura ambiente em que foi mantido os valores de acidez titulável. A

diminuição da perda de acidez titulável em frutas cobertas com quitosana durante o armazenamento também foi observada em estudos realizados em morangos, cereja, goiaba e lichia, que sugerem uma diminuição da senescência das frutas causada pela cobertura de quitosana (DONG et al., 2004; HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008; HONG et al., 2012; PETRICCIONE et al., 2015).

Estudos prévios indicam que os ácidos orgânicos e os sólidos solúveis são consumidos pelo processo respiratório para manter a atividade normal da fruta durante seu armazenamento (ZHOU et al., 2008). A cobertura comestível torna-se uma alternativa para limitar este processo respiratório e metabólico da fruta diminuindo a perda de componentes nutricionais como os sólidos solúveis e acidez titulável (HAGENMAIER, 2005). Em nosso trabalho as frutas tratadas com cobertura de nanopartículas de quitosana, em refrigeração, foram as mais eficazes em retardar o consumo de componentes nutricionais importantes como a acidez titulável. As baixas temperaturas mostram-se como um processo adicional, que juntamente com a quitosana, são capazes de diminuir os processos fisiológicos das uvas e consequentemente retardar o consumo da acidez titulável (MENG et al., 2008).

Os valores de pH, entre os tratamentos, na maior parte do armazenamento refrigerado e não refrigerado não diferiram significativamente ($p > 0,05$), corroborando com os resultados de Sánchez-González et al. (2011). Em temperatura ambiente, o pH variou de 3,75 a 4,09 e em temperatura de refrigeração a variação foi de 3,27 a 3,51, resultados semelhantes ao encontrado por Kim et al. (2014). Segundo Kim et al. (2014), o tipo de cobertura, o tempo e a temperatura de armazenamento não afetam o pH das uvas significativamente ($p > 0,05$), o que pode ser confirmado em nosso estudo, pois, as diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana não influenciaram esse parâmetro físico-químico.

Portanto, as variações de pH em uvas pode ser atribuída a variabilidade natural da fruta e não aos tratamentos empregados. Mudanças observadas nos valores de pH durante alguns dias de armazenamento, deve-se a diferenças na composição de ácidos orgânicos das uvas (VARGAS et al., 2006).

O conteúdo de antocianinas nas uvas controle refrigeradas ($p < 0,05$) foi maior do que nas uvas com nanopartículas, com exceção apenas do dia 24 em que o controle não diferiu significativamente ($p > 0,05$) da amostra CIM/2. Esse maior acúmulo de

antocianina nas uvas controle pode estar relacionado ao seu avançado processo de amadurecimento, em que ocorre a síntese desse pigmento a partir da glicose (MENG et al., 2008). Portanto, a menor concentração de antocianina nas uvas (12°C) com as coberturas, sugere um efeito inibitório do envelhecimento da fruta. Esse efeito inibitório é mais pronunciado no armazenamento prolongado da fruta (KIM et al., 2014), como foi o caso das uvas refrigeradas analisadas em nosso estudo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gol et al. (2013) em morangos cobertos com quitosana, carboximetil celulose e hidroxipropilmetil celulose. Da mesma forma, Perez e Sanz (2001), detectaram também um menor acúmulo de antocianina em morangos armazenados em atmosfera controlada.

Em temperatura ambiente, nos dias 0 e 6, o teor de antocianina das uvas controle não diferiram significativamente ($p > 0,05$) da uvas com tratamento, resultado semelhante encontrado por Santos et al. (2012). Esse resultado mostra novamente a importância da temperatura de armazenamento como potencializador dos efeitos inibitórios da senescência da fruta causado pelas nanopartículas de quitosana. Em temperatura ambiente, esse efeito é menos pronunciado e, portanto, o teor de antocianina da amostra controle equivale-se ao da uvas com tratamento.

Segundo Falcão et al. (2007), as antocianinas presentes em uvas estão concentradas principalmente na casca, com exceção de poucas variedades cuja polpa também é pigmentada. De acordo com Mazza (1995), o conteúdo de antocianinas varia de 30-750mg/100g. Em nosso estudo, encontramos valores que variaram de 97,45 a 276,34mg/100g, dentro da faixa preconizada por Mazza (1995).

Rombaldi et al. (2004) encontrou valores mais altos trabalhando com outra variedade de uvas, em uvas Bordô os teores de antocianinas foi de 345 a 427mg/L. No entanto, Boas et al. (2014), encontrou para esse mesmo tipo de uva um total de antocianinas entre 757,61 e 760,15mg/L. Essa variação no conteúdo de antocianinas pode ser devido à diferença de cultivares e/ou mistura de variedades, da época de colheita, do clima e do solo das regiões produtoras (MAZZA, 1995).

5.5.2 Evolução da cor

Os resultados da análise da cor das uvas não refrigeradas e refrigeradas encontram-se nas tabelas 10 e 11, respectivamente. Em temperatura ambiente, o valor de L diminuiu ao longo dos 12 dias de análise das uvas controle e das uvas com as coberturas, mostrando que os frutos tornaram-se mais escuros. Resultado semelhante foi encontrado por Kim et al. (2014), quando pesquisou sobre a ação de nanoemulsão de óleo essencial de limão em uvas armazenadas a 4°C e 25°C.

Contudo, a manutenção dos valores de L ($p > 0,05$) foi observada nas uvas com nanopartículas armazenadas em refrigeração, diferentemente das uvas controle que tiveram diminuição dos valores de L. A perda de água e o escurecimento superficial são um dos responsáveis por causar a diminuição do brilho em frutas sem coberturas comestíveis como pode ser constatado na presente pesquisa e em outros estudos (RATTANAPONE et al., 2001; BRASIL et al., 2012). A manutenção do brilho das uvas com tratamento também foi observada por Santos et al. (2012), no entanto esse autor não encontrou diferenças nos valores de L das uvas armazenadas em diferentes temperaturas e cobertas com quitosana e óleo essencial de orégano.

Tabela 10 – Efeito das coberturas a base de nanopartículas de quitosana (CIM/2, CIM, 2CIM) sobre a cor das uvas armazenadas a temperatura ambiente (25°C) por 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	6	12
L*			
Controle	19,23 ($\pm 0,03$) ^{bB}	21,24 ($\pm 0,57$) ^{aA}	17,85 ($\pm 0,03$) ^{cA}
CIM/2	19,28 ($\pm 0,29$) ^{bB}	20,86 ($\pm 0,71$) ^{aA}	16,72 ($\pm 0,40$) ^{cB}
CIM	18,40 ($\pm 0,17$) ^{bC}	21,95 ($\pm 0,00$) ^{aA}	17,84 ($\pm 0,04$) ^{cA}
2CIM	20,07 ($\pm 0,17$) ^{aA}	20,26 ($\pm 0,96$) ^{aA}	18,02 ($\pm 0,23$) ^{bA}
a*			
Controle	1,91 ($\pm 0,28$) ^{aB}	1,63 ($\pm 0,04$) ^{abAB}	1,26 ($\pm 0,03$) ^{bB}
CIM/2	2,93 ($\pm 0,51$) ^{aAB}	1,81 ($\pm 0,26$) ^{bA}	0,91 ($\pm 0,22$) ^{cC}
CIM	2,93 ($\pm 0,03$) ^{aAB}	2,07 ($\pm 0,37$) ^{bA}	1,18 ($\pm 0,09$) ^{cB}
2CIM	3,96 ($\pm 0,58$) ^{aA}	1,12 ($\pm 0,07$) ^{bB}	1,56 ($\pm 0,00$) ^{bA}
b*			
Controle	0,97 ($\pm 0,08$) ^{cB}	1,19 ($\pm 0,02$) ^{bAB}	1,34 ($\pm 0,05$) ^{aB}
CIM/2	1,18 ($\pm 0,11$) ^{cAB}	1,52 ($\pm 0,02$) ^{bA}	1,83 ($\pm 0,01$) ^{aA}
CIM	1,36 ($\pm 0,06$) ^{bA}	1,21 ($\pm 0,01$) ^{bAB}	1,56 ($\pm 0,02$) ^{aB}
2CIM	1,38 ($\pm 0,08$) ^{aA}	1,10 ($\pm 0,26$) ^{aB}	1,51 ($\pm 0,14$) ^{aB}

^{a-c} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey. ^{A-C} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey. L* (luminosidade), a* (vermelho/verde) e b* (amarelo/azul).

A diminuição nos valores de L observado nas uvas a 25°C e na amostra controle a 12°C está relacionada também ao maior metabolismo destas frutas em que ocorre diversas reações enzimáticas e não enzimáticas, causando o seu escurecimento (ADILLETA et al., 2016). Isso nos mostra novamente que a cobertura comestível produzida em nosso trabalho quando aplicada em uvas refrigeradas retardam o processo de senescência da fruta. Esses resultados estão de acordo com Hoa & Ducamp (2008), Jo et al. (2014) e Sánchez-González et al. (2011) que mostraram que as coberturas comestíveis a base de polissacarídeos, como a quitosana, modificam a atmosfera interna de manga, maçã e uvas diminuindo as mudanças na cor dessas frutas.

Tabela 11 – Efeito das coberturas a base de nanopartículas de quitosana (CIM/2, CIM, 2CIM) sobre a cor das uvas armazenadas em refrigeração (12°C) por 24 dias.

Tratamento	Dias de armazenamento				
	0	6	12	18	24
L*					
Controle	19,18(±1,97) ^{aA}	14,70(±0,07) ^{bB}	15,22(±1,28) ^{bB}	18,48(±1,13) ^{aA}	16,29(±0,81) ^{bAB}
CIM/2	17,32(±1,54) ^{abA}	15,83(±0,39) ^{bAB}	13,76(±0,73) ^{bB}	19,97(±2,56) ^{aA}	15,0(±0,12) ^{bB}
CIM	18,96(±1,19) ^{bA}	17,68(±1,47) ^{bA}	23,29(±0,94) ^{aA}	17,92(±0,54) ^{bA}	17,0(±0,64) ^{bA}
2CIM	18,87(±0,40) ^{bA}	16,17(±0,45) ^{cAB}	21,35(±0,84) ^{aA}	20,40(±1,49) ^{aA}	17,68(±0,28) ^{bA}
a*					
Controle	2,58 (±0,05) ^{aB}	1,42 (±0,00) ^{cB}	1,62(±0,24) ^{cAB}	1,61 (±0,20) ^{cB}	2,00 (±0,11) ^{bA}
CIM/2	2,93 (±0,42) ^{aAB}	2,05 (±0,21) ^{bAB}	1,84(±0,09) ^{bcA}	1,68(±0,04) ^{bcB}	1,30 (±0,08) ^{cB}
CIM	3,18 (±0,08) ^{Aa}	2,34 (±0,56) ^{bA}	1,65(±0,01) ^{cAB}	1,58 (±0,03) ^{cB}	1,50 (±0,01) ^{cB}
2CIM	2,33 (±0,27) ^{bcB}	2,52 (±0,04) ^{aA}	1,36 (±0,07) ^{cB}	2,06 (±0,04) ^{bA}	1,41 (±0,08) ^{cB}
b*					
Controle	1,21 (±0,28) ^{bA}	1,46 (±0,04) ^{bA}	1,49 (±0,08) ^{bA}	1,53 (±0,04) ^{bA}	2,13 (±0,07) ^{aA}
CIM/2	1,40 (±0,10) ^{bA}	1,47(±0,01) ^{bA}	1,68 (±0,26) ^{bA}	1,62 (±0,22) ^{bA}	2,27 (±0,02) ^{aA}
CIM	1,38 (±0,29) ^{abA}	1,25 (±0,13) ^{bB}	1,71 (±0,12) ^{aA}	1,62(±0,09) ^{abA}	1,71 (±0,06) ^{aB}
2CIM	1,02 (±0,06) ^{bA}	1,59 (±0,01) ^{aA}	1,79 (±0,06) ^{aA}	1,63 (±0,21) ^{aA}	1,66 (±0,07) ^{aB}

^{a-c} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey. ^{A-B} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey. L* (luminosidade), a* (vermelho/verde) e b* (amarelo/azul).

Os valores positivos e perto de zero de a* nas frutas com e sem refrigeração mostram o acúmulo de antocianina nas uvas, já que esse pigmento apresenta uma coloração vermelha e são os principais responsáveis pela cor das uvas (HERNANDEZ-HERRERO; FRUTOS, 2014). O mesmo comportamento foi observado para os valores

de b^* , o que nos mostra que as uvas controle e as uvas com nanopartículas de quitosana foram predominantemente roxas ao longo do tempo de armazenamento nas duas temperaturas analisadas. Pequenas mudanças nos valores de a^* e b^* são bons indicativos da ausência de escurecimento oxidativo nas frutas (ROCHA; MORAES, 2000), o que nos mostra a efetividade da cobertura comestível a base de nanopartículas em controlar o metabolismo das uvas.

5.5.3 Perda de peso das uvas

A determinação da perda de peso nas uvas é uma análise extremamente importante, pois a perda de peso está associada a várias reações indesejáveis nos frutos, como por exemplo: escurecimento dos tecidos, degradação de vitaminas, aumento da atividade enzimática, mudanças na textura, aumento da taxa de crescimento microbiano, maior susceptibilidade a decomposição fúngica e perda de umidade (VALVERDE et al., 2005). Do ponto de vista econômico, a elevada perda de peso causa murchamento e perda de qualidade do fruto diminuindo a comercialização do produto (VILA, 2004).

No presente trabalho foi encontrada menor perda de peso nas uvas tratadas com gel e nanopartículas de quitosana fúngica tanto para o armazenamento refrigerado (controle: 1,72%; CIM/2: 2,26%; CIM: 1,63%; 2CIM: 1,43%) assim como para o armazenamento a temperatura ambiente (controle: 0,85%; CIM/2: 0,81%; CIM: 0,49%; 2CIM: 0,79%). Esses resultados estão de acordo com Eshghi et al. (2014), que trabalhando também com coberturas comestíveis de nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana+cobre, observou que essas coberturas mostraram-se efetivas em reduzir a perda de peso de morangos.

Segundo Deng et al. (2006) é aceitável para uvas uma perda de peso de até 5% e em nosso estudo foi observado valores bem abaixo desse percentual. Gao et al. (2013), analisando uvas tratadas com quitosana também observou valores abaixo de 5%. As uvas armazenadas a 0°C por 60 dias tiveram percentual de perda de peso de 1,44% para as frutas cobertas com quitosana e 4,74% para as uvas controle. No entanto, com o aumento da temperatura de armazenamento para 20°C por 3 dias após os 60 dias a 0°C, as uvas controle apresentaram perda de peso de 7,57%, acima do valor estipulado como aceitável por Deng et al., (2006).

Várias pesquisas demonstram que a perda de peso está associada com o processo de respiração e evaporação de água da fruta, ou seja, com o aumento da temperatura, aumenta a taxa respiratória da fruta e consequentemente a perda de umidade e peso. Além disso, a água é absorvida pela quitosana na superfície da fruta, pois a propriedade higroscópica desse polímero melhora a formação da barreira contra água entre a fruta e o ambiente externo, com isso reduzindo as transferências externas (MORILLON et al., 2002; OLIVAS; BARBOSA-CANOVAS, 2005; XU et al., 2007).

Foi observado que houve um aumento na perda de peso das uvas refrigeradas quando comparamos com as uvas não refrigeradas. No 12º dia de análise das uvas refrigeradas foi observado uma menor perda de peso (controle: 0,15%, CIM/2: 0,13%, CIM: 0,13%, 2CIM: 0,4%) em relação ao 12º de análise das uvas não refrigeradas (controle: 0,85%, CIM/2: 0,81%; CIM: 0,49%; 2CIM: 0,79%). No entanto, por causa do maior tempo de análise para as uvas refrigeradas (24 dias) em relação as não refrigeradas (12 dias), houve uma maior perda de peso ao final do período de análise das uvas refrigeradas devido ao avançado metabolismo da fruta. A perda de peso durante o armazenamento a baixa temperatura também foi observado em framboesas (KRÜGER et al., 2011). De qualquer forma, as coberturas comestíveis são responsáveis por criar uma atmosfera modificada ao redor do produto perecível, permitindo a extensão da vida de prateleira através do controle das trocas gasosas e prevenção da excessiva da perda de peso (ALI et al., 2015).

5.5.4 Percentual de decomposição das frutas

O menor percentual de decomposição encontrado foi o das uvas refrigeradas (controle: 6,66%; CIM/2: 6,66%; CIM: 0%; 2CIM: 0%). As uvas não refrigeradas apresentaram resultados aproximadamente duas vezes mais elevados para o controle (15%) e o CIM/2 (12,5%) em relação as frutas refrigeradas. A amostra CIM (0%) foi a única que manteve a inibição total de infecções em ambas as temperaturas, diferentemente da amostra 2CIM que inibiu completamente as infecções a temperatura de refrigeração, mas a temperatura ambiente seu percentual de infecção aumentou 12,5%.

Segundo Meng et al. (2008), as uvas armazenadas a baixa temperatura apresentam uma diminuição nos processos fisiológicos da fruta e um enfraquecimento dos patógenos,

o que reduz a incidência de apodrecimento da uva armazenada em refrigeração em comparação com as frutas armazenadas a temperatura ambiente, corroborando com os resultados encontrados na presente pesquisa.

Os resultados encontrados estão de acordo com vários outros estudos que trabalharam com gel de quitosana aplicada em diferentes tipos de frutas (BAUTISTA-BANOS et al., 2006; ROMANAZZI et al., 2012; FELIZIANI et al., 2013; SHIEKH et al., 2013; YOUWEI; YINZHE, 2013). Segundo Al-Qurashi e Awad (2015), o tratamento com quitosana melhora o sistema antioxidante das uvas o que possibilita um controle metabólico mais efetivo dos níveis de radicais livres, mantendo a integridade da membrana celular da fruta e melhorando a resistência contra agentes patogênicos.

Outro mecanismo de ação da quitosana responsável pelo menor incidência de infecção em frutas é relatado por Reddy et al. (2000) e Neeta et al. (2013). Segundo esses autores, a quitosana retarda o processo de senescência nas frutas, com isso a resistência a infecções de origem fúngica pode ser melhorada pela retardo dessa senescência. Porém, essa característica da quitosana é potencializada quando este polímero encontra-se no formato de nanopartículas (CRUZ-ROMERO et al., 2013) e com isso é capaz de inibir completamente o aparecimento de infecções visíveis na fruta, como foi o caso da amostra CIM (refrigerado e não refrigerado) e da amostra 2CIM (refrigerado).

Portanto, em nosso estudo, os resultados confirmam a ideia de que as nanopartículas de quitosana são efetivas em inibir o crescimento de microrganismos e em uvas esse efeito inibidor pode ser potencializado em baixas temperaturas.

5.6 Bioatividade das coberturas comestíveis sobre o crescimento bacteriano nas uvas

As tabelas 12 e 13 mostram o resultado do estudo *in vivo* das diferentes concentrações de nanopartículas em uvas não refrigeradas e refrigeradas infectadas artificialmente pela *E.coli*.

As amostras controle, em ambas as temperaturas, apresentaram os valores máximo de *E.coli* detectado pela técnica do NMP. Neste caso, a temperatura de armazenamento não interferiu nos resultados encontrados. Porém, as amostras CIM e 2CIM, foram as mais eficazes na inibição da *E.coli*, além disso, a temperatura de armazenamento mostrou-

se um fator potencializador dessa inibição. Baixas temperaturas têm sido sugeridas como um ponto crítico no controle da contaminação microbiana em frutas e vegetais, inclusive eficaz em manter a qualidade pós-colheita de uvas (JESSUP, 1992; CARTER et al., 2015).

Tabela 12: Sobrevivência de *E.coli* (NMP/g) em uvas não refrigeradas (25°C) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas.

TRATAMENTO	DIA DE ARMAZENAMENTO						
	0	2	4	6	8	10	12
Controle	210	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100
CIM/2	36,59	18,86	160	290	1100	>1100	23
CIM	9,2	3	35	75	150	460	9,2
2CIM	7,4	<3	19,23	43	28	3	3,6

Controle: uvas sem cobertura; CIM/2: uvas cobertas com a metade da concentração inibitória mínima das nanopartículas; CIM: uvas cobertas com a concentração inibitória mínima das nanopartículas; 2CIM: uvas cobertas com duas vezes a concentração inibitória mínima das nanopartículas.

Tabela 13: Sobrevivência de *E.coli* (NMP/g) em uvas refrigeradas (12°C) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas.

TRATAMENTO	DIA DE ARMAZENAMENTO								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Controle	1.100	1.100	1.100	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
CIM/2	1.100	<3	43	6,2	240	<3	14	<3	<3
CIM	1.100	<3	3	93	240	3,6	3	<3	<3
2CIM	1.100	<3	<3	7,4	<3	<3	<3	<3	<3

Controle: uvas sem cobertura; CIM/2: uvas cobertas com a metade da concentração inibitória mínima das nanopartículas; CIM: uvas cobertas com a concentração inibitória mínima das nanopartículas; 2CIM: uvas cobertas com duas vezes a concentração inibitória mínima das nanopartículas.

As nanopartículas na concentração CIM/2 em temperatura de refrigeração obtiveram os valores mínimos de *E coli* pela técnica do NMP nos 4 últimos dias da análise, mostrando melhora em relação a essa mesma concentração em temperatura ambiente. Na concentração CIM, apenas os dias 9, 12 e 15 mostraram resultados acima

do limite mínimo que é de 3NMP/g, enquanto que em temperatura ambiente todos os dias apresentaram valores acima desse limite mínimo, com exceção do dia 2. Um declínio na população de *E.coli* depois da inoculação e em armazenamento a baixas temperaturas também foi observado em alfaces (THEOFEL; HARRIS, 2009) e em aipo (VANDAMM et al., 2013).

Na presente pesquisa, o melhor resultado foi encontrado para as uvas em temperatura de refrigeração e cobertas com nanopartículas na concentração 2CIM. Em todos os 24 dias de análise essas uvas apresentaram resultados semelhantes ao limite mínimo da técnica do NMP, apenas nos dias 0 e 9 encontrou-se valores acima desse limite. A concentração 2CIM assemelha-se a concentração bactericida mínima determinada na atividade antimicrobiana para *E.coli* e, portanto os resultados *in vitro* estão de acordo com a nossa análise *in vivo*.

Aquino et al. (2015), analisando goiabas com e sem cobertura de quitosana enriquecida com óleo essencial de *Lippia gracilis* encontrou valores <3NMP/g durante os 10 dias do estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso trabalho para uvas cobertas com nanopartículas na concentração 2CIM e armazenadas sobre refrigeração. Contudo, a cobertura analisada em nosso estudo mostrou-se mais eficaz pois as uvas foram infectadas antes da aplicação da substância teste e obtiveram resultados semelhantes em relação as goiabas estudadas por Aquino et al. (2015) que não foram infectadas previamente com *E.coli*.

A melhor ação antimicrobiana das coberturas comestíveis com nanopartículas em relação ao uso da quitosana em gel, reafirma o preconizado por Cruz-Romero et al. (2013), de que as nanopartículas de quitosana apresentam atividade antimicrobiana intensificada, porque o seu pequeno tamanho possibilita a entrada da quitosana mais facilmente na célula microbiana, combinando-se com o DNA, inibindo a síntese de RNAm e a transcrição do DNA, promovendo distúrbios no metabolismo celular que são capazes de levar à morte do microrganismo.

Ainda em relação às diferenças da ação antimicrobiana das coberturas, estudos prévios mostram que o modo de ação antimicrobiano e a interação entre as coberturas e os compostos antimicrobianos influenciam a efetividade das coberturas comestíveis (BROWN, 1984; APPENDINIT; HOTCHKISS, 2002). Segundo KIM et al. (2014), a aplicação do inóculo na fruta antes da cobertura comestível, método adotado em nosso

estudo, simula uma situação onde as bactérias contaminam as uvas antes da aplicação da substância antimicrobiana e portanto a cobertura aplicada posteriormente produz um ambiente com baixa concentração de oxigênio para as células microbianas, agindo como uma barreira. No caso do gel de quitosana enriquecido com nanopartículas, a inibição patogênica ocorre devido a atividade antimicrobiana intensificada das nanopartículas de quitosana e a atmosfera modificada criada pela cobertura do gel + nanopartículas, capaz de suprimir a concentração de oxigênio disponível para o microrganismo.

Os resultados encontrados para *Salmonella spp.* estão presentes na figura 11. A amostra CIM/2, apresentou resultados semelhantes ao encontrado nas uvas controles nos 2 primeiros dias. Nos dias seguintes os resultados aproximam-se dos valores encontrados para as outras concentrações de nanopartículas, mostrando um início lento na ação antimicrobiana da concentração CIM/2 contra *Salmonella spp.* em uvas não refrigeradas.

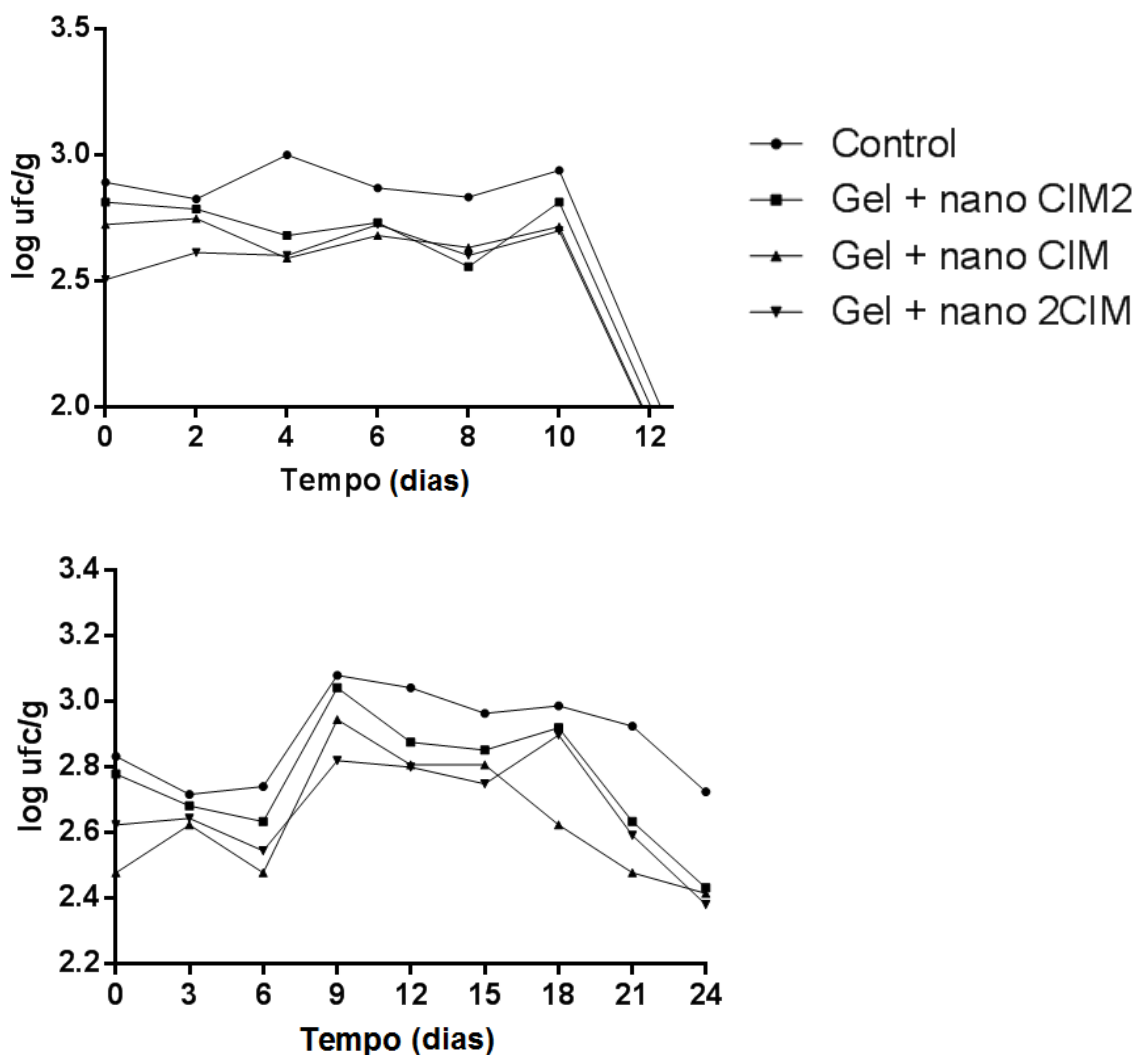
No armazenamento a temperatura ambiente, foi observado também que ao final do período de análise ocorreu um intenso crescimento fúngico nas uvas, culminando com a fermentação dessa fruta e a ausência do microrganismo estudado no 12º dia de análise.

Segundo Lopez-Velasco et al. (2012), a microflora da própria uva pode antagonizar com as células do patógeno inoculado. Isso ocorre devido a competição por nutriente e espaço entre os microrganismos presentes (SIM et al., 2013). Esse efeito antagônico observado em nosso estudo, também foi visto após apenas 4 dias em uvas armazenadas a temperatura ambiente e cobertas com cera de carnaúba cujo crescimento fúngico inibiu o desenvolvimento de *Salmonella spp.* e *E.coli* (KIM et al., 2014). Resultado semelhante foi encontrado por Lopez-Velasco et al. (2012), em folhas de espinafre.

Nas uvas armazenadas em refrigeração, não foi observado crescimento fúngico durante o período de 24 dias de análise, mostrando a importância da temperatura em controlar o desenvolvimento da microflora da fruta. Ma et al. (2016), não observou crescimento de *Salmonella spp.* a 4°C, estando de acordo com o preconizado pela FDA (2001) que diz que a temperatura mínima de crescimento da *Salmonella spp.* é em torno de 4-5°C. Em nosso estudo a temperatura de refrigeração não foi capaz de inibir completamente o crescimento desta bactéria, no entanto, nos 4 últimos dias de análise houve uma diminuição no crescimento da *Salmonella spp.* nas uvas com tratamento, apresentando os menores valores encontrados durante a pesquisa.

As coberturas comestíveis a base de nanopartículas de quitosana analisadas em nosso estudo foram capazes de inibir o crescimento das bactérias estudadas possibilitando sua aplicação como antimicrobiano em uvas. A *Salmonella spp.* e a *E.coli* representam um subgrupo de bactérias patogênicas que podem causar doenças em humanos (CARTER et al., 2015) e por isso a necessidade de medidas de controle e prevenção desses microrganismos.

Figura 11: Sobrevivência de *Salmonella spp.* em uvas não refrigeradas (A) e refrigeradas (B) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas.



5.7 Análise sensorial

As uvas cobertas com nanopartículas nas concentrações CIM/2, CIM e 2CIM e as uvas controle foram submetidas, 3 dias após a aplicação das coberturas, aos testes de aceitação, intenção de compra e ordenação-preferência por 100 avaliadores não treinados.

As frutas com e sem nanopartículas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para os atributos avaliados, com exceção da aparência e do aroma (Tabela 14). A amostra 2CIM foi a mais preferida no atributo de aparência, diferindo significativamente do controle ($p < 0,05$), mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) das outras amostras com nanopartículas. O controle foi a amostra que apresentou um maior excesso de amadurecimento e com isso interferiu nas notas atribuídas para esse atributo.

O contrário foi observado em relação ao aroma. O controle apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com o 2CIM, mas sem diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação as outras amostras. Isso ocorre devido ao aroma de ácido acético usado na dissolução da quitosana (DEBLIEGUERE et al., 2004; VARGAS et al., 2006), no entanto, quando a avaliação é feita 3 dias após a aplicação da cobertura há uma diminuição na percepção desse aroma, devido a evaporação desse ácido (VELICKOVA et al., 2013). Portanto, as nanopartículas não foram responsáveis pela menor aceitação do aroma das uvas 2CIM, porque nas demais uvas com nanopartículas (CIM/2 e CIM), não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre elas e o controle e entre elas e a 2CIM.

As médias obtidas para a aparência, cor, firmeza, sabor e avaliação global encontram-se entre 7 e 8, ou seja, os avaliadores referiram “gostar moderadamente” e “gostar muito” das amostras avaliadas. Para o aroma e sabor residual a média ficou em torno de 6 o que significa que para esse atributo os provadores “gostaram ligeiramente” das uvas.

O teste de preferência mostrou que 33% dos provadores preferiram a amostra controle, seguido por 25% que preferiram a amostra 2CIM, 24% a amostra CIM/2 e 18% a amostra CIM. Segundo Luckow & Delahunt (2004) e Ellendersen et al. (2012), a preferência estar relacionada ao sabor e aroma que os alimentos apresentam. Como vimos, no teste de aceitação o controle obteve as maiores notas para o aroma o que impactou sobre a escolha dessa amostra como a mais preferida.

Apesar da amostra controle ser a preferida para 33% dos provadores, esses resultados não interferiam nas médias obtidas para o teste de intenção de compra. Neste teste, verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras, e as notas atribuídas (controle: 4.01 ± 1.02 , CIM/2: 3.94 ± 1.01 , CIM: 3.96 ± 1.05 , 2CIM: 3.98 ± 0.94) revelaram valores próximos a 4, mostrando que os provadores “possivelmente comprariam” as uvas controle e as uvas com nanopartículas de quitosana, corroborando com os resultados encontrados no teste de aceitação e, portanto, viabilizando do ponto de vista sensorial a utilização da cobertura comestível a nível comercial.

Tabela 14 – Efeito das coberturas comestíveis nos atributos sensoriais das uvas refrigeradas (12°C).

Atributos	Controle	CIM/2	CIM	2CIM
Aparência	7,55 ($\pm 1,35$) ^a	7,80 ($\pm 1,27$) ^{ab}	7,98 ($\pm 0,93$) ^{ab}	8,02 ($\pm 0,98$) ^b
Cor	7,79 ($\pm 1,33$) ^a	7,85 ($\pm 1,17$) ^a	8,10 ($\pm 0,88$) ^a	7,94 ($\pm 1,00$) ^a
Aroma	6,62 ($\pm 1,48$) ^a	6,26 ($\pm 1,52$) ^{ab}	6,27 ($\pm 1,44$) ^{ab}	6,13 ($\pm 1,61$) ^b
Firmeza	7,55 ($\pm 1,44$) ^a	7,31 ($\pm 1,69$) ^a	7,24 ($\pm 1,60$) ^a	7,19 ($\pm 1,58$) ^a
Sabor	7,21 ($\pm 1,75$) ^a	7,61 ($\pm 1,34$) ^a	7,37 ($\pm 1,58$) ^a	7,25 ($\pm 1,69$) ^a
Sabor residual	6,78 ($\pm 1,72$) ^a	6,81 ($\pm 1,66$) ^a	6,85 ($\pm 1,70$) ^a	6,99 ($\pm 1,67$) ^a
Avaliação Global	7,51 ($\pm 1,40$) ^a	7,33 ($\pm 1,37$) ^a	7,46 ($\pm 1,25$) ^a	7,59 ($\pm 1,24$) ^a

^{a-b} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Considerações finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização das quitosanas fungicas utilizadas no estudo mostrou que ambas apresentam um baixo peso molecular, um grau de desacetilação de acordo com o preconizado pela literatura e um infravermelho característico desse polímero. Tais aspectos permitiram a aplicação dessas quitosanas para produção de cobertura comestível tendo como base o gel e nanopartículas de quitosana fungica.

As nanopartículas de quitosana produzidas apresentaram tamanho e forma compatíveis com a definição dessas partículas. As nanopartículas com tratamento térmico apresentaram tamanho homogêneo, esférico e sem formação de agregados e, portanto, foi a escolhida para os demais experimentos. Essas nanopartículas mostraram uma melhora da atividade antimicrobiana *in vitro* quando comparada ao gel de quitosana e tiveram excelentes resultados em relação ao teste de toxicidade realizado, permitindo sua aplicação em alimentos.

As coberturas comestíveis produzidas, gel e nanopartículas de quitosana nas concentrações CIM/2, CIM e 2xCIM, atuaram como barreira à perda de umidade e de peso, mantiveram o teor de sólidos solúveis e açúcar redutor nos níveis mais baixos, preservaram a cor, antocianina, pH e acidez titulável da fruta e reduziram o percentual de infecção visível, favorecendo dessa forma a conservação das uvas, e sem interferência nas suas características organolépticas.

As uvas armazenadas a temperatura ambiente e de refrigeração, tratadas com as coberturas comestíveis de gel de quitosana enriquecido com nanopartículas, apresentaram os menores valores na contagem de bactérias patogênicas de origem alimentar, o que mostra a potencialização e efetividade antimicrobiana das nanopartículas presentes na cobertura comestível produzida.

Portanto, com base nos resultados encontrados, as coberturas comestíveis com nanopartículas de quitosana microbiológica podem ser usadas como uma alternativa promissora para melhora da qualidade pós-colheita de uvas.

Referências

REFERÊNCIAS

ABREU, F.O.M.S.; CAVALCANTE, L.G.; DOUDEMMENT, P.V.; CASTRO, A.M.; NASCIMENTO, A.P. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de carangueijo – Uçá utilizando radiação de micro-ondas. **Polímeros**, 23, 630-635, 2013.

ADILETTA, G.; RUSSO, P.; SENADEERA, W.; DI MATTEO, M. Drying characteristics and quality of grape under physical pretreatment. *Journal of Food Engineering*, 172, 9-18, 2016.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in food industry. **Food and science and technology**, 43, 837-842, 2010.

AL-QURASHI, A.D.; AWAD, M.A. Postharvest chitosan treatment affects quality, antioxidant capacity, antioxidant compounds and enzymes activities of ‘El-Bayadi’ table grapes after storage. **Scientia Horticulturae**, 197, 392-398, 2015.

ALI, A.; MUHAMMAD, M.T.M.; SIJAM, K.; SIDDIQUI, Y. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 124, 620-626, 2011.

ALI, A.; NOH, N.M.; MUSTAFA, M.A. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. **Food Packaging and shelf life**, 3, 56-61, 2015.

ALONSO, M.J.; CALVO, P.; REMUNAM-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **J. Appl. Polym. Sci**, 63, 125-132, 1997.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de

screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, 31, 1224-1229, 2008.

AMARANTE, C.; BANKS, N.H.; GANESH, S. Relationship between character of skin cover of coated pears and permeance to water vapour and gases. **Postharvest Biology and Technology**, 21, 291-301, 2001.

AMORIM, R.V.S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32, 20-23, 2000.

AMORIM, R.V.S.; PEDROSA, R.P.; FUKUSHIMA, K.; MARTÍNEZ, C.R.; LEDINGHAM, W.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.. Alternative Carbon Sources from Sugar Cane Process for Submerged Cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to Produce Chitosan. **Food Technology and Biotechnology**, 44, 519–523, 2006.

ANDRADE, V.S.; NETO, B.B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A factorial desing analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Can. J. Microbiol.**, 46, 1042-1045, 2000.

ANDREWS, W.H.; HAMMACK, T.S. Salmonella. In: Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual Online**. Capítulo 5, 2006.

APPENDINIT, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, 3, 113-126, 2002.

AQUINO, A.B.; BLANK, A.F.; SANTANA, L.C.L.A. Impact of edible chitosan cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis*–Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. **Food Chemistry**, 171, 108–116, 2015.

ARNAUD-STAMFORD, T.M.; STAMFORD, T.C.M. **Caracterização da quitosana e sua aplicação na nanotecnologia.** In: FIGUEIREDO et al. Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais. Embrapa/IPA, 2010, 733-761.

ASHOOR, S. H.; KNOX, J. M. Determination of organic acids in foods by highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 299, 288–292, 1982.

ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Bioconversão de resíduos de camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) para produção de biofilme de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, 9, 480-499, 2008.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 30, 33-38, 2003.

Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2012. Official methods of analysis, of AOAC international (19th ed.). Método 932.12, Método 920.149, Método 981.12, Método 934.06, Método 932.09.

AZEVEDO, J.R.; SIZILIO, R.H.; BRITO, M.B.; COSTA, A.M.B.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS, M.R.V.; LIRA, A.A.M.; NUNES, R.S. Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana-TPP contendo insulina. **VII Congresso Brasileiro de análise Térmica e Calorimetria**. Abril de 2010. São Paulo, Brasil.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, Article ID 460381, 29 pages, 2011.

BAGLEY, D.M.; WATERS, D.; KONG, B.M. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Food Chem Toxicol**, 32, 1155–1160, 1994.

BANERJEE, T.; MITRA, S.; KUMAR SINGH A.; KUMAR SHARMA, R.; MAITRA, A. Preparation characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, 243,93-105, 2002.

BATISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; HERNÁNDEZ-LOPEZ, M.; BARKA, E.A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, 25, 108-118, 2006.

BAPTISTA DA SILVA, S.; FERREIRA, D.; PINTADO, M.; SARMENTO, B. Chitosan based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery-*In vitro* tests. **International Journal of Biological Macromolecules**, 84, 112-120, 2016.

BARANI, H.; MONTAZER, M.; SAMADI, S.; TOLİYAT, T. In situ synthesis of nano silver/lecithin on wool: enhancing nanoparticles diffusion. **Colloid. Surf. B**, 92, 9-15, 2012.

BASSON, C. E.; GROENEWALD, J. H.; KOSSMANN, J.; CRONJÉ, C.; BAUER, R. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. **Food Chemistry**, 121, 1156–1162, 2010.

BERGER, L.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.; DE ALCÂNTARA, S.; DA SILVA, A.; DO NASCIMENTO, A.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. **International Journal of Molecular Sciences (Online)**, 15, 9082-9102, 2014.

BOAS, A.C.V.; HENRIQUE, P.C.; LIMA, L.C.O.; NETO, A.D. Antioxidant activity, anthocyanins and organic acids content of grape juices produced in southwest of Minas Gerais, Brazil. **Ciênc. Agrotec.**, 38, 480-486, 2014.

BOUGNICOURT, L.; ALCOUFFE, P.; LADAVIÈRE, C. Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloidally stable objects. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 457, 476-486, 2014.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, N.Y.; HANGES, W.Y.; BULDER, A.S.; HERR, C.; VOODER, S.E.C.G.; WIJNHOF, S.W.P.; MARVIN, H.J.P; SIPS, A.J.A.M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 53, 52–62, 2009.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 19 de agosto 2015.

BRASIL, I.; GOMES, C.; PUERTA-GOMEZ, A.; CASTELL-PEREZ, M.; MOREIRA, R. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. **LWT- Food Science and Technology**, 47, 39–45, 2012.

BROWN, G.E. Efficacy of citrus postharvest fungicides applied in water or in solution water wax. **Plant Dis.**, 68, 415-418, 1984.

CAI, J.; YANG, J.; DU, Y.; FAN, L.; QIU, Y.; LI, J.; KENNEDY, J.F. Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. **Carbohydrate Polymers**, 64, 151–157, 2006.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, 63, 125-132, 1997.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades α – e β - quitina. **Quím. Nova**, 30, 644-650, 2007.

CAO, Z.B.; SUN, Y.Y. Chitosan-based rechargeable long-term antimicrobial and biofilm-controlling systems. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 89, 960–967, 2009.

CARDOSO, A.; LINS, C.I.M.; DOS SANTOS, E.R.; SILVA, M.C.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agro-industrial substrates. **Molecules**, 17, 4904-4914, 2012.

CARDOSO, A.; SILVA, M.C.F.; BATISTA, A.C.L.; SANTOS, V.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Submerged fermentation for chitin and chitosan production by *Rhizopus arrhizus* UCP 402. **Asian Chitin Journal**, 6, 17-22, 2010.

CARTER, M.Q.; CHAPMAN, H.M.; GABLER, F.; BRANDL, M.T. Effect of sulfur dioxide fumigation on survival of foodborne pathogens on table grapes under standard storage temperature. **Food Microbiology**, 49, 189-196, 2015.

CERQUEIRA, T.S.; JACOMINO, A.P.; SASAKI, F.F.; ALLEONI, A.C.C. Recobrimento de goiabas com filmes proteicos e de quitosana. **Bragantina**, Campinas, 70, 216-221, 2011.

CHAU, CHI-FAI; WU, SHIUAN-HUEI; YEN, GOW-CHIN. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, 18, 5, 269-280, 2007.

CHAUDHRY, Q.; WATKINS, R.; CASTLE, L. Nanotechnologies in the Food Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns. **RSC Nanoscience & Nanotechnology**, 14, 1-17, 2010.

CHUANG, C.C.; MCINTOSH, M.K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. **Annu. Rev. Nutr.**, 31, 155-176, 2011.

CHUNG, Y.C.; SU, Y.P.; CHEN, C.C.; JIA, G.; WANG, H.L.; WU, J.C.G.; LIN, J.G. Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologica Sinica**, 25, 932–936, 2004.

CIE – Commission Internationale de Éclairage, 1986. Colourimetry, second ed. CIE Publication, Vienna, p.78.

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.

CRESTINI, C.; KOVAC, B. e GIOVANNONZI-SERMANNI, G. Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. **Biotechnology and Bioengineering**, 50, 207-210. 1996.

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**, 34, 393-397, 2013.

DANG, Y.Y.; ZHANG, H.; XIU, Z.L. **Microwave-assisted aqueous two phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 89, 1576 – 1581, 2014.

DENG, Y.; WU, Y.; LI, Y.F. Physiological responses and quality attributes of ‘Kyoho’ grapes to controlled atmosphere storage. **LWT- Food Science and Technology**, 39, 584-590, 2006.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, 21, 703-714, 2004.

DIAS, K.B.; SILVA, D.P.; FERREIRA, L.A.; FIDELIS, R.R.; COSTA, J.L.; LOPES DA SILVA A.L.; SCHEIDT, G.N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 4, 184-191, 2013.

DONG, H.; CHENG, L.; TAN, J.; ZHENG, K.; JIANG, Y. Effect of chitosan coating on quality and shelf-life of peeled litchi fruit. **Journal of Food Engineering**, 64, 355–358, 2004.

DOTTO, G.L.; VIEIRA, M.L.G.; PINTO, L.A.A. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. **LWT – Food Science and Technology**, 64, 126-130, 2015.

DU, D.; CHEN, S.; SONG, D.; LI, H.; CHEN, X. Development of acetylcholinesterase biosensor based on CdTe quantum dots/gold nanoparticles modified chitosan microspheres interface. **Biosensors and Bioelectronics**, 24, 475-479, 2008.

DU, W.L.; NIU, S.S.; XU, Y.L.; FAN, C.L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**, 75, 385-389, 2009.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de Alimentos**. 4^a ed. Curitiba: Champagnat: 2013. 531p.

DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, 114, 1173-1182, 2009.

EATON, P.; FERNANDES, J.C.; PEREIRA, E.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Ultramicroscopy**, 108, 1128–1134, 2008.

ELLENDERSEN, L. S. N.; GRANATO, D.; GUERGOLETO, K. B.; WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering in Life Sciences**, 12, 475–485, 2012.

ESHGHI, S.; HASHEMI, M.; MOHAMMADI, A.; BADII, F.; MOHAMMADHOSEINI, Z.; AHMADI, K. Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duchesne) during storage. **Food and Bioprocess Technology**, 1-13, 2014.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, 9, 435-451, 2008.

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.

FALCÃO, L.D.; BARROS, D.M.; GAUCHE, C.; LUIZ, M.T.B. Copigmentação intra e tremolecular de antocianinas: uma revisão. **CEPPA**, 21, 351-366, 2007.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids Surface B Biointerfaces**, 90, 21-27, 2012.

FARIA-TISCHER, P.C.S.; TISCHER, C.A. Nanotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **Biochemistry and biotechnology reports**, 1, 32-53, 2012.

FDA, 2001. Capítulo 3. **Factors that influence microbial growth**. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/researchareas/safepracticesforfoodprocesses/cm094145.htm>. Acesso em: 29/10/2015.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2010). **Bacteriological analytical manual online**. Available from: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> Acesso em:

30.08.15.

FELIZIANI, E.; SMILANICK, J.L.; MARGOSAN, D.A.; MANSOUR, M.F.; ROMANAZZI, G.; GU, S.; GOHIL, H.L.; RUBIO AMES, Z. Preharvest fungicide, potassium sorbate, or chitosan use on quality and storagedecay of table grapes. **Plat. Dis.**, 97, 307-314, 2013.

FERNANDES, J.C; TAVARIA, F.K.; SOARES, J.C.; RAMOS, O.S.; MONTEIRO, M.J.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. **Food Microbiol.**, 25, 922–928, 2008.

FERRARO, V.; CRUZ, I.B.; JORGE, R.F.; MALCATA, F.X.; PINTADO, M.E.; CASTRO, P.M.L. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: a review. **Food Research International**, 43, 2221-2233, 2010.

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, São Carlos, 2002. 69p.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, parti-cle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids Surf. B**, 44, 65–73, 2005.

GANAN, M.; CARRASCOSA, A.V.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.J. Antimicrobial activity of chitosan against *Campylobacter* spp. and other microorganisms and its mechanism of action. **Journal of Food Protection**, 72, 1735–1738, 2009.

GAO, P.; ZHU, Z.; ZHANG, P. Effects of chitosan-glucose complex coating on postharvest quality and shelf life of table grapes. **Carbohydrate Polymers**, 95, 371-378, 2013.

GAUTIER, H.; DIAKOU-VERDIN, V.; BÉNARD, C.; REICH, M.; BURET, M.; BOURGAUD, F.; POESSEL, J. L.; CARIS-VEYRAT, C.; GÉNARD, M. How does

tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. **J. Agric. Food Chem.** 56, 1241–1250, 2008.

GLEWA, R. H.; AYAZB, F. A.; SANZC, C.; VANDERJAGTA, D. J.; HUANGD, H. S.; CHUANGD, L. T. Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development and maturation. **Food Chemistry**, 83, 363–369, 2003.

GOL, N.B.; PATEL, P.R.; RAO, R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, 85, 185-195, 2013.

GOY, R.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 9, 3, 241-247, 2009.

GRENHA, A.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 25, 427–437, 2005.

HAGENMAIER, R. D. A comparison of ethane ethylene and CO₂ peel permeance for fruit with different coatings. **Postharvest Biology and Technology**, 37, 56–64, 2005.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J.M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, 48, 40-50, 2016.

HERNÁNDEZ-HERRERO, J.A.; FRUTOS, M.J. Color and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices at different pHs and temperatures. **Food Chemistry**, 154, 199–204, 2014.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; DEL VALLE, V.; VELEZ, D.; GAVARA, R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, 110, 428-435, 2008.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, 26, 87-94, 1991.

HOA, T.T.; DUCAMP, M.N. Effects of different coatings on biochemical changes of 'cat Hoa loc' mangoes in storage. **Postharvest Biology and Technology**, 48, 150–152, 2008.

HONG, K.Q.; XIE, J.H.; ZHANG, L.B.; SUN, D.Q.; GONG, D.Q. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Sodium guajava* L.) fruit during cold storage. **Scientia Horticulturae**, 144, 172-178, 2012.

HOSSEINNEJAD, M.; JARAFI, S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **Int. J. of Biological Macrom.**, 85,467-475, 2016.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; GE, H.; YUAN, Y.; YANG, C. Synthesis and characterization of chitosan-(polyacrylic acid) nanoparticles. **Biomaterials**, 23, 3193-3201, 2002.

HUGGINS, M.L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules:IV. Dependence on concentration. **Journal of the American Chemistry Society**, 64, 2716-2718, 1942.

IKEDA, T.; TAZUKE, S. Biologically-active polycations.4. Synthesis and antimicrobial activity of poly (Trialkylvinylbenzylammonium chloride). *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics*, 185, 869–876, 1984.

JARA-PALACIOS, M.J.; HERNANDEZ, D.; ESCUDERO-GILETE, M.L.; HEREDIA, F.J. Antioxidant potential of white grape pomances: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. **Food Research International**, 66, 150-157, 2014

JESSUP, A.J. Low-temperature storage as a quarantine treatment for table grapes infested with Queensland fruit-fly (*Bactrocera tryoni* Froggatt). **Crop Hortic. Sci.**, 20, 235-239, 1992.

JIANGLIAN, D.; SHAOYING, Z. Application of chitosan based coating in fruit and vegetable preservation: a review. **Journal Food Technology**, 4, 227, 2013.

JO, W.S.; SONG, H.Y.; SONG, N.B.; LEE, J.S.; MIN, S.C.; SONG, K.B. Quality and microbial safety of 'Fuji' apples coated with carnauba-shellac wax containing lemongrass oil. **LWT- Food Science and Technology**, 55, 490–497, 2014.

KASAAI, M.R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, 79, 801–810, 2010.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 62, 3–11, 2010.

KHOUSHAB, F.; MONTAROP, Y. Chitin Research Revisited: a Review. **Marine Drugs**, 8, 1988-2012, 2010.

KIM, K.W.; MIN, B.J.; KIM, Y.T.; KIMMEL, R.M.; COOKSEY, K.; PARK, S.I. Antimicrobial activity against food borne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. **Food Science and Tecnology**, 44, 565-569, 2011.

KIM, L.H.; OH, Y.A.; LEE, H.; SONG, K.B.; MIN, S.C. Grape berry coatings of lemongrass oil-incorporating nanoemulsion. **Food Science and Technology**, 58, 1-10, 2014.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology**, 114-122. 1991.

KONG, C.; FODJO, E. K.; LI, D.; CAI, Y.; HUANG, D.; WANG, Y.; SHEN, X. Chitosan-based adsorption and freeze deproteinization: improved extraction and purification of synthetic colorants from protein-rich food samples. **Food Chemistry**, 188, 240-247, 2015.

KONG, M.; CHEN, X.G.; LIU, C.S.; YU, L.J.; JI, Q.X.; XUE, Y.P.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. **Frontiers of Materials Science in China**, 2, 214-220, 2008.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. **International Journal of Food Microbiology**, 144, 51-63, 2010.

KRÜGER, E.; DIETRICH, H.; SCHÖPPLEIN, E.; RASIM, S.; KÜRBEL, P. Cultivar , storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 60, 31-37, 211.

LEE, S.M.; SONG, L.C.; LEE, B.S. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. **J. Chem. Eng.**, 27, 688-692, 2010.

LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analysis in cranberries. **HortScience**, 7, 83–84, 1972.

LI, X.F.; FENG, X.Q.; YANG, S. A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. **Food Sci**, 13, 037, 2010.

LI, Z.; YANG, F.; YANG, R. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **Int. Biol. Macromol.**, 75, 378-387, 2015.

LIU, N.; CHEN, X.G.; PARK, H.J.; LIU, C.G.; LIU, C.S.; MENG, X.H. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. **Carbohydrate Polymers**, 64, 60–65, 2006.

LOGESH, A.R.; THILLAIMAHARANI, K.A.; SHARMILA, K.; KALAISELVAM, M.; RAFFI, S.M. Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. **Asian Pac J Trop Biomed**, 2, 140–143, 2012.

LOPEZ-CABALLERO, M.E.; GOMEZ-GUILLEN, M. C.; PEREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. **Food Hydrocolloids**, 19, 303–311, 2005.

LOPEZ-VALASCO, G.; TYDINGS, H.A.; BPYER, R.R.; FALKINHAM, J.O.; PONDER, M.A. Characterization of interactions between *Escherichia coli* O157:H7 with epiphytic bacteria in vitro and on spinach leaf surfaces. **Int. J. Food Microbiol.**, 153, 351–357, 2012.

LOREVICE, M.V.; MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; MOTTOSO, L.H.C. Development of novel guava puree films containing chitosan nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, 12, 2711-2717, 2012.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. **Food Research International**, 37, 805-814, 2004.

MA, C.; LI, J.; ZHANG, Q. Behavior of Salmonella spp. On fresh-cut tropical fruits. **Food Microbiology**, 1-9, 2016.

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, A.; CASTRO, P.M.; PINTADO, M. Production of antimicrobial nanoparticles against food pathogens. **Journal of Food Engineering**, 167, 210-216, 2015.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, 67, 187-195, 2001.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, 35, 341-371, 1995.

MENG, X.; LI, B.; LIU, J.; TIAN, S. Physiological responses and quality attributes of table grapes fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. **Food Chem.**, 106, 501-508, 2008.

MOHAMED, E.I.B.; RABEA, E.I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **Int. J. Carbohydr. Chem.**, 1-29, 2011.

MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S.M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling Botrytis cinerea, the causal agent of gray mould disease. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 28, 73-80, 2015.

MORILLON, V.; DEBEAUFORT, F.; BLOND, G.; CAPELLE, M.; VOILLEY, A. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. **Crit. Rev. Food Sci.**, 42, 67-89, 2002.

MORITZ, M.; GESZKE-MORITZ, M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, 228, 596-613, 2013.

MUZZARELLI, R.A.A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M.G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, 87,995-1012, 2012.

NADARAJAH, K.; KADER, J.; MOHD, M.; PAUL, D.C. Production of chitosan by fungi. **J. Biol. Sci.**, 4, 263-265, 2001.

NASTI, A.; ZAKI, N.M.; LEONARDIS, P.; UNGHAIBOON, S.; SANSONGSAK, P.; RIMOLI, M.G.; TIRELLI, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimization of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharm. Res.**, 26, 1918–1930, 2009.

NEETA, B.G.; POOJA, R.P.; RAMANA RAO, T.V. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. **Postharvest Biol. Technol.**, 85, 185-195, 2013.

NEVES, A.L.P.; MILIOLI, C.C.; MULLER, L.; RIELLA, H.G.; KUHNEN, N.C.; STULZER, H.K. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 445, 34-39, 2014.

NO, H.K.; PARK, N.Y.; LEE, S.H.; MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, 74, 65–72, 2002.

NOWSHEHRI, J.A.; BHAT, Z.A.; Shah, M.Y. Blessings in disguise: bio-functional benefits of grape seedextracts. **Food Research International**, 77, 333-348, 2015.

OJAGH, S.M.; REZAEI, M; RAZAVI, S.H.; HOSSEINI, .M.H. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, 120, 193–198, 2010.

OLIVIA, G.I.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Edible coatings for fresh-cut fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45, 657-670, 2005.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob. Agents. Chemother**, 46, 2720–2722, 2002.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; MARCILLA, A.; CHIRALT, A.; CHAFÉR, M.; GONZALÉZ-MARTÍNEZ, C. Quality and safety of table grapes coated with hydropropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. **Postharvest Biology and Technology**, 60, 64-70, 2011.

PETRICCIONE, M.; DE SANCTIS, F.; PASQUARIELLO, M.S.; MASTROBUONI, F.; REGA, P.; SCORTICHINI, M.; MENCARELLI, F. The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. **Food Bioprocess Technology**, 8, 394-408, 2015.

PINTO, R.; LINCHTER, A.; DANSHIN, A.; SELA, S. The effect of an ethanol dip of table grapes on populations of *Escherichia coli*. **Postharvest Biology and Technology**, 39, 308-313, 2006.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Lett. Appl. Microbiol.**, 35, 17-21, 2002.

QI, L.F.; XU, Z.R.; JIANG, X.; HU, C.H.; ZOU, X.F. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, 339, 2693–2700, 2004.

RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; BELLICH, B.; CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, 455, 219-228, 2013.

RATNER, B.D. **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. 2^aed. San Diego, Elsevier, 2004.

RATTANAPONE, N.; LEE, Y.; WU, T.; WATADA, A.E. Quality and microbial changes of fresh-cut mango cubes held in controlled atmosphere. **Hortscience**, 36, 1091–1095, 2001.

REDDY, M.V.B.; BELKACEMI, K.; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of preharvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, 20, 39-51, 2000.

RAMEZANI, Z.; ZAREI, M.; RAMINNEJAD, N. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. **Food control**, 51, 43-48, 2015.

RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J; LE DUNG, P.; THUY BINH, P.; DONG, N. T. NMR investigation of chitosan derivatives formed by the reaction of chitosan with levulinic acid. **Carbohydrate Polymers**, 46, 339-348, 2001.

ROCHA, A.M.; MORAES, A.M. Effects of controlled atmosphere on quality of minimally processed apple (cv. Jonagored). **Journal of Food Processing and Preservation**, 24, 435-451, 2000.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 44, 875-889, 2009.

ROMBALDI, C.V.; FERRI, V.C.; BERGAMASQUI, M.; LUCHIETA, L.; ZANUZO, M.R. Produtividade e qualidade de uva, cv. Bordô (ives), sob dois sistemas de cultivo. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10, 519-521, 2004.

ROMANAZZI, G.; LICHTER, A.; MILIKOTA GABLER, F.; SMILANICK, J.L. Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, 63, 141-147, 2012.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, S.; PASTOR, C.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHÁFER, M. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. **Postharvest Biology and Technology**, 60, 57–63, 2011.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, 3, 20-31, 2007.

SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, S.E. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol.13, nº4, p.242-249, 2003.

SANTOS, N.S.T.; AGUIAR, A.J.A.A.; VASCONCELOS DE OLIVEIRA, C.E.; VERÍSSIMO DE SALE, C.; SILVA, S. M.; SOUSA DA SILVA, R.; STAMFORD, T.C.M.; LEITE DE SOUZA, E. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). **Food Microbiology**, 32, 345-353, 2012.

SAW, C.L.L.; HENG, P.W.S.; LIEW, C.V. Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, 34, 1168–1177, 2008.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 26, 726-737, 2003.

SERRANO, M.; MARTINEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. **Postharvest Biology and Technology**, 39, 61-68, 2006.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, n. 4, 1998.

SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S.P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, 43, 351-357, 2000.

SIM, H.L.; HONG, Y.K.; YOON, W.B.; YUK, H.G. Behavior of *Salmonella* spp. and natural microbiota on fresh-cut dragon fruits at different storage temperatures. **Int. J. Food Microbiol.**, 160, 239–244, 2013.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON Y. J. Food application of chitin and chitosans. **Trends in Food Science and Technology**, 10, 37–51, 1999.

SHI, Z.; NEOH, K.G.; KANG, E.T.; WANG, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, 27, 2440-2449, 2006.

SHIEKH, R.A.; MALIK, M.A.; AL-THABAITI, S.A.; SHIEKH, M.A. Chitosan as a novel edible coating for fresh fruits. **Food Sci. Technol. Res.**, 19, 139-155, 2013.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Application of chitin and chitosan for biomaterials.

Biotechnol Gen Eng Rev, 17, 413-420, 1996.

SHIMAHARA, K.; TAKIGUCHI, Y.; KOBAYASHI, T.; UDA, K.; SANNAN, T. **Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production.** In G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, & P. Sandford. Elsevier Appl. Sci. London-New York, 319-322, 1989.

SILVA, A.C. **Produção de quitina e quitosana em culturas submersas de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para Mucolares.** Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; KIELME, D. J. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos.** 5ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1994. 387 p.

SORLIER, P.; DENUZIÈRE, A.; VITON, C.; DOMARD, A. A relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, 2, 765-772, 2001.

SOUSA, L.L.; ANDRADE, S.C.A.; ATHAYDE, A.J.A.A.; OLIVEIRA, C.E.V.; SALES, C.V.; MADRUGA, M.S.; SOUZA, E.L. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grape). **Int. J. Food Microbiol.**, 165, 312-318, 2013.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, 27, 2, 2009.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.B. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, 10, 1, 61-69, 2007.

STAMFORD, T.C.M.; MONTENEGRO, T.; CAVALCANTE, H.M.M.; OLIVEIRA, R.; CAMPOS-TAKAKI, G.M., 2013. Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent. In: Andrade, A.O., Pereira, A. A., Naves, E. L. M. & Soares, A. B.(Org.). Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent. 1ed. Rijeka: InTech, 229-244, doi.org/10.5772/54453.

STAMFORD-ARNAUD, T. M. **Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/Quantum Dots fluorescentes**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Exatas da Natureza, Recife., 2012.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COUTELLEMONT, P.; SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicol In Vitro**, 13, 375-84, 1999.

STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia dos Alimentos, Florianópolis, 2004.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, 6, 257–272, 1992.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATTEB, N.A.A.Q. Mycelia of *M. rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v.60.4, p.605-610. 1997.

TAYEL, A.A.; MOUSSA, S.; OPWIS, K.; KNITTEL, D.; SCHOLLMAYER, E.; NICKISCH-HARTFIEL, A. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. **Int. J. of Biological Macromolecules**, 47, 10-14, 2010.

TEZOTTO-ULIANA, J.V.; FARGONI, G.P.; GEERDINK, G.M.; KLUGE, R.A. Chitosan applications pre–or postharvest prolong raspberry shelf–life quality. **Postharvest Biology and Technology**, 91, 72–77, 2014.

THARANATHAN, R.N.; KITTUR, F.S. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 43, 61-87, 2003.

THEOFEL, C.G.; HARRIS, L.J. Impact of preinoculation culture conditions on the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto romaine lettuce (*Lactuca sativa*) plants and cut leaf surfaces. **J. Food Prot.**, 72, 1553–1559, 2009.

THERON, M.M.; LUES, J.F.R. Organic acids and meat preservation: a review. **Food Reviews International**, 23, 141-158, 2007.

TSAI, G.J.; SU, W.H.; CHEN, H.C.; PAN, C.L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. **Fisheries Science**, 68, 170–177, 2002.

VALENTE, J.F.; GASPAR, V.M.; ANTUNES, B.P.; COUTINHO, P.; CORREIA, I.J. Microencapsulated chitosan-dextran sulfate nanoparticles for controlled delivery of bioactive molecules and cells in bone regeneration. **Polymer**, 54, 5-15, 2013.

VALVERDE, J.M.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; CASTILLO, S.; SERRANO, M.; VALERO, D. Improvement of table grapes quality and safety by the combination of modified atmosphere packaging (MAP) and eugenol, menthol, or thymol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 7458–7464, 2005.

VANDAMM, J.P. ; LI, D.; HARRIS, L.J.; SCHAFFNER, D.W.; DANYLUK, M.D. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. **Food Microbiology**, 34, 151–157, 2013.

VANI, R.; STANLEY, S.A. Studies on the extraction of chitin and chitosan from different aquatic organisms. **Advanced Biotechnology**, 12, 12-15, 2013.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GUMY, R.; DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Actv. Drug. Deliv. Rev.**, 59, 1162-1176, 2007.

VARGAS, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTINEZ, C. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, 41, 164-171, 2006.

VASCONCELOS DE OLIVEIRA, C.E.; MAGNANI, M.; VERÍSSIMO DE SALES, C.; PONTES, A.L.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.C.M.; LEITE DE SOUZA, E. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International Journal of Food Microbiology**, 171, 54-61, 2014.

VELICKOVA, E.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; ALVES, V.D.; MOLDÃO-MARTINS, M. Impacto f chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv *Camarosa*) under comercial storage conditions). **LWT – Food Science and Technology**, 52, 80-92, 2013.

VICENTE, A.R.; COSTA, M.L.; MARTINEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; CIVELLO, P.M. Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 38, 213-222, 2005.

VILA, M.T.R. **Qualidade pós colheita de goiabas *Pedro sato* armazenadas sob refrigeração e atmosfera modificada por biofilme de fécula de mandioca**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

WANG, G. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. **J. Food. Prot.**, 55, 916-919, 1992.

WU, B. H.; LIU, H. F.; GUAN, L.; FAN, P. G.; LI, S. H. Carbohydrate metabolism in grape cultivars that differ in sucrose accumulation. **Vitis**, 50, 51–57, 2011.

WU, B. H.; ZHAO, J. B.; CHEN, J.; XI, H. F.; JIANG, Q.; LI, S. H. Maternal inheritance of sugars and acids in peach (*P. persica* (L.) Batsch) fruit. **Euphytica**, 188, 333–345, 2012.

XU, W.T.; HUANG, K.L.; GUO, F.; QU, W.; YANG, J.J.; LIANG, Z.H. LUO, Y.B. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biol. Technol.**, 46, 86-94, 2007.

YADAV, A.V.; BHISE, S.B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, 87, 1176-1178, 2004.

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, 176-179, 2010.

YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **Int. J. Food Microbiol.**, 185, 57-63, 2014.

YOUWEI, Y.; YINZHE, R. Grape preservation using chitosan combined with B-cyclodextrin. **Int. J. Agron.**, 1-8, 2013.

ZHANG, Y. Z.; LI, P. M.; CHENG, L. L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh. **Food Chemistry**, 123, 1013–1018, 2010.

ZHENG, L. Y., & ZHU, J. F. Study of antimicrobial activity of chitosan with different molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, 54(4), 527–530, 2003.

ZHONG, Z.M.; XING, R.G.; LIU, S.; WANG, L.; CAI, S.B. LI, P.C. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. **Carbohydrate Research**, 343, 566–570, 2008.

ZHOU, R.; MO, Y.; LI, Y. F.; ZHAO, Y. Y.; ZHANG, G. X.; HU, Y. S. Quality and internal characteristics of huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* nakai cv. Huanghua) treated with different kinds of coatings during storage. **Postharvest Biology and Technology**, 49, 171–179, 2008.

Apêndices

APÊNDICE A – Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Bioatividade de gel de quitosana enriquecido com nanopartículas para conservação de frutos”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Natália Ferrão Castelo Branco Melo (Av. Cons. Rosa e Silva, 327, Apt.101, Aflitos. CEP: 52020220. Telefone: (81) 88013648/ (81) 98990751/ (81) 34271542. E-mail: natalia_melo_835@hotmail.com); e está sob a orientação da professora Thayza Christina Montenegro Stamford (Rua Prof. Artur de Sá, s/n – Cidade Universitária. CEP: 50.740-521. E-mail: thayzastamford@yahoo.com.br Telefone: (81) 2126-8583) e co-orientação da professora Thatiana Montenegro Stamford Arnaud (Rua Prof. Artur de Sá, s/n – Cidade Universitária. CEP: 50.740-521. E-mail: thatianaarnaud@hotmail.com Telefone: (81) 2126-8583).

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esse projeto de pesquisa pretende definir uma técnica alternativa para a conservação de frutos utilizando um gel de quitosana enriquecido com nanopartículas, proporcionando a obtenção de um produto com uma maior durabilidade e qualidade.

A análise sensorial terá duração em torno de 10 minutos por voluntário. No teste de aceitação, o provador deverá provar cada amostra e atribuir uma pontuação 1 a 9 pontos (1= desgostei extremamente, 9= gostei extremamente) e no teste de intenção de compra atribuir uma pontuação de 1 a 5 pontos (1 = certamente eu não compraria, 5 = certamente compraria). Os dados deverão ser preenchidos em formulário disponibilizado pelo pesquisador. As amostras serão acompanhadas de copo com água para ser utilizado pelo provador entre cada prova das frutas para limpeza das papilas gustativas. Os atributos avaliados serão a aparência, o aroma, o sabor, a textura e impressão global.

Em relação aos riscos da pesquisa, podem ser citados os inerentes à possível contaminação da fruta que serão minimizados adotando-se procedimentos seguros para manipulação e armazenamento dos alimentos conforme recomendação da legislação sanitária (RDC nº216/2004).

Como benefício, o uso do gel de quitosana enriquecido com as nanopartículas de quitosana projeta-se como uma alternativa para conservação da cor, aroma, textura e integridade dos frutos, diminuindo os custos com a deterioração desses alimentos pela indústria e consequentemente diminuindo o preço final desse produto.

A quitosana é um nome científico dado a uma fibra natural (polissacarídeo) originada da carapaça de crustáceos (camarão, lagosta ou caranguejo) ou da parede das células de fungos. Esse polissacarídeo distingue-se dos demais devido a sua capacidade de participar positivamente de reações biológicas específicas no corpo humano, é decomposto pelo corpo humano assim como pelo meio ambiente, sem causar qualquer tipo de efeito tóxico aquele indivíduo que entra em contato com a quitosana.

Em frutas, sua utilização tem como objetivo evitar a contaminação desses alimentos, além de manter e prolongar a qualidade dos frutos. A quitosana pode ser aplicada em diferentes formas, como por exemplo no formato de nanopartículas, o que potencializa suas características prolongando a manutenção da qualidade desses frutos.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Os formulários preenchidos que serão coletados nessa pesquisa ficarão armazenados em CD-ROM, sob responsabilidade do pesquisador principal, Natália Ferrão Castelo Branco Melo (Av. Cons. Rosa e Silva, 327, Apt.101, Aflitos. CEP: 52020220. pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar da pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em caso de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

Pesquisador: Natália Ferrão Castelo Branco Melo

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____,

RG: _____ e CPF: _____, abaixo assinado, concordo em participar do “Bioatividade da associação de gel e nanopartículas de quitosana na conservação de uvas (*Vitis Labrusca L.*)”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante:_____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B - Ficha de Aceitabilidade, Intenção de compra e preferência

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

TESTE DE ACEITAÇÃO, INTENÇÃO DE COMPRA E PREFERÊNCIA

Nome: _____ Idade: _____ e-mail: _____

Fone: _____ Escolaridade: _____ Data: _____

Você está recebendo 4 amostras codificadas de uva 'rubi'. Avalie sensorialmente as amostras e confira nota aos atributos analisados de acordo com a escala abaixo. Lembre-se de colocar os códigos das amostras acima das notas conferidas. Recomenda-se fazer uso da bolacha e da água, antes de cada avaliação.

- 9- gostei muitíssimo
8- gostei muito
7- gostei moderadamente
6- gostei ligeiramente
5- nem gostei/nem desgostei
4- desgostei ligeiramente
3- desgostei moderadamente
2- desgostei muito
1- desgostei muitíssimo

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Códigos)			
Aparência				
Cor				
Aroma				
Firmeza				
Sabor				
Sabor residual				
Avaliação global				

Qual seria sua intenção de compra ao encontrar essas uvas no mercado?

- 5- certamente compraria
4- possivelmente compraria
3- talvez comprasse / talvez não
2- possivelmente não compraria
1- jamais compraria

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Códigos)			
Intenção de compra				

Agora ordene as amostras na ordem decrescente de preferência global.

	Mais preferida			Menos preferida
Posto	1º	2º	3º	4º
Código				

Comentários: _____

OBRIGADA!

APÊNDICE C – ARTIGO 1

Aplicação de cobertura comestível a base de nanopartículas de quitosana para o controle de *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* em uvas pós-colheita.

Natália Ferrão Castelo Branco Melo^a, Miguel A.P.Flores^b, André Galembeck^b, Horacina M.M. Cavalcante^c, Tânia L.M. Stamford^a, Thatiana M. Stamford –Arnaud^a, Thayza C.M. Stamford^a.

A ser enviado para revista International Journal of Food Microbiology

Fator de Impacto: 3.082

Qualis A2: Área de Nutrição - CAPES

Aplicação de cobertura comestível a base de nanopartículas de quitosana para o controle de *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* em uvas pós-colheita.

Natália Ferrão Castelo Branco Melo¹, Miguel A.P.Flores², André Galembeck², Horacina M.M. Cavalcante³, Tânia L.M. Stamford¹, Thatiana M. Stamford –Arnaud¹, Thayza C.M. Stamford¹.

¹ *Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, nº1235, Cidade universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.*

² *Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Campus MCTI Nordeste, Av. Prof. Luiz Freire, nº01, CEP:50740-540, Recife, PE, Brasil.*

³ *Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário I, Cidade Universitária, CEP:58059-900, João Pessoa, PB, Brasil.*

* Autor para correspondência: Thayza Christina Montenegro Stamford

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Medicina Tropical

Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

e-mail: thayzastamford29@gmail.com

RESUMO

Coberturas comestíveis são consideradas uma alternativa promissora para melhora da qualidade pós-colheita de frutas. A presente pesquisa tem como objetivo avaliar a citotoxicidade e atividade antimicrobiana de cobertura comestível a base de nanopartículas de quitosana aplicada em uvas. A citotoxicidade foi analisada através da presença de sinais vasculares (hemorragia, vasoconstrição e coagulação) na membrana coriolantóide do ovo de galinha utilizando o teste HET-CAM. A atividade antimicrobiana foi realizada *in vitro* contra bactérias patogênicas de origem alimentar e foi feita a comparação dos resultados do gel, nanopartículas e gel enriquecido com nanopartículas. As nanopartículas produzidas foram dispersas nas concentrações CIM/2, CIM e 2CIM no gel de quitosana para formação de cobertura comestível para o controle de *Salmonella spp.* e *E.coli* em uvas pós-colheita. Os resultados mostraram que as nanopartículas de quitosana não são irritantes pelo teste do HET-CAM e apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana comparada com o gel de quitosana. As nanopartículas diluídas no gel, apresentaram-se mais bem dispersas e capazes de formar uma cobertura comestível em uvas. Com aumento da concentração das nanopartículas na cobertura, foi observado diminuição na contagem de *E.coli* e *Salmonella spp.* Os resultados encontrados sugerem que as nanopartículas de quitosana podem ser usadas para melhorar a segurança microbiológica de uvas pós-colheita.

Palavras-chaves: nanopartículas de quitosana microbiológica, HET-CAM, cobertura comestível, *Salmonella spp.*, *E.coli*.

1. Introdução

A quitosana é um heteropolímero natural formado por unidades glucosaminas e N-acetilglucosamina, obtido a partir da parede celular de fungos ou através da desacetilação da quitina extraída do exoesqueleto de crustáceos (Muzzarelli et al., 2012). Apresenta diferentes características que a distingue dos demais polissacarídeos: bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e potencialidade antimicrobiana (Costa Silva, 2006; Dias et al., 2013).

Sua atividade antimicrobiana tem sido comprovada contra várias bactérias e fungos, possuindo um alto poder bactericida contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, ao mesmo tempo em que apresenta baixa toxicidade para as células de mamíferos (Kong et al., 2010).

A conhecida ação antimicrobiana da quitosana pode ser intensificada quando esse polímero encontra-se no formato de nanopartículas, devido a sua elevada área superficial e a sua densidade de carga que interage efetivamente com as cargas negativas da superfície das células bacterianas (Shi et al., 2006).

Devido a sua atividade antimicrobiana, a quitosana tem atraído atenção como um potencial conservante natural (Prashanth & Tharanathan, 2007). Coberturas de quitosana misturadas com outros compostos bioativos tem mostrado resultados promissores na inibição do crescimento e sobrevivência de microrganismos em alimentos (Chien et al., 2002).

As coberturas de quitosana podem ser empregadas efetivamente para o controle da deterioração de frutos, pois estes são organismos vivos que apresentam intenso metabolismo e conseqüentemente alta probabilidade de deterioração (Jianglian & Shaoying, 2013). As uvas destacam-se como uma das frutas mais economicamente importantes, com uma produção anual em torno de 69 milhões de toneladas (Nowshahri et al., 2015). Assim como outros produtos naturais, as uvas são vulneráveis a contaminação esporádica com patógenos alimentares, direta ou indiretamente, através de animais do solo, água ou contaminação cruzada através da manipulação humana (Pinto et al., 2006). Um tratamento que melhore a qualidade global e segurança microbiológica contra os agentes patogênicos de origem alimentar é um dos maiores interesses dos produtores, distribuidores e consumidores de frutas (Serrano et al., 2006).

Portanto, frente a reconhecida ação antimicrobiana da quitosana e sua intensificação quando este polímero encontra-se na forma de nanopartículas, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de quitosana microbiológica contra bactérias alimentares presentes no armazenamento pós-colheita de uvas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

As uvas (*Vitis Labrusca L.*) foram adquiridos da CEASA/PE (Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco) e selecionadas de acordo com o tamanho, cor, ausência de infecções visíveis e estágio de maturação.

As quitosanas (Kiofine® e Kionutrime®) foram fornecida pela empresa Kitozyme e ambas foram extraídas do *Aspergillus niger*. Todas as outras substâncias utilizadas foram obtidas através de fontes comerciais.

As cepas testes utilizadas na atividade antimicrobiana pertencem ao banco de cultura da Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de nutrição.

2.2 Caracterização das quitosanas fúngicas

As quitosanas (Kiofine-B® e Kionutrime®) foram caracterizadas individualmente. O grau de desacetilação (GD) da quitosana foi determinado por Ressonância Magnética Nuclear (Varian Unity Plus em 3000MHz), segundo metodologia descrita por Signini et al. (2000). A análise foi feita em uma temperatura de 50 °C, tempo de relaxação de 6 segundos e pulso de 90° (Signini & Campana-Filho, 1998).

O peso molecular (PM) foi determinado por medida de viscosidade, segundo a metodologia proposta por Santos et al. (2003), utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske (dinterno= 1,01mm) termostatizado a (25± 0,01)°C, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte.

2.3 Preparação e caracterização das nanopartículas de quitosana

As nanopartículas de quitosana foram produzidas a partir da quitosana fúngica Kiofine-B®, seguindo o método de gelificação iônica descrito por Calvo et al. (1997).

Inicialmente 0,5g de quitosana de baixo peso molecular foi dissolvido em 50ml de ácido acético à 2% em agitação durante 30 minutos. Depois, 20ml de tripolifosfato de sódio (TPP) à 1% foi adicionado à solução de quitosana por gotejamento através de uma bomba peristáltica (0,3ml/min).

Depois do gotejamento a solução foi mantida sob agitação durante 2h. Em seguida, a solução foi transferida para eppendorfs e centrifugada durante 10min em uma velocidade de 13.400rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado água destilada para a lavagem com posterior centrifugação (13.400rpm/5min). O processo de lavagem foi repetido 5 vezes.

Posteriormente, as nanopartículas foram ressuspensas em água destilada e foi realizado um tratamento térmico (30min/50°C/900rpm) para individualização e reestruturação das partículas, segundo o método descrito por Bugnicourt et al. (2014). Por fim, as nanopartículas de quitosana foram liofilizadas para a sua utilização nos demais experimentos. As nanopartículas sem tratamento térmico foram utilizadas apenas no processo de caracterização para comparação com as nanopartículas com tratamento térmico.

O tamanho das partículas foi determinado através da técnica do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) utilizando o Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK). A análise foi operada em um comprimento de onda de 633nm, a 25°C com um ângulo de detecção de 90°C. A morfologia das nanopartículas com e sem tratamento térmico foi observada utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-QUANTA 200FEG).

2.4 Comparação da atividade antimicrobiana do gel, das nanopartículas e do gel enriquecido com nanopartículas de quitosana

A atividade antimicrobiana foi realizada separadamente para as nanopartículas de quitosana, gel de quitosana e gel de quitosana enriquecido com nanopartículas, frente a

bactérias patogênicas de origem alimentar (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*).

A quitosana foi diluída em ácido acético 1%, sendo o pH ajustado para 5,8 para obtenção da solução mãe (20mg/ml^{-1}) que deu origem ao gel de quitosana (Shigemasa e Minami, 1996). As nanopartículas foram diluída em água destilada e no gel de quitosana ambas na concentração de 20mg/ml^{-1} .

As concentrações mínimas inibitórias (CIM) e mínimas bactericidas (CBM) foram determinadas pelo teste de microdiluição seriada em microplacas de 96 poços. As bactérias testadas foram cultivadas em Caldo Infusão de Cérebro Coração (BHI) por 24h, a 37°C e em seguida padronizado o inóculo a 10^8UFC/ml (Alves et al., 2008).

Para determinação do CIM foi inserido, em cada um dos poços, a substância teste cuja concentração variou de 0 a $0,6\text{mg/mL}$, em seguida foi adicionado o meio BHI e o inóculo de cada bactérias, cujo volume final de cada poço foi de $100\mu\text{L}$.

A placa foi incubada a 37°C por 24h, depois foi adicionado $30\mu\text{L}$ de resazurina em cada poço e incubada novamente a 37°C por 1h. A resazurina é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (Palomino et al., 2002). Portanto, a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano enquanto que as variações de rosa e roxo indicam a presença de células viáveis para crescimento.

Depois de 1h da aplicação da resazurina foi feita a análise da mudança da cor e determinação da CIM, considerado a primeira concentração antes da concentração que houve crescimento visível.

Para o controle de esterilidade foram adicionados separadamente $100\mu\text{L}$ do meio e $100\mu\text{L}$ da substância teste e para o controle de crescimento $80\mu\text{L}$ do meio + $20\mu\text{L}$ do inóculo. O ensaio foi realizado em triplicata, dois poços para o CIM pelo uso da resazurina e um para o CBM.

Após a determinação do CIM, a primeira concentração que não houve crescimento visível e duas imediatamente acima, foram cultivadas em placas de petri contendo ágar BHI para determinação do CBM. Foram transferidos $20\mu\text{L}$ das cavidades da microplaca (sem resazurina) para as placas de petri e estas foram incubadas a 37°C por 48h. A determinação da CBM corresponde a menor concentração a partir da qual não foi observado crescimento microbiano após cultivo (Fernandes et al., 2008).

2.5 Teste de citotoxicidade pelo método da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM)

O teste do HET-CAM foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Steiling et al. (1999). Foi testado as nanopartículas de quitosana diluídas em água destilada e o gel de quitosana enriquecido com nanopartículas na maior concentração (2CIM) que foi utilizado nas análises nas uvas.

O teste foi feito no décimo dia de incubação do ovo. Inicialmente, o reservatório acima do espaço aéreo do ovo foi removido. A membrana corioalantóide do ovo foi exposta e umedecida com salina fisiológica a 0,9%. Uma alíquota de 200µL das substâncias testadas foram aplicada na membrana corioalantóide do ovo.

As membranas foram observadas por 5 minutos afim de identificar sinais de vasoconstricção, hemorragia e coagulação. O tempo (em segundos) que cada um dos sinais iniciou foi aplicado na Equação 1, para determinar o índice de irritação (Vargas et al., 2007).

$$IS = \frac{[(301 - \text{haemorrhage}) \times 5] + [(303 - \text{lysis}) \times 7] + [(301 - \text{coagulation}) \times 9]}{300} \quad (\text{Eq. 1})$$

O índice de irritação pode ser avaliado de acordo com os valores a seguir: 0.0-0.9, sem irritação; 1.0-4.9, leve irritação; 5.0-8.9, irritação moderada; e 9.0-21.0, grave irritação (Steiling et al. 1999). Todos os ensaios foram repetidos 5 vezes para cada amostra.

2.6 Bioatividade das coberturas comestíveis sobre o crescimento bacteriano nas uvas

As uvas foram higienizadas com hipoclorito de sódio (1% v/v) por 15min, lavados com água potável e deixados para secar por 2 horas. Depois, foram imersas na solução do inóculo bacteriano (*E.coli* e *Salmonella spp.* -10⁸UFC/ml) sob agitação durante 1minuto (Santos et al., 2012; Vasconcelos de Oliveira et al., 2014; Kim et al., 2014). Em seguida, as uvas foram imersas durante 3 minutos no gel de quitosana enriquecido com nanopartículas nas concentrações CIM/2, CIM e 2CIM. Um grupo de uvas foi imerso apenas na solução do inóculo (amostra controle).

A infecção bacteriana causada nas uvas foi realizada separadamente para *E.coli* e *Salmonella spp.* A escolha dessas espécies de bactérias foi de acordo com a legislação

RDC 212, que preconiza que em uvas sejam analisadas esses tipos de bactérias (Brasil, 2001).

O crescimento bacteriano nas uvas foi analisando ao longo de 24 e 12 dias, nas uvas refrigeradas (12°C) e não refrigeradas (25°C), respectivamente. A determinação de coliformes termotolerantes foi feita através do Método do Número Mais Provável (NMP) presente no Bacteriological Analytical Manual (FDA 2010) e os resultados expressos em NMP/g. A contagem de *Salmonella spp.* foi realizada através da contagem em placas, adaptado do método do BAM/FDA.

3. Resultados/Discussão

3.1 Caracterização das quitosana

Os GD das quitosanas utilizadas para formação do gel e das nanopartículas foi, 86% e 89,5%, respectivamente. Segundo Shimahara et al. (1989), o GD de quitosana de origem microbiológica encontra-se entre 78 – 91%, condizente com os resultados encontrados em nosso estudo.

No presente trabalho, as quitosanas microbiológicas utilizadas são provenientes do *Aspergillus niger*, e segundo Logesh et al. (2012,) esse fungo é um microrganismo promissor na produção desse polímero. Apesar das duas quitosanas utilizadas serem provenientes do mesmo fungo, foi encontrado pequenas diferenças nos seus GD. Isso pode ser explicado por distintas condições de cultivo do microrganismo o que pode influenciar na produção deste polímero (Logesh et al., 2012).

Cai et al. (2006) fez a extração da quitosana do *Aspergillus niger* através do método químico e enzimático e encontrou valores de grau de desacetilação (76,8 e 73,6%) inferiores ao encontrado no trabalho atual. Quitosanas com maior grau de desacetilação apresentam maior solubilidade e densidade de carga, ou seja, maior sua ação antimicrobiana (Sekiguchi et al., 1994).

Os métodos de extração também influenciam sobre o PM da quitosana. Foi encontrado um PM de $4,35 \times 10^4$ e 4×10^3 para as quitosanas usadas nas nanopartículas e no gel, respectivamente, caracterizando-a de baixo peso molecular. Essa é uma importante característica para utilização da quitosana em coberturas para frutas, porque a

quitosana com uma baixa massa molar pode reduzir a resistência a tração ao longo da película de cobertura sem aumentar a permeabilidade (Pochavanich & Suntornsuk, 2002). Além disso, a mobilidade, atração e interação iônica de pequenas cadeias ocorre mais facilmente do que cadeias grandes, ou seja, a quitosana de baixo peso liga-se mais efetivamente a membrana superficial dos microrganismos (Kumar et al., 2005).

3.2 Caracterização das nanopartículas de quitosana

Segundo o DLS, as nanopartículas de quitosana apresentaram diâmetro médio de 139,1 ($\pm 14,74$) e 101,7nm ($\pm 5,05$) para as partículas sem e com tratamento térmico, respectivamente. Resultados semelhantes as nanopartículas sem tratamento térmico foi encontrado por Fan et al., (2012), Rampino et al. (2013) e Yang et al. (2010).

As nanopartículas com tratamento térmico apresentaram um diâmetro médio inferior as partículas sem tratamento e semelhante ao descrito por Ramezani et al. (2015), que ao produzir nanopartículas de quitosana para conservação de filés de peixe obteve um diâmetro médio de 108,6nm.

As diferenças de tamanho e morfologia entre as partículas pode ser observado na MEV (Fig. 1). As nanopartículas com tratamento térmico (Fig. 1B) mostram-se mais homogêneas, circulares e menores em relação ao grupo sem tratamento térmico. No outro grupo, observa-se partículas com formato não esférico, tamanhos bastante diversos, formação de agregados e presença de resíduos de quitosana (Fig. 1A).

A MEV confirma o que Bugnicourt et al. (2014) preconiza em relação ao tratamento térmico empregado nas nanopartículas, que esse processo serve para reduzir os agregados e com isso individualizar as partículas. Isso ocorre devido a reestruturação das cadeias de quitosana que com o aumento da temperatura, o efeito hidrofóbico entre as cadeias pode ser predominante e as cadeias poliméricas podem colapsar na superfície das nanopartículas.

Atualmente, sabe-se que partículas com tamanho menor que 80nm permite sua penetração em tecidos através de finos capilares, o que viabiliza sua utilização na área farmacêutica (Gan et al., 2005). Contudo, na área de alimentos essa característica não é desejável.

No presente trabalho, a utilização das nanopartículas tem função apenas antimicrobiana com a intenção de preservação das uvas sem causar danos ou acúmulo ao

organismo humano. Portanto, foi escolhido para a utilização nos demais experimentos as nanopartículas com tratamento térmico, apresentaram tamanho homogêneo, acima de 80nm, e que de acordo com a microscopia apresentaram morfologia esférica e estrutura compacta.

3.4 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Os resultados do CIM e CBM encontram-se nas tabelas 1 e 2, respectivamente. O gel de quitosana apresentou os melhores resultados para *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S.aureus* e os maiores valores de CIM e CBM para a *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*.

Alguns autores relatam que a quitosana possui um maior efeito antimicrobiano contra bactérias gram-positivas, do que gram-negativas, devido a membrana externa que serve como uma barreira protetora para célula gram-negativa (No et al., 2002; Zhong et al., 2008). Contudo, outros estudos referem que a ação antimicrobiana da quitosana é maior contra bactérias gram-negativas, por causa sua maior densidade de carga negativa, que liga-se as cargas positivas da quitosana, causando vazamento do material intracelular e portanto, maior efeito inibitório (Chung et al., 2004).

Em nosso trabalho, o gel de quitosana obteve o menor CIM e CBM (3mg/ml) para bactérias gram-negativas, porém a *Salmonella spp.* que também faz parte desse grupo de bactérias obteve um dos maiores valores de CIM e CBM (6mg/ml). Esses resultados estão de acordo com o preconizado por Devlieghere et al. (2004), que relata que a ação antimicrobiana da quitosana depende também de outros fatores como a cepa utilizada e a espécie analisada. Segundo Goy et al., (2009), em ambos os tipos de bactérias, a quitosana parece agir diferentemente, mas nos dois casos ela age satisfatoriamente.

Apesar de bastante documentado na literatura a ação antimicrobiana do gel de quitosana, as propriedades antimicrobianas das nanopartículas ainda são limitadas (Moritz et al., 2013). Os resultados encontrados mostram uma melhora na ação antimicrobiana da nanopartículas quando comparado ao gel. Em relação ao gel, houve uma diminuição nos CIM da *Salmonella spp.*, *S.aureus* e *L. monocytogenes* e no CBM da *E.coli*. Qi et al. (2004), também obteve resultados melhores com as nanopartículas para a *E.coli*, *S. aureus* e *Salmonella spp.*, do que com o gel de quitosana.

Essa melhora da atividade antimicrobiana deve-se a maior área superficial e densidade de carga das nanopartículas de quitosana, pois há uma maior interação dessas

partículas com a célula bacteriana, o que causa vazamento de componentes intracelulares, ocasionando a morte do microrganismo (Qi et al., 2004; Shi et al., 2006; Barani et al., 2012).

O *S. aureus* apresentou um CIM (2,0mg/ml) melhor que o encontrado por Madureira et al. (2015), quando produziu nanopartículas de quitosana de alto peso molecular (2,5mg/ml). Para a *E.coli* foi encontrado um CBM (3,0mg/ml) ligeiramente inferior ao de Madureira et al. (2015) (2,8mg/ml). Contudo, segundo Devlieghere et al. (2004), comparar os valores de CIM e CBM de diferentes estudos é difícil, por causa da possibilidade de diferenças nas características da quitosana utilizada, na temperatura de incubação, pH, solvente, cepa e espécies analisadas.

Com relação ao gel de quitosana enriquecido com nanopartículas, percebemos que a melhora na ação antimicrobiana ocorreu em quase todas as bactérias, com exceção apenas da *Salmonella spp.*, cujos valores de CIM e CBM mantiveram-se iguais aos determinados para as nanopartículas sozinhas.

No gel de quitosana as nanopartículas apresentam-se mais dispersas e segundo Lee et al. (2010) as nanopartículas quando bem dispersas na solução são mais eficientemente transportadas para a parede celular da bactéria causando distúrbios e levando a uma maior atividade antimicrobiana.

Em relação a atividade antimicrobiana, uma cobertura mais homogênea é desejável, pois fornece uma proteção mais efetiva entre a fruta e o ambiente externo (Tezotto-Uliana et al., 2014), como consequência, a transferência de oxigênio e a atividade respiratória do microrganismo são prejudicadas (Aquino et al., 2015). Portanto, tendo em vista estes aspectos, no presente trabalho foi escolhido o gel de quitosana enriquecido com nanopartículas para posterior aplicação nas uvas.

3.4 Teste de citotoxicidade HET-CAM

O ensaio foi utilizado para análise de efeitos inflamatórios e vasculares causados pelas nanopartículas de quitosana e gel de quitosana enriquecido com as nanopartículas. Não foi observado nenhuma mudança na membrana corioalantóide do embrião, sem ocorrência de hemorragia, vasoconstrição e coagulação (Fig. 2). Resultado semelhante

foi encontrado para as nanopartículas de quitosana produzidas por Baptista da Silva et al. (2016) e Rampino et al. (2013).

É de extrema importância a avaliação toxicológica de materiais nanoestruturados, devido a seu tamanho e formato, capazes muitas vezes de penetrar em tecidos e causar danos celulares (Rampino et al., 2013).

No presente estudo, as nanopartículas de quitosana sozinhas ou na presença do gel mostraram-se não-tóxicas de acordo com o HET-CAM, o que possibilita seu uso em alimentos e consequentemente seu consumo humano.

3.5 Efeito antimicrobiano das coberturas de nanopartículas nas frutas

As tabelas 3 e 4 mostram o resultado do estudo *in vivo* das diferentes concentrações de nanopartículas em uvas refrigeradas e não refrigeradas infectadas artificialmente pela *E.coli*.

A amostra controle, em ambas as temperaturas, apresentou os valores máximo de *E.coli* detectado pela técnica do NMP. Neste caso, a temperatura de armazenamento não interferiu nos resultados encontrados. Porém, as amostras CIM e 2CIM, foram as mais eficazes na inibição da *E.coli*, além disso a temperatura de armazenamento mostrou-se um fator potencializador dessa inibição.

Baixas temperaturas tem sido sugeridas como um ponto crítico no controle da contaminação microbiana em frutas e vegetais, inclusive eficaz em manter a qualidade pós-colheita de uvas (Jessup, 1992; Carter et al., 2015).

As nanopartículas na concentração CIM/2 em temperatura de refrigeração obteve os valores mínimos da técnica do NMP nos 4 últimos dias da análise, mostrando melhora em relação a essa mesma concentração em temperatura ambiente. Na concentração CIM, apenas os dias 9, 12 e 15 mostraram resultados acima do limite mínimo que é de 3NMP/g, enquanto que em temperatura ambiente todos os dias apresentaram valores acima desse limite mínimo, com exceção do dia 2. Um declínio na população de *E.coli* depois da inoculação e em armazenamento a baixas temperaturas também foi observado em alfaces (Theofel & Harris, 2009) e em aipo (Vandamm et al., 2013).

Em nosso estudo, o melhor resultado foi encontrado para as uvas em temperatura de refrigeração e cobertas com nanopartículas na concentração 2CIM. Em todos os 24

dias de análise essas uvas apresentaram resultados semelhantes ao limite mínimo da técnica do NMP, apenas no dia 0 e 9 encontrou-se valores acima desse limite. A concentração 2CIM assemelha-se a concentração bactericida mínima determinada na atividade antimicrobiana para *E.coli* e portanto os resultados *in vitro* estão de acordo com a nossa análise *in vivo*.

Aquino et al. (2015), analisando goiabas com e sem cobertura de quitosana enriquecida com óleo essencial de *Lippia gracilis* encontrou valores <3NMP/g durante os 10 dias do estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso trabalho para uvas cobertas com nanopartículas na concentração 2CIM e armazenadas sobre refrigeração. Contudo, a cobertura analisada em nosso estudo mostrou-se mais eficaz pois as uvas foram infectadas antes da aplicação das substâncias teste e obtiveram resultados semelhantes em relação as goiabas estudadas por Aquino et al. (2015) que não foram infectadas previamente com *E.coli*.

A melhor ação antimicrobiana das coberturas comestíveis com nanopartículas em relação ao uso da quitosana em gel, reafirma o preconizado por Cruz-Romero et al. (2013), de que as nanopartículas de quitosana apresentam atividade antimicrobiana intensificada, porque o seu pequeno tamanho possibilita a entrada da quitosana mais facilmente na célula microbiana, combinando-se com o DNA, inibindo a síntese de RNAm e a transcrição do DNA, promovendo distúrbios no metabolismo celular que são capazes de levar à morte do microrganismo.

Os resultados encontrados para *Salmonella spp.* encontram-se na figura 3. A amostra CIM/2, apresentou resultados semelhantes ao encontrado nas uvas controles nos 2 primeiros dias. Nos dias seguintes os resultados aproximam-se dos valores encontrados para as outras concentrações de nanopartículas, mostrando um início lento na ação antimicrobiana da concentração CIM/2 contra *Salmonella spp.* em uvas não refrigeradas.

No armazenamento a temperatura ambiente, foi observado também que ao final do período de análise ocorreu um intenso crescimento fúngico nas uvas, culminando com a fermentação dessa fruta e a ausência do microrganismo estudado no 12º dia de análise.

Segundo Lopez-Velasco et al. (2012), a microflora da própria uva pode antagonizar com as células do patógeno inoculado. Isso ocorre devido a competição por nutriente e espaço entre os microrganismos presentes (Sim et al., 2013). Esse efeito antagônico observado em nosso estudo, também foi visto após apenas 4 dias em uvas

armazenadas a temperatura ambiente e cobertas com cera de carnaúba cujo crescimento fúngico inibiu o desenvolvimento de *Salmonella spp.* e *E.coli* (Kim et al., 2014). Resultado semelhantes foi encontrado por Lopez-Velasco et al. (2012), em folhas de espinafre.

Nas uvas armazenadas refrigeradas, não foi observado crescimento fúngico durante o período de 24 dias de análise, mostrando a importância da temperatura em controlar o desenvolvimento da microflora da fruta. Ma et al. (2016), não observou crescimento de *Salmonella spp.* a 4°C, estando de acordo com o preconizado pela FDA (2001) que diz que a temperatura mínima de crescimento da *Salmonella spp.* é em torno de 4-5°C. Em nosso estudo a temperatura de refrigeração não foi capaz de inibir completamente o crescimento desta bactéria, no entanto, nos 4 últimos dias de análise houve uma diminuição no crescimento da *Salmonella spp.* nas uvas com tratamento.

As coberturas comestíveis a base de nanopartículas de quitosana analisadas em nosso estudo foram capazes de inibir o crescimento das bactérias estudadas. Essa inibição ocorreu devido a ação antimicrobiana intensificada das nanopartículas de quitosana e a atmosfera modificada criada pela cobertura, capaz de suprimir a concentração de oxigênio do microrganismo. Segundo Kim et al. (2014), a aplicação do inóculo na fruta antes da cobertura comestível, método adotado em nosso estudo, simula uma situação onde as bactérias contaminam as uvas antes da aplicação da substância antimicrobiana e portanto a cobertura aplicada posteriormente produz um ambiente com baixa concentração de oxigênio para as células microbianas, agindo como uma barreira.

4. Conclusão

As nanopartículas de quitosana microbiológica com tratamento térmico apresentaram tamanho homogêneo, esférico e sem formação de agregados e, portanto, foi a escolhida para os demais experimentos. Essas nanopartículas mostraram-se biocompatível e com uma efetiva ação antimicrobiana contra bactérias patogênicas de origem alimentar.

Os resultados indicaram uma melhor ação antimicrobiana das nanopartículas quando comparado ao gel de quitosana. Quando as partículas foram dispersas no gel de quitosana formaram uma excelente cobertura comestível, capaz de controlar o

crescimento microbiano de *Salmonella spp.* e *E.coli* em uvas pós-colheita, tornando-se uma alternativa para o controle de bactérias pós-colheita em frutas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE-Brasil) pelo financiamento concedido a pesquisa. Agradecemos a empresa Kitozyme pelo fornecimento da quitosana.

Referências

- Alves, E.G., Vinholis, A.H.C., Casemiro, L.A., Furtado, N.A.J.C., Silva, M.L.A., Cunha, W.R., Martins, C.H.G., 2008. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, Franca, 31, 1224-1229.
- Aquino, A.B., Blank, A.F., Santana, L.C.L.A., 2015. Impact of edible chitosan cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis*-Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. *Food Chemistry*, 171, 108–116.
- Bougnicourt, L., Alcouffe, P., Ladavière, C., 2014. Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloidally stable objects. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 476-486.
- Barani, H., Montazer, M., Samadi, S., Toliyat, T., 2012. In situ synthesis of nano silver/lecithin on wool: enhancing nanoparticles diffusion. *Colloid. Surf. B*, 92, 9-15.
- Batista da Silva, S.; Ferreira, D.; Pintado, M.; Sarmiento, B., 2016. Chitosan based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery-*In vitro* tests. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 112-120.
- Brasil, Anvisa. Resolução RDC nº12. (de 02 de janeiro de 2001). Estabelece Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132.
- Carter, M.Q., Mary, H.C., Glaber, F., Brandl, M.T., 2015. Effect of sulfur dioxide fumigation on survival of foodborne pathogens on table grapes under standard storage temperature. *Food Microbiology*, 49, 189-196.
- Chien, P.J., Sheu, F., Lin, H.R., 2007. Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry*, 100, 1160-1164.
- Chung, Y.C., Su, Y.P., Chen, C.C., Jia, G., Wang, H.L., Wu, J.C.G., Lin, J.G., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 932–936.
- Costa Silva, H. S. R., Santos, K.S.C.R., Ferreira, E.I., 2006. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29, 776-785.
- Cruz-Romero, M.C., Murphy, T., Morris, M., Cummins, E. Kerry, J.P., 2013. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control*, 34, 393-397.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J., 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.

Dias, K.B., Silva, D.P., Ferreira, L.A., Fidelis, R.R., Costa, J.L., Lopes da Silva A.L., Scheidt, G.N., 2013. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4, 184-191.

Fan, W., Yan, W.; Xu, Z.; Ni, H., 2012. Formation mechanism of monodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surface B Biointerfaces*, 90, 21-27.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2010). Bacteriological analytical manual online. Available from: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> Acesso em: 30.08.15.

Fernandes, J.C, Tavaría, F.K., Soares, J.C., Ramos, O.S., Monteiro, M.J., Pintado, M.E.; Malcata, F.X., 2008. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol.*, 25, 922–928.

Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., Mccarron, P., 2005. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf. B*, 44, 65–73.

Goy, R.C., Britto, D., Assis, O.B.G., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 9, 3, 241-247.

Jessup, A.J., 1992. Low-temperature storage as a quarantine treatment for table grapes infested with Queensland fruit-fly (*Bactrocera tryoni* Froggatt). *Crop Hortic. Sci.* 20, 235-239.

Jianglian, D., Shaoying, Z., 2013. Application of chitosan based coating in fruit and vegetable preservation: a review. *J. Food Process Technol*, 4, 227.

Kim, L.H., Oh, Y.A., Lee, H., Song, K.B., Min, S.C., 2014. Grape berry coatings of lemongrass oil-incorporating nanoemulsion. *Food Science and Technology*, 58, 1-10.

Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.

Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C.; Gowda, L.R., Tharanathan, R.N., 2005. Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemistry Journal.*, 391,167-75.

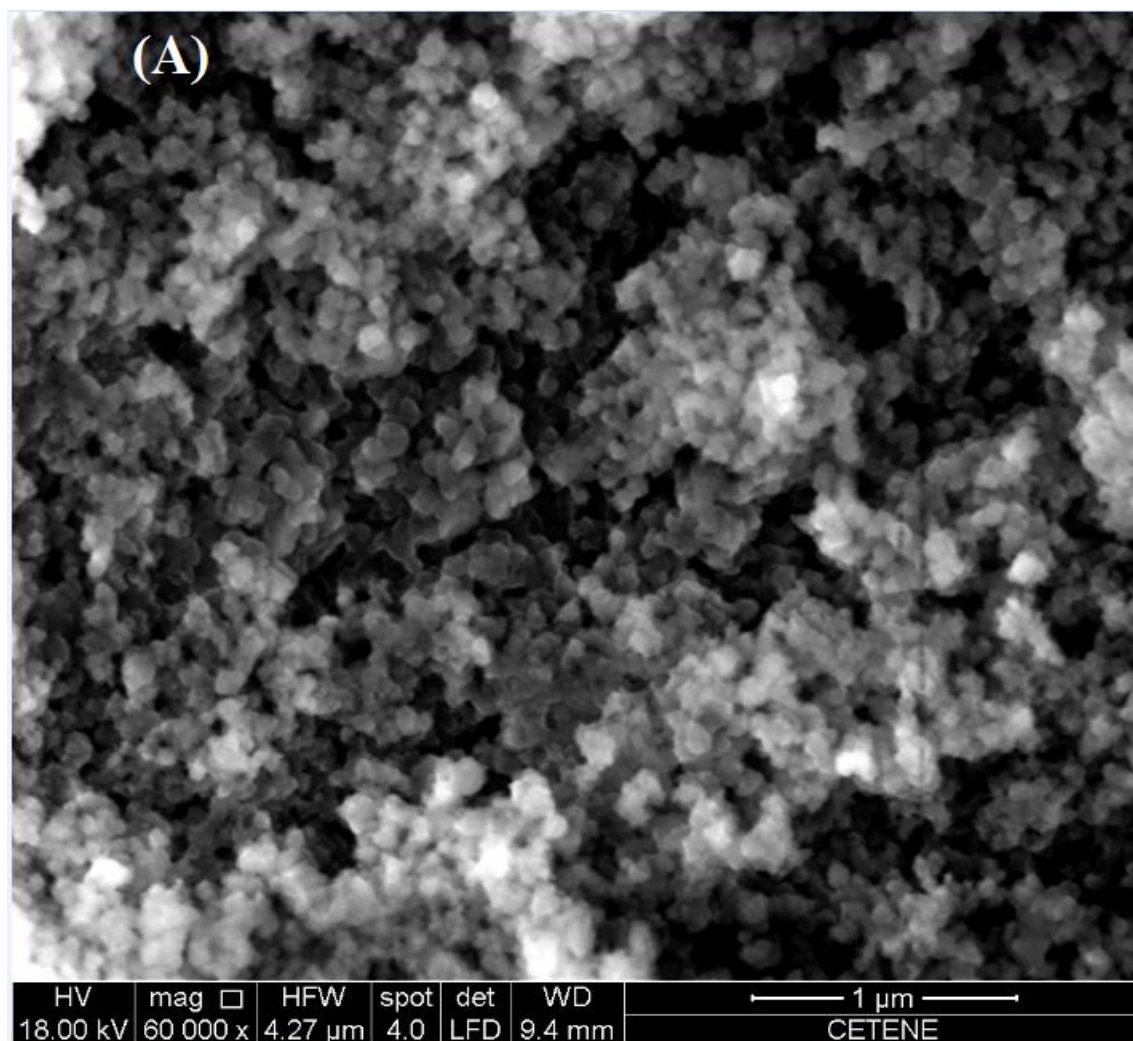
Lee, S.M., Song, L.C., Lee, B.S., 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *J. Chem. Eng.*, 27, 688-692.

- Logesh, A.R., Thillaimaharani, K.A., Sharmila, K., Kalaiselvam, M.; Raffi, S.M. Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2,140–143, 2012.
- Lopez-Valasco, G., Tydings, H.A., Bpyer, R.R., Falkinham, J.O., Ponder, M.A., 2012. Characterization of interactions between *Escherichia coli* O157:H7 with epiphytic bacteria in vitro and on spinach leaf surfaces. *Int. J. Food Microbiol.*, 153, 351–357.
- Ma, C., Li, J., Zhang, Q., 2016. Behavior of *Salmonella* spp. On fresh-cut tropical fruits. *Food Microbiology*, 54, 133-141.
- Madureira, A.R., Pereira, A., Castro, P.M., Pintado, M., 2015. Production of antimicrobial nanoparticles against food pathogens. *Journal of Food Engineering*.
- Moritz, M., Geszke-Moritz, M., 2013. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 228, 596-613.
- Muzzarelli, R.A.A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., Demarchis, M., Paoletti, M.G., 2012. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87,995-1012.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P., 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65–72.
- Nowshahri, J.A., Bhat, Z.A., Shah, M.Y., 2015. Blessings in disguise: bio-functional benefits of grape seedextracts. *Food Research International*, 77, 333-348.
- Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F., 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother* 46, 2720–2722.
- Pinto, R., Linchter, A., Danshin, A., Sela, S., 2006. The effect of an ethanol dip of table grapes on populations of *Escherichia coli*. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 308-313.
- Pochanavanich, P., Suntornsuk, W., 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 17-21.
- Prashanth, H. K. V., Tharanathan, R. N., 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 117e131.
- Qi, L.F., Xu, Z.R., Jiang, X., Hu, C.H., Zou, X.F., 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693–2700.

- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P.; Bellich, B., Cesàro, A., 2013. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 219-228.
- Ramezani, Z., Zarei, M., Raminnejad, N., 2015. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Food control*, 51, 43-48.
- Santos, J.E., Soares, J.P., Dockal, S.E., 2003. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol.13, nº4, p.242-249.
- Santos, N.S.T., Aguiar, A.J.A.A., Vasconcelos de Oliveira, C.E., Veríssimo de Sale, C., Silva, S. M., Sousa da Silva, R., Stamford, T.C.M., Leite de Souza, E., 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32, 345-353.
- Sekiguchi, S., Miura, Y., Kaneko, H., Nishimura, S.I., Nishi, N., Iwase, Tokura, S., 1994. Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. *Food Hydrocolloids: Structures, properties, and functions*, 71–76.
- Serrano, M., Martinez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D., 2006. Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 61-68.
- Signini, R., Campana Filho, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Polímeros*, v. 8, n. 4, 1998.
- Signini, R., Desbrières, J., Campana Filho, S.P., 2000. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 43, 351-357.
- Shi, Z., Neoh, K.G., Kang, E.T., Wang, W., 2006. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 27, 2440-2449.
- Shigemasa, Y., Minami, S., 1996. Application of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Gen Eng Rev*, 17, 413-420.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K.; Sannan, T., 1989. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, & P. Sandford. Elsevier Appl. Sci. London-New York, 319-322.
- Sim, H.L., Hong, Y.K., Yoon, W.B., Yuk, H.G., 2013. Behavior of *Salmonella* spp. and natural microbiota on fresh-cut dragon fruits at different storage temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 160, 239–244.
- Steiling, W., Bracher, M., Coutellemont, P., Silva, O., 1999. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicol In Vitro*, 13, 375-84.

- Theofel, C.G., Harris, L.J., 2009. Impact of preinoculation culture conditions on the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto romaine lettuce (*Lactuca sativa*) plants and cut leaf surfaces. *J. Food Prot.*, 72, 1553–1559.
- Tezotto-Uliana, J.V., Fargoni, G.P., Geerdink, G.M., Kluge, R.A., 2014. Chitosan applications pre–or postharvest prolong raspberry shelf–life quality. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 72–77.
- Vandamm, J.P., Li, D., Harris, L.J., Schaffner, D.W., Danyluk, M.D., 2013. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. *Food Microbiol.*, 34, 151–157.
- Vargas, A., Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gumy, R., Delie, F., 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Actv. Drug. Deliv. Rev.*, 59, 1162-1176.
- Vasconcelos de Oliveira, C.E., Magnani, M., Veríssimo de Sales, C., Pontes, A.L.S., Campos-Takaki, G.M., Stamford, T.C.M., Leite de Souza, E., 2014. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 171, 54-61.
- Yang, H.C., Wang, W.H., Huang, K.S., Hon, M.H., 2010. Preparation and application of nanochitosan to finishing treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties. *Carbohydrate Polymers*, 79, 176-179.
- Zhong, Z.M., Xing, R.G., Liu, S., Wang, L., Cai, S.B., Li, P.C., 2008. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydrate Research*, 343, 566–570.

Fig. 1: MEV das nanopartículas de quitosana sem (A) e com tratamento térmico (B).



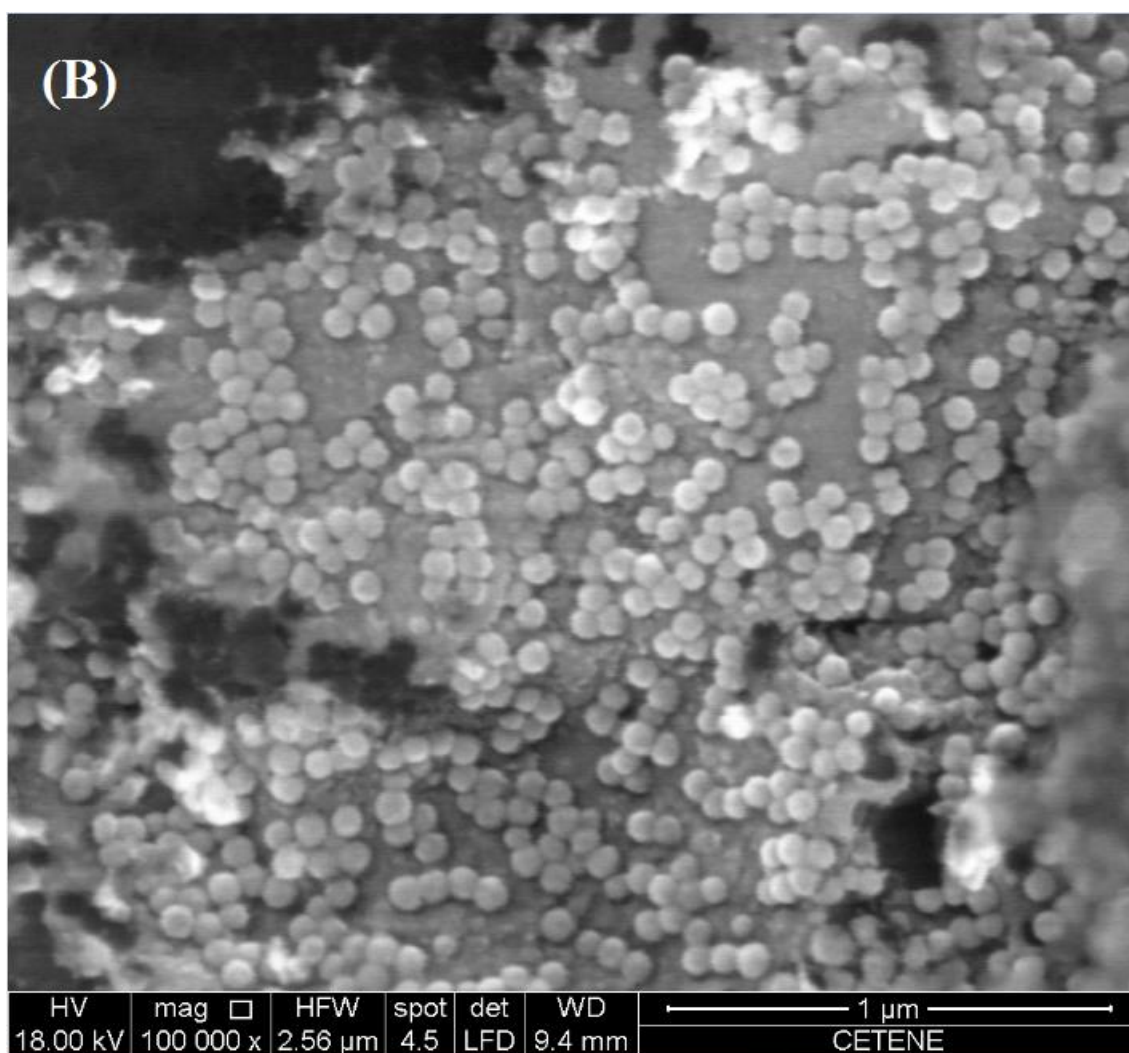


Fig. 2: Citotoxicidade das nanopartículas de quitosana (A) e da associação do gel e nanopartículas de quitosana (B) pelo teste do HET-CAM.

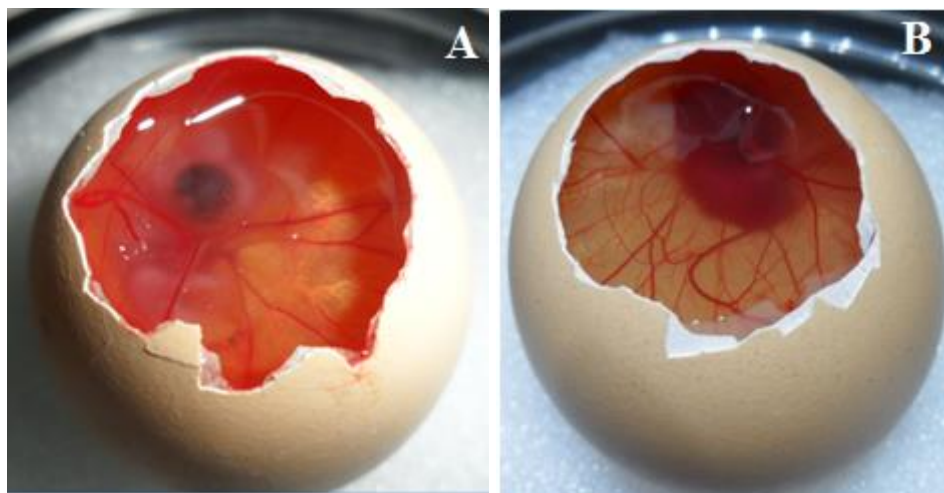
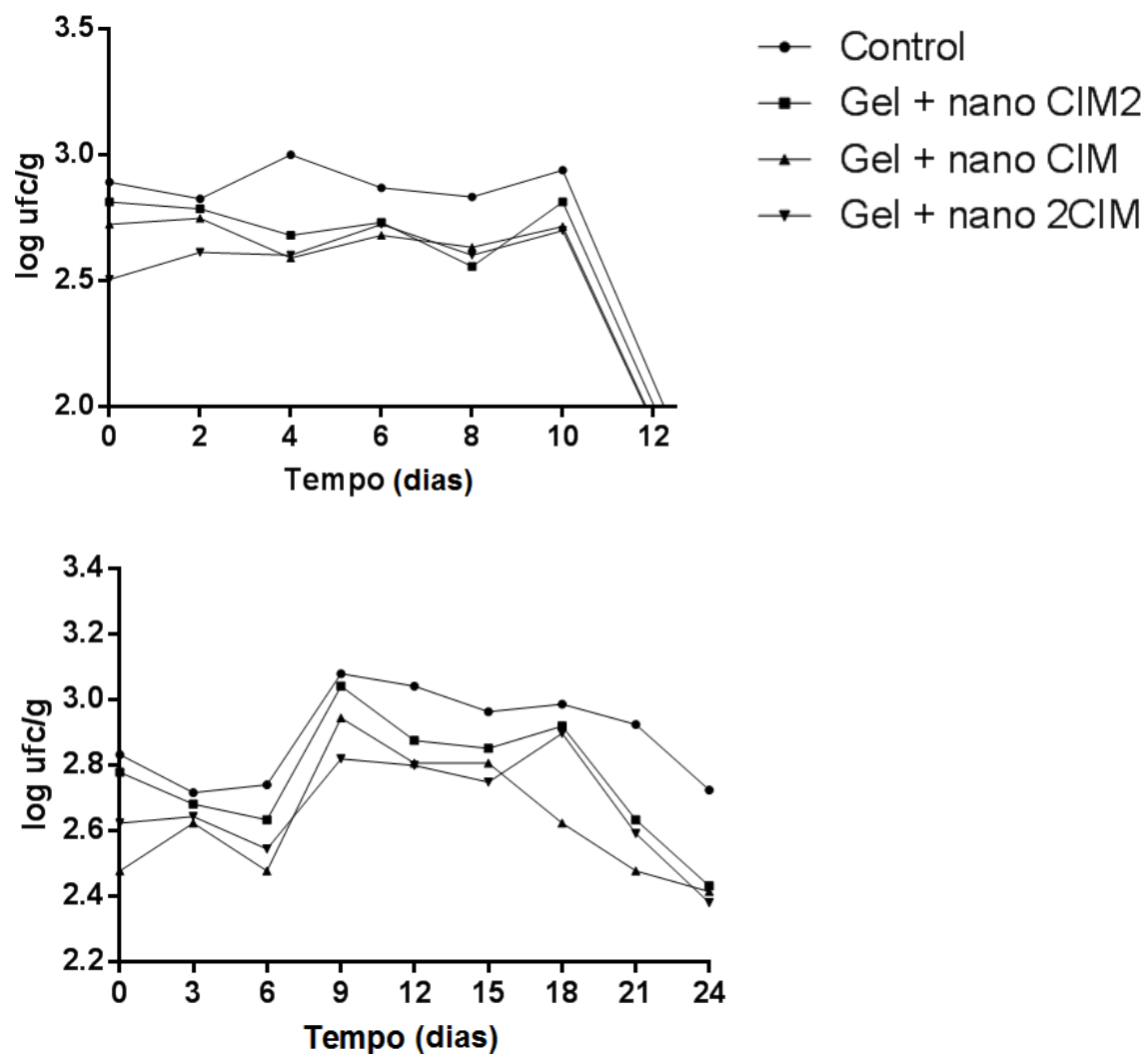


Fig. 3: Sobrevivência de *Salmonella* spp. em uvas não refrigeradas (A) e refrigeradas (B) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas.



Tab. 1: Concentração inibitória mínima (CIM) do gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas.

Bactéria	Gel (mg/ml)	Nanopartículas (mg/ml)	Gel + nanopartículas (mg/ml)
<i>E.coli</i>	3,0	3,0	2,0
<i>Salmonella spp.</i>	6,0	3,0	3,0
<i>P. aeruginosa</i>	3,0	3,0	2,0
<i>S. aureus</i>	4,0	2,0	1,0
<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3,0	2,0

Tab. 2: Concentração bactericida mínima (CBM) do gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas.

Bactéria	Gel (mg/ml)	Nanopartículas (mg/ml)	Gel + nanopartículas (mg/ml)
<i>E.coli</i>	4	3	4
<i>Salmonella spp.</i>	6	6	6
<i>P. aeruginosa</i>	3	4	4
<i>S. aureus</i>	4	6	2
<i>L. monocytogenes</i>	6	6	2

Tab. 3: Sobrevivência de *E.coli* (NMP/g) em uvas não refrigeradas (25°C) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas.

TRATAMENTO	DIA DE ARMAZENAMENTO						
	0	2	4	6	8	10	12
Controle	210	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100
CIM/2	36,59	18,86	160	290	1100	>1100	23
CIM	9,2	3	35	75	150	460	9,2
2CIM	7,4	<3	19,23	43	28	3	3,6

Controle: uvas sem cobertura; CIM/2: uvas cobertas com a metade da concentração inibitória mínima das nanopartículas; CIM: uvas cobertas com a concentração inibitória mínima das nanopartículas; 2CIM: uvas cobertas com duas vezes a concentração inibitória mínima das nanopartículas.

Tab. 4: Sobrevivência de *E.coli* (NMP/g) em uvas refrigeradas (12°C) após aplicação de diferentes concentrações de nanopartículas.

TRATAMENTO	DIA DE ARMAZENAMENTO								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Controle	1.100	1.100	1.100	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
CIM/2	1.100	<3	43	6,2	240	<3	14	<3	<3
CIM	1.100	<3	3	93	240	3,6	3	<3	<3
2CIM	1.100	<3	<3	7,4	<3	<3	<3	<3	<3

Controle: uvas sem cobertura; CIM/2: uvas cobertas com a metade da concentração inibitória mínima das nanopartículas; CIM: uvas cobertas com a concentração inibitória mínima das nanopartículas; 2CIM: uvas cobertas com duas vezes a concentração inibitória mínima das nanopartículas.

APÊNDICE D – ARTIGO 2**“Effects of nanoparticles chitosan from fungi as eco-sustainable edible coating on quality on postharvest table grapes”**

Natália Ferrão Castelo Branco Melo^a, Bruna Lúcia de Mendonça Soares^a, Miguel A.P.Flores^b, José Henrique da Costa Tavares-Filho^a, André Galembeck^b, Thatiana M. Stamford –Arnaud^a, Thayza C.M. Stamford^a.

A ser enviado para revista International Journal of Food Microbiology

Fator de Impacto: 3.082

Qualis A2: Área de Nutrição - CAPES

Recife/Pernambuco - Brazil, February/2016

Dear Editor-in-chief

International Journal of Food Microbiology

We are pleased of sending the enclosed short communication entitled "EFFECTS OF NANOPARTICLES CHITOSAN FROM FUNGI AS ECO-SUSTAINABLE EDIBLE COATING ON QUALITY ON POSTHARVEST TABLE GRAPES" to be peer reviewed by the scientific board of International Journal of Food Microbiology editorial board in order to a possible further publication. This manuscript has not been previously published, is not currently submitted for review to any other journal, and will not be submitted elsewhere before a decision is made by this journal.

We strongly believe that the manuscript brings important not previously published data, and opens new study perspectives on the research of the use of edible coating containing chitosan nanoparticles from fungi as a promising strategy to improve the post-harvest quality of fruits.

Best regards

yours,

Thayza C. M. Stamford*

and co-workers.

*Author for correspondence:

Thayza Christina Montenegro Stamford (Stamford, T.C.M.)

Universidade Federal de Pernambuco /Departamento de Medicina Tropical

Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical . Av. Profª Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil. 50670-901.

E-mail: thayza.stamford@pq.cnpq.br / thayzastamford29@gmail.com

Phone:+55 81 21268526 Fax: +55 81 21268473

HIGHLIGHTS

- ▶ Nanoparticles of fungal chitosan are an alternative to inhibit food spoilage.
- ▶ Coating of chitosan gel/nanoparticles from fungi has its antibacterial action improved.
- ▶ Coating of chitosan gel/nanoparticles from fungi increase the shelf life of grapes.
- ▶ Coating of chitosan gel/nanoparticles from fungi didn't alter the quality of grapes.
- ▶ Coating of chitosan gel/nanoparticles from fungi slows the ripening process of grapes

ABSTRACT

The grapes stand out as an economically important fruit, perishable and susceptible to microbial spoilage. The use of edible chitosan coatings have been considered a viable alternative to extend the postharvest life and ensure the physical-chemical and microbiological quality of fruit. The properties of chitosan can be potentiated when the chitosan are presented in the format of nanoparticles. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity and the influence on quality of grapes treated with edible coatings based the association between gel and nanoparticles of chitosan from fungi stored at 12°C and 25°C. The fungal chitosan, Kiofine-B® and Kionutrime®, were obtained from the cell wall of *Aspergillus niger*, and were provided by Kitozyme®. The characterizations of chitosan were performed to determine the degree of deacetylation, structural characteristics and molecular weight, respectively by the techniques, Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance, Infra-red spectroscopy and viscosity. The nanoparticles were prepared by ionic gelation method and thereafter underwent a heat treatment (50 °C / 900rpm / 30min). Its characterization was carried out by Dynamic Light Scattering and scanning electron microscopy and transmission. The microdilution test was used to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal of nanoparticles of chitosan, chitosan-gel and gel enriched with nanoparticles against food-borne pathogenic bacteria. In order to obtain the coatings to be tested, chitosan was solubilized in 1% acetic acid (20mg/mL) and nanoparticles were subsequently added (MIC/2, MIC and 2xMIC). Glycerol was used as control. The grapes with coatings (tests and control) were analyzed for physicochemical (total soluble solids, pH, titratable acidity, anthocyanin, reducing sugar, moisture content and colour parameters) and sensory attributes. The chitosans, Kiofine-B® e Kionutrime® presented, respectively, deacetylation degree of 89.5% and 86% and a low molecular weight of 4.35×10^4 g/mol and 4×10^3 g/mol. The produced nanoparticles have spherical shape and medium size of 101,7nm. The edibles coatings tests preserved the physicochemical and sensory quality of grapes and inhibited the growth of food-borne pathogenic bacteria. The results obtained in this study demonstrated the effectiveness of the gel enriched with nanoparticles at different concentrations (MIC/2, MIC, 2MIC) to inhibit the growth of pathogenic food-borne bacteria. The coating of chitosan gel/nanoparticles did not alter the quality of grapes and delayed the ripening process, without changes in grape sensory attributes. Therefore, the use of coatings containing chitosan nanoparticles can be a promising strategy to improve the post-harvest quality of grapes.

Keywords: nanomaterials, postharvest quality, shelf life, tropical fruits, biopolymer, food packaging

EFFECTS OF NANOPARTICLES CHITOSAN FROM FUNGI AS ECO-SUSTAINABLE EDIBLE COATING ON QUALITY ON POSTHARVEST TABLE GRAPES

Natália Ferrão Castelo Branco Melo^a, Bruna Lúcia de Mendonça Soares^a, Miguel A.P. Flores^b, José Henrique da Costa Tavares-Filho^a, André Galembeck^{b,c}, Thatiana Montenegro Stamford –Arnaud^a, Thayza Christina Montenegro Stamford^{d*}.

^a *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

^b *Center of Strategic Technologies of Northeast, Campus MCTI Nordeste, Av. Prof. Luiz Freire, nº01, CEP:50740-540, Recife, PE, Brazil.*

^c *Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

^d *Laboratory of Microbiology, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

* Correspondence author:

Name: Thayza Christina Montenegro Stamford (Stamford, T.C.M.)

Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical . Av. Prof^a Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil. 50670-901.

E-mail: thayzastamford29@gmail.com / thayza.stamford@pq.cnpq.br

Telephone: 55 +8121268526

Fax: 55+8121268473

1. Introduction

Grapes are one of the most economically important fruit, with an annual production around 69 million tonnes (Nowshetri et al., 2015). It was considered a highly perishable and non-climacteric fruit, with limited shelf life due to loss of firmness, berry drop, stem discoloration, desiccation and rot by microorganisms. Furthermore, the presence of microorganisms on the surface of the fruit can damage the microbiological safety and quality of the final product (Meng et al., 2008). To control the spoilage and contamination of food it cause economic losses and risks to the health, the spotlight of the food industry is on developing new strategies that allow increased shelf life and inhibit microbial contamination of food (Elsabee and Abdou, 2013; Theron and Lues, 2007).

Among the natural alternatives for preserving fruit, the use of chitosan gel edible coating has been widely studied due to their antimicrobial activity and low toxicity to mammalian cells (Elsabee and Abdou, 2013; Kerch et al., 2015). Chitosan is a polysaccharide composed of β -1,4-D-glucosamine linked to N-acetyl-glucosamine residues and naturally present in fungi cell wall or extracted by the deacetylation of chitin which is a polysaccharide present in the exoskeleton of marine invertebrates. Fungi biomass is a promising eco-friendly alternative to obtain chitosan, because it is not affected by seasonal factors, can be produced on a large scale using industry wastes as cheaper substrate and does not contain any of the proteins that induce allergic reactions to crustaceans (Berger et al, 2014; Stamford et al., 2013; Oliveira et al., 2014).

The edible chitosan coatings have been considered one of the potential technologies to ensure the microbiological safety of foods. Nevertheless, the incorporating of nanostructures to the films and coatings can improve the properties these materials (Bougnicourt et al., 2014; Osheba et al., 2013; Pilon et al., 2014). The chitosan nanoparticles are considered a material with excellent physicochemical properties, because it presents a best antimicrobial activity when compared to chitosan gel. This is due to the high surface area and its charge density that effectively interact with the negatively charged surface of bacterial cells (Arora and Padua, 2010; Ing et al, 2012; Osheba et al., 2013; Pilon et al., 2014).

Although several studies have shown satisfactory results from the use of edible films and coating based on chitosan gel on fruits and vegetables, there is a limitation of studies with chitosan nanoparticles incorporated into the matrix of polymeric coating. Therefore, due to the recognized biological potential of chitosan and its possible use in nanoparticles form, the aim of this research was analyze the use of fungal chitosan nanoparticles in table grapes conservation.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Grapes (*Vitis labrusca L.*) were purchased from CEASA (Supplies and Service Company of Pernambuco, Recife, Brazil) and selected according to size, color, no signs of deterioration and mechanical damage.

The chitosan (Kiofine® and Kionutrime®) were provided by Kitozyme® Company and both are fungal chitosan from *Aspergillus niger*. The others substances used were obtained from commercial sources.

2.2 Preparation and characterization of chitosan nanoparticles

Chitosan nanoparticles were prepared by ionic gelation process. Firstly, 0.5g of fungal chitosan, obtained from Kitozyme (Kiofine®, deacetylation degree = 89%, Molecular weight = 4.35×10^4 extracted from *Aspergillus niger*) was dissolved in 50 ml of acetic acid at 2%, under stirring for 30 minutes. Then, the TPP solution (1%) was added to the chitosan solution drop wise (0,3ml/min) using a peristaltic pump under vigorous magnetic stirring at room temperature (Calvo et al., 1997). After the end of dripping, the nanoparticle solution was stirred for 2 hours. Then, chitosan nanoparticles were purified by centrifugation at 13.400rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet was redispersed by vortex mixing in deionized water. The washing procedure was repeated about 5 times.

The final thermal treatment used to individualize and restructure nanoparticles was performed by stirring a purified suspension of chitosan nanoparticles for 30 min at 50°C and 900rpm, described by Bougnicourt et al. (2014). Then, the nanoparticles were lyophilized.

The characterization of chitosan nanoparticles was made by Transmission Electron Microscopy (FEI – Morgagni) and Dynamic Light Scattering using a Zetasizer Nano-ZS-90 (Malvern, UK). The analysis was performed at a scattering angle of 90°C at 25°C in 633nm.

2.3 Determination of antimicrobial activity of chitosan nanoparticles

The determination of antimicrobial activity of chitosan nanoparticles, against foodborne pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* – ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* – ATCC 7664, *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 9027, *Salmonella spp.* - ATCC 14028, *Escherichia coli* – ATCC 25922) was performed based on the microdilution test using a 96 wells microplate.

The bacteria were cultivated at Brain Heart Infusion (BHI) for 24h, at 37 °C and an initial inoculum of 10⁸ CFU/ml obtained (Berger et al., 2014). The nanoparticles (20mg/ml) were dispersed in deionized water.

The nanoparticles chitosan in a concentration ranged from 0 to 600µg/ml was inserted in the wells, then was added BHI broth and the inoculum of each bacteria, so the final volume of each well was 100 µL. The plate was incubated at 37°C for 24 hours, then added 30µL of resazurin in each well and again incubated at 37°C for 1 hour. After 1 hour of resazurin application, it was made the analysis of the color change (the blue color - no bacterial growth/ pink and purple - the presence of viable cells for growth) to determine the minimal inhibitory concentration (MIC).

2.4 Preparation and application of edible coatings in grapes

Grapes one day after harvest were previously selected according to the fruit maturation stage. Grapes were immersed in sodium hypochlorite (1% v / v) for 15 min, washed with potable water and left to dry for 2 h. Then, the fruits were immersed for 3 min in the coating solutions containing different combinations of chitosan nanoparticles (MIC/2, MIC e 2MIC) diluted in a fixed concentration of chitosan gel (20mg/ml⁻¹) and left to dry for 30 min.

Each treatment included 40 fruits stored for 12 days at room temperature and 24 days at cold temperature (Oliveira et al., 2014; Santos et al., 2012).

2.5 Physicochemical analyses on grapes

Grapes stored at room temperature (25°C – 12 days) and cold temperature (12°C – 24 days) were evaluated, every 6 days, for weight loss and general quality aspects such as color, soluble solids, titratable acidity (AT), pH, anthocyanin, reducing sugar and moisture content. The soluble solids content was determined with a refractometer (Model AUS JENA, Germany), and the results were expressed as °Brix (AOAC, 932.12). The AT was determined by titrating with 0,1 N NaOH until pH 8,2 and the results were expressed as a percentage of tartaric acid (AOAC 920.149). The pH of the fruit samples was assessed using a digital pH meter (Model: MICRONAL B474) according to the standard method described in AOAC (2012) (AOAC 981.12). The moisture content was determined by dehydration of the fruit (70°C/24h) until obtain the dry weight and the results expressed in percentage (AOAC 934.06).

For the determination of reducing sugar content, 5 g of the homogenized grape was suspended in 50 ml distilled water and the solution was placed in water bath (40-50°C) for 1 h. After this, the solution was transferred to a 250ml volumetric flask and it was added and 10ml of potassium ferrocyanide 15% solution and 10ml of zinc acetate 30%. The flask contents were stirred manually and the bulk was completed to 250ml with distilled water. After 15 minutes, the contents was filtered with filter paper into a conical flask and then transferred to a burette. The solution obtained was added slowly to a boiling mixture of Fehling A (copper sulfate) and B (sodium potassium tartrate + sodium hydroxide). The reaction is over when a brick-red color precipitate was formed and the results expressed in g/100g (AOAC 923.09).

The grape color was measured at three different equatorial positions of the fruit with the CIELab system. Colour parameters a^* , b^* and L^* were measured in a CR-300 colorimeter (MINOLTA Co., Osaka, Japan), as recommended by the International Commission on Illumination (CIE, 1986).

The anthocyanin was estimated by the method described by Lee Lees and Francis (1972). About 1g of the fruit was blended with 20ml of the extracting solvent (95% ethanol: 1.5N HCl, 85:15) and stand overnight at 4°C. The samples were filtered into a volumetric flask and covered with the aluminum foil. The residue was washed with an extractor solution to remove the pigments. The filtrate was completed to a total volume of 100ml with the same solvent and absorbance was measured at 535nm. The results expressed in mg/100g.

2.6 Weight loss percentage

The weight loss during storage was measured by monitoring the weight of the fruit at the end of each storage interval. The weight loss was considered the difference between the initial and final weight of coated and uncoated fruit. The results were expressed as the percentage loss of the initial weight, according to Meng et al. (2008).

2.7 Decay rate of grapes

The grapes were examined for any microorganism infection during storage. Forty fruits were used for each measurement. The decay percentage of coated and uncoated fruit was calculated as the number of decayed fruit divides by the initial number of all grapes multiplied by 100 (Gol et al., 2013).

2.8 Sensory evaluation

Sensory evaluation of the grapes was carried out in a standardized test room, in the sensory laboratory of the Department of Nutrition situated in Federal University of Pernambuco (UFPE/Brazil), 3 days after the coating application.

Grapes treated with different concentrations of chitosan nanoparticles (MIC/2, MIC, 2MIC) and uncoated grapes were stored at cold temperature. Each sample, three days after the coating application, was presented in dishes coded with 3 digit random numbers to each panelist for evaluation. The panelists were asked to eat a salty biscuit and to drink water between samples.

Hundred untrained tasters participated in the affective acceptance and preference tests. For acceptability of appearance, flavor, color, taste, aftertaste, texture and overall assessment, a nine-point hedonic scale was used (1: extremely poor; 9: excellent). The intent to purchase was assessed on a five-point structured hedonic scale (1: certainly would not buy, 5: certainly would buy) (Santos et al., 2012).

2.9 Statistical analyses

All data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using SPSS 20 software (SPSS Inc., Chicago, USA). The difference among means at a significance level of 5% was performed by Tukey's test.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of chitosan nanoparticles

The average size of the chitosan nanoparticles was analyzed by Dynamic Light Scattering. The result was 101.7 ($\pm$ 5.05) and it was similar to that found in Transmission Electron Microscopy (Fig. 1). These analyzes showed that chitosan nanoparticles produced have a homogeneous size distribution, spherical morphology and a compact structure.

Mohammadi et al. (2015) also produced chitosan nanoparticles for application in fruit (strawberries) as edible coating and found a size of 96,93nm, a similar result to that found in our study. Ramezani et al (2015) also found similar results. This author produced chitosan nanoparticles to preserve fish fillet, and obtained a mean particle size of 108,6nm. Any of these authors used microbiological chitosan to produce nanoparticles. Until now, our study reports for the first time the production of fungal chitosan nanoparticles for application in the food field.

According to Gan et al. (2005), nanoparticles smaller than 80 nm are able to penetrate into tissues through fine capillaries, which enables its application in the pharmaceutical field. However, in the food field this effect is not desirable. Therefore, the nanoparticles produced in our study exhibit a size appropriate for the study purpose that is to produce antimicrobial edible coating for grapes preservation, without causing damage or accumulation in human body.

3.2 Antimicrobial activity

The results of MIC of chitosan nanoparticles can be observed in Table 1.

According to Zhong et al. (2008), chitosan has a greater bactericidal effect against gram-positive than Gram-negative bacteria, due to the different characteristics of the

bacterial surface, which in the case of gram-negative bacteria has an outer membrane that forms a protective barrier for the microorganism.

However, other studies believe that the antimicrobial power of chitosan is higher against Gram-negative bacteria Gram-positive bacteria (Devlieghere, et al., 2004; Li et al., 2010). This can be explained by the presence of a greater negative charge on the cell surface of gram-negative bacteria in relation to gram-positive, which causes a higher adsorption of chitosan and a higher inhibitory effect against gram-negative bacteria (Chung et al., 2004).

The lowest MIC was found for *S. aureus* (2mg/ml). However, the same results (3mg/ml) were found for Gram-negative bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*) and gram-positive bacteria (*L. monocytogenes*).

Therefore, despite the divergence around the best antimicrobial activity of chitosan towards gram-positive and gram-negative bacteria, it is known that chitosan is able to damage the cell wall, causing lysis, change the membrane and increase the cell permeability, causing leakage of intracellular substance, and induce the cell death (Eaton et al., 2008; Kong et al., 2008).

All this mechanism can be enhanced by chitosan nanoparticles due to its larger surface area and charge density, which favors higher interaction with the negative charges of the bacterial surface (Barani et al., 2012; Qi et al., 2004; Shi et al., 2006). The low values found for MIC in our study confirm the higher antimicrobial power of the chitosan nanoparticles.

In the chitosan gel, nanoparticles are better dispersed. According to Lee et al. (2010), when chitosan nanoparticles are well dispersed in the solution, it is more efficiently transported to the cell wall of bacteria which cause disorders and leading to increased antimicrobial activity.

A more homogeneous edible coating is desirable because it provides a more effective protection between the fruit and the external environment (Tezotto-Uliana, et al., 2014) consequently, the oxygen transfer and respiratory activity of the microorganism are impaired (Aquino et al., 2015).

Therefore, for this study was chosen a fixed concentration of chitosan gel for dilution of chitosan nanoparticles and consequently the formation of a more homogeneous edible coating that was subsequently applied in grapes.

3.3 Effects on physicochemical characteristics of grapes

The physicochemical changes in grapes uncoated or coated with different concentrations of chitosan nanoparticles were evaluated during storage at room (25°C – 12 days) and cold temperatures (12°C – 24 days) (Table 2 and 3).

The determination of moisture content showed that control grapes, stored at both temperatures, showed the lowest values of moisture ($p < 0,05$). The only exception was the time 0 and 6 (12°C) which control did not have any significant difference ($p > 0.05$) between the MIC/2 and MIC samples.

2MIC sample stood out as the sample that had higher moisture content in most of the analyzed days and frequently no significant difference ($p > 0.05$) was observed between 2MIC and MIC samples during storage, demonstrating the importance of edible coating in fruit moisture conservation.

Frequently, the gas changes between the fruit and the atmosphere is due to open pores and higher permeability of the fruit skin (Amarante et al., 2001). Therefore, chitosan nanoparticle edible coating blocks the pores present in grapes, preventing moisture loss and controlling the respiratory rate of the fruit.

Similar results were found by Ali et al. (2011) working with chitosan edible coating in papaya and Velickova et al. (2013) who used chitosan and beeswax edible coating applied on strawberries.

At days zero (cold and room temperature) and 12 (room temperature), the soluble solids content did not differ significantly ($p > 0.05$) between grapes with or without nanoparticles edible coatings. However, at other times analyzed we can observe significant differences ($p < 0.05$) between values of soluble solid content in grapes with or without edible coatings. The lowest results were always found in the samples with nanoparticles and 2MIC sample was responsible for the smaller soluble solids content.

The decrease in the soluble solids content in grapes induced by chitosan, could be due to the slowing of respiration and metabolic activity in the fruit, hence retarding the ripening process (Oliveira et al., 2014). This property is enhanced when chitosan is presented in nanoparticles form, which can be confirmed by the lower concentration of soluble solids in the higher concentration of nanoparticles (2MIC).

Furthermore, the filmogenic property of chitosan allows it to form a semi-permeable barrier around the fruit, modifying the internal atmosphere by reducing oxygen

gas and/or elevating carbon dioxide and suppressing ethylene production (Dong et al., 2004).

At all storage time, at both temperatures, 2MIC sample showed the smallest reducing sugar values differing significantly from control fruits ($p < 0.05$). Moreover, at 0, 6, 12 and 18 days of storage at cold temperature, and 0 and 12 days of storage at room temperature no significant differences ($p > 0.05$) could be observed between MIC and 2MIC.

The results showed that the highest concentrations of chitosan nanoparticles (MIC and 2MIC) caused a decrease in the reducing sugar content. This decrease can be explained by the suppression of respiration rate of the fruit, caused by nanoparticles, which also decreases the metabolic activity, reducing the hydrolysis of sugar to carbohydrates (Hong et al., 2012; Neeta et al., 2013).

The determination of sugars in fruits is an important parameter to evaluate the maturity stage of the fruit (Gautier et al., 2008). Several studies show an increase in fructose and glucose in advanced stages of maturation (Glewa et al., 2003; Zhang et al., 2010; Wu et al., 2011).

Therefore, in our work we realized that the grapes containing the highest chitosan nanoparticle concentrations decreased the fruit maturation stage, which led to decrease in soluble solids and reducing sugar content.

The edible coatings also decreased ($p < 0.05$) the loss of titrable acidity in grapes stored at cold temperature. Different behavior was observed in grapes at room temperature, which can be observed the preservation of titrable acidity values.

Previous studies have shown that the respiratory process consumes organic acids and soluble solids to maintain the normal activity of the fruit during storage (Zhou et al., 2008). The edible coating becomes an alternative to limit this respiratory and metabolic process of the fruit reducing the loss of nutritional components such as soluble solids and titrable acidity (Hagenmaier, 2005).

In our work the fruits coated with nanoparticles, at cold temperature, were the most effective in slowing the consumption of important nutritional components such as titrable acidity. Cold temperatures are considered as an additional process that with chitosan, are able to decrease the physiological processes of grapes and consequently slows the consumption of titrable acidity (Meng et al., 2008).

The pH values between fruits with nanoparticles, in most cold and room storage, did not differ significantly ($p > 0.05$). At room temperature, the pH ranges from 3.75 to

4.09 and the change in cold temperature was 3.27 to 3.51, similar results were found by Kim et al (2014).

According to Kim et al. (2014), the type of the edible coating, time and storage temperature does not affect the pH of the grapes significantly ($p > 0.05$). This can be confirmed in our study. The different concentrations of chitosan nanoparticles did not influence the pH results.

Therefore, the pH changes on grapes is due to the natural variability of the fruit and not related to the treatment applied. The changes observed in pH values for a few days of storage, is due to differences in the composition of organic acids of the grapes (Vargas et al., 2006).

The control grapes anthocyanin content, at cold temperature, ($p < 0.05$) was higher than in grapes with nanoparticles. The only exception was the control grapes at the 24th days. This sample did not differ significantly ($p > 0.05$) of the MIC/2 sample. The greatest accumulation of anthocyanin in control grapes may be related to its advanced maturation process, which occurs the synthesis of this pigment from glucose (Meng et al., 2008). Thus, the lowest concentration of anthocyanins in grapes (12 °C) with edible coatings, suggest an inhibitory effect on fruit senescence. This inhibitory effect is more pronounced in the extended storage of the fruits (Kim et al., 2014), as in the case of grapes, at cold temperature, analyzed in our study.

Gol et al. (2013) found similar results, on strawberries with chitosan, carboxymethyl cellulose and hydroxypropylmethyl cellulose edible coatings. Similarly, Perez and Sanz (2001), also detected a less accumulation of anthocyanin in strawberries stored in a controlled atmosphere.

The anthocyanin content of control grapes, in the 0 and 6 days at room temperature, did not differ significantly ($p > 0.05$) of grapes with chitosan nanoparticles. This result is similar to that found by Santos et al. (2012). This result also shows the importance of storage temperature. Cold temperature can increase the inhibitory effects on fruit senescence, caused by the chitosan nanoparticles. At room temperature, this effect is less pronounced and the anthocyanin content in the control sample is equivalent to the grapes with edible coatings.

The grapes color results, at room and cold temperature, are found in Tables 4 and 5, respectively. At room temperature, the L values decreased during the 12 days of analysis of the control grapes and grapes with edible coatings, which shows that grapes

become darker. A similar result was found by Kim et al. (2014), when researched about the nanoemulsion action of lemon essential oil on grapes stored at 4°C and 25°C.

However, the preservation of the L values ($p > 0.05$) was observed in grapes with nanoparticles stored at cold temperature. Differently, the control sample decreased the L values. Santos et al. (2012), also observed the preservation of the lightness. However, this author did not find differences between the L values of grapes with edible coatings containing chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil and stored at different temperatures.

The decrease of L values observed in grapes at 25°C and control sample at 12°C is related to the increased metabolism in these fruits, which occurs various enzymatic and non-enzymatic reactions, causing browning (Adiletta et al., 2016). This shows again that the edible coating produced in our work when applied in refrigerated grapes slow the fruit senescence process.

The values of a^* positive and close to zero show the anthocyanin accumulation in grapes, since this pigment has a red color and it is the mainly responsible for the grape color (Hernandez-Herrero and Frutos, 2014). The same behavior was observed for the b^* values, which shows that the control grapes and grapes with chitosan nanoparticles were predominantly purple at the different storage intervals at both tested temperatures.

3.4 Weight loss

Weight loss in almost all samples with microbiological chitosan nanoparticles stored at cold temperature (control: 1,72%; MIC/2: 2,26%; MIC: 1,63%; 2MIC: 1,43%) and room temperature (control: 0,85%; MIC/2: 0,81%; MIC: 0,49%; 2MIC: 0,79%) decreased over storage. Deng et al. (2006) indicated that approximately 5% weight loss was the normal acceptable limit for table grapes. In our research, all the samples showed weight loss below 5%.

Gao et al. (2013) evaluated table grapes with chitosan edible coating also observed values below 5%. After 60 days storage at 0°C, weight loss of grapes with chitosan and control sample was 1, 44% and 4, 74%, respectively.

Several research indicated that weight loss was associated with respiration process and evaporation of water from the fruit, so at high temperature there is an increase in the respiration rate of the fruit and consequently loss of moisture and weight occurs. Furthermore, water is absorbed by chitosan on the fruit surface, because the hygroscopic

property of this polymer improves the formation of the water barrier between the fruit and the external environment, thereby reducing the external transfers (Morillon et al., 2002; Olivia and Barbosa-Canovas, 2005; Xu et al., 2007).

In our research, there was an increase in weight loss of grapes stored at cold temperature when compared to grapes stored at room temperature. This probably occurred because of the prolonged analysis time for grapes stored at cold temperature (24 days) than grapes stored at room temperature (12 days), which led to an advanced metabolism of the fruit. Anyway, the edible coatings are responsible for creating a modified atmosphere around the perishable product, allowing the extension of shelf life through the control of gas exchange and prevention of excessive weight loss (Ali et al., 2015).

3.5 Decay rate of fruits

The lowest percentage of decay was found in grapes stored at cold temperature (control: 6,66%; MIC/2: 6,66%; MIC: 0%; 2MIC: 0%). Grapes stored at room temperature were twice as high results for the control (15%) and the MIC/2 samples (12,5%) when compared with fruits stored at cold temperature. The MIC sample (0%) was the only one that maintained complete inhibition of infection in both temperatures, differently the 2MIC sample that completely inhibited the infections at cold temperature, but at room temperature, the percentage of infection of 2MIC sample increased 12.5%.

According to Meng et al. (2008), grapes stored at low temperatures slows physiological processes in fruit and pathogens have weaker pathogenicity, which reduces the incidence of decay compared to fruits stored at room temperature, which decay rapidly.

Furthermore, chitosan is responsible for delaying fruit senescence, therefore the resistance to fungal infections can be improved by slower of senescence (Reddy et al., 2000; Neeta et al., 2013). This characteristic of chitosan is enhanced when the polymer is in nanoparticle form and thus it is able to completely inhibit the appearance of visible infection on the fruit, as we can see in MIC sample (at cold and room temperature) and 2MIC sample (at cold temperature).

Therefore, in our study, the results confirm the idea that the chitosan nanoparticles are effective in inhibiting the growth of microorganisms on grapes and this inhibitory effect can be enhanced at low temperatures.

3.6 Sensory evaluation

Changes in sensory attributes are presented in Table 6. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the samples in relation to the attributes evaluated, except for the control and 2MIC samples for appearance and flavor attributes. Sample 2MIC was the most preferred in appearance attribute. This sample differ significantly from the control ($p < 0.05$) but no significant difference ($p > 0.05$) was observed when it compared with others nanoparticles samples. The control was the sample that has the highest excess of maturity and so this factor interfered in scores for this sample appearance.

The opposite was observed in relation to flavor. The control differ significantly ($p < 0,05$) when compared with 2MIC, but did not differ ($p > 0.05$) from others samples. This is due to the smell of acetic acid used for the dissolution of chitosan (Deblieguere et al., 2004; Vargas et al., 2006). However, when the evaluation is made 3 days after the application of the edible coating, there is a decrease in the perception of this flavor due to the evaporation of acetic acid (Velickova et al., 2013). Therefore, the chitosan nanoparticles were not responsible for the lower acceptance of the flavor of the 2MIC sample, because there was no difference ($p > 0,05$) between 2MIC and grapes with others concentrations of chitosan nanoparticles.

When the tasters were asked to indicate their intent to purchase these grapes, they reported notes next to 4, which showing that the tasters "possibly buy" control grapes and grapes with chitosan nanoparticles. This fact enables the use of the edible coatings produced in this research in a commercial level, when we analyze the sensory aspects.

4. Conclusions

The results of this study indicate that chitosan nanoparticles edible coatings (MIC/2, MIC and 2MIC) were effective in maintaining the physicochemical, sensory and microbiological quality of table grapes. The chitosan nanoparticles were responsible for delaying the ripening process of the grapes resulting in decreased weight loss, soluble solids and reducing sugar content, moisture retention and preservation of the titrable acidity values. Moreover, chitosan nanoparticles presented inhibitory effect against pathogenic foodborne bacteria, with MIC values ranging from 2 to 3mg/ml.

The flavor was the only sensory attribute that control obtained significantly better score than the samples with nanoparticles. This is due to the use of acetic acid in the

production of the edible coating. However, the nanoparticles do not interfere in the others sensory characteristics and in the intent to purchase of the tasters.

Based on these results, the edible coatings with microbiological chitosan nanoparticles can be used to improve the post-harvest quality grapes. Its powerful antimicrobial effect favors its use when we compared to the others materials currently used, such as beeswax.

Acknowledgments

The authors thank to the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE-Brazil) for financial support and Kitozyme company for providing the chitosan used in this research.

References

- Adiletta, G., Russo, P., Senadeera, W., Di Matteo, M., 2016. Drying characteristics and quality of grape under physical pretreatment. *Journal of Food Engineering*, 172, 9-18.
- Ali, A., Muhammad, M.T.M., Sijam, k., Siddiqui, Y., 2011. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 124, 620-626.
- Ali, A., Noh, N.M., Mustafa, M.A., 2015. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and shelf life*, 3, 56-61.
- Amarante, C., Banks, N.H., Ganesh, S., 2001. Relationship between character of skin cover of coated pears and permeance to water vapour and gases. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 291-301.
- Aquino, A.B., Blank, A.F., Santana, L.C.L.A., 2015. Impact of edible chitosan cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis*-Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. *Food Chemistry*, 171, 108–116.
- Arora, A., Padua, G.W., 2010. Review: Nanocomposites in Food Packaging. *Journal of Food Science*, 75 (1),43-49. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01456.x
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2012. *Official methods of analysis, of AOAC international* (19th ed.). Method 932.12 , Method 920.149, Method 981.12, Method 934.06, Method 932.09.

- Barani, H., Montazer, M., Samadi, S., Toliyat, T., 2012. In situ synthesis of nano silver/lecithin on wool: enhancing nanoparticles diffusion. *Colloid. Surf. B*, 92, 9-15.
- Berger, L.R.R, Stamford, T.C.M, Stamford-Arnaud, T.M., Alcântara, S.R.C., Silva, A.C., Silva, A.M. Nascimento, A.E. and Campos-Takaki, G.M., 2014b. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *International Journal of Molecular. Sciences*, 15, 9082-9102; doi:10.3390/ijms15059082.
- Bougnicourt, L., Aalcouffe, P., Ladavière, C., 2014. Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloidally stable objects. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 476-486.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132.
- Chung, Y.C., Su, Y.P., Chen, C.C., Jia, G., Wang, H.L., Wu, J.C.G., Lin, J.G., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 932–936.
- CIE – Commission Internationale de Éclairage, 1986. *Colourimetry*, second ed. CIE Publication, Vienna, p.78.
- Deng, Y., Wu, Y., Li, Y.F., 2006. Physiological responses and quality attributes of ‘Kyoho’ grapes to controlled atmosphere storage. *LWT- Food Science and Technology*, 39, 584-590.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J., 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.
- Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K., Jiang, Y., 2004. Effect of chitosan coating on quality and shelf-life of peeled litchi fruit. *Journal of Food Engineering*, 64, 355–358.
- Eaton, P., Fernandes, J.C., Pereira, E., Pintado, M.E., Malcata, F.X, 2008. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108, 1128–1134.
- Elsabee, M.Z., Abdou, E.S., 2013. Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 1819-1841.

- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., Mccarron, P., 2005. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf. B*, 44, 65–73.
- Gao, P., Zhu, Z., Zhang, G. P., 2013. Effects of chitosan-glucose complex coating on postharvest quality and shelf life of table grapes. *Carbohydrate Polymers*, 95, 371–378.
- Gol, N.B., Patel, P.R., Rao, R., 2013. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185–19.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bernard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poessel, J. L., Caris-Veyrat, C., Génard, M., 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1241–1250.
- Glewa, R. H., Ayazb, F. A., Sanzc, C., Vanderjagta, D. J., Huangd, H. S., Chuangd, L. T., 2003. Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development and maturation. *Food Chemistry*, 83, 363–369.
- Hagenmaier, R. D., 2005. A comparison of ethane ethylene and CO₂ peel permeance for fruit with different coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 56–64.
- Hernández-Herrero, J.A., Frutos, M.J., 2014. Color and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices at different pHs and temperatures. *Food Chem.* 154, 199–204.
- Hong, K.Q., Xie, J.H., Zhang, L.B., Sun, D.Q., Gong, D.Q., 2012. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Sodium guajava* L.) fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 144, 172–178.
- Ing, L.Y., Zin, M.N., Sarwar, A., Katas, H. 2012. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. *International Journal of Biomaterials.*, 1-9. doi:10.1155/2012/632698
- Kerch, G., 2015. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 149–166.
- Kim, L.H., Oh, Y.A., Lee, H., Song, K.B., Min, S.C., 2014. Grape berry coatings of lemongrass oil-incorporating nanoemulsion. *Food Science and Technology*, 58, 1–10.

- Kong, M., Cheng, X.G., Liu, C.S., Yu, L.J., Ji, Q.X., Xue, Y.P., Cha, D.S., Park, H.J., 2008. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. *Frontiers of Materials Science in China*, 2, 214-220.
- Lee, S.M., Song, L.C., Lee, B.S., 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *J. Chem. Eng.*, 27, 688-692.
- Lees, D.H., Francis, F.J., 1972. Standardization of pigment analysis in cranberries. *HortScience*, 7, 83-84.
- Li, X.F., Feng, X.Q., Yang, S., 2010. A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. *Food Sci*, 13, 037.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., Tian, S., 2008. Physiological responses and quality attributes of table grapes fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chem.*, 106, 501-508.
- Mohammadi, A., Hashemi, M., Hosseini, S.M., 2015. Nanoencapsulation of Zataria multiflora essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling Botrytis cinerea, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 73-80.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., Voilley, A., 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Crit. Rev. Food Sci.*, 42, 67-89.
- Neeta, B.G., Pooja, R.P., Ramana Rao, T.V., 2013. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biol. Technol.*, 85, 185-195.
- Nowshehri, J.A., Bhat, Z.A., Shah, M.Y., 2015. Blessings in disguise: bio-functional benefits of grape seed extracts. *Food Research International*, 77, 333-348.
- Oliveira, C.E.V., Magnani, M., Veríssimo de Sales, C., Pontes, A.L.S.; Campos-Takaki, G.M., Stamford, T.C.M., Leite de Souza, E., 2014. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 171, 54-61. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.006
- Olivia, G.I., Barbosa-Canovas, G.V., 2005. Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 657-670.
- Osheba, A.S., Sorour, M.A., Abdou, E.S. 2013. Effect of Chitosan Nanoparticles as Active Coating on Chemical Quality and Oil Uptake of Fish Fingers. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 2(1):1-14.

- Pérez, A.G., Sanz, C. Effect of high-oxygen and high-carbon-dioxide atmospheres on strawberry flavor and other quality traits. *Journal Agric. Food Chemistry*, 49, 2370-2035.
- Pilon, L., Spricigo, P.C., Miranda, M., Moura, R.M., Assis, O.B.G., Mattoso, L.H.C., Ferreira, M.D.. 2014. Chitosan nanoparticle coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attributes. *International Journal of Food Science and Technology*, 1-9. DOI: 10.1111/ijfs.12616
- Qi, L.F., Xu, Z.R., Jiang, X., Hu, C.H., Zou, X.F., 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693–2700.
- Ramezani, Z., Zarei, M., Raminnejad, N., 2015. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Food control*, 51, 43-48.
- Reddy, M.V.B., Belkacemi, K., Corcuff, R., Castaigne, F., Arul, J., 2000. Effect of preharvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 20, 39-51.
- Santos, N.S.T., Aguiar, A.J.A.A., Vasconcelos de Oliveira, C.E., Veríssimo de Sales, C., Silva, S. M., Sousa da Silva, R., Stamford, T.C.M., Leite de Souza, E., 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32, 345-353.
- Shi, Z., Neoh, K.G., Kang, E.T., Wang, W., 2006. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 27, 2440-2449.
- Stamford, T.C.M, Montenegro, T., Cavalcante, H.M.M., Oliveira, R. and Campos-Takaki, G.M., 2013. Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent. In: Andrade, A.O., Pereira, A. A., Naves, E. L. M. and Soares, A. B.(Org.). *Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent*. 1ed. Rijeka: InTech, 229-244, doi.org/10.5772/54453.
- Tezotto-Uliana, J.V., Fargoni, G.P., Geerdink, G.M., Kluge, R.A., 2014. Chitosan applications pre- or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 72-77.
- Theron, M.M., & Lues, J.F.R., 2007. Organic acids and meat preservation: a review. *Food Reviews International*, 23, 141-158.

- Vargas, M., Aalbors, A., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C., 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 164-171.
- Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V.D., Moldão-Martins, M., 2013. Impacto f chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa cv Camarosa*) under comercial storage conditions). *LWT – Food Science and Technology*, 52, 80-92.
- Wu, B. H., Liu, H. F., Guan, L., Fan, P. G., Li, S. H., 2011. Carbohydrate metabolism in grape cultivars that differ in sucrose accumulation. *Vitis*, 50, 51–57.
- Xu, W.T., Huang, K.L., Guo, F., Qu, W., Yang, J.J., Liang, Z.H., Luo, Y.B., 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol. Technol.*, 46, 86-94.
- Zhang, Y. Z., Li, P. M., Cheng, L. L., 2010. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh. *Food Chemistry*, 123, 1013–1018.
- Zhong, Z.M., Xing, R.G., Liu, S., Wang, L., Cai, S.B., Li, P.C., 2008. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydrate Research*, 343, 566–570.
- Zhou, R., Mo, Y., Li, Y. F., Zhao, Y. Y., Zhang, G. X., & Hu, Y. S., 2008. Quality and internal characteristics of huanghua pears (*Pyrus pyrifolia nakai cv. Huanghua*) treated with different kinds of coatings during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 171–179.

Figure 1 – Transmission Electron Microscopy of chitosan nanoparticles

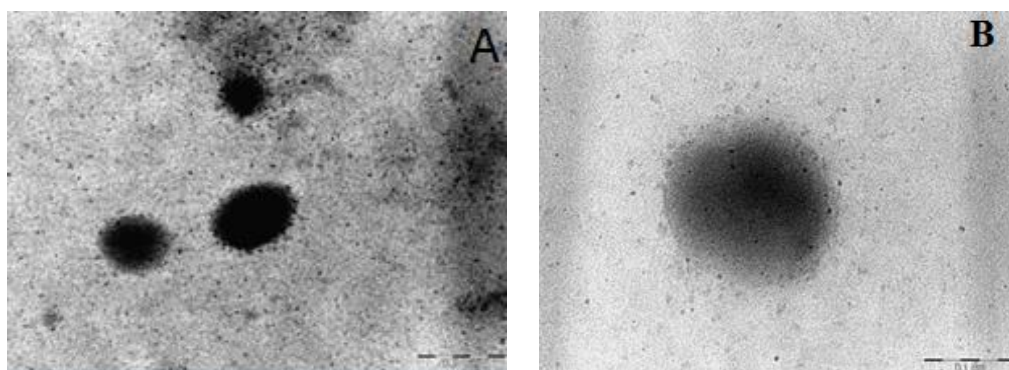


Table 1. Antimicrobial activity of chitosan nanoparticles from fungi against foodborne pathogenic microorganisms.

<i>Microorganisms</i>	minimum inhibitory concentration mg/ml	minimum bactericidal concentration mg/mL
<i>Salmonella spp.</i>	3,0	6,0
<i>E.coli</i>	3,0	3,0
<i>S. aureus</i>	2,0	6,0
<i>P. aeruginosa</i>	3,0	4,0
<i>L. monocytogenes</i>	3,0	6,0

Table 2 – Mean values of physicochemical quality parameters in grapes stored at room temperature (25°C) for 12 days.

Treatments	Days of storage		
	0	6	12
Soluble solids (°Brix)			
Control	13.0 (± 1.00) ^{abA}	15.0 (± 1.00) ^{aA}	12.0 (± 0.00) ^{bA}
MIC/2	13.0 (± 0.50) ^{bA}	15.0 (± 0.50) ^{aA}	12.0 (± 0.00) ^{bA}
MIC	12.5 (± 0.50) ^{aA}	12.6 (± 0.00) ^{aB}	12.0 (± 0.00) ^{aA}
2MIC	11.5 (± 0.00) ^{bA}	13.0 (± 0.50) ^{aB}	11.5 (± 0.50) ^{bA}
Titrate acidity (% tartaric acid)			
Control	0.90 (± 0.01) ^{aA}	0.69(± 0.00) ^{cA}	0.77 (± 0.00) ^{bA}
MIC/2	0.99 (± 0.02) ^{aA}	0.74(± 0.06) ^{bA}	0.80 (± 0.03) ^{bA}
MIC	0.84 (± 0.02) ^{aB}	0.66(± 0.06) ^{bA}	0.74 (± 0.02) ^{bAB}
2MIC	0.90 (± 0.01) ^{aA}	0.70(± 0.03) ^{bA}	0.71 (± 0.00) ^{bB}
pH			
Control	3.84 (± 0.18) ^{aA}	4.09 (± 0.00) ^{aA}	4.04 (± 0.01) ^{aB}
MIC/2	3.87 (± 0.01) ^{bA}	3.93 (± 0.07) ^{bA}	4.04 (± 0.04) ^{aB}
MIC	3.76 (± 0.10) ^{aA}	3.75 (± 0.25) ^{aA}	4.08 (± 0.00) ^{aA}
2MIC	3.88 (± 0.05) ^{cA}	4.00 (± 0.00) ^{bA}	4.07 (± 0.00) ^{bA}
Moisture (%)			
Control	84.20 (± 0.07) ^{bB}	84.5 (± 0.30) ^{bC}	86.65 (± 0.68) ^{aB}
MIC/2	88.28 (± 0.38) ^{aA}	86.7 (± 0.22) ^{bB}	88.66 (± 0.07) ^{aA}
MIC	88.18 (± 0.30) ^{aA}	88.0 (± 0.43) ^{aA}	88.03(± 0.04) ^{aA}
2MIC	88.56 (± 0.15) ^{aA}	88.0 (± 0.20) ^{aA}	88.81(± 0.63) ^{aA}
Reducing sugar (g/100g)			
Control	13.11(± 0.13) ^{aA}	12.21(± 0.0) ^{bA}	9.81 (± 0.22) ^{cA}
MIC/2	10.42 (± 0.73) ^{aB}	10.44(± 0.34) ^{aB}	9.04 (± 0.05) ^{bB}
MIC	11.49 (± 1.53) ^{aAB}	9.70(± 0.25) ^{abC}	9.05 (± 0.36) ^{bB}
2MIC	9.24 (± 0.52) ^{aB}	8.38(± 0.04) ^{bD}	8.76 (± 0.01) ^{abB}
Anthocyanin (mg/100g)			
Control	111.16 (± 5.92) ^{cA}	218.70(± 1.62) ^{aB}	147.68 (± 5.67) ^{bB}
MIC/2	113.19 (± 6.23) ^{cA}	224.75(± 12.9) ^{aAB}	164.08 (± 6.93) ^{bA}
MIC	107.73 (± 3.26) ^{cA}	267.37(± 0.91) ^{aA}	120.63 (± 1.92) ^{bC}
2MIC	117.24 (± 7.29) ^{bA}	249.69(± 22.81) ^{aAB}	130.64 (± 3.64) ^{bC}

^{a-c} For each trial, different superscript lowercase letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test. ^{A-D} Different superscript capital letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 3 – Mean values of physicochemical quality parameters in grapes stored at cold (12°C) for 24 days.

Treatments	Days of storage				
	0	6	12	18	24
Soluble solids (°Brix)					
Controle	16,0 (±0,50) ^{bA}	16,0 (±0,10) ^{bA}	16,4(±0,01) ^{abA}	17,0 (±0,10) ^{aA}	16,2 (±0,20) ^{bA}
CIM/2	16,6 (±0,01) ^{aA}	16,0 (±0,10) ^{abA}	16,6 (±0,76) ^{aA}	15,8 (±0,01) ^{abB}	15,0 (±0,50) ^{bB}
CIM	16,6 (±0,01) ^{aA}	15,8 (±0,01) ^{bB}	14,6 (±0,01) ^{eB}	15,6 (±0,01) ^{cC}	15,0 (±0,10) ^{dB}
2CIM	17,4 (±0,00) ^{aA}	14,6 (±0,00) ^{cC}	14,8 (±0,20) ^{cB}	15,2 (±0,01) ^{bD}	13,0 (±0,10) ^{dC}
Titrate acidity (% ác. tartárico)					
Controle	0,59 (±0,00) ^{bB}	0,59 (±0,00) ^{bD}	0,60 (±0,01) ^{bC}	0,55 (±0,00) ^{bD}	0,62 (±0,00) ^{aB}
CIM/2	0,63 (±0,00) ^{bA}	0,61 (±0,00) ^{bC}	0,66 (±0,02) ^{bB}	0,66 (±0,00) ^{bC}	0,73 (±0,01) ^{aA}
CIM	0,63 (±0,02) ^{cA}	0,70 (±0,00) ^{bB}	0,76 (±0,00) ^{aA}	0,72 (±0,00) ^{bB}	0,64 (±0,01) ^{cB}
2CIM	0,66 (±0,00) ^{bA}	0,72 (±0,00) ^{aA}	0,67 (±0,00) ^{bB}	0,76 (±0,01) ^{aA}	0,73 (±0,00) ^{aA}
pH					
Controle	3,45 (±0,00) ^{bA}	3,42 (±0,00) ^{bB}	3,43 (±0,00) ^{bB}	3,60 (±0,02) ^{aA}	3,46 (±0,02) ^{bA}
CIM/2	3,45 (±0,00) ^{bA}	3,45 (±0,00) ^{bA}	3,50 (±0,00) ^{aA}	3,51 (±0,00) ^{aB}	3,40 (±0,02) ^{cB}
CIM	3,41 (±0,01) ^{aB}	3,34 (±0,01) ^{bC}	3,36 (±0,00) ^{bD}	3,42 (±0,01) ^{aC}	3,43 (±0,01) ^{aAB}
2CIM	3,47 (±0,01) ^{aA}	3,27 (±0,01) ^{dD}	3,40 (±0,00) ^{bC}	3,40 (±0,00) ^{bC}	3,35 (±0,00) ^{cC}
Moisture (%)					
Controle	84,46(±0,04) ^{aA}	83,59(±0,11) ^{bC}	82,54(±0,14) ^{cC}	82,59(±0,25) ^{cB}	83,03(±0,47) ^{bcC}
CIM/2	84,15(±0,42) ^{aAB}	83,86(±0,32) ^{aBC}	84,37(±0,04) ^{aB}	84,72(±0,11) ^{aA}	84,98(±0,91) ^{aB}
CIM	84,24(±0,30) ^{bAB}	84,35(±0,42) ^{bB}	84,94(±0,05) ^{abA}	85,46(±0,11) ^{aA}	85,06(±0,25) ^{aB}
2CIM	83,58(±0,23) ^{cB}	85,41(±0,12) ^{bA}	85,05(±0,38) ^{bA}	84,93(±0,58) ^{bA}	87,77(±0,32) ^{aA}
Reducing sugar (g/100g)					
Controle	12,83(±0,21) ^{aB}	12,02(±0,56) ^{bA}	12,54(±0,17) ^{abA}	12,93(±0,11) ^{aA}	12,61(±0,11) ^{abA}
CIM/2	13,37(±0,35) ^{aAB}	11,29(±0,63) ^{cA}	11,64(±0,15) ^{bcB}	12,54(±0,17) ^{bA}	11,54(±0,33) ^{cB}
CIM	14,24(±0,28) ^{aA}	9,95 (±0,01) ^{dB}	11,19(±0,03) ^{cBC}	11,99(±0,29) ^{bcB}	12,57(±0,58) ^{bA}
2CIM	13,51(±0,60) ^{aAB}	9,64 (±0,33) ^{cB}	11,05(±0,26) ^{bC}	11,61(±0,15) ^{bB}	9,88 (±0,10) ^{cC}
Anthocyanin (mg/100g)					
Controle	164,32(±2,86) ^{bA}	262,58(±3,36) ^{aA}	183,60(±1,61) ^{bA}	164,28(±1,32) ^{bB}	276,34(±17,44) ^{aA}
CIM/2	120,90(±3,11) ^{dB}	212,52(±5,04) ^{bB}	105,12(±7,49) ^{eC}	149,45(±3,32) ^{cC}	248,95(±8,32) ^{aA}
CIM	112,59(±9,98) ^{dB}	166,83(±3,49) ^{bD}	127,96(±12,18) ^{cdB}	140,96(±1,08) ^{cC}	207,09 (±7,71) ^{aB}
2CIM	103,59(±4,11) ^{cC}	182,58(±2,20) ^{bC}	97,45 (±9,12) ^{cD}	232,88(±5,46) ^{aA}	187,42(±11,56) ^{bB}

^{a-e} For each trial different superscript lowercase letters within a row denote differences (p<0.05) between the mean values according to Tukey's test. ^{A-D} Different superscript capital letters in the same column denote differences (p < 0.05) between the mean values according to Tukey's test.

Table 4. Parameters of colour. a*, b* and L* values of uncoated and coated grapes stored at room temperature (25°C) for 12 days.

Treatments	Days of storage		
	0	6	12
L*			
Control	19.23 (± 0.03) ^{bB}	21.24 (± 0.57) ^{aA}	17.85 (± 0.03) ^{cA}
MIC/2	19.28 (± 0.29) ^{bB}	20.86 (± 0.71) ^{aA}	16.72 (± 0.40) ^{cB}
MIC	18.40 (± 0.17) ^{bC}	21.95 (± 0.00) ^{aA}	17.84 (± 0.04) ^{cA}
2MIC	20.07 (± 0.17) ^{aA}	20.26 (± 0.96) ^{aA}	18.02 (± 0.23) ^{bA}
a*			
Control	1.91 (± 0.28) ^{aB}	1.63 (± 0.04) ^{abAB}	1.26 (± 0.03) ^{bB}
MIC/2	2.93 (± 0.51) ^{aAB}	1.81 (± 0.26) ^{bA}	0.91 (± 0.22) ^{cC}
MIC	2.93 (± 0.03) ^{aAB}	2.07 (± 0.37) ^{bA}	1.18 (± 0.09) ^{cB}
2MIC	3.96 (± 0.58) ^{aA}	1.12 (± 0.07) ^{bB}	1.56 (± 0.00) ^{bA}
b*			
Control	0.97 (± 0.08) ^{cB}	1.19 (± 0.02) ^{bAB}	1.34 (± 0.05) ^{aB}
MIC/2	1.18 (± 0.11) ^{cAB}	1.52 (± 0.02) ^{bA}	1.83 (± 0.01) ^{aA}
MIC	1.36 (± 0.06) ^{bA}	1.21 (± 0.01) ^{cAB}	1.56 (± 0.02) ^{aB}
2MIC	1.38 (± 0.08) ^{aA}	1.10 (± 0.26) ^{aB}	1.51 (± 0.14) ^{aB}

^{a-c} For each trial different superscript lowercase letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test. ^{A-C} Different superscript capital letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 5. Parameters of colour. a*, b* and L* values of uncoated and coated grapes stored at cold temperature (12°C) for 24 days.

Treatments	Days of storage				
	0	6	12	18	24
L*					
Controle	19,18(±1,97) ^{aA}	14,70(±0,07) ^{bB}	15,22(±1,28) ^{bB}	18,48(±1,13) ^{aA}	16,29(±0,81) ^{bAB}
CIM/2	17,32(±1,54) ^{abA}	15,83(±0,39) ^{bAB}	13,76(±0,73) ^{bB}	19,97(±2,56) ^{aA}	15,0(±0,12) ^{bB}
CIM	18,96(±1,19) ^{bA}	17,68(±1,47) ^{bA}	23,29(±0,94) ^{aA}	17,92(±0,54) ^{bA}	17,0(±0,64) ^{bA}
2CIM	18,87(±0,40) ^{bA}	16,17(±0,45) ^{cAB}	21,35(±0,84) ^{aA}	20,40(±1,49) ^{aA}	17,68(±0,28) ^{bA}
a*					
Controle	2,58 (±0,05) ^{aB}	1,42 (±0,00) ^{cB}	1,62(±0,24) ^{cAB}	1,61 (±0,20) ^{cB}	2,00 (±0,11) ^{bA}
CIM/2	2,93 (±0,42) ^{aAB}	2,05 (±0,21) ^{bAB}	1,84(±0,09) ^{bcA}	1,68(±0,04) ^{bcB}	1,30 (±0,08) ^{cB}
CIM	3,18 (±0,08) ^{aA}	2,34 (±0,56) ^{bA}	1,65(±0,01) ^{cAB}	1,58 (±0,03) ^{cB}	1,50 (±0,01) ^{cB}
2CIM	2,33 (±0,27) ^{bcB}	2,52 (±0,04) ^{aA}	1,36 (±0,07) ^{cB}	2,06 (±0,04) ^{bA}	1,41 (±0,08) ^{cB}
b*					
Controle	1,21 (±0,28) ^{bA}	1,46 (±0,04) ^{bA}	1,49 (±0,08) ^{bA}	1,53 (±0,04) ^{bA}	2,13 (±0,07) ^{aA}
CIM/2	1,40 (±0,10) ^{bA}	1,47(±0,01) ^{bA}	1,68 (±0,26) ^{bA}	1,62 (±0,22) ^{bA}	2,27 (±0,02) ^{aA}
CIM	1,38 (±0,29) ^{abA}	1,25 (±0,13) ^{bB}	1,71 (±0,12) ^{aA}	1,62(±0,09) ^{abA}	1,71 (±0,06) ^{aB}
2CIM	1,02 (±0,06) ^{bA}	1,59 (±0,01) ^{aA}	1,79 (±0,06) ^{aA}	1,63 (±0,21) ^{aA}	1,66 (±0,07) ^{aB}

^{a-c} For each trial different superscript lowercase letters within a row denote differences (p<0.05) between the mean values according to Tukey's test. ^{A-B} Different superscript capital letters in the same column denote differences (p < 0.05) between the mean values according to Tukey's test.

Table 6 – Effect of the edible coatings on sensory attributes of grapes stored at cold temperature (12°C).

Attributes	Control	MIC/2	MIC	2MIC
Appearance	7.55 ($\pm$ 1.35) ^a	7.80 ($\pm$ 1.27) ^{ab}	7.98 ($\pm$ 0.93) ^{ab}	8.02 ($\pm$ 0.98) ^b
Color	7.79 ($\pm$ 1.33) ^a	7.85 ($\pm$ 1.17) ^a	8.10 ($\pm$ 0.88) ^a	7.94 ($\pm$ 1.00) ^a
Flavor	6.62 ($\pm$ 1.48) ^a	6.26 ($\pm$ 1.52) ^{ab}	6.27 ($\pm$ 1.44) ^{ab}	6.13 ($\pm$ 1.61) ^b
Firmness	7.55 ($\pm$ 1.44) ^a	7.31 ($\pm$ 1.69) ^a	7.24 ($\pm$ 1.60) ^a	7.19 ($\pm$ 1.58) ^a
Taste	7.21 ($\pm$ 1.75) ^a	7.61 ($\pm$ 1.34) ^a	7.37 ($\pm$ 1.58) ^a	7.25 ($\pm$ 1.69) ^a
Aftertaste	6.78 ($\pm$ 1.72) ^a	6.81 ($\pm$ 1.66) ^a	6.85 ($\pm$ 1.70) ^a	6.99 ($\pm$ 1.67) ^a
Overall evaluation	7.51 ($\pm$ 1.40) ^a	7.33 ($\pm$ 1.37) ^a	7.46 ($\pm$ 1.25) ^a	7.59 ($\pm$ 1.24) ^a

^{a-b} For each trial different superscript lowercase letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Anexos

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--	---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Bioatividade de gel de quitosana enriquecido com nanopartículas para conservação de frutos

Pesquisador: Natália Ferrão Castelo Branco Melo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42618415.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: A pesquisa intitulada "Bioatividade de gel de quitosana enriquecido com

Data do Envio: 20/01/2016

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.400.489

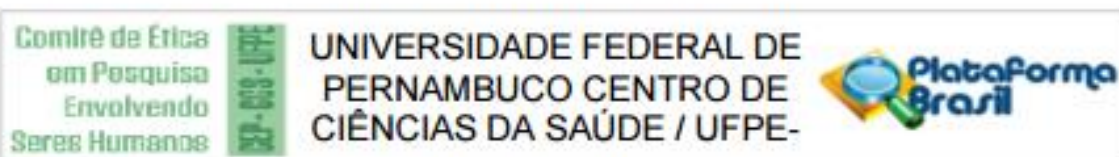
Apresentação da Notificação:

A notificação foi apresentada para avaliação do relatório final da pesquisa.

Objetivo da Notificação:

O pesquisador solicita a aprovação do relatório final da pesquisa.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.400.489

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O TCLE foi apresentado no projeto inicial com Riscos e Benefícios e devidamente utilizados pelo pesquisador.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A notificação foi apresentada com o relatório e a mesma está adequada, sendo que o (s) membro (os) da pesquisa ter(em) participado (s) e foram indicados resultados e conclusão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram considerados adequados.

Recomendações:

s/recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O Relatório Final foi analisado e APROVADO pelo colegiado do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	RELATORIO_FINAL.docx	20/01/2016 12:23:27	Natália Ferrão Castelo Branco Melo	Aceito

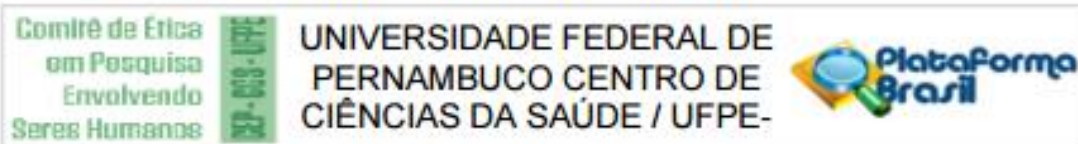
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.400.489

RECIFE, 02 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br