

Darllety Canto da Silva

Nanopartículas de quitosana como antimicrobiano para  
conservação de néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora  
edulis f. flavicarpa*)

Recife,  
2017

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Darlley Canto da Silva

Nanopartículas de quitosana como antimicrobiano para conservação de néctar de  
maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição do Centro de Ciências de Saúde da Universidade  
Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para  
obtenção de título de mestre em nutrição.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Thayza Christina Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Recife,

2017

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586n Silva, Darlley Canto da.  
Nanopartículas de quitosana como antimicrobiano para conservação de néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) / Darlley Canto da Silva. – 2017.  
71 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017.  
Inclui referências.

1. Nanotecnologia. 2. Quitosana. 3. Suco de frutas e vegetais. 4. Prazo de validade de produtos. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-156)

**DARLLETY CANTO DA SILVA**

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO ANTIMICROBIANO PARA  
CONSERVAÇÃO DE NÉCTAR DE MARACUJÁ-AMARELO (PASSIFLORA  
EDULIS F. FLAVICARPA)**

Dissertação aprovada em 22/02/2017.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margarida Angélica da Silva Vasconcelos  
Departamento de Nutrição / UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho  
Departamento de Medicina Tropical / UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Galindo de Oliveira  
Centro Acadêmico de Vitória / UFPE

RECIFE  
2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
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.ª Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

**Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação**

Prof.º Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**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.º Raul Manhães de Castro

**Vice-Chefe do Departamento de Nutrição**

Prof.ª Edigleide Maria Figueiroa Barreto

**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

***À minha família.***

***Vocês são minha força motriz, me impulsionando a romper meus próprios limites e seguir sempre adiante. Obrigada por esta conquista.***

## **Agradecimentos**

À Deus, por dispor em minha vida oportunidades ímpares e conceber-me a dádiva de reconhecê-las e apreciá-las.

Pela compreensão e paciência necessárias diante de meus momentos de ausência, agradeço a meu esposo Artur Correia e a meu filho Artur Gabriel.

Agradeço especialmente à minha mãe e minha querida irmã, por todos os sacrifícios realizados em prol de minha formação e pela forma amorosa com a qual compartilhamos nossas vidas.

À meu tio José Carlos, por sempre acreditar em meu potencial, investindo com amor em minha educação e carreira. Você sempre será um exemplo a ser seguido.

À minhas mentoras, professoras Thayza e Thatiana. Obrigada por todo o ensinamento compartilhado, pelas preciosas orientações e sorrisos cedidos. Além do profissionalismo, vocês representarão para mim um ideal de ética e humanidade.

À professora Tânia Stamford, que ao nos acolher em seu laboratório compartilha de algo muito mais valioso que equipamentos, materiais, meios de cultura ou reagentes. Nos oferece um abraço caloroso e seu vasto conhecimento. Obrigada!

À generosidade demonstrada por todos os técnicos dos laboratórios vinculados ao Departamento de Nutrição da UFPE, em especial Vivaldo e Camilo. Obrigada por abraçar nossa pesquisa com dedicação e altruísmo.

Às colegas Thaisa, Hayane, Anne, Fábila, Raissa e Juliana por encararem comigo os desafios de cursar uma pós-graduação. Sinto-me grata pelos momentos vividos, pelo crescimento mútuo e pelas descobertas. Porque sim, somos bravas!

Às alunas de iniciação científica Camila e Fabiana, companheiras engajadas com às quais tive o privilégio de trabalhar e dividir experiências. Torço para que tenham um futuro profissional brilhante.

Às colegas do laboratório de microbiologia Thaisa, Hayane, Fernanda, Nathália, Bruna. Agradeço pelos treinamentos, recursos, conhecimentos, angústias e sorrisos compartilhados. Vocês tornaram minha caminhada mais leve e prazerosa.

Ao colega Miguel Flores. Sua paciência, conhecimento e recursos foram fundamentais para a realização das análises das nanopartículas.

Ao professor Francisco Humberto Xavier Jr., por ser extremamente disponível e pela forma paciente com a qual compartilhou seus conhecimentos a cerca de estatística.

Ao Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) e ao Laboratório Multiusuários por cederem generosamente seus equipamentos, materiais e recursos humanos, tornando possível a realização desta pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Solos de Agronomia da UFRPE, em especial ao Professor Newton Stamford e a pós-graduanda Marta por realizarem a liofilização das nanopartículas.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, pela oportunidade de realização desta pesquisa e pela incansável luta para a formação de qualidade do profissional nutricionista.

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

Aos membros da banca que abrilhantam o presente trabalho mediante pertinente discussão e sugestão de melhorias. Agradeço por sua disponibilidade e atenção.

Aos familiares e amigos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a conclusão desta pesquisa, principalmente nos momentos de insegurança ou desânimo.



## Resumo

O mercado dos sucos está em expansão decorrente do novo perfil de consumo da sociedade moderna, que anseia por praticidade, qualidade e benefício à saúde atrelados a produtos alimentícios. Neste contexto, métodos inovadores de conservação têm sido propostos. A quitosana, um heteropolímero natural, oferece um amplo espectro de aplicações na indústria alimentícia, destacando-se por ação antimicrobiana, que é intensificada quando na forma de nanopartículas. Portanto, o presente estudo se propôs a avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial de irritação de nanopartículas de quitosana e seus efeitos na conservação do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Quitosanas de diferentes massas molares (baixa, média e alta) foram adquiridas e caracterizadas quanto a estrutura molecular, grau de desacetilação e massa molar pelos métodos de Espectroscopia de raio de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e medida de viscosidade. Nanopartículas de quitosana foram preparadas pelo método de gelificação iônica com reticulante tripolifosfato de sódio e caracterizadas quanto ao tamanho de partícula e carga de superfície. A atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana frente aos patógenos alimentares *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* foi determinada através da concentração inibitória mínima (CIM). O potencial de irritação das nanopartículas de quitosana foi determinado através do Teste da Membrana Corioalantóide do ovo de galinha (HET-CAM). Paralelamente, o néctar de maracujá foi formulado com polpa extraída do maracujá-amarelo, água mineral e açúcar refinado, na proporção de 2:7:1. Parte do néctar foi submetido à pasteurização (controle) e no restante foram adicionadas nanopartículas de quitosana nas concentrações de 1,75 mg/mL (CIM) e 0,85 mg/mL (CIM/2). Parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram observados durante o armazenamento a 4 °C por 28 dias. As quitosanas estudadas apresentaram espectros dos grupos funcionais semelhantes ao descrito na literatura, massas molares de  $2,3 \times 10^4$  g/mol (baixa),  $7,4 \times 10^4$  g/mol (média) e  $5,6 \times 10^5$  g/mol (alta), e respectivos graus de desacetilação de 80%, 62% e 79%. As nanopartículas de quitosana produzidas apresentaram tamanho médio entre  $301,8 \pm 8,4$  nm à  $653,9 \pm 88,3$  nm e potencial zeta entre  $52,8 \pm 3,1$  mV a  $60,1 \pm 5,2$  mV. Nenhuma das nanopartículas testadas apresentou potencial irritatório. Quanto a atividade antimicrobiana, os valores de CIM das nanopartículas de quitosana variaram entre 1,50 a 4,0 mg/mL, com maior atividade apresentada pelas nanopartículas produzidas com quitosana de baixa massa molar. O néctar de maracujá-amarelo, quando adicionadas nanopartículas de quitosana de baixa massa molar na concentração de 1,75 mg/mL, apresentou menor perda de sólidos solúveis totais, maior luminosidade e manutenção da cor durante o armazenamento. Foi constatada ausência de *Salmonella* sp. e de coliformes termotolerantes, entretanto elevadas contagens de leveduras limitaram a vida útil do néctar a 7 dias (amostras contendo nanopartículas de quitosana). Os resultados obtidos demonstram a efetividade das nanopartículas de quitosana como antimicrobiano e sugerem sua aplicação como conservante.

**Palavras-chave:** Nanotecnologia. Quitosana. Suco de frutas e vegetais. Prazo de validade de produtos.

## Abstract

The juice market is expanding due to the new consume profile of the modern society, which craves for practicality, quality and health benefits linked to food products. In this context, innovative methods of conservation have been proposed. Chitosan, a natural heteropolymer, offers a wide spectrum of applications in the food industry, associated with an antimicrobial action, which is enhanced when in the form of nanoparticles. Hence, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity and irritation potential of chitosan nanoparticles and their effects on the conservation of yellow passion fruit nectar (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) relating to its physico-chemical and microbiological parameters. Sigma-Aldrich® crustacean chitosan with different molar weights (low, medium and high) was obtained and characterized by its molecular structure, degree of deacetylation and molar mass using Infrared Spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen and viscosity measurements, respectively. Chitosan nanoparticles were prepared by the ionic gelation method with the sodium tripolyphosphate crosslinker and characterized by its size, using Dynamic Light Scattering Measures, and electrophoretic mobility, using Zeta Potential. The antimicrobial activity of the chitosan nanoparticles against the food pathogens *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* were determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) by the microdilution test. The irritation potential of the chitosan nanoparticles was determined through the Chicken Egg Chorioallantoic Membrane Test (HET-CAM) with 10 days of fertilization. Passion fruit nectar was then formulated with pulp extracted from yellow passion fruit, mineral water and refined sugar, in a ratio of 2: 7: 1. Part of the nectar was submitted to pasteurization (control) and the remaining chitosan nanoparticles were added at concentrations of 1.75 mg / mL (MIC) and 0.85 mg / mL (MIC/2). Physico-chemical and microbiological parameters were observed during storage at 4 ° C for 28 days. The chitosan studied presented functional group spectra similar to that described in the literature, molar masses of  $2.3 \times 10^4$  g / mol (low),  $7.4 \times 10^4$  g / mol (medium) and  $5.6 \times 10^5$  g / mol (high), and degrees of deacetylation of 80%, 62% and 79%, respectively. The chitosan nanoparticles produced had an average size between  $301.8 \pm 8.4$  nm and  $653.9 \pm 88.3$  nm and zeta potential between  $52.8 \pm 3.1$  mV and  $60.1 \pm 5.2$  mV. None of the nanoparticles tested showed an irritant potential. As for the antimicrobial activity, MIC values of chitosan nanoparticles ranged from  $1.50 \pm 0.0$  to  $4.0 \pm 0.0$  mg / mL, with higher efficiency presented by nanoparticles produced with chitosan of low molar mass. It was observed that the chitosan nanoparticles of low molar mass, when added to the nectar of yellow passion fruit at 1.75 mg / mL, presented lower loss of total soluble solids, higher luminosity and maintenance of color during storage under refrigeration. It was verified absence of *Salmonella* spp. and thermotolerant coliforms in all nectar samples analyzed, but high yeast counts, which limited the shelf - life to 7 days of the samples (with chitosan nanoparticles). The results showed the effectiveness of chitosan nanoparticles as antimicrobial and suggest their application as a preservative.

**Keywords:** Nanotechnology. Chitosan. Fruit and vegetable juices. Date of validity of products.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1</b>	Estrutura química da quitosana com evidência do radical N-acetil ligado à glicosamina do monômero <i>m</i>	<b>21</b>
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática da interação do tripolifosfato de sódio (A) e quitosana (B) por gelificação iônica (C)	<b>25</b>
<b>Figura 3</b>	Padrão de seleção do maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> ) para preparo do néctar, conforme homogeneidade de cor e tamanho	<b>30</b>
<b>Figura 4</b>	Etapas experimentais do teste HET-CAM: (A) Ovo no 10º dia de incubação após fecundação; (B) Incisão para retirada da casca externa acima do espaço aéreo do ovo; (C) Umidificação da película de proteção (membrana branca) da membrana corioalantóide com solução salina; (D) Remoção de membrana branca; (E) Exposição da Membrana Corioalantóide do ovo e aplicação de 200 µL das soluções controles ou das amostras e (F) Observação com lupa por 5 minutos após a exposição da substância teste	<b>35</b>
<b>Figura 5</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da quitosana de baixa massa molar	<b>43</b>
<b>Figura 6</b>	Resultado do teste HET-CAM após 5 minutos de exposição ao soro fisiológico (A), a nanopartículas preparadas com quitosana de baixa massa molar (B), de média massa molar (C), de alta massa molar (D) e ao lauril sulfato de sódio (E)	<b>45</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b>	Padrões de identidade e qualidade do néctar de Maracujá	<b>18</b>
<b>Tabela 2</b>	Ação antimicrobiana da quitosana e suas áreas de aplicação	<b>23</b>
<b>Tabela 3</b>	Esquema de preenchimento da microplaca de 96 poços para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo teste de microdiluição	<b>36</b>
<b>Tabela 4</b>	Atribuições das bandas do infravermelho de quitosanas de diferentes massas molares pela técnica de espectroscopia em região de infravermelho	<b>41</b>
<b>Tabela 5</b>	Viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média das quitosanas com diferentes massas molares	<b>42</b>
<b>Tabela 6</b>	Áreas dos picos do espectro de RMN <sup>1</sup> H e grau de desacetilação das quitosanas de diferentes massas molares	<b>43</b>
<b>Tabela 7</b>	Tamanhos e Potencial zeta das nanopartículas preparadas com quitosanas de diferentes massas molares	<b>44</b>
<b>Tabela 8</b>	Concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de quitosana frente a patógenos alimentares	<b>46</b>
<b>Tabela 9</b>	Valores de sólidos solúveis, acidez titulável e pH de néctar de maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> ) pasteurizado (controle) ou adicionado com nanopartículas de quitosana de baixa massa molar com a metade ou com a concentração inibitória mínima durante armazenado sob refrigeração (4 °C) por 28 dias	<b>47</b>
<b>Tabela 10</b>	Evolução da cor do néctar de maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> ) pasteurizado (controle) ou adicionado com nanopartículas de quitosana de baixa massa molar com a metade ou com a concentração inibitória mínima durante armazenado sob refrigeração (4 °C) por 28 dias	<b>48</b>
<b>Tabela 11</b>	Análises microbiológicas do néctar de maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> ) pasteurizado (controle) ou adicionado com nanopartículas de quitosana de baixa massa molar com a metade (CIM/2) ou com a concentração inibitória mínima (CIM) armazenado sob refrigeração (4 °C) por 28 dias	<b>49</b>

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	Maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ).....	<b>17</b>
<b>2.2</b>	Métodos de conservação de sucos de fruta.....	<b>18</b>
<b>2.3</b>	Quitosana.....	<b>20</b>
<b>2.3.1</b>	<i>Atividade antimicrobiana da quitosana.....</i>	<b>21</b>
<b>2.3.2</b>	<i>Nanopartículas de quitosana.....</i>	<b>24</b>
<b>2.3.3</b>	<i>Atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana.....</i>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	Objetivo geral.....	<b>29</b>
<b>4.2</b>	Objetivos específicos.....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	Materiais.....	<b>30</b>
<b>5.2</b>	Caracterização da quitosana.....	<b>31</b>
<b>5.2.1</b>	<i>Determinação da estrutura molecular.....</i>	<b>31</b>
<b>5.2.2</b>	<i>Determinação da massa molar viscosimétrica.....</i>	<b>31</b>
<b>5.2.3</b>	<i>Determinação do grau de desacetilação (GD).....</i>	<b>32</b>
<b>5.3</b>	Preparo de nanopartículas de quitosana por Gelificação Iônica.....	<b>33</b>
<b>5.4</b>	Caracterização das nanopartículas de quitosana.....	<b>34</b>
<b>5.5</b>	Teste de irritabilidade das nanopartículas de quitosana pelo método de membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET-CAM).....	<b>34</b>
<b>5.6</b>	Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana.....	<b>36</b>
<b>5.7</b>	Elaboração do néctar de maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ).....	<b>37</b>
<b>5.8</b>	Determinação da vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ) contendo nanopartículas de quitosana de baixa massa molar.....	<b>38</b>
<b>5.8.1</b>	<i>Sólidos solúveis totais.....</i>	<b>38</b>
<b>5.8.2</b>	<i>pH.....</i>	<b>38</b>

5.8.3	<i>Acidez total titulável em ácido cítrico.....</i>	39
5.8.4	<i>Evolução da cor.....</i>	39
5.8.5	<i>Contagem de bolores e leveduras.....</i>	39
5.8.6	<i>Análise de Salmonella sp.....</i>	40
5.8.7	<i>Determinação de coliformes termotolerantes.....</i>	40
5.9	Análise Estatística.....	40
6	<b>RESULTADOS.....</b>	41
6.1	Caracterização da quitosana.....	41
6.1.1	<i>Determinação da estrutura molecular.....</i>	41
6.1.2	<i>Determinação da massa molar viscosimétrica.....</i>	42
6.1.3	<i>Determinação do grau de desacetilação.....</i>	42
6.2	Caracterização das nanopartículas de quitosana.....	44
6.3	Teste de irritabilidade das nanopartículas de quitosana pelo método de membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET-CAM).....	44
6.4	Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana.....	45
6.5	Determinação da vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa) contendo nanopartículas de quitosana de baixa massa molar conforme parâmetros físico-químicos e microbiológicos.....	46
7	<b>DISCUSSÃO.....</b>	50
7.1	Caracterização da quitosana.....	50
7.1.1	<i>Caracterização da estrutura molecular.....</i>	50
7.1.2	<i>Determinação da massa molar viscosimétrica.....</i>	51
7.1.3	<i>Determinação do grau de desacetilação.....</i>	51
7.2	Caracterização das nanopartículas de quitosana.....	52
7.3	Teste de irritabilidade das nanopartículas de quitosana pelo método de membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET-CAN).....	54
7.4	Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana.....	54

<b>7.5</b>	Determinação da vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ) contendo nanopartículas de quitosana de baixa massa molar conforme parâmetros físico-químicos e microbiológicos.....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil figura como um dos maiores produtores mundiais de frutas, ocupando a terceira posição no ranking, abaixo somente de China e Índia. Sua produção de frutas frescas ultrapassou 37 milhões de toneladas no ano de 2015, com 47% a 53% destinados ao processamento agroindustrial, destacando-se a produção de sucos (SANTOS et al., 2013; IBGE, 2015).

Os principais sucos produzidos e exportados pelo Brasil são derivados de frutas cítricas, entre eles o maracujá, tendo em vista que o país é o maior produtor e consumidor mundial deste fruto, com produção acima de 690 mil toneladas em 2015 e 65% do cultivo nacional pertencente aos estados da Região Nordeste (IBGE, 2015). A variedade predominante cultivada no país é o maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), correspondendo a mais de 95% dos pomares comerciais (MELETTI, 2011). Em adição ao sabor, sua composição nutricional torna-se um atrativo, pois além de rico em vitamina C, cálcio e fósforo (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004), o maracujá-amarelo apresenta quantidades representativas de carotenos precursores de vitamina A, e  $\alpha$ -tocoferol (SILVA; MERCADANTE, 2002; PERTUZATTI et al., 2015).

O mercado dos sucos está em expansão, reflexo do crescente perfil de consumo da sociedade moderna, onde novos padrões familiares, laborais e comportamentais instituíram o benefício à saúde como determinante para aquisição de produtos alimentícios (LEWIS, 2008; VIALTA et al., 2010). Dessa forma, o uso de aditivos químicos é considerado controverso, por alegações de efeitos adversos como carcinogênese, citotoxicidade celular (MAMUR et al., 2012; KHANNA; DASH; DARBRE, 2014), assim como a utilização de processos físicos para conservação de alimentos. Tais processos induzem a perdas nutricionais de vitaminas, compostos antioxidantes e flavorizantes (AGANOVIC et al., 2014; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015), com impacto direto sobre a qualidade de produtos processados como os sucos e sobre a saúde do consumidor.

Atendendo ao novo conceito de determinantes de consumo e a necessidade mercadológica e sanitária do controle microbiológico dos alimentos, técnicas inovadoras de processamento, como alta pressão e antimicrobianos naturais, surgem como alternativa a utilização de conservantes sintéticos e tratamentos térmicos



(OLIVEIRA et al., 2015). Protetores naturais com potencialidade antimicrobiana, como polifenóis de plantas, bacteriocinas (nisinas), culturas protetoras (lactobacillos) e polímeros catiônicos de animais, devem ser seguros e ter mínimos efeitos sobre as características intrínsecas ao alimento (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

A quitosana é um biopolímero policatiônico, composto por unidades  $\beta$ -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina, sendo encontrada na parede celular de crustáceos e fungos. Dentre as inúmeras características que distinguem a quitosana e seus derivados dos demais polissacarídeos, destaca-se a sua bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e potencialidade antimicrobiana (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008; BERGER et al., 2014). Suas características funcionais lhe permitem ser empregada na indústria alimentícia como clarificante, espessante, estabilizante, aplicada em embalagens inteligentes, como encapsulante e como conservante (MARTÍN-DIANA et al., 2009; AIDER, 2010; HOSSEINI et al., 2013; YUAN et al., 2013; TASTAN; BAYSAL, 2015).

Efeitos biológicos desejáveis são atribuídos a quitosana, como atividade antioxidante, anti-hipertensiva, antitumoral, anti-inflamatória e neuroprotetora (NGO et al., 2015). Além disso, apresenta toxicidade menor que outros polímeros, como glicose ou sacarose, pois quando a quitosana foi testada em doses maiores do que as doses letais desses açúcares (8 e 12 g/kg de peso corporal, respectivamente), não apresentou sinal de toxicidade ou mortalidade (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999).

Quando em forma macromolecular, a quitosana tem seu uso limitado em matrizes alimentares por ser insolúvel em soluções aquosas, de pH neutro e básico e na maioria dos solventes orgânicos (GYAWALI ; IBRAHIM, 2014; NGO et al., 2015) Quando na forma de nanopartículas, apresenta propriedades hidrofílicas, é bioadesiva, potencializadora da penetração de grandes moléculas por superfície mucosa (ILLUM, 1998) e possibilita formulações que não requerem a utilização de solventes orgânicos e de surfactantes (ARNAUD-STAMFORD; STAMFORD, 2010).

As nanopartículas de quitosana também tem exibido uma potencialização da atividade antimicrobiana frente a forma convencional, em função de uma maior área de superfície da nanopartícula e maior afinidade com células de microrganismos (RAMEZANI; ZAREI; RAMINNEJAD, 2015).

Diante do reconhecido potencial biológico da quitosana e de suas nanopartículas, mediante escassos relatos de sua utilização em sucos de fruta, torna-se imprescindível a avaliação da atividade antimicrobiana e do potencial de irritação de nanopartículas de quitosana e seus efeitos na conservação de alimentos quanto a parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

O maracujá-amarelo, é um fruto característico de baga carnosa com diâmetro de 4 a 7 cm e casca espessa de coloração amarelada, pertence à família Passifloraceae. Nativa predominantemente de região tropical, distribui-se por toda a América do sul e Central, chegando até o sul dos EUA (HAFLE et al., 2010; SANTOS et al., 2014).

No Brasil, ocupando uma área de mais de 51 mil hectares de cultivo, o maracujá-amarelo é de extrema significância econômica, pois além de consumido in natura, o fruto é matéria-prima para indústrias cosmética, fitoterápica e alimentícia, principalmente produção de suco (SANTOS et al., 2014; IBGE, 2015).

De agradável aroma e sabor exótico, o maracujá-amarelo é atrativo não somente por seus atributos sensoriais. Por ser rico em nutrientes como fibras, vitaminas e minerais, dentre outros, lhe tem sido atribuído efeitos benéficos a saúde do homem, mesmo com composição físico-química variando conforme tipo de cultivar, condições de cultivo e climáticas, grau de maturidade, práticas agrícolas e processamento (JANZANTTI et al., 2012).

Com concentrações de ácido ascórbico entre 160 a 200 mg/100g, o maracujá-amarelo pode ser considerado uma boa fonte de vitamina C, atuando como um importante antioxidante (SIPOLI; BARROS, 2011; RAMAIYA et al., 2013; PERTUZATTI et al., 2015). Sua capacidade antioxidante total é intensificada pela presença de compostos fenólicos, compostos aromáticos voláteis e carotenoides, sendo considerado um alimento fonte de carotenos por apresentar concentrações que variam de 21,5 a 25,1 µg/g (JANZANTTI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; BRAGA et al., 2015; PERTUZATTI et al., 2015).

Devido a sua atividade antioxidante e composição de fibras dietéticas, o maracujá-amarelo tem sido alvo de estudos com foco em alteração de metabolismo e consequente benefícios a saúde. Estudos experimentais em modelo animal realizados com o suco do maracujá-amarelo demonstraram redução de glicemia sérica e melhora

de perfil lipídico, com redução de colesterol total e LDL-colesterol, além de elevação do HDL-colesterol (BARBALHO et al., 2011; SOUZA et al., 2012).

O néctar de Maracujá, por definição, é a bebida não fermentada, obtida da dissolução, em água potável, da parte comestível do maracujá (*Passiflora*, spp.) e açúcares, destinado ao consumo direto, podendo ser adicionado de ácidos (BRASIL, 2003). Sua composição deve estar de acordo o disposto na tabela 1.

Tabela 1. Padrões de identidade e qualidade do néctar de Maracujá

Parâmetros	Min.	Máx.
Polpa de maracujá (g/100g)	10,00	-
Sólidos solúveis em °Brix, a 20°C (g/100g)	11,00	-
Acidez total em ácido cítrico (g/100g)	0,25	-
Açúcares totais (g/100g)	7,00	-

Fonte: BRASIL, 2003.

## 2.2 Métodos de conservação de sucos de fruta

A produção de sucos é uma atividade industrial crescente no Brasil, com destaque para o processamento de frutas cítricas (SANTOS et al., 2013). Os sucos, no geral, apresentam pH igual ou inferior à 4,5, tornando o tratamento térmico, em especial a pasteurização, o método de conservação mais empregado para este tipo de alimento (DUTRA et al., 2012).

A pasteurização é realizada pela indústria alimentícia com objetivo de redução da carga microbiana e a inativação de enzimas que podem comprometer a qualidade dos sucos durante o período de armazenamento (STOFFEL; MOREIRA, 2013). As condições de acidez dos sucos ( $\text{pH} < 4,5$ ) permitem um tratamento térmico mais ameno, com realização da pasteurização em temperaturas entre 60 a 100 °C por poucos segundos (DUTRA et al., 2012). Entretanto, alguns fungos termoressistentes, como os do gênero *Byssochlamys*, podem não ser inativados nas condições de tratamento descritos acima, tornando-se necessária a adição de conservantes químicos como bicarbonato dimetílico, sorbatos e benzoatos (MORAES, 2006).

Contudo, estudos vêm associando alguns efeitos indesejados a esses métodos convencionais de conservação. Soares et al. (2017) descreveram redução das quantidades de glicose, sacarose e frutose presentes no suco de maracujá após pasteurização à 85 °C por 4 s e um aumento expressivo da hidrólise da sacarose com produção de hidroximetilfurfural com pasteurização à 140 °C por 60 s.

Rodríguez-Roque et al. (2015) relataram uma redução de até 15% de ácido ascórbico, 36% dos compostos fenólicos e 34% da ação antioxidante de bebidas à base de suco de frutas após processo de pasteurização à 90 °C por 60 s. Aganovic et al., (2014) observaram perdas significativas de compostos voláteis presentes em suco de tomate após pasteurização à 74 °C por 30 s quando comparados ao suco não tratado e ao suco tratado com campo elétrico pulsado ou processamento em alta pressão.

Apesar de baixa toxicidade, reações adversas de caráter alérgico (como urticária e asma), indução a transtorno de déficit de atenção e hiperatividade em crianças, foram atribuídos aos benzoatos (MCCANN et al., 2007; POLÔNIO; PERES, 2009; PETRUCI; CARDOSO; PEREIRA, 2011). MAMUR et al. (2012), utilizando linfócitos humanos *in vivo*, evidenciaram efeitos genotóxicos no DNA mesmo na presença de baixas concentrações do sorbato de sódio, porém referiram ausência destes efeitos quando utilizado o ácido sórbico ou o sorbato de potássio. Entretanto, existem relatos de casos de convulsões, alergias e inflamações em pessoas com sensibilidade aos sorbatos (PETRUCI; CARDOSO; PEREIRA, 2011).

Os benefícios endossados a uma alimentação saudável estimularam mudanças nos padrões nutricionais que dinamizaram intensamente os setores da indústria de alimentos responsáveis pela produção. Dessa forma, a indústria alimentícia vem pesquisando alternativas que permitam a comercialização de alimentos com vida útil prolongada, mantendo a qualidade nutritiva e sensorial do alimento (FELLOWS, 2006; FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008).

A utilização de pulsos elétricos em alta voltagem e curta duração (campo elétrico pulsado) surge como uma técnica inovadora de conservação de alimentos. Ela consiste no aumento da permeabilidade das membranas celulares decorrente do fenômeno de eletroporação por alteração do potencial transmembrana, e na desnaturação permanente de proteínas citoplasmáticas, levando a morte dos microrganismos. Contudo, este método apresenta limitações como alto custo de equipamentos, efeito limitado na inativação enzimática e maior risco de ruptura

dielétrica de alimentos líquidos não homogêneos (RAMOS et al., 2006; BUCKOW; NG; TOEPFL, 2013; PUÉRTOLAS et al., 2013).

O emprego de ultrassom tem se mostrado efetivo contra microrganismos patógenos de alimentos. Forças físicas e reações químicas geradas pelo fenômeno de cavitação acústica, como rompimento de microbolhas com alta pressão e formação de espécies reativas são os principais mecanismos de ação para inativação microbiana. Contudo, este método não tem demonstrado efeito letal satisfatório para ser aplicado isoladamente na conservação de sucos e apesar de demonstrar mínimo impacto sobre os alimentos, relatos de redução dos níveis de ácido ascórbico, carotenoides, licopenos e efeitos sensoriais negativos foram atribuídos a esta técnica (ZINOVIADOU et al. 2015).

Outra alternativa emergente para conservação de alimentos tem sido a aplicação de protetores naturais com potencialidade antimicrobiana, os quais devem apresentar baixa toxicidade, menos efeitos nocivos sobre o ambiente e o consumidor (FELLOWS, 2006; FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008). Neste cenário, a quitosana vêm se destacando como antimicrobiano natural, com capacidade de formar géis e com ação antioxidante, características atrativas à indústria alimentícia (HU et al., 2015b; HOSSEINI et al., 2016; SHAH et al., 2016).

### **2.3 Quitosana**

A quitosana é um polissacarídeo linear largamente encontrado na natureza por ser uma forma N-acetilada derivada da quitina, componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes, como crustáceos e insetos, e da parede celular fúngica, em especial da Classe Zygomycetes (ABREU et al., 2013; MOUSSA; TAYEL; AL-TURKI, 2013; BERGER et al., 2014).

O processo para obtenção da quitosana baseia-se em hidrólises alcalinas sucessivas da quitina, resultando em moléculas compostas por monómeros de glucosamina N-acetilada e glucosamina (Figura 1), com graus de desacetilação e massas moleculares variáveis, insolúveis em soluções aquosas e de alta viscosidade em soluções levemente ácidas (YOUNES et al., 2014; CHANG et al., 2015; NGO et al., 2015).

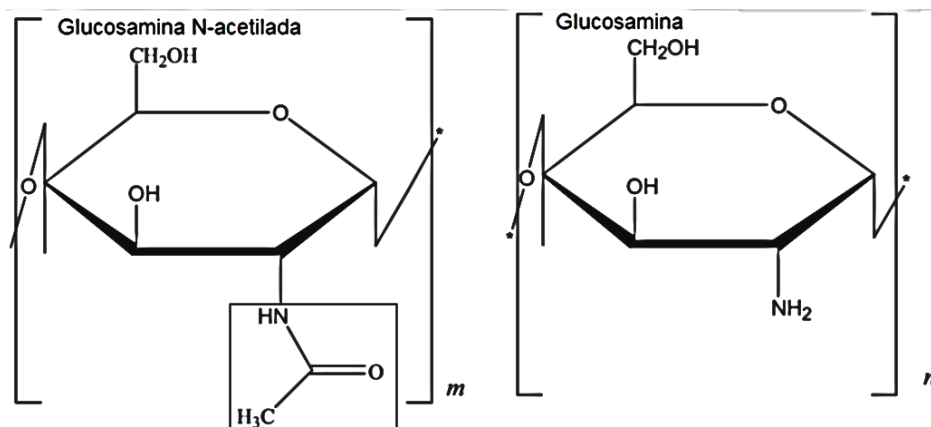


Figura 1. Estrutura química da quitosana com evidência do radical N-acetil ligado à glicosamina do monómero *m*, adaptado de Zou et al. (2015).

A natureza policatiônica da quitosana confere ao polímero propriedades únicas, que garantem uma potencial aplicabilidade em diversos segmentos da indústria alimentícia, farmacêutica, agrícola e ambiental (BERGER et al., 2014; ZOU et al., 2015).

Kammoun et al. (2013), comprovaram uma excelente capacidade da quitosana de formar géis e filmes, através da criação de biofilmes biodegradáveis de quitosana com glicerol e polietilenoglicol como plastificantes. Além disso, puderam constatar importante ação antioxidante, antimicrobiana e biodegradante nos filmes contendo 70% e 90% de quitosana em sua composição.

Younes et al. (2014) constataram o alto poder antioxidante da quitosana e sua atividade antitumoral frente a células de câncer de bexiga, encontrando relação dose dependente e maior eficiência quando aplicada a quitosana de menor massa molar. Outros estudos reforçam as propriedades antimicrobiana e o baixo potencial citotóxico/genotóxico da quitosana (YIN et al., 2009; MOUSSA; TAYEL; AL-TURKI, 2013; CABUK et al., 2014; COSTA et al., 2014; LAGARTO et al., 2015).

### 2.3.1 Atividade antimicrobiana da quitosana

A ação da quitosana frente a inibição de crescimento e morte celular de microrganismos, como fungos e bactérias, tem sido demonstrada por diversos estudos (Tabela 2) e apesar de seu mecanismo de ação não ser claramente elucidado, algumas hipóteses tem sido discutidas no meio científico (KONG et al., 2010).

As hipóteses mais aceitas atribuem o efeito antimicrobiano do polímero a interações entre a fração catiônica da quitosana (carregada positivamente) e componentes celulares dos microrganismos carregados negativamente, como parede celular, DNA e RNA, resultando em aumento da permeabilidade celular, com perda de componentes intracelulares, e bloqueio da transcrição do RNA (CRUZ-ROMERO et al., 2013; MOUSSA; TAYEL; AL-TURKI, 2013; ZOU et al., 2015).

Gyliené et al. (2015), analisando o poder de adsorção de oxigênio pela quitosana, constataram relação inversa entre quantidade de oxigênio adsorvido do meio e viabilidade celular de *E. coli*, sugerindo assim um mecanismo de ação da atividade antimicrobiana da quitosana frente a microrganismos aeróbios.

A eficácia antimicrobiana da quitosana depende de diversos fatores relacionados aos microrganismos (espécie e idade celular), a quitosana (densidade de carga positiva, massa molar, concentração, características hidrofílica/hidrofóbicas, capacidade quelante e estado físico quando solubilizada) e ao ambiente (força iônica do meio, pH, temperatura e tempo reativo) (KONG et al., 2010).

Chang et al. (2015), estudaram os efeitos do pH, temperatura do meio e massa molar da quitosana sobre sua atividade antimicrobiana em *E. coli* e *S. aureus*. Eles observaram o aumento da ação antimicrobiana da quitosana frente aos dois microrganismos mediante elevação da temperatura de incubação empregada. Quando em pH mais ácido (5 e 6) ambos os microrganismos apresentaram maior redução na contagem de células quando expostos às quitosanas de maior massa molar (72,1 kDa à 300 kDa). Entretanto, em pH neutro (7), as quitosanas de menor massa molar (3,3 e 7,7 kDa) apresentaram melhor ação antimicrobiana.



Tabela 2. Ação antimicrobiana da quitosana e suas áreas de aplicação.

Suporte	Aplicação	Bactérias Gram +	Bactérias Gram -	Fungos	Fonte
Acetatos de quitosana	de Preservação de alimentos	<i>S. aureus</i> / <i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> / <i>P. fluorescens</i>	-	CRUZ-ROMERO et al., 2013
Acetato de quitosana	de Preservação de alimentos	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	-	MOUSSA; TAYEL; AL-TURKI, 2013
Acetato de quitosana	de Preservação de alimentos/ Indústria farmacêutica	<i>S. aureus</i> / <i>M. luteus</i> / <i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> / <i>K. pneumoniae</i> / <i>S. typhi</i>	<i>F. oxysporum</i> / <i>F. solani</i> / <i>Fusarium sp.</i>	YOUNES et al., 2014
Quitosana/ copolímero polipirrol	Materiais de embalagem	<i>B. megaterium</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i> / <i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i> / <i>S. cerevisiae</i>	CABUK et al., 2014
Enxaguatório bucal com quitosana	Indústria farmacêutica/ Higiene pessoal	<i>Streptococcus spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	-	-	COSTA et al., 2014
Filme quitosana/ glicerol/ Polietileno glicol	Materiais de embalagem	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	-	KAMMOUN et al., 2013
Derivados de quitosana 6-N-substituídos	Preservação de alimentos	<i>S. aureus</i> / <i>B. subtilis</i> / <i>B. anthracis</i>	<i>E. coli</i> <i>S. typhi</i>	<i>F. graminearum</i> / <i>R. cerealis</i> / <i>F. oxysporum</i> / <i>B. cinerea</i>	HU et al., 2015b

### **2.3.2 Nanopartículas de quitosana**

O termo nanopartícula é empregado para partículas com tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$ , portanto sujeitas a efeitos de tamanho quântico, de túnel macroquântico e de superfície (RAMEZANI; ZAREI; RAMINNEJAD, 2015). Devido a relação de área de superfície/volume, admite-se que um grande percentual dos átomos que compõem os materiais nanoestruturados encontram-se em sua superfície, conferindo propriedades originais à matéria na escala nanométrica, pois os átomos de superfície são reativos por compartilhar menos ligações químicas com átomos vizinhos (LANDRISCINA; ROSEM; FRIEDMAN, 2015).

Materiais de diversas naturezas tem sido utilizadas no preparo das nanopartículas, a exemplo: proteínas hidrossolúveis, como a carfirina (XIAO; NIAN; HUANG, 2015), lipídeos fisiológicos (LUO et al., 2015) e polímeros, como alginato e quitosana ( RAFIEE et al., 2014; KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015). Esta tem se destacado por apresentar baixa toxicidade, biocompatibilidade e boa capacidade de formar géis, além de controlável auto-agregação e promoção de bioadesão (XIAO; NIAN; HUANG, 2015).

Diversos métodos podem ser aplicados para obtenção das nanopartículas de quitosana: gelificação iônica, emulsão “cross-linked”, coacervação ou precipitação, emulsão de gotículas coalescentes ou spray-drying. A escolha do método depende das características desejadas da nanopartícula (tamanho, estabilidade, toxicidade residual, perfil cinético e dispositivo de entrega) e das características do material ativo presente nas mesmas (natureza e estabilidades térmica e química) (ZHOU et al., 2014; HU et al., 2015a; MADUREIRA; PEREIRA; PINTADO, 2015; XIAO; NIAN; HUANG, 2015).

A gelificação iônica está em evidência por ser considerado um método seguro, de fácil controle, não necessitar de solventes orgânicos, requerer baixa energia e ser compatível com moléculas hidrofílicas (KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015; SHAH et al., 2016). Consiste em interações eletrostáticas intra e intermolecular entre a carga positiva do grupo amino da quitosana e grupos carregados negativamente de um poliânion, como o tripolifosfato de sódio (TPP), uma substância atóxica e com propriedade de formar géis (Figura 2) (STAMFORD-ARNAUD, 2012; ANTONIOU et al., 2015).

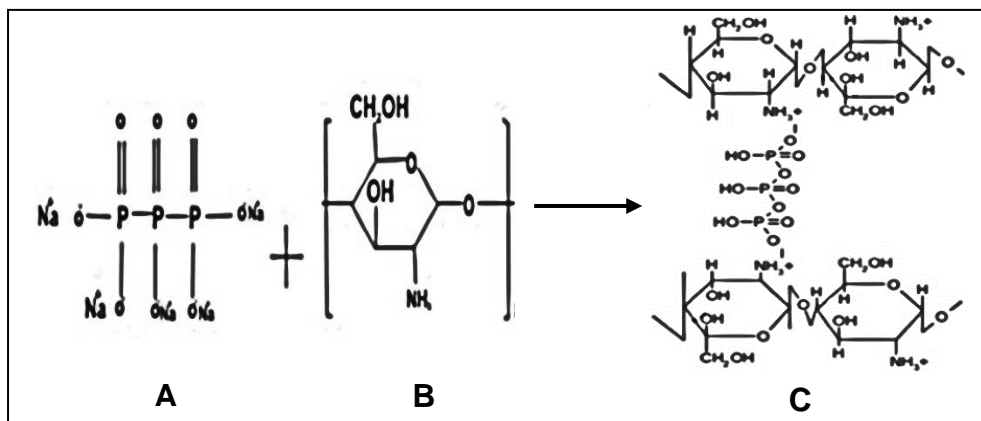


Figura 2. Representação esquemática da interação do tripolifosfato de sódio (A) e quitosana (B) por gelificação iônica (C), adaptado de Azevedo et al. (2010) e Rather et al. (2013).

Em virtude da complexidade de propriedades, as nanopartículas de quitosana tem mostrado promissora aplicação nas mais diversas áreas, como biomédica, farmacêutica, ambiental e alimentar. Estudos tem demonstrado resultados favoráveis quanto sua utilização em sistema de carreação e entrega de drogas (RAFIEE et al., 2014; LUO et al., 2015), proteção e potencialização do efeito de drogas e fitoconstituintes, como antioxidantes e corantes (RAFIEE et al., 2014; HU et al., 2015a; SHAH et al., 2016), tratamento de efluentes (ZHOU et al., 2014) e ação antimicrobiana (ANTONIOU et al., 2015; HU et al., 2015b; MADUREIRA et al., 2015).

Citocompatibilidade e biocompatibilidade são propriedades atribuídas aos nanomateriais formulados com quitosana, capazes de reduzir a citotoxicidade de outros compostos. Rafiee et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana preparadas por interações iônicas com plasmídeo de DNA (1:5) ou alginato (1:1), com tamanhos respectivos de 620 nm e 161 nm, e não observaram efeito significativo sobre a viabilidade de células renais embrionárias humanas após 4 e 24 horas de exposição. Luo et al. (2015) demonstraram um aumento da viabilidade de células epiteliais colorretais na adição de quitosana à formulação de nanopartículas de lipídio sólido.

Entretanto, estudos apontam variação da toxicidade das nanopartículas de quitosana por influência de tamanho e concentração, por tipo e concentração do material ligante ou surfactante, ou ainda do composto encapsulado (PIRAS et al., 2014; RAFIEE et al., 2014; ZHOU et al., 2014; XIAO; NIAN; HUANG, 2015). Omar Zaki, Katas e Hamid (2015) evidenciaram alterações da viabilidade de diversas

linhagens celulares de ratos mediante exposição de 48 h e 72 h a nanopartículas de quitosana em diferentes concentrações e tamanhos. Segundo eles, foi evidenciada redução da viabilidade celular em concentrações mais altas (750 a 1000 µg/ml) e com nanopartículas de tamanho menor (<200 nm).

### **2.3.3 Atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana**

As nanopartículas de quitosana têm sido desenvolvidas para uso em alimentos visando inúmeras aplicações, tais como: melhorar a hidrofobicidade, 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 apresentam ação antimicrobiana intensificada, contudo essa propriedade depende do tipo de solvente usado no preparo das nanopartículas (CRUZ-ROMERO et al., 2013). A quitosana, quando presente em nanomateriais, tem seu efeito antimicrobiano potencializado por aumento da superfície de contato, o que acarreta maior interação com os microrganismos, causando ruptura de membrana celular, interferindo na transcrição e transdução do DNA e na respiração celular (LANDRISCINA; ROSEM; FRIEDMAN, 2015).

Chantarasataporn et al. (2014) mostraram uma larga atividade inibitória de quitosana filamentosa e de nanopartículas de quitosana sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. enteritidis* e *E. coli* O157:H7. As nanopartículas foram produzidas a partir da degradação enzimática da quitosana, formando os oligossacarídeos de quitosana (oligoCS) na escala nano (100 a 300 nm). Os oligoCS apresentaram melhor atividade antimicrobiana que a quitosana filamentosa e quando aplicadas na concentração de 0,4% em carne de porco, inibiram as oxidações proteica e lipídica durante 7 dias de estocagem sob refrigeração.

Ramezani et al. (2015) compararam os efeitos de revestimentos comestíveis de glicerol, aditivados com quitosana e nanopartículas de quitosana, sobre a conservação de filés de carpa prateada durante refrigeração (4 °C) por 12 dias. As nanopartículas obtidas por gelificação iônica com TPP (25:1), com tamanho de 108,6 nm e potencial zeta de +49,50 mV, quando adicionadas a cobertura, mostraram efeito antimicrobiano mais potente que a quitosana por apresentar menores contagens totais de mesófilos e de bactérias psicotróficas ao final da estocagem, mantendo-os dentro

do limite aceitável. Nas coberturas contendo quitosana, a contagem total de bactérias psicotróficas excedia o permitido no 12º dia de armazenamento.

Yang et al. (2010) compararam a ação bacteriostática e bactericida de quitosanas de diferentes massas molares ( $3,6 \times 10^2$  a  $2,4 \times 10^5$ ) e suas nanopartículas, aplicadas como tratamento final de tecido de lã, frente a *S. aureus* e *E. coli*. As nanopartículas foram obtidas por gelificação iônica com TPP com a melhor condição de *cross-linking* na proporção de 5:2, apresentando tamanhos entre 55,3 nm à 134,4 nm e melhor efeito antibacteriano quando comparados as quitosanas de média e baixa massa molar, com maiores valores bacteriostáticos e bactericidas atribuídos as nanopartículas de 67,0 nm na concentração de 1%.

As nanopartículas de quitosana tem demonstrado um importante efeito profilático contra a formação de biofilmes, um fator crítico de virulência que aumenta a adesão e permanência dos microrganismos em superfícies. Del carpio-perochena et al. (2015) constataram redução da formação de biofilme por *Enterococcus faecalis* na adição de nanopartículas de quitosana à seladores de canal radicular e um significativo aumento da eficácia antibacteriana de cimentos endodônticos, mesmo depois um tempo de envelhecimento de 4 semanas.

Madureira et al. (2015), avaliando a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *S. typhimurium*, relataram que a nanopartícula formada a partir da quitosana de baixa massa molar (CIM de 1,0 a 1,5 mg/ml) mostrou-se mais efetiva do que a de alta massa molar (CIM de 2,5 a 3,5 mg/ml). Na literatura é relatado que características como dimensão, índice de polidispersão e potencial zeta, bem como atividade antimicrobiana das nanopartículas, são influenciados por massa molar e grau de desacetilação da quitosana (CHANTARASATAPORN et al., 2014; KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015).

A nanotecnologia é uma área do conhecimento que está sendo considerada como uma nova perspectiva para indústria alimentícia. Os grandes desafios compreendem ainda a limitação das informações sobre as propriedades e os riscos dos nanomateriais, a aplicação em escala industrial e a aceitação por parte dos consumidores. Contudo, espera-se que os investimentos no uso de produtos biocompatíveis e atóxicos no preparo de nanomateriais poderão promover o desenvolvimento sustentável e o incremento da competitividade do agronegócio nacional.

### 3 HIPÓTESE

A potencialização das propriedades biológicas e antibacterianas da quitosana, sob a forma de nanopartículas, contribuirá positivamente para prolongar o tempo de vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana, o potencial de irritação e os efeitos de nanopartículas de quitosana na conservação do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*).

### 4.2 Objetivos específicos

- Tipificar as quitosanas comerciais com diferentes massas molares;
- Preparar e caracterizar as nanopartículas de quitosana com diferentes massas molares;
- Determinar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana com diferentes massas molares frente patógenos de origem alimentar;
- Determinar o potencial de irritabilidade das nanopartículas de quitosana com diferentes massas molares;
- Formular o néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e avaliar o efeito da adição de nanopartículas de quitosana sobre parâmetros físico-químicos e microbiológicos indicadores de qualidade, durante o armazenamento sob refrigeração.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) foi adquirido em comércio local na cidade do Recife, sendo selecionado pela ausência visual de contaminações e danos, conforme estágio de maturação mantendo-se a homogeneidade de cor e tamanho (Figura 3).

As quitosanas de massa molar baixa (Q\_BP), média (Q\_MP) e alta (Q\_AP) e o reagente tripolifosfato de sódio (TPP) foram adquiridos do fabricante Sigma-Aldrich®. Os reagentes ácido acético glacial, ácido clorídrico 37 P.A., resazurina e fenolftaleína P.A. foram fabricados pela empresa VETEC Química, e o hidróxido de sódio (NaOH) pela empresa Dinâmica. Os caldos brain heart infusion (BHI), selenito cistina e *E. coli* (EC) foram fabricados pelo laboratório HIMEDIA. Os meios de cultura ágar bismuto sulfito (BS), ágar hektoen entérico (HE) e o caldo lactosado foram fabricados pela ACUMEDIA. O ágar Xylose lysine deoxycholate (XLD) foi produzido pela Difco™. O ágar Sabouraud e o caldo lauril sulfato foram fabricados pela empresa Merk. A água ultrapura foi obtida por filtração através do Sistema Milli-Q®.

As cepas bacterianas utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7664, *Salmonella typhimurium* ATCC 1408 e *Escherichia coli* ATCC 8739) foram cedidas pelo banco de cultura da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)/ Departamento de nutrição – Campus Recife.



Figura 3: Padrão de seleção do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) para preparo do néctar, conforme homogeneidade de cor e tamanho.



## 5.2 Caracterização da quitosana

### 5.2.1 Determinação da estrutura molecular

Os grupos funcionais presentes na estrutura das quitosanas (Q\_BP, Q\_MP, Q\_AP) foram determinados por espectroscopia vibracional na região de infravermelho em espectrofotômetro com Transformada de Fourier da Bruker, modelo IF66, disponível na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

As amostras foram preparadas com 1,5 g da quitosana sendo seca em estufa a vácuo por um período de 15 h a 60 °C. Após a secagem foram adicionados 100 mg de brometo de potássio (KBr) com homogeneização em almofariz de ágata e pastilhas contendo o pó de quitosana e KBr como suporte foram moldadas. As pastilhas permaneceram em estufa a vácuo a 110 °C durante 20 h até leitura em espectrofotômetro para obtenção do espectro com variação do número de onda na região de 4000 cm<sup>-1</sup> à 400 cm<sup>-1</sup> (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003).

### 5.2.2 Determinação da massa molar viscosimétrica

As massas molares médias das quitosanas foram estimadas por viscosidade, utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske ( $d_{\text{interno}} = 1,01$  mm) termostatizado a  $(25 \pm 0,01)$  °C, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte.

Para a determinação da viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , foram preparadas soluções das quitosanas (Q\_BP, Q\_MP, Q\_AP) em 25 mL de solução de ácido clorídrico à 1% sob agitação (agitador magnético Cientec CT-103) constante por 15 h, com posterior aquecimento a 80 °C por 2 min e adição de mais solução de ácido clorídrico 1%, para obtenção de soluções de concentração final variando de 0,1 a 1,0 mg/mL. Alíquotas de 15 mL desta solução foram dispostas nos capilares para medição do tempo de escoamento, expresso em segundos, estabelecendo-se a média de três repetições (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003).

As viscosidades específicas ( $\eta_{\text{esp}}$ ) das quitosanas foram determinadas pela equação 1, onde  $t$  e  $t_0$  correspondem, respectivamente, ao tempo de escoamento da solução do polímero e ao tempo de escoamento do solvente puro utilizado:

$$\eta_{esp} = \left( \frac{t-t^0}{t^0} \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

As viscosidades reduzidas foram determinadas pela relação inversa da viscosidade específica pela concentração (C) do polímero em gramas/100 mL da solução (Equação 2).

$$\eta_{red} = \left( \frac{\eta_{esp}}{C} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

As viscosidades intrínsecas  $[\eta]$  das quitosanas foram encontradas pela extrapolação do gráfico linear de viscosidade reduzida versus concentração à diluição infinita, com base na equação 3 de Huggins (1942).

$$\eta_{red} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad (\text{Eq. 3})$$

Tendo em vista que a massa molar viscosimétrica média de um polímero está relacionada a viscosidade intrínseca da solução que o contém, podemos determiná-la pela equação 4 de Mark-Houving (RINAUDO et al., 2001).

$$[\eta] = K (\overline{M}_v)^a \quad (\text{Eq. 4})$$

Com base no solvente (ácido clorídrico) e temperaturas (25 °C) utilizados, teremos para K e a os valores de  $1,81 \times 10^{-5}$  e 0,93, respectivamente.

### **5.2.3 Determinação do grau de desacetilação (GD)**

O grau de desacetilação das quitosanas (Q\_BP, Q\_MP, Q\_AP) foi determinado através de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) com base na metodologia e na equação propostas por Signini, Desbrières e Campana Filho (2000).

Uma solução viscosa foi preparada dissolvendo-se 10 mg de quitosana em 1 mL de água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) adicionada de ácido clorídrico na concentração de 1% (v/v) durante 24 h. Esta solução foi disposta em um tubo de 5 mm de diâmetro e

analisada conforme os parâmetros de temperatura de 50 °C, com tempo de relaxação de 6 segundos e pulso de 90° programados nos equipamentos Varian Unity Plus em 300 MHz da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

O grau de desacetilação foi então determinado pela razão dos picos nas regiões de 2 ppm e 3,4 ppm, correspondentes aos núcleos de hidrogênios do agrupamento acetoamido ( $H^{ac}$ ) e da posição 2 do anel de glicosamina ( $H^2$ ), expressa pela equação 5 (SIGNINI, DESBRIÈRES E CAMPANA FILHO, 2000):

$$GD\% = \left( 1 - \left( \frac{H^{ac}}{3H^2} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

### 5.3 Preparo de nanopartículas de quitosana por Gelificação Iônica

Inicialmente, 500 mg de cada quitosana (Q\_BP, Q\_MP, Q\_AP) foram dissolvidos em 50 mL de ácido acético a 2% e agitados (agitador magnético Cientec CT-103) à 800 rpm por 30 min. Em seguida, 20 mL de solução de tripolifosfato de sódio (TPP) à 1 % foram gotejados com auxílio de bureta graduada na velocidade aproximada de 0,3 mL/min.

A solução foi mantida sob agitação (agitador magnético Cientec CT-103) à 800 rpm por duas horas após o gotejamento, sendo então distribuída em eppendorfs de 2 mL e centrifugada (centrifuga Ht Mcd-2000) à uma velocidade de 13.400 rpm por 10 minutos, com desprezo do sobrenadante.

O material sedimentado foi ressuspenso em água destilada e submetido a nova centrifugação (centrifuga Ht Mcd-2000) com mesma velocidade por 5 min. Este processo foi repetido aproximadamente 5 vezes para obtenção do precipitado final, que foi liofilizado (liofilizador de bancada TERRONI Enterprise II) por 16 horas para posterior utilização nos demais experimentos (YANG et al., 2010; STAMFORD-ARNAUD, 2012). As nanopartículas foram classificadas como NQ\_BP, NQ\_MP e NQ\_AP, conforme a massa molecular viscosimétrica das quitosanas utilizadas em sua fabricação.

#### **5.4 Caracterização das nanopartículas de quitosana**

O tamanho de partícula e a carga de superfície das nanopartículas foram determinados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e mobilidade eletroforética usando Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK).

Uma solução inicial foi preparada com a redispersão de 50mg de nanopartículas de quitosana (NQ\_BP, NQ\_MP, NQ\_AP) em 5mL de ácido acético à 1%. Posteriormente, esta solução foi diluída em água ultrapura na proporção de 1:10 e direcionada às análises. As aferições em DLS foram operadas no comprimento de onda de 633 nm, a 25 °C e com um ângulo de detecção de 90 °C (STAMFORD-ARNAUD, 2012; SHAH et al., 2016).

#### **5.5 Teste de irritabilidade das nanopartículas de quitosana pelo método de membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET-CAM)**

Amostras foram preparadas com diluição das nanopartículas de quitosana (NQ\_BP, NQ\_MP, NQ\_AP) em solução acética à 1%, com concentração final de 10 mg/mL e o pH foi corrigido para 5.8 com solução de NaOH 1 N. Foram utilizadas soluções de lauril sulfato de sódio 1%, como controle positivo e de cloreto de sódio à 0,9%, como controle negativo.

O teste do HET-CAM foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Steiling et al. (1999), conforme descrição da Figura 4, afim de identificar sinais de vasoconstrição, hemorragia e coagulação após exposição às substâncias teste.

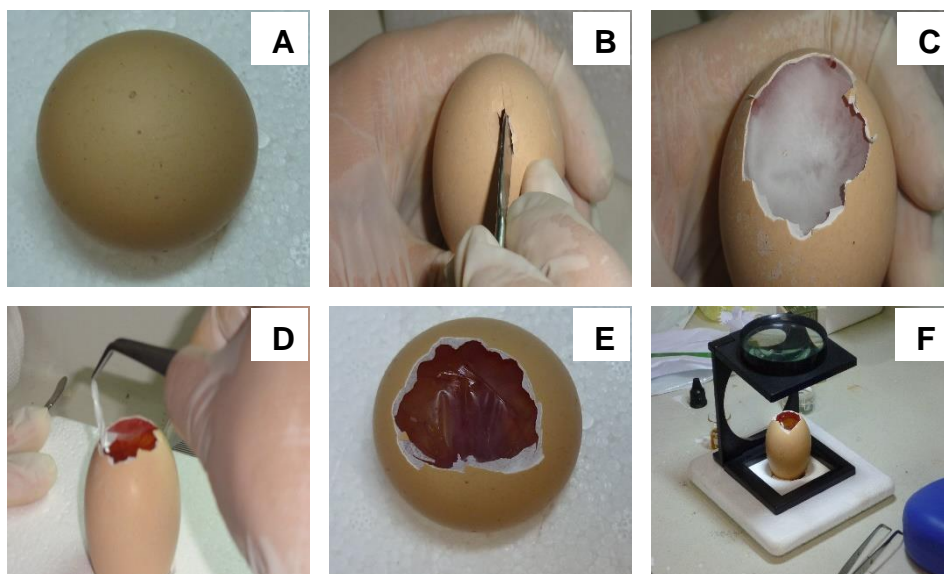


Figura 4: Etapas experimentais do teste HET-CAM: (A) Ovo no 10º dia de incubação após fecundação; (B) Incisão para retirada da casca externa acima do espaço aéreo do ovo; (C) Umidificação da película de proteção (membrana branca) da membrana corioalantóide com solução salina; (D) Remoção de membrana branca; (E) Exposição da Membrana Corioalantóide do ovo e aplicação de 200 µL das soluções controles ou das amostras e (F) Observação com lupa por 5 minutos após a exposição da substância teste. Fonte: própria.

O tempo (em segundos) de início de cada alteração presente na membrana corioalantóide durante os 5 minutos de observação foi registrado, para posterior aplicação na equação 7 (KALWEIT et al., 1990) e determinação do potencial de irritação.

$$[(301 - \text{hemorragia}) \times 5] / 300 + [(301 - \text{vasoconstrição}) \times 7] / 300 + [(301 - \text{coagulação}) \times 9] / 300$$

(Eq. 7)

Os ensaios foram repetidos 5 vezes para cada solução testada e o índice de irritação foi determinado conforme os escores de pontuação de irritação de 0.0 a 0.9 (não irritante), de 1.0 a 4.9 (levemente irritante), de 5.0 a 8.9 (irritante) e de 9.0 a 21.0 (muito irritante) (KALWEIT et al., 1990).

## 5.6 Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana (NQ\_BP, NQ\_MP, NQ\_AP) foi testada frente aos microrganismos patogênicos de origem alimentar: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7664, *Salmonella typhimurium* ATCC 1408 e *Escherichia coli* ATCC 8739.

A suspensão do inóculo foi preparada em solução salina (0,85%) e sua densidade comparada a escala 0,5 de McFarland para obtenção de concentração média de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL para as bactérias, e a densidade ótica (DO) foi padronizada entre 0,38 e 0,40, utilizando espectrofotômetro (Biospectro – espectrofotômetro SP-22) a 530 nm. As nanopartículas de quitosana foram redispersas em solução acética à 1%, com concentração final de 15 mg/mL e o pH foi corrigido para 5.8 com solução de NaOH 1 N.

As concentrações mínimas inibitórias (CIM) foram determinadas através do teste de microdiluição em microplacas estéreis de 96 poços, conforme adaptação da metodologia proposta por Alves et al. (2008). Em cada um dos micropoços foram inseridas inicialmente as nanopartículas de quitosana, cuja concentração variou de 75 a  $900 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , em seguida foi adicionado o meio caldo BHI e o inóculo de cada uma das bactérias, de forma que o volume final de cada poço fosse de 100  $\mu\text{L}$  (Tabela 3).

Tabela 3. Esquema de preenchimento da microplaca de 96 poços para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo teste de microdiluição.

Poço	Solução de nanopartículas ( $\mu\text{L}$ )	Caldo BHI ( $\mu\text{L}$ )	Inóculo ( $\mu\text{L}$ )	Volume final do poço ( $\mu\text{L}$ )	Conc. Final de Nanopartículas ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ )
A1	60	20	20	100	900
B1	50	30	20	100	750
C1	40	40	20	100	600
D1	30	50	20	100	450
E1	20	60	20	100	300
F1	15	65	20	100	225
G1	10	70	20	100	150
H1	5	75	20	100	75

Como prova de esterilidade do meio, foram adicionados 100 µL do caldo BHI em poço distinto. Como controle positivo foram acrescidos 60 µL de ácido acético à 1%, 20 µL do caldo BHI e 20 µL dos inóculos bacterianos (para comprovar crescimento dos microrganismos testes na presença do ácido acético) e como controle negativo, foram adicionados 80 µL do caldo BHI e 20 µL dos inóculos.

As placas contendo os tratamentos e microrganismos testes foram cultivadas a 37 °C por 24 h, com posterior acréscimo de 30 µL de resazurina, um reagente indicativo de viabilidade celular, retornando para estufa a 37 °C por mais uma hora, para então realizar a análise da mudança da cor e determinação da CIM, como a primeira concentração na qual não houve crescimento visível. O ensaio foi realizado em triplicata.

## **5.7 Elaboração do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**

O néctar foi formulado com polpa extraída do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), água mineral e açúcar refinado na proporção de 2:7:1, obedecendo o disposto na legislação vigente para sucos tropicais (BRASIL, 2003).

As frutas, os utensílios e os equipamentos utilizados no preparo do suco foram sanitizados por imersão em solução clorada à 0,02% (200 ppm) durante 15 minutos e lavados em água potável para retirada do cloro residual. Após o despulpamento dos maracujás, todos os ingredientes foram pesados e medidos, sendo homogeneizados por poucos segundos em liquidificador doméstico (Philips Walita Mod. RI2160) e peneirados, para a retirada das sementes.

Parte do néctar obtido foi submetido à pasteurização em banho-maria por 74 °C durante 15 min (ARAÚJO et al., 2016), compondo o grupo controle. No restante do néctar foram adicionadas nanopartículas preparadas com quitosana de baixa massa molar (NQ\_BP). As nanopartículas foram escolhidas por apresentarem melhores resultados nos testes de caracterização e atividade antimicrobiana. Para isso, foram pesados 870 mg e 1750 mg das nanopartículas de quitosana (NQ\_BP) e cada uma destas frações foi adicionada à 1 litro do néctar com homogeneização em liquidificador doméstico (Philips Walita Mod. RI2160), obtendo-se néctares de maracujá-amarelo com nanopartículas de quitosana em concentrações finais de 0,87 e 1,75 mg/ml

(CIM/2 e CIM). Todos os néctares produzidos foram acondicionados em recipientes de vidro com tampa e mantidos sob refrigeração a 4 °C até o momento das análises.

### **5.8 Determinação da vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) contendo nanopartículas de quitosana de baixa massa molar**

Os néctares, submetidos a diferentes tratamentos (Controle, CIM/2 e CIM), foram testados quanto à parâmetros físico-químicos (sólidos solúveis totais, pH, acidez total titulável em ácido cítrico e evolução da cor) e microbiológicos (contagem de bolores e leveduras, análise de *Salmonella* sp. e determinação de coliformes termotolerantes) durante um período de 28 dias de armazenamento sob refrigeração à 4 °C (PRATI et al. 2004), com intervalos de 7 dias entre as análises, realizadas em triplicata, conforme descrito abaixo.

#### **5.8.1 Sólidos solúveis totais**

Os sólidos solúveis totais, expressos em °Brix, foram aferidos através de leitura em refratômetro de bancada aus\_JENA (modelo 375320) à temperatura de 20 °C, após calibração em água destilada, conforme o método 932.12 (AOAC, 2012).

#### **5.8.2 pH**

Determinado através de leitura direta das amostras do néctar em pHmetro digital da marca MICRONAL B474 após calibração do aparelho com soluções tampão em pH 4.0 e 7.0, segundo o método 981.12 (AOAC, 2012).



### **5.8.3 Acidez total titulável em ácido cítrico**

Aproximadamente 2 g de amostra foram dissolvido em 50 mL de água destilada e acrescida do indicador fenolftaleína. A acidez total titulável, foi determinada por meio da titulação com solução de NaOH 0,1N, até atingir pH 8,2 utilizando um pHmetro digital (MICRONAL B474), conforme o método 920.149 (AOAC, 2012), com resultado expresso em percentual de ácido cítrico.

### **5.8.4 Evolução da cor**

A evolução da cor do néctar foi analisada conforme o Sistema CIELab (CIE, 2004), considerando os parâmetros L\* (luminosidade), a\* (região cromática verde-vermelho) e b\* (região cromática azul-amarelo), medidos pelo cálculo de cor do espectro de reflectância, através do colorímetro MINOLTA Co.

Para realização das leituras, as amostras foram dispostas em placas de Petri, preenchendo-se toda a superfície, e posicionadas sob o sensor do colorímetro (3,5 cm em diâmetro) para realização da medida (MARTÍN-DIANA et al., 2009).

### **5.8.5 Contagem de bolores e leveduras**

A contagem de bolores e leveduras foi realizada por plaqueamento em superfície inoculando 0,1 mL de diluições decimais das amostras ( $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) em ágar Sabouraud à 25 °C por 48-72 h. Após término do período de incubação, foi contado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) e os resultados expressos em Log de UFC/mL (SILVA et al., 2007; DE FARIAS SILVA et al., 2016).

#### **5.8.6 Análise de *Salmonella* sp.**

A amostra foi pré-enriquecida em caldo lactosado e incubado à 35 °C por 18 h. Em seguida, alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldos seletivos Tetrationato e selenito cistina, sendo re-incubados em banho-maria à 42 °C por 7 h. Posteriormente foi realizado o plaqueamento em ágar bismuto sulfito (BS), ágar hektoen entérico (HE) e ágar desoxicolato-lisina-xilose (XLD). As colônias com características típicas de *Salmonella* foram submetidas a testes bioquímicos confirmatórios (FDA, 2016).

#### **5.8.7 Determinação de coliformes termotolerantes**

A determinação foi feita através do Método do Número Mais Provável (NMP) conforme procedimentos descritos no Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2016). A amostra foi diluída em solução salina estéril à 0,85 %. Posteriormente, sofreu diluições seriadas à décima potência em tubos de ensaio contendo caldo lauril sulfato e tubo de Durham invertido que foram incubados à 35 °C por 24 h.

Na presença da formação de gases, a fase confirmativa foi realizada com tubos múltiplos incubados em caldo *E. coli* (EC) a 44,5 °C/24 h e o resultado final foi expresso em NMP/mL.

### **5.9 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância por ANOVA, com comparação das médias pelo teste de Tukey para determinação das diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização da quitosana

#### 6.1.1 Determinação da estrutura molecular

A espectroscopia em região de infravermelho é uma técnica rápida e simples, largamente utilizada na identificação de compostos, que se baseia na propriedade inerente às moléculas de sofrer variedade de movimentos vibratórios característicos em seus componentes após absorver luz infravermelha (OLIVEIRA et. al., 2014).

Na tabela 4 podem ser observadas as bandas obtidas nos espectros em região de infravermelho das quitosanas (Q\_BP, Q\_MP, Q\_AP), bem como os grupos funcionais aos quais são atribuídas.

Tabela 4. Atribuições das bandas do infravermelho de quitosanas de diferentes massas molares pela técnica de espectroscopia em região de infravermelho.

Atribuições	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
	Q_BP	Q_MP	Q_AP
Anéis piranosídicos	1083 a 1156	663 a 1076	1099 a 1152
(-CH <sub>2</sub> -OH) $\nu_{C-O}$	1378	1378	1385
(amida) $\nu_{C-N}$	1422	1428	1423
(amida II) $\delta_{NH}$	1599	1596	1599
(amida I) $\nu_{C=O}$	1660	1652	1595
$\nu_{C-H}$	2878	2878	2924
$\nu_{O-H}$ /(amina) $\delta_{NH}$	3283	3462	3448

Q\_BP: quitosana de baixa massa molar; Q\_MP: quitosana de média massa molar; Q\_AP: quitosana de alta massa molar; (-CH<sub>2</sub> -OH)  $\nu_{C-O}$ : estiramento do grupo alcoólico primário; (amida)  $\nu_{C-N}$ : estiramento do grupo acetilglucosamina; (amida II)  $\delta_{NH}$ : deformação angular do grupo amida; (amida I)  $\nu_{C=O}$ : deformação axial de grupo carbonila;  $\nu_{C-H}$ : estiramento de hidrocarbonetos;  $\nu_{O-H}$ : estiramento do grupo hidroxila; (amina)  $\delta_{NH}$ : deformação angular do grupo amina.

### 6.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica

Mesmo não se tratando de um método absoluto, a viscosimetria é um dos processos mais utilizados para a determinação da massa molar de polímeros. A viscosidade de uma solução polimérica diluída é consideravelmente maior que a do solvente puro devido a diferenças de tamanho das moléculas (STAMFORD-ARNAUD, 2012), configurando-se como uma função entre os tempos de escoamento do solvente puro e de um sistema diluído contendo o polímero, em condições determinadas de concentração e temperatura (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003).

Os resultados da viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média das diferentes quitosanas utilizadas na preparação das nanopartículas estão presentes na tabela 5.

Tabela 5. Viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média das quitosanas com diferentes massas molares.

Quitosana	Viscosidade intrínseca $[\eta]$ (mL/g <sup>-1</sup> )	Massa molar média (g/mol)
Q_BP	205	$2,3 \times 10^4$
Q_MP	584	$7,4 \times 10^4$
Q_AP	3.828	$5,6 \times 10^5$

Q\_BP: quitosana de baixa massa molar; Q\_MP: quitosana de média massa molar; Q\_AP: quitosana de alta massa molar;

### 6.1.3 Determinação do grau de desacetilação

Métodos como titulação condutimétrica, cromatografia e espectroscopias na região de infravermelho, de luz ultravioleta ou de ressonância magnética nuclear são amplamente utilizados para sua determinação (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003; BERGER et al., 2014; PIRAS et al, 2014; YOUNES et al., 2014).

Na ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) não ocorrem incertezas geradas pela escolha de linha de base, interferências da deformação da água adsorvida no polímero sobre as bandas das amidas I e II, ou ainda, sobreposição da banda NH<sub>2</sub> em altos graus de desacetilação, como o descrito em outros métodos espectroscópicos (CANELLA; GARCIA, 2001).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das diferentes quitosanas avaliadas foram semelhantes, sendo representados pela figura 5. As integrações dos picos de interesse obtidos através dos espectros estão descritas na tabela 6. O grau de desacetilação das quitosanas com diferentes massas molares foi calculado segundo a equação 5 proposta por Signini, Desbrières e Campana Filho (2000).

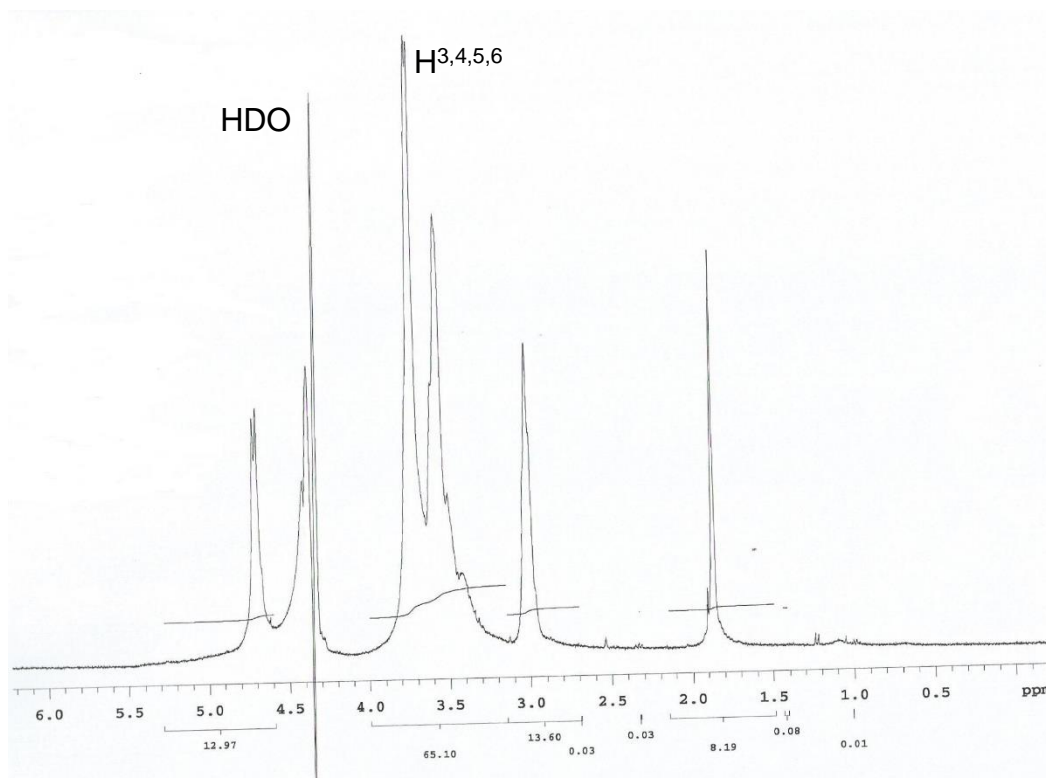


Figura 5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana de baixa massa molar.

Tabela 6. Áreas dos picos do espectro de RMN  $^1\text{H}$  e grau de desacetilação das quitosanas de diferentes massas molares

Hidrogênios	Área dos picos		
	$\text{H}^2$	$\text{H}^{\text{ac}}$	GD%
Q_BP	13,6	8,19	80
Q_MP	13,41	15,38	62
Q_AP	4,67	3,00	79

Q\_BP: quitosana de baixa massa molar; Q\_MP: quitosana de média massa molar; Q\_AP: quitosana de alta massa molar;  $\text{H}^2$ : grupo metila do anel glicosamino;  $\text{H}^{\text{ac}}$ : grupo metila do radical acetoamido; GD%: grau de desacetilação expresso em percentual.

## 6.2 Caracterização das nanopartículas de quitosana

O tamanho e a mobilidade eletroforética das nanopartículas variaram conforme o tipo de quitosana utilizada em seu preparo (NQ\_BP, NQ\_MP, NQ\_AP), como pode ser visto abaixo (Tabela 7).

Tabela 7. Tamanhos e Potencial zeta das nanopartículas preparadas com quitosanas de diferentes massas molares.

Nanopartículas	Tamanho $\pm$ D.P. (nm)	Potencial zeta $\pm$ D.P. (mV)
NQ_BP	301,8 $\pm$ 8,4	+60,1 $\pm$ 5,2
NQ_MP	517,0 $\pm$ 22,9	+52,8 $\pm$ 3,1
NQ_AP	653,9 $\pm$ 88,3	+55,5 $\pm$ 4,1

Resultado reportado em média  $\pm$  D.P., n=3. NQ\_BP: nanopartículas com quitosana de baixa massa molar; NQ\_MP: nanopartículas com quitosana de média massa molar; NQ\_AP: nanopartículas com quitosana de alta massa molar.

## 6.3 Teste de irritabilidade das nanopartículas de quitosana pelo método de membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET-CAM)

A membrana corioalantóide do ovo fecundado de galinha é um tecido ricamente vascularizado, com completa resposta inflamatória ao ser lesionada, assemelhando-se ao teste de irritação do tecido conjuntival de olhos de coelho (Teste Draizer). O HET-CAM tem substituído os testes de irritabilidade com animais pois é considerado um caso limite entre condição in-vivo e in-vitro, portanto, inexistindo conflito com as obrigações éticas e legais, além de ser um teste rápido, sensível e barato (KASKOOS, 2014).

Não foi observada nenhuma mudança na membrana corioalantóide do embrião durante os 5 minutos de observação, não havendo sinais de hemorragia, vasoconstrição ou coagulação após exposição às nanopartículas de quitosana testadas, conferindo às mesmas um escore de irritação igual a zero (potencial não irritante). Já o lauril sulfato de sódio, controle positivo, apresentou escore de irritação de 17,7  $\pm$  0,4 (potencial muito irritante).

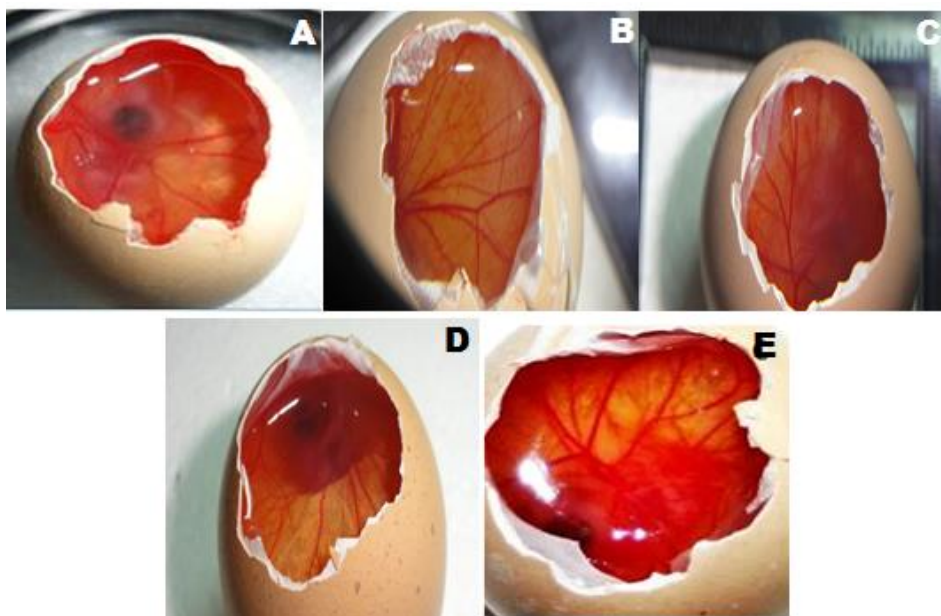


Figura 6. Resultado do teste HET-CAM após 5 minutos de exposição ao soro fisiológico (A), a nanopartículas preparadas com quitosana de baixa massa molar (B), de média massa molar (C), de alta massa molar (D) e ao lauril sulfato de sódio (E).

#### 6.4 Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana

Os avanços da medicina moderna não foram suficientes para sanar um dos maiores desafios dos cuidados à saúde: a resistência microbiana aos antibióticos. Neste contexto, as nanopartículas de quitosana representam um novo paradigma para o tratamento das doenças infecciosas, por apresentar ação antimicrobiana comprovada contra bactérias e fungos (LANDRISCINA; ROSEM; FRIEDMAN, 2015).

As concentrações inibitórias mínimas das nanopartículas de quitosana testadas, necessárias para inibir o crescimento de bactérias alimentares, estão dispostas a seguir (Tabela 8). Pode-se observar que as nanopartículas de quitosana, independente de sua massa molar, inibiram todas as bactérias patogênicas testadas. Contudo, as nanopartículas de quitosana de baixa massa molar apresentaram menor concentração inibitória mínima para todos os patógenos testados, sendo então escolhidas para os experimentos na matriz alimentar.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas de quitosana frente a patógenos alimentares.

Nanopartículas	CIM (mg/mL)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
NQ_BP	1,75 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	1,75 ± 0,4 <sup>Ab</sup>	1,50 ± 0,0 <sup>Ab</sup>	2,00 ± 0,4 <sup>Ac</sup>
NQ_MP	2,50 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	3,00 ± 0,0 <sup>Aa</sup>	2,50 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	3,00 ± 0,0 <sup>Ab</sup>
NQ_AP	2,25 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	3,00 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	3,00 ± 0,0 <sup>Ba</sup>	4,00 ± 0,0 <sup>Aa</sup>

<sup>A-C</sup> Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. <sup>a-c</sup> Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. NQ\_BP: nanopartículas com quitosana de baixa massa molar; NQ\_MP: nanopartículas com quitosana de média massa molar; NQ\_AP: nanopartículas com quitosana de alta massa molar; CIM: concentração inibitória mínima.

### 6.5 Determinação da vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) contendo nanopartículas de quitosana de baixa massa molar conforme parâmetros físico-químicos e microbiológicos

O uso de parâmetros de controle do produto final é uma necessidade latente nas mais diversas escalas industriais. Os sucos e néctares de fruta devem apresentar as características físico-químicas e organolépticas inerentes a fruta de origem, observando-se os limites dos padrões de identidade e qualidade, bem como padrões microbiológicos, estabelecidos por órgãos regulatórios competentes, como Ministério da Agricultura e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes parâmetros tornam-se imprescindíveis para garantir que o produto final fornecido aos consumidores tenha saído da indústria em condições higiênico-sanitárias adequadas, sem sofrer qualquer adulteração, ou uso de matéria prima inadequada (BRASIL, 2003; SILVA et al., 2016).

No presente estudo, o néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) contendo nanopartículas de quitosana (NQ\_BP), foi avaliado durante 28 dias sendo armazenado sob refrigeração (4 °C), quanto aos teores de sólidos solúveis totais, acidez titulável e pH, com resultados expostos na tabela 9.



Tabela 9. Valores de sólidos solúveis, acidez titulável e pH de néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) pasteurizado (controle) ou adicionado com nanopartículas de quitosana de baixa massa molar com a metade ou com a concentração inibitória mínima durante armazenado sob refrigeração (4 °C) por 28 dias.

Tratamento	Dias de armazenamento				
	0	7	14	21	28
Sólidos solúveis (°Brix)					
Controle	12,00 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	11,50 ± 0,00 <sup>Db</sup>	11,80 ± 0,00 <sup>Ba</sup>	12,00 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	11,60 ± 0,00 <sup>Ca</sup>
CIM/2	11,00 ± 0,00 <sup>Ab</sup>	11,00 ± 0,00 <sup>Ac</sup>	11,00 ± 0,00 <sup>Ab</sup>	10,700 ± 0,12 <sup>Bc</sup>	10,00 ± 0,00 <sup>Cc</sup>
CIM	11,00 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	12,00 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	11,80 ± 0,00 <sup>Ba</sup>	11,00 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	11,00 ± 0,00 <sup>Cb</sup>
pH					
Controle	3,18 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	3,36 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,15 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	3,00 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	3,18 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
CIM/2	3,28 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	3,46 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	3,24 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	3,13 ± 0,01 <sup>Da</sup>	3,26 ± 0,01 <sup>BCa</sup>
CIM	3,13 ± 0,01 <sup>Bc</sup>	3,27 ± 0,02 <sup>Ac</sup>	3,08 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	2,99 ± 0,01 <sup>Db</sup>	3,01 ± 0,01 <sup>Dc</sup>
Acidez titulável em ácido cítrico (g/100g)					
Controle	0,51 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,49 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,49 ± 0,00 <sup>Ab</sup>	0,50 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,49 ± 0,00 <sup>Ab</sup>
CIM/2	0,46 ± 0,02 <sup>Ac</sup>	0,45 ± 0,00 <sup>ABc</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>Bc</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>Bc</sup>	0,45 ± 0,02 <sup>ABc</sup>
CIM	0,59 ± 0,00 <sup>ABa</sup>	0,56 ± 0,01 <sup>BCa</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>BCa</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>Aa</sup>

<sup>A-D</sup> Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. <sup>a-c</sup> Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. Controle = néctar pasteurizado; CIM/2 = néctar adicionado de nanopartículas de quitosana de baixa massa molar na concentração de 0,85 mg/mL; CIM = néctar adicionado de nanopartículas de quitosana de baixa massa molar na concentração de 1,75 mg/mL

A pigmentação, expressa através dos parâmetros de cor, é um dos meios pelo qual o fornecedor avalia condições de maturidade e qualidade dos frutos e seus derivados (VIANNA-SILVA et al., 2008). A evolução da cor dos néctares testados pode ser visualizada na tabela abaixo (Tabela 10).

Tabela 10. Evolução da cor do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) pasteurizado (controle) ou adicionado com nanopartículas de quitosana de baixa massa molar com a metade ou com a concentração inibitória mínima durante armazenado sob refrigeração (4 °C) por 28 dias.

Tratamento	Dias de armazenamento				
	0	7	14	21	28
	L*				
Controle	71,02 (± 1,89) <sup>Aa</sup>	66,07 (± 0,26) <sup>Ba</sup>	69,98 (± 0,77) <sup>Aa</sup>	64,13 (± 0,76) <sup>Bb</sup>	52,11 (± 0,21) <sup>Cb</sup>
CIM/2	66,49 (± 1,79) <sup>Ab</sup>	66,36 (± 0,94) <sup>Aa</sup>	63,35 (± 0,83) <sup>Bc</sup>	64,92 (± 0,24) <sup>ABab</sup>	55,18 (± 1,01) <sup>Ca</sup>
CIM	67,67 (± 4,10) <sup>Ab</sup>	63,56 (± 1,36) <sup>Aa</sup>	66,95 (± 0,45) <sup>Ab</sup>	67,30 (± 0,24) <sup>Aa</sup>	54,07 (± 0,43) <sup>Bab</sup>
	a*				
Controle	-1,96 (± 0,30) <sup>Cb</sup>	-4,78 (± 0,01) <sup>Ab</sup>	-4,53 (± 0,08) <sup>Ab</sup>	-3,57 (± 0,09) <sup>Bb</sup>	-3,19 (± 0,03) <sup>Bb</sup>
CIM/2	-2,32 (± 0,03) <sup>Db</sup>	-5,19 (± 0,08) <sup>Ab</sup>	-4,20 (± 0,09) <sup>Bb</sup>	-3,80 (± 0,03) <sup>Cb</sup>	-3,64 (± 0,20) <sup>Cb</sup>
CIM	-4,46 (± 0,82) <sup>Ba</sup>	-6,60 (± 0,18) <sup>Aa</sup>	-5,98 (± 0,02) <sup>Aa</sup>	-5,80 (± 0,08) <sup>Aa</sup>	-4,46 (± 0,09) <sup>Ba</sup>
	b*				
Controle	21,73 (± 5,67) <sup>Ab</sup>	22,18 (± 0,86) <sup>Aa</sup>	17,53 (± 0,29) <sup>Aa</sup>	14,22 (± 0,37) <sup>ABb</sup>	9,27 (± 0,08) <sup>Bb</sup>
CIM/2	34,59 (± 4,04) <sup>Aa</sup>	18,40 (± 0,33) <sup>Ba</sup>	17,72 (± 0,34) <sup>Ba</sup>	16,19 (± 0,11) <sup>Bab</sup>	18,84 (± 0,46) <sup>Ba</sup>
CIM	36,99 (± 4,08) <sup>Aa</sup>	20,35 (± 0,43) <sup>Ba</sup>	19,05 (± 0,06) <sup>BCa</sup>	20,06 (± 0,47) <sup>Ba</sup>	15,08 (± 0,23) <sup>Ca</sup>

<sup>A-D</sup> Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. <sup>a-c</sup> Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. L\* = luminosidade; a\* = região verde-vermelha; b\* = região azul-amarela; Controle = néctar pasteurizado; CIM/2 = néctar adicionado de nanopartículas de quitosana de baixa massa molar na concentração de 0,85 mg/mL; CIM = néctar adicionado de nanopartículas de quitosana de baixa massa molar na concentração de 1,75 mg/mL.

Os frutos, independentemente de sua origem, apresentam uma microbiota variável em sua região externa. Apesar dos frutos e seus derivados apresentarem elevada acidez, que restringe o crescimento microbiano, fatores como ruptura na integridade dos frutos, inadequações na limpeza ou condições higiênico-sanitárias de manipuladores, podem ocasionar a contaminação dos sucos.

Durante o período de armazenamento, os néctares de maracujá processados foram avaliados quanto a presença de *Salmonella* sp., determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes e contagem de bolores e leveduras, conforme o apresentado na tabela 11.

Tabela 11. Análises microbiológicas do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) pasteurizado (controle) ou adicionado com nanopartículas de quitosana de baixa massa molar com a metade (CIM/2) ou com a concentração inibitória mínima (CIM) armazenado sob refrigeração (4 °C) por 28 dias.

Tratamento	Dias de armazenamento				
	0	7	14	21	28
Coliformes à 45 °C (NMP/mL)					
Controle	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
CIM/2	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
CIM	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Análise de Salmonella sp.					
Controle	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
CIM/2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
CIM	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Contagem de leveduras (UFC/mL)					
Controle	<10 <sup>2</sup> (Est.)	1,1 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>6</sup>	4,0 x 10 <sup>6</sup>
CIM/2	6,5 x 10 <sup>2</sup> (Est.)	1,1 x 10 <sup>5</sup>	Incontável	2,9 x 10 <sup>6</sup>	1,7 x 10 <sup>7</sup>
CIM	3,0 x 10 <sup>2</sup> (Est.)	6,9 x 10 <sup>3</sup>	Incontável	1,0 x 10 <sup>6</sup>	4,2 x 10 <sup>6</sup>

Valor estimado (Est.) quando número de UFC é menor que 25 para as diferentes diluições testadas. Controle = néctar pasteurizado; CIM/2 = néctar adicionado de nanopartículas de quitosana de baixa massa molar na concentração de 0,85 mg/mL; CIM = néctar adicionado de nanopartículas de quitosana de baixa massa molar na concentração de 1,75 mg/mL

Destacamos o fato de que não foi evidenciado crescimento de bolores em nenhuma das amostras.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Caracterização da quitosana

#### 7.1.1 Caracterização da estrutura molecular

Os espectros dos grupos funcionais obtidos por infravermelho (Q\_BP, Q\_MP, Q\_AP) apresentaram picos semelhantes entre as quitosanas estudadas. Os picos mais largos, situados entre 3283 e 3462  $\text{cm}^{-1}$ , correspondem ao estiramento dos grupamentos hidroxila (OH) sobrepostos à banda de deformação axial NH do grupo amina, estando próximos aos valores descritos por Battisti e Campana-Filho (2008) que avaliaram quitina e quitosana extraídas de exoesqueletos de camarão *Macrobrachium rosenbergii*.

A deformação axial do grupo carbonila C=O (amida I) e estiramento C-N, pertencente ao N-acetilglucosamina, foram caracterizados por picos em número de onda que convergem com o descrito na literatura, situando-se entre 1590 a 1670 e 1400 a 1430  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (SOARES; DOCKAL, 2003; ABREU et al., 2013; XIA; WU; CHEN, 2013; SANTOS; SHAH et al., 2016). As bandas relativas a estes picos são usualmente aplicadas em equações determinantes do grau de desacetilação da quitosana (BERGER et al., 2014; PIRAS et al., 2014).

Hosseini et al. (2013) especificam os picos referentes ao estiramento de hidrocarbonetos alifáticos (C-H) e a vibração dos anéis piranosídicos em número de onda de 2920  $\text{cm}^{-1}$  e 591  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Já Santos, Soares e Dockal (2003) descrevem um número de onda maior para as bandas de estruturas polissacarídicas da quitosana (890 a 1156  $\text{cm}^{-1}$ ) e valores de 1580 a 1594  $\text{cm}^{-1}$  para a deformação angular N-H, correspondente a amina II. Ambas as descrições se aproximam dos espectros obtidos para as quitosanas estudadas.

### **7.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica**

A massa molar da quitosana originada da quitina de crustáceos é dependente das condições impostas em seu processamento, como binômios tipo/concentração da solução alcalina de hidrólise e tempo/temperatura de reação (YOUNES et al., 2014). A massa molar tem efeitos adversos sobre as atividades biológicas da quitosana, como ação antimicrobiana (CRUZ-ROMERO et al., 2013; CHANG et al., 2015), ação antioxidante, poder de redução e ação antitumoral (YOUNES et al., 2014).

Conforme especificações do fabricante, as quitosanas adquiridas são caracterizadas como de massa molar baixa, média e alta, estando na faixa entre  $5 \times 10^4$  a  $3,7 \times 10^5$  g/mol. Esses valores aproximam-se da determinação obtida pelo presente estudo, com massas molares variando entre  $2,3 \times 10^4$  a  $5,6 \times 10^5$  g/mol (Tabela 5), estando dentro da faixa de  $10^4$  a  $10^6$  g/mol, geralmente atribuída a este polissacarídeo (ABREU et al., 2013).

Chang et al. (2015) encontraram quitosanas de diferentes massas molares a partir da hidrólise enzimática de quitosana de crustáceo, denominando-as como de alta ( $7,2 \times 10^4$  a  $3 \times 10^5$  g/mol) ou como baixa ( $3,3 \times 10^3$  a  $2,9 \times 10^4$  g/mol) massa molar, não fazendo referência a valores medianos. Já Canella e Garcia (2001) obtiveram quitosanas de massas molares mais elevadas ( $6,5 \times 10^5$  a  $7,4 \times 10^5$  g/mol) através de etapa única de desacetilação da quitina. Battisti e Campana-Filho (2008) determinaram como de média massa molar as quitosanas de  $6 \times 10^4$  a  $2,4 \times 10^5$  g/mol, obtidas por hidrólise alcalina da quitosana de caranguejo-uçá. Com base nestas descrições, as especificações do fabricante são consideradas adequadas.

### **7.1.3 Determinação do grau de desacetilação**

Evidências apontam uma forte influência do grau de desacetilação da quitosana sobre propriedades como dimensões físicas, potencial zeta, índice de polidespersão e rendimento de produção das nanopartículas de quitosana (KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015). Assim como referido pelo fabricante (GD de 75% a 85%), as quitosanas de baixa e alta massa molar (Q\_BP e Q\_AP) apresentaram grau de desacetilação dentro do esperado, com valores respectivos de 80% e 79%. Entretanto, a quitosana

de média massa molecular (Q\_MP) apresentou grau de desacetilação abaixo de 70% (Tabela 6).

Signini, Desbrières e Campana-Filho (2000), analisando cloridratos de quitosana degradados por ultra-sonificação, obtiveram valores de GD por RMN  $^1\text{H}$  variando entre 77% a 78%. A fórmula proposta por eles considera a relação das áreas correspondentes aos núcleos dos grupos metila presentes no radical acetoamido ( $\text{H}^{\text{ac}}$ ) e na posição 2 do anel glicosamino ( $\text{H}^2$ ), pois estão livres de influência do pico da água deuterada (HDO) (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003).

Tajik et al. (2008), utilizando diferentes processamentos da casca de camarão *Artemia urmiana* para obtenção de quitosana, encontrou graus de desacetilação de 67%. Segundo os autores, graus mais baixos de desacetilação expressam uma redução na quantidade de grupos carregados positivamente disponíveis para flocular um material carregado negativamente, afetando a solubilidade, reatividade química e biodegradabilidade da quitosana.

Utilizando o método de RMN dos prótons de carbono, Younes et al. (2014) obtiveram um GD de 80% a 81% para quitosanas média e baixa massa molar, respectivamente. Segundo eles, quitosanas com grau de desacetilação entre 70% a 90% e baixo conteúdo de proteína residual, são consideradas como bom produto final para as mais diversas aplicações.

## 7.2 Caracterização das nanopartículas de quitosana

A relação de quitosana:TPP tem sido descrita como um dos principais fatores determinantes do tamanho das nanopartículas obtidas por gelificação iônica (SHAH et al., 2016). As nanopartículas produzidas neste ensaio apresentaram diferentes tamanhos (Tabela 7) uma vez que foram produzidas a partir de quitosanas de diferentes massas molares, o que justifica a formação de nanopartículas com tamanhos variados.

Alguns estudos têm demonstrado relação direta entre a massa molar da quitosana e o tamanho das nanopartículas quando mantidas as condições de reticulação. Madureira et al. (2015) também produziram nanopartículas de quitosana por reticulação com TPP, porém numa relação de 7:1. Eles obtiveram partículas com

tamanhos de  $598,3 \pm 27,1$  nm para quitosana de  $1,1 \times 10^5$  g/mol, e  $743,6 \pm 39,5$  nm para a quitosana de  $6,2 \times 10^5$  g/mol.

Yang et al. (2010) obtiveram nanopartículas de quitosana com tamanhos variando entre 235,0 a 597,6 nm quando utilizadas quitosanas de massas molares diferentes ( $3,6 \times 10^3$  a  $2,4 \times 10^5$  g/mol, respectivamente) mantendo-se a relação de quitosana: TPP em 5:1.

Assim como descrito acima, os tamanhos das nanopartículas obtidas nesse estudo variaram entre  $301,8 \pm 8,4$  nm à  $653,9 \pm 88,3$  nm (Tabela 7), com menores tamanhos obtidos a partir da quitosana de menor massa molar (Q\_BP). Esse fato pode estar relacionado a uma menor viscosidade da solução contendo quitosana de menor massa e consequente melhor solubilidade no meio, promovendo um processo de gelificação mais eficiente e homogêneo (YANG et al. 2010; OMAR ZAKI et al. 2015).

O potencial zeta das diferentes nanopartículas produzidas variou entre  $+52,8 \pm 3,1$  mV à  $+60,1 \pm 5,2$  mV. Estes dados sugerem estabilidade física das nanopartículas por repulsão eletrostática, pois apresentam um potencial zeta superior a  $\pm 30$  mV, o mínimo requerido (RAMEZANI et al., 2015). A carga positiva apresentada reflete os grupos catiônicos  $\text{NH}_3^+$  livres da quitosana (MADUREIRA et al., 2015).

Omar Zaki et al. (2015) encontraram potencial zeta de  $+62,1 \pm 5,1$  à  $+74,4 \pm 4,6$  mV para nanopartículas de quitosana de diferentes tamanhos ( $164,0 \pm 6,3$  a  $684,8 \pm 4,5$  nm), com ambos os parâmetros crescendo proporcionalmente às concentrações da quitosana utilizada. Já Chantarasataporn et al. (2014) obtiveram nanopartículas com potencial zeta de  $+20$  à  $+50$  mV (pH 2 à pH 4), utilizando duas apresentações de quitosana (oligoderivado e fios) com respectivas massas molares de  $1 \times 10^4$  g/mol e  $1,37 \times 10^5$  g/mol.

Segundo Rampino et al. (2013), o potencial zeta de nanopartículas formadas por quitosanas de massas molares diferentes, mesmo com condições de graus de desacetilação e relação de quitosana:TPP mantidos, pode variar devido à diferente acessibilidade aos grupos catiônicos.

### **7.3 Teste de irritabilidade das nanopartículas de quitosana pelo método de membrana corioalantóide do ovo de galinha (HET-CAN)**

As nanopartículas de quitosana testadas (NQ\_BP, NQ\_MP e NQ\_AP) não apresentaram potencial irritatório pelo método utilizado. Kaskoos (2014) c relatou resultados similares ao avaliar nanopartículas de quitosana e sulfato de dextrana como carreadoras de moxifloxacina em soluções óticas. Com tamanho médio de  $279,18 \pm 15,63$  nm e potencial zeta de  $+31,23 \pm 1,32$  mV, estas nanopartículas de quitosana apresentaram escore de irritação zero após o período de observação de 5 minutos.

Rampino et al. (2013) observaram os efeitos de exposição da membrana corioalantóide do ovo de galinha à nanopartículas de quitosana com tamanhos entre  $151 \pm 10$  a  $200 \pm 15,63$  nm e potencial zeta entre  $24 \pm 4$  e  $28 \pm 1,32$  mV. Nesse estudo foi possível constatar a vitalidade de todos os embriões, não observando mudanças significativas nas membranas corioalantóides mesmo após 24 h em contato com as nanopartículas de quitosana.

Outros estudos endossam nossos achados, pois relatam um baixo potencial de irritação e citotoxicidade de nanopartículas de quitosana formuladas por gelificação iônica utilizando TPP como reticulante (STAMFORD-ARNAUD, 2012; PIRAS et al., 2014; JAMIL et al., 2016).

### **7.4 Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana**

De maneira geral, os valores de CIM variaram entre 1,5 a 4,0 mg/mL (Tabela 8) para as diferentes nanopartículas de quitosana testadas. A NQ\_BP foi mais eficiente na inibição do crescimento das bactérias testadas, com valores de concentração inibitória mínima estatisticamente inferiores às demais nanopartículas (NQ\_MP e NQ\_AP), exceto para *E. coli*. Este fato resultou na escolha da NQ\_BP e do valor de seu CIM médio (1,75 mg/mL) para aplicação das nanopartículas de quitosana nos ensaios de vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*).

Resultados semelhantes foram descritos por Madureira et al. (2015) que produziram nanopartículas com diferentes quitosanas para encapsulação de



compostos fenólicos e avaliaram sua atividade antimicrobiana frente às bactérias *B. cereus*, *E. coli* O157, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. innocua* e *Y. enterocolitica*. Eles obtiveram valores de CIM variando entre 1,0 a 3,5 mg/mL, sendo as menores médias (1,0 a 1,5 mg/mL) atribuídas à nanopartículas de quitosana de baixa massa molar, livres de polifenóis.

Jamil et al. (2016) avaliaram os efeitos de óleo de cardamomo e de nanopartículas de quitosana preparadas por gelificação iônica sobre o crescimento de cepas multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus*. Eles observaram um controle no crescimento dos microrganismos por 48 h na presença das nanopartículas de quitosana com tamanho entre 50 a 100 nm e potencial zeta de +50 mV, o que não aconteceu com o uso isolado do óleo. Entretanto quando este foi incorporado às nanopartículas de quitosana, o efeito antimicrobiano se estendeu até 7 dias.

A ação de nanopartículas de quitosana sobre *E. coli* e *S. aureus* também foi avaliada por Ramezani et al. (2015), que ao incorporarem 10% de nanopartículas de quitosana (108,6 nm e +49,5 mV) em filme plastificado com glicerol observaram inibição do crescimento destes microrganismos. Piras et al. (2014) relatam uma redução significativa no número de células de *S. epidermidis* quando incubadas por 5 dias na presença de 75 µg/mL de nanopartículas de quitosana obtidas por gelificação iônica com TPP, medindo  $140 \pm 20$  nm e com potencial zeta de  $37,2 \pm 1,1$  mV.

Estudos apresentam resultados controversos acerca da sensibilidade de bactérias Gram positivas e Gram negativas à quitosana e suas nanopartículas. ANTONIOU et al. (2015) observaram que a adição de 10% de nanopartículas de quitosana à filmes comestíveis resultava numa maior inibição de crescimento do *S. aureus* (Gram positiva) comparado à *E. coli* (Gram negativa). Já Hosseini et al. (2016) descrevem uma maior sensibilidade à nanopartículas de quitosana e óleo essencial de orégano por bactérias Gram negativas (*S. enteritidis* e *E. coli*) comparada à Gram positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*). Em nossas análises, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de CIM para os microrganismos Gram positivos e Gram negativos testados, exceto para a *L. monocytogenes* quando utilizada a nanopartícula preparada com quitosana de alta massa molar (NQ\_AP).

Segundo Cruz-Romero et al., 2013; Landriscina; Rosem; Friedman, 2015 e Madureira et al., 2015, os achados contraditórios a respeito da sensibilidade de bactérias a quitosana decorrem das distintas formas de interação ocorridas. Os grupos de amina das quitosanas se ligam à diferentes compostos presentes nas paredes

celulares das bactérias, como o ácido lipoteicoico (Gram +), lipopolissacarídeos e proteínas de superfície (Gram -) ou competem com os cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), causando a desestabilização estrutural e perda da função de barreira da membrana. Dependendo da massa molar, as quitosanas podem ainda formar uma membrana polimérica ao redor das bactérias, impedindo o acesso a nutrientes, ou interagir com DNA, inibindo a síntese de RNAm e proteínas.

### **7.5 Determinação da vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) contendo nanopartículas de quitosana de baixa massa molar conforme parâmetros físico-químicos e microbiológicos**

Foi observada uma redução significativa nos sólidos solúveis totais quando comparados os tempos iniciais e finais de armazenamento, exceto para o tratamento CIM. As médias de sólidos solúveis totais se mantiveram acima do mínimo de 11 °Brix, estipulado para néctar de maracujá estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2003), exceto para as amostras CIM/2 nos tempos 21 e 28 dias, com valores de 10,7 °Brix e 10,0 °Brix, respectivamente (Tabela 9).

Silva et al. (2016) avaliaram, durante três meses consecutivos, o padrão físico-químico e microbiológico de polpa de frutas produzidas por uma empresa de médio porte. Eles observaram inadequação do °Brix nas amostras de polpa de maracujá processadas no 1° e no 3° mês, com valores médios de 8,9 e 7,2 °Brix, respectivamente. Quando avaliado o perfil microbiológico, nos dois meses supracitados a contagem de bolores e leveduras estavam acima do padrão preconizado para polpas, sugerindo uma relação entre o crescimento microbiano e a redução dos sólidos solúveis. Este achado explica a redução dos sólidos solúveis totais dos néctares de maracujá ao final do armazenamento, os quais apresentavam elevada contagem de leveduras a partir do 14° dia.

Além disso, o estudo realizado por Domingues et al. (2012) demonstrou uma discreta elevação (3 a 5%) nos valores de °Brix quando adicionados de 0,3 a 1 mg/mL de quitosana do suco de maracujá. Segundo estes autores, este resultado é indicativo de que as características nutricionais do suco in natura podem ser preservadas pela adição de quitosana, o que poderia justificar, no presente estudo, a elevação nos

tempos iniciais (7 e 14 dias) dos valores de °Brix do néctar de maracujá-amarelo adicionado de nanopartículas de quitosana em maior concentração (CIM).

Como esperado, o pH e a acidez titulável dos néctares de maracujá-amarelo apresentaram relação inversa durante o período de armazenamento, com valores variando entre  $2,99 \pm 0,01$  a  $3,46 \pm 0,03$  e  $0,43 \pm 0,01$  a  $0,60 \pm 0,01$  g/100g, respectivamente (Tabela 9). A acidez titulável manteve-se adequada aos padrões de qualidade do néctar de maracujá, estando sempre acima de 0,25 g/100g (BRASIL, 2003). Foi observada uma elevação inicial do pH para todos os tratamentos (Controle, CIM/2 e CIM) e diminuição da acidez titulável para os tratamentos CIM/2 e CIM no 7º dia de armazenamento.

Candido Filho e Bergamasco (2015) analisaram a adição de  $\beta$ -ciclodextrina nos parâmetros físico-químicos do néctar de maracujá, cujos valores de pH e acidez titulável variaram entre  $3,13 \pm 0,03$  a  $3,31 \pm 0,04$  e  $6,99 \pm 1,64$  a  $4,18 \pm 0,11$  g/100g, respectivamente. Eles observaram aumento dos valores de pH e redução dos valores de acidez titulável durante 30 dias de armazenamento, atribuindo esta alteração à oxidação do ácido ascórbico e do ácido cítrico. Além disso, Martín-Diana et al. (2009) observaram um efeito linear da concentração de quitosana sobre a redução dos teores de ácido ascórbico de suco de laranja ao longo de 10 dias de estocagem. Segundo eles, esse efeito é resultante da propriedade de sequestro ácido da quitosana.

Após 14º dia de armazenamento ocorreu uma tendência de redução dos valores de pH para todos os tratamentos (Controle, CIM/2 e CIM) e aumento da acidez titulável para os tratamentos CIM/2 e CIM, até que aos 28 dias de armazenamento os valores coincidem com os do tempo 0.

Cabe mencionar que neste período foi observada uma importante elevação nas contagens de leveduras e que, apesar de serem comumente associadas à fermentação alcoólica, as leveduras são capazes de metabolizar açúcares produzindo ácidos orgânicos. Segundo Becker et al. (2015), leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Rhizopus oryzae* (naturalmente encontrada em frutas) são capazes de gerar os ácidos glicólico, pirúvico e láctico como produtos metabólicos, o que pode alterar o pH do meio.

Prati et al. (2004) descrevem parâmetros de cor aproximados aos nossos, com valores de  $a^*$  entre 1,69 a 1,98, valores de  $b^*$  entre 37,02 a 38,94, e valores de  $L^*$  entre 84,12 a 85,43, para garapa processada com suco de maracujá. Os valores de  $L^*$  apresentam discrepâncias aos valores obtidos no presente estudo ( $52,11 \pm 0,21$  a

71,02  $\pm$  1,89) em decorrência do processo de clarificação ao qual foi submetida a garapa.

Em todos os tratamentos testados (Controle, CIM/2 e CIM), houve uma redução significativa da luminosidade ( $L^*$ ) e da coloração amarela ( $b^*$ ) quando comparados os tempos 0 e 28 dias (Figuras 7 e 9). Segundo Oliveira et al. (2014), estas alterações expressam o escurecimento devido a decantação de partículas instáveis e da ruptura dos pigmentos.

As variações de cor verde e amarela ( $a^*$   $b^*$ ) estão relacionadas ao grau de maturidade dos frutos e exprimem o tom amarelo característico do maracujá, atribuídos aos carotenoides presentes em sua polpa (VIANA-SILVA et al., 2008).

Coordenadas negativas de  $a^*$  (Figura 8) expressam a tonalidade verde e são significativamente mais elevadas nos néctares submetidos ao tratamento CIM, conferindo a eles uma aparência mais clara. O mesmo foi observado por Martín-Diana et al. (2009), que constatou relação direta entre concentração de quitosana e elevação dos valores de  $a^*$  em suco de laranja, associado este efeito à ação da quitosana sobre enzimas de escurecimento.

É importante destacar que os néctares contendo nanopartículas de quitosana (CIM/2 e CIM) apresentarem valores de  $L^*$  e  $b^*$  significativamente maiores do que o pasteurizado (Controle) ao final de 28 dias de armazenamento (Figuras 7 e 9). Isso se deve a ação clarificante da quitosana, que mantém a luminosidade e a coloração amarelada do suco de maracujá, retardando o escurecimento (DOMINGUES et al., 2012; TASTAN; BAYSAL, 2015).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos, que determina ausência de *Salmonella* sp. e o máximo de 10 e 10<sup>2</sup> NMP/mL de coliformes à 45 °C, para suco pasteurizado e para suco in natura, respectivamente. Os sucos avaliados se mantiveram dentro desses parâmetros até o tempo final de armazenamento (28 dias).

A legislação supracitada não estabelece padrão de contagem de bolores e leveduras para sucos de fruta. Entretanto, quando estes microrganismos estão presentes em elevadas concentrações, além de deteriorar o alimento diminuindo a aceitação do consumidor, podem estar associados a riscos à saúde pela possível produção de micotoxinas por bolores (SILVA et al. 2016). Por esse motivo, incluímos

esta análise no presente estudo, considerando o limite máximo de  $10^4$ , estabelecido para outros produtos derivados de frutas (BRASIL, 2001).

Os néctares pasteurizados mantiveram-se dentro do limite tolerável de contagem de bolores e leveduras até o 14º dia de estocagem, enquanto nos néctares contendo nanopartículas de quitosana mantiveram contagens satisfatórias por período mais curto, até o 7º dia para concentração de 1,75 mg/mL (CIM) e tempo inicial para concentração de 0,85 mg/mL (CIM/2).

Assim como em nossa pesquisa, Prati et al. (2004) tiveram o tempo de vida de prateleira de caldo de cana com maracujá restrito a 15 dias em decorrência do crescimento de bolores e leveduras. Mesmo com a pasteurização do produto, as contagens chegaram a  $3,3 \times 10^6$  no 30º dia de armazenamento.

Apesar das nanopartículas de quitosana apresentarem um menor controle sobre o crescimento de bolores e leveduras do que processo de pasteurização, sua adição ao néctar de maracujá apresentou resultados satisfatórios ao considerarmos que a vida útil de sucos *in natura* é reduzida, em média dois dias quando refrigerados (PAULA et al. 2011). As nanopartículas de quitosana adicionadas na concentração de 1,75 mg/mL (CIM) prolongaram a vida de prateleira do néctar de maracujá-amarelo até 7 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C), com melhor manutenção das características físico-químicas quando comparado ao néctar pasteurizado.

## 8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que as nanopartículas obtidas a partir de quitosanas de baixa, média e alta massa molar, apresentaram características distintas. Há uma relação direta entre a massa molar da quitosana e o tamanho da nanopartícula gerada e uma relação indireta ao potencial zeta.

As nanopartículas com menor tamanho e maior mobilidade eletroforética mostraram-se mais eficientes na inibição do crescimento de microrganismos patógenos testados e independente da massa molar da quitosana utilizada, as nanopartículas obtidas não apresentaram potencial irritativo.

Apesar das nanopartículas de quitosana produzidas a partir da quitosana de baixa massa molar não se mostrarem tão efetivas quanto o processo de pasteurização no controle do crescimento microbiano, quando adicionadas na concentração CIM, elas promoveram melhor manutenção das características físico-químicas do néctar de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), estendendo a vida de prateleira do néctar *in natura* até 7 dias.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. D. S.; CAVALCANTE, L. G.; DOUDEMONT, P. V.; CASTRO, A. M.; NASCIMENTO A. P.; MATOS, J. E. X. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Micro-Ondas. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v. 23, n. 5, p. 630–635, 2013.
- AGANOVIC, K.; GRAUWET, T.; KEBEDE, B. T.; TOEPFL, S.; HEINZ, V.; HENDRICKX, M. et.al. Impact of different large scale pasteurisation technologies and refrigerated storage on the headspace fingerprint of tomato juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 26, p. 431–444, 2014.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 837–842, 2010.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R. et al. 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.
- ANTONIOU, J.; LIU, F.; MAJEED, H.; ZHONG, F. Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 309–319, 2015.
- ARAÚJO, A. P. O.; SANTOS, E. C. C.; DAMASCENO, F. S.; DEBONI, T. M.; CUEVAS, M. S.; MOTA, R. V. Utilização de planejamento experimental no estudo da pasteurização do suco de acerola. *Scientia Plena*, 12, 069930, 2016.
- ARNAUD-STAMFORD, T. M.; STAMFORD, T. C. M. Caracterização da quitosana e sua aplicação na nanotecnologia. In: *Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais*. [s.l.] Embrapa/IPA, 2010. p. 733–761.
- 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.
- 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.
- BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de a-quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2008.

BARBALHO, S. M.; DAMASCENO, D. C.; SPADA, A. P. M.; LIMA, I. E.R.N.; ARAÚJO, A. C.; GUIGUER, E. L. et al. Effects of *Passiflora edulis* on the Metabolic Profile of Diabetic Wistar Rat Offspring. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1490–1495, 2011.

BECKER, J.; LANGE, A.; FABARIUS, J.; WITTMANN, C. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. **Current Opinion in Biotechnology**, v.36, p. 168-175, 2015.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; FRANCO, L. O.; NASCIMENTO, A. E.; CAVALCANTE, H. M. M. et al. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2771–2792, 2014.

BRAGA, G. C.; PRADO, A.; PINTO, J. S. S.; ALENCAR, S. M. Volatile profile of yellow passion fruit juice by static headspace and solid phase microextraction techniques. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 356–363, 2015.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 3 jun. 2015.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 12, de 04 de setembro de 2003. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical.** Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultaLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

BUCKOW, R; NG, S; TOEPFL, S. Pulsed electric field processing of orange juice: a review on microbial, enzymatic, nutritional, and sensory quality and stability. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 12, n. 5, p. 455-467, 2013.

CABUK, M.; ALAN, Y.; YAVUZ, M.; UNAL, H. I. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of biodegradable conducting polypyrrole-graft-chitosan copolymer. **Applied Surface Science**, v. 318, p. 168–175, 2014.

CÂNDIDO FILHO, C. A.; BERGAMASCO, R. C. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DO NÉCTAR DE MARACUJÁ ENRIQUECIDO COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 4450-4457, 2015

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do método de preparação e do solvente. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 13-17, Feb. 2001.



CHANG, S.-H. LIN, H.-T. V.; WU, G.-J.; TSAI, G. J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 74–81, 2015.

CHANTARASATAPORN, P.; TEPKASIKUL, P.; KINGCHA, Y.; YOKSAN, R.; PICHYANGKURA, R.; VISESSANGUAN, W. et al. Water-based oligochitosan and nanowhisaker chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. **Food Chemistry**, v. 159, p. 463–470, 2014.

CIE – Commission Internationale de Éclairage, 2004. CIE 15: Technical Report: Colorimetry, 3rd edition. CIE Publication, Washington. p.79.

COSTA, E. M.; SILVA, S.; COSTA, M. R.; PEREIRA, M.; CAMPOS, D. A.; ODILA, J. et al. Chitosan mouthwash: Toxicity and in vivo validation. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 385–392, 2014.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana: A fibra do futuro**. 1. ed. Fortaleza: PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, 1999.

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**, v. 34, n. 2, p. 393–397, 2013.

DE FARIAS SILVA, C. E.; MOURA, E. M. O.; ANDRADE, F. P.; GOIS, G. N. S. B.; SILVA, I. C. C.; SILVA, L. M. O et al. The importance of monitoring the identity and quality standards in fruit pulp industry / Importância da monitoração dos padrões de identidade e qualidade na indústria de polpa de fruta. **Journal of bioenergy and food science**, [S.l.], v. 3, n. 1, mar. 2016. ISSN 2359-2710. Available at: <<http://periodicos.ifap.edu.br/index.php/JBFS/article/view/33/123>>. Date accessed: 30 Nov. 2016. doi:<http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v3i1.33>

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. KISHEN, A.; SHRESTHA, A.; BRAMANTE, C. M. Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1353–1358, 2015.Sh

DOMINGUES, R. C. C; FARIA, S. B. J; SILVA, R. B. CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Clarification of passion fruit juice with chitosan: Effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments. **Process Biochemistry**. V. 47, n. 3, p. 467–471, 2012.

DUTRA, A. S.; FURTADO, A. A. L.; PACHECO, S.; OIANO NETO, J. Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenóides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, p. 198-207, 2012.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2016). Bacteriological analytical manual online. Available from: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> Acesso em: 02/09/2016.

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*, v. 9, p. 435-451, 2008.

FELLOWS P.J. Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas. 2ª edição. Porto Alegre (Brasil): Artmed; pag. 19-22, 2006.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101–102, 2004.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.

GYLIENĖ, O.; SERVIENĖ, E.; VEPŠTAITĖ, I.; BINKIENĖ, R.; BARANAUSKAS, M.; LUKŠA, J. Correlation between the sorption of dissolved oxygen onto chitosan and its antimicrobial activity against *Escherichia coli*. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 218–223, 2015.

HAFLE, O. M.; COSTA, A. C.; SANTOS, V. M.; SANTOS, V. A.; MOREIRA, R. A. Características físicas e químicas do maracujá-amarelo tratado com cera e armazenado em condição ambiente. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 341–346, 2010.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food chemistry**, v. 194, p. 1266-1274, 2016.

HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

HU, J.; WANG, X.; XIAO, Z.; BI, W. Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 519–526, 2015a.

HU, L.; MENG, X.; XING, R.; LIU, S.; CHEN, X.; QIN, Y. et al. Design, synthesis and antimicrobial activity of 6-N-substituted chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2015b.

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.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em: 02 dez. 2016.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1326–1331, 1998.

JAMIL, B.; ABBASI, R.; ABBASI, S.; IMRAN, M.; KHAN, S. U.; IHSAN, A. et al. Encapsulation of Cardamom Essential Oil in Chitosan Nano-composites: *In-vitro* Efficacy on Antibiotic-Resistant Bacterial Pathogens and Cytotoxicity Studies. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1580, 2016. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01580>

JANZANTTI, N. S.; MACORIS, M. S.; GARRUTI, D. S.; MONTEIRO, M. Influence of the cultivation system in the aroma of the volatile compounds and total antioxidant activity of passion fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 511–518, 2012.

KALWEIT, S.; BESOKKE, R.; GERNER, I.; SPIELMANN, H. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. *Toxicol. In Vitro* 1990, 4, 702–706.

KAMMOUN, M.; HADDAR, M.; KALLEL, T. K.; DAMMAK, M.; SAYARI, A. Biological properties and biodegradation studies of chitosan biofilms plasticized with PEG and glycerol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 433–438, 2013.

KASKOOS, R. A. Investigation of moxifloxacin loaded chitosan–dextran nanoparticles for topical instillation into eye: *In-vitro* and *ex-vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 4(4), 164–173, 2014. <http://doi.org/10.4103/2230-973X.143114>

KHANNA, S.; DASH, P. R.; DARBRE, P. D. Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 9, p. 1051–1059, 2014.

KLEINE-BRUEGGENEY, H.; ZORZI, G.K.; TOBIAS, F.; EL-GUEDDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M.; GOYCOOLEA, F.M. A rational approach towards the design of chitosan-based nanoparticles obtained by ionotropic gelation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 99–108, 2015.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.

LAGARTO, A.; MERINO, N.; VALDES, O.; DOMINGUEZ, J.; SPENCER, E.; DE LA PAZ, N. et al. Safety evaluation of chitosan and chitosan acid salts from *Panurilus argus* lobster. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1343–1350, 2015.

LANDRISCINA, A; ROSEM, J; FRIEDMAN, A. J. Biodegradable chitosan nanoparticles in drug delivery for infectious disease. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, p. 1609–1619, 2015.

LEWIS, H. **Global market review of automotive lighting - forecasts to 2013**. Worcestershire: Aroq Limited, 2008.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Development of Novel Guava Puree Films Containing Chitosa Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(3), P:2711-2717, 2012.

LUO, Y.; TENG, Z.; LI, Y.; WANG, Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 221–229, 2015.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, A.; CASTRO, P. M.; PINTADO, M. Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. **Journal of food engineering**, 2015.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, A.; PINTADO, M. Current state on the development of nanoparticles for use against bacterial gastrointestinal pathogens. Focus on chitosan nanoparticles loaded with phenolic compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 429–439, 2015.

MAMUR, S.; YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; AKSOY, H. Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes in vitro. **Cytotechnology**, v. 64, n. 5, p. 553–562, 2012.

MARTÍN-DIANA, A. B.; RICO, D.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 590–600, 2009.

MCCANN, D.; BARRETT, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 370, n. 9598, p. 1560–1567, 2007.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. spe1, p. 83–91, 2011.

MORAES, I. V. M. Dossiê Técnico: Produção de polpa de fruta congelada e suco de frutas. **Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro**. 2006.

MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; AL-TURKI, A. I. Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, n. 1, p. 204–208, 2013.

NGO, D.-H.; VO, T.-S.; NGO, D.-N.; KANG, K.-H.; JE, J.-Y.; PHAM, H. N.-D. et al. Biological effects of chitosan and its derivatives. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 200–216, 2015.

OLIVEIRA, G. A.; CASTILHOS, F.; RENARD, C. M. -G. C.; BUREAU, S. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Research International*, 60, 154–162, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.051>

OLIVEIRA, T. L. C.; RAMOS, A. L.S.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H.; CRISTIANINI, M. Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 60–85, 2015.

OMAR ZAKI, S. S.; KATAS, H.; HAMID, Z. A. Lineage-related and particle size-dependent cytotoxicity of chitosan nanoparticles on mouse bone marrow-derived hematopoietic stem and progenitor cells. **Food and Chemical Toxicology**, 2015.

PAULA, A. T.; CASAROTTIA, S. N; BRAGA, H. F.; GRANDI, A. Z.; ROSSIC, D. A. Avaliação Microbiológica em Suco de Laranja in natura pelo Sistema Rápido Compact Dry®. Microbiological Evaluation of Fresh Orange Juice by Ready-to-use System Compact Dry®. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**; v. 13, n. 1, p. 55-58, 2011.

PERTUZATTI, P. B.; SGANZERLA, M.; JACQUES, A. C.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R. C. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 259–263, 2015.

PETRUCI, J. F. S.; CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de benzoato, sorbato, metil e propilparabenos em produtos alimentícios utilizando a eletroforese capilar. **Quím. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1177–1181, 2011.

PIRAS, A. M.; MAISETTA, G.; SANDRESCHI, S.; ESIN, S.; GAZZARRI, M.; BATONI, G. et al. Preparation, physical-chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 124–131, 2014.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653–1666, 2009.

PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. A. B; GÂNDARA, A. L. N. Estudo da vida-de-prateleira de bebida elaborada pela mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e suco natural de maracujá. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 295-310, 2004.

PUÉRTOLAS, E.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J.; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, I. Aplicación industrial de los pulsos eléctricos de alto voltaje para la pasteurización de alimentos: revisión de su viabilidad técnica y comercial. **CyTA Journal of Food**, 11:1, 81-88, 2013. DOI: 10.1080/19476337.2012.693542

RAFIEE, A.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; GAZORI, T.; RIAZI-RAD, F.; FATEMI, S. M. R.; PARIZADEH, A. et al. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 5, p. 372–377, 2014.

RAMAIYfxA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H.; KING, W. S.; SAHRIR, M. A. S. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 5, p. 1198–1205, 2013.

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

RAMOS, A. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, J. B. P.; GOMES, J. C. Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. **Ceres**, v. 53, n. 308, p. 425-438, 2006.

RATHER, M. A.; SHARMA, R.; GUPTA, S.; FERROSEKHAN, S.; RAMYA, V.L.; JADHAO, S.B. Chitosan-Nanoconjugated Hormone Nanoparticles for Sustained Surge of Gonadotropins and Enhanced Reproductive Output in Female Fish. *PLoS ONE* 8(2): e57094, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0057094

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.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 33–43, 2015.

SANTOS, A. PENHA, H.; BELLEC, A.; MUNHOZ, C.; PEDROSA-HARAND, A.; BERGÈS, H. et al. Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 816, 2014.

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, C. E.; KIST, B. B.; CARVALHO, C.; REETZ, E. R.; DRUMET, M. **Anuário Brasileiro de Fruticultura 2013**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 136 p.: il. 2013.

SHAH, B. R.; LI, Y.; JIN, W.; AN, Y.; HE, L.; LI, Z. Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. **Food hydrocolloids**, v. 52, p. 369–377, 2016.

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.

SILVA, C.E.F.; MOURA, E.M.O.; ANDRADE, F.P.; GOIS, G.N.S.B.; SILVA, I.C.C.; SILVA, L.M.O.; SOUZA, J.E.A.; ABUD, A.K.S. A importância da monitoração dos padrões de identidade e qualidade na indústria de polpa de fruta. *Journal of Bioenergy and Food Science*, Macapá, v.3, n.1, p.17-27, jan./mar., 2016. DOI 10.18067/jbfs.v3i1.33.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 254–258, 2002.

SIPOLI, C. C.; BARROS, S. T. D. Concentração de suco de maracujá por osmose inversa. Concentration of passion fruit juice by reverse osmosis. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 187–195, 2011.

SOARES, M. V. L.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; NOVOTNY, E. H., CANUTO, K. M.; WURLITZER, N. J. et al. Tracking thermal degradation on passion fruit juice through Nuclear Magnetic Resonance and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 219, p. 1-6., 2017.

SOUZA, M. D. S. S.; BARBALHO, S. M.; DAMASCENO, D. C.; RUDGE, M. V. C.; CAMPOS, K. E.; MADI, A. C. G. et al. Effects of *Passiflora edulis* (Yellow Passion) on Serum Lipids and Oxidative Stress Status of Wistar Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 78–82, 2012.

STAMFORD-ARNAUD, T. M. **Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/Quantum Dots fluorescentes**. [s.l.] 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.

STOFFEL, F.; MOREIRA, A. S. S. Aplicação de micro e ultrafiltração no processamento de sucos de fruta: revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 31(2), 2013).

TAJIK, H.; MORADI, M.; ROHANI, S. M. R.; ERFANI, A. M.; JALALI, F. S. S. Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia urmiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties of the product. **Molecules**, v. 13, p. 1263-1274, 2008. DOI: 10.3390/molecules13061263

TASTAN, O.; BAYSAL, T. Clarification of pomegranate juice with chitosan: Changes on quality characteristics during storage. **Food Chemistry**, v. 180, p. 211–218, 2015.

VIALTA, A; COSTA, A.C.P.B.; SARANTÓPULOS, C. I.G.L; LOPES, E.; RIBEIRO, E.P.; DONNA, E. et al. **Brasil Food Trends 2020**. São Paulo: FIESP, 2010.

VIANNA-SILVA, T.; RESENDE, E. D.; VIANA, A. P.; PEREIRA, S. M.; CARLOS, L. A.; VITORAZI, L. Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes épocas de colheita. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28(3), 545-550, 2008. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300007>

XIA, Z.; WU, S.; CHEN, J. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 242–245, 2013.

XIAO, J.; NIAN, S.; HUANG, Q. Assembly of ka fi rin / carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. **Food hydrocolloids**, v. 51, p. 166–175, 2015.

YANG, H.C.; WANG, W.H.; HUANG, K.S.; HON, M.H. Preparation and application of nanochitosan to finishing treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties. *Carbohydrate Polymers*, 79 (2010) 176-179.

YIN, L.; YIN, L.; ZHAO, X.; CUI, L.; DING, J.; HE, M. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of superporous hydrogel containing interpenetrating polymer networks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1139–1145, 2009.

YOUNES, I.; HAJJI, S.; FRACHET, V.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 489–498, 2014.

YUAN, F.; GAO, Y.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Modulation of physicochemical properties of emulsified lipids by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 1, p. 1–7, 2013.

ZHOU, Z.; LIN, S.; YUE, T.; LEE, T.-C. Adsorption of food dyes from aqueous solution by glutaraldehyde cross-linked magnetic chitosan nanoparticles. **Journal of food engineering**, v. 126, p. 133–141, 2014.

ZINOVIADOU, K. G.; GALANAKIS, C. M.; BRNČIĆ, M.; GRIMI, N.; BOUSSETTA, N.; MOTA, M. J. et al. Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. **Food Research International**, v. 77, p. 743-752, 2015.



ZOU, P.; YANG, X.; WANG, J.; LI, Y.; YU, H.; ZHANG, Y. et al. Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, n. 12, p. 1174–1181, 2015.