



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

LORENA CAROLINA SANTANA DE ARAÚJO

**COBERTURA COMESTÍVEL DE QUITOSANA-FRUTOSE: impacto na qualidade
pós-colheita de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.)**

Recife

2019

LORENA CAROLINA SANTANA DE ARAÚJO

**COBERTURA COMESTÍVEL DE QUITOSANA-FRUTOSE: impacto na qualidade
pós-colheita de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Profª. Drª. Thayza Christina Montenegro Stamford

Recife

2019

Catalogação na fonte
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

A658c Araújo, Lorena Carolina Santana de.
Cobertura comestível de quistosana-frutose: impacto na qualidade pós-colheita de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) / Lorena Carolina Santana de Araújo. – Recife: o autor, 2019.
55 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição.

Inclui referências e apêndices.

1. Antibacteriano. 2. Antioxidante. 3. Copolímero. 4. Frutas. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 060)

LORENA CAROLINA SANTANA DE ARAÚJO

**COBERTURA COMESTÍVEL DE QUITOSANA-FRUTOSE: impacto na qualidade
pós-colheita de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em Nutrição.

Aprovada em: 26/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Lúcia Raquel Ramos Berger (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Sarah Romini de Lima Basto (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me ajudou a contornar cada obstáculo, me fortalecendo diante das dificuldades e fazendo-me aprender com cada uma delas.

Aos meus pais, Judite Santana e Sérgio Porfírio, que me educaram e tornaram-me uma pessoa persistente. Obrigada por me apoiar e incentivar em cada decisão e por mesmo à distância sempre se fazerem presentes, torcendo e alegrando-se com cada conquista minha.

A todos os meus familiares, em especial minha irmã Bruna, que me ajudou muito com seu conhecimento e experiência acadêmica. Layza, Lívia, Luciana e Bruno, minha segunda família, muito obrigada!

Ao meu namorado, Emerson Bruno, pela cumplicidade, apoio, motivação e por toda compreensão.

À minha orientadora Thayza Montenegro Stamford, que se mostrou tão acolhedora desde o primeiro momento. Obrigada por todo suporte, confiança e incentivo, sempre com muita simpatia e paciência. Sou uma grande admiradora da pessoa e profissional que és.

Aos meus colegas de turma do mestrado Pedro, Viviane, Yan, Yana, Renata e Daniel, obrigada pelos momentos vividos, angústias e experiências compartilhadas.

À minha colega e companheira de laboratório Gerlane, que esteve comigo nos momentos mais difíceis da pesquisa, agradeço pelo apoio, ajuda, e por tudo que compartilhamos ao longo desses dois anos.

Aos colegas de laboratório Thaís, Alberto, Penha, em especial à Natália, que contribuiu muito com sua experiência e estava sempre disposta a esclarecer minhas dúvidas.

À professora Tânia, por me abrir as portas do seu laboratório. Estar ali, foi muito importante para meu crescimento profissional. Obrigada por ser tão especial e atenciosa.

À professora Viviane Lansk, sempre acessível e disposta a ajudar, pela generosidade, muito obrigada! Você é um exemplo de pessoa e profissional.

As professoras Margarida Angélica, Jaciana Santos e Sarah Romini que foram fundamentais para realização das análises de atividade antioxidante e de citotoxicidade.

Ao Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) pela disponibilidade de equipamentos e materiais na realização das análises necessárias, aos técnicos e todos os funcionários.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo a pesquisa e pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

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

A todos àqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram. Muito obrigada!

Não perca a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência, tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do Céu permanecerá

(XAVIER, 1999).

RESUMO

A acerola é uma fruta de significativa importância econômica e nutricional, principalmente, pelo seu alto teor de vitamina C, porém é bastante perecível e susceptível a deterioração microbiana. O uso de coberturas comestíveis a base de gel de quitosana (QTS) tem sido estudado na conservação de frutas, devido a sua ação antimicrobiana e baixa toxicidade. Essas propriedades podem ser potencializadas quando a quitosana é modificada quimicamente. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a ação antioxidant, antibacteriana e a toxicidade da cobertura comestível de quitosana/frutose (QTS-F) obtida por reação de Maillard e sua ação na preservação de acerolas. A atividade antioxidant foi analisada pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH e ABTS e através do teste do poder antioxidant de redução do ferro (FRAP). O teste de microdiluição foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da QTS-F frente a bactérias patogênicas de origem alimentar. O efeito citotóxico das coberturas preparadas foi avaliado (*in vitro*) através do método HET-CAM e pelo ensaio do MTT. Os frutos foram divididos em 4 grupos: controle negativo (sem tratamento), controle positivo (recoberto com glicerol), e os outros dois grupos foram cada um imerso por 3 minutos no gel de QTS e na QTS-F. Foram avaliados os aspectos físico-químicos e a contaminação visível das acerolas (com e sem coberturas) durante o armazenamento em temperatura ambiente (25°C – 4 dias) e refrigerada (12°C - 12 dias). A cobertura de QTS-F apresentou atividade antioxidant superior a quitosana pura, com ação antibacteriana potencializada, principalmente para bactérias Gram-positivas, sem apresentar efeitos citotóxicos, sendo eficaz no retardo da deterioração microbiana e da perda de massa nas acerolas em ambas as temperaturas de armazenamento. Os resultados indicaram que a cobertura de QTS-F pode ser uma estratégia promissora para melhorar a qualidade pós-colheita e aumentar a vida útil da acerola.

Palavras-chave: Antibacteriano. Antioxidante. Copolímero. Frutas. Reação de Maillard.

ABSTRACT

Acerola is a fruit of significant economic and nutritional importance, mainly due to its high content of vitamin C, however it is quite perishable and susceptible to microbial deterioration. The use of chitosan (QTS) based edible coatings has been studied in fruit preservation due to its antimicrobial action and low toxicity. These properties can be potentiated when chitosan is chemically modified. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antioxidant, antibacterial and toxicity effects of chitosan/fructose (QTS-F) obtained by Maillard reaction and its action on the preservation of acerola. The antioxidant activity was analyzed by the free radical sequestration capacity of DPPH and ABTS and by the antioxidant power reduction iron test (FRAP). The microdilution test was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of QTS-F against food-borne pathogenic bacteria. The cytotoxic effect of the prepared coatings was evaluated (*in vitro*) by the HET-CAM method and the MTT assay. The fruits were divided into 4 groups: negative control (no treatment), positive control (glycerol coated), and the other two groups were each immersed for 3 minutes on QTS gel and QTS-F. Physical and chemical aspects and visible contamination of acerolas (with and without coverings) were evaluated during storage at room temperature (25°C - 4 days) and refrigerated (12°C - 12 days). The QTS-F coating presented higher antioxidant activity than pure chitosan, with antibacterial action potentiated, mainly for Gram-positive bacteria, without cytotoxic effects, being effective in the retardation of the microbial deterioration and the loss of mass in the acerolas at both temperatures of storage. The results indicated that QTS-F coverage may be a promising strategy to improve postharvest quality and increase the life span of acerola.

Keywords: Anti-bacterial. Antioxidant. Copolymer. Fruits. Maillard reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da quitosana 17

Figura 2 - Aspecto visual do gel de quitosana-frutose (A) e do gel de quitosana (B) 28

Figura 3 - Resultado do HET-CAM após 5 minutos de exposição ao soro fisiológico (A), ao gel de quitosana/frutose (B) e ao lauril sulfato de sódio (C). 33

Figura 4 - Poder antioxidante de redução do ferro das coberturas comestíveis: quitosana (QTS) e quitosana-frutose (QTS-F). 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) do gel de quitosana e do gel de quitosana/frutose 32

Tabela 2 - Percentual de inibição celular por MTT pelas coberturas comestíveis: quitosana (QTS) e quitosana-frutose (QTS-F) 34

Tabela 3 - Percentual de inibição do radical DPPH e ABTS pelas coberturas comestíveis: quitosana (QTS) e quitosana-frutose (QTS-F) 35

Tabela 4 - Média dos valores dos parâmetros físico-químicos das acerolas armazenadas em temperatura ambiente (25°C) por 4 dias 38

Tabela 5 - Média dos valores dos parâmetros físico-químico das acerolas armazenadas em refrigeração (12°C) por 12 dias 38

Tabela 6 - Efeito das coberturas a base de quitosana e quitosana/frutose sobre a cor das acerolas armazenadas em temperatura ambiente (25°C) por 4 dias 41

Tabela 7 - Efeito das coberturas a base de quitosana e quitosana/frutose sobre a cor das acerolas armazenadas sob refrigeração (12°C) por 12 dias 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2"-azino-bis (3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CFC	Complexo Quitosana-Frutose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
GC	Gel de Quitosana
GD	Grau de Desacetilação
HET-CAM	<i>Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometodetetrazolium
PRM	Produtos da Reação de Maillard
RM	Reação de Maillard
QTS	Quitosana
QTS-F	Quitosana-Frutose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	Acerola (<i>Malphigia emarginata</i> D. C.).....	16
2.2	Quitosana – Características e propriedades.....	17
2.3	Quitosana modificada por Reação de Maillard.....	20
3	HIPÓTESE.....	22
4	OBJETIVOS.....	23
4.1	Objetivo Geral.....	23
4.2	Objetivos Específicos.....	23
5	MÉTODOS.....	24
5.1	Materiais.....	24
5.2	Preparo do conjugado quitosana-frutose por reação de Maillard.....	24
5.3	Determinação da atividade antibacteriana.....	24
5.4	Determinação da toxicidade das coberturas comestíveis obtidas.....	25
5.4.1	Teste de citotoxicidade pelo método (HET-CAM).....	25
5.4.2	Ensaio do (MTT): Teste de citotoxicidade.....	26
5.5	Determinação da atividade antioxidante das coberturas comestíveis.....	27
5.5.1	Ensaio de eliminação do radical DPPH.....	27
5.5.2	Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP).....	27
5.5.3	Atividade de eliminação do radical ABTS.....	27
5.6	Preparação das coberturas comestíveis para aplicação nos frutos.....	28
5.7	Efeito das coberturas sobre os parâmetros físico-químicos das acerolas.....	28
5.7.1	pH.....	29
5.7.2	Acidez total titulável.....	29
5.7.3	Sólidos solúveis.....	29
5.7.4	Parâmetros de cor.....	29
5.7.5	Perda de peso.....	30
5.7.6	Percentual de decomposição.....	30

5.8	Análises estatísticas.....	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
6.1	Atividade Antibacteriana.....	31
6.2	Toxicidade da cobertura comestível por HET-CAM e MTT.....	32
6.2.1	<i>Teste de citotoxicidade da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM)</i>	32
6.2.2	<i>Ensaio do MTT</i>	33
6.3	Atividade antioxidante das coberturas comestíveis.....	34
6.3.1	<i>Ensaio de eliminação do radical DPPH e ABTS.....</i>	34
6.3.2	<i>Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP).....</i>	35
6.4	Efeito das coberturas comestíveis sobre os parâmetros físico-químicos das acerolas.....	37
6.4.1	<i>Análise do pH, sólidos solúveis e acidez total titulável.....</i>	37
6.4.2	<i>Parâmetros de cor.....</i>	39
6.4.3	<i>Perda de peso.....</i>	42
6.4.4	<i>Percentual de decomposição das frutas.....</i>	43
7	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), é um fruto que se destaca como excelente fonte de vitamina C, tem sabor e aroma agradáveis, e ainda possui vasta capacidade de aproveitamento industrial. Tais características têm atraído o interesse dos fruticultores, ganhando importância econômica em diversas regiões do Brasil (ARAÚJO et al., 2014). A aceroleira apresenta grande potencial de expansão, pois o seu uso atende a vários mercados, como o consumo *in natura*, indústria de sucos, e indústria farmacêutica (ALMEIDA et al., 2014).

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de acerola do mundo (CAVICHIOLI et al., 2014). O Nordeste brasileiro, devido às condições de solo e clima, é a região do país onde a acerola melhor se adapta. Entre os Estados produtores dessa cultura, Pernambuco se sobressai, sendo responsável por 25% da safra nacional (FIGUEIREDO NETO et al., 2014).

Embora a maior parte da produção de acerola seja vinculada ao setor agroindustrial, parte considerável dos frutos não é aproveitada, em virtude da sua alta perecibilidade. Além disso, as frutas têm sua comercialização *in natura* dificultada a longas distâncias, por se deteriorarem em poucos dias (ARAÚJO et al., 2017). O padrão climatérico da acerola é um fator que acelera sua senescência pós-colheita e a perda de umidade é bastante significativa nos primeiros dias de conservação, tornando os frutos mais suscetíveis à alterações microbiológicas (MAZARO et al., 2015).

Atualmente, o controle da deterioração microbiana é feito por meio de produtos químicos que, além de contribuir para o desenvolvimento de resistência aos patógenos, apresentam ainda, risco de contaminação ao ambiente, aos frutos e aos seres humanos (PEIXINHO; RIBEIRO; AMORIM, 2017). Desse modo, se faz necessário o desenvolvimento de coberturas bioativas a base de protetores naturais com ação antimicrobiana, com capacidade de retardar o amadurecimento da fruta, e estender a vida útil, mantendo a qualidade global do produto e simultaneamente, de apresentar ausência de toxicidade ao organismo humano e ao meio ambiente (LI et al., 2018).

A quitosana (QTS) tem se mostrado uma alternativa bastante utilizada na produção de coberturas comestíveis. Trata-se de um copolímero natural composto por unidades β -1,4-D-glucosamina ligadas a N-acetilglucosamina que é encontrado na parede celular de fungos ou extraído a partir da desacetilação termoquímica da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos (SINGH; SHITIZ; SINGH, 2017). Devido às suas características biológicas

específicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, atividade antimicrobiana, existem diversas aplicações da quitosana em coberturas comestíveis, isolada ou associada com outros polímeros ou substâncias antimicrobianas, ou ainda na forma do polímero modificado quimicamente (MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2016).

Entre as estratégias utilizadas para modificação da quitosana, uma das mais comuns é a substituição dos grupos amino da molécula por resíduos específicos, que podem conferir a quitosana características desejadas. Carboidratos, principalmente mono e dissacarídeos, tem sido amplamente utilizados para realizar esta modificação, uma vez que são simples e de baixo custo. A introdução de carboidratos pode ser feita por diferentes reações químicas, incluindo a reação de Maillard (GULLON et al., 2016).

A reação de Maillard (RM), também denominada escurecimento não enzimático, é uma reação que envolve a condensação entre um grupo amino de aminoácidos, peptídeos ou proteínas e um grupo carbonila de açúcares redutores, aldeídos ou cetonas, sendo uma das principais reações que ocorrem em alimentos processados. Assim, a presença de grupamentos amino livres na quitosana permite que ela participe da RM. Além disso, pesquisas apontam que os produtos da reação de Maillard (PRM) contribuem para a formação de sabores, e tem efeitos antioxidantes e antimicrobianos (GULLON et al., 2016).

Portanto, mediante o reconhecido potencial biológico da quitosana, e considerando a sua modificação pela RM bastante promissora, especialmente para a indústria de alimentos, devido à melhoria tecnológica, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação antioxidante, conservadora e a toxicidade de cobertura comestível de quitosana/frutose na preservação de acerolas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Acerola (*Malphigia emarginata* D. C.)

A acerola (*Malphigia emarginata* D. C.), também denominada “cereja tropical”, é uma fruta originária das Antilhas, norte da América do Sul e América Central (CARVALHO et al., 2017). Permaneceu frutificando em terras americanas sem despertar muita atenção, entretanto, a partir da década de 40 se aguçou o interesse e os estudos sobre suas potencialidades econômicas, pelo alto teor de vitamina C encontrado na fruta que pode chegar a 5 g/100 g de polpa, correspondendo a 80 vezes a quantidade presente em laranjas e limões (MORAES FILHO et al., 2013).

Além disso, a acerola é fonte de pró-vitamina A, vitaminas do complexo B, e minerais como cálcio, ferro e fósforo (EMBRAPA, 2013). O fruto da aceroleira é uma drupa de tamanho, formas e pesos variáveis. A casca é fina e delicada, com tamanho de 1 a 2,5 cm de diâmetro, e peso de 3 a 15 g. Em relação à cor, os frutos maduros podem apresentar diferentes tonalidades, desde o amarelo ao vermelho intenso ou roxo. Seu sabor varia de levemente ácido a muito ácido. Trata-se de um fruto climatérico, ou seja, pode amadurecer na planta ou depois da colheita, quando colhido imaturo (FIGUEIREDO NETO et al., 2014).

A cultura da acerola no Brasil teve início na década de 50, sendo introduzida em Pernambuco pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), procedente de Porto Rico. Devido a uma boa adaptação às condições de clima tropicais e subtropicais, a cultura propagou-se por quase todos os Estados, exceto a região Sul, por causa das baixas temperaturas no inverno (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

A área destinada ao cultivo da acerola no Brasil é de aproximadamente 10.000 ha e a produtividade média corresponde a 29 t/ha/ano, sendo assim, estima-se que o Brasil produz cerca de 300.000 toneladas ha/ano. Destacam-se os Estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco, que juntos detém 60% da produção nacional (FURLANETO; NASSER, 2015). A comercialização de acerola no mercado interno brasileiro está distribuída de forma que 46% destinam-se à indústria de processamento e 54% destinam-se ao mercado de consumo da fruta fresca (EMBRAPA, 2017).

A aceroleira tem atraído o interesse dos fruticultores não apenas da Região do Submédio São Francisco, como de outros polos agrícolas, em virtude da procura cada vez maior por essa fruta para a extração da polpa. Além desse uso, a acerola também entra na fabricação de licores, geleias, doces em calda e em pasta, sorvetes, chicletes e bombons. Pode

ainda ser consumida *in natura*, sob a forma de suco natural, ou como fonte enriquecedora de vitamina C quando associada ao consumo de outras frutas (EMBRAPA, 2017).

A importância econômica da acerola é prejudicada pela ausência de boas práticas no manuseio, transporte e estocagem, aliada à alta perecibilidade e a falta de infra-estrutura para seu processamento e conservação, que são responsáveis por elevadas perdas, chegando a atingir até 40% da produção (CHITARRA e CHITARRA, 2005; SOUZA et al., 2017; REZENDE; NOGUEIRA; NARAIN, 2018). Os frutos das principais cultivares produzidas na região nordestina possuem vida pós-colheita entre 14 a 21 dias, se colhidos no estádio de maturação ideal e mantidos a temperatura entre 8°C-12°C, dificultando a comercialização de acerolas *in natura*, tanto no mercado local, como em mercados mais distantes (EMBRAPA, 2016).

O controle da deterioração pós-colheita em acerola geralmente é feito através da aplicação de agrotóxicos, sobretudo os fungicidas. Porém, a maior resistência dos patógenos, bem como os impactos nocivos desses produtos ao meio ambiente e à saúde, tem aumentado a demanda por novas alternativas de controle (RIBEIRO; SERRA; ARAÚJO, 2016). Neste contexto, produtos naturais disponíveis comercialmente têm sido pesquisados com esta finalidade, por apresentarem baixa toxicidade ao homem e ao ambiente, melhorarem características fisiológicas dos vegetais e ainda possuírem, em alguns casos, a capacidade de ativação dos mecanismos de defesa das plantas tratadas (RIBEIRO; SERRA; ARAÚJO, 2016). Muitos agentes naturais são citados na literatura como capazes de manter a qualidade de frutos pós-colheita, a exemplo da quitosana (VESPUCCI; CRUZ; TEIXEIRA, 2018).

2.2 Quitosana – Características e propriedades

Quitosana é um polissacarídeo catiônico, cuja estrutura é formada por um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranose unidos por ligações β 1-4 glicosídicas (como observado na figura 1) e de composição variável em função do grau médio de desacetilação e da massa molar (ABREU et al., 2013; MORAES et al., 2017). Está presente na parede celular de alguns fungos, e de modo mais comum, é obtida como produto da desacetilação da quitina que se encontra no exoesqueleto de crustáceos e insetos (SAHARIAH; MÁSSON, 2017; SINGH; SHITIZ; SINGH, 2017).

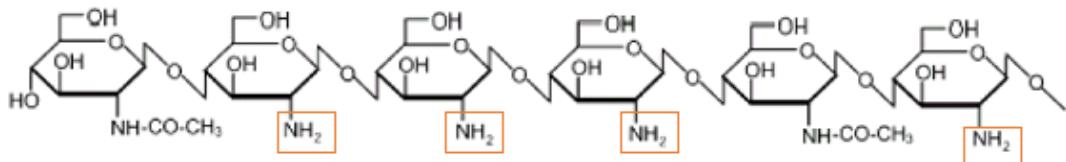


Figura 1 - Estrutura molecular da quitosana (THARANATHAN; KITTUR, 2003).

A quitosana caracteriza-se por possuir grupos amínicos livres, ser solúvel em meios ácidos, pH inferiores à 6,2, sendo os ácidos acético, fórmico e cítrico os mais utilizados na sua solubilização. Além disso, tem a capacidade de aderir-se a superfícies carregadas negativamente, podendo agregar-se a compostos polianiónicos e a íons metálicos. Assim, tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto a agregação com poliâniões lhe atribuem aplicabilidades únicas, tais como antimicrobiano, cicatrizante, carreador de fármacos (PAULINO, 2006; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; KNIDRI et al., 2018).

No que se refere às suas propriedades físico-químicas, este polímero pode variar em distribuição de massa molar, conteúdo de impurezas e em grau de desacetilação de 50 a 95%, dependendo da fonte e do método de preparação. O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade química muito importante da quitosana, sendo um parâmetro que expressa o conteúdo médio de resíduos acetilados presentes nas suas cadeias, e que pode influenciar as suas características químicas, físicas e biológicas. Do ponto de vista químico, o GD da quitosana exerce influência sobre algumas de suas propriedades, dentre elas, a hidrofobicidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes reticulantes, solubilidade e viscosidade de suas soluções (GONÇALVES et al., 2011).

A quitosana tem sido explorada em diversas áreas, como na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmetologia, agricultura, tratamento de água, entre outras. Esse polímero vem sendo utilizado na forma de filmes, géis, esfera, micro/nanopartículas e membranas, pois apresenta propriedades como a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioadesividade, baixa toxicidade e atividade antimicrobiana (TAKAKI, 2015; RAMEZANI; ZAREI; RAMINNEJAD, 2015; MUXIKA et al., 2017).

Vários estudos demonstram a eficácia da quitosana como agente antimicrobiano em espécies patogênicas como *Rhizopus stolonifera* (HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008), *Nigrospora sphaerica* e *Fusarium culmorum* (XING et al., 2016), *Escherichia coli* (JEONG et al., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (OKAWA et al., 2003), *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* (FERNANDEZ-SAIZ et al., 2010), *Streptococcus mutans* (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011), as quais causam doenças em plantas e/ou deterioração pós-colheita de frutas e vegetais (WANG et al., 2017). O efeito da quitosana frente às bactérias, fungos e leveduras é influenciado por muitos fatores, incluindo o tipo de microrganismo, grau de desacetilação da quitosana, massa molecular, concentração do polímero, características hidrofílicas e hidrofóbicas, estado físico, solubilidade em água, e

fatores físico-químicos como força iônica, pH e temperatura do meio (HOSSEINNEJAD; JARAFI, 2016).

Na literatura são sugeridas explicações no intuito de elucidar o mecanismo de ação antimicrobiano da quitosana. Diversos autores sugerem que os efeitos estão associados à natureza catiônica da quitosana, havendo interações entre as cargas positivas do polímero com as cargas negativas dos componentes celulares microbianos. A quitosana pode se ligar a parede celular afetando sua integridade e permeabilidade, o que resulta em aumento da permeabilidade celular, com perda de componentes intracelulares. Além disso, reconhece-se que os efeitos antimicrobianos da quitosana estão associados à diminuição da atividade respiratória dos microrganismos e da atividade de algumas enzimas, podendo haver bloqueio da transcrição do RNA (DOTTO, VIEIRA e PINTO, 2015; ZOU et al., 2015; MARPU; BENTON, 2018).

Quitosana de baixa massa molecular apresenta maior solubilidade, fator importante para reagir com os sítios ativos dos microrganismos. Enquanto que a quitosana com alto grau de desacetilação possui também elevada solubilidade e densidade, aspectos fundamentais para adesão desse polímero à célula microbiana (YOUNES et al., 2014).

Outra propriedade relevante da quitosana é a sua capacidade antioxidante. A sua rápida absorção pelas células e pelo intestino junto com a sua baixa toxicidade, a torna um composto promissor para uso como antioxidante natural. A quitosana pode regular e elevar a atividade das principais enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase), além de reduzir peroxidação lipídica (XIA et al., 2011). Younes et al. (2014) evidenciaram elevada ação antioxidante da quitosana e sua atividade antitumoral frente à células de câncer de bexiga, encontrando relação dose dependente e maior eficiência quando utilizou-se a quitosana de menor massa molar.

A incorporação de constituintes menores nas matrizes de quitosana podem melhorar consideravelmente a atividade antimicrobiana e algumas propriedades físico-químicas, como a capacidade de formar filmes, biodegradabilidade e barreiras contra o vapor de água. Dentre as modificações químicas que têm sido usadas para melhorar as propriedades da quitosana, está a reação de Maillard (GAO; ZHU, ZHANG, 2013). A RM foi reconhecida como uma reação com boa controlabilidade, sem uso de produtos químicos sintéticos, e facilidade de operação quando comparada com outros métodos de modificações químicas (ZHANG; YANG; ZHAO, 2015; SUN et al., 2017).

2.3 Quitosana modificada por Reação de Maillard

A quitosana é um composto comercialmente interessante com custo relativamente baixo, porém, tem seu uso limitado devido à sua reatividade e processabilidade. Sua principal limitação é a insolubilidade do polímero em soluções aquosas e em pH neutro à básico, que afetam suas propriedades biológicas, bem como limitam certas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (AMARAL, 2016).

Assim, diversos estudos são realizados para preparar quitosana quimicamente modificada com o objetivo de aumentar sua solubilidade em água e em pH neutro a fim de ampliar sua aplicação (HAFDANI; SADEGHINIA, 2011). Derivados de quitosana podem ser preparados sob condições brandas por derivatização química de seus grupos funcionais reativos, como grupo amino, grupos hidroxila primários e secundários, que estão respectivamente nas posições C-2, C-3 e C-6 (HAFDANI; SADEGHINIA, 2011, XIA et al., 2010). A modificação da quitosana através da formação de ligações covalentes com os grupos amino reativos é a estratégia mais utilizada para solucionar as limitações do polímero. A modificação da quitosana por meio da reação com seus grupos hidroxila secundários requer mais etapas, como a proteção dos grupos amino funcionais, para evitar sua modificação, que pode ocasionar redução de suas propriedades bioativas (AMARAL, 2016).

Devido à sua natureza hidrofílica, carboidratos, especialmente mono e dissacarídeos, têm sido os compostos preferidos para reagir com a quitosana, promovendo modificações no polissacarídeo. É estabelecido que substituições de 3-20% dos grupos amino levam a um aumento considerável da solubilidade em água da quitosana, mantendo ou adquirindo uma nova atividade biológica, uma vez que os grupos amino restantes não são reativos. A preparação de derivados glicosilados de quitosana envolve, entre outras reações, a reação de Maillard (CHANG et al., 2011).

A reação de Maillard consiste em uma reação entre um grupamento amino livre, de um aminoácido, peptídeo ou proteína, e um composto carbonila, geralmente um açúcar redutor, como glicose, frutose ou lactose (GAO; ZHU; ZHANG, 2013; KAMBOJ et al., 2015). Essa reação ocorre espontaneamente durante o processamento e armazenamento de alimentos, sendo a principal reação responsável pela transformação de precursores em corantes, e conferindo sabor. A RM pode ser influenciada por muitos fatores, incluindo concentração de reagente, temperatura, tempo de aquecimento, pH inicial, e as características dos reagentes (WU et al., 2014).

A quitosana, por possuir grupos aminos em sua molécula, constitui uma candidata para participar da reação de Maillard. A solubilidade e o rendimento ideais dos derivados de

quitosana dependem do tempo e temperatura da reação, e do tipo e da quantidade de sacarídeo utilizados. Pesquisas apontam que a reação de Maillard é promissora e fácil para a fabricação comercial de quitosanas solúveis em água (YING et al., 2011)

Os compostos da RM contribuem para a formação de sabor específico e melhora de propriedades funcionais de alimentos (GAO; ZHU; ZHANG, 2013). Além disso, muitos estudos demonstraram que os PRM tinham propriedades antioxidantes e antimicrobianas (BAKRYA et al., 2018). Kanatt et al. (2008) evidenciaram que o complexo de quitosana/glicose, uma forma modificada de quitosana, apresentou atividade antioxidante superior em comparação com a quitosana/glicose sozinhas.

Os conjugados de açúcar-quitosana têm sido considerados como um tipo de biopolímero funcional com potencialização das propriedades antimicrobianas e antioxidantes do polímero não conjugado. PRM de quitosana-glicose exibiram atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus cereus* (JIANG; FENG; LI, 2012; KANATT et al., 2008; RAO et al., 2011). Estudos mostraram que os PRM entre a quitosana e açúcares redutores foram promissores conservantes antioxidantes e antibacterianos para armazenamento de alimentos (LI et al., 2014).

Adicionalmente, PRM de quitosana-xilose apresentaram atividade antioxidante, propriedade quelante de cobre e bom efeito inibitório da polifenol oxidase (ZHU et al., 2013). Reações de glicose-arginina, valina-histidina, glutatona-glicose ou frutose, caseína-glicose, ribose-lisina e frutose-lisina, também têm sido associadas à formação de compostos com atividade antioxidante (VHANGANI; WYK, 2013; LI et al., 2014).

3 HIPÓTESE

A quitosana apresenta grupamentos aminas que reagem com açúcares redutores, como a frutose, e que por tratamento térmico resultará num produto da reação de Maillard e dessa forma terá suas ações antioxidante e antimicrobiana potencializadas por modificação química em sua estrutura polimérica. Assim, o conjugado quitosana-frutose ao ser aplicado como cobertura comestível na acerola irá promover a proteção do fruto contra microrganismos deteriorantes e consequentemente estenderá a vida de prateleira da acerola.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antioxidante, antibacteriana e a toxicidade de cobertura comestível de quitosana/frutose e sua ação na preservação de acerola (*Malpighia emarginata* D. C.).

4.2 Objetivos Específicos

- Preparar as coberturas comestíveis de quitosana/frutose na forma de gel;
- Determinar a biocompatibilidade, toxicidade, ação antibacteriana e antioxidante das coberturas comestíveis preparadas à base de quitosana/frutose;
- Verificar o efeito das coberturas comestíveis de quitosana/frutose sobre os parâmetros físico-químicos das acerolas.

5 MÉTODOS

5.1 Materiais

As acerolas foram adquiridas na CEASA/PE (Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco), e selecionadas de acordo com o tamanho uniforme, cor, e ausência de infecções visíveis. Para classificação dos frutos quanto ao estádio de maturação, foi utilizado o grau de cor da casca, considerando frutos maduros os que apresentavam 100% de coloração da casca vermelha (NOGUEIRA et al., 2002; ADRIANO; LEONEL, 2012). A quitosana foi adquirida da empresa Sigma® (Lote: STBF8219V, São Paulo, Brasil), sendo de baixo peso molecular e proveniente da desacetilação da quitina de crustáceo. Todas as outras substâncias necessárias para a realização do estudo foram obtidas através de fontes comerciais.

5.2 Preparo do conjugado quitosana-frutose por reação de Maillard

Inicialmente foi procedida a diluição de 1g da quitosana em 100mL de ácido cítrico a 1%. Após completa solubilização do polímero foi acrescentado 1g de frutose, em agitação constante, até a solubilização do monossacarídeo. Posteriormente, a solução obtida foi autoclavada a 121°C por 15 minutos para que ocorresse a reação de Maillard, dando como produto final o conjugado quitosana-frutose. Todas as diluições foram realizadas através de agitação magnética a temperatura ambiente para completa dispersão das substâncias constituintes (Adaptado de Gao; Zhu; Zhang, 2013).

5.3 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada separadamente para o gel de quitosana e para o conjugado quitosan/frutose, frente a bactérias patogênicas de origem alimentar (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7664, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella spp.* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922). As cepas bacterianas testes utilizadas na atividade antimicrobiana pertencem ao banco de cultura da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)/Departamento de Nutrição.

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias estudadas foi realizada a técnica da microdiluição em placas de 96 poços. A CIM foi considerada como a menor concentração de cada substância teste em que não houve crescimento bacteriano visível (ALVES et al., 2008).

As bactérias testadas foram cultivadas em BHI por 24h, a 37°C e em seguida padronizado o inóculo a 10^8 UFC/ml (ALVES et al., 2008). Em cada um dos micropoços

foram inseridos inicialmente a substância teste cuja concentração variou de 0 a 6mg/mL, em seguida foi adicionado o meio BHI e o inóculo de cada bactéria teste, de forma que o volume final de cada poço fosse de 100µL.

A microplaca contendo as bactérias e as substâncias teste foi incubada a 37°C por 24 horas, após esse período foram adicionados 30µL de resazurina em cada poço e incubada novamente a 37°C por 1 hora. A resazurina é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (LUZ; FRAGA, 2016). Portanto, a coloração azul a violeta indica ausência de crescimento bacteriano enquanto que as variações de rosa-vermelho indicam a presença de células viáveis/crescidas. Depois de 1 hora da aplicação da resazurina foi feita a análise da mudança da cor e a determinação da CIM, considerada como a primeira concentração na qual não houve crescimento visível (cor azul-violeta).

Para o controle de esterilidade foram adicionados separadamente 100µL do meio e 100µL da substância teste e para o controle de crescimento/viabilidade das cepas microbianas testes 80µL do meio + 20 µL do inóculo.

5.4 Determinação da toxicidade das coberturas comestíveis obtidas

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

O teste do HET-CAM foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Steiling et al. (1999). Foi testado o gel de quitosana/frutose na concentração CIM que foi utilizado como cobertura comestível nas acerolas.

O teste foi feito no décimo dia de incubação dos ovos fecundados. Inicialmente, o reservatório acima do espaço aéreo do ovo foi removido. A membrana corioalantóide do ovo foi exposta e umedecida com solução salina fisiológica a 0,9%. Uma alíquota de 200 µL da substância testada foi aplicada na membrana corioalantóide. Em seguida, a membrana foi observada por 5 minutos a fim de identificar sinais de vasoconstrição, hemorragia e coagulação. O tempo (em segundos) que cada um dos sinais iniciou foi aplicado na seguinte Equação (VARGAS et al., 2007).

$$\frac{(301 - hemorrhage)5}{300} + \frac{(301 - vasoconstriction)7}{300} + \frac{(301 - coagulation)9}{300}$$

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

5.4.2 Ensaio do 3-[4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL]-2,5-BROMETO DE DIFENIL TETRAZÓLICO (MTT)

O efeito citotóxico da cobertura de quitosana/frutose foi avaliado pelo Ensaio MTT, em leitor de microplaca (Biorad 680, Hercules, Calif., USA), segundo metodologia descrita por Alley et al. (1988) e Mosmann (1983). Este ensaio consiste em dosagem colorimétrica, realizada em microplaca, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometodetetrazolium (MTT) em azul de formazan por ação da enzima succinil-desidrogenase, detectada apenas em mitocôndrias de células metabolicamente ativas.

Foram utilizadas as linhagens celulares Macrófagos de camundongos (RAW 264.7), Leucemia promielocítica humana (HL-60) e Carcinoma colorretal humano (HCT116). As linhagens celulares foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, sendo mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As linhagens celulares HCT116 (Carcinoma colorretal humano), HL-60 (Leucemia promielocítica humana) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongos) foram mantidas em meio de cultura DMEM e RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células HCT116 e RAW 264.7 (10^5 células/mL) e HL-60 (3×10^5 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida 10 µL das soluções testes foram adicionadas aos poços na concentração final de 100 µg/mL para o gel de quitosana (10mg/mL) pH 6,0 e para o complexo quitosana-frutose (10mg/mL) pH 6,0. O fármaco doxorrubicina (10 µg/mL) foi utilizado como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 7.0 demo. Para determinação da toxicidade foi usada uma escala de intensidade, sendo considerado tóxico as amostras com atividade inibitória entre 95 a 100 %, com atividade moderada as que apresentaram inibição variando de 70 a 90% e não tóxica as com inibição menor que 50 % (RODRIGUES et al., 2014; FREIRE et al., 2016).

5.5 Determinação da atividade antioxidante das coberturas comestíveis obtidas

5.5.1 Ensaio de eliminação do radical DPPH

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH foi determinada segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007). Inicialmente 0,1 mL de cada amostra foi misturado a 3,9 mL do radical DPPH. Como branco foi utilizado uma solução de água destilada e ácido cítrico. Após 30 minutos de estabilização da reação, foram realizadas leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 515 nm. O percentual de inibição do radical livre DPPH pelas substâncias teste foi calculado conforme a equação 2 (JUNG et al., 2014).

$$\text{Inibição do radical DPPH (\%)} = (A_b - A_a / A_b) \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

Onde:

A_a = absorbância da amostra + solução de DPPH

A_b = absorbância do branco controle sem a amostra

5.5.2 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

O poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi determinado de acordo com o método proposto por Rufino et al. (2006), com pequenas modificações. Este método baseia-se na redução do íon férrico (Fe^{3+}) para íon ferroso (Fe^{2+}) na presença da quitosana e da quitosana modificada, formando um complexo azul ($Fe^{2+}/TPTZ$). Em ambiente escuro, 90 μ L das amostras diluídas foram adicionadas a 270 μ L de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Após homogenização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, em seguida foram colocadas em microplacas de 96 poços, sendo a leitura realizada em leitor de microplaca no comprimento de onda de 595 nm. As determinações foram realizadas em triplicata. A maior absorbância indicou maior poder redutor.

5.5.3 Atividade de eliminação do radical ABTS

A capacidade de captura do radical 2,2"-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi avaliada segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007), com pequenas modificações. Inicialmente foi preparada uma solução de ABTS 7 mM, à qual foi adicionada uma solução de persulfato de potássio 2,45 mM. A mistura foi mantida a temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas, para formação do radical ABTS. Uma alíquota de 30 μ L de cada substância teste previamente diluída foi adicionada à 3 mL da

solução ABTS. Após 6 minutos de incubação no escuro, foram realizadas leituras espectofotométricas das amostras no comprimento de onda 734 nm. O percentual de inibição do radical livre ABTS pelas substâncias teste foi calculado de acordo com a equação 3. (CHEN et al., 2015).

$$\text{Inibição do radical ABTS (\%)} = [1 - (A_a - A_b / A_c)] \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Onde:

A_a = absorbância da amostra + solução de ABTS

A_b = absorbância da amostra sem a solução do ABTS

A_c = absorbância do branco controle sem a amostra

5.6 Preparação das coberturas comestíveis para aplicação nos frutos

Os frutos receberam dois tratamentos distintos: gel de quitosana diluído em ácido cítrico, e gel de quitosana/frutose (figura 2). O gel de quitosana/frutose foi utilizado na concentração inibitória mínima determinada pela atividade antimicrobiana.

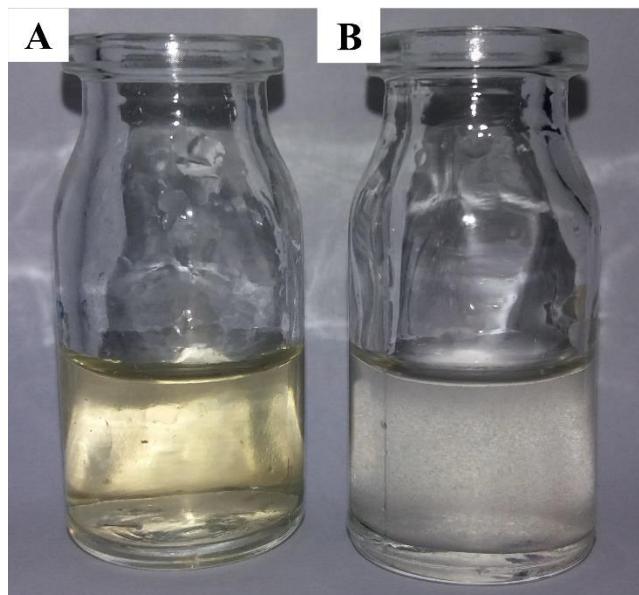


Figura 2 - Aspecto visual do gel de quitosana-frutose (A) e do gel de quitosana (B). Fonte: Autor, 2018.

5.7 Efeito das coberturas comestíveis sobre os parâmetros físico-químicos das acerolas

Os frutos maduros (100% de coloração da casca vermelha) foram previamente selecionados de acordo com a sua integridade, e ausência de danos físicos, fissuras e contaminação microbiana visível. Os mesmos foram lavados em água corrente e sanitizados por imersão em solução de hipoclorito de sódio (1% v/v) durante 15 minutos, lavados com água potável e deixados para secar durante 1 hora a temperatura ambiente. As acerolas foram

distribuídas aleatoriamente em quatro grupos. Um grupo foi o controle negativo, com ausência de cobertura comestível nas acerolas. O segundo grupo foi mergulhado em solução contendo 1% de glicerol. O terceiro grupo foi mergulhado em solução de quitosana, e o último grupo foi mergulhado na solução de quitosana-frutose na concentração de CIM. O tempo de imersão de todas as amostras foi de 3 minutos.

Após secarem, as acerolas foram colocadas em recipientes de polietileno com tampa, sendo armazenadas durante o período de 4 dias a temperatura ambiente (25°C), e durante o período de 12 dias a temperatura de refrigeração (12°C). Durante esse período foram realizadas análises físico-químicas nos dias 0, 2, e 4 para os frutos a temperatura ambiente. E para os frutos armazenados sob refrigeração os dias de análise foram: 0, 4, 8 e 12 (Adaptado Vasconcelos de OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

As frutas foram avaliadas quanto ao: pH, acidez total titulável, sólidos solúveis, perda de peso, parâmetros de cor, de acordo com normas preconizadas pela AOAC (2012), e percentual de decomposição (GOL et al., 2013).

5.7.1 pH

O pH foi determinado por pHmetro digital da marca MICRONAL B474 (Método 981.12), sendo verificado diretamente na amostra.

5.7.2 Acidez total titulável

A amostra diluída em água destilada foi acrescida do indicador fenoftaleína. A acidez total titulável, foi determinada por meio da titulação com solução de NaOH 0,1N, utilizando um pHmetro digital (MICRONAL B474) (Método 920.149). Os resultados foram expressos em percentual de ácido cítrico.

5.7.3 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (SS) foi determinado por meio da leitura em refratômetro de bancada modelo MODEIIausJENA, com os resultados expressos em °Brix (Método 932.12).

5.7.4 Parâmetros de cor

A coloração da acerola foi determinada utilizando-se um colorímetro (MINOLTA Co., Osaka, Japão), calibrado em superfície de porcelana branca, que calcula a cor do espectro de reflectância. As leituras foram expressas no módulo $L^*a^* b^*$ que, segundo a CIE

(Commission Internationale de L'Eclairage), definem a cor: L* a luminosidade, a* a intensidade da cor vermelha e verde e b* a intensidade da cor amarela e azul.

5.7.5 Perda de peso

A perda de peso foi medida durante todo o intervalo de tempo de armazenamento das acerolas e calculada de acordo com o preconizado por Meng et al. (2008). As acerolas foram pesadas no dia da aplicação das coberturas e a cada 2 (temperatura ambiente) e 4 dias (refrigeração), seguindo o mesmo período de tempo determinado para as demais análises físico-químicas. O resultado foi calculado com a base no percentual de perda de peso em relação ao peso inicial das frutas (peso referente ao dia da aplicação da cobertura).

5.7.6 Percentual de decomposição

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

5.8 Análises estatísticas

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Atividade Antibacteriana

A crescente demanda dos consumidores por alimentos isentos de agroquímicos tem direcionado as pesquisas para produtos de origem natural com ação antimicrobiana (MIRA; CARVALHO FILHO; VIOLA, 2015). Na literatura, é bem documentada a ação antimicrobiana da quitosana contra fungos e bactérias (PAIVA et al., 2014). Essa ação depende de vários fatores, entre eles, o tipo de quitosana, grau de desacetilação, massa molecular, pH do meio e microrganismo envolvido (HOSSEINNEJAD; JARAFI, 2016).

O resultado da CIM do conjugado quitosana-frutose para bactérias patogênicas veiculadas por alimentos encontra-se na tabela 1. O gel de quitosana/frutose apresentou os melhores resultados para *S. aureus* e *L. monocytogenes* (3mg/ml), bactérias Gram-positivas. E os maiores valores de CIM para *Salmonella spp.* e *E. coli*, bactérias Gram-negativas. Alguns autores relatam que a quitosana possui efeito antimicrobiano em menores concentrações contra bactérias Gram-positivas em relação às bactérias Gram-negativas. Isso se deve as diferentes características da superfície bacteriana, que no caso da bactéria Gram-negativa apresenta uma membrana externa lipopolissacarídica a parede celular, enquanto as Gram-positivas apresentam ácidos teícoicos na superfície da peptideoglicana que possibilita o carreamento de moléculas carregadas positivamente pela parede celular (MELO et al., 2018).

Entretanto, outros estudos referem que a ação antimicrobiana da quitosana é melhor contra bactérias Gram-negativas (LI et al., 2010). Esse tipo de bactéria apresenta uma membrana constituída principalmente de lipopolissacarídeos contendo fosfato e pirofosfato, os quais conferem uma densidade de cargas negativas superior a observada nas bactérias Gram-positivas (parede celular composta de peptideoglicanos). A maior densidade de cargas negativas favorece a ligação da quitosana a célula microbiana, causando vazamento do material intracelular e, portanto, maior efeito inibitório (MELO et al., 2018).

Estudos mostraram que os PRM de quitosana exibem melhor atividade antibacteriana em comparação com a própria quitosana (LUO, et al., 2013; ZHANG; YANG; ZHAO, 2015). PRM de quitosana-frutose e de sistemas modelo de xilano-quitosana apresentaram atividade antibacteriana potencializada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* do que a quitosana isolada (ZHANG; YANG; ZHAO, 2015; WU et al., 2014). A adição do complexo de quitosana-glicose à carne de cordeiro aumentou o tempo de armazenamento em mais de duas semanas durante o armazenamento refrigerado (KANATT; CHANDER; SHARMA,

2008). A quitosana-glucosamina exibiu atividade antibacteriana aumentada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* quando comparada com a quitosana solúvel em ácido (CHUNG; KUO; CHEN, 2005).

No estudo de Sun et al. (2017) quitosana-glicose e quitosana-maltose exibiram melhor atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* do que a *Escherichia coli*, e a quitosana-glicose apresentou atividade antibacteriana mais efetiva. Sugere-se que a razão da atividade inibitória da quitosana em relação às bactérias é que os grupos amino poliaciônicos interagem com os componentes predominantemente aniónicos na superfície bacteriana e alteram a permeabilidade da membrana, em outras palavras, a atividade antibacteriana da quitosana está fortemente associada ao grupo amino catiônico (NH₃⁺). Os grupos amino de quitosana foram parcialmente consumidos durante a RM, mas, curiosamente, os produtos da RM de quitosana solúvel em água foram relatados como tendo uma melhor atividade antibacteriana do que a quitosana sozinha por causa da melhor solubilidade em água da quitosana que pode possibilitar uma melhor internalização da molécula na célula bacteriana (SUN et al., 2017).

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) do gel de quitosana e do gel de quitosana-frutose.

Bactéria	Gel de quitosana	Gel de quitosana-frutose
	(mg/mL)	(mg/mL)
<i>E.coli</i>	5,0	5,0
<i>Salmonella spp.</i>	6,0	4,0
<i>P. aeruginosa</i>	5,0	4,0
<i>S. aureus</i>	4,0	3,0
<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3,0

6.2 Toxicidade da cobertura comestível por HET-CAM e MTT

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

O HET-CAM caracteriza-se como um ensaio de citotoxicidade de grande interesse científico devido ao baixo custo, efetividade e rapidez da análise quando comparado com os testes tradicionais *in vivo* (VARGAS et al., 2007; SAW et al., 2008; AMEEDUZZAFAR et al., 2017). Os efeitos agudos induzidos por uma substância teste sobre os vasos sanguíneos e

proteínas da membrana coriolantóide são propostos para mimetizar o teste Draize do olho do coelho, por ser similar as membranas de mamíferos. Contudo, o HET-CAM apresenta a vantagem de ser mais universalmente aceitável como um teste não animal. As leis que regulam a experimentação animal permitem a utilização de embriões de galinha com até 10 dias de fecundação sem a autorização dos comitês de experimentação animal, sendo o teste de HET-CAM considerado um ensaio *in vitro* (BAGLEY et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2018).

O ensaio foi realizado para análise de efeitos inflamatórios e vasculares causados pelo gel de QTS-F, tendo como padrão de irritação o lauril sulfato de sódio 1%. Não foi observada nenhuma mudança na membrana coriolantóide do embrião, sem sinal de ocorrência de hemorragia, vasoconstricção e coagulação (Figura 3). Resultado semelhante foi encontrado para o sistema quitosana-dextrano (CHAVAN et al., 2017).

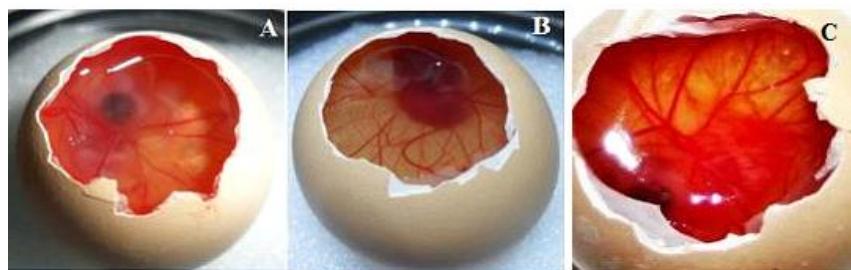


Figura 3 – Resultado do HET-CAM após 5 minutos de exposição ao soro fisiológico (A), ao gel de quitosana/frutose (B) e ao lauril sulfato de sódio (C). Fonte: Autor, 2018.

No presente estudo, o gel de QTS-F mostrou-se não-irritante conforme o HET-CAM, o que possibilita seu uso em alimentos e consequentemente para consumo humano. Com relação ao gel de quitosana, já é um consenso na literatura que seu uso é seguro e não-tóxico ao organismo humano. De acordo com Fai et al. (2008), 18g de quitosana por quilograma de massa corporal não mostra qualquer sinal de toxicidade, o que também viabiliza sua utilização pela indústria de alimentos. Países como Japão, Itália e a Finlândia aprovaram o uso deste polímero para fins dietéticos (KEAN; THANOU, 2010).

6.2.2 Ensaio do 3-[4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL]-2,5-BROMETO DE DIFENIL TETRAZÓLICO (MTT)

O MTT é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, mais especificamente a succinato desidrogenase, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de

coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan [E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan], que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Sendo assim, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, demonstrando a viabilidade celular (MOSMANN, 1983; GRACIOLI et al., 2013).

Tem sido sugerido que alterações na funcionalidade mitocondrial podem estar associadas ao fenômeno de estresse oxidativo, visto que as mitocôndrias constituem o principal ambiente celular de geração de radicais livres (GRACIOLI et al., 2013). O percentual de inibição celular por MTT da cobertura de QTS-F foi inferior a 50% segundo Rodrigues et al., 2014 e Freire et al., 2016, permitindo classificar a mesma como não citotóxica na concentração testada (Tabela 2).

Jung et al. (2014) ao analisar a citotoxicidade por MTT dos PRM de quitoooligômero em células hepáticas, apontaram viabilidade de 100% para todas as concentrações testadas após 24 h, indicando que os PRM do quitoooligômero não eram prejudiciais às células. Tais resultados corroboram com os encontrados na presente pesquisa para a QTS e a QTS-F com as células de macrófagos de camundongos (RAW 264.7), Leucemia promielocítica humana (HL-60) e Carcinoma colorretal humano (HCT116) expostas às substâncias teste.

Tabela 2 – Percentual de inibição das linhagens celulares de macrófagos de camundongos (RAW 264.7), Leucemia promielocítica humana (HL-60) e Carcinoma colorretal humano (HCT116) expostas às substâncias testes, gel de quitosana e gel de quitosana-frutose.

Substâncias Teste	% inibição celular					
	RAW 264.7	EP	HL-60	EP	HCT-116	EP
QTS	0,0	0,0	27,50	2,48	10,65	6,22
QTS-F	0,0	0,0	32,06	5,50	0,00	0,00

*EP = erro padrão

6.3 Atividade antioxidante das coberturas comestíveis

6.3.1 Ensaio de eliminação do radical DPPH e ABTS

No presente estudo, a quitosana/frutose chegou a apresentar percentual de inibição do radical DPPH de 60%, já a quitosana sozinha obteve o maior percentual de 49,4%. Resultados semelhantes foram encontrados por Wu et al. (2014), onde a maior atividade de eliminação de DPPH dos PRM derivados de sistemas modelo de xilano-quitosana/quitoooligômero/cloridrato de glucosamina/taurina foi de 65,9%, 63,7%, 46,4% e 42,5%, respectivamente. No estudo de

Chang, Sung, Chen (2016) as combinações de soluções de frutose-asparagina-quitosana foram dotadas de atividade antioxidante contra o radical DPPH, enquanto a quitosana sozinha mostrou potencial de eliminação menor. A boa atividade de eliminação de radicais dos PRM pode ser atribuída às melanoidinas avançadas, que apresentam alto poder antioxidante através de uma quebra de cadeia, eliminação de oxigênio e mecanismo quelante sem mostrar efeitos citotóxicos (XIE; XU; ZHANG, 2014).

A tabela 3 mostra que as coberturas testadas exibiram atividade antioxidante de forma dose dependente, isto é, com o aumento da concentração das substâncias, houve um aumento de sua atividade antioxidante, resultado similar a MubarakAli et al. (2018). Em relação ao teste do ABTS, o gel de QTS-F apresentou atividade antioxidante significativamente maior do que a QTS isolada, com percentual de inibição de 97% e 91,7% respectivamente na concentração 10mg/ml. Yen et al. (2008) relatou valores de 79,9-85,2% para quitosana de crustáceo também na concentração 10mg/ml.

Tabela 3 – Percentual de inibição do radical DPPH e ABTS pelas coberturas comestíveis: quitosana (QTS) e quitosana-frutose (QTS-F).

Concentração (mg/mL)	DPPH (%)		ABTS (%)	
	QTS	QTS-F	QTS	QTS-F
10	49,4 ($\pm 0,02$) ^{aA}	60,0 ($\pm 0,10$) ^{bA}	91,7 ($\pm 0,04$) ^{aA}	97,0 ($\pm 0,33$) ^{bA}
5	48,5 ($\pm 0,07$) ^{aB}	58,6 ($\pm 0,04$) ^{bB}	15,6 ($\pm 0,12$) ^{aB}	33,2 ($\pm 0,13$) ^{bB}
2,5	47,8 ($\pm 0,05$) ^{aC}	57,9 ($\pm 0,09$) ^{bC}	12,4 ($\pm 0,08$) ^{aC}	18,7 ($\pm 0,04$) ^{bC}

^{a-b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney.

^{A-C}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de tukey.

6.3.2 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Sabe-se que o poder redutor é um importante indicador de atividade antioxidante, que foi utilizado para avaliar as transformações de Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de QTS e QTS-F e expresso em absorbância de 595 nm, em que a maior absorbância indicou maior atividade redutora (ZHANG; ZHAO, 2015). No presente estudo, a cobertura de quitosana-frutose apresentou poder redutor significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com a quitosana pura (Figura 4) em todas as concentrações, mostrando uma relação dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração da cobertura, maior o poder redutor. Bem como no estudo de Zhang et al. (2016), onde o poder redutor dos PRM de alfa e beta quitosana foram

respectivamente 0,2093, e 0,2387, e significativamente maior do que alfa e beta quitosana (0,091 e 0,115). A atividade redutora das soluções de RM pode ser atribuída à capacidade de doação de hidrogênio da quitosana, que quebrou a cadeia do radical livre e doou um átomo de hidrogênio. Após a RM, as pontes de hidrogênio intramoleculares da quitosana foram destruídas, dessa forma, grupos mais hidroxilas podem ser expostos, resultando em maior capacidade de doação de hidrogênio (ZHANG et al., 2016).

Por outro lado, estudos anteriores sobre conjugados de quitosana-glicose relataram poder redutor insignificante (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2008). Isso pode ser devido ao grau de desacetilação e massa molar da quitosana utilizada no estudo em comparação com a presente pesquisa. Outra possível explicação seria pelas diferenças nas condições de reação e na concentração dos reagentes usados nos estudos (KOSARAJU et al., 2010).

Os resultados discutidos nestes trabalhos refletem a variação dos produtos intermediários da reação formados, dependendo dos reagentes envolvidos e das condições de reação empregadas (KOSARAJU et al., 2010).

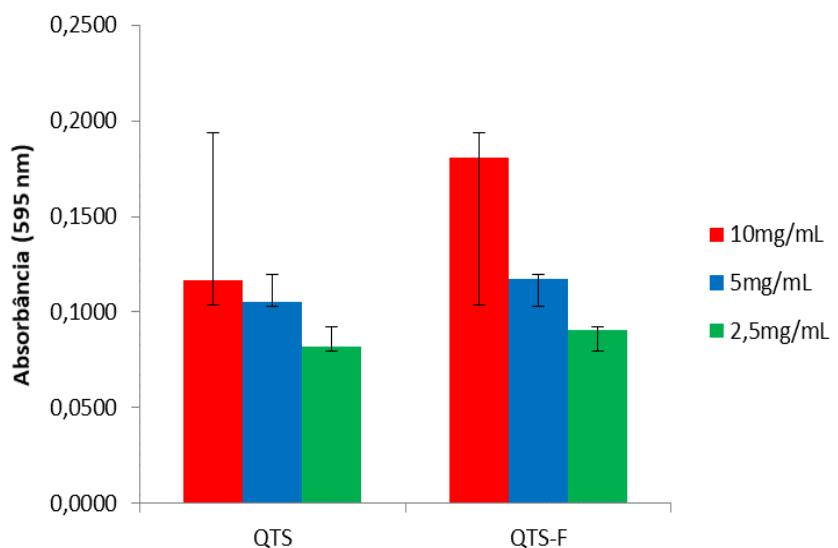


Figura 4 – Poder antioxidante de redução do ferro das coberturas comestíveis: quitosana (QTS) e quitosana-frutose (QTS-F). Fonte: Autor, 2018.

6.4 Efeito das coberturas comestíveis sobre os parâmetros físico-químicos das acerolas

6.4.1 Análise do pH, sólidos solúveis e acidez total titulável

A verificação dos parâmetros físico-químicos durante o armazenamento não refrigerado e refrigerado de acerolas tratadas com glicerol 1%, quitosana, quitosana-frutose ou sem tratamento está apresentada nas tabelas 4 e 5. Quanto aos valores de pH neste estudo, entre os tratamentos, não houve modificações consideráveis ($p > 0,05$), na maior parte do armazenamento refrigerado e não refrigerado. Em temperatura ambiente, o pH variou de 3,38 a 3,62 e em temperatura de refrigeração a variação foi de 3,42 a 3,54. Estes resultados corroboram com o estudo de Ferreira et al. (2016), que desenvolveram revestimentos e filmes comestíveis para estender a vida útil de acerolas, onde não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de pH durante o período de armazenamento, independentemente dos frutos serem revestidos ou não. Oliveira et al. (2012) descreveram valores de pH em acerola variando de 3,13 a 3,50, enquanto Santos et al. (2012) relataram valores de pH variando de 3,39 a 3,52. Dados semelhantes também foram evidenciados por Sagar et al. (2013) e Mamede et al. (2009), que relataram que o pH apresentou baixa variabilidade durante o armazenamento de acerola. Portanto, as variações de pH em acerolas podem ser atribuídas a variabilidade natural da fruta e não aos tratamentos empregados.

No presente estudo, o teor de sólidos solúveis (SS) nas acerolas variou de 7,03 a 9,66 °Brix. Estes resultados diferem dos relatados por Brunini et al. (2004) (5,67-8,22 °Brix), Ferreira et al. (2016) (6,59 a 8,73 °Brix) e Sagar et al. (2013) (média de 6,2 °Brix). Nos tempos zero (refrigerado e não refrigerado) e 12 (refrigerado), o conteúdo de sólidos solúveis não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre as acerolas com e sem coberturas comestíveis de quitosana. No entanto, no 4º e 8º dia de análise foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de SS das acerolas com e sem cobertura mantidas sob refrigeração.

Alguns autores têm encontrado teores de SS para acerolas maduras, variando de 7,47 a 8,73 °Brix (MUSSER et al., 2004) e 6,2 a 8,1 °Brix (NASSER; ZONTA, 2014). Os valores de SS para acerolas do nordeste podem variar de 5 a 12 °Brix, sendo a média em torno de 7 a 8 °Brix. A chuva ou o uso de irrigação excessiva, muitas vezes, reduz o conteúdo de açúcares. As variações numa mesma espécie são decorrentes de fatores diversos como cultivares, tipo de solo, condições climáticas e práticas culturais (CHITARRA; CHITARRA, 2005; MACIEL et al., 2010).

Tabela 4 – Média dos valores dos parâmetros físico-químicos das acerolas armazenadas em temperatura ambiente (25°C) por 4 dias.

	Dias de armazenamento		
	0	2	4
pH			
Controle	3,54 ($\pm 0,03$) ^{aB}	3,42 ($\pm 0,00$) ^{aA}	*
Glicerol	3,53 ($\pm 0,00$) ^{aB}	3,38 ($\pm 0,00$) ^{bA}	*
QTS-F	3,48 ($\pm 0,01$) ^{aA}	3,51 ($\pm 0,01$) ^{cB}	3,53 ($\pm 0,00$) ^{aB}
QTS	3,47 ($\pm 0,01$) ^{aA}	3,49 ($\pm 0,00$) ^{dA}	3,62 ($\pm 0,00$) ^{aB}
Sólidos solúveis (°Brix)			
Controle	7,9 ($\pm 0,05$) ^{aA}	8,86 ($\pm 0,05$) ^{aB}	*
Glicerol	8,0 ($\pm 0,00$) ^{aA}	8,76 ($\pm 0,05$) ^{aB}	*
QTS-F	8,0 ($\pm 0,00$) ^{aA}	9,33 ($\pm 0,57$) ^{aB}	7,53 ($\pm 0,05$) ^{aA}
QTS	8,0 ($\pm 0,00$) ^{aB}	9,66 ($\pm 0,57$) ^{aC}	7,03 ($\pm 0,05$) ^{aA}
Acidez titulável (%ác. cítrico)			
Controle	1,45 ($\pm 0,01$) ^{aA}	1,92 ($\pm 0,01$) ^{aB}	*
Glicerol	1,47 ($\pm 0,01$) ^{aA}	1,78 ($\pm 0,01$) ^{bB}	*
QTS-F	1,50 ($\pm 0,02$) ^{bA}	1,54 ($\pm 0,04$) ^{cA}	1,55 ($\pm 0,02$) ^{aA}
QTS	1,33 ($\pm 0,02$) ^{cB}	1,50 ($\pm 0,00$) ^{dC}	1,19 ($\pm 0,01$) ^{bA}

^{a-d} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.^{A-C} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey.

*Frutos descartados devido à presença de contaminação microbiana.

Tabela 5 – Média dos valores dos parâmetros físico-químicos das acerolas armazenadas em refrigeração (12°C) por 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento			
	0	4	8	12
pH				
Controle	3,54 ($\pm 0,03$) ^{aB}	3,42 ($\pm 0,00$) ^{aA}	3,42 ($\pm 0,00$) ^{aA}	3,42 ($\pm 0,00$) ^{aA}
Glicerol	3,53 ($\pm 0,00$) ^{aB}	3,43 ($\pm 0,00$) ^{aA}	3,43 ($\pm 0,00$) ^{aA}	3,43 ($\pm 0,00$) ^{aA}
QTS-F	3,48 ($\pm 0,01$) ^{aA}	3,44 ($\pm 0,01$) ^{aA}	3,54 ($\pm 0,01$) ^{bB}	3,43 ($\pm 0,00$) ^{aA}
QTS	3,47 ($\pm 0,01$) ^{aA}	3,53 ($\pm 0,03$) ^{bB}	3,47 ($\pm 0,00$) ^{aA}	3,49 ($\pm 0,00$) ^{aA}
Sólidos solúveis (°Brix)				
Controle	7,9 ($\pm 0,05$) ^{aB}	7,20 ($\pm 0,10$) ^{aA}	7,10 ($\pm 0,10$) ^{bA}	7,93 ($\pm 0,11$) ^{aC}
Glicerol	8,0 ($\pm 0,00$) ^{aC}	7,46 ($\pm 0,05$) ^{bA}	7,56 ($\pm 0,05$) ^{aA}	7,96 ($\pm 0,05$) ^{aB}
QTS-F	8,0 ($\pm 0,00$) ^{aA}	9,66 ($\pm 0,57$) ^{cB}	7,56 ($\pm 0,15$) ^{aA}	7,70 ($\pm 0,26$) ^{aA}
QTS	8,0 ($\pm 0,00$) ^{aA}	9,66 ($\pm 0,57$) ^{cB}	7,90 ($\pm 0,17$) ^{aA}	7,83 ($\pm 0,28$) ^{aA}
Acidez titulável (% ác. cítrico)				
Controle	1,45 ($\pm 0,01$) ^{aA}	1,83 ($\pm 0,01$) ^{aB}	1,80 ($\pm 0,01$) ^{aB}	1,80 ($\pm 0,01$) ^{aB}
Glicerol	1,47 ($\pm 0,01$) ^{aA}	1,87 ($\pm 0,01$) ^{aB}	1,80 ($\pm 0,01$) ^{aC}	1,78 ($\pm 0,04$) ^{aC}
QTS-F	1,50 ($\pm 0,02$) ^{aB}	1,55 ($\pm 0,00$) ^{bC}	1,54 ($\pm 0,01$) ^{bC}	1,35 ($\pm 0,00$) ^{bA}
QTS	1,33 ($\pm 0,02$) ^{bA}	1,63 ($\pm 0,02$) ^{cB}	1,71 ($\pm 0,00$) ^{cC}	1,34 ($\pm 0,00$) ^{bA}

^{a-d} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.^{A-C} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Os valores de acidez total titulável (ATT) oscilaram entre 1,33 a 1,92 mg/100 de ácido cítrico na presente pesquisa. Valores semelhantes foram verificados em estudos prévios que avaliaram propriedades de acerola (OLIVEIRA et al., 2012; SAGAR et al., 2013). A cobertura comestível QTS-F foi a que melhor manteve os valores de ATT nas acerolas em ambas as temperaturas de armazenamento em comparação com a cobertura de QTS. A diminuição da perda de acidez titulável em frutas cobertas com quitosana durante o armazenamento também foi observada em estudos realizados em goiaba e lichia, que sugerem uma diminuição da senescência das frutas causada pela cobertura de quitosana (HONG et al., 2012; PETRICCIONE et al., 2015).

De acordo com Chim et al. (2013), os frutos carnosos como acerola têm como característica comum a riqueza em açúcares e acidez relativamente alta. Já que a concentração da acidez, geralmente, não excede 1,5% a 2%, os resultados encontrados nas acerolas estudadas mostram a elevada acidez característica da fruta.

O estado de conservação de frutas pode ser avaliado pela acidez, importante característica em relação ao sabor, juntamente com os valores de sólidos solúveis. Em geral, quando uma fruta passa do estádio de maturação para a senescência, ocorrem várias reações de decomposição, sejam elas por hidrólise, oxidação ou fermentação, alterando dessa forma a concentração dos íons de hidrogênio e, consequentemente, alterando a acidez (SILVA et al., 2013).

Neste sentido, a cobertura comestível torna-se uma alternativa para limitar este processo respiratório e metabólico da fruta reduzindo a perda de componentes nutricionais como os sólidos solúveis e acidez titulável. No presente estudo, as frutas tratadas com cobertura de quitosana/frutose foram as mais eficazes em retardar o consumo de componentes nutricionais importantes como a acidez titulável.

6.4.2 Parâmetros de cor

A coloração dos frutos é um importante atributo de qualidade, pois além de contribuir para uma boa aparência, influencia diretamente a preferência do consumidor. Durante o amadurecimento, a maioria dos frutos sofre mudanças na cor, sobretudo na casca (MOTTA et al., 2015). Os resultados da análise da cor das acerolas não refrigeradas e refrigeradas encontram-se nas tabelas 6 e 7.

Na presente pesquisa, as acerolas em temperatura ambiente, o valor de L* aumentou do dia 0 em relação ao dia 2, sendo observadas diferenças significativas ($p<0,05$) entre o grupo controle e os grupos tratados com as coberturas no segundo dia de análise. É importante salientar que, das frutas armazenadas em temperatura ambiente (25°C), os controles

apresentaram contaminação microbiana no 3º dia. Já no quarto dia, nas acerolas tratadas com QTS houve um aumento de L^* enquanto no grupo QTS-F houve uma diminuição, mas que não foi significativa ($p>0,05$) em relação ao segundo dia de armazenamento.

No armazenamento refrigerado (12°C), o valor de L^* aumentou durante o tempo de armazenamento, porém não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos analisados nos tempos 0, 4 e 8. No 12º dia de armazenamento, houve uma redução no valor de L^* das acerolas sem cobertura refrigeradas, diferindo significativamente ($p<0,05$) dos demais grupos, mostrando que as coberturas auxiliam na manutenção da luminosidade das acerolas.

A perda de água e o escurecimento superficial são um dos responsáveis por ocasionar a diminuição do brilho em frutas sem coberturas comestíveis como pode ser constatado na presente pesquisa e em outros estudos (BRASIL et al., 2012; PERDONES et al., 2012; VELICKOVA et al., 2013). O escurecimento durante o armazenamento está associado também ao maior metabolismo da fruta, onde ocorrem diversas reações enzimáticas e não enzimáticas (ADILLETA et al., 2016). Nesse sentido, as coberturas a base de quitosana produzidas na presente pesquisa atuam diminuindo o processo metabólico das acerolas e assim evitam o seu escurecimento, o que é potencializado em temperatura de refrigeração.

Os valores de a^* não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre os tratamentos na maior parte do armazenamento refrigerado e não refrigerado. Sendo que, as amostras tratadas com glicerol apresentaram menor variabilidade para este parâmetro. Houve uma queda no valor de a^* no 12º dia do armazenamento da acerola controle sob refrigeração, com diferença significativa em relação aos outros tratamentos, devido provavelmente à mudança da coloração para púrpuro escuro.

Quanto ao atributo b^* , os valores estiveram no eixo positivo, o que indica a leve presença da tonalidade amarela. Acerolas revestidas apresentaram valores crescentes de b^* no decorrer do armazenamento em ambas as temperaturas, porém, houve uma diminuição dos valores ao final do 12º de análise para todos os grupos sob refrigeração, exceto para o tratamento glicerol, com destaque para o grupo controle que diferiu significativamente dos demais grupos, demonstrando maior presença da tonalidade amarela na casca.

Esses resultados corroboram com os relatados por Jo et al. (2014) que mostraram que as coberturas comestíveis a base de polissacarídeos, como a quitosana, modificam a atmosfera interna de maçã diminuindo as mudanças na cor da fruta. De maneira geral, as coberturas comestíveis produzidas mantiveram as características da cor das acerolas em relação ao grupo controle.

Tabela 6 – Efeito das coberturas a base de quitosana e quitosana/frutose sobre a cor das acerolas armazenadas em temperatura ambiente (25°C) por 4 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	2	4
L*			
Controle	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	31,25 ($\pm 0,84$) ^{aA}	*
Glicerol	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	34,91 ($\pm 1,96$) ^{bA}	*
QTS-F	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	38,95 ($\pm 0,07$) ^{bB}	38,35 ($\pm 0,52$) ^{aB}
QTS	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	36,36 ($\pm 1,08$) ^{bB}	39,02 ($\pm 0,49$) ^{aB}
a*			
Controle	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aA}	11,07 ($\pm 1,73$) ^{aA}	*
Glicerol	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aA}	15,36 ($\pm 2,59$) ^{bA}	*
QTS-F	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aA}	26,05 ($\pm 2,66$) ^{cB}	24,60 ($\pm 1,46$) ^{aB}
QTS	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aA}	20,03 ($\pm 2,41$) ^{dB}	21,08 ($\pm 0,35$) ^{aB}
b*			
Controle	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	3,60 ($\pm 1,24$) ^{aA}	*
Glicerol	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	4,59 ($\pm 0,58$) ^{bA}	*
QTS-F	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	10,88 ($\pm 2,36$) ^{dB}	11,36 ($\pm 1,19$) ^{aB}
QTS	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	8,05 ($\pm 0,44$) ^{cB}	9,42 ($\pm 1,07$) ^{bB}

*Frutos descartados devido à presença de contaminação microbiana

L* (luminosidade), a* (vermelho/verde) e b* (amarelo/azul)

a-d Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.

A-C Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Tabela 7 – Efeito das coberturas a base de quitosana e quitosana/frutose sobre a cor das acerolas armazenadas sob refrigeração (12°C) por 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento			
	0	4	8	12
L*				
Controle	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	33,77 ($\pm 0,45$) ^{aA}	38,59 ($\pm 0,87$) ^{aB}	31,15 ($\pm 0,97$) ^{aA}
Glicerol	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	34,91 ($\pm 1,96$) ^{aA}	39,66 ($\pm 0,30$) ^{aB}	39,26 ($\pm 0,82$) ^{bB}
QTS-F	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	39,02 ($\pm 0,19$) ^{aB}	37,23 ($\pm 0,22$) ^{aB}	37,21 ($\pm 0,98$) ^{bB}
QTS	30,78 ($\pm 1,20$) ^{aA}	38,02 ($\pm 0,03$) ^{aB}	40,40 ($\pm 0,93$) ^{aB}	38,39 ($\pm 0,84$) ^{bB}
a*				
Controle	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aA}	16,34 ($\pm 0,39$) ^{aA}	14,92 ($\pm 0,70$) ^{aA}	8,6 ($\pm 0,97$) ^{aB}
Glicerol	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aA}	15,36 ($\pm 0,59$) ^{aA}	15,05 ($\pm 0,23$) ^{aA}	16,14 ($\pm 0,89$) ^{bA}
QTS-F	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aB}	25,93 ($\pm 0,59$) ^{bD}	8,06 ($\pm 0,02$) ^{aA}	18,74 ($\pm 1,46$) ^{bC}
QTS	13,52 ($\pm 1,17$) ^{aA}	21,08 ($\pm 0,55$) ^{aB}	23,17 ($\pm 0,21$) ^{bB}	12,85 ($\pm 0,32$) ^{bA}
b*				
Controle	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	5,77 ($\pm 0,24$) ^{aA}	4,70 ($\pm 0,37$) ^{aA}	4,19 ($\pm 0,53$) ^{bA}
Glicerol	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	4,59 ($\pm 0,58$) ^{aA}	7,09 ($\pm 0,03$) ^{bA}	8,34 ($\pm 0,19$) ^{aA}
QTS-F	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	10,99 ($\pm 0,44$) ^{bB}	9,39 ($\pm 0,86$) ^{bB}	7,83 ($\pm 0,36$) ^{aB}
QTS	4,93 ($\pm 1,04$) ^{aA}	9,42 ($\pm 0,63$) ^{aB}	9,41 ($\pm 0,80$) ^{bB}	5,83 ($\pm 0,44$) ^{aA}

L* (luminosidade), a* (vermelho/verde) e b* (amarelo/azul)

a-b Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.

A-D Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey.

6.4.3 Perda de peso

A perda de peso em frutas e vegetais frescos é atribuída principalmente à diminuição de água causada por transpiração e respiração e é uma das principais causas de deterioração da qualidade (DONG et al., 2015). No presente trabalho, em temperatura ambiente, no 2º dia de análise, foi encontrada a menor perda de peso nas acerolas tratadas com quitosana e com quitosana/frutose (controle: 1,26%; glicerol: 2,57%; QTS:0,57%; QTS-F: 0,38%). No 3º dia de armazenamento, os frutos dos tratamentos controle e glicerol apresentavam-se impróprios para consumo, impedindo a realização de novas análises. Os tratamentos QTS e QTS-F no 4º dia de análise apresentaram percentual de perda de peso respectivamente de 1,26% e 0,67%.

Em relação aos frutos mantidos sob refrigeração, também foram verificadas as menores perdas de peso nas acerolas revestidas com as coberturas de quitosana ao longo de todo período de armazenamento. Enquanto que as maiores perdas foram registradas no 12º dia de armazenamento para o grupo controle e glicerol (controle: 2,32%; glicerol: 4,34%; QTS: 0,27%; QTS-F: 0,25%).

Esses resultados estão de acordo com Mariano-Nasser et al. (2016), que ao pesquisarem coberturas comestíveis de quitosana observaram que essas coberturas proporcionaram menor perda de peso em mangabas. Em pesquisa com goiaba cv. Pedro Sato (Soares et al., 2011), manga cv. Tommy Atkins (Souza et al., 2011) e pseudofruto do cajueiro (Ferreira et al., 2010) foram evidenciadas menores perdas de massa fresca em frutos tratados com película de quitosana, quando comparados com os frutos controle. Tezotto-Uliana et al. (2014), em estudo com framboesas, apontaram concentrações de 1% e 2% de quitosana como eficazes na manutenção do peso dos frutos em pós-colheita.

Os resultados obtidos na presente pesquisa, bem como os supracitados de outros autores, sugerem que as coberturas de quitosana funcionam como barreira contra perda de água, uma vez que o polímero apresenta propriedade higroscópica e absorve a água na superfície da fruta. Isto faz com que haja uma modificação do ambiente ao redor dos frutos, dificultando a entrada do oxigênio do ambiente e a perda do CO₂, reduzindo dessa forma a respiração dos frutos (MARIANO-NASSER et al. 2016).

Forato et al. (2015), ao avaliar o efeito de revestimentos comestíveis preparados com goma de cajueiro e carboximetilcelulose na conservação de goiabas frescas e cortadas, também verificaram que as amostras não revestidas apresentaram rápida taxa de degradação. Diferentemente, os frutos que receberam revestimentos obtiveram maior tempo de conservação. Dessa forma, os autores concluíram que as coberturas aturam positivamente, como agente conservante retardando a perda de massa nos frutos.

6.4.4 Percentual de decomposição das frutas

O menor percentual de decomposição encontrado foi o das acerolas refrigeradas (controle: 0%; glicerol: 0%; QTS: 0%; QTS-F: 0%) ao final do período de análise. As acerolas não refrigeradas sem coberturas apresentaram resultados elevados de decomposição no 4º dia de armazenamento (controle: 100%; glicerol: 100%; QTS: 46,25% e QTS-F: 35%). Os frutos do tratamento controle (25°C) apresentavam-se impróprios para o consumo no terceiro dia de armazenamento.

Nenhuma das coberturas manteve a inibição total de infecções em temperatura ambiente, contudo, a cobertura de quitosana-frutose foi a que obteve menor percentual de decomposição microbiana, o que pode ser devido a potencialização da ação antimicrobiana do polímero, bem como pela melhor ação antioxidante. Vale ressaltar que, com base na avaliação visual dos sintomas de lesão, acerolas revestidas com cobertura e armazenadas à temperatura ambiente exibiram um aumento na vida útil de 100% em comparação com frutos não revestidos, conseguindo manter a qualidade até o quarto dia de armazenamento.

No estudo de Dong et al. (2015) o percentual de decomposição de morangos também aumentou gradualmente com o tempo de armazenamento. No final do armazenamento, 93% dos morangos do grupo controle mostraram sinais visuais de decomposição. Os morangos revestidos com quitosana apresentaram percentual de decomposição de 66,7%, sendo a menor percentagem de decomposição relatada pelos autores.

Na presente pesquisa, as acerolas com as coberturas de quitosana mantidas no armazenamento refrigerado ao final do período de análise (12 dias) estavam próprias para consumo, com ausência de infecções visíveis. Moreira et al. (2010), verificaram que acerolas tratadas com quitosana apresentaram condições favoráveis para consumo sem sinal de contaminação fúngica até o nono dia de armazenamento sob refrigeração.

Segundo Cabanez et al. (2016), frutas armazenadas a baixas temperaturas apresentam uma diminuição nos processos fisiológicos, bem como um retardo no desenvolvimento de microrganismos. Isto reduz à incidência de apodrecimento da acerola armazenada em refrigeração em comparação com as frutas armazenadas a temperatura ambiente, corroborando com os resultados encontrados na presente pesquisa.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- A cobertura de quitosana/frutose produzida apresenta atividade antioxidante superior a quitosana pura, bem como ação antimicrobiana potencializada, principalmente para bactérias Gram-positivas.
- A cobertura produzida mostrou-se não-irritante e não citotóxica conforme os ensaios HET-CAM e MTT.
- O revestimento com quitosana/frutose é eficaz no retardo da deterioração microbiana e da perda de massa nas acerolas em ambas as temperaturas de armazenamento.
- Quanto às demais características de qualidade do fruto não foram observadas influências significativas dos revestimentos.

REFERÊNCIAS

ADRIANO, E.; LEONEL, S. Fenologia da aceroleira cv. Olivier em Junqueirópolis-SP. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal*, v. 34, n. 2, p. 469-474, 2012.

ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, v. 48, p. 589- 601, 1988.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, 31, 1224-1229, 2008.

ALMEIDA, J. P. N.; DANTAS, L. L. G. R. Fungo micorrízico arbuscular e extrato de algas no crescimento inicial de portaenxerto de aceroleira. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 57, n. 1, p. 22-28, 2014.

AMEEDUZZAFAR, S. S.I.; BUKHARI, S. N.A.; ALI, A. Preparation and evaluation of novel chitosan: gelrite ocular system containing besifloxacin for topical treatment of bacterial conjunctivitis: scintigraphy, ocular irritation and retention assessment. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017.

ABREU, F. O. M. S.; CAVALCANTE, L. G.; DOUDEMENT, P. V.; CASTRO, A. M.; NASCIMENTO A. P. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Microondas. *Polímeros*, v. 23, n. 5, p. 630-635, 2013.

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

AMARAL, D. S.; CARDELLE-COBAS, A.; NASCIMENTO, B. M. S.; MADRUGA, M. S.; PINTADO, M. M. E. Goat sausages containing chitosan towards a healthier product: microbiological, physico-chemical textural evaluation. *Food & Function*, v. 7, n. 9, p. 4020–4029, 2016.

ARAUJÓ, E. R.; SILVA, P. K.; NASCIMENTO, M. F.; NASCIMENTO, N. F. F; BAIRRAL, M. A. A.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R. Desenvolvimento de geleia de pimenta com acerola: Análise sensorial e aceitação comercial. *Revista AGROTEC*, v. 35, n. 1, p 81–88, 2014.

ARAÚJO, M. N. T.; CASTRO, R. S.; RODRIGUES, A. C.S; RÊGO, J. F.; UCHÔA, V. T. Avaliação do teor de vitamina c em polpas de acerola comercializadas em supermercados de Piriri-PI. **Ciência Agrícola**, Rio Largo, v. 15, n. 1, p. 59-68, 2017.

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.

BRABER, N. L.V.; LADISLAO I.D'IAZ VERGARA, FAUSTINO E.MORAN VIEYRA, CLAUDIO D.BORSARELLI, MARIANA M.YOSSEN, JORGE R.VEGA, SILVIA G.CORREA, MARIANA A.MONTENEGRO. Physicochemical Characterization of Water-Soluble Chitosan Derivatives with Singlet Oxygen Quenching and Antibacterial Capabilities, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 200-207, 2017.

BAKRY, A. M. R. M.; MA, C.; XIONG, S.; YIN, T.; ZHANG, B.; HUANG, Q. Chitosan-glucose Maillard reaction products and their preservative effects on fresh grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during cold storage. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, 2018.

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

BRUNINI, M. A.; MACEDO, N. B.; COELHO, C. V.; SIQUEIRA, G. F. Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Rev Bras Fruticult**, v. 26, p.486–489 2004.

CABANEZ, P. A.; CARVAJAL, N. A. V.; PEREIRA, L. R.; CORREIA, A. O.; SILVA, S. F.; VENIAL, L. R.; BERNARDES, C. O. Uso do frio na conservação das frutas: uma revisão de literatura. **Revista UNIVAP**, v. 22, n. 40, 2016.

CHANG, H. L., CHEN, Y. C., & TAN, F. J. Antioxidative properties of a chitosan– glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage. **Food Chemistry**, 124, 589–595, 2011.

CHAVAN, C., BALA, P., PAL, K., KALE, S. N. Cross-linked chitosan-dextran sulphate vehicle system for controlled release of ciprofloxacin drug: An ophthalmic application. **OpenNano**, v. 2, p. 28–36, 2017.

CHÁVEZ DE PAZ, L., et al. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *streptococcus mutans* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.11, p.3892-3895, 2011.

CHEN, W.; LI, Y.; YANG, S.; YUE, L.; JIANG, Q.; XIA, W. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles, **Carbohydrate Polymers**, 2015.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; RODRIGUES, R. S. Estabilidade da vitamina C em néctar de acerola sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 321-327, 2013.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio.** 2.ed. Lavras: UFLA, 2005. 785p.

CHUNG, Y. C., KUO, C. L., CHEN, C. C. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. **Bioresource Technol**, v. 96, p. 1473–1482, 2005.

DONG, F.; LI, S.; LIU, Z.; ZHU, K.; WANG, X.; JIN, C. Improvement of quality and shelf life of strawberry with Nanocellulose/chitosan composite coatings. **Bangladesh J. Bot**, v. 44, n. 5, p. 709-717, 2015.

EMBRAPA. Contribuições das pesquisas realizadas na Embrapa Semiárido para a cultura da aceroleira / Flávio de França Souza [et al.]. — Petrolina: Embrapa Semiárido, 2017.

EMBRAPA. Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido Petrolina. Colheita e armazenamento de acerola destinada ao consumo *in natura*. Sérgio Tonetto de Freitas [et al.]. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; et al. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**, v.16, p.7143-7154, 2011.

FERNANDEZ-SAIZ, P., et al. Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in laboratory media and in fish soup. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.2-3, p.287-294, 2010.

FERREIRA, A. P. S.; ISEPON, J. S.; MOREIRA, E. R.; ATÍLIO, L. B.; BOLIANI, A. C. Qualidade pós-colheita do pseu-dofruto do cajueiro sob ação de quitosana e refrigeração. **Cultura Agronômica**, v. 19, n. 1, p. 64-70, 2010.

FERREIRA, M. S. L; FAI, A. E. C.; ANDRADE, C. T.; PICCIANI, P. H.; AZERO, E. G.; GONÇALVES, E. C. B. A. Edible films and coatings based on biodegradable residues applied to acerolas (*M. alpighia punicifolia* L.). **J Sci Food Agric**, v. 96, p. 1634–1642, 2016.

FIGUEIREDO NETO, A.; REIS, D. S.; ALVES, E.; GONÇALVES, E.; ANJOS, F. C.; FERREIRA, M. Determinação de vitamina c e avaliação físico-química em três variedades de acerola cultivadas em Petrolina-PE. **Nucleus**, v.11, n.1, 2014.

FORATO, L.A.; BRITO, D.; RIZZO, J. S.; GASTALDI, T.A.; ASSIS, O.B.G. Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 5, p. 68-74, 2015.

FREIRE, P.L.L.; ALBUQUERQUE, A.J.R.; FARIAS, I.A.P.; SILVA, T.G.; AGUIAR, J.S.; GALEMBECK, A.; FLORES, M.A.P.; SAMPAIO, F.C.; STAMFORD, T.C.M.; ROSENBLATT, A. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan – silvernanoparticles – fluoride nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 896–903, 2016.

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

GRACIOLI, E.C.; WINTER, P.; ZIULKOSKI, A.L.; SPILKI, F.; DULLIUS, J.; EINLOFT, S.; PERINI, S.; BODANESE, L.C.; JAHNO, V.D.; LIGABUE, R.A. Dispositivos poliméricos cardiovasculares: comportamento termomecânico e viabilidade celular. **Revista Matéria**, v. 18, n. 2, pp. 1313 –1322, 2013.

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

GONÇALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

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

HAFDANI, F.N.; SADEGHINIA, N. A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial. **World Acad. Sci.**, v. 50, p. 252-256, 2011.

KNIDRI, H. E.; BELAABED, R.; ADDAOU, A.; LAAJEB, A.; LAHSINI, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan: A review. **Biomac**, 2018.

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

JEONG, K., et al. Reduction of Escherichia coli O157:H7 shedding in cattle by addition of chitosan microparticles to feed. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.8, p.2611-2616, 2011.

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

JUNG, W.K.; PARK, P.J.; AHN, C. B.; JE, J.Y. Preparation and antioxidant potential of maillard reaction products from (MRPs) chitooligomer. **Food Chem**, p. 145:173-178, 2014.

KAMBOJ, S.; SINGH, K.; TIWARY, A.K.; RANA, V. Optimization of microwave assisted Maillard reaction to fabricate and evaluate corn fiber gum-chitosan IPN films. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p.260-276, 2015.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan glucose complex—A novel food preservative. **Food Chemistry**, 106, 521-528, 2008.

LI, B.; LECOURT, J. & BISHOP, G. Advances in Non-Destructive Early Assessment of Fruit Ripeness towards Defining Optimal Time of Harvest and Yield Prediction—A Review. **Plants**, vol. 7, n. 3, p. 1-20, 2018.

LI, Y. et al. Preparation and functional properties of blend films of gliadins and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 81, n. 2, p. 484-490, 2010.

LI, SONG-LIN; LIN, J.; CHEN, XIAO-MING. Effect of chitosan molecular weight on the functional properties of chitosan-maltose Maillard reaction products and their application to fresh-cut *Typha latifolia L.* **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 682- 690, 2014.

LUO, Y.; LING, Y.; WANG, X.; HAN, Y.; ZENG, X.; SUN, R. Maillard reaction products from chitosan–xylan ionic liquid solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 835- 84, 2013.

LUZ, M. N. C.; FRAGA, E. G. S. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de própolis vermelha frente ao propionibacterium acnes. Mostra Científica da Farmácia, 10., 2016, Quixadá. Anais... Quixadá: Centro Universitário Católica de Quixadá, 2016.

MAMEDE, M. E.O.; MIRANDA, M. P. S.; RITZINGER, R.; GODOY, R. C. B.; VELOZO, E. S. Physicochemical and sensorial evaluation of new varieties of acerola. **Br Food J**, v. 111, p. 387-395, 2009.

MARIANO-NASSER, F. A. C.; BOLIANI, A. C.; NASSER, M. D.; PAGLIARINI, M. K.; MENDONÇA, V. Z. Conservação de mangabas submetidas à aplicação de quitosana. **Científica, Jaboticabal**, v.44, n.3, p.279-285, 2016.

MARPU, S. B.; BENTON, E. N. Shining Light on Chitosan: A Review on the Usage of Chitosan for Photonics and Nanomaterials Research.. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, 2018.

MELO, N. F. C B.; SOARES, BLM; DINIZ, KM; LEAL, C.F.; CANTO, D; FLORES, MAP, et al. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.139, p. 56-66, 2018.

MIRA, I.; CARVALHO FILHO, C. D.; VIOLA, D. N. Composição ideal da solução filmogênica adicionada de prebiótico, aplicada em uvas ‘thompson’. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**, v. 37, n. 2, p. 308-317, 2015.

MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Effect of chitosan molecular weight as micro and nanoparticles on antibacterial activity against some soft rot pathogenic bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 347-355, 2016.

MOREIRA, E. R.; ISEPON, J. S.; SANTOS, P. C.; FERREIRA, A. P. S.; ATÍLIO, L. B.; CAVALLINI, M. C.; MARIANO, F. A. C. TAKAO, W. Uso de revestimento de biofilme-quitosana para conservação de frutos de acerola. **Cultura Agronômica**, v. 19, n.3, 2010.

MORAES, I.A.; SOUZA, A. R.M.; LIMA, P. K. D.; MELLO, L. M. L.; ARTHUR, VALTER. Efeito de Diferentes Doses de Radiação Gama na Solução de Quitosana. **Revista Agrarian**, v.10, n.37, p. 270-, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTA, J. D.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; SOUSA, K. S. M. Índice de cor e sua correlação com parâmetros físicos e físico-químicos de goiaba, manga e mamão. **Comunicata Scientiae**, v. 6 n.1, p. 74-82, 2015.

MULEY, A. B.; CHAUDHARI, S. A.; MULCHANDANI, K. H.; SINGHAL, R. S. Extraction and characterization of chitosan from prawn shell waste and its conjugation with cutinase for enhanced thermo-stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1047–1058, 2018.

MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.105, p.1358–1368, 2017.

NASSER, M. D.; ZONTA, A. Caracterização de frutos de genótipos de aceroleira em função de estádios de maturação. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 8, n. 5, p. 76-78, 2014.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; SILVA JÚNIOR, J. F. Efeito do estádio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

OKAWA, Y., et al. Comparative study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* infections in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.9, p.902-904, 2003.

OLIVEIRA, L. S.; MOURA, C. F. H.; BRITO, E. S.; MAMEDE, R. V. S.; MIRANDA, M. R. A. Antioxidant metabolism during fruit development of diferente acerola (*Malpighia emarginata* D.C) clones. **J Agric Food Chem**, v. 60, p. 7957–7964, 2012.

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.

PAIVA, W. S; SOUZA NETO, F.E.; BATISTA, A. C. L. Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. **Persp. Online: Biol. e Saúde**, v. 13, n. 4, p. 37-43, 2014.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R., MONTEIRO MACHADO, R., MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. E PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. Teste de irritação vaginal com o Ensaio de Ovos de Galinha-Ensaio de Membrana Corioalantóico. **ALTEX - Alternativas à experimentação animal**, v. 35, n. 4, p. 495-503, 2018.

PERDONES A, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L, CHIRALT A, VARGAS M. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p.32–41, 2012.

PETRICCIONE M, MASTROBUONI F, PASQUARIELLO MS, ZAMPELLA L, NOBIS E, CAPRIOLI G, et al. Effect of chitosan coating on the postharvest quality and antioxidant enzyme system response of strawberry fruit during cold storage. **Foods**, v. 4, p. 501-523, 2015.

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.

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. 5, p. 43-48, 2015.

RAO, M. S., CHAWLA, S. P., CHANDER, R., SHARMA, A. Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan-glucose solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p.714–719, 2011.

REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata DC*) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, v. 254, p. 281–29, 2018.

RIBEIRO, J. G.; SERRA, I. M. R. S.; ARAÚJO, M. U. P. Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Summa phytopathol**, v.42, n.2, 2016.

RODRIGUES, F. A. R. et al. Mefloquine–Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v. 83, p. 126–131, 2014.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Embrapa, Comunicado Técnico Online, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da**

Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Embrapa, Comunicado Técnico Online, 2007.

SAGAR, S. B.; KUNA, A.; PADMAVATHI, T.V.N.; KAVITHA, C.; SUPRAJA, T.; RANI, C. H. V. D. Estimation of physico-chemical properties, nutrient composition and antioxidant activity of acerola *Malpighia emarginata* DC. **J Res ANGRAU**, p. 41, n. 4, p.97–101, 2013.

SANTOS, S. M. L.; VASCONCELOS, A. M.; OLIVEIRA, V. S.; CLEMENTE, E.; COSTA, J. M. C. Evaluation of physical and physicochemical characteristics of *Malpighia emarginata* DC from the state of Ceará. **Int J Biochem Res Ver**, v. 2, p.152–163, 2012.

SAHARIAH, P., E MÁSSON, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846-3868, 2017.

SILVA, L. M. D. M. et al. Avaliação das características físicas e físico-químicas da pupunha evaluation of physical and physicochemical the pupunha. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 3, p. 5–8, 2013.

SINGH, R.; SHITIZ, K.; SINGH, A. Chitin and chitosan: biopolymers for wound management. **Int Wound J**, 2017.

SOARES, N. F. F.; SILVA, D. F. P.; CAMILLOTO, G. P.; OLIVEIRA, C. P.; PINHEIRO, N. M.; MEDEIROS, E. A. A. Uso de revestimento comestível e conservação pós-colheita de goiaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 281-289, 2011.

SOUZA, K. O.; MOURA, C. F. H.; LOPES, M. M. A.; RABELO, M. C.; MIRANDA, M. R. A. Quality of acerola (*malpighia emarginata*) treated with gibberelic acid and stored under refrigeration. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 39, n.4, 2017.

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. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 375-84, 1999.

SUN, T.; QIN, Y.; XU, H.; XIE, J.; HU, D.; XUE, B.; HUA, X. Antibacterial activities and preservative effect of chitosanoligosaccharide Maillard reaction products on *Penaeus vannamei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 764–768, 2017.

TEZOTTO-ULIANA, J. V.; FARGONI, G. P.; GEIRDINK, G. M.; KLUGE, R. A. Chitosan applications pre-or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 91, n. 1, p. 72-77, 2014.

THANDAPANI, G.; PRASAD, P. S; SUDHA, P. N.; SUKUMARAN, A. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. **Int J Biol Macromol**, v. 16, p. 32314-5, 2017.

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

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

VELICKOVA E, WINKELHAUSEN E, KUZMANOVA S, ALVES VD, MOLDÃO-MARTINS M. Impact of chitosan-beeswax edible coating on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv *Camarosa*) under commercial storage conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 52, p.80-92, 2013.

VESPUCCI, I. L.; CRUZ, J. E.; TEIXEIRA, S. M. Estado da Arte de biofilmes para conservação pós-colheita de frutos (2007-2017). **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 14, p. 115-142, 2018.

VHANGANI, L. N., & WYK, J. V. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems. **Food Chemistry**, v. 137, p. 92–98, 2013.

WANG, Y.; LI, B.; ZHANG, X.; PENG, N.; MEI, Y.; LIANG, Y. Low molecular weight chitosan is an effective antifungal agent against *Botryosphaeria* sp. and preservative agent for pear (*Pyrus*) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p.1135–1143, 2017.

WU, S.; DU, Y.; HU, Y.; SHI, X.; ZHANG, L. Antioxidant and antimicrobial activity of xylan–chitooligomer–zinc complex. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1312–1319, 2013.

WU, S.; HU, J.; WEI, L.; DU, Y.; SHI, X.; ZHANG, L. Antioxidant and antimicrobial activity of Maillard reaction products from xylan with chitosan/chitooligomer/glucosamine hydrochloride/taurine model systems. **Food Chemistry**, v. 148, p. 196–203, 2014.

XAVIER, F. C. 1999. Disponível em: < <https://www.pensador.com/frase/MzM5OTk/>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p.170–179, 2011.

XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloid**, v. 25, p. 170-179, 2010.

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

XING, X. SHEN, X. ZHU, X. JU, X. MIAO, J. TIAN, Z. FENG, X. PENG, J. JIANG, S. Qin, Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 82, p. 830–836, 2016.

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

YING, G. Q., XIONG, W. Y., WANG, H., SUN, Y., & LIU, H. Z. Preparation, water solubility and antioxidant activity of branched-chain chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, 83, 1787–1796, 2011.

ZHANG, H.; YANG, J.; ZHAO, Y. High intensity ultrasound assisted heating to improve solubility, antioxidant and antibacterial properties of chitosan-fructose Maillard reaction products. **Food Science and Technology**, v. 60, p. 253-262, 2015.

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.

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.

ZHU, K. X., LI, J., LI, M., GUO, X. N., PENG, W., & ZHOU, H. M. Functional properties of chitosan-xylose Maillard reaction products and their application to semi-dried noodle. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1972–1977, 2013.