



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

ALESSANDRA SILVA ARAÚJO

**COBERTURA COMESTÍVEL BIOATIVA ECOSSUSTENTÁVEL DE
NANOCOMPÓSITOS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA
CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NA CONSERVAÇÃO PÓS-
COLHEITA DE MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.)**

RECIFE

2022

ALESSANDRA SILVA ARAÚJO

**COBERTURA COMESTÍVEL BIOATIVA ECOSSUSTENTÁVEL DE
NANOCOMPÓSITOS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA
CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NA CONSERVAÇÃO PÓS-
COLHEITA DE MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição. Área de concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Thayza C. Montenegro Stamford

Coorientadora: Prof^a. Dra. Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho

RECIFE

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

A663c	<p>Araújo, Alessandra Silva Cobertura comestível bioativa ecossustentável de nanocompósitos de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo óleo de semente de maracujá na conservação pós-colheita de morango (<i>fragaria x ananassa duch.</i>) / Alessandra Silva Araújo . – 2022. 121 f. : il.</p> <p>Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford. Coorientador: Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2022.</p> <p>Inclui referências.</p> <p>1. Nanotecnologia. 2. <i>Aspergillus niger</i>. 3. <i>Colletotrichum</i>. 4. Quitosana. 5. Agente antifúngico. 6. Óleo vegetal. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (orientadora) II. Carvalho, Rafaela de Siqueira Ferraz.(coorientadora). III. Título.</p> <p>612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 - 069)</p>
-------	---

ALESSANDRA SILVA ARAÚJO

**COBERTURA COMESTÍVEL BIOATIVA ECOSSUSTENTÁVEL DE
NANOCOMPÓSITOS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA
CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NA CONSERVAÇÃO PÓS-
COLHEITA DE MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Nutrição. Área de concentração: Ciência dos Alimentos.

Aprovada em: 11/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Natália Ferrão Castelo Branco Melo

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Emmanuella Vila Nova da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco

*A Deus e Nossa Senhora de Fátima, que de cima me olham e protegem do visível e
do invisível ;*

Aos meus pais Marivalda e Pedro por todo esforço e sacrifício feitos por mim.

A meu marido, Josenildo, por estar ao meu lado durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Em minhas orações sempre peço a Deus que ponha em meu caminho pessoas do bem, com quem eu possa aprender a ser um ser humano melhor. Nessa jornada difícil do mestrado, ainda mais agraciada por uma pandemia, Ele atendeu às minhas preces e me pôs em contato com os Seus filhos mais generosos e empáticos.

Professora Thaysa, muito obrigada por sempre me orientar, me direcionar e me acalmar nos momentos em que o medo bateu mais forte. Jamais esquecerei a sua generosidade e confiança.

Professora Rafaela Ferraz, saiba que você me ensinou além da competência técnica, a olhar o ser humano em sua essência e perceber que além do pesquisador existe uma alma com suas dores e temores. Rafa, mil anos eu viva, mil anos não serão suficientes para externar a minha eterna gratidão.

Aos amigos do LAMAp, Ihasmyn (Ilha), Camila (Xamila), Gerlane (Gerilane) e Alberto. Obrigada por tantas vezes segurarem a bancada quando precisei me ausentar. Vocês foram essenciais nesse mestrado e me ensinaram que uma equipe de verdade se faz com braços e coração. Menina Ihasmyn, especialmente, obrigada por ser um anjo de luz e inteligência. Sua amizade me salvou de muitos desesperos.

Aos professores Marcos Lima da UFRPE e Natália Ferrão pela disponibilidade em sempre ajudar e orientações valiosas nas análises microbiológicas. A vocês minha eterna admiração e gratidão.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e ao LEAAL pela estrutura disponibilizada. Especialmente aos técnicos Camilo (LEAAL) e Gabriel (LIKA) pelo suporte para a realização de diversas análises.

A CAPES pela concessão da bolsa, ao CNPq e a PROPESQ/UFPE pela concessão de financiamento para a execução da pesquisa.

Aos membros da banca pelas contribuições para o desenvolvimento e conclusão dessa dissertação.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e aos professores do Programa pela oportunidade e pela experiência tão enriquecedora durante esses dois anos.

A todos que compõem a secretaria da Pós-Graduação em Nutrição, principalmente Cecília Arruda e Andrea Nascimento, pelo empenho e atenção constantes.

A minha família, por entender as minhas ausências e acima de tudo ao meu marido por ser essa fonte de luz em minha vida. Josenildo, se sou , é porque você me permite ser. Obrigada por caminhar comigo nessa jornada.

RESUMO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um pseudofruto que possui um alto grau de perecibilidade principalmente devido às infecções fúngicas. A aplicação de agrotóxicos é a principal estratégia utilizada no controle de micro-organismos no pós-colheita, porém pode causar danos ao organismo humano, ao meio ambiente e afetar as características físico-químicas dos produtos. Diante disso, a indústria alimentícia tem buscado desenvolver tecnologias alternativas seguras como o emprego de coberturas comestíveis à base de polissacarídeos com destaque às que empregam a quitosana. Quitosana é um polímero natural com propriedades potencializadas quando está sob a forma de seus sais hidrossolúveis e em nanopartículas, podendo carrear óleos vegetais encapsulados. A semente do maracujá é rica em compostos bioativos, que permitem que esses resíduos industriais sejam transformados em fontes alternativas de óleos com propriedades funcionais com características antioxidante e antimicrobiana. A presente proposta desenvolveu e avaliou, a ação antimicrobiana e conservativa da cobertura comestível de nanopartículas de cloridrato de quitosana com e sem o óleo da semente de maracujá (OSM) encapsulado na conservação pós-colheita de morangos. As nanopartículas de cloridrato de quitosana carregadas com o óleo de semente de maracujá foram preparadas pela técnica de coacervação complexa e a formulação selecionada após a análise de estabilidade foi a elaborada com a proporção material de parede: OSM de 1:0,50 (NP-OSM-0,50) que foi caracterizada por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Potencial Zeta, Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e por Microscopia Eletrônica de Varedura (MEV). Essas nanopartículas apresentaram pequena dimensão ($159,21 \pm 4,80$ nm), baixo potencial zeta ($9,00 \pm 2,40$ mV), índice de polidispersão (0,40) e mantiveram-se estáveis por 90 dias. A estrutura densa e esférica foi confirmada pela análise de MEV e FTIR. As análises térmicas confirmaram o sucesso da encapsulação do óleo. As nanopartículas apresentaram atividade antifúngica contra os dois fungos fitopatogênicos avaliados (CIM $0,75$ mg mL⁻¹ para *Colletotrichum siamense* e $1,5$ mg mL⁻¹ para o *Aspergillus niger*) e em concentrações sub-inibitórias promoveram alterações morfológicas nos micélios dos dois fungos. As coberturas elaboradas foram capazes de conservar as características físico-químicas do morango em

ambas as temperaturas de armazenamento, sendo mais efetiva nos frutos conservados sob refrigeração durante 12 dias. O revestimento também apresentou ação efetiva na redução da incidência de contaminação pelo *Aspergillus niger*. Os resultados obtidos demonstram que as nanopartículas contendo OSM são uma alternativa viável ao uso de fungicidas sintéticos nocivos ao meio ambiente e ao consumidor. Além disso, o reaproveitamento das sementes do maracujá para elaboração do óleo gera benefícios ambientais e agrega valor a cadeia produtiva do maracujá.

Palavras-chave: nanotecnologia; *Aspergillus niger*; *Colletotrichum*; quitosana; agente antifúngico; óleo vegetal.

ABSTRACT

The strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a highly perishable pseudofruit, mainly because of fungi infections. The use of agrochemicals consists in the main strategy used to control microorganisms during the post-harvest phase, even though it can cause real damages to the human body, the environment and dramatically change the physical and chemical characteristics of the product. Therefore, the food industry has been trying to develop safer alternative technologies, such as the use of polysaccharides based edible coatings, with the highlight on those that use chitosan. Chitosan is a natural Polymer with enhanced properties when is shaped like its water soluble salts and like nanoparticles, resulting in encapsulated vegetable oils. The passion fruit seed is rich in bioactive composites that allows those industrial residues to become alternate oil sources with functional antioxidant and antimicrobial properties. This proposal developed and evaluated the antimicrobial and conservative action of the chitosan hydrochloride nanoparticles edible coating with the encapsulated passion fruit seed oil (OSM) to the post-harvest strawberry preservation. The chitosan hydrochloride nanoparticles loaded with passion fruit seed oil were prepared by the complex coacervation technique and the formulation selected after the stability analysis was the one prepared with a wall material:OSM ratio of 1:0.50 (NP- OSM-0.50) which was characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential, Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) . These nanoparticles presented small dimension ($159,21 \pm 4,80$ nm), low zeta potential ($9,00 \pm 2,40$ mV), polydispersity index (0,40) and kept stable for 90 days. A dense and spherical structure was confirmed by MEV and FTIR analysis. The thermal analysis confirmed the oil encapsulation success. The nanoparticles shown antifungi activity against the two fitopatogenic fungi tested (CIM $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ for *Colletotrichum siamense* e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ for *Aspergillus niger* at sub-inhibitory concentrations they promoted morphological changes in the mycelia of the two fungi. The developed coatings were capable to conserve the physical and chemical characteristics of the strawberry on both storage temperatures, been the most effective with the fruits kept under refrigeration throughout 12 days. Also the coating showed effectiveness reducing the *Aspergillus niger* contamination samples. The obtained results show that the nanoparticles loaded within OSM are a viable

alternative regarding the environment and human hazardous synthetic fungicide. Also, the passion fruit seed reutilization in order to make the oil generate several environment benefits and holds value to the passion fruit productive chain.

Keywords: nanotechnology; *Aspergillus niger*; *Colletotrichum*; chitosan, antifungal agents; vegetable oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura da quitosana	28
Figura 2 -	Grupos funcionais da quitosana	29
Figura 3 -	Estrutura da goma arábica	34
Figura 4-	Sistemas nanoestruturados utilizados na área de alimentos: a) Lipossoma, b) Nanoemulsões e c) Nanopartículas poliméricas (1-Nanocápsula;2-Nanoesfera)	40
Figura 5 -	Imagens das nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente de maracujá (NP-OSM-0,5) obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	66
Figura 6 -	Espectros de infravermelho obtidos para o cloridrato de quitosana (CQ ___), goma arábica (GA ___), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP ___), óleo da semente do maracujá (OSM ___) e nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NPOSM ___).	68
Figura 7 -	Termogramas (DTG(a), TGA(b), DSC(c)) obtidos para o cloridrato de quitosana (CQ___), goma arábica (GA ___), óleo da semente do maracujá (OSM ___), nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (NP___) e nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM ___).	70
Figura 8 -	Microscopia eletrônica de varredura de <i>A. niger</i> . Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente de maracujá (OSM) (b); a nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (NP) (c) e a nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) (d). As siglas indicam: superfície achatada (ach) , retorcido (ret), vazio (vaz).	76
Figura 9 -	Microscopia eletrônica de varredura de <i>C. Siamense</i> . Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente de maracujá (OSM) (b); a nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (NP) (c) e a nanopartículas de cloridrato de	80

quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) (d). As siglas indicam: superfície achatada (ach), retorcido (ret), vazio (vaz), intumescimento (int), escamação(esc), colapso (col)

- Figura 10 - Aparência dos morangos com e sem coberturas após de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente (26 °C) e refrigeração (8 °C), respectivamente. 83
- Figura 11 - Percentual de perda de peso dos morangos recobertos e não recobertos analisados em temperatura ambiente (26 °C) e refrigeração (8 °C) 92
- Figura 12 - Percentual de infecção visível dos morangos recobertos e não recobertos analisados em temperatura ambiente (26 °C) e refrigeração (8 °C) 94
- Figura 13- Avaliação da aparência dos morangos recobertos e não recobertos armazenados a temperatura ambiente (26 °C) e de refrigeração(8 °C) 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das formulações em relação a quantidade de Tween 80 e proporção entre os polímeros e OSM	48
Tabela 2 -	Preenchimento da microplaca de 96 poços.	53
Tabela 3 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga superficial e pH obtidos no dia 0 para cada uma das formulações elaboradas com e sem o óleo de semente de maracujá.	60
Tabela 4 -	Avaliação da estabilidade das formulações elaboradas durante 90 dias.	62
Tabela 5 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos para a formulação NP-OSM-0,5 antes e após liofilização utilizando crioprotetores	65
Tabela 6-	Concentração inibitória mínima (CIM) (mg mL^{-1}).	73
Tabela 7-	Percentual de frutas armazenadas a temperatura ambiente (26°C) e refrigeração (8°C) infectadas artificialmente com <i>A. niger</i> expostas a nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá.	81
Tabela 8	Valores médios dos parâmetros físico-químicos dos morangos não recobertos e recobertos com as nanopartículas de cloridrato de quitosana óleo de semente de maracujá analisados por 6 dias 26°C .	84
Tabela 9 -	Valores médios dos parâmetros físico-químicos dos morangos não recobertos e recobertos com as nanopartículas de cloridrato de quitosana óleo de semente de maracujá analisados por 12 dias 8°C .	87
Tabela 10 -	Efeito da cobertura comestível sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura ambiente (26°C) durante 6 dias.	99
Tabela 11-	Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura de refrigeração (8°C) durante 12 dias.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CEASA/PE	Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco
CIM	Concentração inibitória mínima
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Espalhamento dinâmico da luz)
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> (Calorimetria exploratória diferencial)
FAO	<i>Food and Agriculture Administration of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i> (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos)
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> (Geralmente reconhecido como seguro)
LIKA	Laboratório de imunopatologia Keizo Asami
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NP	Nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica
NP-OSM	Nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo óleo da semente do maracujá
OSM	Óleo da semente do maracujá
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de ionização ácida
TGA	Análise termogravimétrica
TPP	Tripolifosfato pentassódico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	MORANGO.....	20
2.2	FUNGOS PÓS-COLHEITA DO MORANGO.....	23
2.3	REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS.....	25
2.4	QUITOSANA E SEUS SAIS DERIVADOS.....	28
2.4.1	Cloridrato de quitosana	32
2.5	GOMA ARÁBICA.....	33
2.6	ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ.....	35
2.7	NANOENCAPSULAÇÃO.....	37
2.7.1	Nanoestruturas utilizadas na área de alimentos	39
2.7.2	Preparação de nanopartículas: Coacervação Complexa	43
3	HIPÓTESES	45
4	OBJETIVOS	46
4.1	OBJETIVO GERAL.....	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
5	MATERIAL E MÉTODO	47
5.1	MATERIAIS.....	47
5.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS POLÍMEROS.....	47
5.3	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM).....	47
5.4	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO COM O USO DE CRIOPROTETORES.....	49
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS BRANCAS E CONTENDO O OSM.....	49
5.5.1	Aspectos macroscópicos	49
5.5.2	Análise de tamanho de partícula e potencial zeta	49
5.5.3	pH	50
5.5.4	Morfologia	50
5.5.5	Estrutura química	50
5.5.6	Propriedades térmicas	51

5.6	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	51
5.6.1	Preparação do inóculo fúngico.....	51
5.6.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	52
5.6.3	Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica.....	53
5.6.4	Atividade antifúngica <i>in vivo</i> : bioatividade de cobertura comestível sobre o crescimento fúngico em morangos (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).....	54
5.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COBERTURA TESTE E CONTROLE SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS MORANGOS ARMAZENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE E REFRIGERAÇÃO.....	55
5.7.1	Análise dos frutos.....	56
5.7.2	Umidade.....	56
5.7.3	Sólidos solúveis.....	56
5.7.4	pH.....	56
5.7.5	Acidez titulável.....	57
5.7.6	Índice de maturação.....	57
5.7.7	Evolução da cor.....	57
5.7.8	Perda de peso.....	57
5.7.9	Percentual de infecção visível.....	58
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1	NANOPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM).....	59
6.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO O ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM).....	61

6.3	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.....	63
6.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	65
6.4.1	Morfologia.....	65
6.4.2	Estrutura química.....	66
6.4.3	Propriedades térmicas.....	69
6.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	73
6.5.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	73
6.5.2	Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica.....	76
6.5.3	Atividade antifúngica <i>in vivo</i>: bioatividade de cobertura comestível sobre o crescimento fúngico em morangos (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).....	81
6.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS COBERTURAS TESTE E CONTROLE SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS MORANGOS ARMAZENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE E REFRIGERAÇÃO.....	83
6.6.1	Efeito das coberturas teste e controle nos parâmetros de umidade, sólidos solúveis, pH e acidez titulável dos morangos.....	83
6.6.2	Efeito das coberturas teste e controle na perda de peso.....	91
6.6.3	Percentual de infecção visível.....	93
6.6.4	Evolução da cor.....	97
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um pseudofruto não climatérico considerado uma importante cultura no Brasil devido à sua alta rentabilidade econômica, por possuir ampla aceitação pelos consumidores e grande diversidade na comercialização (LAFARGA et al., 2019). A produção mundial de morango é de 9.223.815 toneladas por ano e a brasileira de 165.000 toneladas, com destaque para os Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Bahia, considerado o maior produtor da região nordeste (ANTUNES; BONOW; REISSER JUNIOR, 2020).

Após a colheita, os frutos apresentam uma pequena vida útil em decorrência da alta atividade fisiológica (respiração) e deterioração progressiva em virtude da ação de bactérias e fungos como os pertencentes aos gêneros *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Colletotrichum* (LIU et al., 2017; MOSHARI-NASIRKANDI; ALIREZALU; ALMASI, 2020).

A aplicação de conservantes sintéticos é a principal estratégia utilizada no controle de microrganismos no pós-colheita em frutas e sabe-se que o uso de fungicidas pode apresentar efeitos deletérios à saúde humana e ao meio ambiente (YAZICI; TIRYAKI; AYVAZ, 2020). Nesse contexto, há uma demanda por tecnologias de conservação que sejam eco sustentáveis, com destaque aos agentes naturais poliméricos associados à óleos vegetais com atividade antimicrobiana e antioxidante como a quitosana e a goma arábica. Um dos polímeros mais estudados no controle microbiano em alimentos é a quitosana, polissacarídeo policatiônico obtido, principalmente, pela desacetilação alcalina ou enzimática da quitina e também a partir da parede celular de fungos da Ordem *Mucorales* (BERGER et al., 2018; TAHIR et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020) .

A quitosana e seus derivados apresentam atividade antimicrobiana de amplo espectro, ação antioxidante, capacidade adsorbtiva, biodegradabilidade e biocompatibilidade (NARAYANAN et al., 2018; NAIR et al., 2020). Na indústria de alimentos tem se mostrado como uma alternativa bastante utilizada na produção de coberturas comestíveis para conservação de frutas por formar uma película semipermeável que regula a troca de gases, reduz a taxa de respiração e consequentemente o processo de maturação (FELIZIANI; ROMANAZZI, 2016; NARAYANANKUTTY; ILLAM; RAGHAVAMENON, 2018; NAIR et al., 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020). Suas propriedades podem ser

potencializadas mediante modificação química, para melhora de sua solubilidade e estabilidade. Dentre as modificações estruturais estão os sais de quitosana, com destaque para o cloridrato de quitosana, que se apresenta mais hidrofílico que o acetato e a forma neutra da quitosana, utilizada nos setores farmacêutico e de cosméticos e possui maior atividade antimicrobiana (VIŠNJAR et al., 2017; LI et al., 2019a;).

Sabe-se que nanopartículas são definidas como materiais que possuem dimensão inferior a 1 μm apesar de várias legislações como as que regulam a área farmacêutica e cosmética considerarem como nanomaterial aqueles cujo tamanho seja inferior a 100 nm (ASSADPOUR; JAFARI, 2018; VILLENA DE FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018; HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019). É este pequeno tamanho em combinação com a estrutura e composição química, que fornece às nanopartículas suas características únicas e seu potencial para aplicações como antimicrobiano, inclusive em alimentos (PRAKASH et al., 2018; FERREIRA et al., 2020).

Com isso, o uso de nanopartículas de cloridrato de quitosana apresenta um potencial inovador para aplicação em coberturas comestíveis em matriz alimentar devido à uma maior área de superfície da nanopartícula e maior afinidade com células microbianas. Também podem ser usadas como carreadores de produtos bioativos, tais como os ácidos graxos polinsaturados, fitoesteróis, tocoferóis, compostos fenólicos e carotenoides presentes no óleo de semente de maracujá, podendo melhorar a estabilidade oxidativa desses compostos, manutenção das atividades biológicas, e também a liberação controlada dos bioativos (MATSHETSHE et al., 2018; LIMA; XAVIER JÚNIOR; STAMFORD, 2020).

Assim, a presente pesquisa, inédita, teve por objetivo desenvolver e avaliar a ação antimicrobiana e conservadora da cobertura comestível de nanopartículas de cloridrato de quitosana com o óleo da semente de maracujá encapsulado na manutenção dos parâmetros de qualidade de morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.) durante o armazenamento. Ademais, esse trabalho objetivou novos direcionamentos para aproveitamento de subprodutos, como as sementes do maracujá, o que contribuirá para o aumento da sustentabilidade da cadeia produtiva do setor, diminuindo o desperdício e o impacto ambiental gerado. Além disso, contribuirá para valorização de um produto local que possui características ainda pouco conhecidas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MORANGO

O morango, é um pseudofruto não climatérico que pertence à família Rosaceae gênero *Fragaria*, espécie *Fragaria x ananassa* Duch. (LAFARGA et al., 2019; MOUSAVI; RAHMATI-JONEIDABAD; NOSHAD, 2021). Essa espécie, considerada a mais cultivada no mundo, é um híbrido resultante do cruzamento natural entre as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana* (ANTUNES; JUNIOR; SCHWENGBER, 2016). É uma das frutas economicamente mais importantes no mundo devido à suas características sensoriais, como cor, textura, aroma e sabor (CHU et al., 2020; YOON et al., 2020).

Além disso, possui uma rica composição nutricional gerada pelo seu alto teor de constituintes biologicamente ativos como compostos fenólicos totais (200-324 mg 100 g⁻¹ peso fresco), antocianinas (19-47 mg 100 g⁻¹ peso fresco), vitamina C (28-51 mg 100 g⁻¹ peso fresco), fibras, micronutrientes (ácido fólico, vitamina C, luteína, zeaxantina e colina) e minerais (cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio, sódio, zinco, cobre, magnésio e selênio). A presença desses compostos confere vários benefícios para a saúde comprovados por suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, anti-hipertensivas, anti-hiperlipidêmicas, anticancerígena e retardo no envelhecimento cerebral (VENTURA-AGUILAR et al., 2018; MULEY; SINGHAL, 2020).

A produção mundial vem crescendo passando de 7.879.108 toneladas (2013) para 9.223.815 toneladas (2017), ou seja, um crescimento de 17% nos últimos cinco anos tendo a China como maior produtor mundial seguido por Estados Unidos e México (ANTUNES; BONOW; REISSER JUNIOR, 2020). Dentre os países com maior renda bruta relativa à produção de morangos, está a China que movimentou quase US\$ 7 bilhões em 2016, seguido dos EUA (US\$ 2 bilhões) (FAOSTAT, 2016).

O Brasil ocupa o segundo lugar como produtor na América Latina, sendo Minas Gerais o Estado com maior produtividade (84.000 ton) merecendo destaque também os Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. No Nordeste, a Bahia é considerado um estado com representativa produção de morango, uma vez que alcança valores de produção por hectare (ton ha⁻¹) semelhante aos principais estados produtores no país. Em termos financeiros no ano de 2019 foram

comercializados US\$ 448 mil em exportações de produto fresco e processado . (ANTUNES; BONOW; REISSER JUNIOR, 2020). Atualmente, o morango, é cultivado tanto para o consumo *in natura* quanto para elaboração de produtos processados pelas indústrias de alimentos como por exemplo sucos, geleias, iogurtes, sorvetes entre outros (CHEN et al., 2020).

É considerado um pseudofruto ou infrutescência porque o seu fruto é na verdade a parte diminuta e superficial normalmente confundida como semente chamada de aquênio. Ele origina-se de uma única flor com vários ovários e ficam presos ao receptáculo (PETRASCH et al., 2019). É um fruto não climatérico cujo crescimento e amadurecimento depende da interação entre auxina, ácido abscísico, etileno e giberlinas (COELHO et al., 2019; POTT et al., 2020). Para ser colhido precisa estar maduro pois esse é o estágio em que atinge as características organolépticas relacionadas à cor, textura, sabor (relacionado ao teor de ácidos orgânicos e açúcares solúveis) que são os principais parâmetros geralmente considerados para avaliar a sua qualidade (MULEY; SINGHAL, 2020).

Um dos atributos que definem o ponto ideal de colheita é a cor do receptáculo que deve estar com superfície entre 50% a 75% da cor vermelha caracterizando o fruto apto para ser colhido (AUBERT et al., 2021). Essa cor deve-se às antocianinas que são pigmentos naturais derivados de açúcares. A medida em que a maturação vai se desenvolvendo acontece a degradação da clorofila (pigmento de cor verde) e a síntese das antocianinas (cor vermelha) (DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, 2019; MELO et al., 2020a). No entanto, essa coloração não define apenas o estágio de maturação ideal para o consumo desta fruta. Ela também influencia na escolha do consumidor assim como o aroma de frescor, desenvolvimento de voláteis característicos de odor desagradável, estando associada ao poder de comercialização do morango em muitos países (BOVI et al., 2018; AUBERT et al., 2021).

Um outro fator crítico de qualidade para consumo de frutas e vegetais frescos é a conservação da integridade física, porém, sabe-se que os morangos são muito suscetíveis a injúrias mecânicas durante o manuseio o que resulta numa alta perecibilidade. Danos mecânicos podem influenciar na deterioração acelerada da fruta inteira ao longo da cadeia de abastecimento gerando descartes o que resulta em desperdício de alimentos e causam prejuízos econômicos, principalmente para os países exportadores (HAJJI et al., 2018; LI et al., 2019c; AN et al., 2020).

Além das injúrias físicas que ocorrem durante a cadeia produtiva, a alta perecibilidade do morango (cerca de cinco dias a 4 °C) também é influenciada pela elevada taxa respiratória pós colheita (50 a 100 ml CO₂/kg/h a 20 °C), elevada produção de etileno (<0.1 µlC₂H₄/ kg/h a 20°C), perda de água, distúrbios fisiológicos e alta suscetibilidade a microrganismos deteriorantes (CAMPOS et al., 2016; LIU et al., 2017; BOVI et al., 2018). Essa vulnerabilidade microbiológica, em comparação com outros tipos de frutas, deve-se principalmente ao pH mais baixo, atividade de água ideal para o crescimento de fungos, altos níveis de açúcares e outros nutrientes. O fato de possuir uma textura macia e epicarpo frágil facilmente rompível, também favorece a vulnerabilidade do morango à decomposição fúngica (MENDONÇA et al., 2020).

A fim controlar a contaminação microbiana e prolongar a vida de prateleira dos frutos frescos, vários tratamentos pós-colheita têm sido empregados. Podendo-se citar o uso de sistemas de atmosfera modificada, tratamentos osmóticos, tratamentos hipobáricos, radiação e tratamento térmico, aplicação de fungicidas para controlar a decomposição microbiana, armazenamento em baixas temperaturas e a aplicação de revestimentos comestíveis (MULEY; SINGHAL, 2020). Sendo o armazenamento refrigerado a tecnologia mais comumente empregada para desacelerar metabolismo de frutas e o desenvolvimento de patógenos. Porém, a exposição a baixas temperaturas pode também causar injúria por frio afetando negativamente as propriedades sensoriais da fruta. Para evitar lesões por frio, atmosferas modificadas são frequentemente combinados com armazenamento refrigerado (POTT et al., 2020; BARKAOUI et al., 2021).

Mesmo com o uso dessas tecnologias visando a manutenção da qualidade e o controle da deterioração, o domínio das doenças pós-colheita gerada por fungos é um grande obstáculo para o transporte de longa distância e armazenamento no ponto de venda (HAJJI et al., 2018). As doenças pós-colheita impedem o consumo e comercialização dos morangos, uma vez que alguns tipos de fungos contaminantes de frutas podem produzir metabólitos tóxicos gerando risco para a saúde do consumidor, além do fato de que um fruto infectado pode contaminar os demais provocando danos indiretos nas plantações pela introdução em novas áreas de cultivo onde anteriormente não existia a doença levando a perdas de cerca de 40% por deterioração (ALVES et al., 2019; LAFARGA et al., 2019).

2.2 FUNGOS PÓS-COLHEITA DO MORANGO

As doenças que deterioram as partes já colhidas de uma planta como seus frutos e sementes são conhecidas como doenças pós-colheita e as geradas por fungos geram perdas monetárias consideráveis pois impedem a comercialização e o consumo desses alimentos (LIU et al., 2017; ALGHUTHAYMI et al., 2020).

Destacam-se por serem responsáveis por mais de 40% das perdas microbiológicas em frutas pois geram a destruição dos tecidos com consequência na perda da qualidade sensorial tornando-os menos atraentes ao consumidor final, reduzindo a vida de prateleira, além de poder diminuir os valores nutricionais devido à sua colonização ou pela produção de compostos tóxicos (PATEL et al., 2020; MATROSE et al., 2021).

Os fungos são microrganismos ubíquos que conseguem crescer em diversos tipos de substratos como carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas e lipídios (DAGNAS et al., 2017). Para causar infecção ele deve ser capaz de romper os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro e algumas espécies conseguem crescer tanto em ambientes ácidos quanto naqueles com alto teor de sal ou açúcar como as frutas (FATIMOH, A. O., MOSES, A. A., ADEKUNLE, O. B., AND DARE, 2017).

O morango é bastante susceptível à ação de patógenos sendo comum o desenvolvimento de podridões causadas por uma variedade de fungos devido à sua estrutura sensível e frágil (CONTIGIANI et al., 2020; BARKAOUI et al., 2021). Os principais fungos que reduzem o tempo de vida pós colheita desse pseudofruto são *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e o gênero *Colletotrichum* (MELO et al., 2020b; CALVES et al., 2021).

Fungos do gênero *Colletotrichum* pertencem ao filo Ascomycota e compreendem uma grande variedade de espécies e outras ainda sendo descritas na literatura (GONÇALVES et al., 2021). É considerado um dos 10 principais fungos fitopatogênicos mais importantes no mundo e afeta culturas de grande valor econômico como morango, manga, cítricos e abacate (DA SILVA et al., 2020; PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2020).

As espécies de *Colletotrichum* são os agentes causais da doença antracnose e tem sido responsáveis por grandes perdas no armazenamento de frutos tropicais nos últimos anos reduzindo a qualidade e limitando o valor nos pontos de venda

(SHI et al., 2021; SOARES et al., 2021). Seus sintomas só aparecem após o amadurecimento da fruta e os danos causados são irreversíveis durante toda a cadeia produtiva. Penetra nas células hospedeiras por meio de feridas e aberturas e é caracterizada pela formação de lesões arredondadas que evoluem do castanho escuro para o preto. À medida em que evoluem produzem uma massa de conídios cor salmão na superfície da espécie infectada (GONÇALVES et al., 2021; SOARES et al., 2021).

Particularmente, o *Colletrotrichum siamense* é um fungo comum em frutas tropicais como o morango e as condições úmidas e quentes dos climas subtropicais favorecem o seu desenvolvimento. No fruto, causam lesões arredondadas de aspecto aveludado com coloração que varia do laranja ao rosa e à medida em que evoluem fundem-se atingindo o interior do fruto ou causando a necrose completa(ZHANG et al., 2020).

Aspergillus niger é classificado como um dos fungos do gênero *Aspergillus*, seção *nigri* que é formada por um grupo de *Aspergillus* negros. É um microrganismo saprofítico sendo um dos mais comuns que afetam alimentos e capazes de infectar diferentes tipos de culturas como por exemplos frutas, cebolas, nozes e milho, podendo crescer em uma ampla faixa de temperatura (6–47 °C) e pH (1,5–9,8)(LI et al., 2020; PIMENTA;BALIZA MONTEIRO DOS SANTOS; MOREIRA DA SILVA, 2020).

A principal característica dessa espécie é a formação de colônias com conídios cuja cor da cabeça varia em tonalidades de preto e por isso elas podem apresentar coloração entre o marrom escuro e preto. É o agente causador da podridão negra em frutas, doença que se inicia pelo amolecimento do local infectado seguido da produção de um micélio preto que corresponde a forma de frutificação dos fungos. Essa infecção é favorecida pela alta umidade e temperatura (CABAÑES; BRAGULAT, 2018; JAHANI; PIRA; AMINIFARD, 2020).

O morango é muito sensível a ação de microrganismos e pode ser contaminado pelo *Aspergillus niger* principalmente se estiver com algum dano em sua estrutura externa. Ao ser infectado, o fruto sofre mudanças na sua coloração, consistência e odor o que pode levar a redução de seus atributos de qualidade e posterior comercialização (MELO et al., 2020b; WANG et al., 2020).

As perdas pós-colheita de morangos gerada pela contaminação por microrganismos como *Colletrotrichum spp.* incluindo *C. siamense* e *Aspergillus niger*,

são controladas principalmente com a aplicação de fungicidas sintéticos no campo (LOPES et al., 2018; ALVES et al., 2021). No entanto, esse uso frequente pode levar ao desenvolvimento de resistência ao ingrediente ativo pelos patógenos (FORGES et al., 2018; GONÇALVES et al., 2021). Além disso, excesso de fungicidas impacta negativamente o meio ambiente e na saúde humana devido ao seu efeito acumulativo e como o intervalo entre o tratamento da fruta e o consumo é curto o uso de pesticida na fase pós-colheita se torna ainda mais danoso à saúde (GRANDE-TOVAR et al., 2018).

Dessa forma, tem crescido a procura dos consumidores por frutas e verduras isentas de resíduos de fungicidas artificiais o que tem contribuído para o aumento do interesse de pesquisadores e indústrias de alimentos no desenvolvimento de alternativas ecologicamente corretas para o controle da decomposição microbiológica de vegetais (LAFARGA et al., 2019; MOUSAVI; RAHMATI-JONEIDABAD; NOSHAD, 2021). Como por exemplo, os filmes ou coberturas comestíveis antimicrobianas a base de nanopartículas de quitosana incorporados com óleos que possuam ativos que demonstrem atividade biológica (GRANDE-TOVAR et al., 2018; ALGHUTHAYMI et al., 2020).

2.3 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS

Alimentos de origem vegetal possuem vida pós-colheita relativamente curta devido às suas características bioquímicas e fisiológicas o que pode lhes conferir, ao longo da cadeia de distribuição, alterações nutricionais, organolépticas e microbiológicas que diminuem a sua qualidade (SUHAG et al., 2020; PANAHIRAD et al., 2021).

Várias tecnologias de conservação vem sendo aplicadas a fim de preservar a qualidade pós-colheita desses alimentos, como por exemplo, métodos físicos (irradiação, luz ultravioleta, temperatura) e químicos (uso de cloro, bromo, iodo, ácidos orgânicos e fungicidas sintéticos). No entanto, apresentam desvantagens no que se refere à qualidade sensorial, nutricional e problemas relativos à saúde do consumidor, em se tratando dos métodos químicos (NASCIMENTO et al., 2020; PANAHIRAD et al., 2021).

Uma alternativa que pode suprir as deficiências acima citadas é o uso de revestimentos comestíveis que são conceituados como sendo uma membrana

delgada, fina e transparente que atua como barreira para gases e transferência de umidade para preservação de frutas e verduras (MULEY; SINGHAL, 2020; ZHANG et al., 2022). Além disso, também podem melhorar características sensoriais como o brilho da superfície externa do fruto, evitar a saída de compostos voláteis desejáveis, reduzir a deterioração microbiana e os distúrbios fisiológicos (MD NOR; DING, 2020).

Esses revestimentos são elaborados a partir de vários tipos de matrizes como polissacarídeos, proteína e lipídios, usados isoladamente ou combinados entre eles. Vários trabalhos na literatura relatam a sua aplicação para estender a vida útil e melhorar as características pós colheita de frutas e vegetais como banana, mamão, cenouras, abacate, maçãs e morangos (PINZON et al., 2020; SUHAG et al., 2020; YAN et al., 2021). Saleem et al. (2021) relataram que o revestimento comestível de quitosana com ácido ascórbico incorporado em sua formulação foi uma abordagem eficaz para manutenção da qualidade de morangos pois os frutos revestidos apresentaram redução na perda de peso, contaminação fúngica e acréscimo nas propriedades antioxidantes. Já Fortunati et al. (2017), elaboraram uma cobertura comestível à base de cloridrato de quitosana para aplicação em alface romana e kiwi e encontraram resultados antimicrobianos que demonstraram que esse revestimento foi capaz de inibir o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* e da bactéria *Pectobacterium carotovorum*.

Esses revestimentos podem ser aplicados em frutas e vegetais por diversas técnicas como imersão, pulverização e leito fluidizado. Dentre essas, a imersão é a mais comum e tem sido utilizada para recobrir produtos frescos pois garantem a uniformidade do material aplicado (SENTURK PARREIDT; SCHMID; MÜLLER, 2018). A imersão consiste em imergir o produto no revestimento por um tempo determinado, removê-lo e drenar o excesso de solução. O sistema a ser utilizado depende do tipo de alimento a ser revestido, das características da superfície e da finalidade do revestimento (SENTURK PARREIDT; SCHMID; MÜLLER, 2018; SUHAG et al., 2020).

Como descrito anteriormente, vários tipos de matrizes podem ser usadas para formulação de revestimento e por vezes em sua formulação adicionam-se outros componentes como plastificantes, emulsificantes e aditivos para melhorar a integridade, estabilidade e funcionalidade transformando-os em sistemas ativos que aumentam a segurança, atributos nutricionais, sensoriais e trazendo benefícios a

saúde do consumidor (PANAHIRAD et al., 2021). Coberturas elaboradas com polissacarídeos e proteínas, principalmente, recebem a adição de plastificantes como glicerol, propilenoglicol, sorbitol, sacarose e xarope de milho. Esses agentes são incorporados a fim de impedir que as interações polímero-polímero gerem rigidez nos revestimentos devido às extensas ligações entre as cadeias poliméricas tornando os revestimentos mais flexíveis e processáveis (KUMAR; NEERAJ, 2019; PANAHIRAD et al., 2021) .

Dentre os biopolímeros utilizados para elaboração de coberturas comestíveis destaca-se a quitosana e seus sais derivados, como o cloridrato de quitosana. Sabe-se que a baixa solubilidade da quitosana em água (devido à sua estrutura cristalina rígida) configura um fator limitante do seu uso direto (KUROZUMI et al., 2019; ZHOU et al., 2021). No entanto, sua biodegradabilidade, atoxicidade, propriedades antimicrobianas e antifúngicas despertam o crescente interesse em utilizá-la como material para filmes ou revestimentos de alimentos (BAKSHI et al., 2020; FLÓREZ et al., 2022). Coberturas comestíveis à base de quitosana são excelentes carreadores de ingredientes e aditivos funcionais que agregam sabor, cor, vitaminas e agentes antioxidantes que podem aumentar o valor nutricional, funcionalidade da matriz alimentar (GRANDE-TOVAR et al., 2018; KARTHIK; CAROLINE; PANDI PRABHA, 2021).

Além disso, a quitosana pode formar revestimentos nanoparticulados e sob essa apresentação tem suas propriedades físico-químicas potencializadas devido ao aumento da área de superfície das nanopartículas e densidade de carga, assim como também o melhoramento de suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (DIVYA; JISHA, 2018; ABU SALHA; GEDANKEN, 2021) . Sob essa forma, tem sido utilizada como carreador de compostos bioativos como ácidos orgânicos, agentes antimicrobianos, nutracêuticos e óleos essenciais (ERATTE et al., 2018; ADILETTA; DI MATTEO; PETRICCIONE, 2021). Hasheminejad et al. (2020) aplicaram em arilos de romã um revestimento comestível à base de nanopartículas de quitosana e óleo essencial de cravo e os resultados mostraram que esse nanorevestimento manteve a qualidade dos arilos de romã por 54 dias enquanto os não revestidos tornaram-se inaptos para o consumo no 18º dia devido à podridão fúngica. Do mesmo modo, a cobertura de nanopartículas de quitosana e o óleo essencial de canela foi capaz de reduzir a perda de peso em pepinos para 5,49% no trabalho desenvolvido por Istúriz-Zapata et al. (2020).

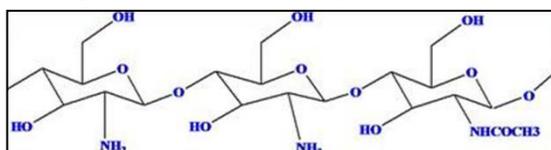
Além disso, sob essa forma de apresentação, revestimentos nanoparticulados à base de quitosana são capazes de controlar a liberação do composto incorporado, mantendo assim as doses eficazes do aditivo ao longo do período de armazenamento o que reforça as propriedades funcionais dessas coberturas (FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015; YUAN; CHEN; LI, 2016; ALGHUTHAYMI et al., 2020).

2.4 QUITOSANA E SEUS SAIS DERIVADOS

A quitosana (Figura 1) é um polissacarídeo catiônico linear, biodegradável, formado a partir de unidades D-glucosaminas ($\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-d-glucopiranoose) ligadas a resíduos de unidades N-acetilglucosamina ($\beta(1,4)$ -2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopiranoose) por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (BAKSHI et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2020).

Em cada monômero de fórmula unitária $C_6H_{11}O_4$ a quitosana apresenta três grupos funcionais reativos (Figura 2): o agrupamento amino no C-2, uma hidroxila secundária no C-3 e uma primária no C-6. Como as unidades glucosaminas e unidades N-acetilglucosamina possuem solubidade diferentes em ácido acético aquoso a 1% (v/v) a quitosana e a quitina podem ser distinguidas por essa propriedade, uma vez que quitina contendo um percentual superior a 40% de N-acetilglucosamina é insolúvel (LI; ZHUANG, 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020).

Figura 1 - Estrutura da quitosana

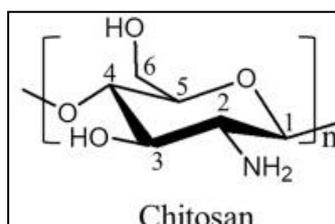


Fonte: Adaptado de Bakshi et al. (2020)

O fato de possuir esses grupos laterais amino e hidroxílicos pode facilitar reações que modifiquem quimicamente a quitosana o que é muito interessante pois o uso desse polissacarídeo em condições fisiológicas é limitado pelo fato de ser insolúvel e precipitar em pH acima de 6,5 (CHOI; NAM; NAH, 2016; BURR; WILLIAMS; RATCLIFFE, 2018; BAKSHI et al., 2020). As modificações químicas que podem ocorrer na quitosana podem ser realizadas principalmente no grupo amino no

C-2 e no grupo hidroxila primário no C-6 (BAKSHI et al., 2020; LI; ZHUANG, 2020; GABRIELE et al., 2021).

Figura 2 - Grupos funcionais da quitosana



Fonte: Adaptado de Li et al. (2020)

A quitosana é obtida, principalmente, pela desacetilação alcalina ou enzimática da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos, insetos, artrópodes e também a partir da parede celular de fungos da ordem *Mucorales*, classe *Zygomycetes*. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose e suas fontes principais são as cascas de caranguejo e camarão (BERGER et al., 2018; ABD EL-HACK et al., 2020).

A maior proporção da quitosana encontrada comercialmente é extraída da quitina advinda de cascas de camarão, lagosta e caranguejo. No entanto, essas matérias-primas apresentam limitações como variações de sazonalidade no fornecimento das fontes marinhas, altos custos de energia pelo uso de altas temperaturas, poluição ambiental causada pelos reagentes utilizados para extração e purificação, quando descartados de maneira irregular, e a heterogeneidade nas características físico-químicas que dificultam a padronização (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017; BERGER et al., 2018; EL KNIDRI et al., 2018).

Uma forma de reduzir essas limitações é a extração da quitina e quitosana produzidas naturalmente na parede celular de fungos da ordem *Mucorales*. A conversão da quitina em quitosana ocorre a partir de sua desacetilação por meio da ação da enzima quitina desacetilase. Essa é uma alternativa viável para obtenção da quitosana uma vez que não há entraves em relação ao abastecimento, sazonalidade e o processo acontece controladamente em condições de cultivo específicas gerando menor heterogeneidade nas características físico-químicas como peso molecular e grau de desacetilação (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017; BERGER et al., 2018). Outro ponto interessante é que a quitosana fúngica não apresenta resíduos de proteínas que podem desencadear reações alérgicas em

indivíduos com alergia a crustáceos o que viabiliza seu uso em diversas aplicações (BERGER et al., 2018; MELO et al., 2020a).

A quitosana é insolúvel em pH neutro e alcalino mas é solúvel em soluções de ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos (pH <6–6,5) como ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido propiônico, ácido succínico, ácido láctico, ácido málico, ácido clorídrico e também o ácido acético que é o solvente usado com maior frequência (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; QIAO et al., 2021).

Sua solubilidade está relacionada à multiplicidade de sítios catiônicos formados a partir da protonação dos grupos aminos das cadeias poliméricas da quitosana. O ácido utilizado para dissolvê-la protona esses grupos amino aumentando a polaridade e o grau de repulsão eletrostática entre as cargas positivas resultando na destruição das redes de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares além da quebra da estrutura cristalina das moléculas de quitosana e a consequente dissolução do polímero (BAKSHI et al., 2020; QIAO et al., 2021). Além da quantidade de grupos amino protonados, parâmetros como grau de desacetilação, pH, força iônica, concentração, peso molecular do polímero e temperatura também podem influenciar o processo de dissolução da quitosana (EL KNIDRI et al., 2018; BAKSHI et al., 2020; QIAO et al., 2021).

Uma das propriedades químicas mais importantes da quitosana é o grau de desacetilação que é definido como a razão entre as unidades D-glucosamina/N-acetilglucosamina que aumenta à medida em que a quitina vai sendo convertida em quitosana (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Quando essa desacetilação atinge um grau superior a 50% a molécula passa a ser chamada de quitosana e não mais quitina apresentando uma forma semicristalina e tornando-se solúvel em soluções ácidas diluídas (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; WANG; XUE; MAO, 2020). Esse parâmetro influencia diretamente suas propriedades químicas (resistência à tração, solubilidade, área de superfície, viscosidade, condutividade, porosidade e flexibilidade) e biológicas (intensificador de adsorção, biodegradabilidade, antioxidante, biodisponibilidade e biocompatibilidade) a depender das condições do processo (YADAV et al., 2019).

Ao ser desacetilada ocorre a quebra das ligações N-acetil da quitina formando a D-glicosamina que possui um grupo amino livre que ao ser protonado assume carga positiva e gera características importantes como solubilidade e atividade antimicrobiana (EL KNIDRI et al., 2018). Essa última, é uma propriedade biológica

importante que diferencia a quitosana de outros polissacarídeos e viabiliza seu uso pela indústria de alimentos, especialmente em frutos como o morango, pois mostra-se efetiva no controle da deterioração (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; EL KNIDRI et al., 2018; BARROS et al., 2020).

É considerada um eficaz agente antimicrobiano contra bactérias, bolores e leveduras, sendo os fungos mais sensíveis a sua ação antimicrobiana. Em relação às bactérias, existem controvérsias se a quitosana exibe atividade bactericida mais forte contra bactérias gram-negativas ou gram-positivas (ABD EL-HACK et al., 2020). Sua efetividade está relacionada ao tipo de microrganismo, ao pH do meio, concentração, fonte da quitosana e propriedades estruturais como o grau de desacetilação e peso molecular. É provavelmente abaixo de pH 6,5 que a quitosana exibe capacidade antimicrobiana pois é nessa faixa que os grupos amino carregados positivamente, ligam-se aos constituintes de carga negativa da membrana das bactérias patogênicas (ABD EL-HACK et al., 2020; ALGHUTHAYMI et al., 2020).

O mecanismo de ação responsável pela ação antimicrobiana da quitosana ainda não é totalmente esclarecido, mas inferem-se três na literatura. O primeiro está relacionado às cargas opostas entre a quitosana e a membrana celular microbiana que é carregada negativamente. Essa atração eletrostática pode aumentar a permeabilidade da membrana interferindo no metabolismo e pode causar o rompimento de biofilmes bacterianos com o subsequente vazamento de proteínas e outros componentes levando a morte celular. O segundo mecanismo refere-se ao potencial de penetração da quitosana no conteúdo citoplasmático e aos núcleos microbianos inibindo a síntese de RNAm e proteínas. O terceiro, por sua vez, está relacionado à supressão de nutrientes essenciais ao crescimento celular devido a ação quelante da quitosana que se liga a oligoelementos inibindo a produção de toxinas e o crescimento microbiano (ALGHUTHAYMI et al., 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020; WANG; XUE; MAO, 2020)

Em razão de suas características e propriedades peculiares como bioatividade, biodegradabilidade, baixo custo, atividade antimicrobiana, atoxidade e capacidade de formação de gel e microesferas, a quitosana possui uma vasta gama de aplicações podendo ser utilizada em diversos setores industriais, como o ramo farmacêutico, cosmético, têxtil, agrícola e alimentar (NARAYANAN et al., 2018; NAIR et al., 2020). Na indústria de alimentos esse polímero tem sido utilizado como cobertura comestível para preservação de alimentos e agente antimicrobiano, como

clarificador de bebidas floculando compostos de cargas negativas das frutas como taninos, celulose e também no tratamento de águas poluídas por meio de floculação, quelação e adsorção (LI et al., 2014; KHAN et al., 2018; URANGA et al., 2019).

Apesar de ser considerado pela “Food Drug Administration” (FDA) como um aditivo alimentar “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) e de seu vasto campo de aplicação, a quitosana possui desvantagens como por exemplo sua baixa solubilidade em água e resistência mecânica (ROMANAZZI et al., 2017; SALAMA; ABDEL AZIZ; SABAA, 2018). Dessa forma é necessário modificar a sua estrutura quimicamente ou por tecnologias de preparação a fim de melhorar sua solubilidade, propriedades biológicas e químicas expandindo ainda mais sua aplicação (BAKSHI et al., 2020; WANG; XUE; MAO, 2020).

Derivados de quitosana podem ser obtidos por modificação química usando técnicas como acilação, alquilação, sulfatação, hidroxilação, quaternização, esterificação, copolimerização por enxerto e esterificação (ZHAO et al., 2018; WANG; XUE; MAO, 2020). Reações como essas inserem novos grupos funcionais na molécula da quitosana, rompendo sua estrutura cristalina tendo como consequência o aumento da solubilidade (ZHAO et al., 2018) .

2.4.1 Cloridrato de quitosana

Entre os derivados hidrossolúveis da quitosana destaca-se o cloridrato de quitosana que é um sal de cloreto, carregado positivamente e obtido por meio da degradação enzimática da quitosana por quitosanases em meio a ácido clorídrico (KUROZUMI et al., 2019; LI et al., 2019a). É conhecido por suas propriedades não tóxicas, biocompatíveis, biodegradáveis e antibacterianas com uso comum e regular como ingrediente alimentar em países como o Japão. Esse composto mantém e potencializa os benefícios biológicos da quitosana tendo a vantagem de ser solúvel em meios neutros e básicos não necessitando de soluções ácidas para ser dissolvido (WU et al., 2015; FORTUNATI et al., 2017; KUROZUMI et al., 2019).

Esse sal de quitosana tem sido amplamente utilizado na indústria de alimentos como conservante para manutenção e prolongamento da vida de prateleira de frutas e vegetais frescos (FORTUNATI et al., 2017). Em um estudo realizado por Fortunati et al. (2017) o cloridrato de quitosana foi testado como conservante sob a forma de filme no pós-colheita de kiwis e alface romana. Os

resultados demonstraram a formação de um filme fino e com grande dispersão onde os testes de atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* com *Botrytis cinerea* demonstraram o retardo e inibição do desenvolvimento desse fitopatógeno.

O cloridrato de quitosana tem sido preferido como material encapsulante para o desenvolvimento de sistemas de distribuição em comparação com outros polissacarídeos porque é um polieletrólito carregado positivamente que cria uma condição viscosa que facilita a dispersão de partículas e diminui a agregação (ZHONG et al., 2020, 2021). De acordo com Zhong et al. (2020) foi constatado que emulsões, produtos em pó ou filmes elaborados a base desse biopolímero juntamente com proteínas como a zeína, gliadina e gelatina são sistemas bastante estáveis.

Como mencionado anteriormente, as propriedades que a quitosana e seus sais derivados apresentam são atrativos que favorecem o interesse da indústria de alimentos além do fato de poderem ser preparados de diferentes formas. Destacando-se os tipos de preparo desse biopolímero sob a forma de géis, filmes, membranas, microesferas e nanopartículas que criam, dessa forma, diversas possibilidades de aplicações (NAIR et al., 2020; ZHONG et al., 2020).

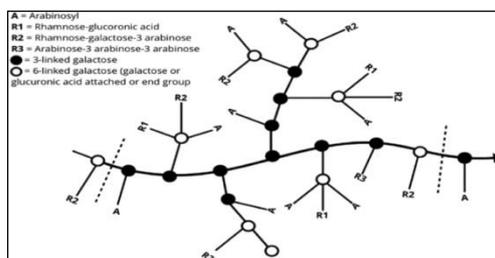
2.5 GOMA ARÁBICA

A goma arábica, também conhecida como goma acácia é um polissacarídeo complexo, biocompatível e biodegradável que consiste no exsudado de árvores do gênero acácia especialmente das espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal* que são principalmente encontradas na região do Sudão e Sahel (RAJABI et al., 2019; VERMA; QURASHI, 2021).

É um heteropolímero (Figura 3) formado por um complexo de polissacarídeos (D-galactose e L-arabinose) altamente ramificados (cerca de 98% em peso) e peptídeos (aproximadamente 2% do seu peso) (MARIOD, 2018). Possui uma composição química heterogênea composta por uma mistura de três frações: uma formada por peptídeos de arabinoglicano, no qual moléculas de β - (1 \rightarrow 3) galactose são ligadas a arabinose e ramnose, que terminam em ácido glucurônico (encontrado na natureza como sais de magnésio, potássio e de cálcio). A segunda parte constituiu o complexo arabinogalactana-proteína no qual as porções de polissacarídeo ligam-se através dos aminoácidos serina e hidroxiprolina. E a terceira

fração consiste em glicoproteínas que estão em menor quantidade (RAJABI et al., 2019; IRAVANI, 2020).

Figura 3 - Estrutura da goma arábica.



Fonte : Verma et al.(2021)

Tem sido amplamente utilizada devido à sua capacidade emulsificante para óleos e aromas. Outras características funcionais envolvem sua capacidade texturizante, estabilizador de espuma, formação de revestimentos e agente encapsulante, especialmente para compostos de aroma. Além disso, é considerada biocompatível, biodegradável, não tóxica e classificada como um aditivo seguro pelo Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO (TAHIR et al., 2019).

Atualmente tem sido utilizada como revestimento comestível ou combinada com a quitosana para conservação de frutas e verduras como tomate, banana e cereja (TAHIR et al., 2018; EL-ADAWY et al., 2021). Tahir et al. (2018) avaliaram a eficácia de um revestimento de goma arábica no processo pós-colheita de morango e esse estudo demonstrou que a cobertura aplicada conservou os parâmetros físico-químicos da fruta (firmeza, sólidos solúveis, cor, pH, atividade antioxidante entre outros) e inibiu em 15% o processo de decomposição.

Quimicamente falando, a goma arábica é um produto solúvel em água, estável em ácidos e com pH entre 4,5–5,0 (TAHERI; JAFARI, 2019). Torna-se carregada negativamente em pH acima de 2,2 (seu pKa aproximado), devido à desprotonação dos grupos carboxílicos em seus resíduos de ácido glucurônico. Isso proporciona o aumento do número de sítios de reação com carga negativa da goma arábica em comparação com outras biomoléculas gerando assim uma condição adequada para a reação com a quitosana durante a nanoencapsulação (RAJABI et al., 2019; SABET et al., 2021).

Sua baixa viscosidade, alta solubilidade em água viabilizam seu uso como matriz encapsulante para compostos bioativos, retenção de aromas e proteção de óleos, especialmente, uma vez que forma emulsões estáveis em ampla faixa de pH.

Essa natureza emulsificante se deve a sua estrutura anfifílica onde a fração hidrofóbica, devido aos peptídeos de sua estrutura, se adsorve na superfície do óleo e a parte hidrofílica formada pelos polissacarídeos estabiliza por repulsão estérica as gotículas do lipídio emulsificado, com a carga negativa dos grupos carboxílicos do ácido gulurônico (XIANG et al., 2015; ISOBE et al., 2020).

Porém, uma das desvantagens de emulsões elaboradas com a goma arábica é sua baixa estabilidade a longo tempo, em comparação à outras gomas, devido ao processo de auto agregação onde forças de coesão entre as moléculas leva a coalescência das gotículas de óleo emulsificadas (XIANG et al., 2015; ISOBE et al., 2020). Dessa forma, o encapsulamento de óleos e o uso de revestimento com a goma arábica sendo o único material formador da matriz alimentar não é suficiente para geração de nanopartículas encapsulantes que ofereçam proteção ao material encapsulado sendo necessário a utilização de um outro biopolímero para formar o material de revestimento (TAHERI; JAFARI, 2019; KARAASLAN et al., 2021).

A interação entre diferentes biopolímeros leva à formação de novas estruturas com propriedades melhoradas e desejáveis quanto ao objetivo da produção de nanoestruturas como por exemplo no trabalho de Tan et al. (2016) que elaboraram nanopartículas de quitosana e goma arábica como um transportador para a curcumina em emulsões de óleo em água. Essa interação levou ao aumento da capacidade antioxidante, estabilidade da curcumina e retardo na liberação da curcumina no fluido gástrico simulado.

2.6 ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ

O nome maracujá é atribuído a várias espécies do gênero *Passiflora* e pertence à família *Passifloraceae*. Compreende mais de 500 espécies em todo o mundo, dentre estas, o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) que é amplamente cultivado e comercializado no Brasil, onde está presente em 95% dos pomares (FALEIRO et al., 2019; LUCARINI et al., 2019).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá amarelo fresco e processado (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), respondendo por cerca de 80% da produção mundial com a geração nacional de 593.429 toneladas em 2019. Nesse cenário, destaca-se a região nordeste com cerca de 65% da produção nacional e em

Pernambuco, a região do Vale do São Francisco, fornece mais de 50% da produção do estado (OLIVEIRA, 2017; IBGE, 2019; MASSAA et al., 2021).

Durante o processamento do fruto para produção de subprodutos à base de maracujá, as cascas e sementes geram muitas toneladas de resíduos agroindustriais o que pode criar problemas ambientais para a indústria devido às muitas toneladas de resíduos formados. Mesmo sabendo da mobilização mundial, no que se refere ao reaproveitamento de subprodutos industriais, grandes quantidades de sementes ainda são subutilizadas (ARAUJO et al., 2020; MASSAA et al., 2021). Elas representam cerca de 5% da composição do maracujá e possuem aproximadamente 30% de lipídios, podendo ser consideradas boas fontes de óleos, além de agregarem consideráveis quantidades de fibras o que pode caracterizar sua inclusão na dieta alimentar como fonte complementar desses nutrientes (LUCARINI et al., 2019; MASSAA et al., 2021).

Atualmente, o uso das sementes de maracujá para extração do óleo tem despertado interesse devido à presença de compostos bioativos em sua composição. Esse óleo possui alto teor de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoleico (até 70%), além de tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos que conferem ao óleo atividade antioxidante. Essa rica composição em compostos funcionais confere potencial de reaproveitamento das sementes do maracujá para aplicação em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas conferindo valor agregado a esse resíduo agroindustrial do beneficiamento do maracujá (OLIVEIRA et al., 2017; MASSAA et al., 2021).

Alguns estudos também comprovam a atividade antimicrobiana desse óleo, frente a cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas (atividade mais eficiente). Essa funcionalidade é atribuída aos ácidos graxos e aos compostos fenólicos (flavonoides, carotenóides, fitoesteróis e tocoferóis) presentes em sua composição (OLIVEIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2019; PUROHIT et al., 2021).

Por possuir um elevado teor de ácidos graxos insaturados esse óleo possui baixa estabilidade oxidativa sendo essa uma das características que limita a sua aplicação (LUCARINI et al., 2019). Nesses casos, faz-se necessário encontrar alternativas tecnológicas para aumentar a sua estabilidade e diminuir efeitos deletérios às propriedades organolépticas, como por exemplo, a microencapsulação ou nanoencapsulação. O objetivo dessas técnicas consiste em proteger o composto

de fatores ambientais, aumentando a liberação, a estabilidade e a eficiência das substâncias encapsuladas (OLIVEIRA et al., 2019b; NAIR et al., 2020).

Barbieri et al. (2014) microencapsularam óleo de semente de maracujá em poli (ϵ -caprolactona) para minimizar os efeitos da oxidação e constataram que a microencapsulação controlou a liberação do óleo. Outros autores que avaliaram a capacidade de preservar componentes do óleo para futuras aplicações por meio da microencapsulação foram Oliveira et al. (2017). Em seus estudos, eles utilizaram a técnica de co-precipitação com biopolímeros e constataram que o óleo foi efetivamente microencapsulado, permitindo a sua preservação para alimentos e aplicações farmacêuticas e cosméticas.

Essas tecnologias promovem a encapsulação de líquidos, sólidos ou gases por meio de polímeros protegendo-os de fatores ambientais, aumentando a liberação controlada, a estabilidade e a eficiência das substâncias encapsuladas (NAIR et al., 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020). Oliveira et al. (2019b) microencapsularam óleo de semente de maracujá pelo método de secagem por atomização e as partículas produzidas apresentaram baixos valores de atividade de água, umidade, diâmetro, forma esférica e distribuição homogênea de tamanho de partícula. Esses resultados levaram esses autores a crerem que a microencapsulação desse óleo foi um processo adequado para futuras aplicações no desenvolvimento de novos produtos alimentares.

É relatado na literatura que nanopartículas poliméricas com óleo vegetal incorporados melhoram a ação antimicrobiana, hidrofobicidade, homogeneidade e manuseabilidade de coberturas comestíveis, prolongam a manutenção da cor e do aroma, principalmente quando aplicadas em frutos (NAIR et al., 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020).

2.7 NANOENCAPSULAÇÃO

O termo nanotecnologia surgiu no final da década de 50 e em 1974, Nario Taniguchi conceituou-o como a manipulação de partículas de tamanho inferior a 1 μm (SAHANI; SHARMA, 2021; SAHU et al., 2021). É uma área multidisciplinar no ramo das ciências que associa preceitos da engenharia química, engenharia de materiais, biotecnologia e tecnologia de processamento industrial. Tem uma grande importância em termos sociais, pois influenciam diretamente muitos setores, como

comunicações, área têxtil, medicina, engenharia, tecnologia agroalimentar entre outros. A nanociência tem como objetivo a caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas em escala nanométrica (PRAKASH et al., 2018; FERREIRA et al., 2020;).

A literatura relata duas abordagens para síntese de nanomateriais e elaboração de nanoestruturas. A primeira é a *"top-down"* que consiste basicamente na desintegração mecânica de materiais (moagem a seco, homogeneização de alta pressão ou microfluidização e emulsificação por ultrassom) e posterior estabilização das partículas nanométricas por agentes de proteção coloidal. No entanto, essa abordagem apresenta algumas desvantagens como nanomateriais com superfícies imperfeitas, contaminações, necessidade de equipamentos específicos, desperdício de material e principalmente a baixa velocidade de elaboração o que dificulta a produção em grande escala (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017; KUMAR et al., 2020) .

A segunda abordagem é a *"botton-up"* e consiste na elaboração de nanomateriais a partir de componentes individuais como átomos ou moléculas por meio da automontagem de forma natural e autorregulada. Sua grande vantagem é o fato de produzir nanoestruturas com menos defeitos, composição mais homogênea e com melhor ordenação estrutural. Além disso, o fato de não desperdiçar materiais durante o processo a faz ser mais viável economicamente. Nessa técnica parâmetros físico-químico como pH, temperatura e tempo de sintetização devem ser levados em consideração na elaboração das nanoestruturas formadas (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017; KUMAR et al., 2020) .

Os nanomateriais como nanopartículas, nanocápsulas ou nacomposítos definem-se como partículas com propriedades morfológicas menores que um micrômetro em pelo menos uma dimensão externa ou com estrutura interna em nanoescala. O tamanho nano confere a esses materiais característica únicas como o aumento de sua área superficial, gerando maior reatividade com consequente melhoria em suas propriedades físicas e químicas (FRANCISCO GARCÍA-ESTEPA, 2018; AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020).

Sabe-se que à medida que o tamanho de um material é reduzido ele vai sofrendo "efeitos quânticos". Isso acontece quando os elétrons que se movem dentro de uma nanopartícula tem seus níveis de energia alterados à medida em que esse tamanho é reduzido levando a alterações em suas propriedades catalíticas,

elétricas, magnéticas ou ópticas quando comparadas às formulações convencionais do mesmo material (FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018; RASHKI et al., 2021).

A nanotecnologia é um campo inovador cujas aplicações estão em ascensão em diversos ramos da biotecnologia como, por exemplo, o farmacêutico, alimentos e nutrição. Particularmente, na área de alimentos, um nanocomposto pode atuar como agente protetor e nanocarreador de elementos sensíveis à luz, oxigênio, pH e temperatura. Sabe-se que existem vários tipos de nanocarreados como por exemplo as nanopartículas poliméricas e outros a base de lipídios que podem ser incorporados à alimentos e em embalagens como as coberturas comestíveis (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017; KHORASANI; DANAEI; MOZAFARI, 2018; BAGHERI DARVISH et al., 2021).

2.7.1 Nanoestruturas utilizadas na área de alimentos

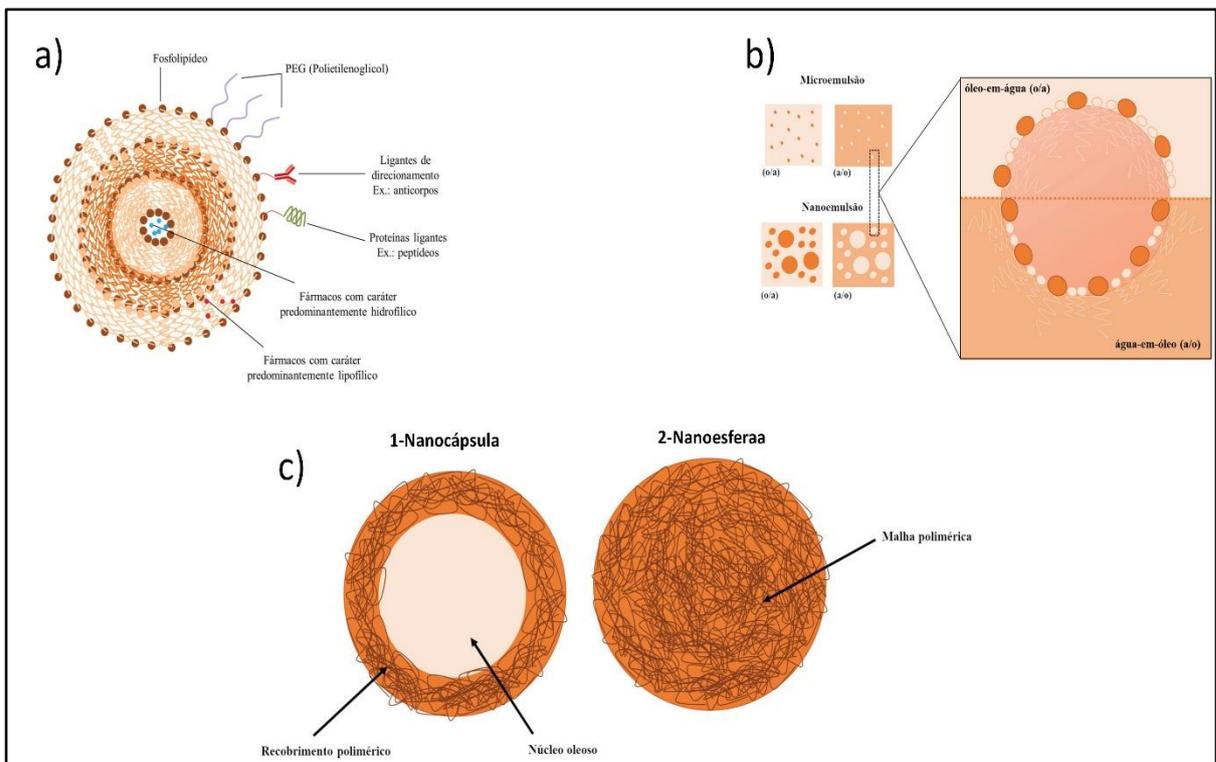
A nanotecnologia é um campo emergente na área de alimentos que gera uma série de benefícios que vão desde a preservação até a síntese de novos produtos e aditivos alimentares (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017; PRAKASH et al., 2018; PATEL et al., 2020). Além disso, favorece a elaboração de alimentos termicamente mais estáveis, com maior solubilidade e biodisponibilidade (HAMAD et al., 2018).

Os sistemas nanoestruturados mais utilizados na área de alimentos são: lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas (Figura 4). Sob essas apresentações estruturais, esses nanomateriais conseguem aumentar a solubilidade, melhorar a biodisponibilidade, favorecer a liberação controlada e a proteção dos compostos ativos (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017; KHORASANI; DANAEI; MOZAFARI, 2018; FONSECA et al., 2020).

Lipossomas (Figura 4a) são definidos como vesículas esféricas formadas por duas camadas de fosfolípidos que associam os benefícios e vantagens da nanotecnologia para encapsular compostos bioativos evitando interações indesejadas com outros componentes do alimento e sua utilização pode melhorar a dissolução, biodisponibilidade e estabilidade de ingredientes funcionais (KHORASANI; DANAEI; MOZAFARI, 2018; SAHANI; SHARMA, 2021). Além disso, os lipossomas também podem auxiliar na entrega específica de nutracêuticos, nutrientes, enzimas, vitaminas e compostos antimicrobianos. Sua pequena

dimensão e área interfacial maior beneficia um maior contato com o alimento e têm sido explorados pela capacidade de associar substâncias antimicrobianas que podem fornecer proteção contra a deterioração de alimentos e crescimento de microrganismos patogênicos (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017; SAHANI; SHARMA, 2021).

Figura 4 - Sistemas nanoestruturados utilizados na área de alimentos: a) Lipossoma, b) Nanoemulsões e c) Nanopartículas poliméricas (1-Nanocápsula ;2-Nanoesfera)



Fonte: Adaptado de Apolinário et al. (2020)

As nanoemulsões (Figura 4b) são sistemas coloidais cujos tamanhos das partículas variam entre 50 nm a 1000 nm. Formam-se a partir da mistura de duas fases imiscíveis estabilizadas por um surfactante ou pela adição de um biopolímero e caracteriza-se por uma fase oleosa dispersa em uma fase aquosa ou um sistema aquoso disperso numa fase oleosa (CHAUDHARY, 2020; SUN; LU; NOLDEN, 2021). Possui aplicação potencial na área de alimentos em decorrência da sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade de compostos, entrega específica, estabilidade a longo prazo e preservação do ativo que for encapsulado (SUN; LU; NOLDEN, 2021).

Também tem ampla utilização como material de revestimento para frutas uma vez que filmes elaborados a partir de uma nanoemulsão e com compostos bioativos incorporados possuem alta eficiência na manutenção da qualidade, no aperfeiçoamento de propriedades funcionais e valor nutricional dos alimentos frescos. Além disso, possui aplicação potencial como carreador de agentes antimicrobianos (CHAUDHARY, 2020). Horison et al. (2019), por exemplo, elaboraram uma nanoemulsão à base de quitosana e de óleo de semente de noz-moscada para aplicação como cobertura em morangos e relataram que esse revestimento reduziu a contagem microbiana nos frutos em decorrência das propriedades antibacterianas e antifúngicas desse óleo potencializadas pela ação da nanoemulsão.

Nanopartículas poliméricas (Figura 4c) são estruturas compostas por polímeros e elaboradas sob a forma de uma nanocápsula ou nanosfera cuja função é envolver ou dispersar uma determinada substância em uma matriz homogênea ou heterogênea (FRANK et al.,2020). Sabe-se que a nanoencapsulação é considerada o principal ramo da nanotecnologia e tem sido usada nas indústrias de alimentos para proteger compostos alimentares bioativos contra o processamento e estresses ambientais (MATSHETSHE et al., 2018; AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020; FRANK et al., 2020).

As nanopartículas ou nanocarreadores esféricos podem ser agrupados como nanoesferas ou nanocápsulas. Nanoesferas (Figura 4c2) são sistemas poliméricos onde os compostos bioativos são dispersos uniformemente nessa matriz de polímeros. Já as nanocápsulas (Figura 4c1), consistem em um invólucro polimérico que envolve um núcleo geralmente oleoso com o composto a ser protegido. A depender das características específicas desse invólucro, o composto ativo pode ser liberado lenta e gradualmente ou completamente após a sua abertura que pode acontecer por mudança de pH ou degradação enzimática (ASSADPOUR; JAFARI, 2018).

A parte externa da nanocápsula é constituída por uma rede formada a partir de interações eletrostáticas intermoleculares entre dois polímeros sintéticos ou naturais de cargas opostas como por exemplo a quitosana e a goma arábica. A quitosana vem se destacando no ramo da nanotecnologia em decorrência de suas vantagens biotecnológicas como sua natureza policatiônica, propriedades mucoadesivas e gelificantes, atividade antibacteriana e antifúngica, não toxicidade,

biodegradabilidade e capacidade filmogênica para conservação de frutas e vegetais (EL KNIDRI et al., 2018; FONSECA et al., 2020; GABRIELE et al., 2021).

Nanopartículas poliméricas também têm sido utilizadas como agente de encapsulação para óleos vegetais e óleos essenciais com o objetivo de protegê-los contra estresses ambientais como temperatura e oxidação, interação indesejada com outros componentes, evitar efeitos sensoriais desagradáveis, controlar a liberação, melhorar a solubidade e biodisponibilidade (DELSHADI et al., 2020; BAGHERI DARVISH et al., 2021). Dessa forma, a tecnologia de encapsulamento pode preservar os compostos bioativos, além de aumentar suas propriedades físico-químicas e melhorar suas atividades de promoção de saúde (DELSHADI et al., 2020; BAGHERI DARVISH et al., 2021).

Diante dessas características tem-se estudado a elaboração de revestimentos comestíveis com óleos nanoencapsulados com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e microbianas do ativo encapsulado, aumentando a vida útil de frutas e vegetais (NASEER et al., 2018; DELSHADI et al., 2020; JAFARZADEH et al., 2021). Karimirad et al. (2019) investigaram a ação de nanopartículas de quitosana carregadas com óleo de cominho na inibição do crescimento de fungos e leveduras em cogumelos *Agaricus bisporus* L. e relataram que essa cobertura foi capaz de inibir os microrganismos acima citados, aumentar a capacidade antioxidante, reduzir ação de enzimas indesejáveis e apresentar qualidade geral aceitável comparativamente às amostras controle. Hassan et al. (2021) investigaram o desempenho de um revestimento elaborado com nanopartículas de quitosana e óleo de tomilho na preservação da qualidade das folhas de manjeriço e observaram que a cobertura comestível aumentou consideravelmente a vida útil e diminuiu a perda de peso das folhas de manjeriço em relação ao controle.

Várias metodologias podem ser utilizadas para preparação de nanopartículas de quitosana entre elas a gelificação iônica, micelas reversas, emulsificação, automontagem, nano secagem por pulverização, nanoprecipitação e coacervação. Atualmente, a coacervação é um dos métodos mais eficazes de micro/nano encapsulamento utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica para encapsular aditivos ou nutrientes reativos, sensíveis ou voláteis (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020).

2.7.2 Preparação de nanopartículas: Coacervação complexa

A coacervação é um processo físico-químico que consiste na separação das fases de um sistema coloidal induzido pela modificação do meio pela alteração do pH, força iônica, temperatura e solubilidade sob condições controladas. A fase rica em colóides recebe a denominação de coacervato e a que contém muito pouca quantidade de colóide é conhecida como fase de equilíbrio (TIMILSENA et al., 2019; BASTOS et al., 2020).

A coacervação pode ser simples ou complexa. Na simples, apenas um polímero está envolvido e os coacervatos são formados a partir da adição de um sal ou de líquido de dessolvatação no meio a partir de mecanismo de desidratação conhecido como déficit de água (TIMILSENA et al., 2019; AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020). A complexa, por sua vez, resulta da interação coloidal entre polímeros de cargas positivas (quitosana) e negativas (goma arábica) formando complexos insolúveis devido à repulsão ao solvente e a consequente separação das fases (TIMILSENA et al., 2019; AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020; BASTOS et al., 2020).

A coacervação complexa é um dos meios mais eficazes de nanoencapsulação utilizado pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas pois apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas como a alta eficiência de encapsulação, baixa concentração dos polímeros, liberação controlada, aumento da estabilidade e proteção dos compostos nanoencapsulados, como óleos, de condições ambientais como o calor evitando a perda de voláteis (SILVA et al., 2015; GHARANJIG et al., 2020; FERREIRA; NICOLETTI, 2021). De acordo com Akbari-Alavijeh et al. (2020) estudos anteriores demonstraram que nanopartículas à base de quitosana e goma arábica como sistema de liberação de curcumina demonstraram uma eficiência de encapsulação de cerca de 90% e com tamanho de diâmetro médio de 863 nm.

Alguns pontos importantes, além da interação eletrostática entre os dois polímeros de cargas opostas, também devem ser considerados no processo de coacervação, incluindo a relação entre os compostos poliméricos, a densidade de carga, força iônica, pH das soluções, estabilidade e solubilidade dos complexos formados (RUTZ et al., 2017; FERREIRA; NICOLETTI, 2021).

Um dos produtos que pode se beneficiar da nanoencapsulação por coacervação complexa são os óleos vegetais e essenciais por serem voláteis, instáveis e facilmente se decompõem com a exposição ao ar, luz e calor durante o processamento, utilização e armazenamento (TIMILSENA et al., 2019). Esses óleos têm sido estudados em decorrência da eficácia dos seus compostos bioativos que apresentam eficácia antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar, bactérias, fungos e toxinas podendo atuar como compostos conservantes viáveis para alimentos perecíveis (MATSHETSHE et al., 2018; PRAKASH et al., 2018; AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020).

Diante do exposto, as propriedades e aplicações que a quitosana e seus derivados apresentam, ampliam o leque de pesquisas para avaliação de novas funcionalidades, principalmente em dimensões nano, pois, a aplicabilidade desse biopolímero pode produzir diferentes formas de nanomateriais, carrear compostos bioativos de óleos, como o óleo de semente de maracujá (DIVYA; JISHA, 2018; MATSHETSHE et al., 2018; AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020;).

O aproveitamento desse resíduo do beneficiamento do maracujá é uma importante estratégia para agregar valor à cadeia produtiva desse fruto produzindo benefícios social, ambiental, científico e tecnológico.

3 HIPÓTESES

Cloridrato de quitosana permite melhor interação eletrostática com a goma arábica pela técnica de coacervação complexa além de possibilitar a encapsulação de óleo da semente de maracujá permitindo a obtenção de nanopartículas para o preparo de cobertura comestível com ação antimicrobiana e biocompatível.

Cobertura comestível de nanopartículas cloridrato de quitosana-goma arábica com o óleo de semente de maracujá nanoencapsulado prolonga o tempo de armazenamento sob refrigeração (8°C) e ambiente (26°C) de morango (*Fragaria x ananassa* Duch), mantendo os parâmetros de qualidade do pseudofruto.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a ação antimicrobiana e conservadora da cobertura comestível de cloridrato de quitosana-goma arábica com o óleo da semente de maracujá encapsulado na manutenção dos parâmetros de qualidade de morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) durante o armazenamento.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica com e sem o óleo da semente de maracujá encapsulado;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas contendo o óleo;
- Avaliar o processo de liofilização das nanopartículas contendo o óleo utilizando diferentes crioprotetores;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo da semente do maracujá, das nanopartículas brancas e das nanopartículas contendo o óleo frente a cepas dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum siamense* e *Aspergillus niger*;
- Avaliar a bioatividade de cobertura comestível elaborada com as nanopartículas contendo o óleo nanoencapsulado contra o *Aspergillus niger*;
- Verificar o efeito da cobertura preparada sobre os parâmetros físico-químicos, e microbiológicos do morango durante o tempo de armazenamento a temperatura ambiente e sob refrigeração.

5 MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos, em sua maioria, foram realizados no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição, no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA_p) do Departamento de Medicina Tropical (LAMA_P) e na Central Analítica do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Todos pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco.

5.1 MATERIAIS

O óleo da semente de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) foi doado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA_p) da UFPE. O mesmo foi extraído pelo método de prensagem a frio, armazenado em frasco âmbar rosqueado e mantido a -18°C (MALACRIDA; JORGE, 2012).

O cloridrato de quitosana extraído do *Aspergillus niger* (grau de desacetilação 93,2%, viscosidade 32 mpa.s) foi adquirido da Qingdao ChiBio Biotech Co., Ltd. (China). A goma arábica (*Acacia senegal*) foi obtida na Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Millipore (Milli-Q Plus, Millipore Corp., Massachusetts, EUA).

5.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS POLÍMEROS

O cloridrato de quitosana (1,0% (m/v), pH~3,80) foi dissolvido em água ultrapura sob agitação magnética (600 rpm), em temperatura ambiente até completa dissolução. A goma arábica (2,0% (m/v), pH~5,0) foi dispersa em água ultrapura, sob agitação magnética (600 rpm) até estar totalmente dissolvida.

5.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA COM E SEM O ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM)

As nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica com e sem o óleo da semente de maracujá (NP-OSM) foram preparadas segundo metodologia descrita no trabalho de Rutz et al. (2017) com alterações.

A nanoencapsulação do OSM foi realizada utilizando a técnica de coacervação complexa e desenvolveu-se em duas etapas principais. A primeira consistiu na emulsificação do óleo na solução de cloridrato de quitosana e a segunda na formação do invólucro polimérico em volta das gotículas do óleo emulsificado a partir da complexação entre macromoléculas de cargas opostas (BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014).

Em um primeiro momento emulsificou-se o cloridrato de quitosana 1,0% (m/v), o Tween 80 (HBL 15,0) e diferentes quantidades de OSM, conforme a tabela 1, em um homogeneizador ultra-turrax (T25, IKA, Alemanha) a 8000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, esse sistema ficou sob agitação magnética (400 rpm) por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a goma arábica foi adicionada à essa emulsão, com o auxílio de uma seringa adaptada a uma ponteira e sob agitação constante (700 rpm) por mais 30 minutos a fim de garantir a completa complexação entre os polímeros. Em seguida, as dispersões de nanopartículas foram submetidas à centrifugação (2.000 rpm) por 10 minutos. Nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) foram preparadas seguindo o mesmo procedimento, sem a adição do OSM, de forma a avaliar a influência do óleo nas nanopartículas.

Tabela 1 - Composição das formulações em relação a quantidade de Tween 80 e proporção entre os polímeros e OSM

Formulação	POL:OSM (m/m)	Polímeros (material de parede)			OSM (mg)	Tween 80 (mg)
		CQ (mg)	GA (mg)	Total (mg)		
NP	1:0	150,0	300,0	450,0	0	130,0
NP-OSM-0,25	1:0,25	150,0	300,0	450,0	112,5	130,0
NP-OSM-0,50	1:0,50	150,0	300,0	450,0	225,0	130,0
NP-OSM-0,75	1:0,75	150,0	300,0	450,0	375,5	130,0
NP-OSM-1,00	1:1	150,0	300,0	450,0	450,0	130,0

NP: nanopartículas brancas; POL: polímeros; OSM: óleo da semente de maracujá; CQ: cloridrato de quitosana; GA: goma arábica.

Fonte: A autora(2021).

A avaliação da estabilidade das nanopartículas foi baseada na observação do aspecto macroscópico e valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga superficial e pH, como descrito a seguir. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (4°C) e analisadas após 7, 15, 21, 30, 60 e 90 dias para acompanhar possíveis mudanças nos parâmetros.

5.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO COM O USO DE CRIOPROTETORES

Após a avaliação da estabilidade e definição da melhor formulação, adicionou-se a essa amostra, os crioprotetores manitol (proporções de 5 e 10% (m/v)) e trealose (na proporção de 5,0% (m/v)). Cada crioprotetor foi adicionado às dispersões de nanopartículas sob agitação magnética suave (300 rpm) durante 5 minutos (RAMPINO et al., 2013; GOKCE et al., 2014). Em seguida, as amostras foram congeladas a -80 °C durante 24 horas e submetidas à liofilização em equipamento EZ-DRY (FTS Systems, Nova York, EUA) durante 48 horas.

Após a liofilização as amostras foram redispersas em água ultrapura e analisadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga superficial e pH.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS BRANCAS E CONTENDO O OSM

5.5.1 Aspectos macroscópicos

Os aspectos macroscópicos foram avaliados visualmente a partir da verificação das seguintes características: cor, translucência azulada, presença de gotículas de óleo na superfície ou aderidas ao frasco, deposição de resíduos, formação de grumos ou de cremagem e separação de fases (CAVALCANTI et al., 2015).

5.5.2 Análise de tamanho de partícula e potencial zeta

Tanto para a análise de tamanho de partícula quanto para a de potencial zeta, as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 com água ultrapura filtrada (Millex® 0,22 µm) a fim de evitar fenômenos de espalhamentos múltiplos (Tan et al., 2016).

O tamanho do raio hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foi avaliado em um equipamento Zetasizer (Nano ZS90, Malvern, Reino Unido) a 25 °C com laser de 633 nm e ângulo de detecção fixo de 90°. O

tamanho das nanopartículas foi calculado automaticamente de acordo com o movimento Browniano gerado pelas mesmas, utilizando a equação de Stokes-Einstein (TSAI et al., 2011).

A determinação do potencial Zeta foi realizada através da técnica de mobilidade eletroforética a 25 °C, no mesmo equipamento anterior. Os valores de mobilidade eletroforética foram automaticamente convertidos em potencial Zeta (mV) com base no modelo de Smouluchowski (UMERSKA et al., 2018).

Para cada amostra foram realizadas três leituras subsequentes tanto para tamanho de partícula quanto para potencial Zeta e os valores foram expressos no formato média \pm desvio padrão.

5.5.3 pH

O pH da solução de nanopartículas foi avaliado utilizando medidor de pH digital PHS3BW (Bel Engineering, Monza, Itália) equipado com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, a 25 °C .

5.5.4 Morfologia

A morfologia das nanopartículas contendo o óleo da semente de maracujá (NP-OSM-0,50) foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O microscópio utilizado foi um aparelho EVO LS15 (ZEISS, Oberkochen, Alemanha).

Uma alíquota de 5 μ L da dispersão fresca de nanopartículas foi depositada diretamente em um “stub” e deixada para secar em temperatura ambiente (26 °C) durante 24 horas. Posteriormente, a amostra foi recoberta com uma camada de 10 nm de Au-Pd em sistema de metalização Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (JEOL, Tóquio, Japão) e visualizada no microscópio eletrônico de varredura sob tensão de aceleração de 10 kV e magnificação entre 5.000 e 20.000x (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019).

5.5.5 Estrutura química

A fim de analisar a estrutura química dos polímeros, OSM, das nanopartículas liofilizadas (NP e NP-OSM-0,50) e as possíveis interações entre eles, realizou-se a

espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros dessas amostras foram elaborados por um aparelho espectrofotômetro IR-Tracer (Shimadzu, Japão) acoplado a acessório de reflectância total atenuada ou ATR (Attenuated Total Reflectance).

Os materiais foram depositados diretamente no cristal de seleneto de zinco e diamante para serem analisadas no modo ATR e um total de 16 varreduras foram realizadas para cada medida com resolução de 4 cm^{-1} , na região entre 4.000 cm^{-1} e 600 cm^{-1} .

Essas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

5.5.6 Propriedades térmicas

As análises de termogravimetria (TGA) e de DSC (Differential Scanning Calorimetry) foram utilizadas para avaliar a estabilidade térmica dos materiais de parede, do OSM e das nanopartículas liofilizadas (NP e NP-OSM-0,5). Ambas foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

A análise de TGA foi realizada em um analisador térmico TGA Q500 V20.13. Cerca de 10 mg de cada material foi colocado em cadinhos de platina e aquecidos de $19,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio (60 mL min^{-1}) (HADIDI et al., 2020).

Para a análise de DSC, 2 mg de cada amostra foram aquecidas em cadinhos de alumínio entre $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $380\text{ }^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com um fluxo de nitrogênio de 50 mL min^{-1} (HADIDI et al., 2020). O equipamento utilizado foi um DSC Q20 (TA Instrumentos, New Castle, DE, EUA).

5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO*

5.6.1 Preparo do inóculo fúngico

As cepas dos fungos *Aspergillus niger* URM 7282 e *Colletotrichum siamense* CMM 4077 foram adquiridas da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (Centro de Biociências, UFPE, Recife, Brasil) e da coleção de fungos fitopatogênicos

“Prof. Maria Menezes” da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Brasil), respectivamente. As culturas foram repicadas em meio BDA (batata dextrose ágar) e cultivadas entre 25 °C e 28 °C por 7 dias, respectivamente a fim de garantir a esporulação necessária.

Com movimentos suaves e com o auxílio de um swab coletou-se os esporos fúngicos e ressuspendendo-os em água destilada estéril. Em seguida, essa solução foi filtrada com uma camada tripla de gaze estéril para retirada de fragmentos de hifas e a concentração ajustada até 10^6 esporos mL^{-1} com o auxílio de um hemocítômetro (DE OLIVEIRA et al., 2014; FARZANEH et al., 2015).

5.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação da atividade antifúngica do OSM, das nanopartículas com e sem OSM baseou-se na obtenção da CIM dessas substâncias frente aos fungos fitopatogênicos citados no item 5.6.1. Baseou-se na técnica de microdiluição em caldo utilizando uma placa de 96 poços e seguiu a metodologia citada por Balouiri et al. (2016) com adaptações.

Para esse teste, o OSM foi emulsificado na concentração utilizada na formulação NP-OSM-0,5 ($7,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Essa solução foi preparada com água destilada estéril, Tween 80 1% (m/m) e DMSO 1% (m/m). Posteriormente foi homogeneizado por 5 minutos em ultraturrax a velocidade de 8000 rpm. Convém ressaltar que as concentrações dos reagentes anteriormente citados, de acordo com alguns estudos, não influenciam negativamente no crescimento de fungos (ATHAYDE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

A distribuição das substâncias testes, meio de cultura e inóculo seguiram esquema de preenchimento conforme tabela 2. Inicialmente, adicionou-se em cada poço as substâncias testes (OSM, NP e NP-OSM) e posteriormente foi adicionado o meio Sabouraud e o inóculo de cada um dos fungos, de forma que o volume final de cada poço fosse de 100 μL . A fim de garantir o controle de esterilidade (poço G1) e controle positivo (poço H1), alguns poços foram preenchidos com meio de cultura e substâncias teste e outros completados apenas meio e inóculo, respectivamente. Em seguida as placas foram incubadas entre 25 °C e 28 °C, durante 96 horas (KIM et al., 2020) e após esse período, a menor concentração da substância teste que não apresentou turvação no poço foi considerada a CIM.

Tabela 2- Preenchimento da microplaca de 96 poços.

Poço	Substância teste µL	Meio Sabouraud µL	Inóculo µL	Volume final do poço µL	[OSM] _f (mg mL ⁻¹)	[NP] _f (mg mL ⁻¹)
A1	60	20	20	100	4,50	3,00
B1	50	30	20	100	3,75	2,50
C1	40	40	20	100	3,00	2,00
D1	30	50	20	100	2,25	1,50
E1	20	60	20	100	1,50	1,00
F1	10	70	20	100	0,75	0,50
G1	80	20	-	-	-	-
H1	-	80	20	-	-	-

[OSM]_f: concentração final do óleo da semente do maracujá; [NP]_f: concentração final das nanopartículas de quitosana-goma arábica.

Fonte: A autora (2021).

5.6.3 Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica

Os fungos fitopagênicos *A. niger* e *C. siamense* foram expostos às substâncias teste e à ação das mesmas sobre a morfologia fúngica foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Inicialmente, o inóculo fúngico padronizado em água destilada estéril por hemocítmetro (10^6 esporos mL⁻¹), foi inoculado em caldo Sabouraud e depois separadamente foram acrescentadas a solução de óleo da semente do maracujá (OSM), as nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) e de nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) em concentrações sub-inibitórias para cada fungo.

Para o *C. siamense*, utilizou-se 50% da CIM, 86% da CIM e 75% da CIM para OSM, NP-OSM e NP, respectivamente; para o *A. niger*, utilizou-se 67% da CIM, 75% e 67% da CIM para OSM, NP-OSM e NP, respectivamente. As amostras foram incubados entre 25 °C e 28 °C por 72 horas e os controles cresceram apenas no meio de cultura sem as substâncias teste (SHARMA; TRIPATHI, 2008).

Em seguida, fragmentos dos micélios foram coletados e lavados com solução salina (pH 7,2) por 3 vezes, 10 minutos cada e fixados com glutaraldeído 2,5% com verde malaquita 0,05% em tampão fosfato 0,1M por 1 hora a 28 °C. Após a fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato 0,1M por 10 minutos. As amostras foram então gradativamente desidratadas em etanol nas concentrações de 50%, 70% e 90% (5 minutos cada) e na concentração de 100% por 3 vezes de 10

minutos. Em sequência, as amostras foram imersas em hexametildisilazina (HDMS) 100% por 5 minutos para secagem. Por fim, as amostras foram mantidas em dessecador por 24 horas e em seguida foram montadas em suportes de alumínio, metalizadas com ouro (espessura de 10nm) e observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-5600 LV (Tóquio, Japão) operando a 18kV (MELO et al., 2020b; MENG et al., 2020).

5.6.4 Atividade antifúngica *in vivo*: bioatividade de cobertura comestível sobre o crescimento fúngico em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Os pseudofrutos utilizados nesse experimento foram adquiridos no CEASA/PE (Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco), possuíam no máximo três dias de colhidos no campo e foram selecionados levando-se em consideração a sua cor e tamanho homogêneo, superfície isenta de danos mecânicos e infecções fúngicas visíveis.

Após essa primeira etapa, os morangos foram mergulhados em recipientes contendo solução de hipoclorito de sódio 1%(v/v) durante 15 minutos para higienização, em seguida foram lavados com água potável e deixados para secagem à temperatura ambiente por um período de 2 horas para remoção da água residual. Depois disso, os frutos foram inoculados durante um minuto em solução do inóculo fúngico de *Aspergillus niger* (10^6 esporos mL⁻¹) sob agitação suave utilizando um bastão de vidro estéril antes de receberem as coberturas comestíveis (tratamento curativo) (MELO et al., 2020b).

Em seguida, os pseudofrutos foram divididos em 3 grupos, sendo, 20 morangos por grupo. No primeiro, os morangos foram imersos em uma solução formada pelo plastificante glicerol 2,5% (v/v) e pela dispersão das nanopartículas de cloridrato quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá sob a mesma concentração encontrada para a CIM do *A. niger*. O segundo grupo foi considerado o controle positivo, no qual os frutos foram recobertos por solução de glicerol 2,5% (v/v) e o terceiro grupo, controle negativo, que corresponde aos frutos sem cobertura (MELO et al., 2020b).

Após aplicação das coberturas os frutos foram deixados para secagem por 30 minutos a fim de drenar o excesso de líquido das amostras e em seguida foram armazenados separadamente por grupos, em recipientes de polietileno, em

temperatura ambiente (26 °C) e de refrigeração (8 °C), separadamente. Os morangos foram avaliados quanto a presença de infecção fúngica visível com 6 e 12 dias em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente e os resultados foram expressos em percentual de fruta infectada (SHAHBAZI, 2018; MELO et al., 2020b).

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COBERTURA TESTE E CONTROLE SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS MORANGOS ARMAZENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE E REFRIGERAÇÃO.

Os critérios de seleção dos morangos, higienização com hipoclorito de sódio 1%(v/v) e secagem seguiram os mesmos parâmetros e passo a passo citados no item 5.6.4.

Em seguida os pseudofrutos foram divididos em 3 grupos distintos com 40 frutos cada, sendo: um controle negativo (que não recebeu nenhum tratamento), um controle positivo (recoberto com solução de glicerol a 2,5 % (v/v) e o grupo cujos morangos foram imersos na substância teste (nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá + glicerol 2,5% v/v). Convém ressaltar que cada grupo foi duplicado em relação ao quantitativo de frutos a fim de serem analisados a temperatura ambiente (26 °C) e sob refrigeração (8 °C).

Em seguida, os morangos foram imersos durante um minuto em cada solução, exceto o controle negativo. Os frutos foram manuseados pelo pedicelo durante a imersão a fim de evitar danos. Decorrido esse período, as amostras dos grupos controle positivo e as que receberam a substância teste foram deixadas por 30 minutos, a temperatura ambiente para secagem das coberturas aplicadas. Posteriormente os morangos foram acondicionados em recipientes de polietileno com tampa e os grupos foram armazenados a temperatura ambiente por 6 dias e 12 dias sob refrigeração.

Ao longo dos períodos acima citados os morangos foram analisados a cada 3 dias de armazenamento (0,3,6 dias – grupo não refrigerado e 0,3,6,9,12 dias – grupo refrigerado) quanto a umidade, sólidos solúveis, pH, índice de maturação e acidez titulável, seguindo as normas da AOAC (2012), percentual de infecção visível (MELO et al., 2020a), perda de peso (FRIEDRICH et al., 2020) e evolução da cor (CIE 1986).

5.7.1 Análise dos frutos

As amostras para análise de umidade, sólidos solúveis, pH e acidez titulável foram preparadas para serem avaliadas através da trituração de 6 frutos por tratamento utilizando um aparelho processador manual doméstico (mixer), modelo PMX600, marca Philco. As análises foram realizadas em triplicata.

Para avaliar perda de peso, percentual de infecção visível e cor foram selecionados, em cada grupo, um quantitativo de 10 e 2 morangos, respectivamente, que foram separados e identificados para que as análises fossem sempre realizadas nos mesmos frutos.

5.7.2 Umidade

As análises para avaliação do teor de umidade das amostras foram realizadas por meio do aquecimento dos frutos, previamente triturados, em estufa à 70°C pelo período de 24 horas até a obtenção de massa seca e o resultado foi expresso em porcentagem (AOAC, 2012-Método 934.06).

5.7.3 Sólidos solúveis

A determinação dos teores de sólidos solúveis totais das amostras foi realizada utilizando um refratômetro de bancada modelo AUS JENA calibrado previamente com água destilada. Para leitura da amostra dispôs-se cerca de 0,05 mL do suco extraído após a trituração sobre o prisma do aparelho. Os resultados foram apresentados em °Brix (AOAC, 2012-Método 932.12).

5.7.4 pH

A amostra das frutas foi diluída em água destilada e o pH foi mensurado usando um pHmetro digital da marca Micronal B474 após a calibração do aparelho com as soluções tampão (pH 4,0 e 7,0) (AOAC, 2012-Método 981.12).

5.7.5 Acidez titulável

A acidez titulável, expressa em percentual de ácido cítrico, foi determinada através da diluição da amostra da fruta triturada em água destilada, seguida da adição do indicador fenolftaleína e titulação com solução de NaOH 0,1 N até o ponto de viragem estabelecido em pH 8,2 utilizando-se um pHmetro digital da marca Micronal B474 (AOAC, 2012-Método 920.149).

5.7.6 Índice de maturação

O índice de maturação foi calculado pelo quociente entre o teor de sólidos solúveis e acidez titulável seguindo metodologia preconizada por Melo et al. (2020a).

5.7.7 Evolução da cor

A cor da superfície dos morangos foi avaliada tendo como base o sistema internacional de cores CIElab (L^* , a^* e b^*), usando um colorímetro Minolta modelo CR-300 (Osaka, Japão). Antes das medições o aparelho foi calibrado com uma placa de cerâmica branca padrão. Cada fruto foi avaliado em 2 posições diferentes e os parâmetros de luminosidade das amostras (L^*), coordenada cromática a^* que é relacionada a dimensão verde/vermelho e b^* , associado à dimensão azul/amarelo foram registrados. A partir desses dados foram calculados os valores de croma (C^*), que indica o atributo quantitativo de intensidade de cor e o ângulo hue (h°), que é considerado o atributo qualitativo de tonalidades de cor (0° = vermelho-roxo e 180° =verde-azulado) usando as equações (1) e (2), respectivamente (CALEB et al., 2016).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad \text{Eq. (2)}$$

5.7.8 Perda de peso

A perda de peso das amostras foi determinada segundo metodologia de Friedrich et al. (2020). Os frutos foram pesados individualmente com o auxílio de uma balança analítica Marte modelo AY220. Cada morango foi pesado no dia 0 (dia em

que aplicou a cobertura e após secagem) e em intervalos de 3 dias de acordo com períodos determinados para as análises físico-químicas até o final do armazenamento a temperatura ambiente (6 dias) e refrigeração (12 dias).

O cálculo para perda de massa foi realizado segundo a equação 3 e expresso em porcentagem de perda de peso em relação ao peso inicial.

$$PP\% = \frac{(PI-PF)}{PI} \times 100 \text{ (Eq.3)}$$

Onde:

PP: porcentagem de perda de peso no período.

PI: massa inicial da amostra no dia 0 em gramas.

PF: massa final da amostra em gramas.

5.7.9 Percentual de infecção visível

Durante o armazenamento e seguindo os períodos determinados para realização das análises físico-químicas as amostras foram inspecionadas e avaliadas quanto a presença de decomposição e infecções visíveis por microrganismos. O número de frutos apodrecidos foi dividido pelo número inicial de frutos em cada grupo e expresso em porcentagem de acordo com Melo et al. (2020a).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com estatística descritiva (média e desvio padrão) e testes inferencial (ANOVA seguido pelo teste de tukey) para determinação das diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como a média estimada \pm desvio padrão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 NANOPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM)

Os resultados encontrados para as nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (NP) e as com o óleo incorporado (NP-OSM-0,25; NP-OSM-0,50; NP-OSM-0,75; NP-OSM-1,0) estão relacionados na tabela 3 e a partir da avaliação dos valores de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e pH foi escolhida a formulação mais estável para dar continuidade às análises propostas nesse trabalho.

A emulsificação é determinante para estabelecer o tamanho e a distribuição do nanocarreador formado e é influenciada pelas configurações do aparelho utilizado, taxa de homogeneização, a razão de volume e propriedades físico-químicas das fases imiscíveis (HECKERT BASTOS et al., 2020; FERREIRA; NICOLETTI, 2021). Kuroiwa et al. (2015) e Eghbal et al. (2018) relataram que no processo de coacervação complexa a turbidez inicial de uma solução aumenta pela adição de outro biopolímero de carga oposta. Ao final do processo de coacervação, visualizamos uma formulação leitosa com aspecto azulado, que configura a formação de nanopartículas, sem formação de cremagem, material decantado ou em suspensão.

De acordo com a tabela 3 o valor médio do tamanho das partículas formadas variou de 120 a 453 nm à medida que alterava a quantidade de OSM. Esses valores são semelhantes aos encontrados por Oliveira al. (2018) ao prepararem nanopartículas à base de quitosana para encapsular geraniol pela mesma técnica utilizada em nosso experimento.

Como esperado, as nanoestruturas formadas apresentaram aumento de tamanho acompanhado da redução do potencial zeta à medida em que a massa inicial do OSM incorporado às formulações aumentou. Assim como em nosso trabalho, Hadidi et al. (2020) observaram o incremento no diâmetro médio das nanopartículas elaboradas em seu experimento ao incorporar óleo essencial de cravo. Sotelo-Boyás et al. (2017) também relataram esse mesmo fenômeno ao avaliarem a influência da variação da quantidade de óleo essencial de limão em nanopartículas de quitosana. Eles relacionaram o aumento do tamanho evidenciado

nas nanopartículas à adsorção do óleo essencial na superfície da mesma o que geraria uma estrutura maior.

Tabela 3 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga superficial e pH obtidos no dia 0 para cada uma das formulações elaboradas com e sem o óleo de semente de maracujá

Formulação	POL:OSM	Parâmetro			
		ϕ (nm)	PDI	ζ (mV)	pH
NP	1:0	139,8±0,99	0,33	48,02±1,35	4,11±0,15
NP-OSM-0,25	1:0,25	120,83±1,56	0,67	26,03±1,80	4,06±0,12
NP-OSM-0,50	1:0,50	159,21±4,80	0,40	9,00±2,40	4,08±0,13
NP-OSM-0,75	1:0,75	177,12±4,71	0,30	8,10±0,90	4,23±0,22
NP-OSM-1,00	1:1	453,10±39,40	0,38	3,30±0,10	4,15±0,11

POL: polímero; OSM: óleo da semente de maracujá; ϕ : tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; Potencial ζ : potencial zeta. Resultados representados como valor médio \pm desvio-padrão.

Fonte: A autora (2021).

Um outro aspecto importante a ser avaliado em suspensões coloidais é o índice de polidispersão (PDI). Ele indica a homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas e pode variar entre 0 e 1. Considera-se uma amostra polidispersa aquelas cujos valores apresentam-se superiores a 0,5 (KIM et al., 2019; RAJABI et al., 2019). Nossos resultados mostram valores de PDI que caracterizam a maioria das nossas formulações como monodispersas, exceto a NP-OSM-0,25. Pant et al. (2018), também obtiveram nanopartículas de pequeno tamanho e PDI próximos a 1 o que foi associado a uma reticulação descontrolada entre os ânions do TPP e os cátions da quitosana. De acordo com Sena et al. (2018) sistemas polidispersos tendem a se desestabilizar, então, por esse motivo a NP-OSM-0,25 foi descontinuada da avaliação de estabilidade.

O potencial zeta representa a carga superficial das partículas e é um dos fatores que controla as interações eletrostáticas entre os polímeros de cargas opostas durante o processo de coacervação. Além de ser um referencial para manutenção da estabilidade (FERREIRA; NICOLETTI, 2021). Conforme mostrado na tabela 3 os resultados do potencial zeta variaram de 3,3 mV até 48,02 mV.

O maior valor corresponde a formulação sem a adição do OSM (NP) e a medida em que aumenta a proporção óleo:material de parede, há um decréscimo do potencial zeta. De acordo com Sotelo-Boyàs et al. (2017) isso acontece devido a uma redução dos íons positivos da quitosana (NH_3^+) ao interagir com os grupos

funcionais negativos da estrutura química do óleo o que gera uma menor disponibilidade de cargas positivas e conseqüentemente a redução no potencial. É relatado em trabalhos como o de Sena et al. (2018) e o de Souza et al. (2021) que o potencial zeta de emulsões do óleo de semente de maracujá varia entre -57mV e -21mV, respectivamente, e isso poderia explicar a redução do potencial zeta das nanopartículas à medida em que quantidades adicionais de óleo eram acrescentadas às formulações.

Karimirad et al. (2020) também identificaram o decréscimo no potencial zeta de nanopartículas de quitosana e óleo de laranja amarga com o aumento da proporção em massa do composto nanoencapsulado. Ele associaram o fenômeno ao aumento da dimensão das nanopartículas e a redução da superfície carregada positivamente devido ao acréscimo do conteúdo inicial do óleo.

O pH das dispersões de nanopartículas elaboradas em nosso estudo variou entre 4,06 e 4,23. Esses valores encontram-se dentro da faixa adequada para obtenção de coacervatos de cloridrato de quitosana e goma arábica. Tan et al. (2016) e Espinosa-Andrews et al. (2007) relatam que a faixa ideal para obtenção de coacervados estabelece-se na faixa de pH que varia de 3,5-5,0.

6.2-AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO O ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM).

Conforme anteriormente descrito, a seleção das formulações adequadas para prosseguir com a análise de estabilidade baseou-se na avaliação do tamanho de partícula, baixo índice de polidispersão, potencial zeta positivo e pH. De acordo com os valores da tabela 3, a formulação NP-OSM-1 apresentou o maior tamanho entre as amostras e a NP-OSM-0,25 maior polidispersão. Diante disso, a avaliação das mesmas foi descontinuada.

A tabela 4 demonstra os resultados da estabilidade das formulações elaboradas obtidos ao longo de 90 dias nos intervalos de 0,7, 15, 21, 30, 60 e 90. O monitoramento foi baseado na avaliação dos aspectos macroscópicos e nos parâmetros físico-químicos.

Em relação às alterações visuais, ao longo dos 90 dias de armazenamento, não foi identificada nenhuma alteração macroscópica como cremagem, formação de

grumos e divisão de fases nas amostras. O aspecto azulado característico da formação das nanopartículas foi presente em todo o período.

Tabela 4 – Avaliação da estabilidade das formulações elaboradas durante 90 dias

Parâmetro	Tempo Dias	FORMULAÇÃO		
		NP	NP-OSM-0,50	NP-OSM-0,75
∅ (nm)	0	139,80±0,99	159,21±4,80	177,12±4,71
	7	143,45±15,47	140,61±8,41	156,02±5,32
	15	154,25±9,64	153,53±4,30	159,61±6,52
	21	174,03±1,49	139,03±6,50	153,32±4,31
	30	176,22±7,67	138,12±9,52	152,63±7,32
	60	293,33±88,67	144,83±5,32	153,52±5,31
	90	408,03±76,38	165,00±16,01	173,51±16,72
	PDI	0	0,33	0,40
7		0,21	0,40	0,30
15		0,17	0,40	0,40
21		0,13	0,30	0,20
30		0,20	0,30	0,20
60		0,31	0,40	0,30
90		0,42	0,40	0,30
Potencial (mV)		0	48,02±1,35	9,00±2,40
	7	37,58±4,02	15,50±0,80	9,41±0,52
	15	32,00±2,05	11,02±1,01	14,72±2,20
	21	34,13±0,65	8,60±0,92	8,73±0,71
	30	43,14±16,88	11,42±3,22	10,12±4,13
	60	41,15±3,07	11,91±5,00	11,40±3,41
	90	45,55±3,07	15,62±7,81	16,62±9,32
	pH	0	4,11±0,15	4,08±0,13
7		4,02±0,31	4,13±0,08	4,22±0,15
15		4,55±0,18	4,12±0,11	4,18±0,11
21		4,50±0,03	4,06±0,06	4,17±0,08
30		4,52±0,04	4,08±0,02	4,16±0,10
60		4,48±0,08	4,12±0,06	4,09±0,16
90		4,51±0,02	4,5±0,01	4,51±0,08

∅: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; Potencial ζ: potencial zeta (carga superficial). Resultados representados como valor médio ± desvio-padrão.

Fonte: A autora (2021).

Quanto às características físico-químicas, tanto a NP-OSM-0,5 e a NP-OSM-0,75 mantiveram-se estáveis por 90 dias, com tamanho de partícula abaixo de 200

nm, PDI em torno de 0,4 e potencial zeta variando entre 8,6 e 16,9 mV. O pH manteve-se constante até 60 dias de avaliação apresentado um leve acréscimo aos 90 dias nas duas amostras avaliadas.

O potencial zeta apresentou discretas alterações ao longo do armazenamento, mas sempre dentro da faixa da neutralidade sem agregação e desestabilização observada. Esse é um parâmetro essencial para a avaliação da estabilidade de sistemas coloidais pois avalia a magnitude das forças de repulsão eletrostática entre as partículas (BAGHERI; ARIALLI; MOTAMEDZADEGAN, 2021). De acordo com Kuroiwa et al. (2015) o potencial zeta não é o único fator que garante a integridade de um sistema coloidal. Kuroiwa et al. (2015) associam a manutenção da estabilidade coloidal a três tipos de estabilização: estérica (ação das forças repulsivas entre os polímeros), a eletrostática (repulsão Coulombic entre superfícies de partículas com carga idêntica) e a eletrostérica onde as partículas coloidais são estabilizadas por uma combinação das duas anteriores.

Após o período acima citado, determinamos que NP-OSM-0,5 seria a formulação selecionada para realização dos testes posteriores. O critério de escolha baseou-se na apresentação do menor tamanho de partícula, carga superficial positiva e o aspecto visual homogêneo.

6.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

A liofilização baseia-se na remoção de água de um sistema coloidal com o objetivo de preservar a sua estabilidade a longo prazo. Nanopartículas podem ser termodinamicamente instáveis e após períodos de armazenamento podem ser suscetíveis a agregação e dispersão o que torna a liofilização uma alternativa viável para manutenção e proteção de suas características coloidais (RUTZ et al., 2017; TRENKENSCHUH; FRIESS, 2021). Buscando esse objetivo, a formulação NP-OSM-0,5 foi liofilizada, porém as nanopartículas redispersas apresentaram tamanho de partícula aproximadamente 4 vezes maior ($619,30 \pm 82,33 \text{ nm}$) que a suspensão das nanopartículas ($154,63 \pm 1,81 \text{ nm}$).

De acordo com alguns autores, a própria liofilização possui ressalvas uma vez que as etapas do processo podem gerar tensões que afetem a estabilidade das nanopartículas, como por exemplo, causar a fusão irreversível ou agregação (UMERSKA et al., 2018; TRENKENSCHUH; FRIESS, 2021). A fim de evitar a

ocorrência desses fenômenos, a literatura sugere o uso de crioprotetores. Esses agentes conferem proteção às nanopartículas durante a liofilização e são adicionados às suspensões antes do início do processo com o objetivo de amenizar o estresse físico gerado minimizando os danos e alterações físico-químicas que as baixas temperaturas possam promover. Geralmente são carboidratos (glicose, frutose, sacarose, manitol) cujo mecanismo de ação consiste em gerar uma matriz amorfa em torno da nanopartícula evitando agregação e danos à estrutura durante os estágios da liofilização (AMIS et al., 2020; TRENKENSCHUH; FRIESS, 2021).

Dessa forma, manitol (5% e 10% (m/v) e trealose 5% (m/v) foram usados como crioprotetores na formulação NP-OSM-0,5 e o efeito dos mesmos pode ser visualizado na tabela 5.

Avaliando o tamanho e PDI das nanopartículas redispersas observa-se que o manitol apresentou melhor desempenho que a trealose, o que difere dos experimentos de Rampino et al.(2013) que obtiveram melhores resultados utilizando a trealose como crioprotetor.

Apesar disso, as amostras liofilizadas com manitol a 5% apresentaram o dobro do tamanho das nanopartículas em suspensão e resultado ainda menos satisfatório foi obtido ao dobrar a sua concentração. Gokce et al. (2014) relataram que a incorporação de excesso de crioprotetor pode ser prejudicial à liofilização pois pode causar agregação das nanopartículas. Isso pode explicar o aumento de tamanho em torno de 5x da amostra liofilizada com 10% de manitol.

Em relação ao potencial zeta podemos notar que ao adicionar o manitol 5% houve uma redução nesse indicador o que corrobora com os resultados de Fonte et al. (2015) ao elaborarem nanopartículas de ácido lático-co-ácido glicólico carregadas com insulina. Esses autores associam essa redução à camada de hidratação viscosa gerada pela presença do crioprotetor na superfície das nanopartículas o que expande o plano de deslizamento durante o movimento eletroforético. Já a adição de manitol 10% e trealose 5% geraram efeito contrário no potencial zeta das nanopartículas e Li et. al.(2017) explicam esse acréscimo ao aumento do tamanho das nanopartículas.

Uma vez que as partículas em suspensão se mantiveram estáveis por 90 dias e o processo de liofilização não foi favorável, optamos por dar continuidade às demais análises com as amostras em suspensão. Diante desses resultados, faz-se necessários estudos posteriores utilizando concentrações inferiores de manitol para

observarmos o comportamento das nanopartículas liofilizadas com a adição desse crioprotetor em relação aos parâmetros anteriormente avaliados.

Tabela 5 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos para a formulação NP-OSM-0,5 antes e após liofilização utilizando crioprotetores.

Formulação	Parâmetro	Suspensão NP-OSM-0,5	Condição de Crioproteção		
			Manitol 5,0%(m/v)	Trealose 5%(m/v)	Manitol 10%(m/v)
NP-OSM-0,5	ϕ (nm)	127±3,56	279,17±5,72	531±34,38	686.03±109,81
	PDI	0,25	0,21	0,19	0,21
	Potencial ζ	19,47±0,70	10,44±0,42	32,93±0,65	34,43±0,55
	pH	4,00±0,12	4,56±0,02	4,63±0,10	4,75±0,15

ϕ : tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; Potencial ζ : potencial zeta (carga superficial). Resultados representados como valor médio \pm desvio-padrão.

Fonte: A autora (2021).

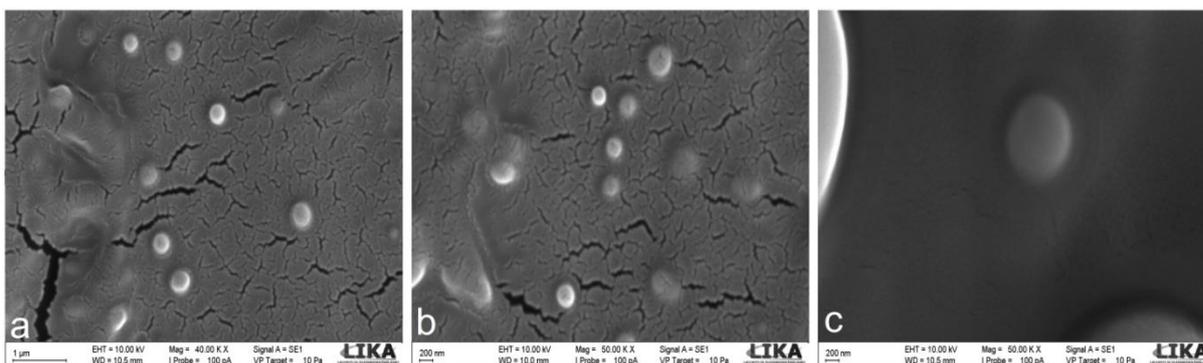
6.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

6.4.1 Morfologia

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para estudar a ultraestrutura e a aparência das NP-OSM-0,5 e está apresentada na figura 5. Essa técnica oferece informações acerca da morfologia da nanopartícula e características de sua superfície como rugosidade e textura (ZHU et al., 2020).

As nanopartículas apresentam-se com distribuição uniforme, sem formação de aglomerados e tamanho homogêneo (Figura 5). A partir da análise das características estruturais, percebe-se que as mesmas possuem forma esférica com superfície lisa, sem a presença de fissuras, porosidades e rachaduras (Figuras 5a-5c). Essas são características essenciais para retenção do óleo encapsulado em seu interior. Silva et al. (2018), ao encapsularem óleo de pequi em uma matriz à base de quitosana-goma de cajueiro também encontraram morfologia semelhante ao nosso estudo. Para Mehran et al (2020) microcápsulas com inexistência de fraturas em sua superfície é um forte indício de que o encapsulamento do composto foi realizado com sucesso. Segundo Rajabi et al. (2020), nanopartículas com essas características estruturais são indicativas da ligação eletrostática entre os grupos amina e carboxila dos biopolímeros utilizados.

Figura 5- Imagens das nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente de maracujá (NP-OSM-0,5) obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: A autora (2021).

6.4.2 Estrutura química

A espectroscopia na região do infravermelho é uma metodologia de análise que permite identificar os grupos funcionais de uma determinada substância por meio das bandas de absorção que lhes são atribuídas, além de detectar e identificar possíveis interações entre polímeros (SHOJAEI; ESHAGHI; NATEGHI, 2019; SANTOS et al., 2021).

A partir dos resultados obtidos foi possível definir e analisar as bandas que caracterizam o cloridrato de quitosana, a goma arábica, o óleo de semente de maracujá e os possíveis deslocamentos de bandas que indiquem as interações entre o grupo amino do cloridrato de quitosana e os grupos carboxila da goma arábica o que pode comprovar a formação das nanopartículas de cloridrato de quitosana sem e com o óleo de semente de maracujá.

O espectro do cloridrato de quitosana e suas bandas características podem ser visualizados na figura 6. Percebe-se uma banda larga em 3280 cm^{-1} atribuída ao estiramento OH o qual aparece sobreposto a banda de deformação axial N-H da amina III e II (FORTUNATI et al., 2017; GE et al., 2018). O pico em 2904 cm^{-1} representa o estiramento C-H alifático e os observados nos comprimentos de onda 1633 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} correspondem as bandas das amidas I e ao pico de absorção de vibração da flexão NH_3^+ (HAN et al., 2020). Já a banda evidenciada em 1521 cm^{-1} demonstra a presença do grupo amino enquanto os comprimentos de onda abaixo da faixa de 1155 cm^{-1} são atribuídos a estruturas de sacarídeos e podem ser

visualizados no espectro desse polímero, no da goma arábica e também nas nanopartículas (GE et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018 LI et al., 2019b).

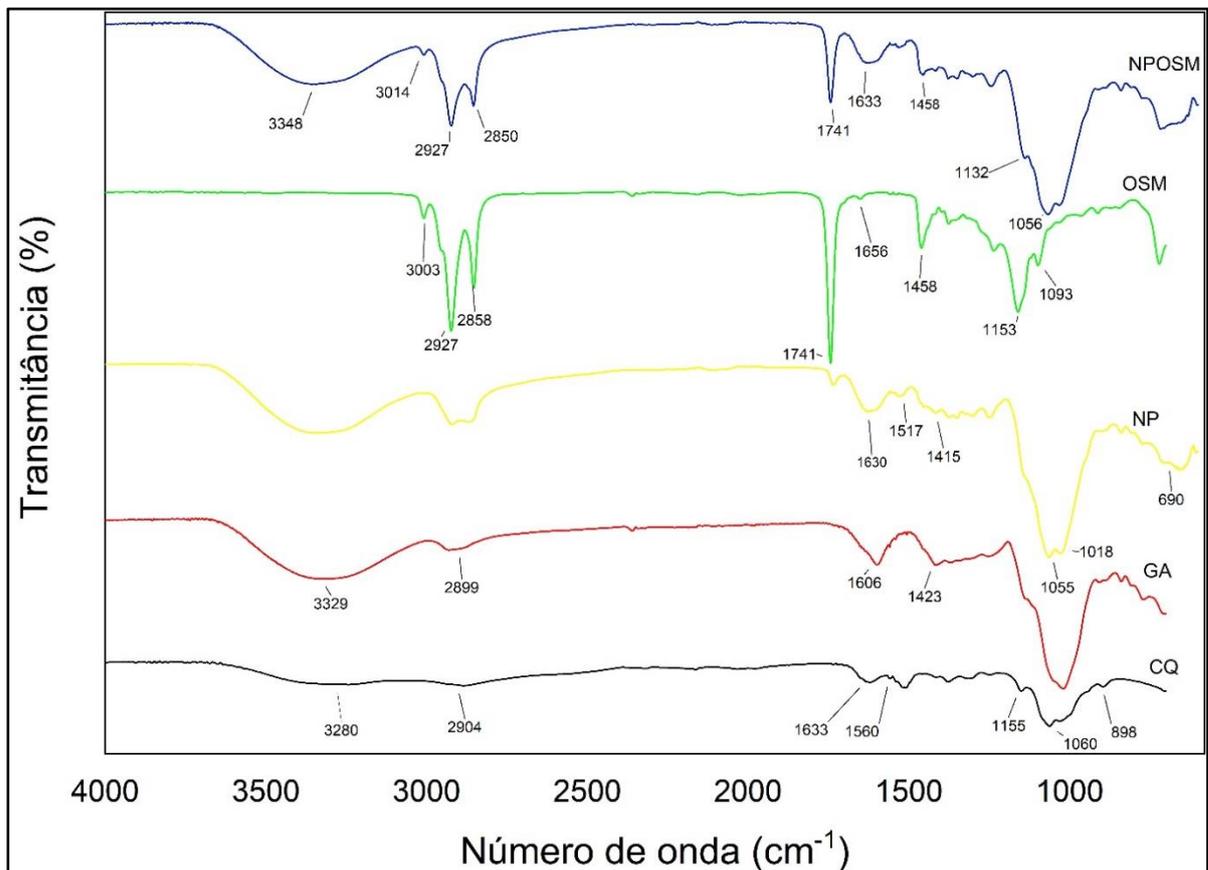
O espectro da goma arábica (Figura 6) mostrou bandas típicas em 3329 cm^{-1} característica do alongamento do grupo OH do anel glicosídico (OLIVEIRA et al., 2018). Vibrações de alongamento referentes ao alongamento simétrico e assimétrico de COO^- são evidenciados nos comprimentos de onda 1606 cm^{-1} e 1423 cm^{-1} respectivamente (OLIVEIRA et al., 2018; RABELO et al., 2019; RAJABI et al., 2019).

Observando o espectro das nanopartículas brancas percebe-se o alargamento da banda de absorção entre 3000 e 3700 cm^{-1} referente ao aumento das ligações de hidrogênio entre o CQ e a GA no processo de coacervação complexa (TAVARES; NOREÑA, 2020). Resultado semelhante foi encontrado por Butstraen et al. (2014) que associaram o alargamento da banda em 3340 cm^{-1} às ligações de hidrogênio envolvidas na coacervação complexa entre a quitosana e a goma arábica para formação de microcápsulas. Ainda como resultado da interação dos biopolímeros, percebe-se que esse espectro de infravermelho mudou significativamente na região da carbonil-amida com o desaparecimento dos picos de absorção referentes a flexão NH_3^+ em 1560 (CQ) e a vibração de alongamento assimétrico COO^- em 1606 (GA) indicando que as nanopartículas foram formadas pelas interações eletrostáticas entre os dois polímeros (HAN et al., 2020; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2020).

Em relação ao espectro obtido para o OSM podemos notar que as bandas que caracterizam a presença de água em óleos, localizadas nas regiões entre 3300 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} , estão ausentes o que evidencia a alta qualidade do óleo estudado (KIEFER et al., 2019) A complexidade química que envolve as moléculas dos triglicerídeos nos óleos gera uma série de subpicos na faixa que vai de 3003 cm^{-1} a 2858 cm^{-1} originários do alongamento de grupos C-H (KIEFER et al., 2019; LUCARINI et al., 2019). Constata-se em 1741 cm^{-1} uma forte e intensa banda de absorção característica do alongamento C=O indicativo da presença de ácido carboxílico de ésteres metílicos que também evidencia a existência de ácidos graxos como o ácido linoleico e oleico que são os compostos majoritários desse óleo (PUROHIT et al., 2021). Nota-se que a região de comprimento de onda abaixo de 1656 cm^{-1} é a que concentra um maior número picos e é denominada como região *fingerprinter*. É uma área muito rica em informações com bandas sobrepostas geradas em decorrência dos movimentos vibracionais dos grupos funcionais

presentes (LUCARINI et al., 2019). Resultados semelhantes foram apresentados por Kiefer et al. (2019) ao pesquisarem a adulteração de óleo de maracujá por FTIR e também por Lucarini et al.(2019).

Figura 6 - Espectros de infravermelho obtidos para o cloridrato de quitosana (CQ ___), goma arábica (GA ___), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP ___), óleo da semente do maracujá (OSM ___) e nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NPOSM ___).



Fonte: A autora (2021).

O espectro das nanopartículas contendo o óleo de semente de maracujá (NP-OSM) apresenta bandas semelhantes às apresentadas pelas nanopartículas brancas. No entanto, nota-se que o pico de vibração em 1741 cm^{-1} bastante evidente no OSM e característico dos ácidos carboxílicos de ésteres metílicos (ácido linoleico e oleico, compostos majoritários no OSM), está presente no FTIR das NP-OSM em intensidade reduzida evidenciando o sucesso da incorporação do óleo nas nanopartículas formadas. A partir dessa informação pode-se inferir que o óleo está interagindo fisicamente com a quitosana, mas a ausência de novos picos nesse espectro ilustra que nenhuma nova ligação química entre os grupos funcionais do óleo e os materiais de parede se formou. De acordo com Garcia et al. (2021) o fato

de não surgir novos picos no espectro de óleos essenciais incorporados à micropartículas de quitosana demonstram que esses compostos e o biopolímero estão fisicamente interligados, mas não há nenhuma ligação química de natureza covalente, ligação de hidrogênio, forças hidrofóbicas ou interações eletrostáticas. Hasani et al.(2018) também encontraram resultados semelhantes em microcápsulas de quitosana e amido carregadas com óleo essencial de limão.

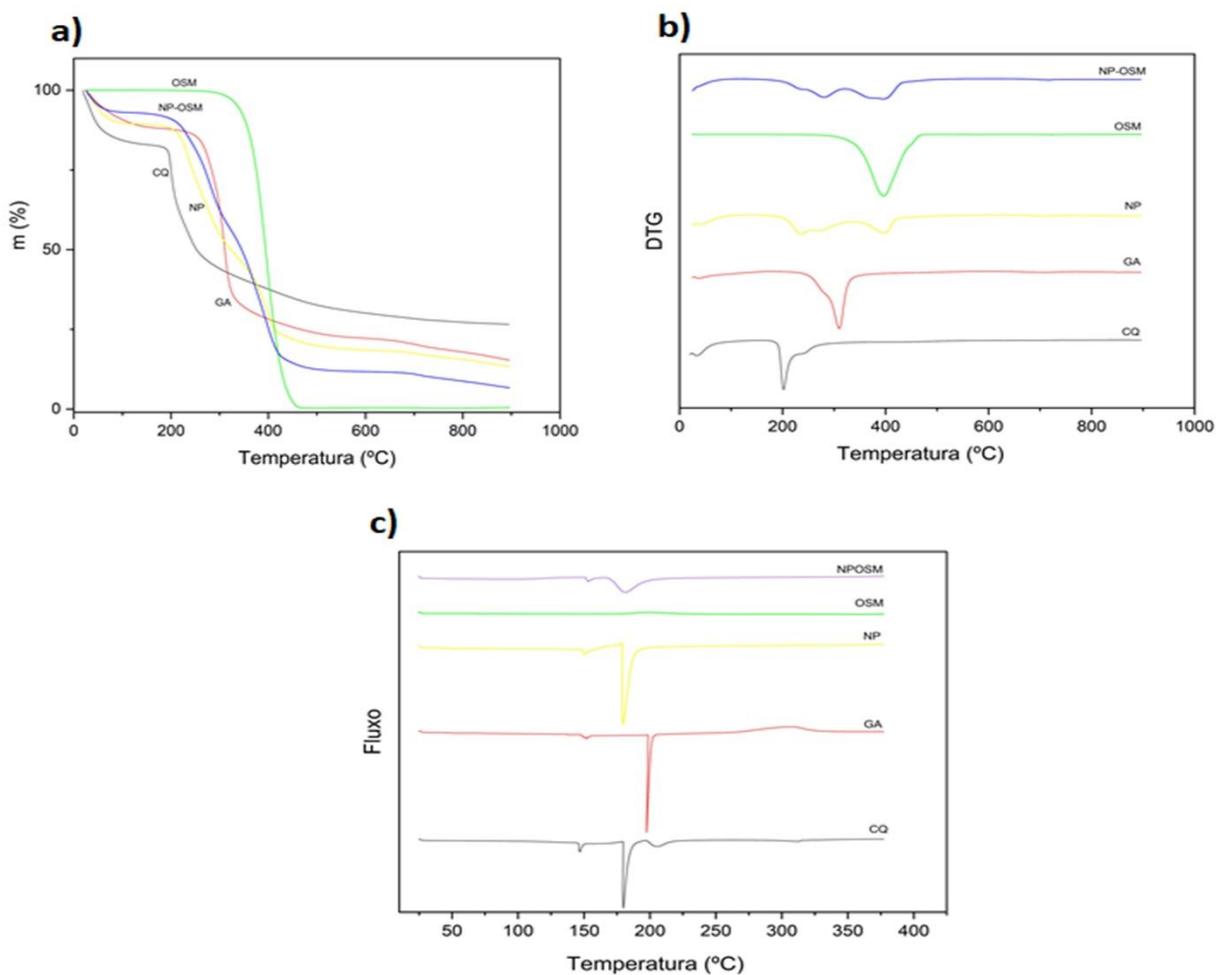
6.4.3 Propriedades térmicas

A figura 7 apresenta os termogramas (TG, DTG, DSC) dos materiais de parede (CQ e GA), do óleo de semente de maracujá (OSM) e das nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica sem (NP) e com o óleo encapsulado(NP-OSM).

A análise de TGA (Figura 7a) quantifica o percentual de variação da massa de uma amostra em função da elevação da temperatura e fornece informações importantes acerca de sua estabilidade térmica, composição e etapas de decomposição durante o processamento (GRANATO; NUNES, 2016; TENGKU-ROZAINA; BIRCH, 2018). O DTG (Figura 7b) corresponde a primeira derivada da curva de TGA e permite identificar as temperaturas em que ocorrem as perdas máximas de massa, denominadas temperaturas de degradação (T_d) (GRANATO; NUNES, 2016; TENGKU-ROZAINA; BIRCH, 2018). A curva de TGA geralmente apresenta três estágios térmicos importantes referentes à desidratação da amostra, decomposição do polímero e do carbono residual (GRANATO; NUNES, 2016; TENGKU-ROZAINA; BIRCH, 2018) .

O primeiro evento está relacionado à liberação da água de hidratação que está adsorvida ou fracamente ligada aos polímeros e ocorreu numa faixa de temperatura abaixo de 190 °C para o cloridrato de quitosana e 237 °C para goma arábica (SALAMA; ABDEL AZIZ; SABAA, 2018). Convém ressaltar que a perda de água foi cerca de 20% para o cloridrato de quitosana e 10% para a goma arábica. Diferente do nosso resultado, Fortunati et. (2017) encontraram perda de água de aproximadamente 10% para o cloridrato de quitosana nesse primeiro estágio de degradação. Vuillemin et al. (2020) identificaram valor semelhante ao do nosso estudo ao avaliar o comportamento térmico da goma arábica nessa mesma fase.

Figura 7 - Termogramas TGA(a), DTG(b) e DSC(c) obtidos para o cloridrato de quitosana (CQ___), goma arábica (GA ___), óleo da semente do maracujá (OSM ___), nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (NP___) e nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM ___).



Fonte: A autora (2021).

No segundo e mais importante estágio de perda de massa, as temperaturas de degradação do CQ e da GA foram de 201 °C e 308 °C respectivamente, representando uma redução percentual de massa em aproximadamente 45% para CQ (despolimerização e degradação das unidades CH-D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina) e 35% GA (desidratação, decomposição e despolimerização do anel carboidrato) (TAVARES; NOREÑA, 2020). O último estágio térmico que ocorreu a partir de 290°C (CQ) e 340 °C(GA) é atribuído à degradação dos carbonos residuais presentes na estrutura dos materiais de parede (GARCIA et al., 2021). Semelhante ao nosso estudo Tavares et al. (2019) e Ramakrishnan et al. (2021) evidenciaram

temperaturas iniciais de degradação dos carbonos residuais similares aos nossos achados.

As nanopartículas brancas (NP) também apresentaram os três eventos térmicos característicos, no entanto, percebe-se que as temperaturas de degradação dos materiais de parede sofreram aumento quando comparadas às temperaturas dos polímeros isoladamente indicando maior estabilidade térmica (CQ de 201 °C para 231 °C, GA de 308 °C para 392 °C) (HOSSEINI et al., 2013; GARCIA et al., 2021).

O OSM apresenta apenas uma faixa de perda de massa com temperatura de degradação em 400 °C. Esse único evento corresponde a quase 100% da degradação do óleo. O OSM analisado no estudo conduzido por Andrade et al. (2015), assim como o nosso, apresentou uma única etapa de decomposição com degradação completa a 480°C e sem a presença de resíduos ao final do experimento.

As NP-OSM mostraram uma nova faixa de perda de massa em 720°C atribuída ao aumento da temperatura de degradação do OSM. Esse deslocamento da faixa de degradação do óleo representa um acréscimo em sua estabilidade térmica e em decorrência desse resultado, acredita-se que a matriz polimérica formada pela coacervação complexa entre o CQ e a GA protejam o óleo, aumentando sua estabilidade em relação ao mesmo em seu estado livre (TIAN; LIU, 2020). Nossos resultados corroboram com o Hadidi et al. (2020) que observaram que a temperatura de degradação de micropartículas de quitosana e óleo essencial de cravo eram superiores às das micropartículas sozinhas como também com os relatados por Shetta et al. (2019) que também observaram esse comportamento em nanopartículas de quitosana carregadas com óleos essenciais.

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é um método de análise térmica que avalia mudanças físicas ou químicas (alteração na estrutura cristalina, ponto de fusão e ebulição) em uma amostra em decorrência da alteração temperatura (HADIDI et al., 2020). As transições de fase, desidratação e redução de materiais são caracterizados no termograma com um pico para baixo demonstrando efeitos endotérmicos. Já a cristalização, oxidação e algumas reações de decomposição são observados com picos para cima o que evidencia os efeitos exotérmicos (RUTZ et al., 2017).

De acordo com o apresentado pela figura 7c os termogramas dos materiais de parede (CQ e GA) apresentaram picos endotérmicos (entre 130 °C e 200 °C) característicos da evaporação da água de hidratação dos polímeros, cuja perda no cloridrato de quitosana, pode estar associada à presença de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila (SIMÕES; TAKEDA, 2017; HASANI; OJAGH; GHORBANI, 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Picos exotérmicos característicos da decomposição do cloridrato de quitosana e da goma arábica foram visualizados na faixa de temperatura compreendida entre 195 °C e 307 °C, respectivamente. e praticamente coincidem com os dados obtidos nas análises de TGA e DTG. Nossos resultados corroboram com os perfis de decomposição para CQ e GA relatados por Ge et al. (2018) e You et al. (2018).

A análise de DSC para o OSM mostra que reações de decomposição ocorreram por volta de 200 °C evidenciado por um pico exotérmico curto e largo atribuído à decomposição de compostos insaturados. Diferente dos nossos resultados, os picos exotérmicos encontrados por Andrade et al. (2015) em seu experimento ocorreram por volta de 350 °C.

O termograma das nanopartículas sem o OSM apresentou picos endotérmicos até cerca de 180 °C referente à evaporação da água de hidratação. No entanto, não se evidenciou os picos exotérmicos característicos do cloridrato de quitosana e da goma arábica o que demonstra a interação eletrostática entre os polímeros e a formação das nanopartículas (OLIVEIRA et al., 2018). Em relação NP-OSM observam-se os mesmos picos endotérmicos até 180 °C característicos da saída da água de hidratação. De acordo com Hasani et al. (2018) os picos endotérmicos gerados em temperaturas inferiores a 100 °C são associados a à evaporação de água livre e para a faixa 150-200 °C correspondem à liberação de água de hidratação.

Observamos que os picos individuais característicos dos biopolímeros e do OSM não foram evidenciados no termograma das NP-OSM e de acordo com Hadidi et al. (2020) e Shaddel et al. (2018) o desaparecimento ou deslocamento desses eventos evidencia a incorporação do composto encapsulado. Dessa forma, podemos inferir que o óleo de semente de maracujá foi incorporado a matriz polimérica e protegido de degradação até a temperatura máxima de análise que foi de 400 °C.

Hasani et al, (2018) evidenciaram em seus estudos pequenos picos exotérmicos em temperaturas mais altas que às de degradação dos óleos essenciais

do seu experimento e eles associaram esse fenômeno à oxidação do óleo superficial aderidos à superfície de nanocápsulas de quitosana formadas. Em nosso estudo, a temperatura de deterioração do OSM foi em cerca de 200 °C e no termograma das NP-OSM nenhum pico exotérmico foi verificado após essa temperatura o que nos leva mais uma vez a acreditar que todo o óleo de semente de maracujá foi encapsulado. Nossos achados corroboram com as afirmações de Bastos et al. (2020), Gharanjig et al. (2020) e Eghbal et al. (2018) que relatam a alta eficiência de encapsulação de compostos bioativos em matrizes poliméricas gerados pela metodologia de coacervação complexa.

6.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

6.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias testes frente aos fungos *Colletotrichum siamense* e *Aspergillus niger* encontram-se relacionados na tabela 6 .

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) (mgmL⁻¹)

Substância Teste	<i>C.siamense</i>	<i>A. niger</i>
[OSM]	4,50	4,50
[NP]	2,00	1,5
[NP-OSM-0,5]	0,75	1,5

[OSM]: concentração do óleo da semente do maracujá;

[NP]: concentração das nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica.

[NP-OSM]:concentração do OSM incorporado às nanopartículas

Fonte: A autora (2021).

Em relação ao OSM, tanto o *Colletotrichum siamense* quanto o *Aspergillus niger* apresentaram CIM semelhante (4,5 mg mL⁻¹). Convém ressaltar que trabalhos que relatem a ação antifúngica do OSM utilizando a técnica de microdiluição não foram evidenciados na literatura. No entanto, o trabalho de Saravanan et al. (2013) avaliou, por meio da técnica de difusão em disco, a ação antifúngica de uma emulsão de óleo de semente de maracujá (*Passiflora subpeltata*) com concentração de 10 mg mL⁻¹ contra *A. niger* e o resultado demonstrou uma zona de inibição de 15,21 mm cuja eficácia assemelhou-se ao do medicamento antifúngico padrão Fluconazol (zona de inibição 16,50 mm) que foi utilizado como controle no experimento.

A atividade antimicrobiana do OSM está associada à presença de ácidos graxos como o oleico e linoleico, seus principais constituintes. Acredita-se que afinidade lipofílica entre esses ácidos e a bicamada lipídica da membrana fúngica facilite a penetração dos mesmos levando a ruptura, extravasamento de componentes importantes do citosol e pôr fim a morte celular (DIÁNEZ et al., 2018; PEREIRA et al., 2019). Além disso, segundo Purohit et al. (2021) e Saravanan et al. (2013), a ação antimicrobiana desse óleo está relacionada à presença de compostos antioxidantes e flavonóides presentes em sua composição.

As nanopartículas brancas, por sua vez, apresentaram CIM 56% e 67% menores para o *C.siamense* (2 mg mL^{-1}) e *A.niger* ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$), respectivamente, quando comparadas à inibição gerada pelo OSM. A concentração de inibição para o *A. niger* encontrada em nossa pesquisa foi menor que as relatadas nos trabalhos de alguns autores como Hasheminejad et al. (2019) que expuseram esse mesmo fungos às nanopartículas de quitosana-TPP (3 mg mL^{-1}) obtendo 80% de inibição do crescimento radial micelial e o de Melo et al. (2020a) para nanopartículas de quitosana fúngica e TPP com uma CIM de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Além disso, Melo et al. (2020a) compararam o valor da CIM entre o gel de quitosana e nanopartículas relatando que a forma nanoestruturada potencializou a inibição dos fungos fitopatogênicos *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger*. Eles associaram essa ação antifúngica adicional das nanopartículas à sua maior área de superfície que favorece a adsorção na membrana das células fúngicas, rompendo-as, levando ao vazamento de conteúdo citoplasmático e à consequente morte celular.

A ação antimicrobiana da quitosana e seus derivados já é bem documentada, mas o mecanismo de ação que leva a morte celular ainda não está totalmente esclarecido na literatura. Relata-se que a atração eletrostática entre os grupos amino da quitosana (positivos) e compostos negativos presentes na membrana celular microbiana gera aumento na permeabilidade da mesma interferindo no metabolismo e consequente morte celular. Outro mecanismo proposto refere-se ao potencial da quitosana em inibir a síntese de RNAm e proteínas ao penetrar no conteúdo citoplasmático e núcleos microbianos. Além disso, infere-se que devido à ação quelante da quitosana a mesma liga-se a oligoelementos essenciais ao crescimento celular inibindo a produção de toxinas e o crescimento microbiano (ALGHUTHAYMI et al., 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020; WANG; XUE; MAO, 2020).

Observando a tabela 6 percebe-se que após a incorporação do OSM às nanopartículas (NP-OSM-0,5), a CIM reduziu consideravelmente para ambos os fungos, sendo mais pronunciada para o *C. siamenses* (0,75 mg mL⁻¹). Esse incremento na atividade antifúngica do óleo nanoparticulado, em comparação ao composto livre, pode estar relacionado à sua liberação lenta e controlada associada à proteção dos compostos bioativos antifúngicos promovida pelo nanoencapsulamento do OSM (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019; DELSHADI et al., 2020). Além disso, uma outra razão para o aumento da eficiência antifúngica pode estar associada ao aumento da área de superfície gerada pela pequena dimensão das nanopartículas que permite uma maior interação entre o cloridrato de quitosana, os componentes ativos encapsulados do óleo e a membrana celular dos fungos (YILMAZ et al., 2019).

Hasheminejad et al. (2019) verificaram que a capacidade antifúngica do óleo essencial de cravo encapsulado em nanopartículas de quitosana foi superior à sua ação livre contra o *A.niger* e relataram que esse desempenho poderia ter sido gerado pela liberação controlada dos compostos voláteis do óleo preservados no invólucro formado pela reticulação entre a quitosana e o TPP. Yilmaz et al. (2019) também associaram o nanoencapsulamento do composto ativo à sua maior capacidade antifúngica ao observarem redução nos valores de crescimento micelial de *Alternaria alternata* contra o óleo essencial de *Origanum vulgare*.

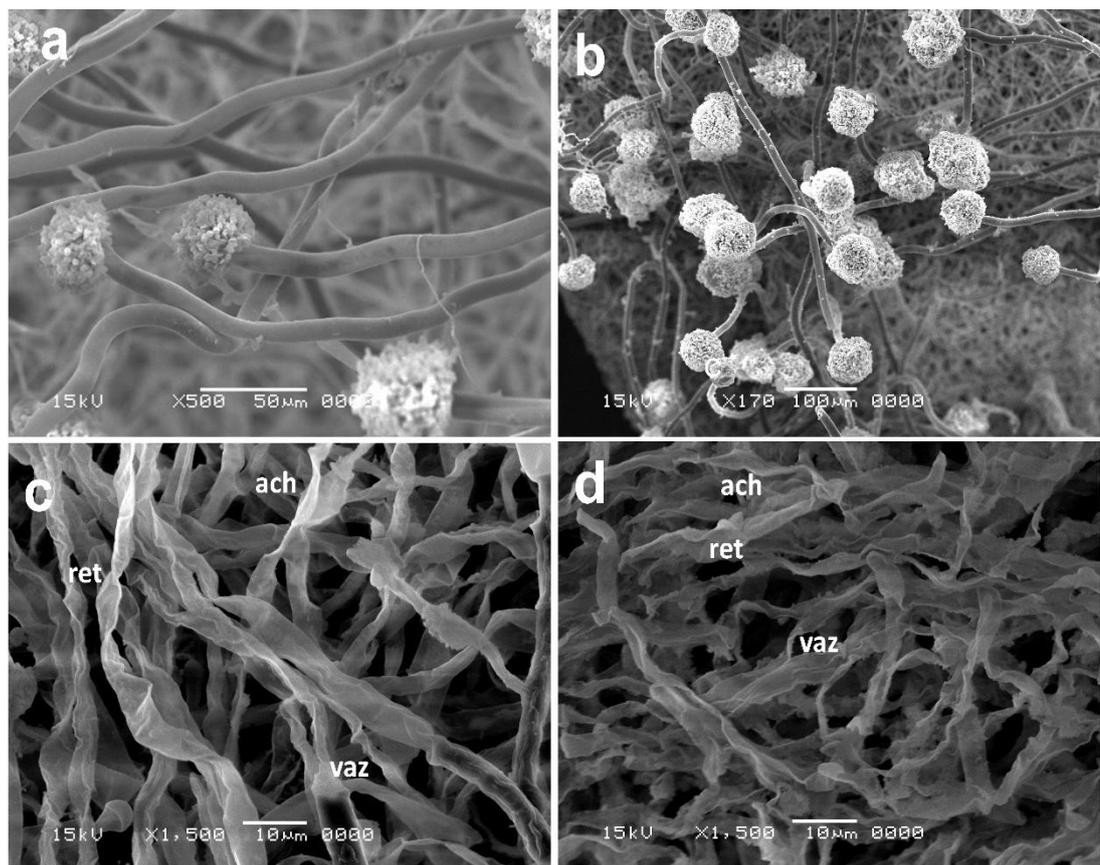
Observando a tabela 6 percebe-se que a CIM das NP-OSM perante o *A. niger* foi o dobro da encontrada para o *C. siamense* e isso pode estar relacionado às características intrínsecas desse fungo. Segundo Melo et al.(2020a), que também encontraram em sua pesquisa o valor da CIM superior para o *A. niger* quando compararam a ação de soluções à base de quitosana contra fungos fitopagênicos do morango, fungos como *A. niger*, que possuem a quitosana como componente em sua parede celular, apresentam maior resistência a ação antifúngica desse polímero. Essa proposição pode explicar a maior resistência do *A. niger* a ação da substância teste NP-OSM-0,5 em relação ao *C. siamense*.

Diante dos resultados acima citados infere-se que o uso da associação entre nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica e óleo de semente de maracujá pode aumentar o espectro antifúngico desses compostos o que torna essa associação uma interessante alternativa de preservação pós-colheita para morangos.

6.5.2 Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica

O efeito do OSM, das nanopartículas com e sem OSM sobre a morfologia do *A. niger* e *C. siamenses*, podem ser observadas nas figuras 8 e 9 respectivamente.

Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura de *Aspergillus niger*. Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente de maracujá (OSM) (b); a nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (NP) (c) e a nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) (d). As siglas indicam: superfície achatada (ach), retorcido (ret), vazio (vaz).



Fonte: A autora (2021).

Com relação ao *A. niger* observa-se que a amostra controle (8a) apresenta micélios com hifas alongadas, homogêneas com diâmetros regulares, superfície externa lisa e conidióforos de aparência normal com grande quantidade de conídios com cabeça globosa inerente a esse fungo (ERAZO; MOSQUERA; RODRÍGUEZ-PAÉZ, 2019). Por outro lado, na figura 8b, a qual demonstra a ação do OSM em concentração sub-inibitória equivalente a 67% ($3,0 \text{ mg l}^{-1}$) da concentração CIM

(4,5 mg mL⁻¹), não se observa alterações morfológicas das hifas. Já as figuras 8c e 8d relativas à ação das nanopartículas sem o óleo com concentração referente a 67% (1,0 mg mL⁻¹) da CIM (1,5 mg mL⁻¹) e com o óleo nanoencapsulado 75% (1,12 mg mL⁻¹) da CIM (1,5 mg mL⁻¹), respectivamente, apresentaram alterações morfológicas pronunciadas no micélio fúngico, como hifas com superfície achatadas, retorcidas e vazias.

Esses resultados encontrados devem-se, provavelmente, a capacidade da quitosana e de sua forma nanoparticulada em inibir o crescimento fúngico e induzir alterações estruturais na morfologia de fungos em decorrência da estimulação da ação das quitinases que agem hidrolisando a quitina que é um componente comum à parede celular de fungos como o *A. niger* (HAJJI et al., 2018; BERGER et al., 2020; MELO et al., 2020b). Sabe-se também que o tamanho em dimensão nanométrica e a carga superficial das nanopartículas, podem favorecer a entrada na célula fúngica por meio de canais iônicos ou carreadores de proteínas (HAJJI et al., 2018; MELO et al., 2020b).

Além disso, o aumento da permeabilidade da parede celular fúngica devido a atração eletrostática entre a quitosana e componentes presentes na parede celular do microrganismo, a inibição da síntese de RNAm em decorrência da entrada da quitosana no núcleo fúngico e à sua ação quelante podem explicar ação desse polímero e derivados perante a morfologia e desenvolvimento de fungos (ALGHUTHAYMI et al., 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020; WANG; XUE; MAO, 2020). Já a ação do OSM pode ser atribuída a presença de ácidos graxos insaturados além de compostos antioxidantes e flavonóides presentes em sua composição (PEREIRA et al., 2019; PUROHIT et al., 2021)

É interessante notar que o micélio fúngico exposto às nanopartículas carregadas com o óleo de semente de maracujá (Figura 8d) também demonstrou as mesmas características presentes na amostra NP, no entanto, os danos estruturais foram bem mais pronunciados, apresentando hifas ainda mais retorcidas, irregulares, algumas totalmente vazias e sem conídios e conidióforos. Algumas hifas, inclusive, apresentam-se totalmente colapsadas sem a presença da parede celular.

Apesar do óleo livre não gerar modificação estrutural no micélio fúngico, sua nanoencapsulação pode ter proporcionado uma maior interação entre seus compostos antifúngicos e a parede celular do *A. niger*. Ao correlacionarmos as alterações estruturais observadas no micélio do *A. niger* com as CIM das

substâncias teste (Tabela 6) percebe-se que a CIM das nanopartículas contendo o óleo nanoencapsulado foi menor (1/3 da CIM do óleo livre) o que ajuda explicar as modificações mais acentuadas (Figura 8d) observadas nas hifas crescidas na presença das nanopartículas contendo o OSM. O fato do óleo estar nanoencapsulado gera liberação lenta e controlada dos compostos bioativos antifúngicos presentes em sua composição e aumenta a interação desses ativos com a parede celular do fungo (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019; DELSHADI et al., 2020). Portanto, pode-se dizer que a incorporação do OSM às nanopartículas pode ter favorecido a intensificação dos danos estruturais no micélio fúngico.

O resultado dos ensaios relacionados ao *C. siamense* estão apresentados nas figuras 9a-9d e identifica-se alterações morfológicas em todas as amostras em que foram aplicadas as substâncias testes em concentrações sub-inibitórias. Os micélios presentes na amostra controle (Figura 9a) apresentaram hifas tubulares bem homogêneas com diâmetros regulares, superfície externa lisa e ápices arredondados.

Já as hifas expostas à ação antifúngica do OSM (Figura 9b) em concentração 50% inferior à da sua CIM ($4,5 \text{ mg mL}^{-1}$), apresentaram-se com aspecto discretamente retorcido, rugosidades superficiais, escamações e alguns pontos de inchaço. Essas alterações foram semelhantes às observadas em estudos realizados por Oliveira et al. (2019a) com *Colletotrichum acutataum* exposto ao óleo essencial de *Lippia sidoides* (de $250 \text{ } \mu\text{l L}^{-1}$) onde foram observadas alterações estruturais nas hifas, além de destruição e rugosidades.

De acordo com Oliveira et al. (2019a), as modificações causadas por esse óleo podem ser associadas ao ataque à parede celular do fungo, à perda da sua capacidade de infecção e colonização, levando à falha em processos fisiológicos essenciais, influenciando na morfogênese e no crescimento fúngico. Kalagatur et al. (2018) também observaram esse tipo de alteração morfológica ao avaliar o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon martini* na estrutura de conídios de *Fusarium graminearum*. Sabe-se que diferentes fungos podem não apresentar a mesma sensibilidade a um composto devido às suas características intrínsecas e isso pode explicar a ação antifúngica do OSM perante o *C. siamenses* ao contrário do que aconteceu com *A. niger*, mesmo diante a uma CIM superior à do *C. siamense* (*A. niger*: $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$; *C. siamense*: $2,25 \text{ mg mL}^{-1}$).

As hifas expostas à ação das nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (Figura 9c) mostraram-se com distorções, diâmetros variados, pontos de intumescimento ao longo da superfície e alguns trechos murchos com escamações. Essas modificações morfológicas demonstram que a atividade antifúngica dessas nanopartículas de quitosana pode estar associada a interação eletrostática entre as suas cargas positivas superficiais com os principais grupos negativos dos fosfolipídios presentes na membrana celular fúngica. Essa interligação altera a permeabilidade da membrana levando ao extravasamento de conteúdo intracelular, resultando na morte do microrganismo (PALMA-GUERRERO et al., 2010; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017).

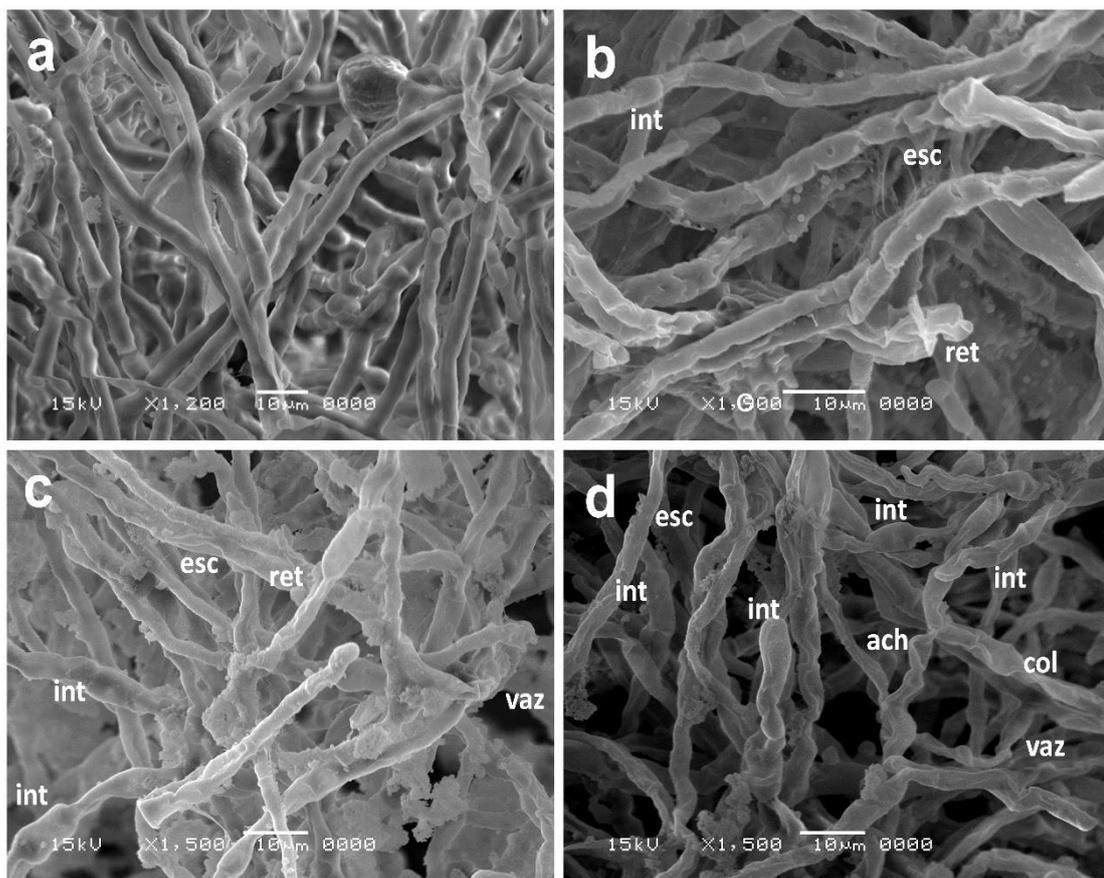
Alterações estruturais semelhantes foram identificadas no trabalho de Nascimento et al. (2020) ao expor hifas de *C. gloesporioides* à ação de quitosana em ácido cítrico (2,5 mg mL⁻¹). Gálvez-Irriqui et al. (2019) explicam que a quitosana pode quelar nutrientes essenciais para o crescimento celular, interagir com componentes da membrana fúngica e causar alterações de permeabilidade que podem facilitar a entrada de líquidos extracelulares para o citoplasma gerando turgor e inchaço que levam a lise celular e consequente morte.

O efeito da exposição do micélio de *C. siamense* às nanopartículas de cloridrato de quitosana carregadas com o OSM pode ser visto na figura 9d . A imagem apresenta alterações estruturais mais pronunciadas na superfície das hifas, como murchamento, superfícies achatadas, rugosas, colapsadas e presença maior de pontos intumescimento. Em geral, observa-se que o micélio sofreu efeitos mais drásticos à ação dessa substância que podem ter sido induzidos pela presença do OSM nanoparticulado. Esse dano morfológico acentuado visualizado nos micélios do *C. siamense* expostos às nanopartículas com o OSM nanoencapsulado já era esperado uma vez que comparando a CIM (Tabela 6) desse composto com a CIM do óleo livre percebe-se que a concentração necessária do OSM para inibir o crescimento do *C. Siamense* foi seis vezes maior.

De acordo com Pereira et al.(2019) a ação antimicrobiana desse óleo está associada a presença de ácidos graxos insaturados de cadeia longa como o oleico e linoleico (seus principais constituintes) e a combinação do mesmo com as nanopartículas de cloridrato de quitosana aperfeiçoaram essa ação se compararmos com o aspecto morfológico das hifas expostas apenas às nanopartículas sem o OSM. Correa-Pacheco et al. (2017) relataram que a combinação de nanopartículas

de quitosana e óleo essencial de tomilho foi capaz de inibir o crescimento de micélios e a germinação de esporos de *C. gloeosporioides*. Além disso é sabido que o processo de nanoencapsulação favorece uma liberação lenta e controlada dos ativos do óleo o que pode aperfeiçoar a sua ação antifúngica.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura de *Colletotrichum siamense*. Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente de maracujá (OSM) (b), a nanopartículas brancas de cloridrato de quitosana-goma arábica (NP) (c) e a nanopartículas de cloridrato de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) (d). As siglas indicam: superfície achatada (ach), retorcido (ret), vazio (vaz), intumescimento (int), escamação(esc), colapso (col).



Fonte: A autora (2021).

6.5.3 Atividade antifúngica *in vivo*: bioatividade de cobertura comestível sobre o crescimento fúngico em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Os resultados observados para o percentual de infecção do *A. niger* em morangos revestidos e não revestidos com a cobertura NP-OSM-0,5 mantidos por 6 e 12 dias sob temperatura ambiente (26°C) e refrigeração (8°C), respectivamente, estão apresentados na tabela 7. Convém ressaltar que a concentração da cobertura elaborada com a NP-OSM-0,5 foi igual à da CIM apresentada para o *A. niger* e que o gel de glicerol foi utilizado apenas como agente plastificante para elaboração da cobertura comestível e meio de dispersão das nanopartículas.

Em ambas as temperaturas de armazenamento a cobertura elaborada com as nanopartículas apresentou o menor percentual de inibição e esse resultado corrobora com os achados de Melo et al. (2020b) que avaliaram o efeito de revestimentos comestíveis a base de gel de quitosana e nanopartículas de quitosana em morangos infectados por três tipos de fungos fitopatogênicos.

A figura 10 apresenta a aparência dos morangos com e sem cobertura previamente infectados e nota-se uma infecção mais intensa (mofo escuro) nos frutos dos grupos controle e glicerol armazenados a temperatura ambiente que naqueles mantidos sob refrigeração. O *Aspergillus niger* ao infectar um fruto, primeiramente gera o amolecimento do local contaminado e em seguida desenvolve o crescimento de um mofo escuro que corresponde a estrutura de frutificação do fungo (JAHANI; PIRA; AMINIFARD, 2020).

Tabela 7- Percentual de frutas armazenadas a temperatura ambiente (26 °C) e refrigeração (8 °C) infectadas artificialmente com *Aspergillus. niger* expostas a nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá

Amostra	Percentual de fruta infectada (%)	
	Temperatura Ambiente	Temperatura de Refrigeração
Controle	100,00±0,00	100,00±0,00
Glicerol	100,00±0,00	90,00±14,00
NP-OSM-0,5	89,00±18,21	40,00±22,00

NP-OSM-0,5: cobertura elaborada com a formulação NP-OSM-0,5
 Fonte: A autora (2021).

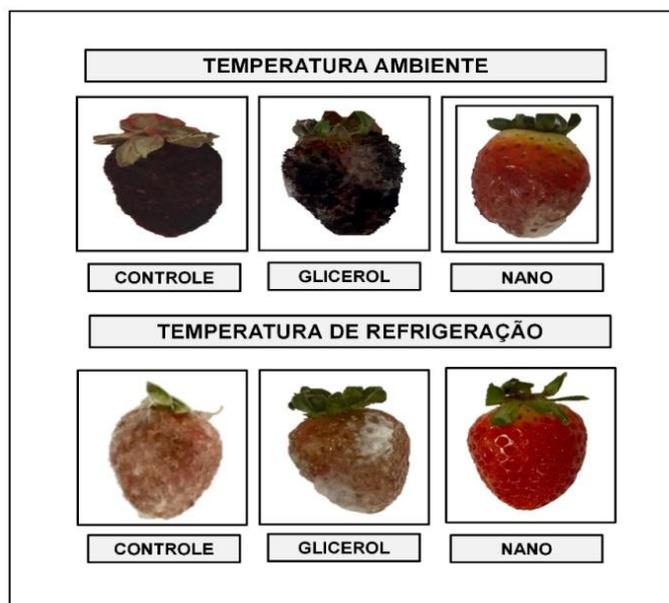
Ainda em relação à figura 10 percebe-se que o morango do grupo NP-OSM-0,5 conservado à temperatura ambiente, mesmo infectado não apresentou até o sexto dia de armazenamento os conídios escuros que são responsáveis pela reprodução assexuada do *Aspergillus niger*. Isso indica que o revestimento aplicado foi capaz de retardar o desenvolvimento fisiológico desse fungo por completo. Qin et al. (2020) e Ferreira et al. (2020) relataram que a atividade antifúngica da quitosana é atribuída à sua capacidade fungistática em vez de fungicida, uma vez que ela pode se difundir dentro das hifas, interferindo na atividade da enzima responsável pelo crescimento do microrganismo. Em relação a essa ação antifúngica, Pinzon et al. (2020) e Hajji et al. (2018) relataram que revestimentos elaborados com a quitosana retardam o desenvolvimento de fungos devido à indução de quitinases que hidrolisam a quitina, um dos componentes de sua parede celular, evitando o desenvolvimento desses microrganismos.

Em relação às amostras conservadas sob temperatura de refrigeração, percebe-se um menor grau de infecção nos morangos que receberam os revestimentos à base de nanopartículas e OSM. Ademais, os frutos em sua maioria, estavam brilhantes, íntegros e sem consideráveis alterações visuais. Esses resultados sugerem que além da ação antifúngica, as coberturas comestíveis também formaram uma barreira semipermeável que reduziu as trocas gasosas, perda da umidade e o consequente processo de maturação do fruto. Além disso, a baixa temperatura contribuiu com a desaceleração da senescência do morango além de diminuir o potencial de infecção do fungo. Segundo Martínez et al. (2018) esse é o resultado previsível, uma vez que uma das funções de revestimentos aplicados em frutos é formar uma barreira entre o vegetal e o ambiente externo retardando o crescimento microbiano. Já Melo et al. (2020b) relataram que o armazenamento refrigerado reduz os processos fisiológicos de frutas e gera a redução da patogenicidade de fungos contaminantes.

A literatura também relata em diferentes estudos, que revestimentos à base de quitosana e óleos essenciais podem reduzir a permeabilidade de gases na superfície dos frutos além de adicionar ao revestimento ingredientes antioxidantes ou agentes antimicrobianos que retardam o crescimento dos fungos, indicando a existência de uma ação sinérgica entre a quitosana e o óleo essencial (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019; GARCIA et al., 2021). Além disso, a estrutura nanoparticulada do filme confere uma maior interação entre os

componentes bioativos encapsulados e a membrana dos microrganismos fornecendo também uma barreira extra contra a permeação de gases, a desaceleração da taxa de respiração, com a conseqüente modulação da deterioração dos frutos (YILMAZ et al., 2019).

Figura 10 - Aparência dos morangos com e sem coberturas após 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente (26 °C) e refrigeração (8 °C), respectivamente.



Fonte: A autora (2021).

Diante dos nossos resultados podemos inferir que a incorporação de compostos bioativos como o OSM em revestimentos nanoparticulados à base de cloridrato de quitosana pode ser uma alternativa para o prolongamento pós-colheita de frutos e pseudofrutos altamente perecíveis e com alta atividade fisiológica como o morango.

6.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS COBERTURAS TESTE E CONTROLE SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS MORANGOS ARMAZENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE E REFRIGERAÇÃO.

6.6.1 Efeito das coberturas teste e controle nos parâmetros de umidade, sólidos solúveis, pH e acidez titulável dos morangos

A aplicação de coberturas comestíveis pode propiciar o aumento da vida útil de vegetais que apresentam elevada taxa de respiração e deterioração pós-colheita

como o morango, uma vez que o revestimento pode evitar a perda de água da fruta e proteger a superfície contra danos físicos causados pelo contato (KWAK et al., 2021; MOUSAVI; RAHMATI-JONEIDABAD; NOSHAD, 2021). Uma das formas de verificar a eficiência desses revestimentos é a avaliação de parâmetros físico-químicos que verifiquem as mudanças que caracterizem o processo de senescência, aspectos de qualidade e nutricionais exigidos pelo consumidor (KTENIOUDAKI; O'DONNELL; DO NASCIMENTO NUNES, 2019; ALGHUTHAYMI et al., 2020; FRIEDRICH et al., 2020; HASSAN et al., 2020).

Dessa forma, as mudanças observadas nos parâmetros físico-químicos dos morangos com e sem cobertura de nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá armazenadas em temperatura ambiente e refrigeração estão descritas nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8-Valores médios dos parâmetros físico-químicos dos morangos não recobertos e recobertos com as nanopartículas de cloridrato de quitosana óleo de semente de maracujá analisados por 6 dias a 26°C

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	3	6
Umidade (%)			
Controle	94.50(±0.18) ^{Aa}	93.06(±0.05) ^{ABb}	90,14(±2.20) ^{Ba}
Glicerol	93.70(±0.73) ^{Aab}	93.71(±0.27) ^{Aa}	93.22(±0.53) ^{Aa}
Nano	92.95(±0.04) ^{Ab}	92.69(±0.28) ^{ABb}	92.21(±0.19) ^{Ba}
pH			
Controle	3.38(±0.02) ^{Ab}	3.32(±0.02) ^{Aa}	3.09(±0.07) ^{Bb}
Glicerol	3.46(±0.01) ^{Aa}	3.33(±0.01) ^{Ba}	3.03(±0.01) ^{Cb}
Nano	3.38(±0.03) ^{Ab}	3.35(±0.00) ^{Aa}	3.37(±0.00) ^{Aa}
Sólidos Solúveis (%)			
Controle	7.07(±0.12) ^{Ba}	7.13(±0.12) ^{Ba}	7,42(±0.08) ^{Aa}
Glicerol	7.18(±0.03) ^{Aa}	7.40(±0.20) ^{Aa}	7.50(±0.26) ^{Aa}
Nano	6,93(±0.31) ^{Aa}	7.19(±0.02) ^{Aa}	6.87(±0.12) ^{Ab}
Acidez Titulável (%ácido cítrico)			
Controle	1.13(±0.03) ^{Aa}	0.93(±0,00) ^{Ba}	0.89(±0.07) ^{Ba}
Glicerol	0.87(±0.01) ^{Ab}	0.84(±0.03) ^{Ab}	0.88(±0.02) ^{Aa}
Nano	0.87(±0.03) ^{Bb}	0.84(±0.03) ^{Bb}	0.98(±0.04) ^{Aa}
Índice de Maturação			
Controle	6.25(±0.26) ^{Bb}	7,66(±0.14) ^{Ab}	8.37(±0.75) ^{Aa}
Glicerol	8.27(±0.11) ^{Aa}	8.80(±0.54) ^{Aa}	8.56(±0.28) ^{Aa}
Nano	7.96(±0.34) ^{Aa}	8.57(±0.28) ^{Aa}	6.98(±0.18) ^{Bb}

^{a-b}Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

^{A-C}Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

Nano: Cobertura elaborada com a formulação NP-OSM-0,5.

Fonte: A autora (2021)

Avaliando o resultado do teor de umidade das amostras dos grupos controle, percebe-se que há variação do percentual desse parâmetro em ambas as temperaturas de armazenamento demonstrando que há diferenças significativas ($p < 0,05$) quando observa-se os valores do primeiro e do último dia de armazenamento. Esse comportamento também foi observado nos morangos recobertos com a substância teste conservados a 26 °C. Diferentemente desses frutos, os conservados sob refrigeração e expostos às nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá não apresentaram diferença significativa no valor da umidade quando observado o dia 0 e 12 do experimento.

Como relatado anteriormente, os frutos revestidos e acondicionados a 8 °C apresentaram menor perda de umidade o que pode ser explicado pela barreira semipermeável formada pelo cloridrato de quitosana e o óleo de semente de maracujá que pode ter reduzido o processo de migração da água para o meio ambiente (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2020; PINZON et al., 2020). A incorporação do óleo às nanopartículas certamente potencializou a eficiência dessa barreira devido à sua natureza hidrofóbica e sua distribuição uniforme em tamanho nanométrico. De acordo com Melo et al. (2020a) a pequena dimensão das partículas formadas gera um efeito duplo de bloqueio uma vez que além da barreira formada pelo filme de quitosana haverá também a obstrução dos poros que existem nas frutas pelas nanopartículas. Resultados semelhantes foram encontrados por Chu et al. (2020) que recobriram morangos com uma nanoemulsão de pululano e óleo essencial de canela e por Mendonça et al. (2020) que aplicaram microemulsões de óleo de citronela e abacate em morangos minimamente processados.

O ambiente em que os frutos foram armazenados nesse experimento demonstra ser um parâmetro que influencia no teor de umidade dos morangos, uma vez que temperaturas de refrigeração reduzem as alterações químicas e enzimáticas, mantendo a qualidade e a conservação das frutas (POTT et al., 2020; SILVA et al., 2020). Comparando as perdas do grupo controle, as amostras mantidas a temperatura ambiente demonstraram uma perda percentual bem maior que as avaliadas a 8 °C (4,62% e 0,54%, respectivamente) e aquelas recobertas com as nanopartículas armazenadas a 26 °C apresentaram uma pequena, mas significativa ($p < 0,05$) perda percentual (0,80%) de umidade, comportamento que não se repetiu com os frutos do mesmo grupo mantidos sob refrigeração que conservaram seu teor de hidratação .

Os resultados acima divergem dos encontrados por Melo et al (2020a) que não observaram a influência da temperatura na manutenção da umidade de amostras de morangos recobertas com gel, nanopartículas e uma mistura de gel e nanopartículas de quitosana, mas corroboram com os de Ventura-Aguilar et al. (2018) que observaram manutenção no grau de umidade de amostras de morango revestidas com cobertura comestível formulado com quitosana, extrato aquoso de *Roselle cálices* e óleo essencial de canela.

Independente do tempo, temperatura de armazenamento e natureza da cobertura comestível os valores de pH da maioria das amostras apresentaram tendência de redução em relação aos valores observados no primeiro e no dia final de avaliação. Esses resultados corroboram com os estudos de Hajji et al. (2018) que também evidenciaram valores de pH em níveis mais baixos em amostras de morangos revestidos com quitosana e suplementados com carotenóides, com os de Oregel-Zamudio et al. (2017) ao avaliarem a eficácia de um revestimento a base de cera de candelilla e bactérias de biocontrole na qualidade de morangos durante armazenamento e com os de Melo et al. (2020a). De acordo com Pinzon et al (2020) o teor de ácidos orgânicos aumenta com o armazenamento pós-colheita de morangos em decorrência do processo metabólico fisiológico da fruta. Sabe-se que um dos principais ácidos orgânicos presentes no morango é o ácido cítrico e seu possível incremento certamente influenciou na redução do pH observado nas amostras (MELO et al., 2020a; SHAHBAZI et al., 2020).

Observa-se que os morangos conservados a temperatura ambiente recobertos com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá não apresentaram variação significativa ($p > 0,05$) nos valores de pH em nenhum momento da avaliação o que sugere retardo no processo de senescência dessas amostras. Esse comportamento pode ser explicado pela redução da permeabilidade ao vapor de água devido à formação de uma barreira compacta e hidrofóbica gerada pelas nanopartículas e o óleo de semente de maracujá o que certamente controlou o processo de degradação dos morangos (PINZON et al 2020; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2020). É interessante citar que o comportamento protetivo das coberturas também pode ser evidenciado ao observar que o declínio nos valores de pH foi percentualmente superior nos grupos controle em ambas as temperaturas de armazenamento (8,58% a 26 °C; e 5,34% a 8 °C) comparados aos grupos que receberam a cobertura de nanopartículas de cloridrato

de quitosana e óleo de semente de maracujá (1,52% a 26 °C; e 0,29% a 8 °C) . Resultado semelhante também foi observado por Pinzon et al (2020) em ensaios realizados em morangos recobertos com um composto formado por gel de amido de banana , quitosana e aloe vera .

Tabela 9 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos dos morangos não recobertos e recobertos com as nanopartículas de cloridrato de quitosana óleo de semente de maracujá analisados por 12 dias a 8°C

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
Umidade (%)					
Controle	93.14(±0.01) ^{Aa}	92.76(±0.11) ^{ABCa}	93.02(±0.24) ^{ABab}	92.59(±0.09) ^{Cb}	92.63(±0.20) ^{BCb}
Glicerol	93.14(±0.12) ^{ABa}	91.73(±0.27) ^{Cb}	93.68(±0.34) ^{Aa}	92.98(±0.13) ^{Ba}	93.70(±0.06) ^{Aa}
Nano	93,20(±0.26) ^{Aa}	93.35(±0.12) ^{Aa}	92.65(±0.27) ^{BCb}	92.35(±0.13) ^{Cb}	92.91(±0.13) ^{ABb}
pH					
Controle	3.37(±0.00) ^{Aab}	3.19(±0.06) ^{Bb}	3.32(±0.02) ^{Ab}	3,17(±0.06) ^{Bb}	3,19(±0.00) ^{Bab}
Glicerol	3.44(±0.08) ^{Aa}	3.33(±0.02) ^{ABab}	3.33(±0.00) ^{ABb}	3.25(±0.00) ^{Ba}	3.10(±0.09) ^{Cb}
Nano	3.29(±0.05) ^{BCb}	3.34(±0.00) ^{Ba}	3.44(±0.02) ^{Aa}	3.25(±0.00) ^{Ca}	3.24(±0.01) ^{Ca}
Sólidos Solúveis (%)					
Controle	7.00(±0.00) ^{Cb}	7.22(±0.03) ^{BCa}	7.22(±0.10) ^{BCa}	7.40(±0.10) ^{ABa}	7,53(±0.12) ^{Aa}
Glicerol	7.33(±0.12) ^{Aa}	7.40(±0.20) ^{Aa}	7.05(±0.09) ^{Ba}	7.43(±0.15) ^{Aa}	7.50(±0.20) ^{Aa}
Nano	7.15(±0.05) ^{Ab}	7.17(±0.05) ^{Aa}	7.25(±0.13) ^{Aa}	7.12(±0.10) ^{Ab}	7.27(±0.12) ^{Aa}
Acidez Titulável (%ácido cítrico)					
Controle	0.97(±0.04) ^{ABa}	0.90(±0.01) ^{BCa}	0.91(±0.06) ^{ABCa}	0.99(±0.02) ^{Aa}	0.84(±0.03) ^{Ca}
Glicerol	0,85(±0.01) ^{Ca}	0.93(±0.02) ^{Ba}	0.85(±0.01) ^{Ca}	1.01(±0.05) ^{Aa}	0.84(±0.01) ^{Ca}
Nano	0.88(±0.08) ^{Aa}	0.85(±0.02) ^{Ab}	0.84(±0.02) ^{Aa}	0.88(±0.03) ^{Ab}	0.85(±0.04) ^{Aa}
Índice de Maturação					
Controle	7.19(±0.32) ^{Bb}	8.06(±0.11) ^{Aba}	7.96(±0.56) ^{Ba}	7.45(±0.28) ^{Bb}	8.94(±0.18) ^{Aa}
Glicerol	8.64(±0.07) ^{ABa}	7.99(±0.32) ^{BCa}	8.31(±0.16) ^{ABa}	7.39(±0.32) ^{Cb}	8.90(±0.30) ^{Aa}
Nano	8.23(±0.76) ^{Aab}	8.40(±0.11) ^{Aa}	8.67(±0.26) ^{Aa}	8.12(±0.15) ^{Aa}	8.62(±0.60) ^{Aa}

^{a-b}Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,05) conforme teste de Tukey.

^{A-C}Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa (p<0,05) conforme teste de Tukey.

Nano: Cobertura elaborada com a formulação NP-OSM-0,5.

Fonte: A autora (2021)

O teor de sólidos solúveis é um indicador de doçura e considera-se um dos parâmetros físico-químicos que mais afeta a qualidade sensorial do morango e a aceitabilidade pelo consumidor (KTENIOUDAKI; O'DONNELL; DO NASCIMENTO NUNES, 2019; YAN et al., 2019). Representam a quantidade total de açúcares

solúveis, aminoácidos e pectinas e seu aumento durante a fase pós-colheita pode representar a senescência da fruta. É avaliado em índice de refração e seus valores durante a fase de amadurecimento variam entre 4,6% e 11,9% (MELO et al.,2020a; YOON et al 2020;KWAK et al., 2021).

Apesar de todos os morangos analisados em nossa pesquisa apresentarem valores de °Brix dentro da faixa acima especificada, as amostras do grupo controle apresentaram significativo aumento do teor de sólidos solúveis ($p < 0,05$) ao longo do período de análise e em ambas as temperaturas de armazenamento, ou seja, esse fator de avaliação não influenciou na alteração desse parâmetro físico-químico. Esse incremento no teor de sólidos solúveis demonstra que até mesmo as amostras desse grupo que foram mantidas sob refrigeração continuaram com o metabolismo ativo convertendo o amido e ácidos presentes em açúcar o que representa o aumento da taxa de respiração das frutas e o conseqüente processo de senescência. Resultados semelhantes foram encontrados por Temiz et al. (2021) que avaliaram a eficiência, sob refrigeração, de uma cobertura elaborada com extrato de limão verbena em morangos e por Quintana et al. (2021) que recobriram morangos com quitosana e óleos essenciais.

Em relação às amostras revestidas com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá percebe-se que não houve, em nenhum dia avaliado, variação significativa ($p > 0,05$) no teor de sólidos solúveis dos morangos em ambas as temperaturas de observação. Isso demonstra a capacidade de formação de barreira do revestimento aplicado que certamente desacelerou o metabolismo dos frutos, a atividade respiratória, a redução da hidrólise dos polissacarídeos, e, portanto, o retardo na deterioração dos morangos.

De acordo com os escritos de Pinzon et al. (2020) os revestimentos comestíveis podem modular a permeabilidade do vapor de água, do O_2 e do CO_2 e como esses dois gases são formados pela degradação de açúcares complexos em açúcares mais simples, o uso de coberturas comestíveis podem reduzir o processo de degradação o que leva a valores de sólidos solúveis menores. Nossos resultados corroboram com o trabalho de Chu et al. (2020) que revestiram morangos com uma nanoemulsão de pululano e óleo essencial de canela e com o de Friedrich et al. (2020) que recobriram morangos com amido, gelatina e extrato de tetradenia riparia .

O sabor do morango é particularmente influenciado pela sua quantidade de ácidos orgânicos sendo o cítrico e o málico os componentes majoritários nessa fruta

(BOVI et al., 2018). Avalia-se a acidez titulável pelo percentual de ácido cítrico presente na amostra e sabe-se que seu teor é afetado pela taxa de metabolismo, particularmente pelo processo respiratório que consome os ácidos orgânicos como substrato via ciclo de Krebs, diminuindo a acidez durante o período de armazenamento e gerando a consequente senescência dos frutos (HAJJI et al., 2018; TABASSUM; KHAN, 2020).

Essa redução foi observada nas amostras do grupo controle durante o período de avaliação em ambas as temperaturas de armazenamento o que pode ser atribuído ao aumento da taxa de respiração dos morangos alterando a concentração de ácido cítrico e diminuindo os valores de acidez titulável. É importante frisar que esse decréscimo no teor de acidez foi mais acentuado nas amostras conservadas em temperatura ambiente que nas mantidas sob refrigeração (22% e 13%, respectivamente) demonstrando que a condição em que os morangos foram armazenados influenciou em seu processo de conservação.

De acordo com Friedrich et al. (2020) e Hernández-López et al. (2020) condições de armazenamento em cerca de 7°C contribui com manutenção das concentrações de carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos presentes no morango uma vez que em temperaturas mais baixas os processos metabólicos ocorrem mais lentamente. Além disso, Ktenioudaki et al. (2019) relataram que além da temperatura, os valores de acidez titulável podem oscilar a depender do grau de maturação e da variedade desse fruto.

Em relação aos morangos que receberam a cobertura de nanopartículas observa-se que os valores de acidez titulável mantiveram-se constante durante os 12 dias do experimento a 8°C e em temperatura ambiente apresentaram leve aumento significativo ($p < 0,05$) entre os dias 0 e 6 de observação. Esse acréscimo, de acordo com Pinzon et al. (2020), pode ser explicado porque a presença dos ácidos orgânicos tende a aumentar durante o armazenamento pós-colheita de morangos devido à degradação de açúcares complexos em decorrência do processo metabólico normal.

Revestimentos comestíveis alteram a atmosfera interna ao redor dos morangos, mantendo a concentração de CO₂ em quantidades mais elevadas, reduzindo o consumo dos ácidos orgânicos pelo decréscimo da respiração e pela produção de etileno o que explica a manutenção nos valores de acidez titulável durante o tempo de avaliação (TABASSUM; KHAN, 2020; SHIRZAD et al., 2021).

Nossos resultados corroboram com os de Chu et al. (2020) que observaram que o revestimento de pululano e óleo essencial de canela foram eficientes na retenção do teor de acidez titulável em morangos e também com os de Dong et al. (2017) ao recobrirem morangos com carboxilmentilcelulose e óleo essencial de alho.

O índice de maturação consiste na relação entre o teor de sólidos solúveis e a acidez titulável. Configura um dos parâmetros físico-químicos mais importantes na avaliação da qualidade organoléptica do morango uma vez que a fruta atinge as características necessárias para o consumo com o aumento do teor de sólidos solúveis e com a redução da acidez (FRIEDRICH et al., 2020; AUBERT et al., 2021). Além de avaliar a relação entre a doçura e a acidez, esse índice também pode indicar a progressão do processo de amadurecimento de frutos e o consequente processo de senescência (MARTÍNEZ et al., 2018).

Os morangos armazenados em temperatura ambiente e sem cobertura apresentaram aumento progressivo no índice de maturação ($p < 0,05$) durante os seis dias de armazenamento o que de acordo com Valenzuela et al. (2015) demonstra a evolução do processo natural de senescência da fruta uma vez que com a progressão do amadurecimento o teor de sólidos solúveis totais tendem a aumentar enquanto o teor de ácidos tendem a diminuir. Comportamento contrário foi observado nos morangos recobertos com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente que a partir do terceiro dia de observação reduziu o valor do índice de maturação demonstrando a eficácia desse revestimento na redução do processo de amadurecimento dos frutos. Resultado semelhante foi observado por Saleem et al. (2021) em um estudo onde analisaram o efeito de uma cobertura de quitosana e ácido ascórbico em morangos.

Avaliando-se o comportamento dos grupos mantidos sob 8 °C percebe-se que o acréscimo significativo ($p < 0,05$) no índice de maturação persiste nos frutos que não receberam a cobertura teste. De outro modo, os morangos recobertos mantiveram esse índice no mesmo patamar ao longo dos 12 dias de avaliação do experimento o que demonstra a capacidade de coberturas à base de nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá em retardar a atividade metabólica de morangos. Nossos resultados corroboram com os estudos de Melo et al. (2020a) ao avaliarem o efeito de revestimentos à base de nanopartículas quitosana em morangos.

6.6.2 Efeito das coberturas teste e controle na perda de peso

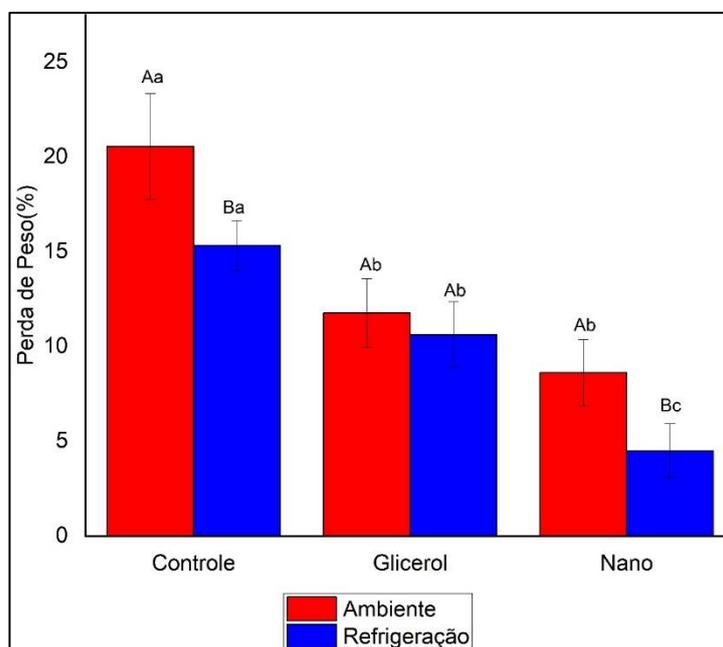
A perda de peso é um indicador relevante na avaliação da vida de prateleira de vegetais frescos pois seu controle não só evidencia o frescor como também destaca as mudanças na aparência visual que demonstram alterações na textura, sabor e valor nutricional (KTENIOUDAKI; O'DONNELL; DO NASCIMENTO NUNES, 2019; TABASSUM; KHAN, 2020). Devido à sua pele muito fina que contribui para o enrugamento e enfraquecimento dos tecidos, o morango é altamente suscetível a perda rápida de água e seu controle constitui um grande desafio para sua comercialização. De acordo com Ventura-Aguilar et al. (2018) a manutenção do peso do morango pode ser influenciada pela temperatura e pelo tempo de armazenamento como também por tratamentos pós-colheita.

Ao avaliar a evolução desse indicador em relação à condição de armazenamento (figura 11) verificamos que os morangos do grupo controle apresentaram uma perda de peso significativamente superior ($p < 0,05$) chegando a cerca de 21% contra uma média de 15,32% dos frutos que foram conservados sob refrigeração. Esse mesmo comportamento foi evidenciado nos frutos recobertos com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá que também demonstraram uma perda significativamente maior ($p < 0,05$) no armazenamento a 26 °C. Resultados semelhantes foram relatados por Ventura-Aguilar et al. (2018) ao evidenciarem em seu estudo que o armazenamento de morangos recobertos com uma mistura de quitosana, óleo essencial de canela e extrato de hibisco a 5°C, reduziu em cerca de 15 vezes a perda de peso de morangos quando comparados aos mantidos em 20°C. Melo et. al. (2020a) que utilizaram coberturas à base de quitosana para conservação de morangos em temperatura ambiente e refrigeração também obtiveram resultado equivalente ao nosso estudo.

Sabe-se que a perda de peso em frutos está associada principalmente ao processo de migração da umidade para o ambiente e a taxa em que o deslocamento ocorre é influenciada pela pressão do vapor da água entre a superfície do fruto e a atmosfera, assim como da temperatura de armazenamento (CHU et al., 2020; QUINTANA et al., 2021). Na medida em que aumenta a intensidade do calor ocorre um incremento na taxa respiratória e na atividade da enzima malato desidrogenase que gera um acréscimo no consumo de carboidratos e, conseqüentemente, a uma maior perda de peso dos frutos (PANOU; KARABAGIAS; RIGANAKOS, 2020;

BARAKAUI et al., 2021). Isso pode explicar a redução de peso mais acentuada nas amostras avaliadas a 26 °C que nas armazenadas a 8 °C.

Figura 11- Percentual de perda de peso dos morangos recobertos e não recobertos analisados em temperatura ambiente (26 °C) e refrigeração (8 °C)



^{A-B}Letras diferentes entre as mesmas coberturas representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

^{a-c}Letras diferentes nas mesmas temperaturas representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

Fonte: A autora (2021)

Revestimentos comestíveis à base de quitosana atuam como barreiras ao vapor d'água, possuem baixa permeabilidade a gases e propriedades mecânicas de proteção semelhantes às conferidas por polímeros sintéticos como o polietileno de alta e baixa densidade (FERREIRA et al., 2020; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2020). Conforme mostrado na figura 11 a maior perda de peso (20,55%) ocorre nos morangos não revestidos (controle) e a menor nos frutos que receberam a cobertura elaborada com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá (4,49%). A principal razão para isso pode ser o fato de que nos frutos controle não existe nenhuma barreira física que atue como obstáculo ao vapor d'água e as trocas gasosas com o ambiente, enquanto os recobertos recebem a proteção da cobertura nanoparticulada. Um dos benefícios em utilizar revestimentos à base de nanopartículas de quitosana é ampliação da área de superfície que aumenta a reatividade e a melhor penetração nas células (HASSAN et al., 2021).

Martinez-Gonzalez et al. (2020) avaliaram a qualidade de um revestimento contendo nanopartículas de quitosana e própolis em morangos e o resultado mostrou eficácia na preservação do peso desses frutos. Assim como no trabalho anterior e em nossa pesquisa, Melo et al. (2018) também encontraram associação entre a redução da perda de peso em uvas e a aplicação de uma cobertura à base de nanopartículas de quitosana.

Ferreira et al. (2020) relatam que apesar dessas vantagens, as coberturas à base de quitosana devido ao seu caráter hidrofóbico apresentam baixa resistência ao vapor de água o que pode limitar sua utilização uma vez que o controle efetivo da transferência de umidade é exigido em aplicações de embalagem de alimentos. Isso pode ser modificado através da incorporação de ácidos graxos, óleos vegetais, ceras e outros compostos .

De acordo com Chu et al. (2020) revestimentos nanoparticulados com óleos incorporados tem sua propriedade de barreira potencializada uma vez que a natureza hidrofóbica do composto lipídico e sua distribuição em tamanho nanométrico aumenta a distância percorrida pelas moléculas de água no filme. Essa proposição corrobora com os nossos resultados que também estão de acordo com os de Dong et al. (2017) ao observarem em seu estudo a formação de um revestimento de quitosana mais resistente a água ao incorporar óleo essencial de alho em coberturas de morango.

É importante frisar que segundo Antunes et al. (2016) a porcentagem máxima de perda de água admissível em morangos pós-colheita é de cerca 6% e acima disso o fruto torna-se inaceitável para comercialização. Diante desse percentual, e avaliando nossos resultados, infere-se que apenas os morangos que receberam a cobertura de nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá e que foram conservados sob temperatura de refrigeração estariam aptos para venda ao consumidor.

6.6.3 Percentual de infecção visível

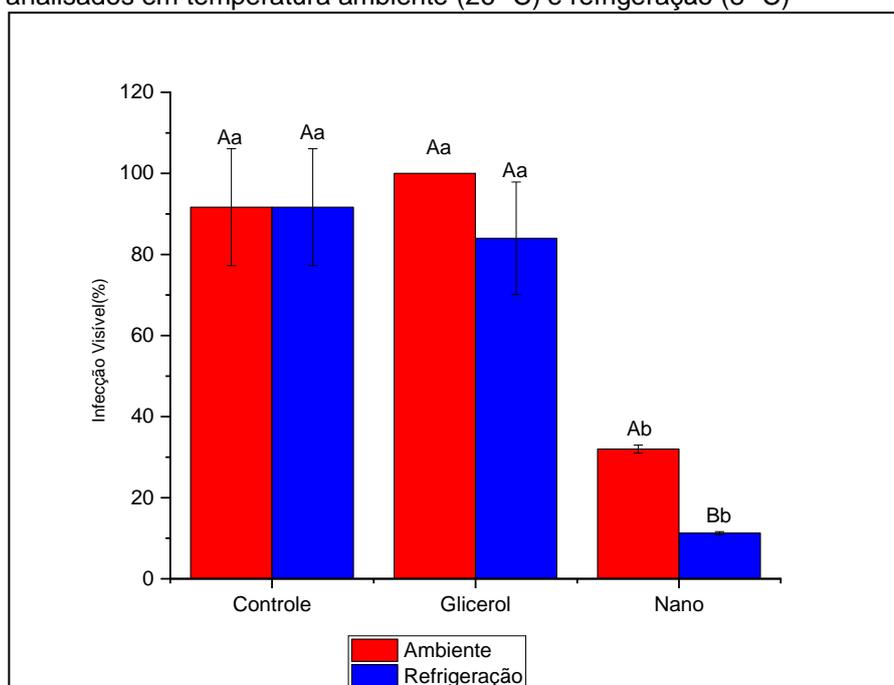
O morango é bastante perecível devido à sua intensa atividade metabólica pós-colheita, alta taxa respiratória e suscetibilidade à ataques por fungos fitopatogênicos que geram mudanças em sua aparência e limitam a aceitação pelo

consumidor, reduzindo, dessa forma a sua comercialização (MOSHARI-NASIRKANDI; ALIREZALU; ALMASI, 2020; HUANG et al., 2022).

O percentual de infecção visível, também definido como índice de decomposição fúngica, representa a porcentagem de amostras infectadas em relação ao total de amostras armazenadas em um determinado período (Figura 12).

As amostras do grupo controle foram as que sofreram maior percentual de deterioração fúngica e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os morangos armazenados a 26°C e 8 °C. No entanto, diferiram significativamente das amostras recobertas ($p < 0,05$), em ambas as temperaturas, o que já era esperado uma vez que uma das funções de revestimentos comestíveis é formar uma barreira protetora que retarde o crescimento fúngico (MARTÍNEZ et al. 2018; KWAK et al., 2021). Assim como em nosso estudo, Pinzon et al. (2020) relataram que morangos não revestidos com um gel à base de quitosana apresentaram uma rápida decomposição fúngica em relação aos revestidos.

Figura 12- Percentual de infecção visível dos morangos recobertos e não recobertos analisados em temperatura ambiente (26 °C) e refrigeração (8 °C)



^{A-B} Letras diferentes entre as mesmas coberturas representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

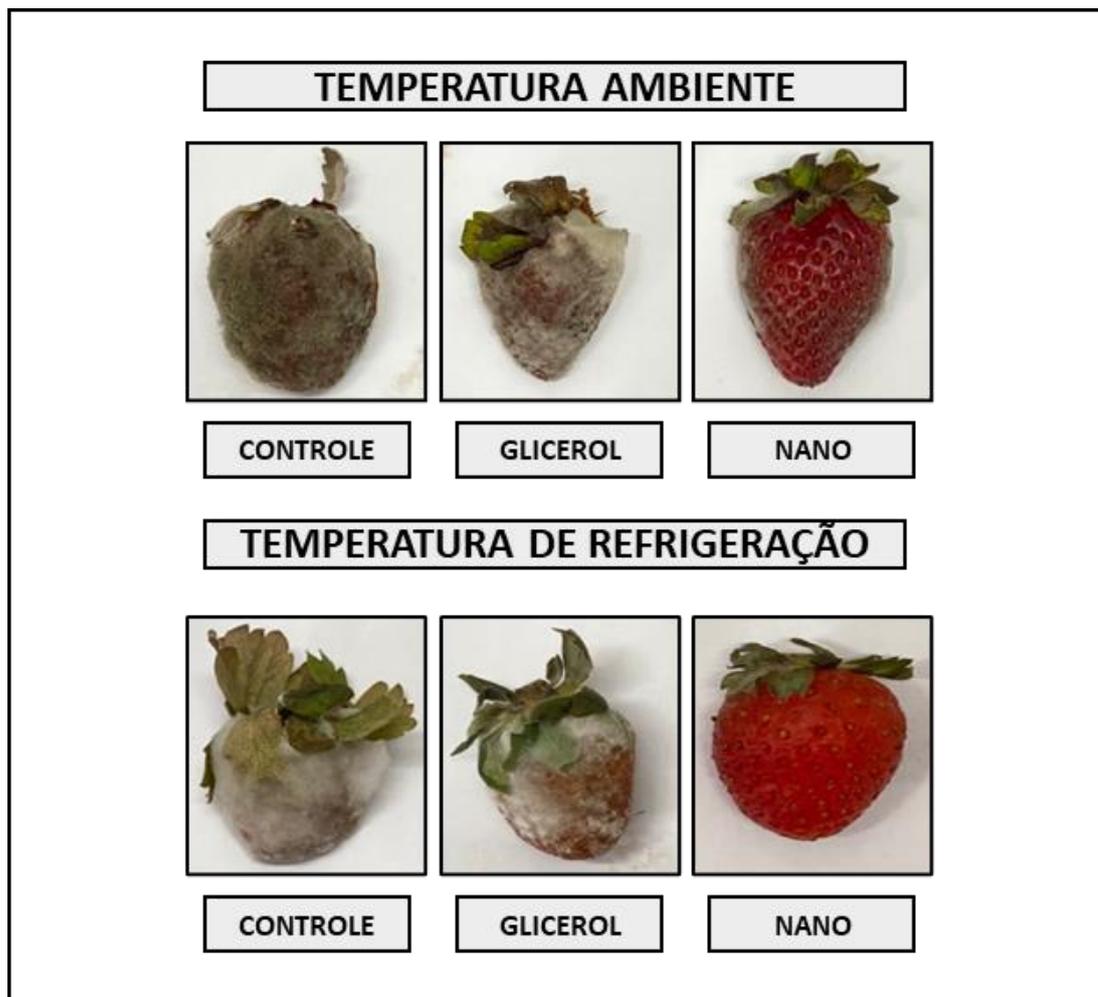
^{a-c} Letras diferentes nas mesmas temperaturas representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

Fonte: A autora (2021).

Em relação aos morangos revestidos percebe-se que a decomposição fúngica foi mais pronunciada nos frutos acondicionados a 26°C (Figura 13) que diferiram

significamente ($p < 0,05$) dos armazenados a 8°C . Nota-se, apenas, um pequeno ponto de infecção no morango mantido a 26°C no 12º dia de armazenamento, o que demonstra a influência positiva da temperatura de armazenamento refrigerado na conservação do morango. Ventura Aguilar et al. (2018) também relataram que o armazenamento de morangos recobertos com quitosana e mantidos a 5°C reduziu em 4 a 5 vezes a incidência de infecção, independentemente do tratamento aplicado, em comparação com aqueles sob 20°C .

Figura 13- Avaliação da aparência dos morangos recobertos e não recobertos armazenados a temperatura ambiente (26°C) e de refrigeração (8°C)



Fonte: A autora (2021).

A quitosana tem a ação potencial de gerar danos celulares em bolores e leveduras e dois tipos de mecanismos são associados a essa atividade antifúngica. O primeiro envolve a ativação da enzima de defesa quitinase, que hidrolisa a quitina presente na parede celular dos fungos e o segundo está associado capacidade

desse polímero em causar alterações na estrutura do microrganismo e gerar desorganização molecular nas células fúngicas (HAJJI et al., 2018; PINZON et al., 2020). Fortunatti et al. (2017) relataram que kiwis e alfaces tratados com uma cobertura de cloridrato de quitosana apresentaram menor severidade de infecção fúngica em relação a esses mesmos vegetais tratados com compostos químicos.

Além disso, nanopartículas de quitosana como as elaboradas em nosso estudo, tem sua ação antimicrobiana intensificada quando comparada à quitosana devido ao efeito interfacial das partículas em tamanho nanométrico que reforça sua capacidade de aderir às células microbianas, penetrando e destruindo as membranas celulares (FERREIRA et al., 2020). Pan et al. (2019) relataram em seu estudo que a atividade antimicrobiana de nanopartículas de quitosana foi significativamente melhor que a da quitosana e isso foi correlacionado ao tamanho das nanopartículas formadas (<200nm).

Aditivos como o óleo de semente de maracujá adicionados à revestimentos como o elaborado em nosso estudo podem reduzir o fluxo de umidade, a captação de oxigênio, o processo de respiração além de conferir propriedades antimicrobianas e antioxidantes adicionais que retardam o crescimento microbiano (PEREIRA et al., 2019). Vários estudos como o de Grande-Tovar et al. (2018), Demirok Soncu et al. (2018) relatam que a incorporação de óleos essenciais a revestimentos de quitosana inibem o crescimento de microrganismos, retarda a oxidação de lipídios e melhora a qualidade sensorial. Saravanan et al. (2013) avaliaram ação antimicrobiana de óleos de semente de *Passiflora subpeltata* e verificaram que esse composto é um eficaz agente antifúngico. Eles também associaram essa forte atividade microbiana à presença de compostos fenólicos.

Dessa forma podemos dizer que a associação entre o óleo de semente de maracujá e o revestimento nanoparticulado do cloridrato de quitosana podem aumentar o espectro de propriedades antimicrobianas do nanorevestimento elaborado e também produzir interações associativas contra microrganismos o que torna essa cobertura uma atraente alternativa em embalagens de frutos sensíveis como o morango e pode não apenas manter as propriedades nutritivas e organolépticas dos frutos como também reduzir a quantidade de fungos e leveduras durante o armazenamento e a conseqüente podridão em morangos.

6.6.4 Evolução da cor

A cor é um atributo importante na percepção de qualidade do morango e avaliar a sua variação se faz necessário para verificar o efeito do revestimento comestível aplicado durante o armazenamento. As tabelas 10 e 11 apresentam os resultados das análises dos frutos armazenados em temperatura ambiente e refrigeração respectivamente.

Ao avaliar os valores de luminosidade (L^*), indicador do escurecimento do fruto, percebe-se que a maioria dos morangos apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) em seus valores de L^* . Esse comportamento foi observado nas amostras do grupo controle, independente da temperatura de armazenamento, e também nos morangos conservados sob a mesma condição recobertos com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá. O escurecimento das amostras pode ser atribuído ao efeito da temperatura ambiente que provoca nos morangos uma maior mudança de cor devido à ocorrência de processos enzimáticos relacionados à maturação. De acordo com Ventura_Aguilar et al. (2018) temperaturas mais altas favorecem o avanço do amadurecimento. Assim como em nosso estudo, esses autores constataram em seu trabalho que morangos recobertos com uma cobertura à base de quitosana e óleo essencial de canela conservados a 20 °C também apresentaram menores valores de luminosidade quando comparados às amostras mantidas em 5 °C.

Diferente dos resultados anteriores, os morangos refrigerados a 8 °C e recobertos com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá não apresentaram, ao longo de todo o período de armazenamento, variação significativa no valor de L^* ($p > 0,05$). A partir desse resultado sugere-se dizer que o revestimento aplicado não alterou a cor original do fruto além de preservá-los do processo de senescência, o que foi intensificado pela baixa temperatura de refrigeração. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por de Melo et al. (2020a) e Martinez-Gonzales et al. (2020).

Em relação aos valores do ângulo hue (h^*), somente os morangos do grupo controle apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) no sexto dia de análise. Exceção para os frutos desse mesmo grupo avaliados a 8 °C que não variaram significativamente ($p > 0,05$) durante o armazenamento. De acordo com o sistema CIELAB quanto mais próximo de 0 ° estiver o ângulo maior é a intensidade da cor

vermelha e valores aproximados a 90° demonstram que mais amarelo é o fruto. Portanto, o decréscimo desse parâmetro ao longo do armazenamento sugere intensificação da tonalidade vermelha dos frutos o que é associado ao processo de amadurecimento evidenciado pela continuidade das reações de biossíntese das antocianinas (SIEBENEICHLER et al.;2020; QUINTANA et al., 2021). Resende et al. (2018) e Quintana et al. (2021) observaram em seus estudos que morangos não revestidos com as coberturas testes à base de quitosana também apresentaram redução do valor do ângulo hue .

Diferente das amostras do grupo controle, os morangos revestidos e armazenados em temperatura ambiente e de refrigeração apresentaram valores constantes de ângulo hue durante o período de experimento. Essa informação nos leva a crer que as coberturas comestíveis aplicadas não afetaram a tonalidade dos frutos além de promover a conservação dos mesmos por meio do retardo da senescência. Esses resultados corroboram com os de Quintana et al. (2021) e os de Martinez-González et al. (2020) que também não evidenciaram diferenças significativas nas amostras que receberam tratamento à base de quitosana ao longo do armazenamento.

Sabe-se que o Croma (C*) é um índice que avalia a medida de saturação ou intensidade da cor e valores mais altos indicam que as amostras são mais brilhantes (TABASSUM et al 2020; QUINTANA et al 2021). Em relação às amostras do grupo controle percebe-se uma redução nos valores desse parâmetro em ambas as temperaturas de armazenamento ($p < 0,05$), demonstrando que ao longo do experimento esses morangos foram perdendo o brilho e essa redução foi ainda mais impactante nos frutos conservados em temperatura ambiente que demonstraram os menores valores. Do mesmo modo, o experimento com coberturas à base de quitosana desenvolvido por Quintana et al. (2021), apresentou diminuição acentuada dos valores do croma o que os autores atribuíram a secagem da superfície dos frutos.

Ao contrário dessas amostras, os morangos com as coberturas à base de nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá mantiveram a intensidade da cor ao longo do período analisado independente da temperatura. Isso demonstra a eficácia desses revestimentos na conservação do brilho e vividez dos frutos.

Tabela 10- Efeito da cobertura comestível sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura ambiente (26°C) durante 6 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	3	6
L*			
Controle	35.53 (± 1.31) ^{Ab}	31.31 (± 1.56) ^{Bb}	26.74 (± 3.04) ^{Cb}
Glicerol	34.19 (± 0.27) ^{Ab}	32.45 (± 1.05) ^{ABab}	30.65 (± 1.36) ^{Bab}
Nano	39.13 (± 0.46) ^{Aa}	35.09 (± 1.85) ^{ABa}	34,47 (± 2.93) ^{Ba}
h*_{ab}			
Controle	27.45 (± 1.26) ^{Aa}	26.96 (± 1.49) ^{Aa}	23.49(± 0.61) ^{Ba}
Glicerol	33.46 (± 5.88) ^{Aa}	28.43 (± 1.71) ^{Aa}	27.11 (± 0.22) ^{Ab}
Nano	33,95 (± 2.21) ^{Aa}	29.03 (± 1.72) ^{Aa}	28.39 (± 5.06) ^{Aa}
C*_{ab}			
Controle	32.77 (± 1.61) ^{Aa}	27.54 (± 0.91) ^{Bb}	23.49 (± 1.70) ^{Cb}
Glicerol	23.48 (± 6.89) ^{Ab}	27.88 (± 1.44) ^{Ab}	20.75 (± 5.41) ^{Ab}
Nano	33.92 (± 2.60) ^{Aa}	33.79 (± 3.73) ^{Aa}	32.65 (± 1.40) ^{Aa}

^bLetras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

^{A-C}Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

Fonte: A autora (2021).

Tabela 11- Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura de refrigeração (8°C) durante 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
L*					
Controle	36.68(± 1.15) ^{Aa}	33.45(± 1.62) ^{Ba}	32.48(± 2.01) ^{BCa}	29.80(± 0.84) ^{Cc}	29.74(± 0.63) ^{Cb}
Glicerol	39.55(± 4.62) ^{Aa}	37.90(± 2.35) ^{Aa}	35.59(± 3.16) ^{ABa}	33.07(± 2.31) ^{ABb}	29.78(± 1.99) ^{Bb}
Nano	38.45(± 3.76) ^{Aa}	38.87(± 3.51) ^{Aa}	37.64(± 4.14) ^{Aa}	37.33(± 0.71) ^{Aa}	36.56(± 0.55) ^{Aa}
h*_{ab}					
Controle	28.12(± 1.83) ^{Aa}	26.49(± 1.01) ^{Ab}	25.80(± 1.04) ^{Ab}	25.85(± 0.72) ^{Ab}	28.52(± 4.76) ^{Aa}
Glicerol	31.57(± 3.10) ^{Aa}	32.13(± 1.97) ^{Aab}	29.18(± 3.18) ^{Aab}	28.65(± 2.68) ^{Aab}	35.50(± 7.39) ^{Aa}
Nano	30.94(± 3.03) ^{Aa}	36.90(± 4.77) ^{Aa}	33.96(± 4.88) ^{Aa}	33.44(± 4.22) ^{Aa}	32.15(± 0.93) ^{Aa}
C*_{ab}					
Controle	35.81(± 2.37) ^{Aa}	32.16(± 2.56) ^{ABa}	32.45(± 3.60) ^{ABa}	26.11(± 5.23) ^{Ba}	24.78(± 3.62) ^{Bab}
Glicerol	35,72(± 0.98) ^{Aa}	33.39(± 1.77) ^{Aa}	33.11(± 3.42) ^{Aa}	28.22(± 0.24) ^{ABa}	19.17(± 7.42) ^{Bb}
Nano	35.70(± 4.49) ^{Aa}	31.82(± 2.97) ^{Aa}	32.82(± 6.36) ^{Aa}	30.62(± 4.32) ^{Aa}	31.92(± 3.46) ^{Aa}

^{a-b}Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

^{A-C}Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) conforme teste de Tukey.

Fonte: A autora (2021).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formulação mais estável após 90 dias de armazenamento foi caracterizada e as análises realizadas comprovaram a formação das nanopartículas com o OSM nanoencapsulado. A utilização dos crioprotetores não mostrou ser um processo favorável à liofilização das nanopartículas.

O óleo livre e nanoencapsulado apresentaram ação antifúngica perante os dois fungos fitopagênicos avaliados e promoveram alterações estruturais no micélio do *C.siamense*. Já para o *A. niger* apenas os micélios expostos às nanopartículas com o óleo nanoencapsulado sofreram alterações em sua morfologia.

As coberturas elaboradas mostraram efetividade na manutenção dos parâmetros físico-químico dos morangos recobertos, assim como reduziu o percentual de perda de peso e a incidência de infecção dos frutos infectados com o *A.niger* nas duas temperaturas de avaliação.

Diante desses resultados, pode-se inferir que a cobertura comestível elaborada com nanopartículas de cloridrato de quitosana e óleo de semente de maracujá pode ser uma alternativa viável na conservação de morangos na fase pós-colheita tanto para manutenção dos seus parâmetros físico-químicos quanto redução da infecção microbiana. Mostra-se também uma alternativa viável ao uso de fungicidas sintéticos nocivos ao meio ambiente e ao consumidor. Além disso, o reaproveitamento das sementes do maracujá para obtenção do óleo gera benefícios ambientais e agrega valor a cadeia produtiva do maracujá.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2726–2744, dez. 2020.
- ABU SALHA, B.; GEDANKEN, A. Extending the Shelf Life of Strawberries by the Sonochemical Coating of their Surface with Nanoparticles of an Edible Anti-Bacterial Compound. **Applied Nano**, v. 2, n. 1, p. 14–24, 2021.
- ADILETTA, G.; DI MATTEO, M.; PETRICCIONE, M. Multifunctional role of chitosan edible coatings on antioxidant systems in fruit crops: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–18, 2021.
- AKBARI-ALAVIJEH, S.; SHADDEL, R.; JAFARI, S. M. Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 105, n. February, p. 105774, 2020.
- ALGHUTHAYMI, M. et al. **Mono and hybrid nanomaterials: Novel strategies to manage postharvest diseases**. Cambridge: Elsevier Inc., 2020.
- ALVES, H. et al. Aspectos microbiológicos e físico-químicos de morango exposto ao gás ozônio em diferentes concentrações durante o armazenamento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–12, 2019.
- ALVES, J. A. V. et al. Quality of 'San Andreas' strawberries and control of gray mold with essential melaleuca oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. October, p. 1–9, 6 nov. 2021.
- AMIS, T. M. et al. Selection of cryoprotectant in lyophilization of progesterone-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 1–15, 2020.
- AN, X. et al. Characterization of textural failure mechanics of strawberry fruit. **Journal of Food Engineering**, v. 282, p. 1–10, 2020.
- ANDRADE, J. K. S. et al. Yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg .) oil refining extracted by mechanical pressing. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 1, n. 5, p. 39–47, 2015.
- ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; REISSER JUNIOR, C. Morango Crescimento Constante em área de Produção. **Anuário Campo & Negócios HF**, v. 37, n. 1, p. 88–92, 2020.
- ANTUNES, L. E. C.; JUNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. **Morangueiro**. Brasília: EMBRAPA, 2016.
- APOLINÁRIO, A. et al. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo' **Química Nova**, v. 43, n. 2, p. 212–225, 2020.

ARAUJO, M. E. V. et al. Physical properties of yellow passion fruit seeds (*Passiflora edulis*) during the drying process. **Scientia Horticulturae**, v. 261, n. September 2019, p. 109032, 2020.

ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation: Techniques and Developments for Food Applications. **Nanomaterials for Food Applications**, p. 35–61, 2018.

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

ATHAYDE, A. J. A. A. et al. A coating composed of chitosan and *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) essential oil to control *Rhizopus* soft rot and quality in tomato fruit stored at room temperature. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 582–591, 2016.

AUBERT, C. et al. Impact of maturity stage at harvest on the main physicochemical characteristics, the levels of vitamin C, polyphenols and volatiles and the sensory quality of Gariguet strawberry. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 1, p. 37–49, 2021.

BAGHERI DARVISH, H. et al. Micro/nanoencapsulation strategy to improve the efficiency of natural antimicrobials against *Listeria monocytogenes* in food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 8, p. 1241–1259, 28 abr. 2021.

BAGHERI, R.; ARIALI, P.; MOTAMEDZADEGAN, A. Characterization, antioxidant and antibacterial activities of chitosan nanoparticles loaded with nettle essential oil. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1395–1402, 2021.

BAKSHI, P. S. et al. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1072–1083, 2020.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARBIERI, J. C.; LEIMANN, F. V. Extraction of passion fruit seed oil and microencapsulation in poly(ϵ -caprolactone). **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 2, p. 1, 2014.

BARKAOUI, S. et al. E-beam irradiation of strawberries: Investigation of microbiological, physicochemical, sensory acceptance properties and bioactive content. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 73, n. April, 2021.

BARROS, D. DE M. et al. Utilização de quitosana na conservação dos alimentos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 17717–17731, 2020.

BASTOS, L. P. H. et al. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 1–8, 2020.

BERGER, L. R. R. et al. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 635–641, 2018.

BERGER, L. R. R. et al. Agroindustrial waste as ecofriendly and low-cost alternative to production of chitosan from Mucorales fungi and antagonist effect against *Fusarium solani* (Mart.) Sacco and *Scytalidium lignicola* Pesante. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 101–108, 2020.

BOVI, G. G. et al. Impact of modified atmosphere and humidity packaging on the quality, off-odour development and volatiles of 'Elsanta' strawberries. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 204–210, 2018.

BURR, S. J.; WILLIAMS, P. A.; RATCLIFFE, I. Synthesis of cationic alkylated chitosans and an investigation of their rheological properties and interaction with anionic surfactant. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 615–623, 2018.

BUTSTRAEN, C.; SALAÜN, F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 608–616, 2014.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R. Black aspergilli and ochratoxin A-producing species in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 1–10, 2018.

CALEB, O. J. et al. Hot water dipping: Impact on postharvest quality, individual sugars, and bioactive compounds during storage of 'Sonata' strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 210, p. 150–157, 2016.

CAMPOS, T. et al. Conservação de morangos com utilização de óleos essenciais. **AGROTEC**, v. 18, p. 90–96, 2016.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. Antimicrobial activity of β -lapachone encapsulated into liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 103–108, 2015.

CHAUDHARY, S. Nanoemulsões de quitosana como revestimentos comestíveis avançados para frutas e vegetais : composição , fabricação e desenvolvimentos na última década. p. 1–49, 2020.

CHEN, L. et al. The effect of high-power ultrasound on the rheological properties of strawberry pulp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 67, p. 1–11, 2020.

CHOI, C.; NAM, J.-P.; NAH, J.-W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 33, p. 1–10, 2016.

CHU, Y. et al. Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion. **Lwt**, v. 122, n. August 2019, p. 109054, 2020.

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

COELHO, J. et al. The study of hormonal metabolism of Trincadeira and Syrah cultivars indicates new roles of salicylic acid, jasmonates, ABA and IAA during grape ripening and upon infection with *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, v. 283, p. 266–277, 2019.

CONTIGIANI, E. V. et al. Ozone washing decreases strawberry susceptibility to *Botrytis cinerea* while maintaining antioxidant, optical and sensory quality. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 2020.

CORREA-PACHECO, Z. N. et al. The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Growth in vitro and on cv Hass Avocado and Fruit Quality. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 5, p. 297–305, 2017.

DA SILVA, L. L. et al. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1891–1904, 2020.

DAGNAS, S. et al. Quantifying the effect of water activity and storage temperature on single spore lag times of three moulds isolated from spoiled bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 75–84, 2017.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

DE OLIVEIRA, C. E. V. et al. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 54–61, 2014.

DELSHADI, R. et al. Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. **Trends in Food Science and Technology**, v. 104, n. June, p. 72–83, 2020.

DEMIROK SONCU, E. et al. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Turkish fermented sausages (sucuk) coated with chitosan-essential oils. **Lwt**, v. 97, n. June, p. 198–204, 2018.

DIÁNEZ, F. et al. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight

pathogenic fungi of vegetables and mushroom. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 400–410, 2018.

DIVYA, K.; JISHA, M. S. Chitosan nanoparticles preparation and applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 101–112, 2018.

DONG, F.; WANG, X. Effects of carboxymethyl cellulose incorporated with garlic essential oil composite coatings for improving quality of strawberries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 821–826, 2017.

EGHBAL, N.; CHOUDHARY, R. Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. May 2017, p. 254–264, 2018.

EL-ADAWY, M. M. et al. Green synthesis and physical properties of Gum Arabic-silver nanoparticles and its antibacterial efficacy against fish bacterial pathogens. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 3, p. 1247–1254, 2021.

EL KNIDRI, H. et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1181–1189, 2018.

ERATTE, D. et al. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, n. August 2017, p. 121–131, 2018.

ERAZO, A.; MOSQUERA, S. A.; RODRÍGUEZ-PAÉZ, J. E. Synthesis of ZnO nanoparticles with different morphology: Study of their antifungal effect on strains of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*. **Materials Chemistry and Physics**, v. 234, n. April, p. 172–184, 2019.

ESPINOSA-ANDREWS, H. et al. Gum arabic-chitosan complex coacervation. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 4, p. 1313–1318, 2007.

FALEIRO, F. G. et al. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, p. 1–17, 2019.

FAOSTAT. World production of strawberries. 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 23 dez. 2021.

FARZANEH, M. et al. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 109, p. 145–151, 2015.

FATIMOH, A. O., MOSES, A. A., ADEKUNLE, O. B., AND DARE, O. E. Isolation and identification of rot fungi on post-harvest of pepper. **Aascit Journal of Biology**, v. 3, n. 5, p. 24–29, 2017.

FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology,

epidemiology, and disease management. **Journal of Berry Research**, v. 6, n. 1, p. 47–63, 2016.

FERNÁNDEZ-PAN, I. et al. Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 60–68, 2015.

FERREIRA, D. C. M. et al. Chitosan nanocomposites for food packaging applications. In: **Multifunctional Hybrid Nanomaterials for Sustainable Agri-Food and Ecosystems**. Cambridge: Elsevier, 2020. p. 393–435.

FERREIRA, S.; NICOLETTI, V. R. Microencapsulation of ginger oil by complex coacervation using atomization: Effects of polymer ratio and wall material concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 291, p. 1–24, 2021.

FLÓREZ, M. et al. Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107328, 2022.

FONTE, P. et al. Co-encapsulation of lyoprotectants improves the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles upon lyophilization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 850–862, 2015.

FONSECA, L. R. et al. Modulating properties of polysaccharides nanocomplexes from enzymatic hydrolysis of chitosan. **Food Research International**, v. 137, p. 1–11, 2020.

FORGES, M. et al. Impact of UV-C radiation on the sensitivity of three strawberry plant cultivars (*Fragaria x ananassa*) against *Botrytis cinerea*. **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 603–613, 2018.

FORTUNATI, E. et al. Effective Postharvest Preservation of Kiwifruit and Romaine Lettuce with a Chitosan Hydrochloride Coating. **Coatings**, v. 7, n. 11, p. 196, 2017.

FRANCISCO, E. V. DE; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of Food Engineering**, v. 238, p. 1–11, 2018.

FRANK, L. A. et al. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 147, p. 104459, 2020.

FRIEDRICH, J. C. C. et al. Improved antioxidant activity of a starch and gelatin-based biodegradable coating containing *Tetradenia riparia* extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1038–1046, 2020.

GABRIELE, F. et al. Ionic and covalent crosslinking in chitosan-succinic acid membranes: Effect on physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 1–9, 2021.

GÁLVEZ-IRIQUI, A. C. et al. Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p. 2985–

3000, 2019.

GARCIA, L. G. S. et al. Essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 621–632, 2021.

GE, J. et al. Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 23–31, 2018.

GHARANJIG, H. et al. Development and optimization of complex coacervates based on zedo gum, cress seed gum and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 148, p. 31–40, 2020.

GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1415–1421, 2017.

GOKCE, Y. et al. Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 462, p. 75–81, 2014.

GONÇALVES, D. DA C. et al. Recent advances and future perspective of essential oils in control *Colletotrichum* spp.: A sustainable alternative in postharvest treatment of fruits. **Food Research International**, v. 150, n. June, p. 110758, 2021.

GRANATO, D. .; NUNES, D. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas: Uma Abordagem Teórico-Prática**. [s.l: s.n.].

GRANDE-TOVAR, C. D. et al. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involved in fruit decay and mechanisms of action. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 61–71, 2018.

HADIDI, M. et al. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, n. February, p. 116075, 2020.

HAJJI, S. et al. Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 375–392, 2018.

HAMAD, A. F. et al. The intertwine of nanotechnology with the food industry. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 27–30, jan. 2018.

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

HAN, J. et al. Environmental stability and curcumin release properties of Pickering

emulsion stabilized by chitosan/gum arabic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 202–211, 2020.

HASANI, S.; OJAGH, S. M.; GHORBANI, M. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 143–151, 2018.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F. The effect of clove essential oil loaded chitosan nanoparticles on the shelf life and quality of pomegranate arils. **Food Chemistry**, v. 309, n. September 2019, p. 125520, 2020.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, n. August 2018, p. 113–122, 2019.

HASSAN, F. A. S. et al. Shelf-life extension of sweet basil leaves by edible coating with thyme volatile oil encapsulated chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 517–525, 2021.

HASSAN, J. et al. REVISTA INTERNACIONAL DE AGRICULTURA E BIOLOGIA O revestimento comestível à base de quitosana retarda a decomposição fúngica e mantém a qualidade dos morangos Artigo completo O revestimento comestível à base de quitosana retarda a decomposição fúngica e m. 2020.

HECKERT BASTOS, L. P. et al. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 102, n. September 2019, 2020.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. Á. et al. Microencapsulation of vanilla oleoresin (*V. Planifolia andrews*) by complex coacervation and spray drying: Physicochemical and microstructural characterization. **Foods**, v. 9, n. 10, 2020.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, G. et al. Nanostructured chitosan edible coating loaded with α -pinene for the preservation of the postharvest quality of *Capsicum annum* L. and *Alternaria alternata* control. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1881–1888, 2020.

HORISON, R. et al. Physical characteristics of nanoemulsion from chitosan/nutmeg seed oil and evaluation of its coating against microbial growth on strawberry. **Food Research**, v. 3, n. December, p. 821–827, 9 jul. 2019.

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

HUANG, Z. et al. UV excited fluorescence image-based non-destructive method for early detection of strawberry (*Fragaria x ananassa*) spoilage. **Food Chemistry**, v. 368, n. August 2021, p. 130776, 2022.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal (PAM) 2019. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 01 nov. 2021.

IRAVANI, S. Plant gums for sustainable and eco-friendly synthesis of nanoparticles: recent advances. **Inorganic and Nano-Metal Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 469–488, 2020.

ISOBE, N. et al. Estrutura primária da goma arábica e sua dinâmica na interface óleo / água Palavras-chave. p. 1–13, 2020.

ISTÚRIZ-ZAPATA, M. A. et al. Quality of cold-stored cucumber as affected by nanostructured coatings of chitosan with cinnamon essential oil and cinnamaldehyde. **Lwt**, v. 123, n. September 2019, p. 109089, 2020.

JAFARZADEH, S. et al. Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 291, p. 102405, 2021.

JAHANI, M.; PIRA, M.; AMINIFARD, M. H. Efeitos antifúngicos dos óleos essenciais contra *Aspergillus niger* in vitro e in vivo na romã (*Punica granatum*) frutas Palavras-chave. p. 1–21, 2020.

KALAGATUR, N. K. et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JUN, p. 1–13, 2018.

KARAASLAN, M. et al. Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. **Food Chemistry**, v. 337, n. December 2019, 2021.

KARIMIRAD, R.; BEHNAMIAN, M.; DEZHSETAN, S. Application of chitosan nanoparticles containing *Cuminum cyminum* oil as a delivery system for shelf life extension of *Agaricus bisporus*. **Lwt**, v. 106, n. July 2018, p. 218–228, 2019.

KARIMIRAD, R.; BEHNAMIAN, M.; DEZHSETAN, S. Bitter orange oil incorporated into chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and their potential application on antioxidant and antimicrobial characteristics of white button mushroom. **Food Hydrocolloids**, v. 100, n. September 2019, p. 105387, 2020.

KARTHIK, C.; CAROLINE, D. G.; PANDI PRABHA, S. Nanochitosan augmented with essential oils and extracts as an edible antimicrobial coating for the shelf life extension of fresh produce: a review. **Polymer Bulletin**, n. 0123456789, 2021.

KHAN, I. et al. Evaluation of nisin-loaded chitosan-monomethyl fumaric acid nanoparticles as a direct food additive. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 100–107, 2018.

KHORASANI, S.; DANAEI, M.; MOZAFARI, M. R. Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79,

n. June, p. 106–115, 2018.

KIEFER, J. et al. Identification of passion fruit oil adulteration by chemometric analysis of FTIR spectra. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 1–13, 2019.

KIM, E. S. et al. Mucoadhesive chitosan-gum arabic nanoparticles enhance the absorption and antioxidant activity of quercetin in the intestinal cellular environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 31, p. 8609–8616, 2019.

KIM, Y. H. et al. Comparative antibacterial and antifungal activities of sulfur nanoparticles capped with chitosan. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, n. February, p. 104178, 2020.

KTENIOUDAKI, A.; O'DONNELL, C. P.; DO NASCIMENTO NUNES, M. C. Modelling the biochemical and sensory changes of strawberries during storage under diverse relative humidity conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 154, n. January, p. 148–158, 2019.

KUMAR, N.; NEERAJ. Polysaccharide-based component and their relevance in edible film/coating: a review. **Nutrition and Food Science**, v. 49, n. 5, p. 793–823, 2019.

KUMAR, P. et al. Nanotechnology and its challenges in the food sector: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 17, p. 100332, set. 2020.

KUROIWA, T. et al. Formulation and stabilization of nano-/microdispersion systems using naturally occurring edible polyelectrolytes by electrostatic deposition and complexation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 226, p. 86–100, 2015.

KUROZUMI, S. et al. A novel hydrochloride-free chitosan oligosaccharide production method to improve taste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 109–118, 2019.

KWAK, H. et al. Protective coating of strawberries with cellulose nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 258, n. January, p. 117688, 2021.

LAFARGA, T. et al. Strategies to reduce microbial risk and improve quality of fresh and processed strawberries: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 197–212, 2019.

LI, C. et al. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. **Biotechnology Advances**, v. 44, p. 1–17, 2020.

LI, J.; ZHUANG, S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. **European Polymer Journal**, v. 138, n. September, p. 109984, 2020.

LI, X. M. et al. Chitosan hydrochloride/carboxymethyl starch complex nanogels as novel Pickering stabilizers: Physical stability and rheological properties. **Food**

Hydrocolloids, v. 93, n. February, p. 215–225, 2019a.

LI, X. M. et al. Fabrication of chitosan hydrochloride and carboxymethyl starch complex nanogels as potential delivery vehicles for curcumin. **Food Chemistry**, v. 293, n. March, p. 197–203, 2019b.

LI, Z. et al. Factors affecting human hand grasp type in tomato fruit-picking: A statistical investigation for ergonomic development of harvesting robot. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 157, p. 90–97, fev. 2019c.

LI, Z. X. et al. Application of Modified Chitosan in Fruit Juice Clarification. **Applied Mechanics and Materials**, v. 651–653, p. 211–214, 2014.

LI, W. et al. Self-assembly of green tea catechin derivatives in nanoparticles for oral lycopene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 248, p. 117–124, 2017.

LIMA, G. S. DE; XAVIER JÚNIOR, F. H.; STAMFORD, T. C. M. Óleo de semente de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Composição química e funcionalidade em alimentos. **Equidade e Sustentabilidade no Campo da Segurança Alimentar Global**, p. 63–75, 2020.

LIU, J. et al. The impact of the postharvest environment on the viability and virulence of decay fungi. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1681–1687, 2017.

LOPES, U. P. et al. A new species of *Calonectria* causing rot on ripe strawberry fruit in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, n. 1, p. 1–11, 2018.

LUCARINI, M. et al. Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Seed Oil. In: **Fruit Oils: Chemistry and Functionality**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 577–603.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and chemical characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 127–134, 2012.

MARIOD, A. A. **Enhancement of Color Stability in Foods by Gum Arabic**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. DEL C. et al. Effect of nanostructured chitosan/propolis coatings on the quality and antioxidant capacity of strawberries during storage. **Coatings**, v. 10, n. 2, p. 1–12, 2020.

MARTÍNEZ, K. et al. The effect of edible chitosan coatings incorporated with thymus capitatus essential oil on the shelf-life of strawberry (*Fragaria x ananassa*) during cold storage. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, 2018.

MASSAA, T. B. et al. Passion fruit seed oil: Extraction and subsequent transesterification reaction. **Grasas y Aceites**, v. 72, n. 2, 2021.

MATROSE, N. A. et al. Plant extracts and other natural compounds as alternatives

for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review. **Food Bioscience**, v. 41, n. December 2020, p. 100840, 2021.

MATSHETSHE, K. I. et al. Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded Cinnamomum zeylanicum essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 676–682, 2018.

MD NOR, S.; DING, P. Trends and advances in edible biopolymer coating for tropical fruit: A review. **Food Research International**, v. 134, n. April, p. 109208, 2020.

MEHRAN, M.; MASOUM, S.; MEMARZADEH, M. Microencapsulation of Mentha spicata essential oil by spray drying: Optimization, characterization, release kinetics of essential oil from microcapsules in food models. **Industrial Crops and Products**, v. 154, n. June, p. 112694, 2020.

MELO, N. F. C. B. 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, n. February, p. 56–66, 2018.

MELO, N. F. C. B. et al. Quality of postharvest strawberries: comparative effect of fungal chitosan gel, nanoparticles and gel enriched with edible nanoparticles coatings. **International Journal of Food Studies**, v. 9, n. 2, p. 373–393, 18 out. 2020a.

MELO, N. F. C. B. et al. In vivo and in vitro antifungal effect of fungal chitosan nanocomposite edible coating against strawberry phytopathogenic fungi. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 11, p. 3381–3391, 4 nov. 2020b.

MENDONÇA, C. R. B. et al. Application of microemulsions as coating in fresh cut strawberries. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 7, p. 2764–2770, 2020.

MENG, D. et al. Antifungal activity of chitosan against Aspergillus ochraceus and its possible mechanisms of action. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 1063–1070, 2020.

MOSHARI-NASIRKANDI, A.; ALIREZALU, A.; ALMASI, M. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Effect of lemon verbena bio - extract on phytochemical and antioxidant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 1–8, 2020.

MOUSAVI, S. R.; RAHMATI-JONEIDABAD, M.; NOSHAD, M. Effect of chia seed mucilage/bacterial cellulose edible coating on bioactive compounds and antioxidant activity of strawberries during cold storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, n. September, p. 618–623, nov. 2021.

MULEY, A. B.; SINGHAL, R. S. Extension of postharvest shelf life of strawberries (Fragaria ananassa) using a coating of chitosan-whey protein isolate conjugate. **Food Chemistry**, v. 329, p. 1–11, 2020.

- NAIR, M. S. et al. Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 304–320, 2020.
- NARAYANAN, A. et al. Super water absorbing polymeric gel from chitosan, citric acid and urea: Synthesis and mechanism of water absorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 191, n. 2505, p. 152–160, 2018.
- NASCIMENTO, J. I. G. et al. Chitosan–citric acid edible coating to control *Colletotrichum gloeosporioides* and maintain quality parameters of fresh-cut guava. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1127–1135, 2020.
- NASEER, B. et al. Importance and health hazards of nanoparticles used in the food industry. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 6, p. 623–641, 19 dez. 2018.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55–62, 2016.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Encapsulation of passion fruit seed oil by means of supercritical antisolvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 96–105, 2017.
- OLIVEIRA, A. M. DE; OLIVEIRA JUNIOR, E. N. DE. Antifungal and filmogenic properties of micro- and nanostructures of chitosan and its derivatives. In: **Nanomycotoxicology**. Cambridge: Elsevier, 2020. p. 397–421.
- OLIVEIRA, J. L. DE et al. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 5325–5334, 30 maio 2018.
- OLIVEIRA, J. et al. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, n. May 2018, p. 261–267, 2019a.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Encapsulation of passion fruit seed oil by means of supercritical antisolvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 96–105, nov. 2017.
- OLIVEIRA, J. P. et al. Preparation and characterization of microparticles loaded with seed oil of Caatinga passion fruit obtained by spray drying. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 16, n. 1, p. 97–104, 2019b.
- OREGEL-ZAMUDIO, E. et al. *Scientia Horticulturae* Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 273–279, 2017.
- PALMA-GUERRERO, J. et al. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1021–1032, 2010.

- PAN, C. et al. Preparation nanoparticle by ionic cross-linked emulsified chitosan and its antibacterial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 568, p. 362–370, maio 2019.
- PANAHIRAD, S. et al. Applications of carboxymethyl cellulose- and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 110, n. February, p. 663–673, 2021.
- PANOY, A. A.; KARABAGIAS, I. K.; RIGANAKOS, K. A. Effect of Gamma-Irradiation on Sensory Characteristics, Physicochemical Parameters, and Shelf Life of Strawberries Stored under Refrigeration. **International Journal of Fruit Science**, v. 20, n. 2, p. 191–206, 2020.
- PANT, A.; NEGI, J. S. Novel controlled ionic gelation strategy for chitosan nanoparticles preparation using TPP- β -CD inclusion complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 180–185, jan. 2018.
- PATEL, M. K. et al. Phenylalanine: A promising inducer of fruit resistance to postharvest pathogens. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2020.
- PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. M. Nanostructures: Current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 2, p. 245–253, 2017.
- PEREIRA, M. G. et al. Effect of Extraction Process on Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Oil from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa*) Seeds. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 9, p. 2611–2625, 2019.
- PETRASCH, S. et al. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 6, p. 877–892, 2019.
- PIMENTA, R. S.; MONTEIRO DOS SANTOS BALIZA, D. D.; MOREIRA DA SILVA, J. F. **Aspergillus**. [s.l.] Elsevier, 2020.
- PINZON, M. I. et al. Increasing shelf life of strawberries (*Fragaria ssp*) by using a banana starch-chitosan-Aloe vera gel composite edible coating. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 92–98, 2020.
- POTT, D. M. et al. Metabolic reconfiguration of strawberry physiology in response to postharvest practices. **Food Chemistry**, v. 321, p. 1–10, 2020.
- PRAKASH, B. et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1–11, 2018.
- PRASANNATH, K.; GALEA, V. J.; AKINSANMI, O. A. Characterisation of leaf spots caused by *Neopestalotiopsis clavispora* and *Colletotrichum siamense* in macadamia

in Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 4, p. 1219–1225, 2020.

PUROHIT, S. et al. Evaluation of thermophysical, biochemical and antibacterial properties of unconventional vegetable oil from Northeast India. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 4, p. 81–91, 2021.

QIAO, C. et al. Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid. **LWT**, v. 135, p. 1–17, 2021.

QIN, Y.; LI, P.; GUO, Z. Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: A review of structural optimization and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, n. February, p. 116002, 2020.

QUINTANA, S. E. et al. Comparison between essential oils and supercritical extracts into chitosan-based edible coatings on strawberry quality during cold storage. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 171, n. September 2020, p. 105198, 2021.

RABELO, R. S. et al. Complexation of chitosan with gum Arabic, sodium alginate and κ-carrageenan: Effects of pH, polymer ratio and salt concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, n. July, p. 115120, 2019.

RAJABI, H. et al. Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 578, p. 1–8, 2019.

RAJABI, H. et al. Preparation and characterization of 3D graphene oxide nanostructures embedded with nanocomplexes of chitosan- gum Arabic biopolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 163–174, 2020.

RAMAKRISHNAN, R. K. et al. Eco-Friendly and Economic , Adsorptive Removal of Cationic. **Polymers**, v. 13, p. 1–21, 2021.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1–2, p. 219–228, 2013.

RASHKI, S. et al. Nanopartículas à base de quitosana contra infecções bacterianas Palavras-chave. p. 1–29, 2021.

RESENDE, N. S. et al. Chitosan/Cellulose Nanofibril Nanocomposite and Its Effect on Quality of Coated Strawberries. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

ROMANAZZI, G. et al. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 579–601, 2017.

RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017.

SABET, S. et al. The interactions between the two negatively charged

polysaccharides: Gum Arabic and alginate. **Food Hydrocolloids**, v. 112, p. 1–14, 2021.

SAHANI, S.; SHARMA, Y. C. Advancements in applications of nanotechnology in global food industry. **Food Chemistry**, v. 342, n. May 2020, p. 128318, 2021.

SAHU, T. et al. Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102487, 1 jun. 2021.

SALAMA, H. E.; ABDEL AZIZ, M. S.; SABAA, M. W. Novel biodegradable and antibacterial edible films based on alginate and chitosan biguanidine hydrochloride. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 443–450, 2018.

SALEEM, M. S. et al. Incorporation of ascorbic acid in chitosan-based edible coating improves postharvest quality and storability of strawberry fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, n. August, p. 160–169, 2021.

SANTOS, O. V. DOS et al. Utilization of agroindustrial residue from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds as a source of fatty acids and bioactive substances. **Food Science and Technology**, v. 41, n. suppl 1, p. 218–225, jun. 2021.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Total phenolic content, Free radical scavenging and Antimicrobial activities of *Passiflora subpeltata* seeds. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 4, p. 67–72, 2013.

SENA, C. P. et al. Características físico-químicas de emulsões de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) homogeneizadas com ultrassom-assitido. **Scientia Amazonia**, v. 27, n. 2, p. 27–32, 2018.

SENTURK PARREIDT, T.; SCHMID, M.; MÜLLER, K. Effect of Dipping and Vacuum Impregnation Coating Techniques with Alginate Based Coating on Physical Quality Parameters of Cantaloupe Melon. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 929–936, 2018.

SHADDEL, R. et al. Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1800–1810, 2018.

SHAHBAZI, Y. Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 264–272, 2018.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 337–344, 2008.

SHETTA, A.; KEGERE, J.; MAMDOUH, W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 126, p. 731–742, 2019.

SHI, X. C. et al. Biocontrol strategies for the management of *Colletotrichum* species in postharvest fruits. **Crop Protection**, v. 141, n. November 2020, p. 105454, 2021.

SHIRZAD, H. et al. Effect of *aloesia citrodora* essential oil on biochemicals, antioxidant characteristics, and shelf life of strawberry fruit during storage. **Metabolites**, v. 11, n. 5, 2021.

SHOJAEI, M.; ESHAGHI, M.; NATEGHI, L. Characterization of hydroxypropyl methyl cellulose–whey protein concentrate bionanocomposite films reinforced by chitosan nanoparticles. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 10, p. 1–12, 2019.

SIEBENEICHLER, T. J. et al. The postharvest ripening of strawberry fruits induced by abscisic acid and sucrose differs from their in vivo ripening. **Food Chemistry**, v. 317, n. September 2019, p. 126407, 2020.

SILVA, L. DA et al. Microencapsulamento de óleo de pequi revestido com goma de cajueiro e quitosana por coacervação complexa seguida de secagem por spray drying ou liofilização. **infoteca.cnptia.embrapa.br**, n. 1, p. 23, 2018.

SILVA, P. P. M. et al. Essential oils from *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey and *Eucalyptus urograndis* W. Hill ex Maiden associated to carboxymethylcellulose coating for the control of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. and *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. in strawberry. **Industrial Crops and Products**, v. 156, n. April, p. 112884, nov. 2020.

SILVA, T. M. et al. Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 49, 2015.

SIMÕES, F. R.; TAKEDA, H. H. Basic Concepts and Principles. In: RÓZ, A. L. DA et al. (Eds.). **Nanostructures**. Cambridge: Elsevier, 2017. p. 1–32.

SOARES, M. G. O. et al. *Colletotrichum siamense* is the main aetiological agent of anthracnose of avocado in south-eastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 1, p. 154–166, 2021.

SOTELO-BOYÁS, M. E. et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. **LWT**, v. 77, p. 15–20, abr. 2017.

SOUZA, M. L. DE et al. Wild *Passiflora* (*Passiflora* spp.) seed oils and their nanoemulsions induce proliferation in HaCaT keratinocytes cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, n. July, p. 102803, set. 2021.

SUHAG, R. et al. Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. **Food Research International**, v. 136, n. September, p. 109582, 2020.

SUN, R.; LU, J.; NOLDEN, A. Nanostructured foods for improved sensory attributes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, n. January, p. 281–286, 2021.

TABASSUM, N.; KHAN, M. A. Modified atmosphere packaging of fresh-cut papaya using alginate based edible coating: Quality evaluation and shelf life study. **Scientia Horticulturae**, v. 259, n. March 2019, p. 108853, 2020.

TAHERI, A.; JAFARI, S. M. Gum-based nanocarriers for the protection and delivery of food bioactive compounds. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 269, p. 277–295, 2019.

TAHIR, H. E. et al. Quality and postharvest-shelf life of cold-stored strawberry fruit as affected by gum arabic (*Acacia senegal*) edible coating. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 1–10, 2018.

TAHIR, H. E. et al. Recent developments in gum edible coating applications for fruits and vegetables preservation: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, n. March, p. 115141, 2019.

TAN, C. et al. Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 236–245, 2016.

TAVARES, L. et al. Microencapsulation of Garlic Extract by Complex Coacervation Using Whey Protein Isolate/Chitosan and Gum Arabic/Chitosan as Wall Materials: Influence of Anionic Biopolymers on the Physicochemical and Structural Properties of Microparticles. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 12, p. 2093–2106, 2019.

TAVARES, L.; NOREÑA, C. P. Z. Encapsulation of Ginger Essential Oil Using Complex Coacervation Method: Coacervate Formation, Rheological Property, and Physicochemical Characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, n. 8, p. 1405–1420, 2020.

TEMIZ, N. N.; ÖZDEMİR, K. S. Microbiological and physicochemical quality of strawberries (*Fragaria x ananassa*) coated with *Lactobacillus rhamnosus* and inulin enriched gelatin films. **Postharvest Biology and Technology**, v. 173, n. September 2020, 2021.

TENGGU-ROZAINA, T. M.; BIRCH, E. J. **Thermal analysis for lipid decomposition by DSC and TGA**. [s.l.] Elsevier, 2018.

TIAN, B.; LIU, Y. Chitosan-based biomaterials: From discovery to food application. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 31, n. 11, p. 2408–2421, 2020.

TIMILSENA, Y. P. et al. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1276–1286, 2019.

TRENKENSCHUH, E.; FRIESS, W. Freeze-drying of nanoparticles: How to

overcome colloidal instability by formulation and process optimization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 165, n. May, p. 345–360, 2021.

TSAI, M. L. et al. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 756–761, 2011.

UMERSKA, A. et al. Freeze drying of polyelectrolyte complex nanoparticles: Effect of nanoparticle composition and cryoprotectant selection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 552, n. 1–2, p. 27–38, 2018.

URANGA, J. et al. Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 86, p. 95–103, 2019.

VALENZUELA, C. et al. Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 406–411, 2015.

VENTURA-AGUILAR, R. I. et al. Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. **Food Chemistry**, v. 262, p. 142–149, 2018.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.

VERMA, C.; QURAIISHI, M. A. Gum Arabic as an environmentally sustainable polymeric anticorrosive material: Recent progresses and future opportunities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, n. June, p. 118–134, 2021.

VILLENA DE FRANCISCO, E.; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of Food Engineering**, v. 238, p. 1–11, dez. 2018.

VIŠNJAR, T. et al. Chitosan hydrochloride has no detrimental effect on bladder urothelial cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 44, n. December 2016, p. 403–413, 2017.

VUILLEMIN, M. E. et al. Caracterizações físico-químicas da goma arábica modificada com produtos de oxidação do ácido ferúlico Palavras-chave. p. 1–20, 2020.

WANG, K. et al. The biochemical and molecular mechanisms of softening inhibition by chitosan coating in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) during cold storage. **Scientia Horticulturae**, v. 271, p. 109483, 2020.

WANG, W.; XUE, C.; MAO, X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4532–4546, 2020.

WU, H. T. et al. Precipitation parameters and the cytotoxicity of chitosan hydrochloride microparticles production by supercritical assisted atomization. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 102, p. 123–132, 2015.

XIANG, S. et al. Gum Arabic-stabilized conjugated linoleic acid emulsions: Emulsion properties in relation to interfacial adsorption behaviors. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 110–116, 2015.

YADAV, M. et al. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 8, p. 1–20, 2019.

YAN, J. et al. The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, n. September 2018, p. 29–38, 2019.

YAN, J. et al. Antifungal activity screening for mint and thyme essential oils against *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of strawberry and peach fruits. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 6, p. 1993–2007, 2021.

YAZICI, A.; TIRYAKI, G. Y.; AYVAZ, H. Determination of pesticide residual levels in strawberry (*Fragaria*) by near-infrared spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 5, p. 1980–1989, 2020.

YILMAZ, M. T. et al. Electro spraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, n. September 2018, p. 166–178, 2019.

YOON, Y.-S. et al. Effects of X-ray irradiation on the postharvest quality characteristics of 'Maehyang' strawberry (*Fragaria × ananassa*). **Food Chemistry**, v. 325, p. 1–9, 2020.

YOU, G.; LIU, X. L.; ZHAO, M. M. Preparation and characterization of hsian-tsao gum and chitosan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 255–266, 2018.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research International**, v. 89, p. 117–128, 2016.

ZHANG, L. et al. Characterization and fungicide sensitivity of *colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in eastern China. **Plant Disease**, v. 104, n. 7, p. 1960–1968, 2020.

ZHANG, W. et al. Effective strategies of sustained release and retention enhancement of essential oils in active food packaging films/coatings. **Food Chemistry**, v. 367, n. June 2021, p. 130671, 2022.

ZHAO, D. et al. Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. **Polymers**, v. 10, n. 4, p. 1–17, 2018.

ZHONG, Y. et al. Fabrication and characterization of oil-in-water emulsions stabilized by macadamia protein isolate/chitosan hydrochloride composite polymers. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p. 1–11, 2020.

ZHONG, Y. et al. Spray drying and rehydration of macadamia oil-in-water emulsions: Impact of macadamia protein isolate to chitosan hydrochloride ratio. **Food Chemistry**, v. 342, n. October 2020, p. 128380, 2021.

ZHOU, W. et al. Carboxymethyl chitosan-pullulan edible films enriched with galangal essential oil: Characterization and application in mango preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 256, n. December 2020, p. 117579, 2021.

ZHU, W. et al. Development and physicochemical characterization of chitosan hydrochloride/sulfobutyl ether- β -cyclodextrin nanoparticles for cinnamaldehyde entrapment. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1–11, 2020.