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

JOSÉ ALBERTO DA COSTA MEDEIROS

COBERTURA COMESTÍVEL BIOATIVA DE GEL E CLORIDRATO DE QUITOSANA: BIOTECNOLOGIA ECOSSUSTENTÁVEL PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM UVAS DE MESA

RECIFE
2023

JOSÉ ALBERTO DA COSTA MEDEIROS

COBERTURA COMESTÍVEL BIOATIVA DE GEL E CLORIDRATO DE QUITOSANA: BIOTECNOLOGIA ECOSSUSTENTÁVEL PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM UVAS DE MESA

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

Orientador(a): Thayza Christina Montenegro Stamford

RECIFE

2023

Catalogação na fonte:

M488c Medeiros, José Alberto da Costa
Cobertura comestível bioativa de gel e cloridrato de quitosana: biotecnologia ecossustentável para controle de contaminação fúngica em uvas de mesa / José Alberto da Costa Medeiros. – 2023.
108 p. : il.

Orientadora:Thayza Christina Montenegro Stamford.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2023.

Inclui referências e anexo.

1. Atividade antifúngica. 2. Fitopatógenos. 3. Nanotecnologia. 4. Química verde 5. Segurança alimentar. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 218)

Bibliotecária: Elaine Freitas,
CRB4:1790

JOSÉ ALBERTO DA COSTA MEDEIROS

COBERTURA COMESTÍVEL BIOATIVA DE GEL E CLORIDRATO DE QUITOSANA: BIOTECNOLOGIA ECOSUSTENTÁVEL PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM UVAS DE MESA

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

Aprovada em: 28/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Natália Ferrão Castelo Branco Melo

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Lucia Raquel Ramos Berger

Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

Dra. Gerlane Souza de Lima

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta tese ao maior vascaíno de todos os tempos, sempre alegre e conversador, tio Nego, José Ilson da Costa (08/09/1964 - †28/04/2023).

AGRADECIMENTOS

Há que ser dito que ainda não acredito estar chegando ao fim do terceiro volume da coletânea que foi iniciada ao entrar no curso superior de Nutrição. As noites mal dormidas e os dias de zero convívio social vivenciados na graduação, no mestrado e depois no meio do doutorado devido a pandemia por Covid-19, teimam em permanecer em alguns momentos do doutorado, mas cada privação realizada conto como um benefício e conhecimento adquirido ao longo desses inumerados anos. Não me arrependo! Só agradeço pela oportunidade para realizar o doutorado.

Nada mais justo que agradecer aos grandes responsáveis por este que aqui vos escreve: Dona Vilma, vulgo minha mãe, e seu eterno companheiro, Seu Armando (pros mais íntimos Seu Osmano), também conhecido como meu pai. Nenhuma palavra no mundo será capaz de demonstrar todo o agradecimento que tenho por tudo que me proporcionaram. Aos “irmões” que tanto completam a família Laurindo Medeiros, Ana Villany, Wanilla Medeiros e Amanda Vitória.

Sempre que penso nesses últimos anos vividos, algumas pessoas não podem passar desapercebidas das memórias: Thaísa Farias, Maria Isabel, Alessandra Silva, Lúcia Raquel... Todas, ao seu modo, me inspiram a continuar neste caminho (mesmo que, as vezes, eu teime em desviar. Minha culpa). Pessoas incríveis! Um destaque especial para minha amiga Gabriela Morais, não teria um EU para terminar essa história sem ela na minha vida, obrigado, Madêra.

Com toda certeza devo esta última etapa da vida acadêmica a minha orientadora Thayza Stamford, sem o seu total apoio, não teria chegado ao fim desse maior desafio. Um anjo em minha vida. Mesmo após a despedida do seu saudoso pai, Newton Stamford (1942-2023). Que Deus conforte toda família.

Muitos compôem o corpo de servidores dos diversos laboratórios por mim utilizados durante o doutorado, tanto na UFPE quanto na UNICAP. Além deles, o apoio de outros profissionais das mais variadas origens tiveram sua parcela de contribuição. Seria injusto e totalmente incapaz de normear a todos, mas aqui fica meu agradecimento.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que concedeu minha bolsa e possibilitou minha dedicação exclusiva.

Cambota Bonitão é o nome do meu parceiro de “noitada”, amigo fiel e

incansável arranhador/mordedor. Meu gato é incrível. Obs.: Saudades da sua parceira, a gata Bastarda.

Por fim, o agradecimento mais que especial, envolto em amor, Susana Lígia, minha amiga, companheira, confidente, namorada, mulher... Se tem alguém nesse mundo que me entende é ela. Me entende até nos mínimos detalhes. Te amo. Que Deus abençoe nossa união!

RESUMO

Fungos fitopatogênicos são os principais agentes deteriorantes de frutas, ocasionando elevada perda na produção e na comercialização. Isto acarreta a implantação de medidas preventivas pela agroindústria. Nesse contexto, coberturas comestíveis são tecnologias emergentes, e ecosustentáveis para conservação de alimentos. Assim, o presente estudo desenvolveu coberturas comestíveis a base de gel de cloridrato de quitosana, de nanopartículas de cloridrato de quitosana, e da associação das duas substâncias, verificando sua ação antifúngica, e influência na ultraestrutura de fungos fitopatogênicos, atividade antioxidante e toxicidade. Também foi verificada a ação preventiva e curativa para infecções fúngicas das coberturas, usando uva de mesa como fruta modelo. O cloridrato de quitosana foi obtido por dialise da quitosana extraída de Mucolares por método álcali-ácido. As nanopartículas foram obtidas por gelificação iônica. Os materiais obtidos foram caracterizados físico-quimicamente (espectro de infravermelho, termogravimetria, calorimetria, tamanho médio, índice de polidispersão, e potencial zeta. Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) das substâncias testes, além da influência no crescimento micelial e ultraestrutura dos fungos fitopatogênico. Atividade antioxidante foi determinada pelos sequestros dos radicais DPPH, ABTS e redução de ferro. A citotoxicidade, e o potencial de irritação foram determinados por MTT e HET-CAM. Os polímeros apresentaram bandas características no espectro de infravermelho. Com grau de desacetilação acima de 80%. As nanopartículas apresentaram tamanho 450-1160nm, potencial zeta 27-41mV, e índice de polidispersão 0,42-0,92. Todas as substâncias foram consideradas atóxicas. As substâncias apresentaram baixa CIM e promoveram importantes alterações no micélio e nos esporos dos fungos teste. O controle de infecções pós-colheita em uvas pelas substâncias testes demonstrou efeito preventivo, e curativo, obtendo resultados promissores na conservação das uvas. Dessa forma, o cloridrato de quitosana em gel ou nanopartículas, é um promissor agente inibitório de fungos, sendo efetivo no preparo de cobertura comestível bioativa.

Palavras-chaves: atividade antifúngica; fitopatógenos; nanotecnologia; química verde; segurança alimentar.

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi are the main fruit spoilage agents, causing high losses in production and commercialization. This leads to the implementation of preventive measures by the agroindustry. In this context, edible coatings are emerging and eco-sustainable technologies for food preservation. Thus, the present study developed edible dressings based on chitosan hydrochloride gel, chitosan hydrochloride nanoparticles, and the association of the two substances, verifying their antifungal action, and influence on the ultrastructure of phytopathogenic fungi, antioxidant activity and toxicity. The preventive and curative action for fungal infections of the toppings was also verified, using table use as a model fruit. Chitosan hydrochloride was obtained by dialysis of chitosan extracted from Mucolares by alkali-acid method. The nanoparticles were obtained by ionotropic gelatinization. The materials obtained were characterized physicochemically (infrared spectrum, thermogravimetry, calorimetry, average size, polydispersity index, and zeta potential. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of the test substances were determined, in addition to the influence on mycelial growth and ultrastructure of the phytopathogenic fungi. Antioxidant activity was determined by scavenging radicals DPPH, ABTS and iron reduction. Cytotoxicity and irritation potential were determined by MTT and HET-CAM. The polymers showed characteristic bands in the infrared spectrum. With degree of deacetylation above 80%. The nanoparticles were 450-1160nm in size, zeta potential 27-41mV, and polydispersion index 0.42-0.92. All substances were considered non-toxic. The substances presented MIC and promoted alterations in the mycelium and spores The control of postharvest infections in grapes by the test substances demonstrated preventive and curative effects, obtaining promising results in the conservation of the grapes. Thus, chitosan hydrochloride in gel or nanoparticles is a promising fungal inhibitory agent, being effective in the preparation of bioactive edible coating.

Keywords: antifungal activity; phytopathogens; nanotechnology; green chemistry; food safety**.**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desacetilação da quitina para obtenção de quitosana. 25

Figura 2 – Espectros na região do infravermelho da quitosana microbiologica (Q), do cloridrato de quitosana (CQ) e das nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCl). 44

Figura 3 – Curvas de termogravimetria (TGA) do cloridrato de quitosana (A) e das nanopartículas do cloridrato de quitosana (B). 49

Figura 4 – Curvas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) do cloridrato de quitosana (A1) e com ampliação do seguimento (A2), das nanopartículas do cloridrato de quitosana (B1) e ampliação do seguimento (B2). 50

Figura 5 - Determinação do potencial de irritação das substâncias testes: quitosana fúngica(QF), cloridrato de quitosana (QCl), e nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPClQ), pelo ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM). Controle positivo de irritação foi usado o laurel sulfato de sódio 1% (LSS), com observação de até 5 minutos/300 segundos dos sinais de vasoconstricção (VC), hemorragia (HE) e coagulo (C).....53

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura de A. niger. Micélio controle sem a presença de substância teste (A); após exposição a concentração 6mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (B); concentração 7 mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (C); concentração 2mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (D); concentração 3mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (E); concentração 0,5mg/mL da junção das substâncias (F) e concentração 1mg/mL da junção das substâncias (G). 60

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura de R. stolonifer. Micélio controle sem a presença de substância teste (A); após exposição a concentração 4 mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (B); concentração 5 mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (C); concentração 1mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (D); concentração 2 mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de

quitosana (E); concentração 0,5mg/mL da junção das substâncias (F) e concentração 1mg/mL da junção das substâncias (G). 61

Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura de C. siamenses. Micélio controle (A); após exposição a concentração 4 mg/mL gel cloridrato de quitosana (B) e concentração 5 mg/mL gel cloridrato de quitosana (C). 62

Figura 9 – Tratamento curativo sob temperatura ambiente com os fungos A. niger, R. stolonifer e C. siamense frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+). 64

Figura 10 – Tratamento curativo sob temperatura de refrigeração com os fungos A. niger, R. stolonifer e C. siamense frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+). 64

Figura 11 - Tratamento preventivo sob temperatura ambiente com os fungos *A. niger, R. stolonifer e C. siamense* frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+). 65

Figura 12 - Tratamento preventivo sob temperatura ambiente com os fungos A. niger, R. stolonifer e C. siamense frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+). 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das formulações para elaboração das nanopartículas do cloridrato de quitosana microbiologica por gelatinização ionotrópica, tendo como variantes pH, percentual de TPP, de cloridrato de quitosana e da proporção entre cloridrato de quitosana e o TPP. 34

Tabela 2 - Distribuição das substâncias testes utilizadas para obtenção das coberturas comestíveis, com suas respectivas concentrações, com base na concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL: metade (CIM/2), CIM, e dobro (2xCIM), a serem avaliadas na inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Substâncias testes: gel de cloridrato de quitosana (GCQ), nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPCQ), e a junção de ambas substâncias (GCQ+NPCQ). 38

Tabela 3 - Determinação dos melhores parametros das variaveis dependentes, percentual de cloridrato de quitosana, de TPP e a proporção entre cloridrato de quitosana e TPP, para obtenção de nanopartículas de cloridrato de quitosana com melhores características de tamanho (DLS), potencial zeta (PZ), indice de polidispersão (PDI). 46

Tabela 4 – Atividade antioxidante in vitro pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS da quitosana fúngica, do cloridrato de quitosana, e das nanopartículas de cloridrato de quitosana fúngica-TPP (NPClQ). 51

Tabela 5 - Determinação da citotoxicidade das substâncias testes: quitosana fúngica(QF), cloridrato de quitosana (ClQ), e nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPClQ), pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Doxorrubicina foi utilizada como padrão positivo para citoxicidade. 52

Tabela 6 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do cloridrato de quitosana (QCl), das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (NPCLQ), e da junção de ambos (QCl-NPCLQ) para fungos fitopagenos.....55

Tabela 7 - Inibição do crescimento micelial radial (ICM%) dos fungos fitopatogênicos frente as substâncias testes em suas diferentes

concentrações, com base na concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL Substâncias testes: cloridrato de quitosana (QCl), nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPCl), junção das substâncias (QCl + NPCLQ). Os fungos foram crescidos em meio Ágar Batata Dextrose, e incubados a 25ºC. O crescimento micelial radial foi medido diariamente até que a placa contendo o controle negativo (sem substância teste) estivesse completamente coberta de micélios. 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1 PRODUÇAO, CONSUMO E CONSERVAÇÃO DA UVA 18
2.2 FUNGOS CONTAMINANTES NO PÓS-COLHEITA DA UVA 20
2.2.1 *Aspergillus niger* 21
2.3 *Rhizopus stolonifer* 22
2.4 *Colletotrichum siamense* 23
2.5 QUITOSANA 24
2.6 NANOTECNOLOGIA 28
2.6.1 Nanotecnologia aplicada a quitosana 29
3 OBJETIVOS 31
3.1 OBJETIVO GERAL 31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
4 HIPÓTESE 32
5 MATERIAIS E MÉTODOS 33
5.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO CLORIDRATO DE QUITOSANA E DAS NANOPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA 33
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CLORIDRATO DE QUITOSANA E DAS NANOPARTICULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA 35
5.2.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) . 35
5.2.2 Método ABTS (2,2"-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) 35
5.2.3 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) 36
5.3 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE MTT 36
5.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO PELO MÉTODO HET-CAM 37
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 37
5.6 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL FÚNGICO 38
5.7 INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS FÚNGICOS 39
5.8 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE A MORFOLOGIA FÚNGICA 39

5.9 PREPARO DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS 40
5.10 ATIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO NAS UVAS 41
5.10.1 Tratamento preventivo 41
5.10.2 Tratamento curativo 42
5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
6.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA, DO CLORIDRATO DE QUITOSANA E DAS NANOPARTICULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA 43
6.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 50
6.3 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO 52
6.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 54
6.5 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE A MASSA MICELIAL 57
6.6 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTES SOBRE A MORFOLOGIA FÚNGICA 58
6.7 EFEITO DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO NAS UVAS 62
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 67
REFERÊNCIAS 68
ANEXO A – CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO: AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS 82

1 INTRODUÇÃO

Em 2012, no Rio de Janeiro durante a Conferência das Nações Unidas foram estabelecidos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que provesse os desafios mundiais mais urgentes, no âmbito ambiental, político e econômico. Tais objetivos devem ser mensuráveis e acordados mundialmente, compreendendo um conjunto de ações para acabar com a pobreza extrema, e a fome, prevenir doenças mortais, expandir a educação primária, diminuir a desigualdade econômica, proteger o planeta, o clima, consumo sustentável, e assegurar paz e prosperidade a todas as pessoas (Nações Unidas-Brasil, 2023).

Na indústria do agronegócio dois dos ODS se destacam, no intuito de estimular uma produção e consumo sustentável, melhorando a qualidade dos produtos comercializados e a renda, principalmente, dos pequenos produtores de alimentos. O Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2 (Fome zero e Agricultura sustentável), especificamente 2.4, tem como uma de suas ações garantir, até 2030, a implementação de sistemas sustentáveis de produção de alimentos que aumentem a produtividade e a produção, e que ajudem a manter os ecossistemas. Assim como, o ODS 12 (Consumo e Produção responsáveis), destacando-se os 12.3 cujas ações são voltadas para redução das perdas de alimentos ao longo das cadeias de produção e abastecimento; e o 12.4 apresentam ações para alcançar o manejo dos produtos químicos de forma ambientalmente saudável, minimizando os impactos negativos desses produtos sobre a saúde humana e o meio ambiente (Nações Unidas-Brasil, 2023).

Os acordos e concessões comerciais advindos da integração de vários setores aos ODS, tem estimulado a implantação de práticas da química verde a processos de produção. A Química verde é uma ciência relacionada ao meio ambiente que tem por objetivo advertir sobre os possiveis danos dos processos produtivos tradicionais, e contribuir com soluções inovadoras para processos industriais, visando a eficiência, prevenção de perigos, prevenção da poluição e substituição de compostos toxicos (WHITEKER, 2019). A integração entre o agronegócio, seus setores correlatos e a indústria química vem se tornando uma alternativa para a liderança em tecnologias sustentáveis no mercado mundial, e na implantação da bioeconomia e da economia circular. Assim, tecnologias emergentes de embalagens inovadoras, bioativas, de baixo custo e ecosustentáveis vem sendo propostas para incorporação no

agronegocio (COUTINHO et al., 2019).

Entre as embalagens emergentes para preservação de frutas na pós-colheita, as coberturas comestíveis vem se destacando. Polímeros naturais estão sendo considerados como alternativas aos materiais tradicionais, com foco em bioplásticos extraídos de rejeitos vegetais; embalagens de hidrogéis constituídas de polímeros biodegradáveis naturais também são uma opção, mas requerem formulação individual para cada tipo de alimento (LEYVA-JÍMENEZ, F. et al 2023).

A quitosana é um biopolimero, biodegradável, biocompatível, abundante, renovável, de baixo custo, capaz de formar gel e microesferas. Este polimero vem sendo estudado e empregado nos mais diversos ramos da inudstria de alimentos, como na confecção de embalagens biodegradáveis e comestíveis em frutas e queijos, como biocida, conservante para molhos, clarificador em sucos, conservante em vinho, no tratamento de água, como defensivo agrícola e compondo fertilizante, além de outras aplicações. Essas características da quitosana podem ser potencializadas com alterações químicas, e o emprego de nanotecnologia (EL KNIDRI et al., 2018; KUMAR et al., 2019; MUJTABA et al., 2018; YADAV et al., 2019).

Dentre as alterações químicas mais utilizadas na quitosana está a obtenção de sais de quitosana, com destaque para o cloridrato de quitosana, que apresenta forma mais hidrofílica que o acetato e a forma neutra da quitosana. O cloridrato de quitosana por ser hidrossolúvel e estável em pH biológico (pH 6-7) está sendo apresentado aos setores farmacêutico e de cosméticos como uma alternativa viavel a quitosana tradicional (soluvel em ácido fraco e estavel até pH abaixo de 6,0), alem de apresenta amplo expectro antimicrobiano (FORTUNATI et al., 2017; GE et al., 2018).

As nanopartículas de quitosana e seus derivados em alimentos tem intuito diversificado, desde melhoria na hidrofobicidade, continuidade, manuseabilidade e homogeneidade de coberturas comestíveis, manutenção de aroma e cor, principalmente quando aplicadas em frutos. Além disso, as formas de obtenção dessas nanopartículas pode variar de acordo com o pH, metodologia empregada, estrutura da quitosana e outras (KASHYAP; XIANG; HEIDEN, 2015; MELO et al., 2018; ZAKI et al., 2015).

Dessa forma, a utilização de coberturas comestíveis poliméricas a base de cloridrato de quitosana podem ser uma alternativa para minimizar o desperdício de frutas na fase pós-colheita. Estima-se que o agronegócio registra um percentual de perda, em todas as etapas de produção, de aproximado 14% dos alimentos

produzidos mundialmente (BALCI e TUNA, 2021). Dentre os principais fatores responsáveis por essas perdas, as alterações causadas por microrganismos se destacam, principalmente no pós-colheita de frutas, como a uva de mesa (*Vitis labrusca* L.), impactando negativamente nos setores financeiro e agrícola (BHANUSHREE et al., 2018; KANETIS; CHRISTODOULOU; IACOVIDES, 2017; SUN et al. 2018). Dentre os fungos encontrados frequentemente no pós-colheita de frutas, pode-se citar o *Botrytis cinerea, Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* (CALDERÓN et al., 2019; PITT, 2018; KASSEMEYER, 2017). Assim, a natureza das hortifrutícolas fazem delas a categoria mais afetada por perdas, requerendo então maior preocupação na proteção logística até o consumidor final (BALCI e TUNA, 2021).

Nesse contexto, a presente tese teve como objetivo obter coberturas comestiveis a base de nanoparticulas de cloridrato de quitosana fungica, verificar a ação antioxidante e antimicrobiana das coberturas, e usar como fruta teste uva de mesa (*Vitis labrusca* L.), para verificar o efeito protetor e curativo da cobertura frente a fungos fitopatógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇAO, CONSUMO E CONSERVAÇÃO DA UVA

O Brasil ocupa hoje o terceiro lugar dos países com maior produção de frutas (atrás da China e Índia), com estimativa de produção de 45 milhões de toneladas ao ano, onde 65% é destinado ao consumo interno e 35% para o mercado externo. No entanto, ocupa o 23º lugar no quesito exportação, devido a problemas infraestruturais, perdas durante colheita, pós-colheita, transporte, dimensão geográfica do país que por si dificulta o escoamento dessa produção, dentre outros (CAVALCANTI; DIAS, 2015; EMBRAPA, 2019b).

Dentre as principais frutas cultivadas no país, a uva vem ganhando destaque. A viticultura ocupa uma área aproximada de 78 mil hectares, espalhados do extremo sul ao norte. Em 2021 a produção superou 1,7 milhões de toneladas, e com perspectivas de crescimento nos anos seguintes. Deste volume, destina-se ao processamento cerca de 50%, originando sucos, vinhos e outros derivados, o restante sendo comercializado como uvas de mesa. O estado do Pernambuco apresentou uma produção estimada de 420 mil toneladas em 2021, quase que em sua totalidade do sertão, na região do Vale do São Francisco (ARATA; HAUSCHILD; SCKOKAI, 2017; EMBRAPA, 2019a; IBGE 2022).

Em termos gerais, a produção de uvas de mesa no Brasil pode ser dividida em dois: as uvas finas (*V*. *vinifera* L.) com sementes, sendo as principais os cultivares “Itália” (e suas mutações “Rubi”, “Benitaka” e “Brasil”) e a “Red Globe”, e as uvas finas sem sementes (“Thompson”, “Crimson” e “Sugraone”); e o outro grupo é das comuns ou rústicas *V. labrusca* L., cujos representantes principais são os cultivares “Niágara” e “Isabel” (COLOMBO; BATISTA; SABBAG, 2016; RITSCHEL; MAIA; SOUZA, 2018).

O consumo de uvas e seus derivados é crescente, uma vez que são fontes de vitaminas, minerais e fibras, além do fator nutricional, apresentam propriedades benéficas a saúde do consumidor, como a presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante, sequestrante de radicais livres e atividade protetora contra doenças cardiovasculares. A demanda pela fruta aumenta também a preocupação dos consumidores quanto a qualidade e segurança da mesma (GUERRA et al., 2016).

A uva é um fruto não-climatérico altamente perecível, devido a deterioração, perdas de peso e nutrientes durante o armazenamento. A deterioração das uvas pode

ocorrer tanto no pré quanto no pós-colheita, e pode ter origem física, fisiológica e/ou patológica. Uma forma de deterioração de ordem física é a desidratação da ráquis que pode resultar na perda de bagas. De origem fisiológica tem-se o escurecimento da casca durante maturação das uvas. E a principal causa de deterioração dessa fruta é de origem patológica, por infecção fúngica que pode ocorrer tanto no pré e pós-colheita, por ação dos fungos *A. niger,* R. *stolonifer* e *C. siamense* (ALI et al., 2016; TIAN et al., 2015).

O armazenamento de uvas em temperaturas mais elevados e clima úmido é difícil devido à ocorrência de vários fungos, causando diversas doenças no pós-colheita, como podridão mole, cinzenta, azul e antracnose. A deterioração dos frutos afeta negativamente a sua aparência e, consequentemente, seu valor de mercado, além de serem potenciais agentes transmissores de doenças devido a possível presença de algum patógeno humano (GUERRA 2016; SONKER; PANDEY; SINGH, 2016; SUN et al. 2018).

Tradicionalmente, no pós-colheita, esses fungos são controlados pelo uso de fungicidas sintéticos e tratamento térmico. No entanto, esses métodos físicos e químicos apresentam certas limitações, fazendo com que produtos biológicos e vegetais ativos sejam estudados por sua efetiva proteção fornecida as uvas, com atividade antifúngica, antibacteriana, antioxidante e propriedades bio-reguladoras, como ocorre com óleos essenciais, quitosana e outros (KARA et al., 2018; MELO et al., 2018; SONKER; PANDEY; SINGH, 2016).

Dentre os métodos físicos utilizados na conservação de uvas, pode-se citar o tratamento com água quente, onde se recomenda uma temperatura superior a 50 ºC, e posterior associação com armazenamento em temperatura de refrigeração. Outro método é a modificação da atmosfera de armazenamento dos frutos, embora não seja recomendada para uvas comerciais, pesquisadores demonstraram que o armazenamento em condições de baixa concentração de O_2 e elavada de CO_2, é eficaz na preservação de uvas, atuando na manutenção da firmeza, retardando a deterioração, reduzindo o escurecimento, atrasando e diminuindo a respiração da baga (SONKER; PANDEY; SINGH, 2016).

Já no pré-colheita, o controle desses microrganismos geralmente é feito pela aplicação de fungicidas nos campos de cultivo (também podem ser utilizados outros agentes antimicrobianos durante o armazenamento e processamento para formação de derivados como sucos e vinhos), no entanto, a eficácia dos mesmos e seus efeitos

adversos ao homem e meio ambiente como um todo está sendo questionadas. Assim, surge uma demanda por produtos naturais com eficácia antimicrobiana comprovada e que não apresentem os mesmos riscos que essas substâncias, como a quitosana e seus derivados (MELO et al., 2018; PETRICCIONE et al., 2018; SHARMA et al., 2017).

2.2 FUNGOS CONTAMINANTES NO PÓS-COLHEITA DA UVA

Durante o pós-colheita de frutas e legumes, muitos são os fatores contaminantes e deteriorantes dos mesmos, insetos, nematóides e microrganismos. Com destaque especial aos fungos pois compoêm o grupo que mais causam perdas econômicas ao setor agrícola. As alterações causadas pelos fungos nas uvas diminuem a vida de prateleira e apelo comercial do alimento. As alterações que se destacam são aquelas relacionadas ao aroma, cor, sabor, aspecto geral e textura. As bagas das uvas são, geralmente, as primeiras a apresentarem sinais visíveis de contaminação fúngica (DOPAZO et al., 2021; 2022).

Os principais gêneros contaminantes e deteriorantes de uvas são *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Penicillium.* Recentemente, outro gênero que tem causado preocupação ao setor agrícola é o *Colletotrichum*, principalmente na região do Vale do São Francisco, em Petrolina, Pernambuco. Além da deterioração das frutas, muitos desses fungos são potenciais agentes produtores de toxinas, como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, zearalenona, tricotecenos e ácido penicílico, que são metabólitos secundários frequentemente encontrados em alimentos contaminados por fungos. Muitas dessas micotoxinas são estáveis química e termicamente mesmo durante e após o processamento dos alimentos, com métodos que envolvem cozimento, fervura, forneamento, fritura e pasteurização (BATISTA et al., 2023; DOPAZO et al., 2021; GIRMA; SUALEH, 2022; QUINTIERI et al., 2022).

Algumas dessas micotoxinas são classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC) como cancerígenas, provavelmente cancerígenas e possivelmente cancerígenas para humanos. A ocratoxina A tem sido estudada com frequência devido seus efeitos nefrotóxicos, mutagênicos, teratogênicos, imunotóxicos e carcinogênicos. Daí a preocupação extra em evitar ou inibir a contaminação e proliferação desses agentes nos alimentos (COSTA; CERQUEIRA; GARDA-BUFFON, 2019; DOPAZO et al., 2021; GIRMA; SUALEH, 2022).

2.2.1 Aspergillus niger

O gênero *Aspergillus* corresponde a mais de 200 espécies diferentes que se reproduzem exclusivamente por via assexual, incluindo espécies amplamente utilizadas em processos fermentativos, principalmente no oriente, como o *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. awamori*. São capazes de produzir enzimas e ácidos orgânicos uteis para indústria de alimentos que, ao longo do tempo os incluiu na lista de Geralmente Reconhecidos como Seguros (Generally Recognized as Safe - GRAS). Outras espécies são conhecidas por produzirem metabólitos secundários, como aflatoxina e ocratoxina, que são prejudiciais para humanos, animais e/ou plantas, como linhagens do mesmo *A. niger*, *A. flavus* e *A. parasiticus* (MACHIDA; GOMI, 2010).

A classificação taxonômica desse gênero tem mudado com frequência, pois processos mais específicos são utilizados para fazer o mapeamento genético, molecular e morfológico desses microrganismos para diferenciá-los, uma vez que alguns são tão semelhantes que métodos antigos não os identificavam. O *A. niger* está na seção Nigri, que corresponde a um grupo conhecido genericamente como: agregado *Aspergillus niger*. Este grupo é composto atualmente por 15 espécies morfologicamente indistintas, que são: *A. tubingensis, A. niger, A. welwitschiae, A. acidus, A. foetidus, A. kawachii, A. lacticoffeatus, A. luchuensis, A. brasiliensis, A. coreanus, A. costaricaensis, A. eucalypticola, A. neoniger, A. piperis e A. vadensis* (GIL-SERNA et al., 2019).

Atualmente a espécie *A. niger* tem por classificação taxonômica o reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae e género *Aspergillus*. É um fungo filamentoso formador de esporos, presente no solo e frequentemente encontrado em produtos orgânicos em decomposição, seus conídios contêm esporos que podem ser propagados pelo ar e água. É conhecido por causar a doença chamada de “mofo preto” em frutras, que é uma das principais causas de deterioração de uvas durante a colheita e armazenamento. Algumas espécies agregadas de *A. niger* são consideradas produtoras de ocratoxina A em alimentos, principalmente em uvas e derivados. Essa substância é extremamente tóxica para humanos e animais, com potencial cancerígeno (GIL-SERNA et al., 2018; PITT, 2018; TIAN et al., 2015; WANG et al., 2015).

O controle primário do *A. niger* em frutas geralmente é feito durante o cultivo

com aplicação de fungicidas. No entanto, estudos apontam que a biossíntese de micotoxinas pode ser estimulada quando o fungo se encontra em situação de estresse, como durante aplicação de fungicidas em doses subletais. Esses estudos relatam que, apesar de haver certo controle no crescimento do microrganismo, sua produção de micotoxinas se eleva. Tornando-se necessário o conhecimento detalhado da atividade do agente antimicrobiano e sua dose efetiva (LAAZIZ et al., 2018; ZOUHAIR et al., 2014).

2.3 *Rhizopus stolonifer*

O *Rhizopus* é um gênero de fungos zigomicetos saprótróficos, caracterizado pela presença de rizóides na base dos esporangióforos, basicamente onipresente no solo, excrementos e vegetação em decomposição. Atualmente 10 espécies estão inclusas nesse gênero (GRYGANSKYI et al., 2018; LEVETIN et al., 2016).

A classificação taxonômica do *R. stolonifer* tem sofrido alterações ao longo do tempo, atualmente está definida como: reino Fungi, filo Zygomycota, subfilo Mucoromycotina, ordem Mucorales, família Mucoraceae, género *Rhizopus*. A espécie *R. stolonifer* é vulgarmente conhecida como “mofo preto do pão”, sendo a espécie mais conhecida do gênero e comumente associada a alergias. Quando o micélio é jovem sua cor é esbranquiçada, tornando-se marrom-acinzentada devido à presença abundante de esporângios pretos (KASSEMEYER, 2017; LEVETIN et al., 2016).

Existe interesse especial nesse gênero, uma vez que algumas espécies podem ser utilizadas em biofermentação industrial e na indústria de alimentos, e outras são patógenos humanos, animais e/ou plantas. Assim há elevado interesse acadêmico como modelo de estudos sobre a biologia celular e molecular de fungos (GRYGANSKYI et al., 2018).

Esse fungo atua, geralmente, em frutas e vegetais maduros (como uvas de mesa, morango, tomate e pepino), que são mais propensos a ferimentos e possuem maior teor de açúcar, preferencialmente em climas quentes e úmidos, não sendo frequente na vinicultura em climas frios. A infecção desse fungo em uvas não se restringe a baga, em clima úmido, ele pode se espalhar e deteriorar o cacho inteiro. Geralmente causa podridão mole durante transporte e armazenamento (BAGGIO et al., 2016; KASSEMEYER, 2017).

Por não possuir enzimas específicas, como esterases, que facilitem sua

penetração, a infecção ocorre majoritariamente através de ferimentos na casca das frutas. Após 2-3 dias da infecção, os frutos se apresentam macios e aquosos liberando líquido com odor ácido ou fermentado. Em condições favoráveis, um dia após os primeiros sintomas pode se observar um rápido crescimento micelial na superfície da fruta infectada (BAGGIO et al., 2016).

Assim como demais bolores, o controle primário desse microrganismo é feito pela aplicação de produtos químicos sintéticos durante o cultivo, no entanto, alguns desses fungicidas estão sendo proibidos em diversos países, por seus efeitos adversos ao homem e meio ambiente, além de estarem suspeitos de contribuírem para o desenvolvimento de resistência do microrganismo, propiciando estudos com novos antimicrobianos, como a quitosana e seus derivados (MELO et al., 2018; ZHOU et al., 2018).

2.4 Colletotrichum siamense

O fungo *Colletotrichum siamense* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Phyllachorales, Família Glomerellaceae, Gênero *Glomerella* (*Colletotrichum*). Sob microscopia óptica a visualização do *C. siamense* apresenta morfologia de micélio acinzentado, pálido amarelado a rosado, conídios com 14,6 ± 0,7 µm de comprimento, 4,5 ± 0,4 µm de largura e formato cilíndrico, e sua extremidade apresenta ligeiro afilamento, com taxa de crescimento de 7,8 mm por dia (CAO et al., 2021; QUADROS et al., 2015; SILVA et al., 2019; SHARMA; SHENOY, 2013).

As espécies do gênero *Colletotrichum* têm sido amplamente estudadas e, com frequência, erroneamente classificadas, devido aos poucos caracteres diferenciadores de sua morfologia. É um gênero que engloba espécies epífitas, saprofíticas, endofíticas e com atividade fitopatogênica diversa. Apresentam coloração variada, do cinza-escuro ao branco-gelo (CAO et al., 2021; QUADROS et al., 2015; SILVA et al., 2019).

As espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose são particularmente importantes no pós-colheita de mais de 60 frutas e vegetais em regiões tropicais e subtropicais. Sendo o oitavo gênero de fitopatógenos mais importante do mundo. Dentre elas está o *C. siamense,* frequentemente causador de perdas econômicas no pós-colheita de bananas, abacates, morango, uvas, lichia, variedades de pimentas,

caqui, mandioca, inhame e outras (QUADROS et al., 2015; NIEV IEROWSKI et al., 2021; SILVA et al., 2019 (ZHANG et al., 2020).

O fungo pode permanecer quiescente por um longo período até que o as condições ambientais estejam favoráveis ao seu desenvolvimento, sobrevivendo em tecidos vivos ou mortos presentes no solo. As chuvas e águas de irrigação são os principais agentes de dispersão dos esporos. A antracnose pode atingir tanto frutas, quanto folhas, galhos, caules e sementes. Apresentando lesões redondas marrons que, com a progressão da doença tornam-se marrom-escuro ou pretas. A infecção pode ocorrer antes da colheita e, com o amadurecimento dos frutos, as lesões se espalham no epicarpo e as manchas tornam-se mais escuras e coalescem, podendo causar rachaduras e apodrecimento total. Em estágios avançados é possível observar a presença de conídios de cor salmão (LIMA; LIMA, 2015; SOARES et al., 2020).

Devido à gravidade da doença, em muitos locais já são adotadas medidas preventivas e técnicas de manejo durante o pré e pós-colheita. Dentre elas pode-se citar: utilização de refrigeração, embalagens com atmosfera modificada, revestimentos comestíveis, aplicação de radiação ultravioleta e gama, dentre outras (BALENDRES; BENGOA, 2019; MELO et al., 2020b; NAJAFABADI; ALI; BARZEGAR, 2017).

2.5 QUITOSANA

A quitosana é derivado da desacetilação da quitina, que é segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, em primeiro lugar está a celulose. A estrutura da quitina é formada por ligações lineares do tipo β-(1-4) de unidades de N-acetilglicosamina (2-acetamido-2-deoxi-D-glicose), com elevado grau de acetilação. Sua estrutura é semelhante à da celulose, diferindo no radical do carbono dois, onde na celulose está uma hidroxila e na quitina um grupo acetamino. A quitina está presente no exoesqueleto de artrópodes e insetos, e é o principal polímero estrutural na parede celular de fungos (AHSAN et al., 2018; CRINI, 2019).

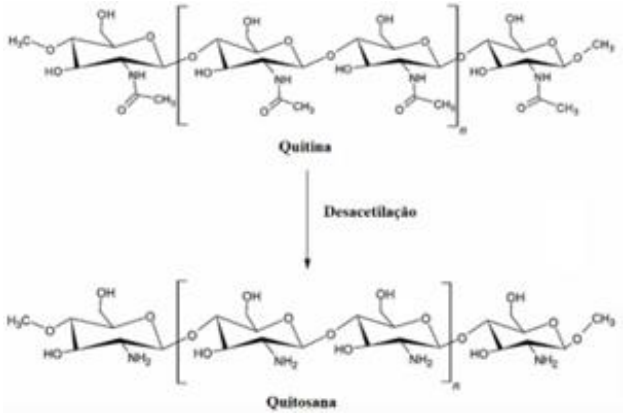
O processo de obtenção da quitina de crustáceos parte da separação dela dos outros componentes da carapaça, num processo químico de desmineralização e desproteinização com, por exemplo, soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), seguida dos processos de desodorização e descoloração com permanganato de potássio ($KMnO_4$) e ácido oxálico ($H_2C_2O_4$) (CHANG; CHIN; TSAI,

2018; FRANCESCHINIS; CASTELLÓ; GALDI, 2018).

O principal derivado desacetilação alcalina da quitina é o aminopolissacarídeo quitosana (Figura 1). A quitosana é composta por unidades de N-acetil-D-glicosamina conectadas por ligações do tipo β-(1→4), pequenas quantidades podem ser encontradas na parede celular de fungos (ordem *Mucorales, classe Zygomycetes*), no entanto, sua obtenção é majoritariamente por remoção parcial de grupos acetamidas das moléculas de quitina, onde íons acetato e um grupo –NH2 são produzidos por hidrólise do grupo acetamida (YADAV et al., 2019).

Quando a desacetilação ultrapassa 50% suas moléculas são então chamadas de quitosana e não mais quitina. Tonam-se solúveis em soluções de ácidos inorgânicos e pode ser diluída em ácidos orgânicos com pH inferior a 6, sendo insolúvel em água, ácidos concentrados, acetona, álcool e álcalis (EL KNIDRI et al., 2018). O grau de desacetilação influencia diretamente suas propriedades químicas (flexibilidade, condutividade, porosidade, solubilidade, área superficial, viscosidade e resistência à tração) e biológicas (biodisponibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, antioxidante e intensificador da adsorção), dependendo das condições do processo (YADAV et al., 2019).

Figura 1 - Desacetilação da quitina para obtenção de quitosana.



Fonte: Adaptado de Yadav et al., 2019.

Devido sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo, capacidade de formação de gel e microesferas, a quitosana e seus derivados têm sido utilizados em diversos setores industriais, como o ramo farmacêutico, cosmético, têxtil, alimentar e agrícola. No setor alimentar, a quitosana tem sido utilizada como embalagem biodegradável e comestível para queijos e frutas,

fungicida, tratamento de água, defensivo agrícola, adubo, bactericida e outras (EL KNIDRI et al., 2018; KUMAR et al., 2019; MUJTABA et al., 2018; YADAV et al., 2019).

A utilização da quitosana e seus derivados como substitutos de sanitizantes químicos é de interesse de diversos setores, uma vez que se pode obter esse produto com a utilização de rejeitos que seriam descartados no meio ambiente, como cascas de camarão, caranguejo e lagosta para síntese da quitosana de crustáceos, e milhocina, manipueira, cascas de mamão, entre outros para quitosana microbiológica/fúngica. Atendendo um mercado que demanda uma economia de base biológica e sustentável (BERGER et al., 2018; FORTUNATI et al., 2017; SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2016).

No entanto, a quantidade de produtos químicos, efluentes tóxicos resultantes, tempo necessário para a extração, variabilidade e pureza da quitosana extraída de resíduos de crustáceos, exigiu o uso de meios alternativos de produção de quitosana, seja pela troca para quitosana fúngica ou por meios modernos de extração. Têm obtido destaque nas últimas décadas pesquisas e produtos que utilizam a quitosana de origem fúngica/microbiológica, uma vez que a extração da quitosana é mais simples, rápida e menos onerosa ao meio ambiente que o método utilizado para extração da quitosana de crustáceos. Tonando os fungos uma alternativa viável e promissora para obtenção de quitosana (SEBASTIAN; ROUISSI; BRAR, 2020).

A utilização de um método biológico (também chamada de química verde) para extração de quitosana utilizando enzimas e/ou microrganismos é visto como mais eficaz e ecológico do que os métodos que utilizam produtos químicos. Enzimas como tripsina e alcalase são utilizadas na desproteinização, seguida da desmineralização com ácido lático. Microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa, Lactobacillus* sp*., Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*, também podem ser utilizados na desproteinização e desmineralização com graus variáveis de resultados, de 60% a 95% e 70% a 95%, respectivamente (SEBASTIAN; ROUISSI; BRAR, 2020).

Além de todos esses fatores relacionados à produção da quitosana, tem-se ainda o potencial alergênico, uma vez que a quitosana de crustáceos não é indicada para aplicação geral em alimentos (como filme de revestimento, por exemplo) uma vez que residuos de proteínas podem estar presentes na quitosana e o consumo do alimento não será recomendado. Assim sendo, a quitosana de origem fúngica torna-se mais indicada, uma vez que não possui tais derivados protéicos com potencial alergênico (COIMBRA et al., 2023; SEBASTIAN; ROUISSI; BRAR, 2020).

O uso da quitosana pode ser ampliado com modificações químicas em sua estrutura, uma vez que apresenta grupos hidroxilas e aminos disponíveis para reações, como hidroxilação, esterificação, carboxilação, alquilação e acilação. Nesse processo altera-se a estrutura da quitosana formando seus derivados que, em geral, possuem melhor solubilidade, além de propriedades biológicas e físico-químicas aprimoradas. Dentre os derivados da quitosana pode-se citar o carboximetil quitosana, quitosana N-alquilada, quitosana N-succinilada, quitosana sulfatada, hidroxietil-quitosana, quitosana na forma neutra e cloridrato de quitosana (GE et al., 2018; SILVA et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

Devido à baixa solubilidade da quitosana em meio neutro, estratégias para redução do peso molecular são utilizadas para aumentar a solubilidade da mesma, por métodos enzimáticos, físicos e químicos. A formação de sais em meio ácido com o grupo amino da quitosana também melhora a solubilidade aquosa deste polímero (MINH et al., 2019).

O cloridrato de quitosana é um derivado fracamente solúvel em água, com carga superficial positiva, com grau de desacetilação entre 70-95% e teor de cloretos entre 10-20%, que pode ser utilizada para elaboração de nanopartículas por gelificação iônica (GE et al., 2018; YAN et al., 2018). Esse derivado mantém as propriedades biológicas da quitosana, apresentando vantagem da não necessidade de utilização de soluções ácidas para sua dissolução. Fato de importância quando o objetivo é utilizá-lo como embalagem comestível, uma vez que a presença do ácido pode deixar sabor e odor residual, alterando as características organolépticas do alimento (FORTUNATI et al., 2017; MELO et al., 2018).

Em estudo realizado por Seyfarth et al., (2008), foi observado que o cloridrato de quitosana tanto de baixo quanto de alto pelo molecular foram efetivos em inibir o crescimento *in vitro* de *Candida albicans, C. krusei* e *C. glabrata*. No entanto, os autores relatam uma atividade antimicrobiana dependente da concentração, e que quanto menor o peso molecular, menor a atividade antimicrobiana.

O cloridrato de quitosana foi testado como conservante no pós-colheita de kiwis e alface romana. O filme formado por esse derivado da quitosana se apresentou fino e bem distribuído nos alimentos. Testes de atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* foram realizados com *B. cinerea* e demonstraram o retardo e/ou inibição do desenvolvimento desse fungo em ambos experimentos a uma concentração de 0,1% prolongando a vida de prateleira dos kiwis e alface romana (FORTUNATI et al., 2017).

As formas de utilização da quitosana e seus derivados em alimentos já estão sendo testadas para além do pós-colheita. Em estudo realizado por He et al. (2018) foi testada a pulverização de oligossacarídeos de quitosana (derivado da hidrólise da quitosana) durante o cultivo de morangos. Foi observado que os frutos tratados com esse derivado da quitosana apresentaram resultados positivos em relação a viscosidade, firmeza, lignina, vitamina C, atividade antioxidante e fenol total. Além de estender a vida de prateleira dos morangos. O estudo conclui que esses oligossacarídeos de quitosana podem substituir os defensivos agrícolas tradicionais, uma vez que são atóxicos e se apresentam com base numa economia ecológica/sustentável.

Embora as aplicações da quitosana e seus derivados em diversos setores já estejam bem fundamentadas, pesquisas com esse biopolímero estão sendo intensificadas em busca de novas funcionalidades, principalmente em dimensões nano. Este interesse tem por base o conceito de que ao reduzir o tamanho da partícula (nano), o produto apresentará novas características e, consequentemente, novas aplicações (DIVYA; JISHA, 2018).

2.6 NANOTECNOLOGIA

A síntese de nanopartículas é de grande interesse de vários setores, devido propriedades incomuns de ordem óptica, fotoeletroquímica, eletrônica e química. Diversos processos químicos, físicos e biológicos podem ser utilizados na elaboração de nanopartículas das mais variadas origens. Essas partículas apresentam funcionalidades únicas, diferindo do material que lhe deu origem. A classificação do tamanho das partículas ainda precisa ser melhor estabelecida, autores consideram nanopartículas aquelas com dimensões entre 1 e 100 nm (nanômetros), outros aceitam até escala de 1000 nm (DIVYA; JISHA, 2018; HE et al., 2017; PAGELS; PRUD'HOMME, 2015; ZAKI et al., 2015).

No estudo da nanotecnologia existe um segmento que merece destaque, a área de nanobiotecnologia, que está voltada para compreensão de atividades biológicas e físico-químicas de biomoléculas, fazendo a ligação entre ciências biológicas e de materiais (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). Dentro desta área pode-se citar a utilização da quitosana na elaboração de nanopartículas, que podem ser utilizadas com as mais variadas funções em pesquisas do setor de alimentos, medicina,

cosméticos, farmacêutico e outros (JAIN; KUMAR; DUTTA, 2015; MELO et al., 2018; YEMISC et al., 2018).

A área superficial por unidade de massa dessas nanopartículas é muito maior se comparada as estruturas na dimensão macro, fazendo com que estejam mais disponíveis para interagir com outras moléculas, sistemas, células, etc. No entanto, devido a essas mesmas propriedades, as nanopartículas podem interagir com componentes celulares e subcelulares, apresentando consequências danosas, como estresse oxidativo e respostas inflamatórias, e possíveis quadros tóxicos (JAIN; MEHRA; JAIN, 2015).

O potencial das nanopartículas depende do tipo de material, sua concentração, tamanho, formato das partículas e do local onde será utilizada. Essas partículas podem ser elaboradas com o objetivo de o próprio material ser utilizado em alguma aplicação específica (ex.: nanopartículas de quitosana), como também para proteger algum outro material (ex.: fármacos, peptídeos, óleos essenciais) (AMINABHAVI; DHARUPANEEDI; MORE, 2017; MELO et al., 2018; SOTELO-BOYÁS et al., 2017; YEMISC et al., 2018; ZAKI et al., 2015).

2.6.1 Nanotecnologia aplicada a quitosana

O uso da quitosana para elaboração de nanopartículas é largamente estudado e existem metodologias diversas para elaboração dessas nanopartículas. Dentre essas metodologias pode-se citar: gelificação iônica, difusão de solvente de emulsificação, microemulsão, micela reversa e complexo polieletrolítico. Com destaque para a gelificação iônica por dispensar a utilização de solventes orgânicos e surfactantes (AHSAN et al., 2018; DIVYA; JISHA, 2018).

A gelificação iônica é comumente utilizada na elaboração de nanopartículas de quitosana devido a sua simplicidade. Descrita pela primeira vez em 1997 por Calvo e colaboradores, tem por base que, após a dissolução da quitosana em solução ácida, se adiciona o agente reticulante sob agitação constante à temperatura ambiente. O tamanho, formato e carga superficial dessas partículas pode ser alterado/otimizado com modificações no tipo de quitosana, concentração da solução ácida utilizada na diluição da quitosana, temperatura, velocidade de agitação, tipo e concentração do agente reticulante (DIVYA; JISHA, 2018; KASHYAP; XIANG; HEIDEN, 2015; ZAKI et al., 2015).

Essa técnica consiste na interação eletrostática do grupo amina da quitosana com um grupo de carga negativa, como o tripolifosfato de sódio (TPP), que ao entrar em contato com a quitosana causa sua gelificação iônica formando partículas esféricas que precipitam. Sugere-se que todos os grupos iônicos do TPP interagem com os grupamentos amina da quitosana. O pareamento de íons entre TPP(-) e quitosana(+) proporcionam as nanopartículas de quitosana um caráter anfotérico, ou seja, capaz de reagir com característica ácida ou básica. As nanopartículas formadas por esse método são consideradas estáveis, atóxicas e com alta carga superficial positiva (KASHYAP; XIANG; HEIDEN, 2015).

Das vantagens dessa técnica pode-se citar que o TPP é considerado um agente atóxico e o mais utilizado, e que a reação para formação das nanopartículas ocorre em meio aquoso, dispensando o uso de solventes orgânicos tóxicos, como o glutaraldeido, possibilitando a utilização das nanopartículas de quitosana em alimentos. Além de permitir a elaboração de partículas reproduzíveis em escala nanométrica e semelhantes em distribuição de tamanho (BUGNICOURT; LADAVIERE, 2016).

Em trabalho realizado por Melo et al. (2018), os autores elaboraram nanopartículas de quitosana com a técnica de gelificação iônica e as utilizaram como cobertura comestível em uvas de mesa. As nanopartículas elaboradas retardaram o amadurecimento das uvas, com melhor manutenção dos atributos acidez, umidade e sólidos solúveis. Apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Além de não influenciarem negativamente no aspecto sensorial geral das uvas. Os autores concluem que a utilização dessas nanopartículas se apresenta como uma alternativa promissora na conservação de uvas de mesa no pós-colheita.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir coberturas comestíveis a base de gel de cloridrato de quitosana e nanopartículas de cloridrato de quitosana fúngica para controle de infecções fúngicas pós-colheita de uva de mesa (*Vitis labrusca* L.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a obtenção e caracterizar as nanopartículas de cloridrato de quitosana fungica;
- Caracterizar as coberturas comestíveis de quitosana na forma de gel, da nanoparticula de cloridrato de quitosana, e da associação do gel com nanopartículas de cloridrato de quitosana;
- Determinar a biocompatibilidade e toxicidade das coberturas comestíveis obtidas;
- Determinar a ação antioxidante e antimicrobiana das coberturas comestíveis;
- Verificar as alterações promovidas pelas coberturas comestiveis obtidas no crescimento miceliar, e na ultraestrutura de fungos fitopatogenicos;
- Verificar o efeito protetor e curativo das coberturas comestíveis obtidas frente a fungos fitopatogenos, tendo como fruta modelo uva de mesa (*Vitis labrusca* L.)

4 HIPÓTESE

Quitosana e seus derivados são polímeros que formam gel, que podem ser utilizados para preparo de coberturas comestíveis, devido a sua viscosidade, e a presença de grupos aminas protonados e grupos acetil que reagem formando uma rede polimérica. Cloridrato de quitosana é um derivado hidrossolúvel da quitosana que, além dos grupos aminas protonados, apresenta cloreto que por ser um halogênio atua amplificando a ação antimicrobiana e antioxidante do cloridrato de quitosana. Na forma de nanopartículas o cloridrato de quitosana apresenta maior área superficial, o que confere melhor interação com a parede celular microbiana e a permite a penetração no interior de citoplasmas possibiitando alteração na sintese protéica ou inibição enzimática. Assim, tais moléculas influenciarão no crescimento de fungos e ocasionarão alterações estruturais a nível de micélio, hifas e esporos. Devido ao amplo espectro de ação da quitosana e do cloridrato de quitosana, as coberturas comestíveis obtidas apresentarão ação protetora e curativa em uvas de mesas infectadas por fungos fitopatógenos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As uvas (*V. labrusca* L.) foram adquiridas no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA/PE) e selecionadas de acordo com o tamanho, cor, ausência de infecções visíveis e danos mecânicos.

A quitosana fungica de baixo peso molar, extraida da biomassa de *Aspergillus niger não* geneticamente modificado, e não produtor de micotoxina, foi adquirida da empresa ChiBio Biotech Co.,Ltd (Qingdao, China). Todas as demais substâncias foram adquiridas de fontes comerciais.

As cepas dos fungos fitopatogênicos (*Rhizopus stolonifer* URM 3728 e *Aspergillus niger* URM 7282) utilizadas nos testes antimicrobianos pertencem a coleção de cultura da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), centro de Ciências Biológicas. A cepa do fungo *Colletotrichum siamense* (CMM 4077) foi obtida da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profa. Maria Menezes” (Universidade Federal Rural de Pernambuco). As cepas fungicas foram mantidas em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) e estocadas sob refrigeração (5ºC).

5.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO CLORIDRATO DE QUITOSANA E DAS NANOPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA

O cloridrato de quitosana foi obtido por dissolução de 1,0 g de quitosana microbiologica de baixo peso molar em 100 mL de ácido acético 1 %, e colocado sob agitação contínua durante 18 hs. Após este período a solução obtida foi filtrada à vácuo em papel de filtro da VETEC com porosidade de 0.45 µm. Em seguida realizou-se diálise em membrana de celofane com limite de exclusão de 12.000-14.000 Dalton por dois períodos consecutivos de 36 hs. O primeiro período, contra solução aquosa de NaCl 0,2mol/L e o segundo, contra água deionizada, seguindo a metodologia proposta por Signini e Campana Filho (1998). Logo após, esse gel de cloridrato de quitosana foi submetido a liofilização e armazenado para posteriores análises.

O cloridrato de quitosana liofilizado, foi então submetido ao processo de formação das nanopartículas. Conforme a **tabela 1**, foram avaliadas diversas concentrações e proporções entre o cloridrato de quitosana e o TPP para formação das nanopartículas de cloridrato de quitosana. O pH também foi uma variável considerada durante o preparo. Estabelecendo alguns valores para teste e obtenção

das melhores formulações, das quais algumas foram avaliadas em equipamento Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK).

Tabela 1 - Composição das formulações para elaboração das nanopartículas do cloridrato de quitosana microbiologica por gelatinização ionotrópica, tendo como variantes pH, percentual de TPP, de cloridrato de quitosana e da proporção entre cloridrato de quitosana e o TPP.

Parâmetro		Níveis	
pH	4	4,5	5
TPP %	0,1	0,5	1
CQ %	1	1,5	2
CQ:TPP	1:1	2:1	3:1

O cloridrato de quitosana liofilizado foi suspenso em água Milli-Q, colocado sob agitação magnética em temperatura ambiente, e então, com auxílio de uma bomba peristáltica (Atlas Syringe Pump), o TPP foi gotejado, a uma velocidade de 0,3mL/min, para formação das nanopartículas, permanecendo sob agitação por 60min para estabilização das nanopartículas, segundo metodologia adaptada (MELO et al., 2020a). Foi selecionada para análises subsequentes a formulação de nanopartículas de cloridrato de quitosana que apresentou um potencial zeta ≥30mV, PDI < 0.5 e o menor tamanho.

Para caracterização do cloridrato de quitosana foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho em um A estabilidade térmica foi avaliada pelas análises termogravimétricas (TGA) em um analisador térmico TGA Q500 V20.13 e por Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry - DSC) utilizando o equipamento um DSC Q20, segundo metodologia proposta por Hadidi et al., (2020).

As nanopartículas de cloridrato de quitosana obtidas foram caracterizadas por análise do tamanho médio das partículas por espalhamento dinâmico de luz (Dynamic light scattering - DLS), Potencial Zeta e índice de polidispersão (PDI) usando o Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK), Espectroscopia na região do infravermelho em um espectrofotômetro BRUKER Mod. IFS 66. Além das análises de perfil térmico TGA e DSC.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CLORIDRATO DE QUITOSANA E DAS NANOPARTICULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA

A atividade antioxidante do cloridrato de quitosana e das nanopartículas cloridrato de quitosana-TPP (NPCl) foi determinada por três métodos, DPPH, ABTS e FRAP. Anteriormente à execução dos procedimentos, o cloridrato de quitosana, bem como as nanoparticulas foram diluídos/suspendidas em água destilada estéril, ambos a 10mg/mL, tendo seus pH ajustados para 6,0 com hidróxido de sódio 1%.

5.2.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade de sequestro do radical DPPH foi analisada segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Uma alíquota de 100 µL das substâncias teste foi adicionada a 3,9 mL da solução metanólica de DPPH 60 µmol/L e mantida protegida da luz por 30 minutos. A absorbância (Abs) foi medida em espectrofotômetro UV/Vis (Agilent, Varian® 50 Bio), à 515 nm. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em percentual de inibição do radical DPPH.

5.2.2 Método ABTS (2,2"-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

A capacidade de captura do radical 2,2"-azino-bis (3-etilbenzenotiazolina- 6-sulfônico) (ABTS) foi avaliada segundo Granato; Nunes (2017). Inicialmente, foi preparada uma solução de ABTS 7mM, à qual foi adicionada uma solução de persulfato de potássio a 2,45 mM. A mistura foi mantida a temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas, para formação do radical ABTS. No momento da análise, essa solução foi diluída em etanol, tendo sua absorbância medida à 734 nm. Uma alíquota de 30 µL de cada substância teste foi adicionada à 3 mL da solução ABTS. Após 6 minutos de incubação no escuro, as absorbâncias das amostras foram analisadas. Uma curva padrão foi plotada a partir de diferentes concentrações de Trolox (2-200 µmol.L-1) e os resultados foram expressos em µmol de equivalente de Trolox por g de substância teste (µmol TE.g-1).

5.2.3 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Determinou-se o potencial antioxidante total das amostras testes através do poder de redução do ferro (FRAP), de acordo com o método apresentado por Granato; Nunes (2017). 90 µL de cada amostra teste foi adicionada a 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, sob o abrigo de luz. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho maria a 37ºC por 30 minutos, seguida de análise a 595 nm. Uma curva padrão foi plotada a partir da mistura de 90 µL de solução de sulfato ferroso (0-2000 µM), 270 µL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP. Os resultados foram expressos em µmol de sulfato ferroso por grama de óleo (µmol FeSO4.g-1).

5.3 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE MTT

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (SANTOS, et al., 2012). As linhagens celulares HCT116 (Carcinoma colorretal humano), HL-60 (Leucemia promielocítica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), L929 (fibroblasto de camundongos) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongos) foram mantidas em meio de cultura contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37ºC em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO_2.

As células HCT116, MCF-7, L929 e RAW 264.7 (10^5 células/mL) e HL-60 (3 x 10^5 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Após esse período, 10µL das soluções foram adicionados aos poços na concentração final de 50µg/mL para o gel (10mg/mL) pH 6,4, nanopartículas (10mg/mL) pH 7,4 e gel + nanopartículas (10mg/mL) pH 7,4. O fármaco doxorrubicina (10µg/mL) foi utilizado como padrão. Após 72h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5mg/mL) e depois de 3h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e o percentual de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 7.0 demo. A avaliação da citotoxidade foi

feita de acordo com a escala proposta por Rodrigues et al. (2014): 95 - 100% de inibição celular – citotóxica; 70 - 90% de inibição celular - citotoxicidade moderada e < 50% de inibição celular – sem citotoxicidade.

5.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO PELO MÉTODO HET-CAM

O potencial de irritação foi realizado através do teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha fecundado – HET-CAM para as substâncias testes (quitosana fúngica, quitosana de camarão, cloridrato de quitosana, quitosana-frutose-reação de Maillard, óleo da semente de maracujá, nanopartículas de quitosana-goma arábica e de cloridrato de quitosana goma arábica, com e sem encapsulação do óleo da semente de maracujá). As substâncias de controle negativo e positivo foram solução salina 0,9% e lauril sulfato de sódio 1%, respectivamente. O potencial de irritação (PI) foi determinado pela observação da membrana corioalantóide, durante 5 minutos (300 segundos) de ocorrência de efeitos irritantes (hemorragia, coagulação e vasoconstricção) (**Equação**).

$$PI= \frac{(301- hemorrhage)5}{300} + \frac{(301-\text{vasoconstriction})7}{300} + \frac{(301-coagulation)9}{300} \qquad \textbf{Equação}$$

Após quantificação, as amostras foram classificadas como: não irritante (0-0,9); ligeiramente irritante (1-4,7); irritação moderada (5- 8,9); irritação grave/severa (9-21). Todas as substâncias foram aplicadas cinco vezes (FREIRE et al., 2015).

5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) das substâncias estudadas frente aos fungos testes (*A. Niger, R. stolonifer* e *C*. *siamense*) utilizou-se a técnica da macrodiluição. Inicialmente, os fungos foram cultivados em meio ágar batata dextrose (Potato Dextrose Agar - PDA) (Kasvi, Brasil) a 25ºC ± 3ºC por 7 dias para suficiente esporulação. Os esporos fúngicos foram coletados por swab e suspensos em solução salina 0,9% estéril. O número de esporos foi padronizado a 10^7 esporos/mL após contagem em hematocitômetro. Tubos de ensaio contendo 2mL de caldo Sabouraud estéril (Kasvi, Brasil) foram adicionados de 2,5mL das soluções das substâncias teste em diferentes concentrações (0,0 a 12mg/mL), e então, 0,5mL dos

esporos fúngicos foi inoculado, para obtenção de uma concentração final de 10^6 esporos/mL em 5mL (volume final). Os tubos foram incubados a 25ºC ± 3ºC por 7 dias ou até o crescimento visível do tubo controle (sem a substância teste). A CIM foi considerada como sendo a menor concentração da substância teste capaz de inibir o crescimento fúngico visível (MELO et al., 2020b).

5.6 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTES SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL FÚNGICO

A inibição do crescimento micelial radial foi determinada pela técnica do envenenamento do substrato de crescimento (diluição em meio sólido). Foram utilizadas as concentrações das substâncias testes na CIM/2, CIM e 2xCIM, frente aos fungos fitopatogênicos. Para realização da análise, um disco de 3 mm contendo micélios de cada isolado fúngico foi retirado de uma colônia com sete dias de cultivo em Ágar Batata Dextrose (ABD) a 25 ºC, e foi colocada no centro de uma placa de Petri com ABD adicionado das substâncias testes em diferentes concentrações (CIM/2, CIM, e 2xCIM) e incubada a 25 ºC. Sistemas contendo ABD sem adição de substância teste foram testados similarmente como controles.

Os valores do ICM% das substâncias testes (cloridrato de quitosana, nanoparticulas de cloridrato de quitosana-TPP, e a junção de ambos), nas concentrações CIM/2, CIM, e 2xCIM, estão presentes na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Distribuição das substâncias testes utilizadas para obtenção das coberturas comestíveis, com suas respectivas concentrações, com base na concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL: metade (CIM/2), CIM, e dobro (2xCIM), a serem avaliadas na inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Substâncias testes: gel de cloridrato de quitosana (GCQ), nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPCQ), e a junção de ambas substâncias (GCQ+NPCQ).

Substâncias testes		**Fungos fitopatogênicos**		
		C. siamense	***R. stolonifer***	***A. niger***
GCQ	CIM/2	4,0	3,0	4,0
	CIM	8,0	6,0	8,0
	2xCIM	12*	12	12*
NPCQ	CIM/2	2,0	1,5	2,0
	CIM	4,0	3,0	4,0
	2xCIM	8,0	6,0	8,0
QCl+NPCQ	CIM/2	2,0	3,0	3,0
	CIM	4,0	6,0	6,0
	2xCIM	2,0	3,0	3,0

O crescimento micelial radial foi medido diariamente até que a placa contendo o controle negativo estivesse completamente coberta de micélios. O diâmetro de crescimento micelial radial (mm) de cada cepa foi aferido em duas direções perpendiculares para obtenção do diâmetro médio da colônia. O percentual de inibição do crescimento micelial (ICM%) foi calculado utilizando a **Equação**, onde C é o diâmetro da colônia no ensaio controle e T é o diâmetro da colônia crescido em ABD suplementado com substância teste (OLIVEIRA et al., 2017).

$$ICM\% = [(C-T) / C] \times 100 \qquad \textbf{Equação}$$

5.7 INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS FÚNGICOS

Alíquotas de 0,1mL de cada solução contendo diferentes concentrações das substâncias teste (gel, nanopartículas e gel+nanopartículas) foram misturadas com 0,1ml da suspensão de esporos fúngicos (10^6 esporos/mL) obtidos de cultura com 10 dias de crescimento em ágar Sabouraud a 25ºC ±3. Então, 0,1mL do sistema foi disposto no centro de lâminas de vidro estéreis e posteriormente incubadas em câmara úmida a 25-28ºC por 24 horas. Após esse período, cada lâmina foi fixada com o corante azul lactofenol e a análise da germinação dos esporos foi realizada pela observação através de microscopio óptico (OLIVEIRA et al., 2014).

A capacidade das substâncias teste em inibir a germinação dos esporos fúngicos foi definida comparando o número de esporos germinados no ensaio controle e nos ensaios na presença das substâncias teste (OLIVEIRA et al., 2014).

5.8 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE A MORFOLOGIA FÚNGICA

Os fungos fitopagênicos *A. niger*, *R. stolonifer* e *C. siamense* foram expostos às substâncias teste para se verificar a influência das mesmas sobre a morfologia e ultraestrutura fúngica, avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, segundo o proposto por Battistelli et al. (2005) e Tyagi e Malik (2010)

Inicialmente, o inóculo fúngico foi padronizado em água destilada estéril por

hemocitômetro (10^6 esporos/mL), inoculado em caldo Sabouraud e depois separadamente foram acrescidas a solução teste em concentrações sub-inibitórias para cada fungo (CIM/2). As cepas fungicas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Para preparo do controle, o procedimento foi o mesmo, contudo sem a presença de substância teste, sendo o fungo apenas crescido no meio de cultura.

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 ºC. 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 hexametildisilazine (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)..

5.9 PREPARO DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS

Os frutos receberam três tratamentos distintos: gel de cloridato de quitosana, nanopartículas de cloridrato de quitosana solubilizadas em glicerol e gel de quitosana enriquecido com nanopartículas de cloridrato de quitosana. O gel de cloridrato de quitosana e as nanopartículas de cloridrato de quitosana foram utilizados nas suas respectivas CIM determinadas pela atividade antimicrobiana, segundo metodologia adaptada de Oliveira et al. (2014).

As nanopartículas de cloridrato de quitosana foram suspensas em água destilada contendo 0,5% (v/v) de glicerol como agente plastificante aumentando a força e a flexibilidade da solução de revestimento. Já as nanopartículas adicionadas ao gel de cloridato de quitosana foram diluídas no próprio gel. As diluições realizadas por agitação magnética a temperatura ambiente para completa dispersão das substâncias.

5.10 ATIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO NAS UVAS

As uvas foram higienizadas com hipoclorito de sódio (1% v/v) por 15 minutos, lavadas com água potável e deixadas para secar por 2 horas. Deste ponto foram realizados dois tratamentos: um com foco preventivo, onde as frutas foram revestidas com as coberturas teste antes de serem submetidas a infecção com os esporos fúngicos; e o outro com foco curativo, onde as frutas foram inicialmente expostas aos fungos para só então serem revestidas com as coberturas teste. Para cada grupo de tratamento foram utilizados 20 cachos de uvas (contendo de 6-8 uvas por cacho).

5.10.1 Tratamento preventivo

Após higienização, as uvas foram divididas em 5 grupos e imersas nas soluções teste: gel de cloridato de quitosana; nanopartículas de cloridrato de quitosana; gel de cloridrato de quitosana enriquecido com nanopartículas de cloridrato de quitosana, 1 grupo para controle negativo (frutas tratadas com água destilada estéril) e 1 grupo para controle positivo (fruta recoberta por glicerol 1%). Após este procedimento, as frutas foram secas em filtros de nylon para retirar o excesso de líquido. Em seguida, imersas em 500 mL da solução do inóculo fúngico (10^6 esporos/mL) sob agitação, onde permaneceram por 1 minuto. A infecção fúngica causada nas uvas foi realizada separadamente para cada espécie (*A. Niger, R. Stolonifer* e *C. siamense*) e novamente foram colocadas para secar em filtros de nylon. Cada um dos 5 grupos foi dividido em 2 (totalizando 10 grupos) e acondicionados em recipientes estéreis com tampa, de modo que 5 subgrupos armazenados à temperatura ambiente (25ºC ±3) por 12 dias, enquanto os outros 5 subgrupos armazenados em refrigeração 6°C por 30 dias. As frutas foram examinadas pelos sinais observáveis de infecção fúngica e os resultados expressos em percentual de fruta infectada seguindo os intervalos de tempo pré-definidos, segundo metodologia adaptada de Guerra et al. (2016).

5.10.2 Tratamento curativo

Logo após higienização e secagem, as uvas foram imersas em 500 mL da solução do inóculo fúngico (10^6 esporos/mL) sob agitação, onde permaneceram por 1 minuto. A infecção fúngica causada nas uvas foi realizada separadamente para cada espécie (*A. niger, R. stolonifer* e *C. siamense*). Em seguida, as frutas foram divididas em 5 grupos, imersas nas soluções contendo as substâncias teste (gel de quitosana, nanopartículas de cloridrato de quitosana e gel de cloridrato de quitosana enriquecido com nanopartículas de cloridrato de quitosana), 1 grupo para controle negativo (tratados com água destilada estéril) e 1 grupo para controle positivo (fruta será recoberta por glicerol 1%). Após este procedimento, seguindo o mesmo esquema do tópico anterior, as frutas foram secas, os 5 grupos divididos em 2 (totalizando 10 grupos) e acondicionadas em recipientes estéreis com tampa, de modo que 5 subgrupos armazenados à temperatura ambiente por 12 dias, enquanto os outros 5 subgrupos armazenados a 12 °C por 30 dias. As frutas foram examinadas pelos sinais observáveis de infecção fúngica e os resultados expressos em percentual de fruta infectada seguindo os intervalos de tempo pré-definidos, segundo metodologia adaptada de Guerra et al. (2016).

5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios serão realizados em triplicata e os resultados expressos como uma média dos ensaios. As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva ANOVA (média e desvio padrão) e inferencial (teste de Tukey) para determinação de diferenças significantes ($p<0,05$) entre as médias dos resultados obtidos. Para o tratamento estatístico, será utilizado o software Sigma Stat. 2.03.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA, DO CLORIDRATO DE QUITOSANA E DAS NANOPARTICULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA

As características estruturais da quitosana microbiologica e do cloridrato de quitosana, assim como das nanoparticulas de cloridrato de quitosana foram observadas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. A técnica de espectroscopia de infravermelho está baseada na interação entre grupos funcionais presentes na amostra analisada com radiações eletromagnéticas. Ela permite identificar e classificar vibrações moleculares (alongamento, flexão e torções das ligações químicas) características desses grupos, fornecendo assim, informações estruturais sobre a amostra (LUCARINI et al., 2019; SANTOS et al., 2021). A partir dos resultados obtidos foi possível definir e analisar as bandas que caracterizam a quitosana, o cloridrato de quitosana, e as nanoparticulas de quitosana e os possíveis deslocamentos de bandas que indiquem as interações entre o grupo amino do cloridrato de quitosana e os ânions tripolifosfato do TPP, o que pode comprovar a formação das nanopartículas de cloridrato de quitosana.

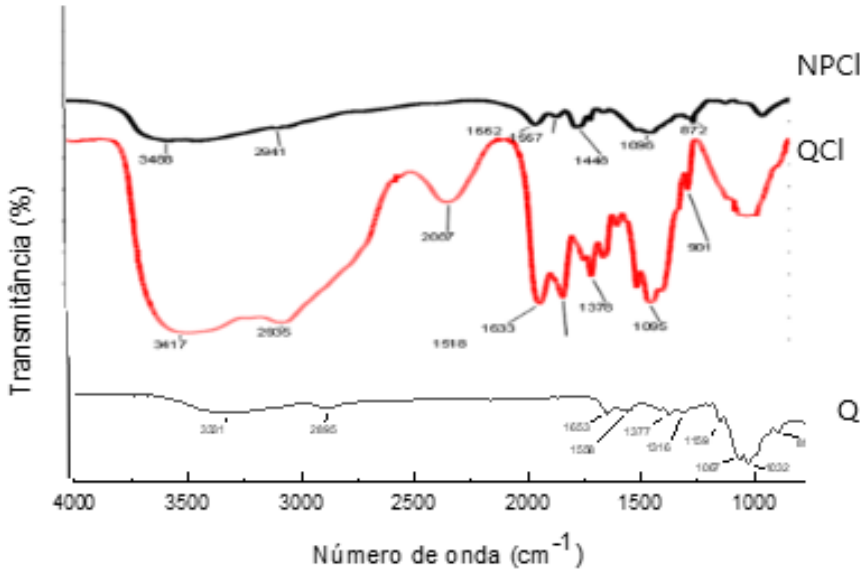
O espectro obtido para a quitosana microbiologica (**Figura 2**) apresenta, um pico largo em 3372 cm-1, na região correspondente ao estiramento OH. O pico em 2931 cm-1 representa o estiramento C-H alifático. O pico em 1655 cm-1 corresponde ao grupo amina C=O da quitosana. O modo vibracional do estiramento da ligação N-H (amida II) com valor de 3372 cm-1 pode ser observado no espectro da quitosana fungica. Os valores do grupamento O-H e N-H estão sobrepostos no espectro. O pico em 1062 cm-1 representa o estiramento C-O do grupo alcóolico primário (-CH2 – OH) da quitosana. A deformação axial C-N da amida apresenta-se no pico 1424 cm-1.

O espectro do cloridrato de quitosana e suas bandas características pode ser visualizado na **Figura 2**. Percebe-se uma banda larga em 3417 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 2935 cm-1 representa o estiramento C-H alifático e os observados nos comprimentos de onda. 1633 cm-1 e 1557 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 1518 cm-1 demonstra a presença do grupo amino (GE et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018, LI

et al., 2019).

Observando o espectro das nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP e comparando com o do cloridrato de quitosana (**Figura 2)** percebe-se o alargamento da banda de absorção entre 3000 e 3700 cm-1 referente ao aumento das ligações de hidrogênio devido a interação entre o grupamento amina do cloridrato de quitosana e os ânions tripolifosfato do TPP no processo de geleficaçao iôinica (MELO et al., 2020a; MELO et al., 2020b). Foi observado que esses dois espectros diferem entre si, mostrando a formação das nanopartículas através da molécula inicial da quitosana. No espectro do cloridrato de quitosana, o pico 3417 cm-1, que corresponde ao estiramento O-H, é mais largo e mais plano do que o mesmo pico no espectro das nanopartículas (3488 cm-1). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Thandapani et al. (2017), Melo, et al. (2018) e Melo, et al. (2020a, 2020b) ao prepararem nanoparticulas de quitosana-TPP, os autores sugerem que a redução das ligações de hidrogênio que ocorre devido a estrutura mais aberta resultante da interligação da quitosana com o TPP para formação das nanopartículas.

Figura 2 - Espectros na região do infravermelho da quitosana microbiologica (Q), do cloridrato de quitosana (CQ) e das nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCl).



Durante os experimentos com as diferentes formulações para obtenção das nanoparticulas de quitosana, foi observado que o pH era o principal fator a influenciar as características das nanopartículas. As faixas de pH 4,5 e 5 induziram a formação de coágulos e consequente precipitação do cloridrato de quitosana. Assim, estabeleceu-se o valor de pH 4 para demais experimentos, por ter favorecido a obtenção das melhores formulações. Assim, apesar do cloridrato de quitosana dispensar o uso de soluções ácidas, podendo ser diluído em água, foi inviável a produção de nanopartículas dentro dos padrões desejados em faixas de pH mais elevado. Isto, justificou a necessidade de trabalhar no pH 4,0. A literatura sugere que pH ácido tende a favorecer a protonação dos grupos NH_2 para NH_3^+da quitosana e de seus derivados. Quando dissolvido, os grupos amino do gel de cloridrato de quitosana estão livres para reagir com os grupos fosfato do TPP, formando as nanopartículas de cloridrato de quitosana (EL- GHAFFAR et al., 2017; SABARUDIN, 2021; SATHIYASEELAN et al., 2021).

Na **Tabela 3** estão relatadas as caracteristicas quanto a tamanho das particulas, potencial zeta, e indice de polidispersão das formulações para obtenção das nanoparticulas de cloridrato de quitosana pela técnica de gelificação iônica. A literatura demonstra que nanopartículas de quitosana de baixo peso molar tendem a apresentar-se de forma homogênea, com aspecto leitoso, branco opalescente e de reflexo azulado (efeito de Tyndall), decorrente do movimento browniano das nanopartículas (FERNÁNDEZ-DÍAZ; COSTE; MALTA, 2017; SAEED; DMOUR; TAHA, 2020). As formulações que se apresentaram visivelmente inadequadas foram desconsideradas para as etapas seguintes. Por exemplo, formulações nas quais se observou precipitação da mistura de gel de cloridrato de quitosana e TPP, indicando estarem fora do padrão desejado.

Como pode ser observado na **Tabela 3**, quanto maior a concentração de cloridrato de quitosana e TPP, maior o tamanho da partícula formada. Assim, com base nos resultados prévios obtidos, o ensaio 5 foi escolhido para dar sequência ao desenvolvimento do estudo, por apresentar o menor tamanho (450,97 nm), potencial zet acima de +30, e indice de polidispersão abaixo de 0,5.

Dentre as principais informações necessárias para conhecermos um material em escala nanométrica, o tamanho médio da partícula é uma delas. Uma vez que é o tamanho nanométrico que fornece uma maior área superficial e propriedades que não estão presentes no material de origem em escala macro. A técnica de espalhamento

dinâmico de luz (DLS) serve para medir o espalhamento de luz baseado no movimento aleatório das partículas, devido a colisão com as moléculas do solvente (movimento browniano). Assim, apenas partículas suspensas em líquido podem ser caracterizadas. As partículas maiores possuem movimento mais lento que as menores no mesmo solvente e temperatura. A técnica DLS pode ser usada para a caracterização da distribuição do diâmetro hidrodinâmico da partícula usando a equação de Stokes-Einstein (TOSI et al., 2020).

Tabela 3 - Determinação dos melhores parametros das variaveis dependentes, percentual de cloridrato de quitosana, de TPP e a proporção entre cloridrato de quitosana e TPP, para obtenção de nanopartículas de cloridrato de quitosana com melhores características de tamanho (DLS), potencial zeta (PZ), indice de polidispersão (PDI).

Ensaio	**Variável**			**Resultado**		
	GCQ %	**TPP %**	**CQ:TPP**	**DLS (nm) ± DP**	**PDI ± DP**	**PZ (mV) ± DP**
1	2	1	2:1	1159,33 (44,99)	0,77 (0,18)	51,13 (2,54)
2	1,5	1	2:1	1071,67 (27,39)	0,92 (0,09)	40,2 (1,37)
3	2	0,5	2:1	476,83 (13,3)	0,60 (0,1)	27,77 (0,38)
4	1	1	3:1	500,17 (10,61)	0,42 (0,02)	34,8 (0,72)
5	**1**	0,1	**2:1**	**450,97 (12,78)**	0.48 (0,06)	**44,2 (0,96)**
6	1	0,1	1:1	467,13 (16,66)	0.64 (0.06)	37.37 (2,32)

Nanopartículas de quitosana e derivados em escala inferior a 500nm apresentam potencial antimicrobiano de amplo espectro, uma vez que sua área superficial é ampliada, podendo se fixar e interagir diferentes estruturas microbiana (MUBARAKALI et al., 2018). Em estudo realizado por Melo e colaboradores (2020b) foram produzidas nanopartículas de quitosana com tamanho médio de partículas de 331.1nm, sendo eficazes contra fungos pós-colheita em morangos infectados.

Em estudo realizado por Li e colaboradores (2019), foi desenvolvido um complexo de nanoesferas de cloridrato de quitosana e carboximetil amido, como agentes carreadores de curcumina. Os autores, assim como no presente estudo, utilizaram valor de pH 4 para desenvolvimento de suas nanopartículas, tendo como características um potencial zeta de 40,23mV e um tamanho médio de partículas de 378,2nm. Nesse contexo, a utilização das nanopartículas de cloridrato de quitosana como revestimento comestível podem influenciar positivamente em prolongar a vida de prateleira de frutas, como uvas.

O índice de polidispersão (PDI) é um importante indicador da homogeneidade da partículas, esse índice vai de 0 a 1, quanto mais próximo de 0, mais homogêneas são as partículas, sendo classificadas como nanopartículas monodispersas. O valor de PDI pode influenciar na estabilidade das partículas, valores mais elevados tendem a reduzir a estabilidade (RUSLAN et al., 2020; TOSI et al., 2020).

O potencial zeta afere a capacidade de atração/repulsão eletrostática das partículas, afetando diretamente a estabilidade de uma suspensão coloidal. Em geral, nanopartículas com potencial zeta superior a +30mV são consideradas estáveis, sendo mais resistentes a agregação por forças de van der Waals, movimento browniano ou interações partícula-partícula (ÇAKIR; ICYER; TORNUK, 2020; CHANDRASEKARAN; KIM; CHUN, 2020; HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019).

Diversos trabalhos demonstram nanopartículas de quitosana e seus derivados com potencial zeta superior a +30mV, com estabilidade eletroquímica, tamanho, homogeneidade, atividade antimicrobiana suficiente para serem utilizadas como revestimentos comestíveis na conservação de alimentos (CHANDRASEKARAN; KIM; CHUN, 2020; HESAMI; DARVISHI; ZAREI, 2021; MELO et al., 2018, 2020b; VILLEGAS-PERALTA et al., 2020). Quando avaliados esses parâmetros (tamanho de partícula, PDI e potencial zeta) e comparados com as nanopartículas obtidas no presente estudo, podemos considerá-las partículas com tamanho, carga e homogeneidade adequadas ao desenvolvimento de uma cobertura comestível de gel de cloridrato de quitosana associada as nanopartículas de cloridrato de quitosana na conservação de uvas de mesa.

As **Figuras 3 e 4** apresentam os termogramas (TGA, DSC) do cloridrato de quitosana (QCl), e das nanoparticulas de cloridrato de quitosana-TPP (NPCLQ). A análise de TGA 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, 2017; 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 adsorvida ou fracamente ligada aos polímeros (SALAMA; ABDEL AZIZ; SABAA,

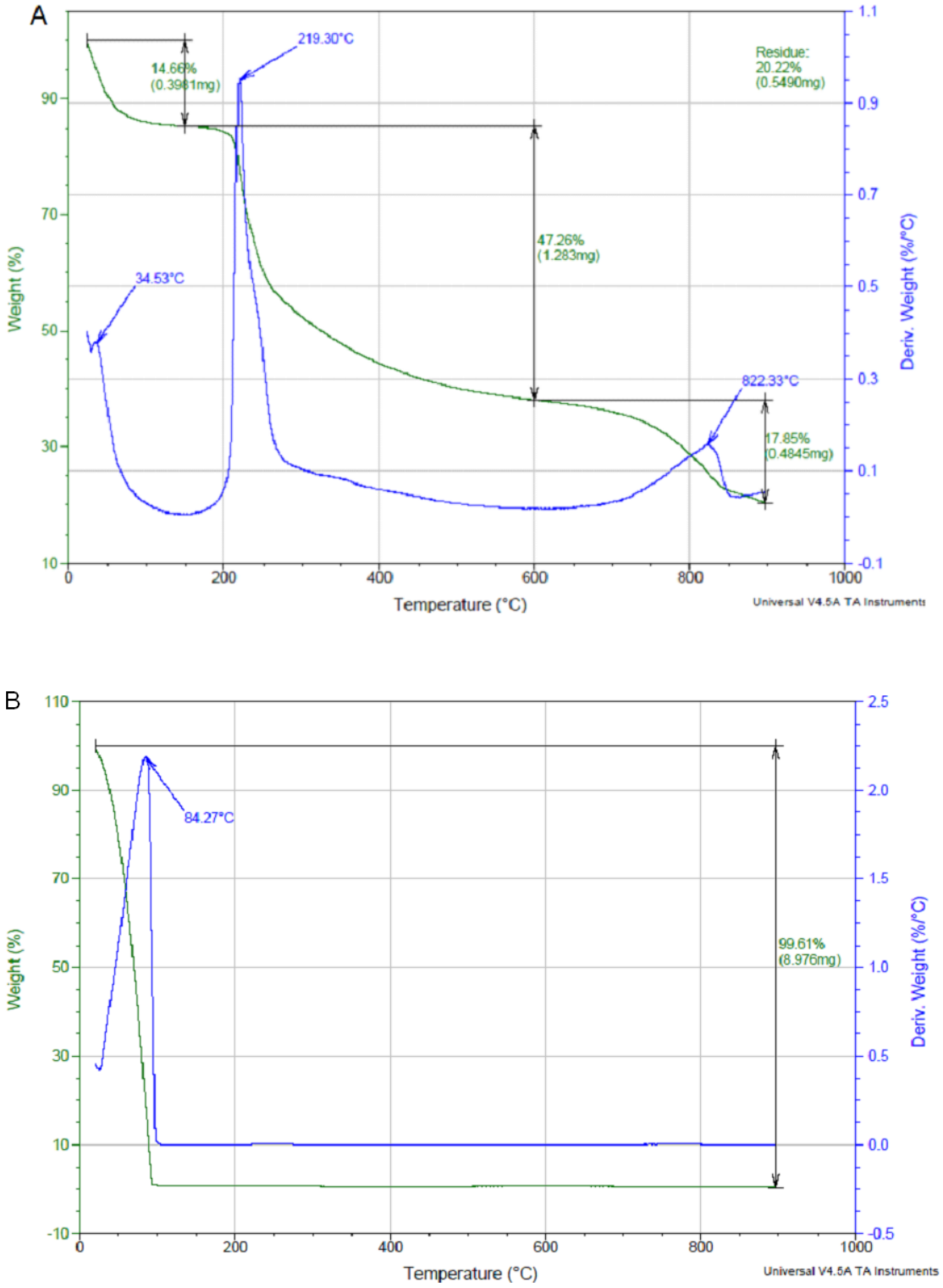
2018). Na **figura 3 e 4** se verifica que o primeiro evento ocorreu numa faixa de temperatura de 219,30 ºC para o cloridrato de quitosana, e de 84,27 ºC para nanoparticulas de cloridrato de quitosana. Convém ressaltar que a perda de água foi cerca de 14,56% para o cloridrato de quitosana e 99,51% para as nanoparticulas. O presente estudo corrabora com os achados relatados por Fortunati et. (2017), que encontraram perda de água de aproximadamente 10% para o cloridrato de quitosana nesse primeiro estágio de degradação.

No segundo e mais importante estágio de perda de massa, as temperaturas de degradação do ClQ foi de 219,30 ºC, representando uma redução percentual de massa em aproximadamente 47,26% em decorrencia da despolimerização e degradação das unidades CH-D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina (TAVARES, et al., 2020). O último estágio térmico que ocorreu a partir de 283ºC (CQ) é atribuído à degradação dos carbonos residuais presentes na estrutura dos materiais de parede (GARCIA et al., 2021).

As nanopartículas de cloridrato de quitosana obtidas no presente estudo não apresentaram os três eventos térmicos característicos, o que difere dos resultados relatados por HOSSEINI et al. (2013), e GARCIA et al. (2021) que descrevem os três eventos termicos em nanoparticulas de quitosana-goma arabica obtidas por coaservação complexa. Os autores relatam que as temperaturas de degradação dos materiais de parede (quitosana e goma arabica) sofreram aumento quando comparadas às temperaturas dos polímeros isoladamente indicando maior estabilidade térmica (quitosana em torno de 200 ºC para 230 ºC, e de goma arabica em torno de 30o ºC para 390 ºC).

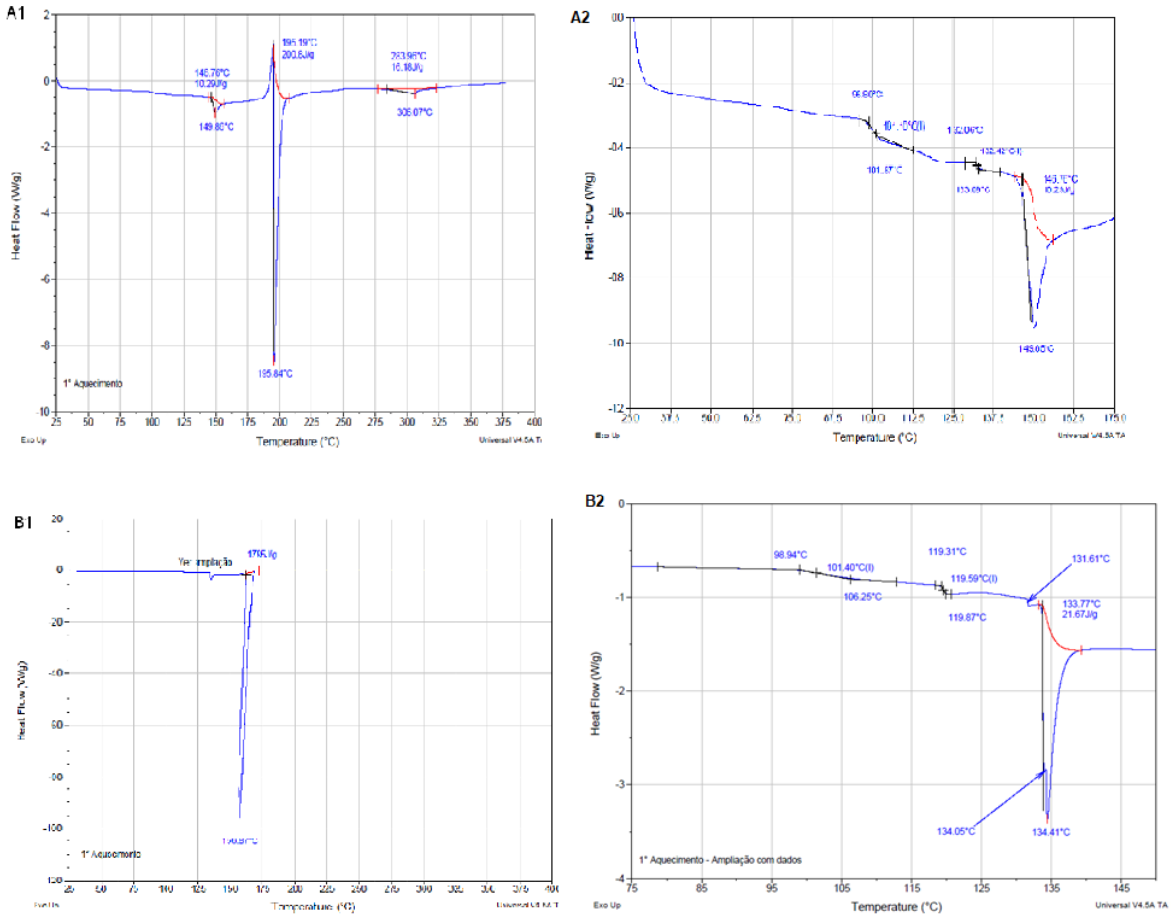
A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é um método de análise térmica que avalia mudanças físicas ou químicas (alteração na estrutura cristalina, ponto de fusão e ebulição) em uma amostra em decorrência da alteração temperatura (HADIDI et al.,2020). As transições de fase, desidratação e redução 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).

Figura 3 – Curvas de termogravimetria (TGA) do cloridrato de quitosana (A) e das nanopartículas do cloridrato de quitosana (B).



Os termogramas (DSC) do cloridrato de quitosana e das nanoparticulas (**Figura 4**) apresentaram picos endotérmicos, característicos de desidratação em torno de 150 °C para o ClQ e as NPCLQ e pico exotérmico, atribuído à decomposição do polímero, em 195°C para o cloridrato de quitosana. Tais resultados coincidem com os dados obtidos a partir das análises de TGA. A curva de DSC das nanoparticulas apresentou um único pico endotermico largo em 134,41 ºC, que pode ser atribuído à decomposição do cloridrato de quitosana e do TPP.

Figura 4 – Curvas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) do cloridrato de quitosana (A1) e com ampliação do seguimento (A2), das nanopartículas do cloridrato de quitosana (B1) e ampliação do seguimento (B2).



6.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante de um produto ou substância se baseia na sua capacidade de reduzir ou eliminar algum composto (redox-ativo ou radical livre), através da transferência de átomos de hidrogênio e/ou de elétrons (APAK et al.,

2016). Em relação aos métodos de análise aplicados na pesquisa, o DPPH e o ABTS podem agir de ambas as formas citadas acima, simultaneamente (CERECEDO-CRUZ et al., 2018). Por outro lado, o FRAP se baseia na transferência de elétrons do composto antioxidante para o complexo de ferro (TPTZ), fazendo passar do estado férrico (Fe3+) para o ferroso (Fe2+) (GRANATO; NUNES, 2017).

Os resultados da atividade antioxidante das substâncias testes estão dispostos na Tabela 16. Observou-se que todas as substâncias testes apresentaram atividade sequestradora do radical DPPH como observado na **Tabela 3**. A quitosana fúngica se destacou tendo o maior valor de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, e que favoreceu a maior transferência de elétrons para o complexo de ferro, provavelmente por apresentar maior carga positiva pela protonação dos grupos aminas. Comparando a quitosana fúngica, com as quitosanas modificadas e as nanopartículas obtidas, se verifica a ação antioxidante para os três métodos utilizados, em ordem decrescente quitosana fúngica, cloridrato de quitosana, e as nanoparticulas de cloridrato de quitosana.

Tabela 4 – Atividade antioxidante in vitro pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS da quitosana fúngica, do cloridrato de quitosana, e das nanopartículas de cloridrato de quitosana fúngica-TPP (NPClQ).

Substâncias testes	Método de atividade antioxidante		
	DPPH (%)	ABTS (μmol TE.g^{-1})	FRAP (μmol $FeSO^4.g^{-1}$)
Quitosana fúngica	79,81±0,018	0,30±0,031	0,28 ±0,123
GCQ	74,14±0,071	0,26±0,042	0,26±0,144
NPCQ	54,80±0,123	0,19±0,070	0,18±0,044

.

Segundo Siripatrawan e Harter (2010), a atividade antioxidante da quitosana deve-se a presença dos grupos aminos na molécula desse polímero. Os radicais livres, ABTS, DPPH, íon férrico, reagem com os grupos aminos livres da molécula da quitosana para formar moléculas mais estáveis. Com isso, os grupos NH2+ transformam-se em NH3+ através da absorção do íon hidrogênio presente na solução do radical livre. Portanto, quanto maior o grau de desacetilação da molécula de quitosana maior a sua atividade antioxidante (YAN, YANG, MAU., 2008).

6.3 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO

Como pode ser observado na **Tabela 5,** as substâncias testes foram consideradas como não toxicas pela escala de avaliação proposta por Rodrigues et al (2014), por todas terem promovido inibição das culturas celulares abaixo de 50%. Na presente pesquisa as substâncias testes apresentaram variação entre 0 a 22,54% de inibição das culturas celulares.

Tabela 5 - Determinação da citotoxicidade das substâncias testes: quitosana fúngica(QF), cloridrato de quitosana (ClQ), e nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPClQ), pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Doxorrubicina foi utilizada como padrão positivo para citoxicidade.

Substâncias teste	**% de inibição celular**									
	NCI-H292	EPM	**HEP-2**	EPM	**MCF-7**	EPM	**HL-60**	EPM	**RAW**	EPM
QF	0,00	0,00	0,16	0,32	2,53	0,56	2,35	1,83	12,51	0,76
GQC	0,00	0,00	1,04	0,55	2,13	0,83	2,31	0,71	11,04	2,29
NPCQ	22,54	1,76	8,03	0,73	4,01	0,00	4,26	0,00	13,92	0,79
Doxorrubicina	79,68	0,11	74,28	2,62	74,18	6,33	72,77	2,46	76,58	1,74

EPM- Erro Padrão Médio

NR* - Teste não realizado

A quitosana fúngica, e o cloridrato de quitosana apresentaram perfil de avalição da citotoxicidade similares, com variação da inibição celular entre 0,0 a 12,51%. As nanopartículas de cloridrato de quitosana apresentaram inibição de crescimento de todas as células testadas (4,01 a 22,54%). Liu; Gao (2009) também avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana em fibroblastos e não encontraram atividade tóxica nesse tipo de célula. De acordo com Loh, Saunders, Lim (2012), a citotoxicidade de nanopartículas está relacionada as cargas positivas presentes na sua superfície. Contudo, essas cargas são pH-dependentes, o que significa dizer que no pH utilizado no presente método (4,0) as cargas superficiais estão suficientemente ionizadas a ponto de se ligarem intensamente com as cargas negativas das membranas das células e causar inibição, mesmo em percentual abaixo do considerado tóxico. Esses resultados sugerem que os materiais testes, incluindo as nanoparticulas de cloridrato de quitosana apresentam-se como seguras para uso em

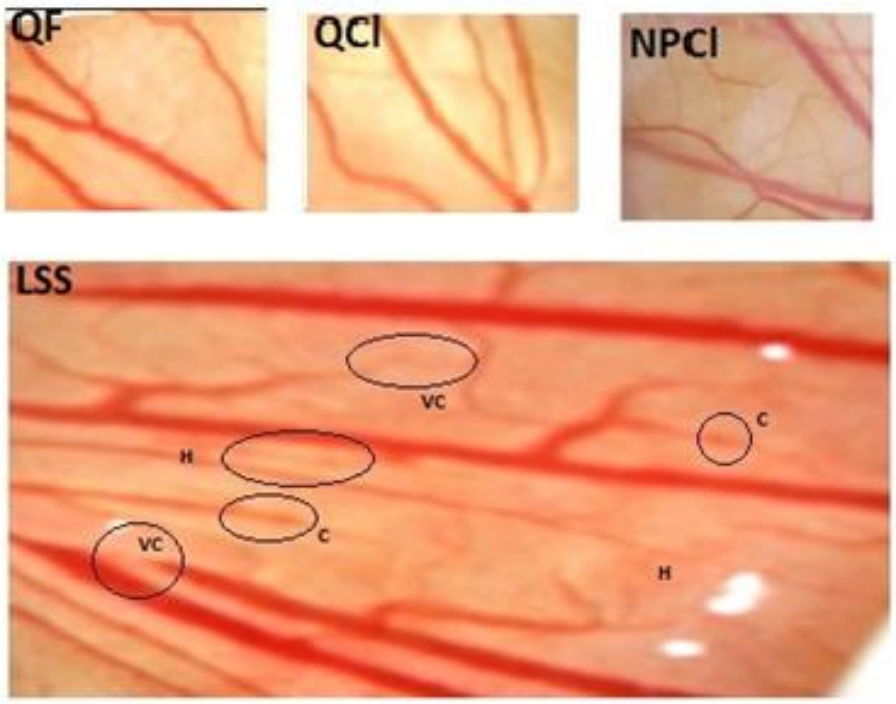
humaos e ao meio ambiente.

O teste do potencial de irritação pelo ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM) caracteriza-se como um ensaio de irritação in vitro de grande interesse científico devido ao baixo custo, efetividade e rapidez da análise quando comparada com outros testes in vivo, tais como o teste Draizer do olho do coelho. Tem como limitação não ser possível a realização do teste por substâncias que inviabilizem a visualização da membrana corioalantóide, seja devido a uma coloração intensa, alta viscosidade, ou não ser possível de se realização a solubilização da substância (VARGAS et al., 2007; SAW; HENG; LIEW, 2008). A membrana corioalantóide do ovo de galinha fecundado por se assemelhar a membrana mucosa de mamíferos, e pelos efeitos agudos induzidos por uma substância sobre os pequenos vasos sanguíneos e proteínas da membrana corioalantóide, o teste de HET-CAM tem sido propostos como substituto ao teste do olho do coelho. Ademais, o teste de HET-CAM apresenta a vantagem de ser mais universalmente aceitável como um teste não animal. As leis atuais que regulam a experimentação animal permitem a utilização de embriões de galinha com até 10 dias de fecundação sem a autorização dos comitês de experimentação animal (BAGLEY; WATERS; KONG, 1994).

HET-CAM é um teste qualitativo e quantitativo de efeitos negativos derivados da exposição de membranas a determinadas substâncias (FREIRE et al., 2015). Como verificado na **Figura 5** que a quitosana fungica, o cloridrato de quitosana e as nanopartículas testadas foram consideradas como não irritantes, com PI de 0,0, com ausência dos efeitos inflamatórios e vasculares de vasoconstricção, hemorragia e coágulo, durante dos 5 minutos (300 segundos) de observação.

Figura 5 - Determinação do potencial de irritação das substâncias testes: quitosana fúngica(QF), cloridrato de quitosana (QCl), e nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPClQ), pelo ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM). Controle positivo de irritação foi usado o laurel sulfato de sódio 1% (LSS), com observação de até 5 minutos/300 segundos dos sinais

de vasoconstricção (VC), hemorragia (HE) e coagulo (C).



Por outro lado, como esperado, o lauril sulfato de sódio 1% (controle positivo para irritação) apresentou PI de 17,74±0,4, sendo visualizado vasoconstricção (6,0±1,0 segundos), coágulo (63,0±3,0 segundos) e hemorragia (48±3,0 segundos), sendo classificado como irritante severo/grave. Os resultados obtidos no teste de HET-CAM sugerem que os polimeros e as nanoparticulas avaliados como princípio ativo para obtenção de cobertura comestivel são seguros para uso em humanos, em relação ao potencial de irritação. Testes de citotoxicidade devem ser empregados para verificar a segurança das substâncias quanto a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

6.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas do gel de cloridrato de quitosana, nanopartículas de cloridrato de quitosana e mistura das duas estão presentes na **tabela 6**. Pode-se observar que os fungos *A. niger* e *C siamense* foram mais resistentes às substâncias teste, sendo *R. stolonifer* mais sensível. Considerando a viabilidade do estudo, foram estabelecidos os valores máximos da CIM para os demais experimentos.

Diferente do esperado, os valores obtidos no presente estudo não correspondem aos relatos da literatura, onde as concentrações variam de 5,0 até 0,187mg/mL (HASHEMINEJAD; K/HODAIYAN; SAFARI, 2019; HESAMI; DARVISHI; ZAREI, 2021; MELO et al., 2020a). Quando comparada a quitosana convencional e sais derivados, a CIM obtida para as nanopartículas de cloridrato de quitosana, neste estudo, possui uma concentração elevada (CHENG et al., 2019; FRANCESCONI et al., 2020). No entanto, pode-se observar a associação cinérgica entre gel de cloridrato de quitosana e as nanopartículas de cloridrato de quitosana

Tabela 6 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do cloridrato de quitosana (QCl), das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (NPCLQ), e da junção de ambos (QCl-NPCLQ) para fungos fitopagenos.

Substancia teste	**CIM (mg/mL) para os fungos fitopatógenos**		
	A. niger	***R. stolonifer***	***C. siamense***
QCl	8,0	6,0	8,0
NPCLQ	4,0	3,0	4,0
QCl + NPCLQ	2,0	2,0	2,0

O espectro de atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados são amplamente conhecidos, no entanto, os mecanismos específicos de como se dá essa atividade ainda não estão plenamente estabelecidos. O modelo mais aceito relaciona a interação entre as cargas superficiais positivas da quitosana com os componentes carregados negativamente da superfície celular microbiana, alterando a passagem de nutrientes e outras subtâncias pela parede celular, bem como a permeabilidade da membrana plasmática, promovendo o extravasamento de fluidos e, consequentemente, morte celular. Neste modelo a atividade antimicrobiana da quitosana está diretamente relacionada com o número de grupos aminos livres na estrutura (LOPEZ-MOYA; SUAREZ-FERNANDEZ; LOPEZ-LLORCA, 2019; MENG et al., 2020; SUN et al., 2021).

Outro mecanismo de ação proposto indica que a quitosana seria capaz de transpor a membrana celular e se ligar ao DNA microbiano, inviabilizando a síntese de RNA mensageiro , inibindo a sintese proteica da celula microbiana. Da mesma forma, essa ligação estaria relacionada as cargas superficiais da quitosana (positivas) e do RNA e do DNA (negativas) (ALGHUTHAYMI et al., 2020; SUN et al., 2021)

Além dos mecanismos supracitados, é proposto por alguns autores que a quitosana atua como quelante de nutrientes e metais traços essenciais a sobrevivência dos microrganismos. E é capaz de se depositar sobre a superfície celular, formando uma camada espessa que inibe o fluxo de natural de nutrientes e outras atividades metabólicas, induzindo a morte celular (CHAKRABORTY; HASANUZZAMAN; RAHMAN, 2020).

Quando comparada a ação antimicrobiana do gel de cloridrato de quitosana, e as nanoparticulas de cloridrato de quitosana, a solução de nanopartículas de cloridrato de quitosana apresentou inibição dos fungos testes em concentração menor, indicando uma potencialização da atividade antimicrobiana quando o polimero encontra-se em tamanho nanometrico. O que está em acordo com o apresentado na literatura, uma vez que nanopartículas possuem características diferenciais que potencializam a atividade das mesmas quando comparadas com a material de origem em escala macro (MELO et al., 2020b). É sugerido que, pelo seu pequeno tamanho, as nanopartículas podem ser absorvidas pelas células microbianas, por ação de proteínas transportadoras ou canais iônicos, e assim interagir com estruturas e organelas celulares induzindo a morte celular (ABD-ELSALAM et al., 2017, CARVALHO et al., 2019).

É possível observar na **tabela 6** que a junção entre o gel de cloridrato de quitosana e as nanopartículas de cloridrato de quitosana potencializou seu efeito antifungico, quando comparamos a atividade antifúngica das substâncias individualmente. Esse efeito potencializador já foi observado na literatura, em experimentos realizados com fungos e também bactérias (MELO et al., 2018, 2020b, 2020a). Vale destacar que nenhum estudo, até o momento, avaliou a associação do cloridrato de quitosana com nanopartículas de cloridrato de quitosana contra esses fungos fitopatógenos.

6.5 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE SOBRE A MASSA MICELIAL

As substâncias testes apresentaram inibição do crescimento radial fungico para *C. siamense*, *R. stolonifer*, e *A. niger* de forma diretamente proporcional ao aumento da concentração das substâncias testes (**Tabela 7**). Para a concentração metade da CIM (CIM/2) todas apresentaram inibição acima de 50% até 65%. Para as concentrações inibitórias mínimas todas as substâncias inibiram a partir de 90% o crescimento radial dos fungos. O dobro da concentração inibitória mínima (2xCIM) inibiu 100% o crescimento radial de todos os fungos testes, incluindo a solução de cloridrato de quitosana, a qual não foi possivel acrescentar ao meio agar BDA a concentração 2xCIM (16mg/mL), devido a alteração na consistência do meio, tendo sido testada a concentração de 12mg/mL. De forma geral, as nanoparticulas de cloridrato de quitosana foram mais efetivas na inibição do cresciemto radial dos fungos fitopatogenos testados, quando comparada ao gel de cloridrato de quitosana. Contudo, a junção QCl + NPCLQ foi a substância que obtive os maiores percentuais de inibição. Isto já era esperado, uma vez que nanopartículas possuem características diferenciais que potencializam a atividade das mesmas quando comparadas com a material de origem em escala macro (MELO et al., 2020a).

Da mesma forma, os modelos propostos para explicar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana e seus derivados ainda estão sendo definidos. É sugerido que, pelo seu pequeno tamanho, as nanopartículas podem ser absorvidas pelas células microbianas, por ação de proteínas transportadoras ou canais iônicos, e assim interagir com as organelas celulares induzindo a morte celular (MELO et al., 2020b).

Por apresentarem carga positiva e área superficial elevadas, as nanopartículas de quitosana e seus derivados tendem a serem atraídas pela carga superficial celular negativa. Entrando em maior contato com os fungos se comparadas ao gel de cloridrato de quitosana. Devido sua grande área superficial e tamanho nanométrico, as partículas podem ser absorvidas e interagir com o DNA celular, impedindo a transcrição em RNAm (ABD-ELSALAM et al., 2017).

Tabela 7 - Inibição do crescimento micelial radial (ICM%) dos fungos fitopatogênicos frente as substâncias testes em suas diferentes concentrações, com base na concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL Substâncias testes: cloridrato de quitosana (QCl), nanopartículas de cloridrato de quitosana-TPP (NPCl), junção das substâncias (QCl + NPCLQ). Os fungos foram crescidos em meio Ágar Batata Dextrose, e incubados a 25ºC. O crescimento micelial radial foi medido diariamente até que a placa contendo o controle negativo (sem substância teste) estivesse completamente coberta de micélios.

Substâncias testes		**Fungos fitopatogênicos (ICM%)**		
		C. siamense	***R. stolonifer***	***A. niger***
QCl	**CIM/2**	53,00 (±2,00)	55,33 (±2,89)	52,37 (±2,89)
	CIM	89.33 (±2.89)	90.67 (±1.77)	88,67 (±2,63)
	2xCIM	98,00 (±2,00)	99,32 (±1,34)	97,9 (±2,68)
NPCl	**CIM/2**	60,33 (±2,77)	63.67 (±2.89)	60,00 (±1,64)
	CIM	93,76 (±1,67)	91,05 (±1,30)	90,99 (±1,80)
	2xCIM	100 (±0,0)	100 (±0,0)	100 (±0,0)
QCl + NPCLQ	**CIM/2**	66,85 (±0,58)	67,77 (±1,71)	64,82 (±1,40)
	CIM	98,37 (±1,41)	97,35 (±0,92)	95,41% (±1,00)
	2xCIM	100 (±0,00)	100 (±0,00)	100 (±0,00)

6.6 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS TESTES SOBRE A MORFOLOGIA FÚNGICA

Os efeitos das substâncias testes na morfologia e ultraestrutura de *A. niger, R. stolonifer* e *C. siamense* podem ser observados nas **Figuras 6, 7** e **8**. As hifas de *A. niger, R. stolonifer, e C. siamense* crescidas na ausência de substâncias teste apresentaram estrutura típica, apresentando hifas tubulares bem homogêneas com diâmetros regulares, superfície externa lisa e ápices arredondados, não sendo visualizadas deformações ou danos aparentes (**Figura 6A, 7A e 8A**). Todas as substâncias testes aplicadas nas concentrações sub-inibitórias foram capazes de induzir alterações na morfologia dos fungos testes.

O gel de quitosana e seus derivados tendem a se depositar na superfície das hifas, assim, dificultam as trocas iônicas e entrada de nutrientes essenciais a célula. Hifas crescidas na presença de gel de cloridrato de quitosana mostraram-se distorcidas, com diâmetros distintos, superfície enrugada e achatadas, indicando perda do citoplasma, também conhecidas como “hifas vazias” (**Figuras 6 B e C, 7 B e C, e 8B e C**). As nanopartículas de quitosana-TPP foram capazes de causar pontos

de inchaços ao longo das hifas (**Figuras 6 D e E, 7 D e E**). Modificação similar foi identificada por Nascimento et al. (2020) em hifas de *C. gloesporioides* expostas à solução de quitosana em ácido cítrico (2,5 mg/mL) e que pode estar relacionada à perda do balanço osmótico da célula, também em consequência do aumento da permeabilidade da membrana (GÁLVEZ-IRIQUI et al., 2019; MELO et al., 2020ª; PEI et al., 2020).

Nas figuras **6 F** e **G**, **7 F** e **G**, podem ser observadas as alterações induzidas por diferentes concentrações da associação do gel de cloridrato de quitosana e das nanopartículas de cloridrato de quitosana. Onde parece haver a potencialização dos efeitos das substâncias isoladas.

Estudos anteriores relataram a capacidade da quitosana e de seus derivados, não apenas de inibir o crescimento fúngico, como também de causar danos morfológicos e estruturais às hifas (MELO, et al 2020a; NASCIMENTO, et al., 2020). Berger et al. (2018) reportaram que hifas de *C. fruticola* tratadas com quitosana fúngica (7500 ppm) também apresentaram rugosidade, além de depressões em sua superfície. Tais alterações sugerem que a forma pela qual o cloridrato de quitosana inibe o crescimento de *Colletotrichum* provém da interação direta com a parede celular fúngica.

Como citado anteriormente, a carga superficial positiva do cloridrato de quitosana lhe confere a capacidade de se ligar eletrostaticamente aos fosfolipídios presentes na membrana celular fúngica, gerando uma desestabilização da membrana e alterando de sua permeabilidade (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). Membrana e parede celulares estão intimamente ligadas, visto que, complexos de sintase associados à membrana plasmática são responsáveis pela formação de componentes importantes da parede celular (por exemplo, quitina e β-glucanas). Assim sendo, perturbações causadas à membrana e a tais reações enzimáticas podem afetar a forma e o crescimento dos fungos (LOPEZ-MOYA; SUAREZ-FERNANDEZ; LOPEZ-LLORCA, 2019).

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura de A. niger. Micélio controle sem a presença de substância teste (A); após exposição a concentração 6mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (B); concentração 7 mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (C); concentração 2mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (D); concentração 3mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (E); concentração 0,5mg/mL da junção das substâncias (F) e concentração 1mg/mL da junção das substâncias (G).

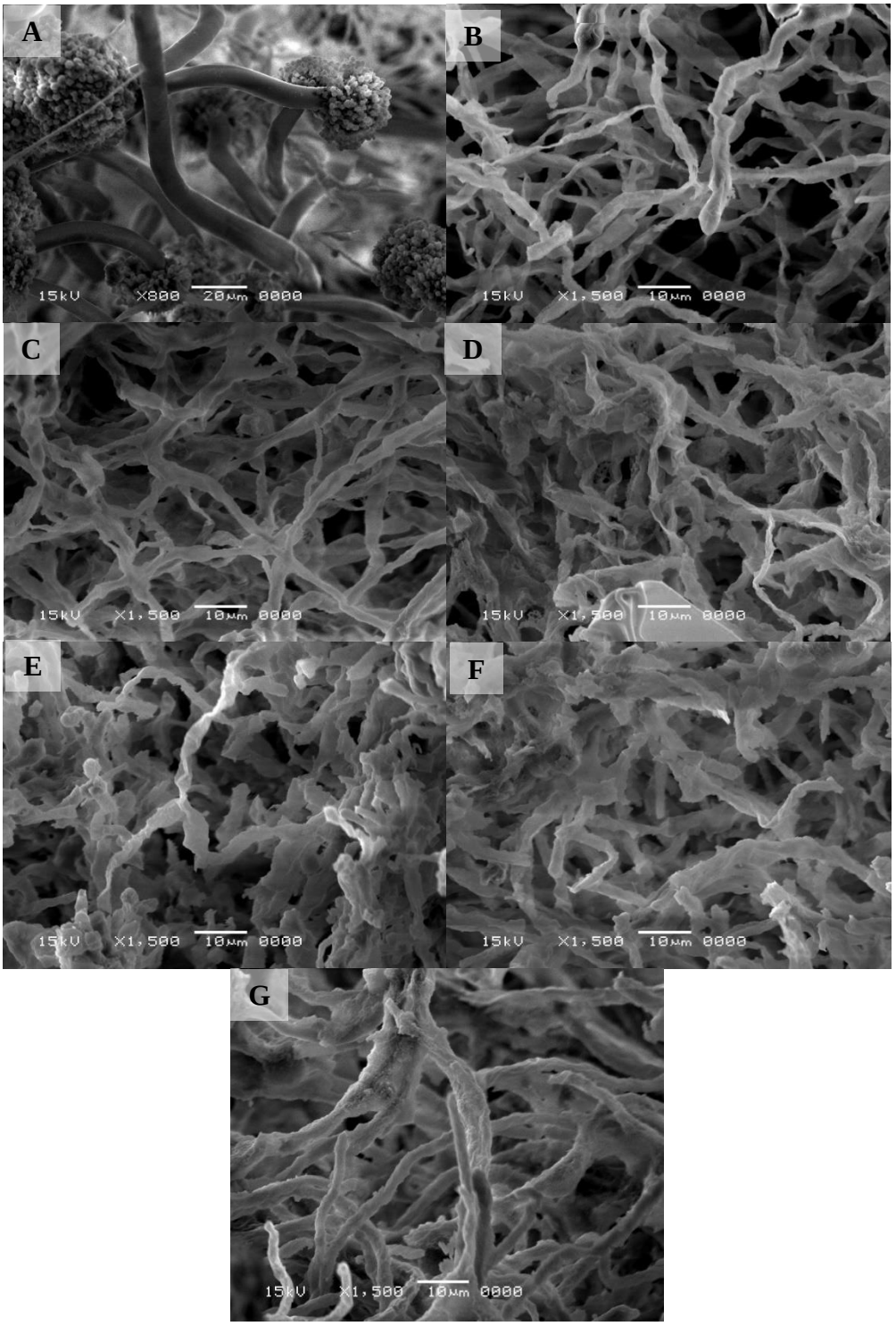


Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura de R. stolonifer. Micélio controle sem a presença de substância teste (A); após exposição a concentração 4 mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (B); concentração 5 mg/mL do gel de cloridrato de quitosana (C); concentração 1mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (D); concentração 2 mg/mL das nanoparticulas de cloridrato de quitosana (E); concentração 0,5mg/mL da junção das substâncias (F) e concentração 1mg/mL da junção das substâncias (G).

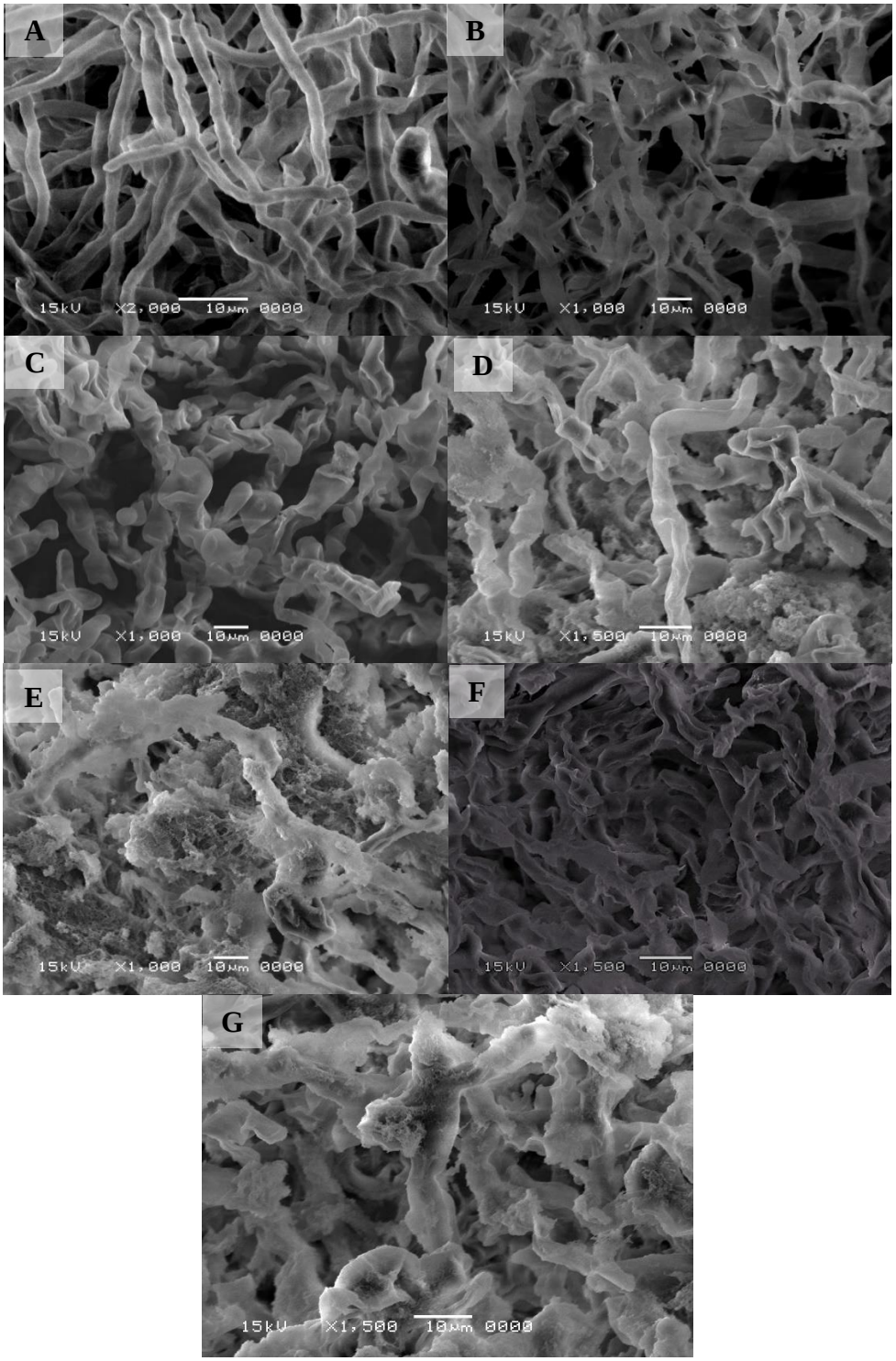
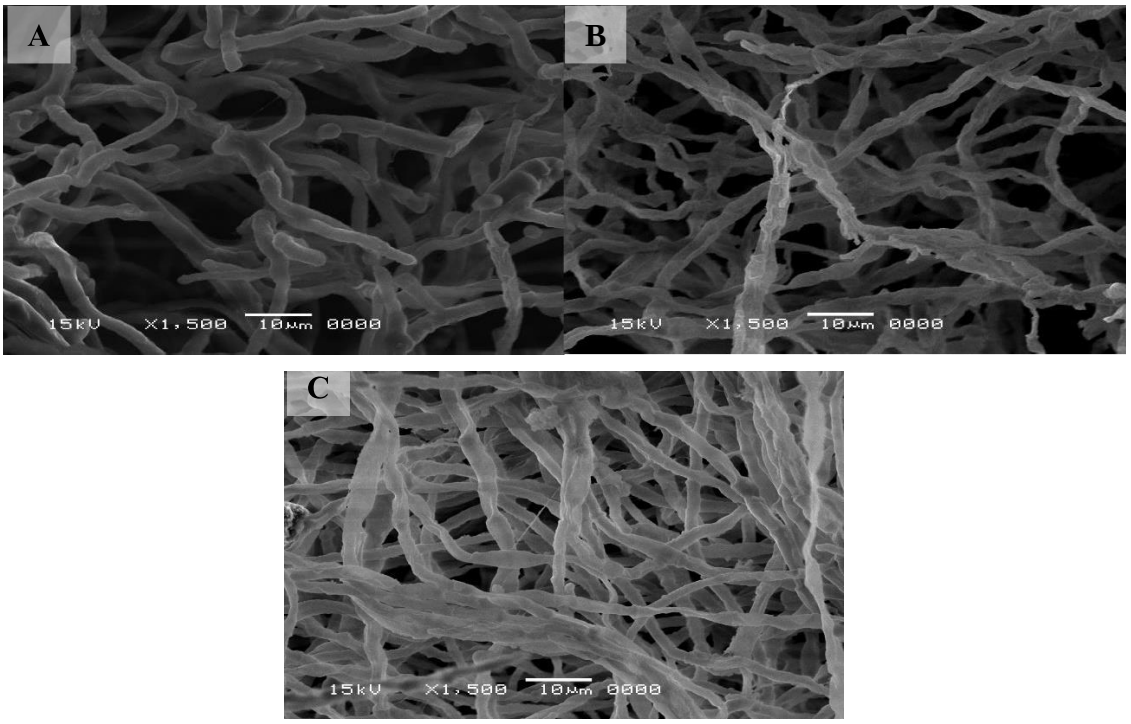


Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura de C. siamenses. Micélio controle (A); após exposição a concentração 4 mg/mL gel cloridrato de quitosana (B) e concentração 5 mg/mL gel cloridrato de quitosana (C).



6.7 EFEITO DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO NAS UVAS

O efeito curativo dos revestimentos de gel de cloridrato de quitosana, nanoparticulas de cloridrato de quitosana-TPP, e a junção entre as duas substâncias (gel de cloridrato de quitosana + nanoparticulas de cloridrato de quitosana), e como controle positivo glicerol 1%, na inibição do desenvolvimento da infecção fúngica (expressa como percentual de redução do diâmetro da lesão fúngica) causadas por *C. siamense, R. stolonifer* e *A. niger* em uvas (em cacho contendo de 6 a 8 unidades de uva) durante o período de 12 dias a 25ºC, e 24 dias a 6ºC, são apresentados nas Figuras 9 e 11, 10 e 12, respectivamente.

No tratamento curativo sob temperatura ambiente (Figura 9), a aplicação das coberturas tratamento resultou em diminuição da gravidade da lesão fúngica em cacho de uva infectado com os fungos fitopatógenos, separadamente. As uvas em cacho revestidas com gel de cloridrato de quitosana + nanoparticulas de cloridrato de quitosana-TPP apresentaram menor gravidade da lesão em comparação aos frutos tratados com glicerol 1% (controle positivo) e com as demais coberturas teste.

A infecção por *A. niger* apresentou maior tolerância as coberturas teste nos tempos de análise verificados, ou seja, maior percentagem de infecção visível nas uvas. O que está de acordo com os experimentos anteriores de atividade antimicrobiana e alteração morfológica e na utraestrutura dos fungos. A infecção causada por este fitopatógeno é facilmente visualizada pelo amolecimento do local infectado e subsequente desenvolvimento de mofo escuro referente às estruturas de frutificação dos fungos. Como é possível observar na figura 9, no nono dia de experimento, as uvas dos tratamentos controle positivo e negativo já estavam totalmente recobertas pelos micélios do *A. niger*. Tendo o grupo composto pelo gel de cloridrato de quitosana associado às nanopartículas a menor percentagem de infecção visível.

Foi possível verificar que, quando comparados os gráficos, o *R. stolonifer* e *C. siamense* apresentaram níveis de infecção semelhantes, principalmente nos grupos de tratamento das nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ) e da mistura de gel de cloridrato de quitosana com as nanopartículas (GCQ + NPCQ). Ao final do experimento (12 dia), ambos os grupos não apresentaram diferença estatística entre si.

Ao final do experimento, o gel de cloridrato de quitosana (GCQ) aprensentou a menor atividade inibidora de infecção visível, tanto no *A. niger*, quanto no *C. siamense.* Já no *R. stolonifer* não apresentou diferença siginificativa quando coparado co o grupo das NPCQ.

No tratamento curativo sob refrigeração (figura 10) foi possível observar nos três fungos testes que os tratamentos de NPCQ e mistura de GQC+NPCQ foram os mais eficazes em inibir o crescimento fúngico visível, com percentagem de infecção inferior a 15% ao final do experimento no 24 dia. Novamente é possível verificar a menor sensibilidade do *A. niger* às substâncias teste, um vez que, ao final do experimento, observou-se a maior contaminação visível entre os três fungos no grupo de tratamento do GQC sob refrigeração.

Figura 9 – Tratamento curativo sob temperatura ambiente com os fungos *A. niger, R. stolonifer* e *C. siamense* frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+).

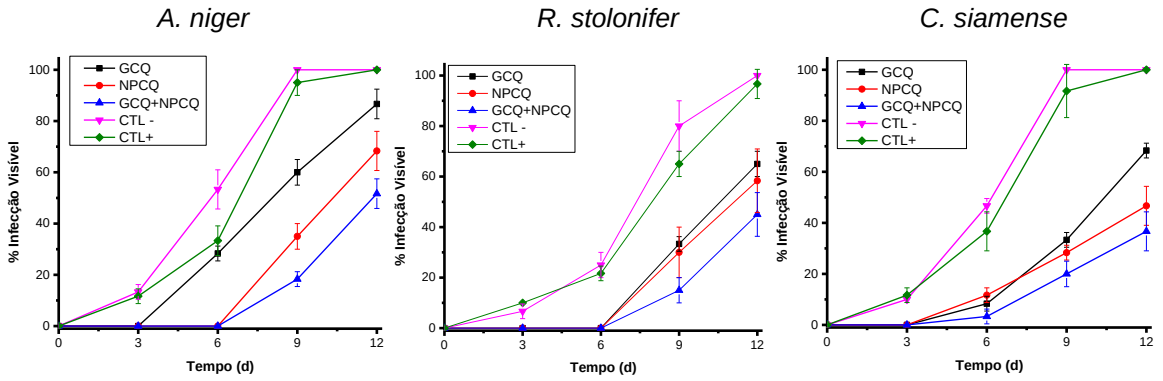
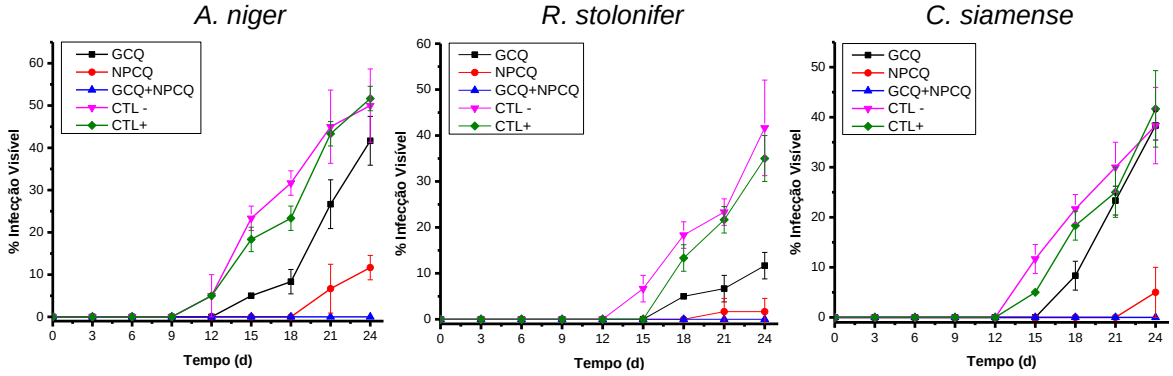


Figura 10 – Tratamento curativo sob temperatura de refrigeração com os fungos *A. niger, R. stolonifer* e *C. siamense* frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+).



Com relação ao tratamento preventivo com as uvas armazenadas temperatura ambiente (figura 11), as lesões características dos fungos diminuíram em relação ao controle positivo, e as coberturas testes, o que reforça o conhecimento de que temperatura de refrigeração auxilia na prevenção do desenvolvimento de infecções em frutas. Durante o armazenamento os valores do percentual de redução da infecção fúngica foram diminuindo em todos os tratamentos, com o prolongamento do tempo de armazenamento.

Através dos gráficos é possível observar comportamento semelhante dos fungos tanto no tratamento preventivo, quanto no tratamento curativo sob temperatura

ambiente contra as substâncias teste (GCQ; NPCQ; GCQ+NPQC), indicando que o nível de atividade antifúngica, neste caso específico com uvas, pode não ter influência se a contaminação ocorreu antes ou depois do revestimento com as substâncias teste.

Figura 11 – Tratamento preventivo sob temperatura ambiente com os fungos *A. niger, R. stolonifer e C. siamense* frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+).

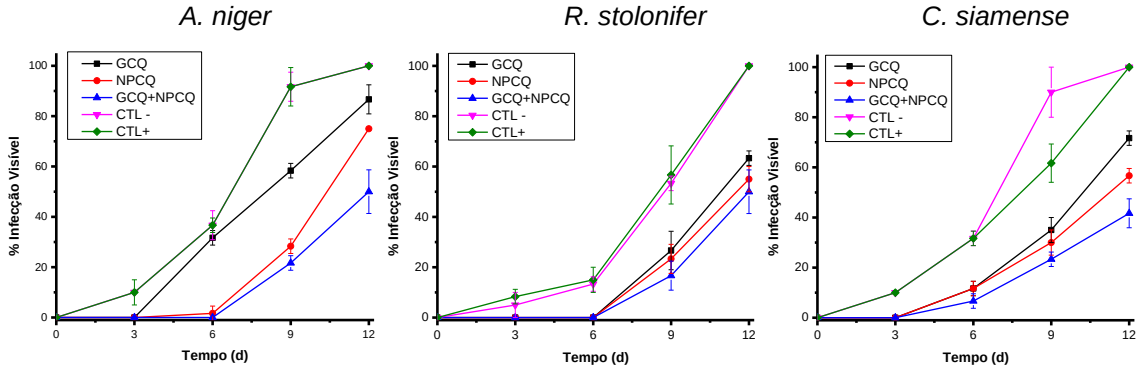
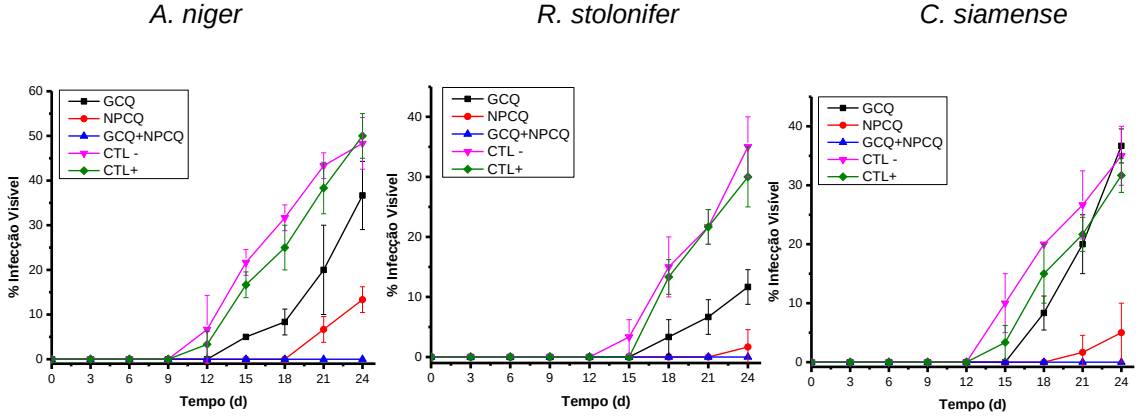


Figura 12 – *Tratamento preventivo sob temperatura ambiente com os fungos* A. niger, R. stolonifer e C. siamense *frente aos tratamentos gel de cloridrato de quitosana (GCQ) nanopartículas de cloridrato de quitosana (NPCQ), gel de cloridrato de quitosana mais nanopartículas de cloridrato de quitosana (GCQ+NPCQ), controle negativo (CTL-) e controle positivo (CTL+).*



No tratamento preventivo sob temperatura de refrigeração (figura 12), seguindo os mesmos resultados obtidos no tratamento curativo sob refrigeração, foi possível observar o prolongamento da vida de prateleira das uvas frente às infecções dos três fungos teste para todos o tratamentos (GCQ; NPCQ; GCQ+NPCQ). No entanto, diferindo dos demais ensaios, o fungo *C. Siamense* foi o mais resistente ao tratamento com o GCQ, apresentando, ao final do experimento, nível de infecção similar ao controle positivo e negativo. Já os tratamentos NPCQ e GCQ+NPCQ apresentaram

os melhores resultados em inibição do crescimento fúngico visível ao final do 24 dia de experimento.

As coberturas comestíveis formam uma barreira semipermeável ao redor da fruta, que regula as trocas gasosas, reduz a perda de umidade e a taxa de respiração, mantendo a sua qualidade (TOVAR et al., 2018; YUAN; CHEN; LI, 2016). Ademais, a presença das nanopartículas em suspensão no gel de cloridrato de quitosana pode ter potencializado as propriedades da barreira física MELO, et al. 2020b). De acordo com Oliveira et al. (2014), baixas temperaturas de armazenamento contribuem para a desaceleração do processo de maturação do fruto, além de diminuir a multiplicação de microrganismos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O preparo das nanoparticulas de cloridrato de quitosana foi otimizado ao variar a percentagem de cloridrato de quitosana e de TPP, bem como a proporção entre eles. As nanoparticulas nas melhores condições de formulaçaço aoresentaram tamanho abaixo de 300 nm, poencial zeta acima de 30 e indice de polidispersão abaixo de 0,5, configurando um sistema estavel, carregado positivamente. Todos os polimeros testados apresentaram ação antifungica, com melhor efetividade para as a cobertura obtida pela junção do cloridrato de quitosna com as nanoparticulas de cloridrato de quitosana. Coberturas comestiveis foram obtidas com gel de cloridrato de quitosana, nanoparticulas de cloridrato de quitosana em glicerol 1%, e pela junção entre gel de cloridrato de quitosana e as nanoparticulas. As coberturas formuladas apresentaram ação antioxidante, baixa toxicidade e baixo potenial de irritação, e atividade antifungica para *A. niger, R. stolonifer, e C. siamense.* Em uvas de mesa as coberturas apresentaram ação curativa e preventiva a infecção pelos fungos testes. Os resultados obtidos sugerem a efetividade das coberturas comestiveis a base de cloridrato de quitosana e de nanoparticulas de cloridrato de quitosana como materiais bioativos a serem utilizados para auxiliar, de forma segura e não toxica, o controle de infecções fungicas em fruta. Sendo uma alternativa para embalagem baseada nos principios da quimica verde, e com aderencia aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentavel 2 e 12, contidos na Agenda ONU 2030.

REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, K. A. et al. Bimetallic blends and chitosan nanocomposites : novel antifungal agents against cotton seedling damping-off. **European Journal of Plant Pathology**, 2017.

ABUQAMAR, S.; MOUSTAFA, K.; TRAN, L. S. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 262-274, 2017.

AHSAN, S. M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 110, p. 97- 109, 2018.

ALGHUTHAYMI, M. A. et al. Silver / Chitosan Nanocomposites : Preparation and Characterization and Their Fungicidal Activity against Dairy Cattle Toxicosis Penicillium expansum. **Journal of Fungi**, v. 6, p. 1–18, 2020.

ALI, J. et al. Effect of Coating of *Aloe Vera* Gelon Shelf Life of Grapes. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 4, n. 1, p. 58-68, 2016.

AMINABHAVI, T. M.; DHARUPANEEDI, S. P.; MORE, U. A. The role of nanotechnology and chitosan-based biomaterials for tissue engineering and therapeutic delivery. In: JENNINGS, J. A; BUMGARDNER, J. D. **Chitosan Based Biomaterials Volume 2**. Woodhead Publishing, 2017. p. 1-29.

APAK, R. et al. et al. Antioxidant activity/capacity measurement. Classification, physicochemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 997-1027, 2016.

ARATA, L.; HAUSCHILD, S.; SCKOKAI, P. Economic and social impact of grape growing in Northeastern Brazil. **Bio-based and Applied Economics Journal**, v. 6, n. 1050-2018-3695, p. 279-293, 2018.

ARNAUD, T. M. S. **Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/quantum dots fluorescentes.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, 2012.

BAGGIO, J. S. et al. Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 633-642, 2016.

BAGLEY, D.M.; WATERS, D.; KONG, B.M.. Development of a 10-day chorioallantoic

membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Food Chem Toxicol**, 32, 1155–1160, 1994.

BATISTA, D. C. et al. First report of *Colletotrichum siamense* causing grape ripe rot in Brazil. **Plant Disease**, n. ja, 2023.

BATTISTELLI, M. et al. *Rhodiola rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behaviour. **European journal of histochemistry**, v. 49, n. 3, p. 243, 2005.

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.

BHANUSHREE, L. S. et al. Influence of chitosan on postharvest behavior of papaya (*Carica papaya* L.) fruits under different storage conditions. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 2, p. 2010-2014, 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC – Resolução da Diretoria Colegiada. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Brasília, DF, 2001.

BUGNICOURT, L.; LADAVIERE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 60, p. 1-17, 2016.

ÇAKIR, M. A.; ICYER, N. C.; TORNUK, F. International Journal of Biological Macromolecules Optimization of production parameters for fabrication of thymol-loaded chitosan nanoparticles. v. 151, p. 230–238, 2020.

CALDERÓN, C. E. et al. *Pseudozyma aphidis* activates reactive oxygen species production, programmed cell death and morphological alterations in the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular plant pathology**, v. 20, n. 4, p. 562-574, 2019.

CARVALHO, F. G. et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on C. albicans biofilm formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, 2019.

CASTRO, C. M. M. B. et al. Effect of stress on the production of O 2− in alveolar macrophages. **Journal of neuroimmunology**, v. 108, n. 1, p. 68-72, 2000.

CAVALCANTI, J. S. B.; DIAS, G. H. Cadeias globais de alimentos, redes de atores e qualidades na produção de frutas para exportação: elos entre Brasil e Alemanha. **Estudos de Sociologia**, v. 2, n. 21, p. 279-310, 2015.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed, Campinas, SP, Editora Unicamp, 2001.

CERECEDO-CRUZ, L. et al. Evaluation of the oxidative stability of Chipotle chili (*Capsicum annuum L*.) oleoresins in avocado oil. **Grasas y Aceites**, v. 69, n. 1, p. 240, 2018

CHAKRABORTY, M.; HASANUZZAMAN, M.; RAHMAN, M. Mechanism of Plant Growth Promotion and Disease Suppression by Chitosan Biopolymer. **Agriculture**, v. 10, n. 624, p. 1–30, 2020.

CHANDRASEKARAN, M.; KIM, K. D.; CHUN, S. C. Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles : A Review. p. 1–21, 2020.

CHANG, F. S.; CHIN, H. Y.; TSAI, M. L. Preparation of chitin with puffing pretreatment. **Research on Chemical Intermediates**, v. 44, n. 8, p. 4939-4955, 2018.

CHENG, Hao et al. Chitosan–catechin coating as an antifungal and preservable agent for postharvest satsuma oranges. **Journal of food biochemistry**, v. 43, n. 4, p. e12779, 2019.

CHIEN, P.; SHEU, F.; LIN, H. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1160-1164, 2007.

CIE – Commission Internationale de Éclairage. **Colourimetry**, 2ª ed. CIE Publication, Vienna, 1986. p.78.

COIMBRA, Luísa et al. Food allergens in oral care products. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 6684, 2023.

COLOMBO, A. S.; BATISTA, K. S.; SABBAG, O. J.. Eficiência da produção de uvas para mesa em pequenas propriedades rurais: aplicação de análise envoltória de dados. **Extensão Rural**, v. 23, n. 3, p. 138-150, 2016.

COSTA, C. L. A.; CERQUEIRA, M. B. R.; GARDA-BUFFON, J. Kresoxim-methyl and famoxadone as activators of toxigenic potential of *Aspergillus carbonarius*. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, n. 12, p. 1860-1870, 2019.

COUTINHO P.L.A., BASTOS J.B.V., ALIJÓ P.H.R., GOULART A.K.. Intensificação de processos e química verde: importância para as indústrias farmacêutica, cosméticos, alimentícia e biorrefinarias. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 74-93. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/704>. Acesso em: 19/04/2023.

CREASY, G. L.; CREASY, L. L. **Grapes.** Crop production science in horticulture. 2. ed, CABI, 2018. p. 1-2.

CRINI, G. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-21, 2019.

DIVYA, K.; JISHA, M. S. Chitosan nanoparticles preparation and applications. **Environmental chemistry letters**, v. 16, n. 1, p. 101-112, 2018.

DOPAZO, V. et al. Potential application of lactic acid bacteria in the biopreservation of red grape from mycotoxigenic fungi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 3, p. 898-907, 2022.

DOPAZO, Victor et al. Bio-preservative potential of microorganisms isolated from red grape against food contaminant fungi. **Toxins**, v. 13, n. 6, p. 412, 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.

EL-GHAFFAR, M. A. A. et al. Amino Acid Combined Chitosan Nanoparticles for Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride. v. 60, n. 4, p. 507–518, 2017.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. A Viticultura no Brasil**. Inteligência e Mercado de Uva e Vinho. 2019a. Disponível em: https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-uva-e-vinho/a-viticultura-no- brasil. Acesso em: 11 set 2019

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ciência que transforma. Resultados e impactos positivos da pesquisa agropecuária na economia, no meio ambiente e na mesa do brasileiro.** Frutas e Hortaliças. 2019b. Disponível em: https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura- brasileira/frutas-e-hortalicas. Acesso em: 11 set 2019.

FARIA-TISCHER, P. C. S; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **BBR- Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32-53, 2012.

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.

FRANCESCHINIS, G.; CASTELLÓ, P. F.; GALDI, M. Simple and ecological obtention of chitin from crustacean waste. **Latin American Applied Research**, v. 48, n. 1, p. 21-25, 2018.

FRANCESCONI, S. et al. Growth , Development and Systemic Acquired Resistance in Two Durum Wheat Genotypes. **Molecules**, v. 25, p. 1–29, 2020.

FREIRE, P.L.L., et al. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents**; 45:183-187, 2015

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.

GIL-SERNA, J. et al. Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. **International journal of food microbiology**, v. 268, p. 35-43, 2018.

GIL-SERNA, J. et al. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. **Food microbiology**, v. 82, p. 240-248, 2019.

GIRMA, B.; SUALEH, A. Prevalence and importance of the mycotoxin and ochratoxin A (OTA) in coffee: A review. **Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation**, v. 10, n. 2, p. 88-100, 2022.

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

GRANATO, D.; NUNES, D. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas: Uma Abordagem Teórico-Prática**. Elsevier Brasil, 2017.

GRYGANSKYI, A. P. et al. Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 6, p. 2007-2018, 2018.

GUERRA, I. C. D. et al. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha* (*piperita* L. or x *villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 34, p. 112-121, 2016.

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.

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.

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.

HE, Y. et al. Pre-Harvest treatment of chitosan oligosaccharides improved strawberry fruit quality. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2194, 2018.

HE, Z. et al. Scalable fabrication of size-controlled chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin. **Biomaterials**, v. 130, p. 28-41, 2017.

HESAMI, G. et al. Fabrication of chitosan nanoparticles incorporated with *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica hulls'* essential oil as a potential antifungal preservative against strawberry grey mould. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, n. 9, p. 4215-4223, 2021.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 6. ed., São Paulo: Instituto Adolf Lutz, v. 1, 2008.

JAIN, K.; MEHRA, N. K.; JAIN, N. Nanotechnology in drug delivery: safety and toxicity issues. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 29, p. 4252-4261, 2015.

JAIN, T.; KUMAR, S.; DUTTA, P. K. Chitosan in the light of nanobiotechnology: a mini

review. **Journal of biomedical technology and research**, v. 1, n. 1, p. 101- 107, 2015.

KANETIS, L.; CHRISTODOULOU, S.; IACOVIDES, T. Fungicide resistance profile and genetic structure of *Botrytis cinerea* from greenhouse crops in Cyprus. **European journal of plant pathology**, v. 147, n. 3, p. 527-540, 2017.

KARA, Z. et al. Effectiveness of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts on fungi and bacteria management. **Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences**, v. 32, n. 3, p. 366-372, 2018.

KASHYAP, P. L.; XIANG, X.; HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. **International journal of biological macromolecules**, v. 77, p. 36-51, 2015.

KASSEMEYER, H. H. Fungi of grapes. In: **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Springer, Cham, 2017. p. 103-132.

KUMAR, V. et al. Chitin and Chitosan: The Defense Booster in Agricultural Field. In: AHMED, S.; KANCHI, S.; KUMAR, G. **Handbook of Biopolymers: Advances and Multifaceted Applications**. Pan Stanford, 2019. p. 93-134.

LAAZIZ, A. et al. Chemical control of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* isolated from Moroccan grapes. **South Asian Journal of Experimental Biology**, v. 7, n. 2, p. 84-91, 2018.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, 1972.

LEVETIN, E. et al. Taxonomy of allergenic fungi. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 3, p. 375-385. e1, 2016.

LEYVA-JÍMENEZ, F. *et al.* Comprehensive review of natural based hydrogels as an upcoming trend for food packing. **Food Hydrocolloids**. 2023. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108124

LI, X. 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, 2019.

LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 300-

306, 2007.

LIU, S.; CHE, Z.; CHEN, G. Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. **Crop Protection**, v. 84, p. 56-61, 2016.

LOPEZ-MOYA, F.; SUAREZ-FERNANDEZ, M.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants. **International Journal of Moleculas Science.** 20 (2):332**.** 2019.

LOVATO, A. et al. Specific molecular interactions between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea* are required for noble rot development in grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 110924, 2019.

LUAN, F. et al. Preparation and characterization of quaternized chitosan derivatives and assessment of their antioxidant activity. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 516, 2018.

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

MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). **Aspergillus: molecular biology and genomics**. Horizon Scientific Press, 2010.

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, p. 56-66, 2018.

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 and Technology**, v. 55, n. 11, p. 3381–3391, 2020a.

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, 2020b.

MELO, N. F. C. et al. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 139, p. 56–66, 2018.

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

MINH, N. C. et al. Preparation of water soluble hydrochloric chitosan from low molecular. **International Journal of Biological Macromolecules**, 121: 718–726, 2019.

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

MUBARAKALI, D. et al. Microbial Pathogenesis An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants. **Microbial Pthogenesis**, v. 114, n. December 2017, p. 323–327, 2018.

MUJTABA, M. et al. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. **International journal of biological macromolecules**, 2018.

NAÇÕES UNIDAS-BRASIL. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil. Acessado em 21 de abril de 2023. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/sdgs#:~:text=Os%20Objetivos%20de%20Desenvolvimento%20Sustent%C3%A1vel%20s%C3%A3o%20um%20apelo%20global%20%C3%A0,de%20paz%20e%20de%20prosperidade.

NOSTRO, A. et al. Effects of *Helichysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 17, n. 6, p. 517-520, 2001.

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.

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.

PAGELS, R. F.; PRUD'HOMME, R. K. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 519-535, 2015.

PETRICCIONE, M. et al. Postharvest treatment with chitosan affects the antioxidant metabolism and quality of wine grape during partial dehydration. **Postharvest biology and technology**, v. 137, p. 38-45, 2018.

PITT, S. J. **Clinical Microbiology for Diagnostic Laboratory Scientists**. 1 Ed, Wiley-Blackwell, 2018. p. 242.

QUINTIERI, L. et al. Effect of gaseous citral on table grapes contaminated by *Rhizopus oryzae* ITEM 18876. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2478, 2022.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food control**, v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, v. 66, n. 24, p. 2851-2856, 2005.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v. 17, n. 5, p. 359-364, 2006.

RITSCHEL, P. S.; MAIA, J. D. G.; SOUZA, R. T. Novas cultivares brasileiras de uvas para mesa e para elaboração de sucos. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 13, n. 1, p. 34-37, 2018.

RODRIGUES, F.A., et al.. Mefloquine-oxazolidine derivatives: A new class of anticancer agents. Chemical Biology and Drug Design. 83:16-131, 2014.

RUPP, S. et al. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2075, 2017.

RUSLAN, N. S. et al. The Influence of Preparation Factors on Physical Characteristics of Chitosan Nanoparticles. **Journal of Physical Science**, v. 31, n. 3, p. 47–60, 2020.

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.

SABARUDIN, A. Preparation and Kinetic Studies of Cross-Linked Chitosan Beads Using Dual Crosslinkers of Tripolyphosphate and Epichlorohydrin for Adsorption of Methyl Orange. v. 2021, 2021.

SAEED, R. M.; DMOUR, I.; TAHA, M. O. Stable Chitosan-Based Nanoparticles Using Polyphosphoric Acid or Hexametaphosphate for Tandem Ionotropic/Covalent Crosslinking and Subsequent Investigation as Novel Vehicles for Drug Delivery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. January, p. 1–21, 2020.

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.

SANTOS, J. A. et al. Comparativo entre diferentes solubilizadores usados na produção de filmes de quitosana. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 13230-13237, 2015.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 13, n. 4, 2003.

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.

SANTOS, S. D. et al. Shrimp waste extract and astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. **Journal of food science**, v. 77, n. 7, 2012.

SATHIYASEELAN, A. et al. pH-controlled nucleolin targeted release of dual drug from chitosan-gold based aptamer functionalized nano drug delivery system for improved glioblastoma treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, n. December 2020, p. 117907, 2021.

SAW, C. L. L., HENG, P. W. S., & LIEW, C. V.. Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. 34(11), 1168–1177, 2008.

SEBASTIAN, J.; ROUISSI, T.; BRAR, S. K. Fungal chitosan: prospects and challenges. **Handbook of chitin and chitosan**, p. 419-452, 2020.

SEYFARTH, F. et al. Antifungal effect of high-and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1-2, p. 139-148, 2008.

SHARMA, A. K. et al. Enhanced shelf life of Thompson Seedless grapes by application of chitosan. **Progressive Horticulture**, v. 49, n. 1, p. 8, 2017.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polimeros**, v. 8, n. 4, p. 63-68, 1998.

SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 4, p. 351-357, 2000.

SILVA, S. B. et al. Water-soluble chitosan derivatives and pH-responsive hydrogels by selective C-6 oxidation mediated by TEMPO-laccase redox system. **Carbohydrate polymers**, v. 186, p. 299-309, 2018.

SILVA, T. C. et al. Chitin, chitosan and biosurfactant production by *Cunninghamella phaeospora* using agroindustrial wastes. In: Mendez-Vilas, A. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, BrownWalker Press, 2016. p. 326-330.

SIRIPATRAWAN U, HARTE BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids** 2010; 24:770-775.

SONKER, N.; PANDEY, A. K.; SINGH, P. Strategies to control post-harvest diseases of table grape: a review. **Journal of wine research**, v. 27, n. 2, p. 105-122, 2016.

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, 2017.

SUN, Y. et al. Cellular uptake of chitosan and its role in antifungal action against Penicillium expansum. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, n. May, p. 118349, 2021.

SUN, Z. et al. Effect of chitosan coatings enriched with lauroyl arginate ethyl and montmorillonite on microbial growth and quality maintenance of minimally processed table grapes (*Vitis vinifera* L. Kyoho) during cold storage. **Food and bioprocess technology**, v. 11, n. 10, p. 1853-1862, 2018.

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.

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

THANDAPANI G, PRASAD PS, SUDHA PN, ANIL S. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 104:1784-1806, 2017.

TIAN, J. et al. Efficacy and possible mechanisms of perillaldehyde in control of *Aspergillus niger* causing grape decay. **International journal of food microbiology**, v. 202, p. 27-34, 2015.

TOSI, M. M. et al. Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. In: **Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients**. Academic Press, 2020. p. 191-211.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against Pseudomonas fluorescens. **International journal of food microbiology**, v. 143, n. 3, p. 205-210, 2010.

VAN KAN, J. A. L. et al. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 1, p. 75-89, 2017.

VARGAS A, et al.. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 59:1162-1176, 2007.

VELOSO, J.; VAN KAN, J. A. L. Many shades of grey in *Botrytis*–host plant interactions. **Trends in plant science**, v. 23, n. 7, p. 613-622, 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

VILLEGAS-PERALTA, Y. et al. Impact of the molecular weight on the size of chitosan nanoparticles : characterization and its solid - state application. **Polymer Bulletin**, n. 0123456789, 2020.

WANG, Y. et al. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism. **Food control**, v. 55, p. 54-61, 2015.

weight chitosan in the solid state. **International Journal of Biological Macromolecules**,

WHITEKER, G. Applications of the 12 Principles of Green Chemistry in the Crop Protection Industry. **Organic Process Research & Development**. 2019. doi:10.1021/acs.oprd.9b00305

WIESE, J. et al. Marine fungi as producers of benzocoumarins, a new class of inhibitors of glycogen-synthase-kinase 3β. **Marine drugs**, v. 14, n. 11, p. 200, 2016.

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

YAN MT, YANG JH, MAU JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**. 74:840-844, 2008.

YAN, L. et al. Formulation and characterization of chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan encapsulated quercetin nanoparticles for controlled applications in foods system and simulated gastrointestinal condition. **Food hydrocolloids**, v. 84, p. 450-457, 2018.

YEMISCI, M. et al. Preparation and characterization of biocompatible chitosan nanoparticles for targeted brain delivery of peptides. In: SKAPER, S. D. (Ed) **Neurotrophic Factors**: methods and protocols, methods in molecular biology. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 443-454.

YOUSSEF, K. et al. Synergistic effect a novel chitosan/silica nanocomposites-based formulation against gray mold of table grapes and its possible mode of action. **International journal of biological macromolecules**, v. 141, p. 247-258, 2019.

ZAKI, O. et al. Particle size affects concentration-dependent cytotoxicity of chitosan nanoparticles towards mouse hematopoietic stem cells. **Journal of Nanotechnology**, v. 2015, 2015.

ZHAO, D. et al. Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles. **Polymers**, v. 10, n. 4, p. 462, 2018.

ZHOU, D. et al. Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 1, p. 166-178, 2018.

ZOUHAIR, S. et al. Effect of five fungicides on growth and ochratoxin A production by two *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolated from Moroccan grapes. **South Asian Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 3, p. 118-126, 2014.

ANEXO A – CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO: AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO E PRODUÇÃO DEALIMENTOS

Volume 4. Edição: 1. Volume: 4 Ano: 2021. ISBN: 978-65-87196-95-4. Páginas: 698

27

José Alberto da Costa Medeiros
UFPE

Ihasmyn dos Santos Nunes
UFPE

Alessandra Silva Araújo
UFPE

Eduardo Alves Carvalho
UFPE

Thayza Christina Montenegro Stamford
UFPE

10.37885/210203317

RESUMO

O progresso obtido na conservação e produção de alimentos encontra barreiras que ne- cessitam de estratégias engenhosas para superá-las. Nessecontexto, ananotecnologia tem sido uma aliada importante, principalmente quando associada com produtos de ori- gem natural, como a quitosana. Diversas são as metodologias utilizadas na produção de nanopartículas. No entanto, quando se trata de aplicação em alimentos, a mais utilizada tem sido a gelificação iônica. As nanopartículas de quitosana por muitas vezes estão associadas com outras substâncias, como óleos essenciais, vitamina C, prata, cobre e outros. Essa mistura pode ter intuito de proteção e liberação controlada desses produtos no alimento, ou ainda potencializar a atividade das nanopartículas. A aplicação de na- nopartículas de quitosana na conservação de alimentos, sejam eles de origem vegetal ou animal, tem se mostrado eficiente e cada dia mais estudada devido suas atividades antimicrobiana e antioxidante. Há de se destacar que as nanopartículas de quitosana apresentam potencial antimicrobiano superior quando comparada a quitosana na sua forma macro. Além disso, resultados promissores têm demonstrado o potencial dessas nanopartículas de quitosana quando utilizadas no cultivo, uma vez que apresentam ativi- dade elicitora em uma variedade de plantas utilizadas na alimentação humana, podendo estimular a

produção de alimentos mais resistentes a pragas e doenças fúngicas. Com essas características, a quitosana tem potencial para ser um auxiliar na segurança alimentar em um futuro próximo.

Palavras-chave: Cobertura Comestível, Biopolimero, Nanotecnologia, Ciência dos Alimentos.

INTRODUÇÃO

A quitosana é um biopolímero modificado, derivado da parcial desacetilação alcalina da quitina. A quitina é constituída por sequência linear das moléculas de N-acetilglicosamina (2- acetamido-2-deoxi-D-glicose) unidas por ligações do tipo □-(1-4), com elevado grau de acetilação. A principal fonte de quitina é a carapaça de crustáceos (camarões, lagostas, ca- ranguejos e siris), mas pode ser encontrada em moluscos, insetos e parede celular fúngica (BERGER et al., 2020; MELO et al., 2018; YADAV et al., 2019).

Os primeiros relatos sobre a quitina datam de 1811, com Henri Braconnot, com pes- quisas em cogumelo. Já a quitosana foi descoberta em 1859 pelo francês Charles Rouget após tratamento da quitina hidróxido de potássio, verificando que a substância formada, ao contrário da quitina, dissolvia-se em soluções ácidas. No entanto, o nome "quitosana" foi dado apenas 35 anos após este fato, pelo alemão Felix Hoppe-Seyler (TIAN; LIU, 2020).

A estrutura da quitosana é composta por ligações do tipo □-(1□4) de N-acetil-D- glico-

samina, encontrada naturalmente em pequenas quantidades na parede celular de fungos (ordem *Mucorales, classe Zygomycetes*). No entanto, sua principal forma de obtenção se dá por remoção parcial dos grupos acetamida da quitina, numa reação de desacetilação. Ao ul- trapassar 50% da desacetilação da quitina, o biopolímero torna-se solúvel em soluções áci- das e insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, aprensentando-se como um polieletrólito catiônico com protonação dos grupamentos amina na presença de íons H^+, passando a se caracterizar como quitosana e não mais quitina (EL KNIDRI et al., 2018; MELO et al., 2018; YADAV et al., 2019).

O grau de desacetilação da quitosana exerce influência direta em suas propriedades químicas (solubilidade, flexibilidade, viscosidade, porosidade, área superficial e resistência à tração) e biológicas (biocompatibilidade, biodegradabilidade, biodisponibilidade, antioxidante e intensificador da adsorção) (TAVARES et al., 2020;

ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

A quitosana é considerada um produto natural, não-tóxico, renovável, de baixo custo, biodegradável, biocompatível, com propriedades para formação de gel e microesferas, e tem sido aplicada em vários ramos industriais, na confecção de embalagens biodegradá- veis/comestíveis, conservante para molhos, agente bactericida/fungicida, no tratamento de água, na fabricação de papel, como defensivo agrícola e adubo, além de outras aplicações (BERGER et al., 2018; EL KNIDRI et al., 2018).

O emprego da quitosana pode ainda ser diversificado por modificações químicas em sua estrutura, os grupos hidroxilas e aminos disponíveis permitem reações, como hidroxi- lação, carboxilação, alquilação, esterificação e acilação. Alterando a estrutura da quitosana formam-se seus derivados que, em geral, apresentam solubilidade, propriedades biológicas e físico-químicas aprimoradas. Dentre os derivados da quitosana pode-se citar o cloridrato

de quitosana, carboximetilquitosana, hidroxietil quitosana, quitosana N-alquilada, quito- sana N-succinilada, quitosana na forma neutra e quitosana sulfatada (FORTUNATI et al., 2017; GE et al., 2018). Essas características da quitosana e seus derivados podem ser potencializadas com o emprego de nanotecnologia.

DESENVOLVIMENTO

SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS QUITOSANA

A cada dia mais pesquisas são feitas com elaboração de nanopartículas das mais variadas origens e ramos científicos, devido propriedades incomuns de ordem óptica, fo- toeletroquímica, eletrônica e química dessas substâncias. A classificação do tamanho das partículas não é um consenso, alguns pesquisadores consideram nanopartículas aquelas com dimensões entre 1 e 100 nm (nanômetros), já outros incluem até escala de 1000 nm. A área superficial por unidade de massa das nanopartículas é superior quando com- parada às estruturas na dimensão macro, apresentando maior disponibilidade de interação com outras moléculas, sistemas, células, etc. (BERGER et al., 2020; MELO et al., 2018; ZAKI; IBRAHIM; KATAS, 2015).

O emprego da quitosana para elaboração de nanopartículas é amplamente estudado e diversas são as metodologias utilizadas. Dentre as metodologias pode-se citar: gelificação iônica; micela reversa; microemulsão; difusão de solvente de emulsificação; e complexo polieletrolítico. Com destaque para a gelificação iônica por sua simplicidade de execução e dispensar a utilização de surfactantes e solventes orgânicos (CARVALHO et al., 2019).

A gelificação iônica foi descrita pela primeira vez por Calvo et al. (1997), em que, após a dissolução da quitosana em solução ácida, se adiciona o agente reticulante sob agitação constante à temperatura ambiente. A propriedades das nanopartículas (tamanho, carga su- perficial e formato) podem ser alteradas/otimizadas pelo tipo de quitosana (de acordo com o peso molecular e grau desacetilação), concentração da solução ácida utilizada na diluição da quitosana, velocidade de agitação, tipo e

concentração do agente reticulante (DIVYA; JISHA, 2018; ZAKI; IBRAHIM; KATAS, 2015).

O agente reticulante mais utilizado para formação de nanopartículas para uso em ali- mentos é o tripolifosfato de sódio (TPP). A gelificação iônica consiste na interação eletrostática quitosana (carregada positivamente) com o TPP (carregado negativamente), que ao entrar em contato com a quitosana causa sua reticulação iônica, formando partículas coloidais es- féricas que precipitam. O pareamento do TPP e da quitosana proporciona às nanopartículas um caráter anfotérico, ou seja, capaz de reagir em meio ácido ou básico. As nanopartículas

formadas por esse método são consideradas atóxicas, estáveis e com alta carga superficial positiva (WANG; JUNG; ZHAO, 2017).

Essas nanopartículas têm sido descritas como sendo um material com propriedades físicas e bioquímicas aprimoradas, sendo mais eficazes como agente antimicrobiano que o gel de quitosana, devido à sua elevada área superficial, que interagem com as superfícies das células bacterianas (MELO et al., 2018).

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA EM ALIMENTOS

As medidas para conservação de alimentos, como frutas e produtos de origem animal (queijos, carnes resfriadas), mais utilizadas são aplicação de um sistema de cadeia de frio/ baixa temperatura, sanitizantes sintéticos, tratamentos térmicos para inibição de enzimas e microrganismos no caso de minimamente processados e, mais recentemente, aplicação de embalagens com atmosfera modificada, que tendem a retardar o processo de maturação/ senescência e infecções com consequente deterioração dos alimentos. Todas essas medi- das são eficazes em certo grau, no entanto, tendem a elevar os custos que são repassados ao consumidor final (AMJADI et al., 2020; LIN; GU; CUI, 2019; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2017; OJEDA et al., 2019).

Assim, outras alternativas coadjuvantes estão sendo testadas, como a utilização de bioembalagens/filmes de revestimento comestível. Tais embalagens/filmes, mesmo não reduzindo o custo de produção do alimento, possibilitam prolongar a vida de prateleira dos produtos alimentíceos reduzindo assim o volume de perdas. Dentro dessas bioembala- gens podemos encontrar diversos produtos com potencial de utilização, a citar o alginato, gelatina, celulose e a quitosana. As bioembalagens, além de atuarem como barreira física, apresentam atividades especiais, como antimicrobiana e antioxidante (HASHIM; YOUSSEF; ABD-ELSALAM, 2019; MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2015).

Devido a capacidade de formação de gel da quitosana, além de suas propriedades antimicrobianas, a forma mais comum de aplicação em alimentos é como cobertura de co- mestível. Esse revestimento envolve todo o alimento formando

uma película fina que atua na conservação dos mesmos, não apenas evitando a contaminação/multiplicação de mi- crorganismos deteriorantes ou patogênicos, mas, no caso de frutas e legumes, controlando aspectos relacionados a maturação (produção de etileno, teor de sólidos solúveis), trocas gasosas, retenção perda de umidade, mantendo as características organolépticas dos ali- mentos (MA et al., 2019; MELO et al., 2018, 2020).

A atividade antimicrobiana da quitosana e suas demais propriedades tem levado ao de- senvolvimento nanossistemas mistos, onde a quitosana é associada com metais ou se torna um carreador de compostos naturais ou sintéticos, que possuem um agente antimicrobiano

intrínseco, para aplicação em alimentos. Tais como os óleos essenciais e seus constituintes majoritários, prata, cobre, proteínas do soro do leite, gelatina, óxido nítrico, pectina e outros. Todas essas substâncias apresentam alguma finalidade, seja ela ampliação do espectro de atividade antimicrobiana, barreira mecânica ao vapor d'água, agregação de atributos nutri- cionais/funcionais, estabilização e melhoria das propriedades plásticas da quitosana para revestimento dos alimentos, liberação controlada de alguma substância bioativa englobada pelas nanopartículas de quitosana (MARTÍNEZ- HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2017; MELO et al., 2019; ORTIZ-DUARTE et al., 2019; SIDDAIAH et al., 2018).

A associação da quitosana e seus derivados com óleos essenciais tem sido amplamente estudada, apresentando resultados promissores no combate à microrganismos deterioran- tes e patogênicos, além de atuarem na preservação dos alimentos, principalmente quando utilizados como cobertura comestível. No caso dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários, com comprovada atividade antimicrobiana, é comum a utilização de nanopartí- culas de poliméricas, com destaque para a quitosana para englobamento dessas substâncias e posterior liberação controlada no alimento. Uma vez que os óleos essenciais apresentam natureza lipofílica, evaporam e são oxidados com facilidade durante o processamento devido exposição direta à luz e ao oxigênio, torna-se difícil sua dissolução em soluções aquosas para serem usados no tratamento de frutas e vegetais. Assim, a associação com a quitosa- na é uma estratégia viável para utilização dessas substâncias, principalmente nas formas de cobertura comestível e/ou solução para higienização de alimentos (geralmente vegetais minimamente processados) (CAMPOS et al., 2018; GHADERI-GHAHFAROKHI et al., 2017; LIN; GU; CUI, 2019; YILMAZ et al., 2019).

A diversidade de alimentos tratados com nanopartículas de quitosana e seus deri- vados expande a cada dia. Em geral, a maioria dos estudos utilizam produtos de origem vegetal. No entanto, testes com alimentos de origem animal são promissores, como no caso de estudo realizado por Diao, Huan e Chitrakar (2020), no qual estudaram coberturas comestíveis de nanopartículas de carboximetilquitosana e extrato aquoso de alho preparadas por meio de tratamento ultrassônico para estender a vida de prateleira de carne de frango condimentada "pronta para comer" (ready-to- eat: RTE).

Os dados disponibilizados na literatura científica quanto ao revestimento de hortifrútis com nanopartículas de quitosana apontam processo de maturação mais lento, prolongando sua vida de prateleira, assim, apresentam menor teor de sólidos solúveis e açúcares redu- tores, uma vez que essas moléculas são formadas durante a maturação, clivando macro- moléculas e, consequentemente liberando suas subunidades. Como também menor teor de desidratação, uma vez que a respiração e demais processos metabólicos são mais lentos

e o próprio revestimento serve como barreira física no controle dessa perda de fluidos (MA et al., 2019; MELO et al., 2018; SAHARAN et al., 2015; SILVA et al., 2020).

Assim, a bioembalagem de quitosana é capaz de suprimir a respiração, modificar a microatmosfera, reduzindo concentração de oxigênio e aumentando de gás carbônico, além de reduzir atividade do etileno (relacionado a maturação). E todos esses efeitos são melho- res observados sob refrigeração, uma vez que o frio por si só reduz atividades metabólicas (HASHIM; YOUSSEF; ABD-ELSALAM, 2019; MA et al., 2019; MELO et al., 2020).

A forma mais convencional de revestimento é por imersão do alimento na solução contendo as nanopartículas. Outro método de aplicação é por borrifamento dessas substân- cias sobre o alimento. Existe ainda a possibilidade de formação de filmes comestíveis com base em nanopartículas quitosana que são elaborados separadamente e então aplicados sobre o alimento.

Processo semelhante ao envolvimento de alimentos com filme PVC (policloreto de vinila) (HASHIM; YOUSSEF; ABD-ELSALAM, 2019; LIN; GU; CUI, 2019; MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2015).

Um detalhe importante quando se trata da aplicação de nanopartículas de quitosana como revestimento, é que essas partículas, em geral, não apresentam capacidade de for- mação de gel, necessitando então de alguma substância com tal propriedade para serem diluídas e poder revestir o alimento. Dentre as substâncias utilizadas é frequente o uso do gel de quitosana, gelatina, glicerol e outros. Assim, as nanopartículas são diluídas numa solução com propriedade de formação de gel e, os alimentos são inseridos nessa mistura de gel com nanopartículas por determinado tempo. Após a retirada do alimento e devida secagem, um filme é formado sobre toda sua superfície conferindo-lhe todos os mecanismos de proteção já citados. Já no caso de alimentos de origem animal, a aplicação de nanopartículas de quitosana pode contribuir na conservação prevenindo a oxidação lipídica, elevação do pH e proliferação microbiana, mantendo a coloração e demais aspectos sensoriais, como em hambúrgueres, carne fresca e peixes (GHADERI-GHAHFAROKHI et al., 2017; MARTÍNEZ- HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2017; MELO et al., 2020).

A resistência do revestimento é uma propriedade mecânica que depende da estrutura e composição das substâncias utilizadas na sua produção. O peso molecular

da quitosana influencia diretamente esse parâmetro, assim como a concentração das nanopartículas e outras substâncias adicionadas. A atividade antioxidante pode ser influenciada também, uma vez que pesquisas apontam que quitosana de baixo peso molecular apresentam maior atividade antioxidante total se comparada com a de alto peso molecular. Da mesma forma, a atividade antimicrobiana do revestimento pode ser afetada por esses fatores (AMJADI et al., 2020; KRITCHENKOV et al., 2020; ORTIZ-DUARTE et al., 2019; SIDDAIAH et al., 2018).

A permeabilidade ao oxigênio do revestimento é outro fator de grande importância para a conservação dos alimentos. O oxigênio pode induzir reações de oxidação que resultam em alterações das características dos alimentícios (sabor, cor e odor) e deterioração dos nutrientes. Portanto, os filmes de revestimentos devem ter uma permeabilidade adequada para prolongar a vida de prateleira do alimento. A troca de vapor d'água entre o alimento e o meio externo também afeta a qualidade do produto. Um importante requisito para o reves- timento é prevenir ou reduzir a troca de umidade entre o alimento e a atmosfera circundante (KRITCHENKOV et al., 2020).

A elevada concentração de nanopartículas de quitosana e outras substâncias (óleos essenciais, prata, cobre e etc.) no revestimento de alimentos pode não ser desejável, uma vez que elas podem se aglomerar e influenciar diretamente na plasticidade do revesti- mento, induzindo sua ruptura, aumentando a permeabilidade ao oxigênio e vapor d'água (KRITCHENKOV et al., 2020; ORTIZ-DUARTE et al., 2019; YADAV; MEHROTRA; DUTTA,

2021). Na tabela 1 é possível verificar a aplicação de nanopartículas de quitosana e seus derivados, associados ou não com diversas substâncias, em alimentos.

Tabela 1. Nanopartículas de quitosana aplicados em alimentos

SUBSTÂNCIAS	TÉCNICA	ALIMENTOS	FINALIDADE	RESULTADOS	AUTORES E ANO
Nanopartículas de quitosana-carvacrol	Gelatinização iônica – TPP	Cenoura –minimamente processada	Higienização	Manutenção da qualidade microbiológica e sensorial	MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2017
Nanopartículas de quitosana-OE de canela	Gelatinização iônica – TPP	Pepino	Cobertura comestível	Redução da taxa de respiração, manutenção da segurança microbiológica, peso do fruto e a qualidade dos pepinos durante	ALI MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2015

				armazenamento	
Nanopartículas de quitosana-ácido ascórbico	Gelatinização iônica – elo TPP	Cogumelo minimamente processado	Avaliar estabilidade antioxidante e escurecimento enzimático	Retardamento do efeito do escurecimento enzimático, manutenção da firmeza, maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante	OJEDA et al., 2019
Nanopartículas de quitosana-cobre-sílica	Método de precipitação com sonicação – Sulfato de sódio anidro	Uva de mesa	Aplicação em spray para controle do desenvolvimento fúngico	Retardamento do desenvolvimento de *B. cinerea* nas uvas em laboratório e no campo de cultivo. Autores sugerem possibilidade de atividade sinérgica da associação de nanopartículas de quitosana e sílica	HASHIM; YOUSSEF; ABD-ELSALAM, 2019
Nanopartículas de quitosana	Gelificação iônica – TPP	Uva de mesa	Cobertura comestível	Retardo na maturação, manutenção dos atributos umidade, acidez e sólidos solúveis. Atividade contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P aeruginosa*, *Salmonella* spp. e *E.coli*.	MELO et al., 2018
Nanopartículas de quitosana-óleo moringa-gelatina	Emulsão/ gelificação iônica – TPP	Queijo Cheshire	Nanofibra como revestimento	Controle de *L. monocytogenes* e *S. aureus* no queijo. Não afetou negativamente atributos sensoriais	LIN; GU; GUI, 2019

QUITOSANA NA AGRICULTURA

A utilização de nanopartículas de quitosana ou de seus derivados em alimentos é ampla, tendo pesquisas com produtos de origem vegetal e animal, desde queijos, produtos cárneos, peixes, uvas, morangos, cerejas, entre outros. E esta aplicação não se limita, no caso de vegetais, ao pós- colheita, uma vez que estudos demonstram que aplicação de formas nanoparticuladas da quitosana podem ser aplicadas durante o cultivo, melhorando características próprias dos alimentos, como teor de compostos fenólicos, atividade anti- microbiana e antioxidante. Dentre outros benefícios relacionados a aplicação da quitosana no cultivo, pode-se relatar o tratamento de sementes, melhorando o combate a infecções fúngicas, amplificando os mecanismos de defesa da planta (AMJADI et al., 2020; CAMPOS et al., 2018; DIAO; HUAN; CHITRAKAR, 2020; LI et al., 2019).

Como já dito, a quitosana pode ser uma aliada no pré e pós-colheita. A manipulação ge- nética, manejo da cultura, uso de fertilizantes e defensivos agrícolas são meios utilizados para melhorar a produção e reduzir o volume de perdas devido pragas e doenças. Influenciando diretamente na manutenção da oferta e da qualidade dos alimentos. Nesse contexto, estu- dos apontam que a aplicação de nanopartículas de quitosana em sementes antes do plantio pode induzir resistência sistêmica a doenças fúngicas em diversos tipos de plantas, como em tomate, trigo, milhete e arroz (SAHARAN et al., 2015; SIDDAIAH et al., 2018).

Quando submetidas a algum patógeno ou estresse por fator abiótico, muitas plantas produzem proteínas e peptídeos de baixo peso molecular que apresentam atividade anti- microbiana, as chamadas proteínas relacionadas à patogênese. Algumas dessas proteínas são enzimas hidrolíticas, como a quitinase e a □-1,3-glucanase. Considerando que o exoes- queleto de insetos e parede celular fúngica são compostos por quitina e/ou □-D-glucano, a quitinase e □-1,3-glucanase são capazes hidrolisar esses elementos, decompondo a pare- des celular, evitando assim o desenvolvimento do fungo na planta. Nesse sentido, tem-se observado o efeito da quitosana em estimular a produção dessas proteínas relacionadas à patogênese como mecanismo de defesa da planta para infecções futuras (SAMARAH et al., 2020;

SATHIYABAMA; MANIKANDAN, 2018).

Outra forma de atuação como agente elicitor da quitosana, é pelo estímulo à produção e acúmulo de metabólitos secundários relacionados à ao sistema de defesa do vegetal. Pode-se destacar as fitoalexinas (inclusas em várias classes: terpenóides, isoflavonóides e alcaloides), que são compostos antifúngicos e antioxidantes; os precursores da lignina, que está relacionada diretamente com maior resistência mecânica da parede celular da planta à penetração de fungos; os compostos fenólicos (como o ácido rosmarínico, ácido cloro- gênico) com atividades antioxidante e antimicrobiana; e a melhor deposição de placas de

calose, como resposta a ferimento causado pela penetração do fungo (MOHAMED, 2019; SIDDAIAH et al., 2018).

Deve-se destacar o potencial das nanopartículas de quitosana e derivados quando comparadas com a quitosana na sua forma macro. Uma vez que as evidências e pesquisa- dores sugerem que a utilização das nanopartículas, em concentrações inferiores em relação à quitosana em seu estado natural, apresentam a mesma atividade ou ainda superior como elicitador em plantas usadas na alimentação humana. Essa atividade estimulante de resis- tência está relacionada a atividade de algumas enzimas de defesa das plantas, junto com a peroxidase, catalase, fenilalanina amônia-liase, superóxido dismutase e oxidase (LI et al., 2019; MA et al., 2019; SIDDAIAH et al., 2018).

Em estudo realizado por Silva et al. (2020) foi realizada aplicação, em videiras da variedade Sousão, de soluções de quitosana e nanopartículas de quitosana para avaliação comparativa dos teores de compostos fenólicos, atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos alcoólicos das sementes, cascas e caules das uvas tratadas e não tratadas. Em li- nhas gerais, observaram aumento na concentração de compostos fenólicos, atividade an- tioxidante e antimicrobiana daquelas que foram tratadas com as soluções de quitosana e nanopartículas de quitosana em relação aquelas não tratadas. No entanto, os autores relatam surpresa ao não identificarem melhor atividade nesses parâmetros do grupo das nanopartículas em comparação ao grupo tratado apenas com a quitosana.

O controle de pragas é uma das árduas tarefas para produtores de alimentos. A aplica- ção de inseticidas e repelentes torna-se prática constante nos campos, no entanto, muitas dessas substâncias estão sendo suspeitas de serem prejudiciais ao meio ambiente e seres humanos. Assim, estudos estão sendo realizados com substâncias naturais, como a quito- sana, para atuarem como inseticidas. A associação de nanopartículas de quitosana consti- tuintes de óleos essenciais já demonstrou atividade inseticida e repelente contra *Helicoverpa armigera* (lagarta) e *Tetranychus urticae* (ácaro) em feijão (CAMPOS et al., 2018).

CONCLUSÃO

Com as informações apresentadas fica evidente que as nanopartículas de quitosana e seus derivados possuem papel importante quando se trata da alimentação humana, uma vez que podem auxiliar na produção, como agente estimulante de crescimento, de resistência a pragas e doenças. E também atuam na conservação dos alimentos, prolongando a vida de prateleira e mantendo a qualidade dos mesmos. Com isso, é possível pressupor que a utilização das nanopartículas de quitosana em benefício da alimentação humana estará cada dia mais presente num futuro não tão longínquo.

REFERÊNCIAS

1. AMJADI, S. et al. Multifunctional betanin nanoliposomes-incorporated gelatin/chitosan nanofi- ber/ZnO nanoparticles nanocomposite film for fresh beef preservation. **Meat Science**, v. 167, n. April, p. 108161, 2020.

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

3. BERGER, L. R. R. et al. Agroindustrial waste as ecofriendly and low-cost alternative to pro- duction 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.

4. CAMPOS, E. V. R. et al. Carvacrol and linalool co-loaded in β-cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1– 14, 2018.

5. CARVALHO, F. G. et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Col- loidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, 2019.

6. DIAO, X.; HUAN, Y.; CHITRAKAR, B. Extending the shelf life of ready-to-eat spiced chicken meat: garlic aqueous extracts-carboxymethyl chitosan ultrasonicated coating solution. **Food and Bioprocess Technology**, n. 2014, 2020.

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

8. EL KNIDRI, H. et al. Extraction, chemical modification and

characterization of chitin and chi- tosan.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 120, p. 1181–1189, 2018.

9. FORTUNATI, E. et al. Effective postharvest preservation of kiwifruit and romaine lettuce with a chitosan hydrochloride coating. **Coatings**, v. 7, n. 11, 2017.

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

11. GHADERI-GHAHFAROKHI, M. et al. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Appli- cation as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. **Inter- national Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 19–28, 2017.

12. HASHIM, A. F.; YOUSSEF, K.; ABD-ELSALAM, K. A. Ecofriendly nanomaterials for controlling gray mold of table grapes and maintaining postharvest quality. **European Journal of Plant Pathology**, 2019.

13. KRITCHENKOV, A. S. et al. Efficient reinforcement of chitosan-based coatings for ricotta chee- se with non-toxic, active, and smart nanoparticles. **Progress in Organic Coatings**, v. 145, n. February, p. 105707, 2020.

14. LI, R. et al. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (Triticum aestivum L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 91– 100, 2019.

15. LIN, L.; GU, Y.; CUI, H. Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 86–93, 2019.

16. MA, Y. et al. Enhancement of storability and antioxidant systems of sweet cherry fruit by nitric oxide- releasing chitosan nanoparticles (GSNO-CS NPs). **Food Chemistry**, v. 285, p. 10–21, 2019.

17. MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G. Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrots. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 56– 63, 2017.

18. MELO, N. F. C. et al. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 139, p. 56–66, 2018.

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

20. MELO, P. T. S. et al. Combining cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) puree, pectin, and chi- tosan nanoparticles into novel edible films for food packaging applications. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 8, p. 2228–2233, 2019.

21. MOHAMED, E. A. Copper and chitosan nanoparticles as potential elicitors of innate immune response in date palm: a comparative study. **Archives of Phytopathology and Plant Protec- tion**, v. 52, n. 17–18, p. 1276–1288, 2019.

22. MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Chitosan nanoparticles loaded with *Cin- namomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110,

p. 203–213, 2015.

23. OJEDA, G. A. et al. Chitosan/tripolyphosphate nanoaggregates enhance the antibrowning effect of ascorbic acid on mushroom slices. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 110934, 2019.

24. ORTIZ-DUARTE, G. et al. Ag-chitosan nanocomposites in edible coatings affect the quality of fresh-cut melon. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 174–184, 2019.

25. SAHARAN, V. et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles

26. against pathogenic fungi of tomato. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 346– 353, 2015.

27. SAMARAH, N. H. et al. Treatment of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds with chitosan increases chitinase and glucanase activities and enhances emergence in a standard cold test.

28. **Scientia Horticulturae**, v. 269, p. 109393, 2020.

29. SATHIYABAMA, M.; MANIKANDAN, A. Application of copper-chitosan nanoparticles stimulate growth and induce resistance in finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.) plants against blast disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1784–1790, 2018.

30. SIDDAIAH, C. N. et al. Chitosan nanoparticles having higher degree of acetylation induce resis- tance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. **Nature**, p. 1–14, 2018.

31. SILVA, V. et al. Comparative insight upon chitosan solution and chitosan nanoparticles appli- cation on the phenolic content , antioxidant and antimicrobial activities of individual grape components of Sousão variety. **Antioxidants**, v. 9, n. 2,

p. 178, 2020.

32. TAVARES, L. et al. Effect of deacetylation degree of chitosan on rheological properties and physical chemical characteristics of genipin- crosslinked chitosan beads. **Food Hydrocolloids**, v. 106, 2020.

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

34. WANG, W.; JUNG, J.; ZHAO, Y. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1246– 1253, 2017.

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

36. YADAV, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Chitosan based ZnO nanoparticles loaded galli-

c-acid films for active food packaging. **Food Chemistry**, v. 334, n. July 2020, p. 127605, 2021.

37. YILMAZ, M. T. et al. Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan na- noparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, p. 166–178, 2019.

38. ZAKI, S. S. O.; IBRAHIM, M. N.; KATAS, H. Particle size affects concentration-dependent cytotoxicity of chitosan nanoparticles towards mouse hematopoietic stem cells. **Journal of Nanotechnology**,

v. 2015, 2015.

39. ZHUANG, C.; ZHONG, Y.; ZHAO, Y. Effect of deacetylation degree on

properties of chitosan

films using electrostatic spraying technique. **Food Control**, v. 97, p. 25–31, 2019.