



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA-TRIPOLIFOSFATO E SEU POTENCIAL COMO
ANTIFÚNGICO NATURAL PARA APLICAÇÃO POR ASPERSÃO EM
FRUTAS FRESCAS”**

Taís Téó de Barros Alexandrino*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis

***Bolsista CAPES – 88882.426497/2019-01**

**São Carlos – SP
2020**

TAÍS TÉO DE BARROS ALEXANDRINO

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA-TRIPOLIFOSFATO E SEU POTENCIAL COMO
ANTIFÚNGICO NATURAL PARA APLICAÇÃO POR ASPERSÃO EM
FRUTAS FRESCAS”**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo
Embrapa Instrumentação

Prof. Dra. Lucimeire Pilon
Embrapa Hortaliças

Prof. Dr. Marcos David Ferreira
Embrapa Instrumentação

Prof. Dra. Milena Martelli Tosi
Departamento de Engenharia de Alimentos – FZEA/USP

Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis
Embrapa Instrumentação

São Carlos – SP
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Taís Téó de Barros, realizada em 20/05/2020, com o título: Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana-tripolifosfato e seu potencial como antifúngico natural para aplicação em frutas in natura via spray

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis (UFSCar), participando à distância

Profa. Dra. Milena Martelli Tosi (FFCLRP/USP), participando à distância

Profa. Dra. Lucimeire Pilon (EMBRAPA), participando à distância

Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo (EMBRAPA), participando à distância

Prof. Dr. Marcos David Ferreira (EMBRAPA), participando à distância

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Julgadora, consta no Sistema Eletrônico de Informações da UFSCar (SEI) e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Agradecimentos

Ao meu marido, André, pelo apoio incondicional, companheirismo, cumplicidade, amizade, amor, compreensão e paciência, **muita paciência**.

Aos meus pais, irmão e avó, pelo carinho, amor, incentivos, conselhos e apoio em todas as fases e decisões da minha vida.

Às minhas amigas Bruna Adrielle e Thaís Fávero, pela amizade, parceria e por, mesmo de longe, torcerem pelas minhas conquistas e crescimento pessoal, me incentivando em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis, pela orientação, oportunidade, confiança e apoio, que foram essenciais para realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a Milena Martelli Tosi pela orientação, apoio, confiança e incentivo. Agradeço, também, pela relação de amizade que desenvolvemos ao longo desses mais de 9 anos.

Às técnicas da Embrapa Instrumentação Adriana Thomazi, Silviane Hubinger, Joana Bresolin e Viviane Farias por todo o auxílio e apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas de laboratório, João, Camila, Vanessa, Bárbara, Jéssica e Paulo pela colaboração, amizade, parceria e momentos de descontração.

À CAPES, pelo auxílio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Barros-Alexandrino, Taís Téó de. **Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana-tripolifosfato e seu potencial como antifúngico natural para aplicação por aspersão em frutas frescas**. 2020. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2020.

Resumo

A contaminação por patógenos é um problema que ocorre em escala global e está relacionada a aproximadamente 25% das perdas totais de frutas e hortaliças na condição pós-colheita. Os antimicrobianos sintéticos que são usualmente empregados com o objetivo de minimizar essas perdas podem, se não aplicados de forma racional, gerar impactos indesejáveis na saúde humana e no meio ambiente. Registra-se assim uma crescente conscientização e preferência por alimentos saudáveis, ausentes de defensivos químicos. Uma alternativa para atender tais demandas é o desenvolvimento de fungicidas naturais que possam atuar de maneira satisfatória com baixo impacto ou efeitos secundários. Neste contexto, a quitosana tem sido considerada como uma alternativa viável para o desenvolvimento de antimicrobianos, principalmente por ser um material biodegradável e oriundo de fontes naturais. Na forma diluída convencional já está comprovada sua ampla ação antimicrobiana. No presente trabalho, a síntese de nanopartículas do sistema Quitosana-Tripolifosfato de sódio (NPQui-TPP), e o potencial antifúngico de suas suspensões em meio aquoso foram avaliados como agente antimicrobiano em aplicações tópicas em frutas via *spray*. A premissa é que quanto maior a área superficial do particulado, maior serão as interações superficiais entre as moléculas de quitosana e os patógenos. As NPQui-TPP foram sintetizadas pelo método de geleificação ionotrópica em parâmetros experimentais avaliados e otimizados para uma padronização do processo, sendo definidas as melhores condições como: altura de gotejamento do agente reticulante (TPP) a 8 cm com relação a superfície do gel de quitosana, sob agitação de 1500 rpm e posterior ultrassonicação com 30% de amplitude durante 2 minutos. Nestas condições NPQui-TPP com diâmetro médio de 117,3 nm foram geradas e avaliadas *in vitro* nas concentrações de 8 e 9 g/L com efetivas ações na inibição do crescimento de *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* inoculados em meio BDA. Formulação para aplicação tópica foi preparada com 9 g/L (concentração de partículas em suspensão) e aplicada por aspersão em maçãs e goiabas, inoculadas ou não com os fungos em análise, para as avaliações da atividade *in vivo*. Coberturas na condição não-nanoparticulada (gel de quitosana) também foram ensaiadas para comparação. Os resultados indicaram atividades superiores das NPQui-TPP com respeito às coberturas não nanoparticuladas. A cobertura nanoparticulada promoveu diminuição de 55 % nas perdas de firmeza nas goiabas e 38,7 % nas maçãs. Adicionalmente, proporcionou uma diminuição de 24 % no crescimento fúngico das maçãs e 28 % nas goiabas, com alterações colorimétricas da ordem de 13,7 % nas maçãs, tendo por base comparativa amostras controle não revestidas, para medidas realizadas ao longo de 14 dias. Embora os exatos mecanismos pelos quais ocorra a atividade antimicrobiana da quitosana ainda não estejam plenamente elucidados, ficou evidente que a utilização de quitosana na forma nanoparticulada apresenta atividades antifúngicas e de conservação superiores, o que foi atribuído a sua alta área superficial e consequentemente uma maior amplitude de interações.

Palavras-chave: *Alternaria alternata*. Coberturas comestíveis. Conservação Pós-Colheita. Geleificação Ionotrópica. Nanotecnologia. *Penicillium expansum*.

Barros-Alexandrino, Taís Téó de. **Synthesis and characterization of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and their potential as a natural antifungal agent for application by sprinkling on fresh fruits.** 2020. PhD Thesis (Post-graduation Program in Biotechnology) – UFSCar, São Carlos, 2020.

Abstract

Contamination by pathogens is a problem that occurs on a global scale and is related to approximately 25% of total fruit and vegetables losses in the post-harvest condition. The synthetic antimicrobials usually applied in order to minimize these losses, if not used in a moderate way, might generate undesirable impacts on human health and to the environment. So, a growing awareness and preference for healthy foods, absent of chemical pesticides, is in course. An alternative to meet these demands is the development of natural fungicides, which can act satisfactorily and with low impact or side effects. In this context, chitosan has been considered as a suitable alternative for the development of antimicrobials, mainly due its natural source and biodegradability. In conventional diluted form, chitosan has already proved to have a broad antimicrobial activity. In the present study, the synthesis of nanoparticles from the Chitosan-Tripolyphosphate (NPQui-TPP) system and their antifungal potential, when in aqueous suspensions, were evaluated in topical applications on fruits via spray. The premise is that as larger the particulate area, the greater will be the surface interaction between chitosan molecules and pathogens. The NPQui-TPP were synthesized by the ionotropic gelation method, and several experimental parameters evaluated aiming at the optimization and standardization of the process, where the following conditions were defined: height of 8 cm between intercrossing (TPP) dropping and the chitosan gel surface, under agitation of 1500 rpm and additional ultrasonication with 30% of amplitude for 2 minutes. In these conditions NPQui-TPP with an average diameter of 117.3 nm were generated and assessed in vitro at concentrations of 8 and 9 g/L with effective activity in inhibiting the growth of *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* inoculated in BDA medium. Formulations for topical application with 9 g/L (particles in suspension) were prepared and sprinkled on apples and guavas, inoculated and non-inoculated with the analyzed fungi, for in vivo assessment. Coatings in non-nanoparticulated condition (dipping into chitosan gel), were also carried out for comparison. The results show superior activities of NPQui-TPP when compared to the continuous coatings. The nanoparticulated coatings promoted reductions of 55 % in the loss of firmness in guavas and 38.7 % concerning the apples. Additionally the nanoparticles provided a decrease in 24 % in the fungal growth on apples and of 28 % on guavas, with simultaneous colorimetric alterations around 13.7 % on apples, when compared to non-coated samples, along 14 days. Although the exact mechanisms by which chitosan antimicrobial activity occurs is not yet fully elucidated, it is evident that chitosan in nanoparticles form has superior antifungal activity and general preservative properties, what have been attributed to their high surface area and consequently the ability to perform larger interactions.

Keywords: *Alternaria alternata*. Edible coatings. Ionotropic gelation. Nanotechnology. *Penicillium expansum*. Post-Harvest conservation.

Lista de Figuras

Capítulo 1 – Introdução

Figura 1.1 Perdas mundiais de frutas e hortaliças	13
Figura 1.2 Estrutura idealizada da Quitosana	19
Figura 1.3 Geleificação da Quitosana e Tripolifosfato de Sódio	23
Figura 1.4 Modelo da formação de coberturas comestíveis	25
Figura 1.5 Limitações dos transportes e trocas com a atmosfera de uma cobertura ideal	25

Capítulo 2 – Material e Métodos

Figura 2.1 Esquematização do processo de síntese de NPQui-TPP	32
Figura 2.2 Nomenclatura utilizada para as suspensões de NPQui-TPP	32
Figura 2.3 Esquematização do Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)	35
Figura 2.4 Nomenclatura utilizada no Ensaio de MIC	36
Figura 2.5 Processo de Higienização	39
Figura 2.6 Processo de Revestimento	40

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Figura 3.1 Tamanhos de partículas obtidas em diferentes condições de síntese	44
Figura 3.2 Imagens de MEV-FEG de NPQui-TPP	46
Figura 3.3 Tamanhos das partículas H8_V1500_PC antes e após ultrassonificação	47
Figura 3.4 Ensaio de estabilidade de NPQui-TPP	49
Figura 3.5 Espectros de FT-IR da Quitosana, TPP e NPQui-TPP liofilizadas	52
Figura 3.6 Caracterização térmica da Quitosana, TPP e NPQui-TPP	54
Figura 3.7 Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)	56
Figura 3.8 Ensaio de Crescimento Radial	59
Figura 3.9 Análise de perda de massa	64
Figura 3.10 Análise de Textura	67
Figura 3.11 Aspecto visual de maçãs revestidas	70
Figura 3.12 Análise colorimétrica de maçãs	71
Figura 3.13 Aspecto visual de goiabas revestidas	74
Figura 3.14 Análise colorimétrica de goiabas	75
Figura 3.15 Contagem Microbiana ($\log \text{CFU/g}^{-1}$) durante período de armazenamento	79

Lista de Tabelas

Capítulo 1 – Introdução

Tabela 1.1 Micotoxicoses, agentes etiológicos, substratos e sintomas causados pela ingestão e/ou contato com micotoxinas 15

Tabela 1.2 Alguns materiais utilizados como coberturas comestíveis, suas aplicações e propriedades 27

Tabela 1.3 Uso da quitosana como coberturas comestíveis, aplicações e propriedades 29

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Tabela 3.1 Valores dos diâmetros finais das colônias e Índices Fungioestáticos (IF) do Ensaio de Crescimento Radial 61

Tabela 3.2 Concentração de Sólidos Solúveis (°Brix) de maçãs e goiaba. 77

Lista de Abreviações e Siglas

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
AF	Aflatoxinas
DON	Deoxynivalenol
F	Fumosinas
OT	Ochatoxinas
ZEA	Zearalenona
GRAS	<i>“Generally regarded as safe”</i> , Geralmente recomendados como seguros
C2	Carbono 2
C3	Carbono 3
C6	Carbono 6
n	Grau de polimerização da Quitosana
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
TPP	Tripolifosfato de Sódio
FDA	<i>“Food and Drug Administration”</i> , Agência de alimentos e drogas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
NPQui-TPP	Nanopartículas de Quitosana e TPP
MIC	Concentração Mínima Inibitória
m/v	Massa/Volume
rpm	Rotações por minuto
PC	Pré centrifugação
S	Sobrenadante
R	Ressuspendidas
H	Altura de gotejamento em relação ao gel de Quitosana
V	Velocidade de agitação do meio
mV	milivolts
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
TGA	Termogravimetria
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
BDA	Batata-dextrose-agar
v/v	Volume/Volume

IF	Índice Fungioestático
M_C-	Grupo controle negativo das maçãs
M_C+	Grupo controle positivo das maçãs
M_Qui	Maçãs revestidas com gel de Quitosana não nanoparticulada
M_NPQui-TPP	Maçãs revestidas com Nanopartículas de Quitosana e TPP
G_C-	Grupo controle negativo das goiabas
G_C+	Grupo controle positivo das goiabas
G_Qui	Goiabas revestidas com gel de Quitosana não nanoparticulada
G_NPQui-TPP	Goiabas revestidas com Nanopartículas de Quitosana e TPP
L*	Luminosidade
a*	Grau de variação entre o verde (-a) e o vermelho (+a)
b*	Grau de variação entre o azul (-b) e o amarelo (+b)
°h	Ângulo Hue
°Brix	Concentração de sólidos solúveis
PDI	Índice de Polidispersividade
PPO	Polifenoloxidase
PDO	Peroxidases
CFU	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

Resumo	3
Abstract	4
Lista de Figuras	5
Lista de Tabelas	6
Lista de Abreviaturas e Siglas	7
Capítulo 1- Introdução	12
1.1 Contaminação fúngica em frutas	13
1.2 Micotoxinas	14
1.3 <i>Penicillium expansum</i> e <i>Alternaria alternata</i>	16
1.4 Fungicidas sintéticos	17
1.5 Fungicidas naturais	18
1.6 A Quitosana	19
1.6.1 Atividade antimicrobiana da Quitosana	20
1.6.2 Nanopartículas de Quitosana	22
1.6.3 Toxicidade das Nanopartículas de Quitosana	24
1.7 Coberturas protetoras para frutas	25
1.8 Objetivos	30
1.8.1 Objetivo Geral	30
1.8.2 Objetivos específicos	30
Capítulo 2- Material e Métodos	31
2.1 Síntese e padronização do processo de produção das nanopartículas de Quitosana-TPP (NPQui-TPP)	31
2.2 Caracterização das Nanopartículas de Quitosana-TPP	33
2.2.1 Determinação do Potencial Zeta e tamanho de partícula	33

2.2.2 Ensaio de estabilidade	33
2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (FEG)	33
2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	34
2.2.5 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	34
2.3 Ensaaios Microbiológicos	34
2.3.1 Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)	34
2.3.2 Crescimento Radial em meio sólido	37
2.3.3 Índice Fungioestático	38
2.4 Revestimento de frutas	38
2.5 Análises físico-químicas	41
2.6 Análise microbiológica das frutas revestidas e não revestidas	42
2.7 Análise Estatística e Gráficos	42
Capítulo 3- Resultados e Discussão	43
3.1 Padronização da síntese das Nanopartículas de Quitosana-TPP	43
3.2 Caracterização das Nanopartículas de Quitosana-TPP	48
3.2.1 Ensaio de Estabilidade	48
3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	51
3.2.3 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	53
3.3 Avaliação do potencial antifúngico das Nanopartículas de Quitosana-TPP	55
3.3.1 Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)	55

3.3.2 Crescimento Radial em meio sólido	57
3.3.3 Índice Fungioestático (IF)	61
3.4 Revestimento e caracterização de frutas com Nanopartículas de Quitosana-TPP	63
3.4.1 Perda de Massa	63
3.4.2 Análise de Firmeza	66
3.4.3 Análise colorimétrica: Luminosidade (L*) e Ângulo Hue (°H)	69
3.4.4 Concentração de Sólidos Solúveis (°Brix)	76
3.4.5 Análise Microbiológica de frutas revestidas com Nanopartículas de Quitosana-TPP	78
Capítulo 4- Conclusões	82
Referências	84

Capítulo 1 – Introdução

No ano de 2018 a produção mundial de frutas frescas foi de 830 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por aproximadamente 41 milhões de toneladas deste montante, o que o coloca como o terceiro maior produtor mundial, atrás somente da China e da Índia (IBGE, 2019).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, a fruticultura brasileira representa 11,5% do PIB agrícola e 0,62% do PIB nacional, cujo mercado está pautado essencialmente no consumo interno, considerando que somente 31% do total produzido no país são destinados à exportação (IBGE, 2019).

No entanto, estima-se que em torno de 22% de toda a produção nacional não seja aproveitada por razões diversas (REETZ et al., 2015; TREICHEL, 2016). Esse elevado percentual de perdas e descartes tem sido atribuído principalmente a injúrias mecânicas causadas por manipulação inadequada ou excessiva, ausência de uma cadeia adequada de resfriamento, processamentos de baixa tecnologia, armazenamento e transporte inapropriados e pela incidência de doenças na condição pós-colheita (BERETTA et al., 2013).

As etapas da cadeia produtiva em que ocorrem as principais perdas normalmente estão relacionadas ao nível de industrialização disponível. Em geral, quanto mais industrializado o país, mais tardiamente no processo e em menor quantidade, essas perdas ocorrem (GUSTAVSSON et al., 2011).

Em países da Europa, América do Norte e parte da Ásia, estima-se que cerca de 40% das perdas de alimentos ocorram no final da cadeia, ou seja, no comércio e domicílio dos consumidores. Enquanto nas demais regiões, caracterizadas por países menos industrializados, as perdas se dão principalmente no campo e nas etapas de distribuição e processamento (GUSTAVSSON et al., 2011).

A Figura 1.1 apresenta o balanço das ocorrências de perdas mundiais em 2011, segundo levantamento apresentado por Gustavsson e colaboradores (GUSTAVSSON et al., 2011), valores estes que não apresentaram variações significativas nos últimos anos (FAO, 2019).

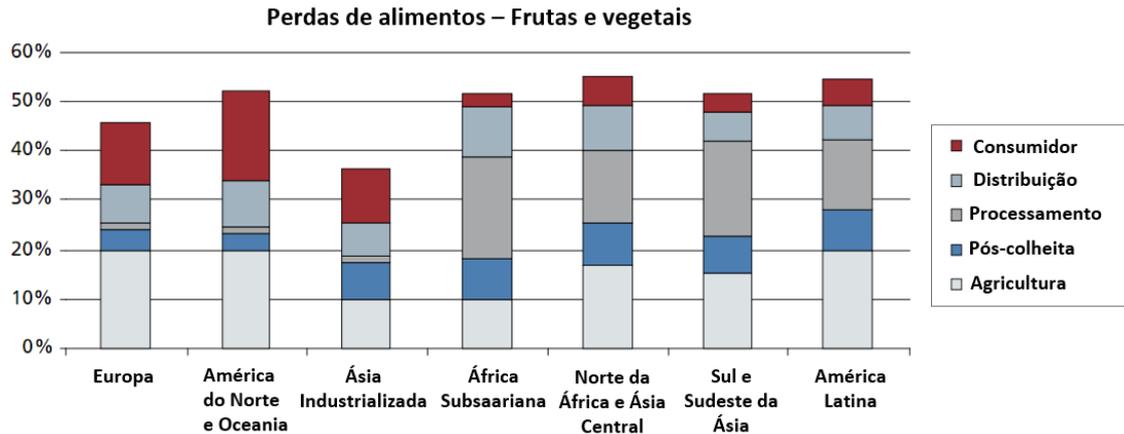


Figura 1.1 Perdas mundiais de frutas e hortaliças. Fonte: **GUSTAVSSON et al., 2011.**

Contudo, em todas as etapas uma parte significativa das perdas é decorrente da contaminação por microrganismos. Embora seja difícil mensurar a extensão exata dessas contaminações, principalmente devido à falta de uma classificação padronizada e da coleta de dados específicos, estima-se que entre 20 a 25% das perdas de frutas e hortaliças colhidas sejam decorrentes da ação de fitopatógenos (SHARMA, SINGH & SINGH, 2009).

1.1 Contaminação fúngica em frutas

Embora bactérias também contaminem frutas e gerem consideráveis perdas do produto, a ênfase deste trabalho são os fungos. Menos de 10% das espécies catalogadas são consideradas fitopatogênicas e, destas, estima-se que cerca de 100 sejam identificadas como extremamente danosas sendo as principais responsáveis pela quase totalidade das doenças na condição pós-colheita (ECKERT & RATNAYAKE, 1983; TRIPATHI & DUBEY, 2004). As características físico-químicas das frutas e hortaliças, como presença de água, abundância de nutrientes e baixo pH, favorecem uma maior incidência e o rápido desenvolvimento de diversos fungos de forma isolada ou simultânea (TRIPATHI & DUBEY, 2004).

Entre os principais gêneros relacionados às perdas pós-colheita de frutas destacam-se os fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium*, *Monilinia*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus* (LIU et al., 2013). Sendo estes os principais responsáveis pela geração de manchas marrons e pretas observadas nas superfícies de maçãs e pêssegos, pela podridão negra e antracnose

em frutas cítricas e pela perda de firmeza em mamões, pêras e morangos, entre outras frutas (COELHO, HOFFMANN & HIROOKA, 2003).

Os processos de infecção fúngica são complexos e os vegetais possuem mecanismos de autodefesa que atuam no sentido de impedir a entrada e a expansão dos patógenos, embora estes nem sempre sejam plenamente eficientes. Esses mecanismos são ativados por meio da ação conjunta da transcrição de genes relacionados à defesa, de modificações em seu metabolismo primário e secundário, abertura de canais iônicos e da fosforilação de proteínas específicas (DA SILVA et al., 2008).

Em geral, tais respostas são eliciadas sistemicamente pela presença de agentes externos bióticos ou abióticos denominados "indutores", os quais desencadeiam a série de eventos bioquímicos subsequentes (DA SILVA et al., 2008).

Tais processos também resultam no aumento da concentração de fenóis, fitoalexinas, proteínas "PR" (*pathogenesis-related proteins*), radicais livres e lectinas, que são compostos atuantes em interações bioquímicas com os invasores, reduzindo sua agressividade. Diversos autores apontam também o desenvolvimento de barreiras estruturais de defesa, como a síntese de gomas, lignificação e a produção de metabólitos de ação fungiotóxica (DA SILVA et al., 2008; ZAIN, 2011; HAMMERSCHMIDT & KUC, 2013).

1.2 Micotoxinas

As micotoxinas consistem em um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos em condições específicas de temperatura e umidade. Podem ser geradas pela contaminação em alimentos, desde o campo até a fase de armazenamento. Em função da grande diversidade de estruturas químicas, efeitos biológicos e origens biossintéticas, as micotoxinas são de difícil definição e classificação (ZAIN, 2011). A preocupação com a presença e consumo deste tipo de metabólito recai em suas propriedades carcinogênicas, teratogênicas, imunossupressoras e tóxicas, conforme dados obtidos em diversos estudos (COELHO, HOFFMANN & HIROOKA, 2003; OUESLATI et al., 2012).

Dentre as 400 micotoxinas conhecidas, destacam-se as aflatoxinas (AF), deoxynivalenol (DON), fumosinas (F), patulinas (P), ochratoxinas (OT) e zearalenona

(ZEA), as quais são produzidas principalmente pelos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* (ZAIN, 2011; OUESLATI et al., 2012), patógenos estes comumente presentes em frutas e hortaliças. Cabe salientar que as micotoxinas contaminam alimentos tanto de origem animal quanto vegetal, especialmente cereais, frutas, sementes, leite e ovos (JI, FAN, ZHAO, 2016).

Na Tabela 1.1 encontram-se descritas algumas micotoxicoses, bem como seus agentes etiológicos, substratos e sintomas predominantes causados por sua ingestão ou contato.

Tabela 1.1- Micotoxicoses, agentes etiológicos, substratos e sintomas causados pela ingestão e/ou contato com micotoxinas

Referências	Micotoxina	Agente	Substrato	Potenciais doenças decorrentes da ingestão	Sintomas
CARVALHO, 1995; MAZIERO, BERSOT, 2010; KABAK, 2016	Aflatoxinas	<i>Aspergillus sp.</i>	Uvas, figos, damasco, ameixas e pêras	Hepatocarcinoma e aflatoxicose	Hepatite aguda, Morte e Hepatocarcinoma
COELHO, HOFFMANN, HIROOKA, 2003; TOROVIĆ et al., 2018	Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Maçãs, pêras, uvas, bananas e cerejas		Edema cerebral e pulmonar, hemorragias, vômito
ALGHUTHAYMI, BAHKALI, 2015; RYCHLIK, 2017	Deoxynivalenol	<i>Fusarium</i>	Bananas, maçãs, coco, uvas		Vômito, diarreia, hemorragia, endotexemia
LI et al., 2017	Fumosinas	<i>Fusarium</i>	Bananas e figos		Doenças hepáticas, cardíacas, neurais e câncer
CARVALHO, 1995; OTEIZA et al., 2017	Ocratoxina	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>	Maçãs, pêras, uvas	Câncer urotelial superior	Tumor maligno urotelial
ALGHUTHAYMI, BAHKALI, 2015; ZINEDINE et al., 2007	Zearalenona	<i>Fusarium</i>	Bananas e maçãs		Desordens reprodutivas, síndrome hiperestrogênica

Algumas práticas agronômicas vêm sendo utilizadas na tentativa de reduzir a incidência fúngica no cultivo de alimentos. Entre elas, pode-se citar: i) colheita precoce; ii) secagem adequada; iii) emprego de tratamentos físicos; iv) sanitização; v) armazenamento apropriado e, vi) o manejo de insetos. Além dessas, a descontaminação por controle biológico e químico por meio do uso de fungicidas têm sido o procedimento mais amplamente utilizado (ZAIN, 2011).

As micotoxinas podem não ser as principais responsáveis pelas perdas pós-colheita em frutas e hortaliças, embora tenham uma participação importante nos prejuízos. O que deve ser considerado é que a contaminação fúngica, além de gerar essas perdas, apresentam potenciais danos à saúde humana e animal (ZAIN, 2011).

1.3 *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*

Dois dos principais grupos de fungos de maior incidência em frutas e hortaliças são classificados dentro dos gêneros *Alternaria* e *Penicillium*.

Inicialmente descrito por Von Esenbeck em 1817, o gênero *Alternaria* agrupa diversas espécies de fungos endofíticos, patogênicos e sapróbios, capazes de se estabelecerem em substratos como plantas, sementes, tecidos animais, produtos agrícolas e mesmo no ar (WOUDENBERG et al., 2013).

Relacionados como causadores de doenças em animais (WANG et al., 1996) e em humanos (BUSH & PROCHNAU, 2004; SALO et al., 2006), o gênero *Alternaria* tem sido foco permanente de pesquisas na área agrícola e biotecnológica, uma vez que está relacionado a infecções de cerca de 100 espécies de plantas (ROTEM, 1994; WOUDENBERG et al., 2015). É responsável por diversas doenças de ocorrência pós-colheita (COATES & JOHNSON, 1997) e, conseqüentemente, por importantes perdas de *commodities* agrícolas, como tomates (YAN et al., 2015), berinjelas, maçãs, pêssegos, mamão, manga e abóboras (COATES & JOHNSON, 1997).

Já o gênero *Penicillium*, conhecido por causar a “*blue/green mold rot*” e produzir a micotoxina patulina, que é potencial causadora de diversas doenças, como distúrbios renais, úlceras gástricas, desordens intestinais e até alterações hormonais, testiculares e modificações morfológicas em espermatozoides (SELMANOĞLU & KOÇKAYA, 2004, SELMANOĞLU, 2006), é composto por diversas espécies patogênicas com incidência principalmente sobre frutas, incluindo

maçãs, nectarinas, pêssegos e cerejas (KARABULUT & BAYKAL, 2002; VENTURINI, ORIA & BLANCO, 2002). Ambos gêneros de fungos são comumente encontrados em frutas e hortaliças amplamente consumidas no Brasil (TREICHEL, 2016).

1.4 Fungicidas sintéticos

Como citado, o Brasil é um dos maiores produtores de frutas e hortaliças do mundo, o que faz com que ocupe também uma posição de destaque no emprego, em volume, de agrotóxicos e defensivos. O país é considerado o líder mundial, em volume, do uso de pesticidas, uma vez que é utilizado por cerca de 90% dos produtores, os quais aplicam, anualmente, aproximadamente 899 milhões de litros deste tipo de compostos (MOLITOR, 2019).

Os principais fungicidas sintéticos empregados no combate da contaminação fúngica são o imazalil, o tiabendazol, o pyrimethanil (SMILANICK et al., 2008) e a guazatina (DICH et al., 1997). A ampla aplicação desses compostos deve-se ao seu custo relativamente baixo e a boa eficiência de ação, embora recentemente seja observada uma crescente preocupação com o risco de desenvolvimento de populações de patógenos resistentes, associada à conscientização por parte dos consumidores relativa a ingestão de alimentos com excesso de agrotóxicos residuais (DE ALMEIDA; CARNEIRO & VILELA, 2009).

Além dos alimentos, diversos fungicidas e pesticidas sintéticos estão relacionados a sérios problemas ambientais como a contaminação de solos e águas (TOURNAS, 2005), podendo resultar em possíveis perturbações do equilíbrio natural, aumento de resistência de pragas e problemas de saúde em humanos e animais (DOGHEIM et al., 2002, HJORTH et al., 2011).

Na literatura encontram-se diversos trabalhos que relacionam o uso de produtos químicos sintéticos a elevados níveis de toxicidade e compostos teratogênicos e carcinogênicos identificados em frutas e hortaliças (TRIPATHI & DUBEY, 2004; PARK et al., 2012).

1.5 Fungicidas naturais

Com o objetivo de reduzir o uso de agentes fungicidas sintéticos e, conseqüentemente, minimizar os impactos de sua aplicação, alguns procedimentos e técnicas alternativas têm sido propostas. Um exemplo é o emprego de antimicrobianos não seletivos como o carbonato e bicarbonato de sódio e de tratamentos físicos como o armazenamento a baixas temperaturas, a aplicação de água aquecida e a exposição à radiação ionizante (TRIPATHI & DUBEY, 2004).

No entanto, algumas destas técnicas não se mostram, isoladamente, eficazes no controle da formação de colônias fúngicas e, em certos casos, podem até gerar injúrias, contribuindo negativamente para a vida útil dos produtos (TRIPATHI & DUBEY, 2004).

Compostos naturais como o acetaldeído, o benzaldeído, o hexanal, o ácido jasmônico, a própolis, os óleos essenciais e a quitosana, vêm sendo continuamente avaliados acerca de suas propriedades antimicrobianas em relação a diversos microrganismos presentes em frutas e hortaliças. Esses compostos apresentaram ações comprovadas contra o *P. digitatum* (TRIPATHI & DUBEY, 2004), o *P. expansum* (SONG et al., 1996), o *B. Cinerea* (SONG et al., 1996), o *A. Alternata* (HAMILTON-KEMP et al., 1992) e a *M. Fructicola* (TRIPATHI & DUBEY, 2004).

Por serem classificados como “GRAS”, ou seja, “*Generally Recognized as Safe*” e, portanto, geralmente recomendados como seguros para o consumo, tornam-se importantes no desenvolvimento de tecnologias alternativas que prezem pela qualidade dos alimentos (DA SILVA et al., 2015).

Em função principalmente de sua biocompatibilidade e das propriedades antifúngicas e antibacterianas apresentadas (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009), a quitosana em particular, tem sido amplamente avaliada na área de alimentos, seja como agente ativo incorporado em embalagens (VAN DEN BROEK et al., 2015), no desenvolvimento de coberturas protetoras e filmes comestíveis (ASSIS & BRITTO, 2011), ou como agente particulado de aplicação tópica no controle de patógenos prejudiciais à saúde humana (YOUNES et al., 2014; PILON et al., 2015).

1.6 A Quitosana

A quitosana é um polímero natural formado por cadeias lineares de unidades de glicosamina e *N*-acetil-glicosamina unidas por ligações β (1 \rightarrow 4), obtida a partir do processo de desacetilação da quitina, que consiste no principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos (AOUADA, 2009).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, ficando atrás somente da celulose (DEVLIEGHERE, VERMEULEN & DEBEVERE, 2004), da qual diferencia-se pela presença de grupos amínicos, apesar de apresentar semelhanças na estrutura química (BARROS, 2016).

A presença de três grupos funcionais reativos na estrutura da quitosana (grupo amino no C2 e uma hidroxila nos C3 e C6), conforme visualizado na Figura 1.2, promove sua interação com cargas negativas de outras moléculas e polímeros (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009). A modificação química destes grupos pode resultar em mudanças de suas propriedades, possibilitando diferentes aplicações e respostas deste polissacarídeo (SHAHIDI, ARACHCHI & JEON, 1999).

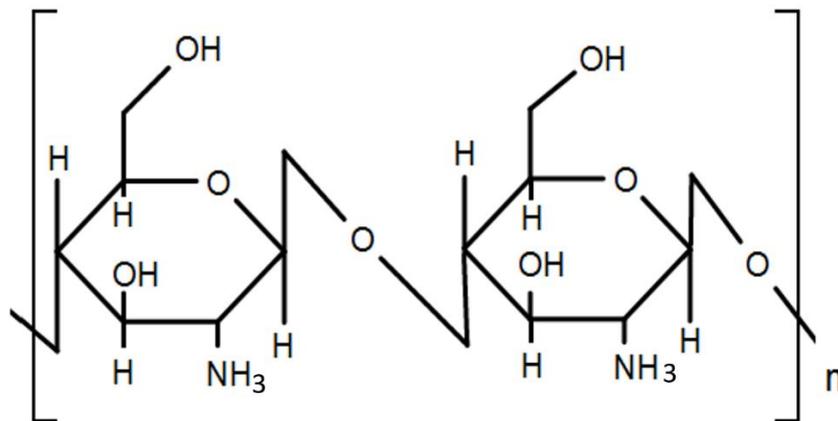


Figura 1.2 Estrutura idealizada da quitosana, sendo “n” o grau de polimerização. Fonte: (AOUADA, 2009).

Devido às suas características atóxicas, facilidade na formação de géis e blendas, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de valor calórico, o emprego da quitosana tem sido avaliado em diversos campos de pesquisa e em aplicações tecnológicas e industriais há mais de setenta anos (KUMAR, 2000; SIGNINI & CAMPANA-FILHO, 2001; CHILLO et al., 2008; LOREVICE et al., 2012).

Tais aplicações vão desde a desacidificação de sucos de frutas (SHAHIDI, ARACHCHI & JEON, 1999) a sistemas de liberação de fármacos (AHMED & ALJAEID, 2016), passando pelo desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis para a conservação de alimentos (MARTELLI et al., 2013).

Diversos estudos confirmam a eficiência da quitosana na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas além de diversos fungos causadores de podridão em alimentos (DU et al., 2008; GOY, BRITTO & ASSIS, 2009). Além disso, apresenta diversas vantagens em relação a outros produtos naturais empregados como agentes antimicrobianos, como um maior espectro de atividade e uma menor toxicidade em relação às células de mamíferos (YOUNES et al., 2014).

1.6.1 Atividade antimicrobiana da Quitosana

Apesar da atividade antimicrobiana da quitosana ser amplamente descrita na literatura, os exatos mecanismos pelos quais ocorre essa atividade ainda não estão plenamente elucidados (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009; ASSIS & BRITTO, 2011; MENDES et al., 2016). Três hipóteses têm sido aventadas como possíveis mecanismos de ação antimicrobiana que ocorreriam simultânea ou isoladamente, tendo todas por princípio interações superficiais, o que implica que para que a ação seja eficiente, as moléculas de quitosana devam estar em contato direto com a superfície do microrganismo alvo (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009).

De maneira geral, as hipóteses atribuem a atividade antimicrobiana como resultado das seguintes características: i) presença de cargas em sua estrutura e a interação com sítio eletricamente carregados das lipoproteínas presentes na parede celular dos microrganismos; ii) penetração via envelope celular com subsequente interação e inativação do DNA microbiano e iii) capacidade de complexação de metais e nutrientes essenciais ao crescimento microbiano (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009).

De acordo com o mecanismo mais aceito, a hipótese “i”, a atividade antimicrobiana ocorre devido interações mediadas por forças eletrostáticas entre os grupos protonados da quitosana (NH^+_3) e os resíduos negativamente carregados presentes na superfície do microrganismo (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009).

Este modelo sugere que a atividade antimicrobiana da quitosana seria, portanto, diretamente proporcional ao número de aminas cationizadas presentes em sua estrutura. Tais aminas carregadas positivamente seriam capazes de se ligar a grupamentos fosfato e pirofosfato negativamente carregados dos lipopolissacarídeos presentes na membrana externa (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009).

As ligações decorrentes destas interações eletrostáticas promoveriam trocas iônicas as quais resultariam em fragmentações estruturais da membrana (lises) e, conseqüentemente, modificações na permeabilidade da parede celular promovendo um desequilíbrio osmótico com conseqüente perda de fluidos intercelulares. Este desequilíbrio pode inibir o crescimento ou mesmo levar a morte do microrganismo (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009).

Na segunda hipótese, a quitosana transporia a membrana celular e seria capaz de se ligar ao DNA do microrganismo, impossibilitando a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e, conseqüentemente, a produção de proteínas essenciais para sua sobrevivência. Mais uma vez, essa ligação seria promovida pela interação eletrostática entre as cargas positivas dos grupamentos amino da quitosana e das cargas negativas dos grupos fosfato da molécula de ácido desoxirribonucleico (AZEREDO et al., 2018).

A terceira hipótese, por sua vez, atribui a atividade antimicrobiana da quitosana à sua deposição molecular ao redor da membrana celular do microrganismo, o que promoveria uma redução de sua permeabilidade. Sugere que ocorra, também, junto a essa deposição de quitosana, a quelação de metais e nutrientes essenciais à sobrevivência do microrganismo (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009).

Em relação específica à sua atividade antifúngica, tem sido atribuída à quitosana um efeito inibidor do crescimento micelial, o que leva a uma redução da infecção e da germinação, diminuindo a produção de esporângios e a liberação de esporangiósporos, além de uma ação, conjunta ou isolada, de alterações morfológicas no crescimento das hifas (YOUNES et al., 2014). Nestas são observadas agregação e ramificação exacerbada, o que pode estar relacionado ao aumento da atividade de enzimas como a fenilalanina amônia liase, assim como a formação de compostos fenólicos e incremento de mecanismos de lignificação (ATIA et al., 2005).

Alguns dos limitantes ao emprego mais amplo da quitosana como antifúngico, deve-se a sua insolubilidade em pH neutro e de sua alta viscosidade. Métodos alternativos têm sido utilizados para minimizar essas características, como alterações químicas que gerem derivados hidrossolúveis de quitosana e a síntese de nanopartículas (YIEN et al., 2012). No entanto estes derivados apresentam características desvantajosas como alto custo, tempo de preparo e a geração de resíduos tóxicos como subprodutos da síntese (LI et al., 2012; QIN et al., 2012).

1.6.2 Nanopartículas de Quitosana

As diferentes respostas físicas e químicas e a potencialização das propriedades que alguns materiais apresentam quando em escala nanométrica, são as principais razões pelo interesse no desenvolvimento e aplicação de materiais com essas dimensões. As alterações nas propriedades resultam de uma maior acessibilidade e disponibilidade dos átomos superficiais, decorrentes da maior área superficial, para a participação em interações com o meio (ESTEVES, BARROS-TIMMONS & TRINDADE, 2004; DALMAS et al., 2007; AZEREDO et al., 2009). O incremento das interações gera modificações na dinâmica molecular podendo resultar em alterações nas propriedades mecânicas, de barreira (SORRENTINO, GORRASI & VITTORIA, 2007) e térmicas (TEIXEIRA et al., 2010) do material nanométrico.

Nanopartículas orgânicas, de origem biopoliméricas, podem ser obtidas por dois princípios básicos: i) a partir da polimerização controlada do monômero principal ou ii) através da interação iônica de dois polieletrólitos (SCHAFFAZICK et al., 2003), processo genericamente denominado de geleificação iônica ou ionotrópica (FAN et al., 2012; KOUKARAS et al., 2012).

Assim, a geleificação ionotrópica tem por base a interação entre as cargas opostas de um polímero e contra-íons de um agente reticulante. No caso da quitosana, a interação ionotrópica ocorre entre suas cargas positivas de grupos amino protonados e as cargas negativas do poliânion adicionado, usualmente o tripolifosfato de sódio (TPP). Essas interações resultam na imediata coagulação da mistura, decorrentes da formação de ligações intra e intermoleculares entre os grupos positivos da quitosana e os fosfatos negativamente carregados da TPP, o

que permite a formação de nanopartículas de Quitosana-TPP (NPQui-TPP) (AOUADA, 2009).

Adicionalmente, a técnica de geleificação por ser livre de solventes orgânicos é atóxica, relativamente simples e com relativo controle em decorrência da anulação entre as cargas dos compostos e a formação de um complexo polieletrólito estável (FAN et al., 2012).

Para que as ligações sejam estabelecidas, o TPP é diluído em água miliQ, gerando cargas negativas em sua cadeia e interagindo com a quitosana diluída em meio ácido (pH 4-5). A partir destas interações, os grupos amino são protonados, estabelecendo cargas positivas nas terminações (NH_3^+) (CALVO et al., 1997; GAN et al., 2005). A Figura 1.3 ilustra a interação iônica provável entre os grupos funcionais dos dois compostos.

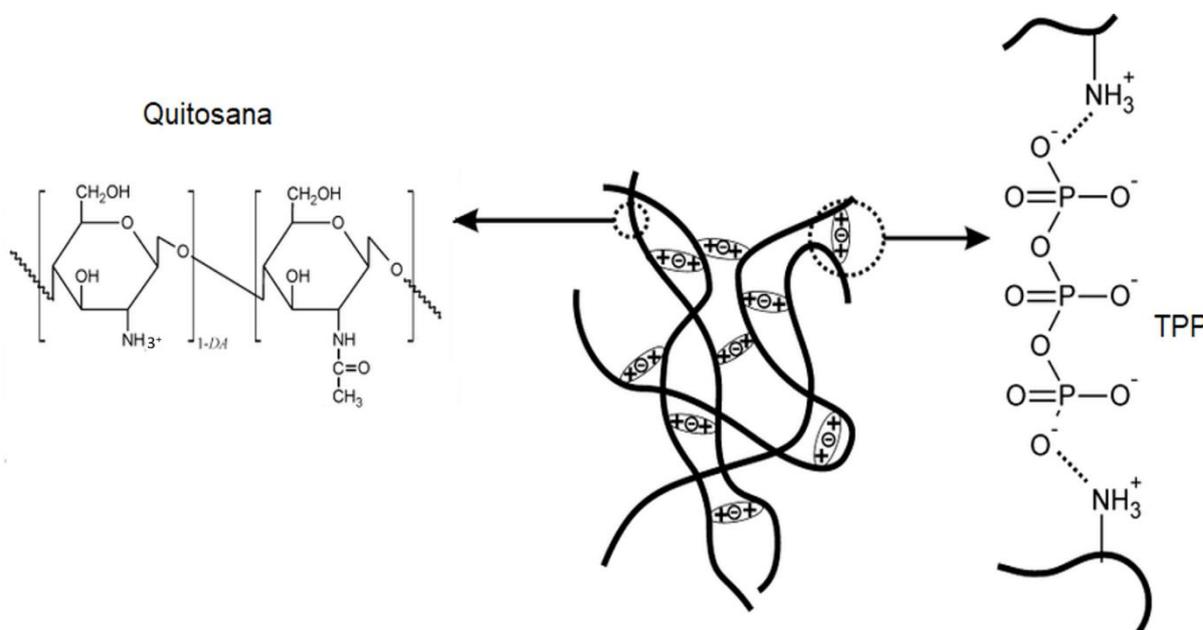


Figura 1.3 Geleificação da quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP) por interação entre grupos iônicos e catiônicos. Fonte: (baseado em GIERSEWSKA & OSTROWSKA-CZUBENKO, 2016).

Nanopartículas de quitosana geradas por geleificação têm sido avaliadas em diferentes aplicações, como no desenvolvimento de novos materiais particulados (AMASS, AMASS & TIGHE, 1998; ELSABEE & ABDU, 2013), seja para emprego na área médica (ELNAGGAR et al., 2015), farmacêutica (BORGES et al., 2007; GAN et al., 2005), ou alimentícia (AOUADA, 2009; ASSIS & BRITTO, 2011; MARTELLI et al., 2013).

1.6.3 Toxicidade das Nanopartículas de Quitosana

O tamanho reduzido e a grande área superficial das nanopartículas resultam em altas taxas de deposição, absorção e mobilidade possibilitando o deslocamento pelo corpo e interação ou acúmulo em órgãos ou tecidos não alvo ou, ainda, sua liberação não controlada no meio ambiente (BUZEA, PACHECO & ROBBIE, 2007).

Estas possibilidades geram dúvidas quanto a toxicidade das nanopartículas e estão relacionadas principalmente a capacidade de penetração por meio das membranas celulares, mitocondriais, nucleares e através de canais iônicos ou de transporte de proteínas. Com isso, materiais nanoparticulados poderiam ocasionar danos celulares e subcelulares além de alterações nos níveis proteicos (NEL et al., 2006; MA et al., 2018).

Uma das dificuldades de avaliar a toxicidade neste contexto é estabelecer parâmetros de análise eficientes e adequados para cada material, considerando que muitos dos protocolos de análises toxicológicas, atualmente utilizados, não foram definidos e validados para nanomateriais (GNACH et al., 2015). As análises de toxicidade em geral enfocam diferentes níveis de complexidade: (i) Nível celular; (ii) Órgãos; (iii) Organismo e (iv) Ambiental. O estudo de cada um destes níveis é responsável por tentar elucidar os mecanismos específicos os quais possam estar associados à toxicidade (GNACH et al., 2015).

Desde 2001 a quitosana é considerada segura pela FDA (*US Food and Drug Administration*) para aplicações em cosméticos e alimentos (AL-NAAMANI, DOBRETSOV & DUTTA, 2016) e, embora existam discussões acerca do potencial tóxico das nanopartículas de quitosana (DE SALAMANCA et al., 2006; JAYAKUMAR et al., 2010; KEAN & THANOU, 2010; HU et al., 2011; ELNAGGAR et al., 2015), os resultados encontrados na literatura, de uma maneira geral, reafirmam a ausência da toxicidade dentro das concentrações usuais, seja para aplicações na área médica ou alimentícia (FALGUERA et al., 2011; ELSABEE & ABDU, 2013; CRUZ-ROMERO et al., 2013; HAN, 2014; KASHYAP, XIANG & HEIDEN, 2015; AL-NAAMANI, DOBRETSOV & DUTTA, 2016).

1.7 Coberturas protetoras para frutas

Coberturas e filmes protetores e comestíveis são finas camadas de materiais consumíveis aplicados ou formados diretamente sob os alimentos, podendo exercer um papel importante de proteção, conservação e comercialização (FALGUERA et al., 2011).

As coberturas comestíveis em geral são formadas por imersão em uma solução filmogênica, cuja matriz pode ser polissacarídica, lipídica, proteica ou de suas combinações (compósitos). Durante a imersão, as cadeias poliméricas da solução estabelecem ligações fortes e fracas com a superfície da fruta, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações por forças dispersivas e eletrostáticas, configurando uma camada depositada contínua e estável (Figura 1.4) (ASSIS & BRITTO, 2014)



Figura 1.4 Modelo de formação de uma cobertura comestível realizada por imersão. Em (a), ocorre a imersão do fruto na solução filmogênica; (b) atração entre o adsorvato (componentes da solução filmogênica) e a superfície da fruta e (c) evaporação do solvente e reticulação polimérica consolidando a cobertura. Fonte: (ASSIS & BRITTO, 2014).

Para sua formação, essas coberturas podem fazer uso de matérias-primas oriundas de resíduos e rejeitos da cadeia hortifrutícola, como, por exemplo, as kafirinas, as zeínas e a quitosana, que são provenientes do sorgo, milho e exoesqueleto de crustáceos respectivamente (SCRAMIN et al., 2011; ELSABEE & ABDOL, 2013; SALGADO et al., 2015).

Tais revestimentos têm como objetivo principal proteger o produto, podendo também ser empregados na conservação de frutos processados. As coberturas, de um modo geral, proveem uma barreira semipermeável ao dióxido de carbono, oxigênio e umidade, reduzindo as taxas de respiração, oxidação e perdas de água

(LEE et al., 2003). Adicionalmente é desejável que uma cobertura apresente uma ação antimicrobiana e promova a retenção de lipídios e de compostos voláteis relacionados ao aroma e ao sabor (HAN et al., 2004).

Estas características podem ser ilustradas segundo o esquema da Figura 1.5.

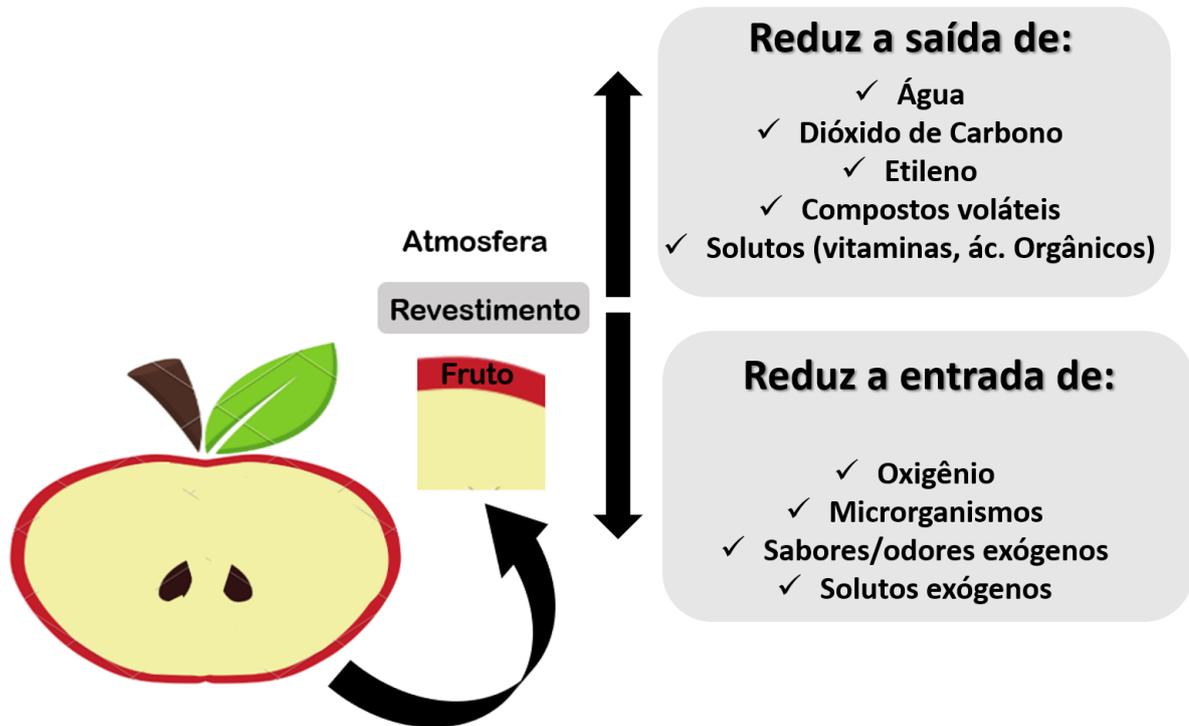


Figura 1.5 Limitações dos transportes e trocas com a atmosfera em uma cobertura ideal. Fonte: baseado em (ASSIS & BRITTO, 2014).

As coberturas comestíveis têm sido apontadas como uma tecnologia simples e adequada à crescente demanda por alimentos frescos e com menores concentrações de aditivos químicos. Podem ser aplicadas tanto em frutas *in natura* quanto em produtos minimamente processados (descascados e fatiados), já que injúrias mecânicas ocorridas na colheita e em seu processamento provocam danos nos tecidos causando alterações fisiológicas que aceleram sua senescência, através do aumento das taxas de respiração, perdas de água e do favorecimento da contaminação microbiana (LEE et al., 2003). De um modo geral, as características protetivas de uma cobertura estão diretamente relacionadas à natureza da matriz biopolimérica a partir da qual o filme será formado, sendo possível adequar a formulação filmogênica de acordo com as propriedades desejadas para aplicações específicas (ASSIS, DE BRITTO, 2014; FALGUERA et al., 2011).

A título de ilustração, na Tabela 1.2 encontram-se dispostas algumas formulações usualmente empregadas como coberturas comestíveis e suas propriedades, conforme dados da literatura.

Tabela 1.2 Materiais utilizados como coberturas comestíveis, suas aplicações e propriedades

Referências	Composição do revestimento	Agente	Substrato	Potenciais doenças decorrentes da ingestão
PONCE et al., 2008	Compósito	Caseína Quitosana Carboximetilcelulose	Vegetais minimamente processados	Antimicrobiana e Antioxidantes
OMS-OLIU; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2008		Alginato Pectina Vitamina C	Pêras	Melhora nas propriedades de barreira; Antimicrobiana; Manutenção das características sensoriais
ATARÉS; CHIRALT, 2016	Lipídica	Óleos essenciais	Uvas, Melão, Bacalhau, sardinha	Antimicrobiana, Antioxidantes, Piora propriedades de barreira
GARCÍA; MARTINO; ZARITZKY, 1998	Polissacarídica	Amido	Morangos	Antimicrobiana
KERCH, 2015		Quitosana	Cenouras, Morangos e carambolas	Mantém qualidade nutricional e aumenta vida útil
SCRAMIN et al., 2011	Protéica	Zeína	Pêras	Alta hidrofobicidade; Baixa permeabilidade a gases; Aumento na vida útil

Segundo agências internacionais de regulamentação, como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Directive* (ED), os revestimentos podem ser classificados como: i) produtos alimentícios; ii) ingredientes alimentícios; iii) substâncias em contato com o alimento iv); aditivos alimentícios e, v) embalagem de alimentos (ROJAS-GRAÜ, SOLIVA-FORTUNY & MARTÍN-BELLOSO, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não estabelece uma legislação específica para coberturas e revestimentos ou embalagens comestíveis. Estes são classificados como conservantes ou aditivos e devem seguir as recomendações descritas para o emprego desses ingredientes (ANVISA, 1997).

Segundo a Portaria nº 540 (ANVISA, de 27 de outubro de 1997), as coberturas e revestimentos são aqueles compostos empregados no processo de fabricação ou preparo de alimentos e que sejam incorporados ao produto, ainda que possam causar modificações no sabor e textura e possam elevar a qualidade nutricional do produto.

Já os aditivos, grupo no qual a quitosana está inserida, são ingredientes adicionados intencionalmente ao alimento visando a alteração de características biológicas, químicas, físicas ou sensoriais durante qualquer etapa de produção, ou seja, desde o cultivo até a embalagem e comercialização. Ambos devem estar de acordo com a Portaria nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 e à Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1998, que regulamentam sobre aditivos e coadjuvantes de tecnologia (ANVISA, de 27 de outubro de 1997).

O potencial da quitosana como matriz para coberturas comestíveis vem sendo avaliado há diversos anos. Além da facilidade com a qual forma géis e blendas, destacam-se suas características antimicrobianas, de biocompatibilidade e biodegradabilidade, além da ausência de valor calórico e de alérgenos (KUMAR, 2000; ELSABEE & ABDYOU, 2013). Diversos estudos descrevem os efeitos do uso da quitosana como matriz para o revestimento de frutas, entre eles: sua ação na manutenção da firmeza, da cor e das qualidades nutricionais, associadas a uma diminuição das taxas de perda de massa e redução das trocas gasosas (ELSABEE & ABDYOU, 2013; HAN, 2014; KERCH, 2015; DOTTO, VIEIRA & PINTO, 2015).

Na Tabela 1.3 temos uma breve revisão das propriedades da quitosana como coberturas comestíveis, segundo dados encontrados na literatura.

Tabela 1.3 Uso da quitosana como coberturas comestíveis, suas aplicações e propriedades

Referências	Aplicação	Propriedades
HAN et al., 2004	Morangos e framboesas	Redução da perda de água; Preserva cor, pH e textura;
DOTTO; VIEIRA; PINTO, 2015	Mamão papaia	Antimicrobianas
KERCH, 2015	Cenouras Morangos Carambolas	Mantém qualidade nutricional e aumenta vida útil
KAYA et al., 2016	Kiwi	Diminuição da perda água e manutenção da firmeza
SABAGHI et al., 2015	Nozes	Redução da oxidação e crescimento fúngico
PETRICCIONE et al., 2015	Nêspera	Redução da perda de polifenóis, flavonoides, ácido ascórbico e carotenóides
PASQUARIELLO et al., 2015	Cereja	Diminuição do escurecimento
CHIEN; SHEU; YANG, 2007	Manga	Redução da perda de água
XIAO et al., 2010	Pêras	Redução de escurecimento; Manutenção dos polifenóis e vitamina C
GOL; CHAUDHARI; RAO, 2015	Carambola	Manutenção dos compostos fenólicos
EL-ELERYAN, 2015	Laranja	Redução da perda de água e escurecimento
HONG et al., 2012	Goiaba	Redução da perda de água; Manutenção da firmeza, sólidos solúveis e vitamina C
IBRAHIM et al., 2014	Abacaxi	Redução da perda de água; Redução de crescimento fúngico; Manutenção dos sólidos solúveis
HONG et al., 2012	Pepino	Redução da perda de água e Manutenção dos sólidos solúveis

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consiste no processamento e caracterização de nanopartículas do sistema Quitosana-TPP (NPQui-TPP), sintetizadas pelo método de geleificação ionotrópica, para aplicação tópica via *spray*, na formação de coberturas comestíveis em goiabas e maçãs *in natura*, e a avaliação de sua ação antifúngica na condição pós-colheita.

1.8.2 Objetivos específicos

- Produção e caracterização de nanopartículas de Quitosana e TPP obtidas pelo método de geleificação ionotrópica (NPQui-TPP), definindo condições otimizadas e reprodutíveis de síntese;
- Avaliação e estabelecimento das Mínimas Concentrações Inibitórias (MIC) fúngicas, *in vitro*, como subsídios para a elaboração de suspensão aquosa particulada para posterior aplicação como *spray*;
- Aplicação das NPQui-TPP em maçãs e goiabas através de aspersão e avaliar seu caráter protetor com relação à infestação antifúngica por meio da inoculação dos fungos *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*, comparando com frutas não revestidas e com coberturas contínuas de quitosana (formulação não particulada);
- Acompanhar as alterações nas condições fisiológicas das frutas revestidas em condições ambientais não controladas.

Capítulo 2 – Material e Métodos

2.1 Síntese e padronização do processo de produção das nanopartículas de Quitosana-TPP

A quitosana utilizada na síntese foi a de média massa molar (400.000 g/mol), com 75-85 % de unidades desacetiladas e como contra-íon o Tripolifosfato de sódio (TPP), ambos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e o ácido acético glacial da marca Labsynth (Diadema, SP, Brasil).

A quitosana foi solubilizada em ácido acético 1% sob agitação magnética de 1500 rpm durante 24h em temperatura ambiente. O resultado desta solubilização, denominado “gel de quitosana”, foi produzido com concentração final de 10g/L (m/v) e foi submetido a temperatura de 40°C por 10 minutos ao início da mistura.

Para a obtenção das NPQui-PP, o TPP foi solubilizado em água destilada na concentração de 0,1% (m/v) e adicionado ao gel de quitosana por gotejamento contínuo na razão de 1 mL/min para uma concentração final de TPP de 0,05%. No processo de síntese foram avaliadas a influência da velocidade de agitação do gel de quitosana e da altura do gotejamento do TPP no tamanho e distribuição final das nanopartículas geradas. Para isso, foram testadas as velocidades de 600, 1050 e 1500 rpm e as alturas de 5 e 8 cm do gotejamento de TPP em relação ao gel de quitosana, como apresentado no esquema da Figura 2.1, Etapa 2.

Posteriormente, as suspensões foram submetidas a centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos a 10°C (Etapa 4) sendo separados lotes de cada uma das três etapas de síntese: pré-centrifugação (“PC”) (Etapa 3) e, após a centrifugação, tanto as partículas presentes no sobrenadante (“S”) (Etapa 4), quanto as partículas ressuspendidas (“R”) (Etapa 5), para avaliação comparativa das alterações introduzidas no tamanho e distribuição das nanopartículas. A sequência geral da síntese empregada está esquematizada na Figura 2.1.

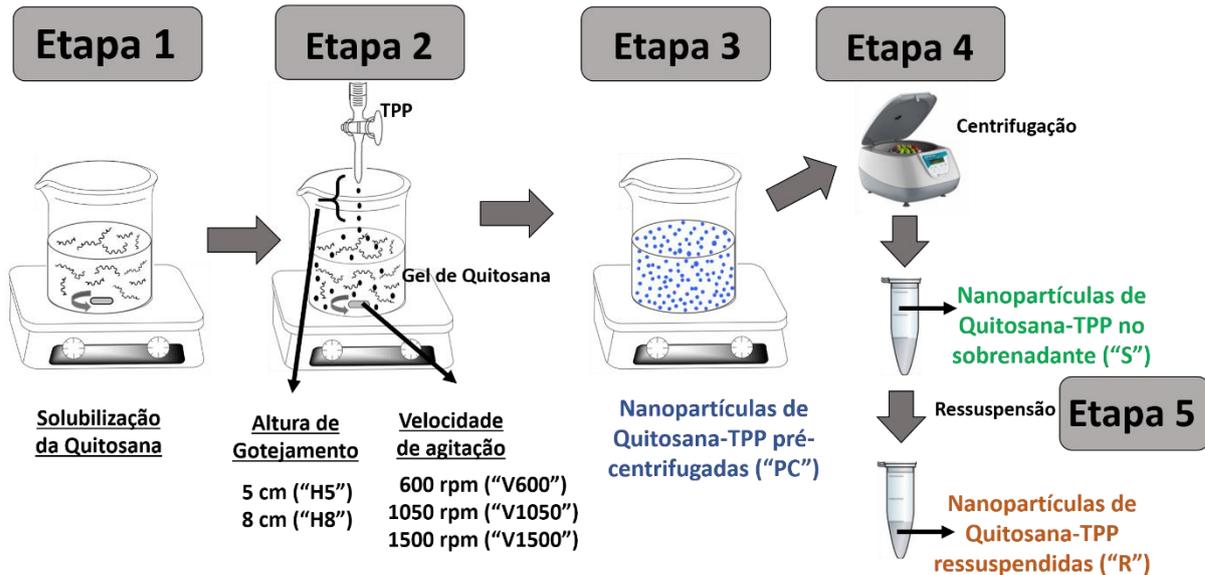


Figura 2.1 Esquemática do processo de síntese de Nanopartículas de Quitosana-TPP (NPQui-TPP) em 5 etapas.

A partir deste processo, estabeleceu-se a nomenclatura de identificação de amostras descrita na Figura 2.2, em que "H" consiste na altura em centímetros do gotejamento do TPP em relação ao gel de quitosana (H5 e H8 cm); "V" a velocidade de agitação do gel de quitosana no momento do gotejamento (600, 1050 e 1500 rpm); "PC" a suspensão de Nanopartículas de Quitosana-TPP antes da centrifugação, "S" as Nanopartículas de Quitosana-TPP após a centrifugação presentes no sobrenadante e "R", Nanopartículas de Quitosana-TPP após centrifugação e ressuspensão do *pellet*.

	H5_V600_PC		H5_V600_S		H5_V600_R
	H5_V1050_PC		H5_V1050_S		H5_V1050_R
	H5_V1500_PC		H5_V1500_S		H5_V1500_R
	H8_V600_PC		H8_V600_S		H8_V600_R
	H8_V1050_PC		H8_V1050_S		H8_V1050_R
	H8_V1500_PC		H8_V1500_S		H8_V1500_R

Figura 2.2 Nomenclaturas utilizadas para as suspensões de Nanopartículas de Quitosana-TPP (NPQui-TPP), onde os valores subsequentes as letras "H" e "V" representam, respectivamente, a altura de gotejamento (em centímetros), do TPP em relação ao gel de quitosana e a velocidade da agitação mecânica do gel no momento do gotejamento. As siglas "PC", "S" e "R" referem-se a etapa da metodologia em que as nanopartículas foram analisadas: pré-centrifugação, sobrenadante e após a ressuspensão, respectivamente.

Com o objetivo de promover a desagregação de aglomerados formados e, desta forma, obter nanopartículas com tamanhos, cargas e dispersão homogênea, as suspensões foram submetidas a ultrassom (Sonifier Sound Enclosure SSE-1, Branson, Danbury, Connecticut, EUA) durante 2 min com amplitude de 30%, de acordo com a metodologia descrita por Esmaeilzadeh-Gharedaghi e colaboradores (ESMAEILZADEH-GHAREDAGHI et al., 2012).

2.2 Caracterização das Nanopartículas de Quitosana-TPP

2.2.1 Determinação do Potencial Zeta e tamanho de partícula

A medida das dimensões das NPQui-TPP e seus valores de potencial zeta foram obtidas em sistema Zeta Potential Analyser (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), em triplicata, a 25 °C. Os resultados foram expressos em nanômetros para o diâmetro e em miliVolts (mV) para o potencial zeta.

2.2.2 Ensaio de estabilidade

A estabilidade da suspensão de NPQuit-TPP foi estimada através do acompanhamento da alteração de tamanhos e do potencial zeta ao longo do tempo. As medidas foram realizadas nas suspensões após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 20 e 30 dias a partir da síntese, em condições de guarda à temperatura ambiente. As medidas foram realizadas em triplicatas (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Foram comparadas as amostras submetidas a ultrassonicação (para a fragmentação e redução de agregados) a cada dia de análise assim como amostras sem a aplicação de ultrassonicação, com o objetivo de avaliar o efeito deste procedimento na recuperação dos tamanhos iniciais de partículas.

2.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (FEG)

As suspensões de NPQuit-TPP foram submetidas a banho ultrassônico por 15 min, diluídas em água deionizada - mili-Q (1:100) e gotejadas em lâminas de silício. Após 48h em dessecadores, foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo FEG JSM-6701F (Jeol, EUA).

2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A identificação das estruturas e grupos funcionais nas amostras de quitosana, TPP e as decorrentes de suas interações na formação das NPQuit-TPP foram determinadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em amostras liofilizadas.

Os espectros foram gerados em espectrômetro Vertex 70 (Bruker, Massachusetts, EUA) em comprimentos de onda no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} em 64 varreduras por amostra.

2.2.5 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As alterações da estabilidade térmica nas diversas condições de síntese foram avaliadas, em amostras liofilizadas, em equipamento TGA Q-500 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). As amostras foram submetidas a uma rampa térmica de 30 a 800 $^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sob fluxo de nitrogênio na vazão constante de 60 mL/min.

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi conduzida em sistema DSC Q100 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA), em rampa de aquecimento de -60 a 400 $^{\circ}\text{C}$ na razão de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 60 mL/min.

2.3 Ensaios Microbiológicos

2.3.1 Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A atividade antifúngica *in vitro* das suspensões de NPQuit-TPP foi determinada pelo método de Concentração Inibitória Mínima (MIC) (QI et al., 2004). O ensaio de MIC foi realizado com o intuito de uma análise qualitativa inicial para determinar qual intervalo de concentração de NPQui-TPP seria capaz de inibir ou impedir o crescimento dos microrganismos fúngicos analisados e, desta forma, definir uma faixa de concentração específica adequada para as análises quantitativas em placas de Petri e, posteriormente, diretamente nas frutas.

Para a obtenção da solução de esporos *Alternaria alternata* (CCT 7152 DSMZ 12633) e *Penicillium expansum* (CMIIAA PEN 001), estes foram repicados em placa

de Petri com o meio de cultura BDA batata-dextrose-agar (HIMEDIA, Byosystems, Curitiba, PR). A partir do crescimento dos fungos, foram preparadas soluções padronizadas com esporos na concentração de 1×10^6 esporos/ml, utilizando solução esterilizada de Tween 80 (0,1% v/v). A concentração dos esporos foi determinada com auxílio da câmara de Neubauer. A Figura 2.3 ilustra o conjunto de tubos empregados para a obtenção dos MICs pela técnica de microdiluição.

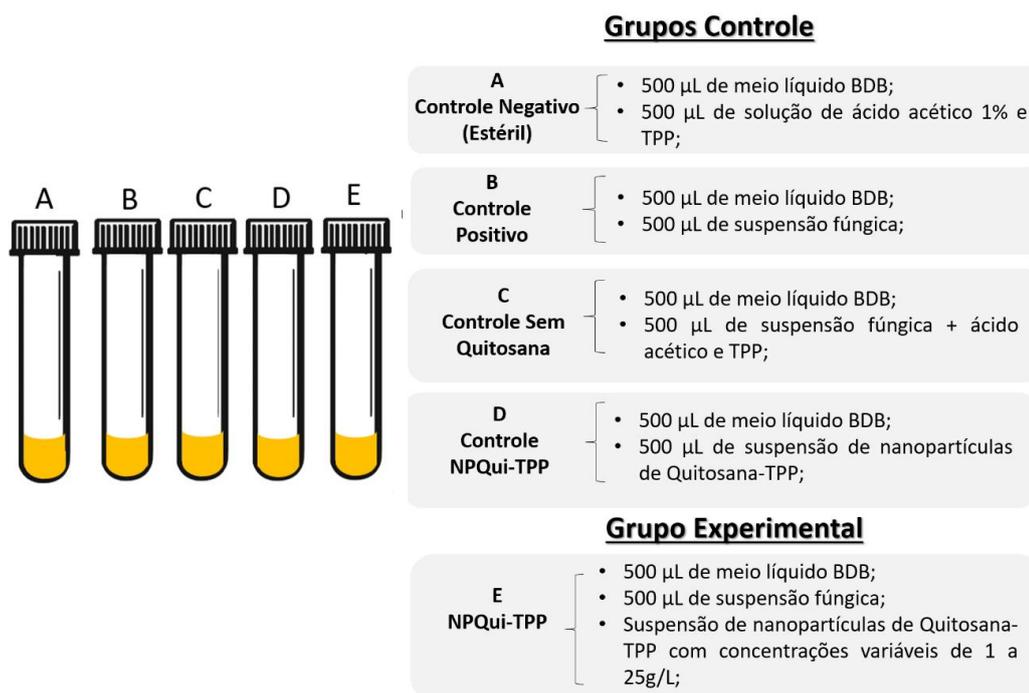


Figura 2.3 Esquemática do ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC) para os ensaios in vitro de *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*.

Os tubos de ensaio foram divididos em cinco grupos, nomeados de A a E, conforme Figura 2.3. Os tubos “A” consistiram no controle negativo e, portanto, foram compostos somente de meio líquido BDB (HIMEDIA, Byosystems, Curitiba, PR) e solução de ácido acético 1% e TPP. Os tubos do grupo “B” foram o controle positivo, com o objetivo de verificar a viabilidade da suspensão fúngica utilizada e, com isso, foi composto por meio líquido BDB e a suspensão fúngica.

A fim de comprovar que a ação antifúngica observada poderia ser atribuída somente à quitosana e não aos outros componentes da solução de NPQui-TPP, foi utilizado o grupo “C”, composto por meio líquido BDB, suspensão fúngica, ácido acético 1% e TPP. A partir do grupo “D” foi avaliada a ausência de contaminação

na própria suspensão de NPQui-TPP, de forma que esta não pudesse estimular o crescimento fúngico e, com isso, distorcer qualquer interpretação dos resultados.

Por fim, nos tubos do grupo “E” foram avaliadas a capacidade antifúngica de NPQui-TPP nas concentrações de 1 a 25 g/L (m/v) e, para isso, o material foi disposto no tubo juntamente com o meio líquido e com a suspensão de esporos padronizada em 1×10^6 esporos/mL.

Os cálculos de ajuste de concentração foram feitos para que todos os tubos apresentassem os mesmos volumes finais. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicatas e em 4 ensaios diferentes, realizados separadamente. Todos os tubos permaneceram em agitação de 200 rpm/min durante 7 dias em temperatura ambiente. Ao final deste período, foram comparados visualmente, identificando ou não o crescimento dos microrganismos nas diferentes concentrações de NPQui-TPP em relação aos tubos controle.

Na Figura 2.4 está esquematizada a padronização desta comparação visual, que considera o tamanho das colônias fúngicas em relação ao diâmetro do tubo e a turbidez final de seu conteúdo.

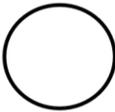
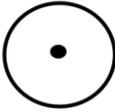
Código	Classificação	Crescimento Fúngico	Aspecto
1	Sem crescimento		<ul style="list-style-type: none"> Ausência de crescimento fúngico aparente; Conteúdo líquido sem alterações na turbidez em relação ao controle
2	Crescimento reduzido		<ul style="list-style-type: none"> Tubos com colônias pequenas; Ausência de alteração na turbidez do conteúdo do tubo ou pequeno aumento de turbidez
3	Crescimento intermediário		<ul style="list-style-type: none"> Tubos com colônias de tamanho médio; Aumento de turbidez;
4	Crescimento exacerbado		<ul style="list-style-type: none"> Presença de colônias grandes que ocupavam grande parte do diâmetro do tubo; Grande aumento de turbidez;

Figura 2.4 Nomenclatura utilizada no Ensaio de MIC.

Foram classificados como "1" os tubos nos quais não houve crescimento fúngico aparente bem como ausência de alterações na turbidez do conteúdo líquido presente no tubo.

Os tubos com crescimento reduzido foram identificados como "2", aqueles em que ocorreram o aparecimento de colônias centrais em tamanhos reduzidos. Além disso, notou-se ausência ou ligeiro aumento da turbidez do meio. Nos tubos "3", houve Crescimento intermediário caracterizado por colônias fúngicas de tamanho médio e aumento considerável na turbidez do conteúdo.

Por fim, nos tubos com "Crescimento exacerbado", com código "4" foram observados crescimentos intensos das colônias fúngicas, as quais ocupavam praticamente todo o diâmetro do tubo e grande aumento da turbidez.

Os tubos classificados como "1", "2" e "3" foram selecionados para dar continuidade aos ensaios microbiológicos. Os tubos classificados como "4", por apresentarem elevado crescimento fúngico, foram excluídos dos ensaios subsequentes, considerando que as concentrações de NPQui-TPP contidas foram incapazes de inibir ou impedir o crescimento dos microrganismos analisados.

2.3.2 Crescimento Radial em meio sólido

A segunda etapa da análise microbiológica consistiu no ensaio de crescimento radial em meio sólido. Neste ensaio foi possível quantificar o crescimento fúngico a partir de medidas do diâmetro das colônias. Foi realizada a inoculação de alíquotas de 100 µL dos conteúdos dos tubos do ensaio de MIC em que não houve crescimento fúngico ou o crescimento foi considerado reduzido ou intermediário (amostras relativas aos tubos 1, 2 e 3), em poços de 6 mm em placas de Petri com ágar BDA (HIMEDIA, Byosystems, Curitiba, Brasil). A evolução dos diâmetros das colônias foi acompanhada diariamente ao longo de 20 dias. Os ensaios foram realizados em quatro repetições separadas, com triplicatas.

A concentração inibitória mínima foi definida, portanto, como a menor concentração de NPQui-TPP capaz de impedir o crescimento fúngico, considerando os tubos e placas em que não foram observados crescimento visível de *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*. A MIC definida por tais ensaios foi usada como referência para a elaboração de suspensões de NPQui-TPP para aplicação tópica nas frutas, conforme será descrito no item 2.4

2.3.3 Índice Fungioestático (IF)

A partir das medidas dos diâmetros das colônias foram realizados os cálculos do Índice fungioestático (IF) para cada amostra em comparação com os controles, segundo procedimentos descritos por COTA-ARRIOLA et al., 2011. O Índice Fungioestático (IF) foi obtido pela relação :

$$IF = \left(1 - \frac{R_i}{R_c}\right) \times 100$$

Sendo R_c = média dos raios das colônias das amostras do controle e R_i = média dos raios das colônias cuja amostra continham quitosana. As medidas foram realizadas em triplicatas.

2.4 Revestimento de frutas

A partir das definições das concentrações inibitórias obtidas nos ensaios *in vitro*, suspensões de NPQui-TPP foram preparadas e aplicadas via *spray* em maçãs e goiabas, para avaliação do potencial fungioestático das nanopartículas na condição pós-colheita, *in vivo*. Ambos frutos foram escolhidos pela disponibilidade no mercado, por conter diversos dados na literatura relativos a conservação e uso de coberturas (maçãs) e por apresentar rápida perecibilidade (goiabas), o que facilita a reprodutividade dos ensaios e obtenção de dados comparativos (HONG et al., 2012).

Foram selecionadas maçãs (*Malus domestica*) da cultivar Gala da marca Dalai Alimentos (Vacaria-RS) e goiabas vermelhas (*Psidium guajava*) da marca Verdin, produzidas na chácara Santa Luzia (Campinas-SP). As frutas foram adquiridas em mercado local (São Carlos, SP), embora com controle de datas de colheita e chegada, conforme previamente acordado com o fornecedor, assegurando assim amostras de um mesmo lote.

Anterior aos ensaios, as frutas passaram por uma seleção com o objetivo de garantir uma padronização com respeito a cor e tamanhos, sendo descartadas aquelas que se apresentavam fora dos padrões desejados. Um total de 228 frutas foi selecionado para cada ensaio, sendo 132 maçãs e 96 goiabas. Esta diferença é decorrente das diferentes durações das análises realizadas, considerando que ambas frutas apresentam graus distintos de perecibilidade.

As frutas selecionadas foram higienizadas com sanitizante VEROX e esponja macia e imersas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos (Figura 2.5).



Figura 2.5 Processo de Higienização. Maçãs (a) e goiabas (b) higienizadas com detergente neutro e imersas em solução de hipoclorito de sódio (c e d), antes do processo de seleção.

Após secarem em temperatura ambiente, as amostras foram separadas em 4 tratamentos com 30 maçãs e 21 goiabas cada, de acordo com as seguintes condições:

Tratamento 1: Maçãs e goiabas não revestidas, sendo este considerado o controle negativo e identificadas como "M_C-" e "G_C-", respectivamente.

Tratamento 2: Maçãs e goiabas revestidas com suspensão de NPQui-TPP juntamente com uma suspensão fúngica padronizada, sendo este tomado como controle positivo e identificadas como "M_C+" e "G_C+".

Para o estabelecimento da suspensão fúngica padronizada foram realizados os cálculos de concentração e contagem em Câmara de Neubauer para que o número de esporos de *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata* fosse o mesmo utilizado nos ensaios *in vitro* (1×10^6 esporos/mL). A suspensão fúngica com esporos de ambos fungos foi misturada com o volume equivalente de NPQui-TPP imediatamente anterior a aplicação nas frutas.

Tratamento 3: Maçãs e goiabas revestidas com solução de quitosana não nanoparticulada. Foi empregado o gel de quitosana, cuja síntese consistiu na solubilização da quitosana em ácido acético 1%, conforme descrito no item 2.1. Este grupo foi identificado como “M_Qui” e “G_Qui”.

Tratamento 4: Maçãs e goiabas revestidas com NPQui-TPP, sem inoculação de fungos, sendo este o grupo experimental identificado como “M_NPQui-TPP” e “G_NPQui-TPP”.

O processo de revestimento via *spray* foi adotado por se tratar de uma técnica de aplicação rápida e uniforme, que utiliza uma menor quantidade de solução. A ausência de imersão evita a o contato com o meio prevenindo contaminações e possíveis alterações de seus componentes durante a formação da cobertura, além de favorecer uma secagem rápida (BALDWIN, HAGENMAIER & BAI, 2011). Aspectos que são interessantes do ponto de vista do desenvolvimento de um produto comercial.

Na aplicação das nanopartículas foi utilizado um pulverizador manual de 1L, de baixa pressão (Merax, Piracicaba, SP) (Figura 2.6-a). As frutas foram dispostas em grades de alumínio e revestidas durante 30 segundos em suas superfícies superiores e inferiores. Este tempo de aspensão foi estabelecido com base em testes preliminares, assegurando a aplicação em todas as faces e a formação de uma cobertura uniforme (Figura 2.6-b).



Figura 2.6 – Processo de revestimento por aspensão. (a) **Pulverizador manual** de pressão (Merax) utilizado para aplicação de Nanopartículas de Quitosana-TPP em maçãs (b) e goiabas.

As amostras revestidas foram secas espontaneamente ao ar e armazenadas em condições ambientais não controladas (ao ar em temperatura ambiente média de 25°C e umidade relativa próxima a 50%). As frutas não foram conservadas em câmara fria pois o objetivo foi o de analisar as respostas em condições similares às encontradas no comércio, como supermercados e *hortifrutis*, nos quais usualmente há consideráveis flutuações de temperatura, umidade, luminosidade, etc.

2.5 Análises físico-químicas

Considerando as diferentes características e processo de amadurecimento das amostras, a caracterização das frutas ocorreu em dias alternados ao longo de 14 dias para as goiabas por um período de 20 dias para as maçãs. As medidas consistiram em:

Acompanhamento da perda de massa decorrentes da água eliminada, por transpiração e demais processos metabólicos. As medidas foram realizadas em triplicata por pesagem nos dias pré-definidos em balança analítica AY220 (SHIMADZU, Quioto, Japão);

Evolução da textura por meio da medida de firmeza em ensaio de penetrometria em equipamento Texturômetro Stable Micro Systems (TA.TX plus – Texture Analyser). Foi utilizado probe cilíndrico de aço inoxidável de 4 mm de diâmetro, com penetração de 1cm a uma taxa de 5mm/s, conforme descrito por Pilon et al., (2015). As frutas foram dispostas perpendicularmente em relação a ponteira e as medidas foram expressas em MPa. Foram realizadas 5 medidas em pontos diferentes em cada fruta analisada.

Alterações colorimétricas ao longo do período de amadurecimento, por meio de leitura em colorímetro Chroma Meter CR-410 (Konica Minolta, EUA). Essa análise teve como objetivo comparar as alterações das cores nas superfícies nas diversas condições de revestimentos. Utilizou-se como padrão a “escala de Hunter”, composta pelos parâmetros L^* , a^* e b^* (Cie/Lab), sendo L^* o parâmetro que indica a luminosidade (número de fótons), ou seja, a quantidade de luz refletida pela superfície, variando de zero (preto) a 100 (branco). Já a^* e b^* quantificam a cromaticidade: a^* expressa o grau de variação entre o verde (-a) e o vermelho (+a) e o b^* entre o azul (-b) e o amarelo (+b).

A partir dos valores numéricos de a^* e b^* é possível determinar o Ângulo Hue ($^{\circ}H$), que estabelece a tendência de alteração colorimétrica observada na fruta, pela equação $\tan^{-1} b^*/a^*$. Valores de $^{\circ}H$ próximos a 0° , 90° , 180° e 270° representam matizes de cores predominantemente avermelhadas, amareladas, esverdeadas e azuladas, respectivamente (FERREIRA & SPRICIGO, 2017).

A análise de concentração de sólidos solúveis ($^{\circ}Brix$) foi realizada em Refratômetro RX-5000 (Atago, Japan) em 50 g de polpas das frutas previamente homogeneizadas. A leitura foi conduzida em triplicata na temperatura ambiente.

2.6 Análise microbiológica das frutas revestidas e não revestidas

A microflora das goiabas e maçãs foi medida a cada 2 dias durante os períodos de armazenamento de 14 e 20 dias, respectivamente. Amostras de 10g da casca das frutas foram mergulhadas em solução de água peptonada 1% estéril (Isofar, Capivari, Rio de Janeiro, Brasil) por 2 min. Foi realizada uma diluição em série, também em peptona estéril 1%, até uma diluição final de 10^{-3} (PILON et al., 2015).

Alíquotas de 1,0ml das diluições 10^{-3} foram plaqueadas em placas de Petri com meio BDA (HIMEDIA, Byosystems, Curitiba, Brasil), espalhadas com alça de Drigalski e incubadas, em triplicata, por 3 dias a $25^{\circ}C$. As colônias foram contadas com Contador de colônias digital CP-600/1 (TECNAL, Piracicaba, Brasil) e os resultados expressos em função das unidades formadoras de colônia (UFC/g)

2.7 Análise Estatística e Gráficos

Os resultados de cada análise foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e tiveram as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), fazendo uso do software MiniTab *Statistical Software* (MiniTab®). Gráficos de tendência foram gerados pelo programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc).

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Padronização da síntese das Nanopartículas de Quitosana-TPP

A padronização do processo de síntese de nanopartículas é fator determinante na garantia da reprodutibilidade das amostras e, conseqüentemente, das propriedades finais das partículas obtidas. Intervalos de tamanhos específicos e em uma distribuição regular são desejáveis em diversas áreas para que aplicações de NPQui-TPP sejam mais eficazes (SAWTARIE, CAI & LAPITSKY, 2017; TAMER et al., 2014). De um modo geral, é desejável que o processo gere partículas nas menores dimensões possíveis e em uma estreita distribuição de tamanhos, assegurando uma maior área superficial e homogeneidade, de forma que potencialize as interações com o meio no qual estarão inseridas (SORRENTINO, GORRASI & VITTORIA, 2007).

A dimensão final das nanopartículas obtidas a partir do método de geleificação é diretamente influenciado por parâmetros como a força iônica, o pH do meio reativo, a proporção da quitosana em relação ao reticulante TPP, o índice de agregação e o grau de desacetilação da quitosana utilizada (SAWTARIE, CAI & LAPITSKY, 2017). Em especial o grau de desacetilação, que é a proporção de grupos desacetilados (transformação de NHCOOCH_3 em NH_2) na estrutura é um dos principais fatores que comprovadamente influenciam na atividade antifúngica da quitosana (TAMER et al., 2014), razão pela qual a quitosana com 75-85% de grupos desacetilados foi empregada neste trabalho.

As estruturas desacetiladas impõem a natureza catiônica pela protonação dos grupos aminos NH_2 em NH_3^+ quando em solventes levemente ácidos, o que confere uma distribuição de cargas positivas ao longo de sua cadeia elevando assim a solubilidade da molécula. A presença de cargas positivas na quitosana confere uma característica catiônica no polímero, o que incrementa a capacidade de interação do com os grupamentos negativamente carregados presentes na parede celular microbiana (TAMER et al., 2014).

Ademais, parâmetros experimentais como altura de gotejamento do TPP, velocidade de agitação do meio reativo, centrifugação e ultrassonicação da solução nanoparticulada exercem importante influência nas características finais das partículas, como tamanho e formato, embora dados referentes as análises das

variáveis no processo ainda sejam bastante escassos na literatura (TSAI, BAI & CHEN, 2008; FÀBREGAS et al., 2013).

Na Figura 3.1 temos a comparação dos tamanhos médios das partículas geradas nas diferentes condições experimentais avaliadas. Os resultados indicam uma redução dos tamanhos de partículas conforme a altura de gotejamento do TPP é elevada, de 5 para 8 cm (H5 e H8, respectivamente) com relação a superfície líquida do gel de quitosana independente das demais variáveis. A velocidade de agitação do meio reativo, de 600 rpm para 1050 rpm e 1500 rpm, também mostrou-se determinante na geração de partículas menores. Particularmente, para a mais alta rotação empregada (V1500 rpm), observou-se as menores dimensões para todas as condições.

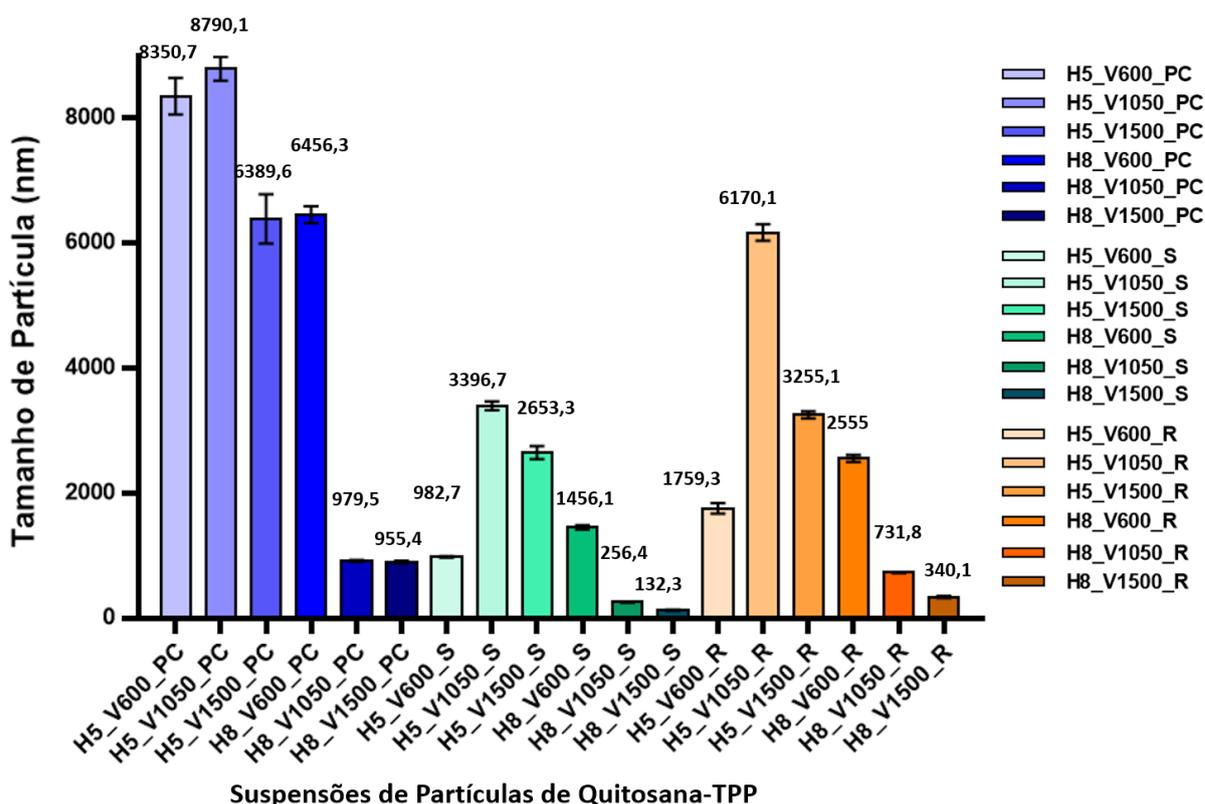


Figura 3.1 Comparação entre os tamanhos de partículas obtidas em diferentes condições de síntese. Foram avaliadas variações na altura de gotejamento (H) de 5 para 8 cm em relação a superfície do gel de quitosana, na velocidade (V) de 600 para 1050 e 1500 rpm e nas etapas de síntese: pré-centrifugação (PC), sobrenadante (S) e após ressuspensão (R).

Adicionalmente, pode-se verificar que, ao compararmos as dimensões medidas nas diferentes etapas de síntese, as amostras do sobrenadante (“S”),

apresentaram tamanhos significativamente menores em relação as etapas de pré centrifugação (“PC”) e ressuspendidas (“R”), o que acredita-se estar relacionado ao processo de centrifugação, no qual partículas maiores sofrem maior ação centrífuga e ficam acumuladas no fundo do recipiente, e as menores se mantêm na superfície aquosa.

A tendência da geração de partículas menores quando a reação ocorre no meio com maiores velocidades de agitação, pode ser atribuída ao favorecimento da repulsão eletrostática que ocorre entre as cargas superficiais positivas das partículas, e a evidente dificuldade de agregação em sob alta agitação (FÁBREGAS et al., 2013).

Com base nestes resultados experimentais, foram selecionadas inicialmente as amostras H8_V1050_S, H8_V1500_S e H8_V1500_R, com dimensões médias de partículas de $256,4 \pm 14,0$; $132,3 \pm 9,4$ e $340,1 \pm 15,9$ nm respectivamente (Figura 3.2), para a realização dos ensaios preliminares *in vitro* de ação contra os fungos *P. expansum* e *A. Alternata*. No entanto, observou-se que para um mesmo volume as concentrações de quitosana eram diferentes para cada amostra, o que foi atribuído a eventuais perdas, ou não recuperação de todas as partículas, no processo de centrifugação e ressuspensão. Neste sentido, para garantir a concentração final de nanopartículas e, conseqüentemente de quitosana em suspensão, optou-se pela utilização da amostra H8_V1500_PC não centrifugada.

Ao serem observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG), tem-se que essas partículas, na condição pré-centrifugação H8_V1500_PC (Figuras 3.2-a e 3.2-b), constituem na dispersão de grandes aglomerados porosos formados pela agregação de partículas menores. A dimensão média obtida pela análise de espalhamento de luz (Zeta-sizer) foi de $955,4 \pm 18,9$ nm (Figura 3.2), valor que reflete o raio hidrodinâmico da amostra, ou seja, os aglomerados são lidos como uma única partícula (JONASSEN, KJØNIKSEN & HIORTH, 2012). Mas pelo registro fotográfico da Figura 3.2-b, observa-se a agregação de múltiplas partículas menores, com diâmetros individuais próximos a $117,3 \pm 49,3$ nm como será apresentado adiante. Dimensões essas similares ou até menores as obtidas quando submetidas a centrifugação (Figura 3.2-c) e a ressuspensão (Figura 3.2-d).

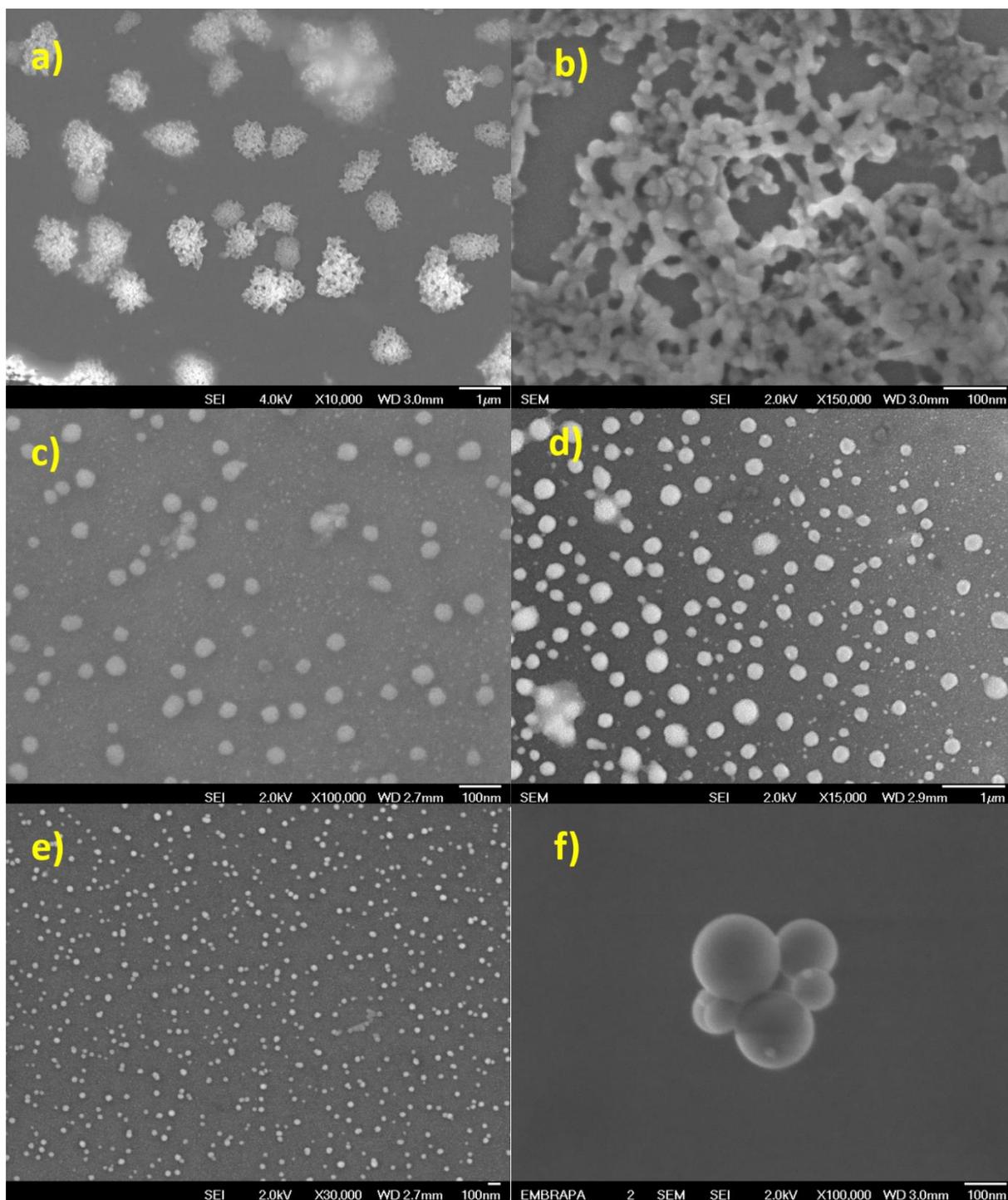


Figura 3.2 Imagens de MEV-FEG de NPQui-TPP em diferentes etapas de síntese: (a; b) amostra pré-centrifugação (H8_V1500_PC); (c) no sobrenadante (H8_V1500_S), (d) ressuspensas (H8_V1500_R); (e; f) após ultrassonicação (H8_V1500_PC).

Para promover a ruptura desses aglomerados e tornar as partículas adequadas para o objetivo deste trabalho, suspensões de H8_V1500_PC foram então submetidas a ultrassom durante 2 min com amplitude de 30%, o que resultou na desagregação das partículas (Figuras 3.2-e e 3.2-f). Nestas condições, as nanopartículas obtidas apresentam parâmetros dentro dos valores desejáveis de

cargas, dispersão e homogeneidade de formatos e tamanhos, conforme dados graficamente comparados na Figura 3.3, segundo valores obtidos por Zeta-sizer.

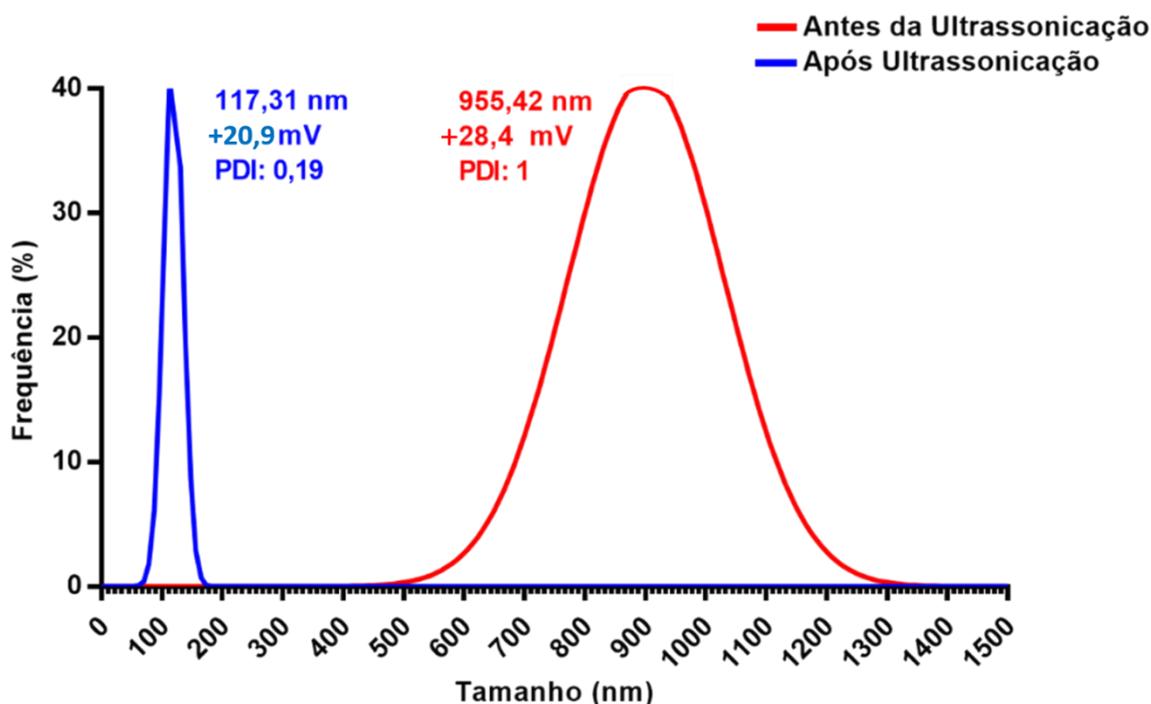


Figura 3.3 Tamanhos e dispersão das partículas na síntese H8_V1500_PC, anterior e após a ultrassonicação, confirmando a desagregação das partículas. Valores de potencial zeta (mV) e índice de polidispersividade (PDI) também são assinalados.

Antes da ultrassonicação os aglomerados apresentavam tamanhos médios de $955,4 \pm 18,9$ nm, potencial zeta de $+28,4 \text{ mV} \pm 5,2$ e Índice de Polidispersividade (PDI) de 1, que é considerado alto, indicando baixa homogeneidade de tamanhos e elevada presença de aglomerados. Após a ultrassonicação, as nanopartículas desagregadas apresentaram tamanhos médios de $117,3 \pm 49,3$ nm, potencial zeta de $+20,96 \text{ mV} \pm 3,79$ e uma significativa redução da polidispersividade, PDI de $0,19 \pm 0,04$ o que indica alta homogeneidade dos tamanhos na suspensão, que pode ser depreendido pelo estreitamento da Gaussiana de distribuição da Figura 3.3.

Como já apresentado (Item 1.6.1), partículas com dimensões reduzidas são capazes de interagirem mais facilmente e penetrarem isoladamente na parede celular fúngica e, com isso, potencializar sua atividade antimicrobiana. Em estudo conduzido por TAMER et al., em 2014, ficou evidente que partículas com diâmetros de 260 nm e, portanto maiores que as obtidas neste trabalho, já se mostram capazes de penetrarem nas células fúngicas e inibir o crescimento de fungos como o *P. expansum*, *R. stolonifer* e *B. cinerea*, o que leva a inferir que as nanopartículas de

117,3 nm sintetizadas no presente trabalho podem resultar em ações mais eficientes.

No trabalho de Esmailzadeh-Gharedaghi e colaboradores, foram avaliados diversos tempos e amplitudes de ultrassonicação, indicando que existe um ponto crítico a partir do qual o aumento da duração do processo de ultrassonicação não promove reduções adicionais de tamanho (ESMAEILZADEH-GHAREDAGHI et al., 2012). Este limite tem sido atribuído às diferentes forças de interação responsáveis por manter a união das partículas em um agregado. À medida que a ultrassonicação inicia, esta é capaz de romper as ligações fracas, mas o aumento no tempo do processo não garante a quebra das ligações mais fortes (TANG, HUANG & LIM, 2003; TSAI, BAI & CHEN, 2008; ESMAILZADEH-GHAREDAGHI et al., 2012).

Com um aumento da amplitude ultrassônica, as ligações fortes poderiam ser rompidas. No entanto, esse aumento pode elevar significativamente a ocorrência de cavitações (geração e colapso de bolhas no meio) que reduzem ou perturbam a propagação da transmissão de energia, diminuindo o efeito de desagregação desejado (TANG; HUANG; LIM, 2003). Adicionalmente, o aumento da amplitude e/ou do tempo de ultrassonicação pode ocasionar acréscimo da temperatura e, no caso de biomaterias, sua degradação térmica.

3.2 Caracterização das Nanopartículas de Quitosana-TPP

3.2.1 Ensaio de estabilidade

Com o intuito de avaliar o tempo e o padrão de agregação das suspensões de NPQuit-TPP e, desta forma, estimar sua estabilidade, as variações de tamanhos, potencial zeta e índice de polidispersividade (PDI) foram avaliadas ao longo de 30 dias, cujos resultados podem ser acompanhados nos gráficos da Figura 3.4.

Como já observado por microscopia, é confirmado a aglomeração temporal das NPQui-TPP, formando agregados de maiores dimensões, com aparente estabilização após o vigésimo dia (Figura 3.4-a). O acompanhamento das dimensões médias indica a variação do diâmetro hidrodinâmico inicial de 117,31 nm para 1.773 nm em um período de 30 dias, ou seja, um aumento de cerca de 15 vezes.

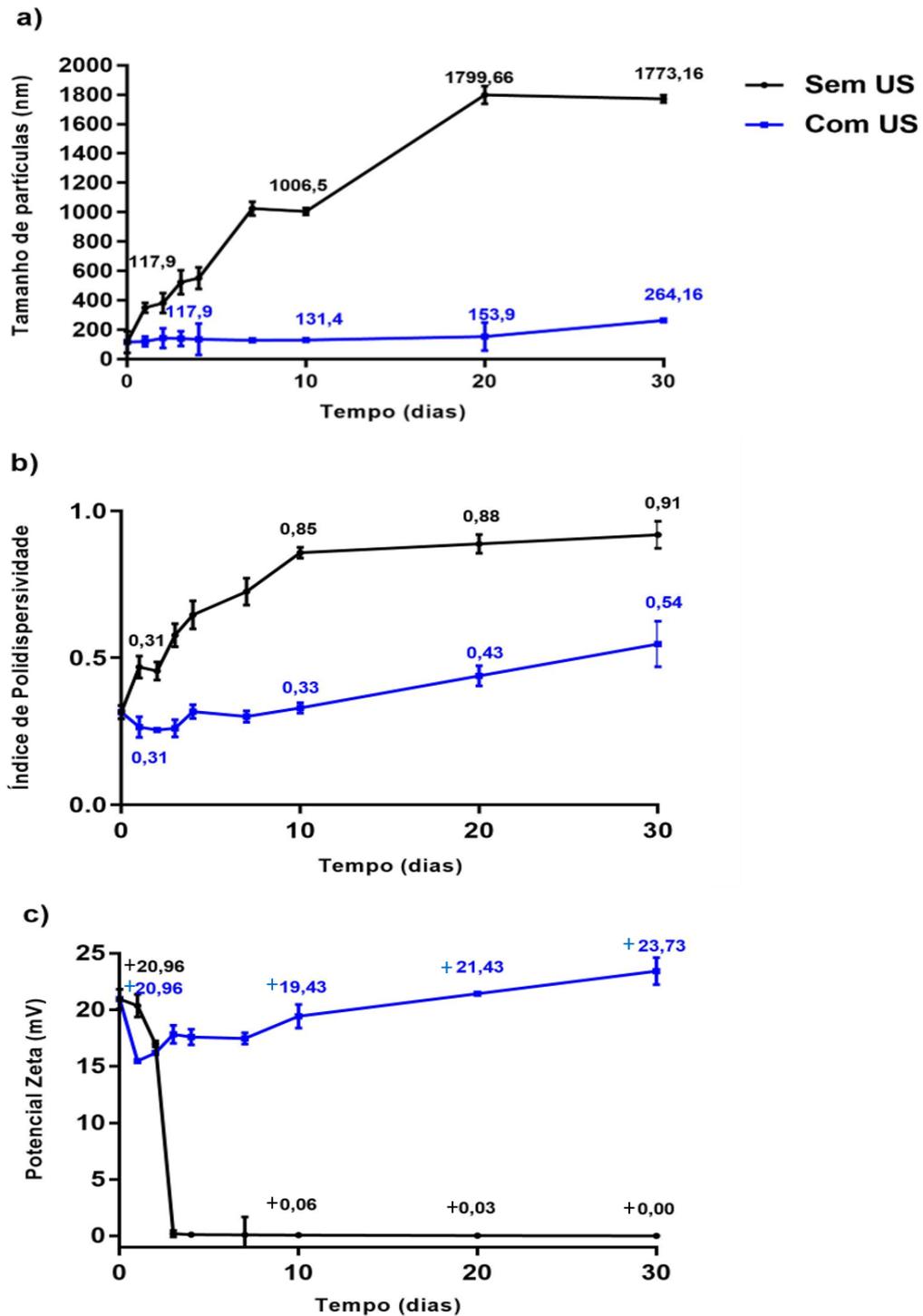


Figura 3.4 Parâmetros relacionados a estabilidade de suspensões de nanopartículas de Quitosana-TPP em função do tempo. Medidas de a) Tamanho de partícula; b) Índice de Polidispersividade (PDI) e c) Potencial Zeta, ao longo de 30 dias em nanopartículas submetidas ou não a ultrassonificação (US).

As NPQui-TPP quando submetidas a ultrassom (em azul), apresentaram maior estabilidade com menor tendência à agregação, com alterações de tamanhos proporcionalmente menores, entre 117,3 nm para 264,2 nm, após o trigésimo dia, o que representa um aumento de cerca de 2,25 vezes, consideravelmente inferior às amostras não sonicadas.

Com relação à variação no Índice de Polidispersividade (PDI) (Figura 3.4-b), as medidas para ambas amostras foram coerentes com os resultados de variação de tamanho. As partículas não sonicadas acusaram um aumento de cerca de 3 vezes (PDI de 0,31 para 0,91), confirmando a alta tendência de aglomeração ao longo do tempo, formando uma suspensão caracterizada pela dispersão de partículas de tamanhos variados em uma distribuição irregular (normalmente polimodal), enquanto as submetidas à ultrassonificação, o aumento medido foi de de 0,31 para 0,54 após 30 dias, indicando também a ocorrência de certa aglomeração, embora dentro de um intervalo de distribuição de tamanhos bem mais estreito, o que é desejável para a aplicação em questão.

Em relação ao potencial Zeta (Figura 3.4-c), foram observadas alterações nos valores iniciais de +20,96 (mV) para +23,73 (mV) e 0,00 (mV) nas leituras das amostras submetidas e não submetidas a ultrassonificação, respectivamente. Ou seja, para as amostras submetidas a ultrassonificação, a variação dos valores de Potencial Zeta não apresentou diferenças significativas em relação ao primeiro dia de análise, mantendo assim praticamente inalterada a capacidade de repulsão entre as partículas ao longo do período. Nas amostras não submetidas ao processo, houve uma tendência notável de diminuição nos valores, chegando próximos a zero a partir do quarto dia de análise, confirmando a menor estabilidade nestas condições.

O Potencial Zeta é a medida do potencial elétrico presente no plano hidrodinâmico de cisalhamento da partícula (interface com o solvente), e quanto mais alto seu valor, maior será a repulsão eletrostática entre as partículas mantendo-as assim dispersas em solução, o que configura indicativo da estabilidade da suspensão (BHATTACHARJEE, 2016). Valores de potencial zeta próximos ou superiores a -30 mV ou +30 mV são, na maioria dos casos, considerados como sistemas altamente estáveis (KASZUBA et al., 2010; PATEL & AGRAWAL, 2011; BHATTACHARJEE, 2016). Potencial zeta igual a zero é denominado “Ponto Isoelétrico da Suspensão” e representa a situação na qual a suspensão atinge sua máxima instabilidade (WATSON; TUZINSKI, 1989).

Pela comparação dos parâmetros de tamanho, polidispersividade e potencial zeta, pode-se inferir que o emprego de ultrassonificação, após a síntese das nanopartículas, consiste em uma técnica simples, que não apenas dispersa mas assegura a estabilidade da suspensão nanoparticulada. Cabe salientar que embora existam outras estratégias apresentadas na literatura para a redução da tendência de agregação, como o uso de solventes salinos (JONASSEN; KJØNIKSEN & HIORTH, 2012) e processo de liofilização pós-síntese (CHACON et al., 1999), estas não são consideradas adequadas à aplicação de nanopartículas em alimentos.

O uso de meios salinos é empregado para elevar a condutividade do meio e a densidade de cargas superficiais. Este processo além de instável pode gerar alterações de sabor em aplicações tópicas em frutas (DEVLIEGHERE, VERMEULEN & DEBEVER, 2004). A liofilização de nanopartículas poliméricas dificilmente recupera suas características iniciais após a ressuspensão (CHACON et al., 1999), o que inviabiliza a reprodutibilidade em aplicações na forma de *spray*.

Assim, considerando o conjunto dos parâmetros operacionais da técnica de geleificação iônica avaliados e as características das partículas geradas, define-se as condições mais adequadas para a síntese de nanopartículas de quitosana-TPP, para o objetivo de emprego como agente antifúngico, as seguintes: gotejamento de TPP na razão de 1 mL/min na concentração de 0,05% a uma altura de 8 cm em relação a superfície do gel de quitosana (10g/L em ácido acético a 1%), em uma velocidade de rotação do meio reagente em 1500 rpm, seguido de ultrassonificação com 30% de amplitude durante 2 min. Tais condições garantem homogeneidade de distribuição de tamanhos e reprodutibilidade sem a necessidade de processos adicionais.

3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A análise da quitosana pura e da reticulada com TPP, por meio de espectroscopia de FT-IR, permite a caracterização estrutural individual bem como a inferência dos diferentes tipos de ligações que ocorrem entre o polímero e o TPP, indicando quais grupos funcionais que preferencialmente participam das interações na formação das nanopartículas. Os espectros da quitosana pura, do TPP e das NPQui-TPP estão dispostos na Figura 3.5.

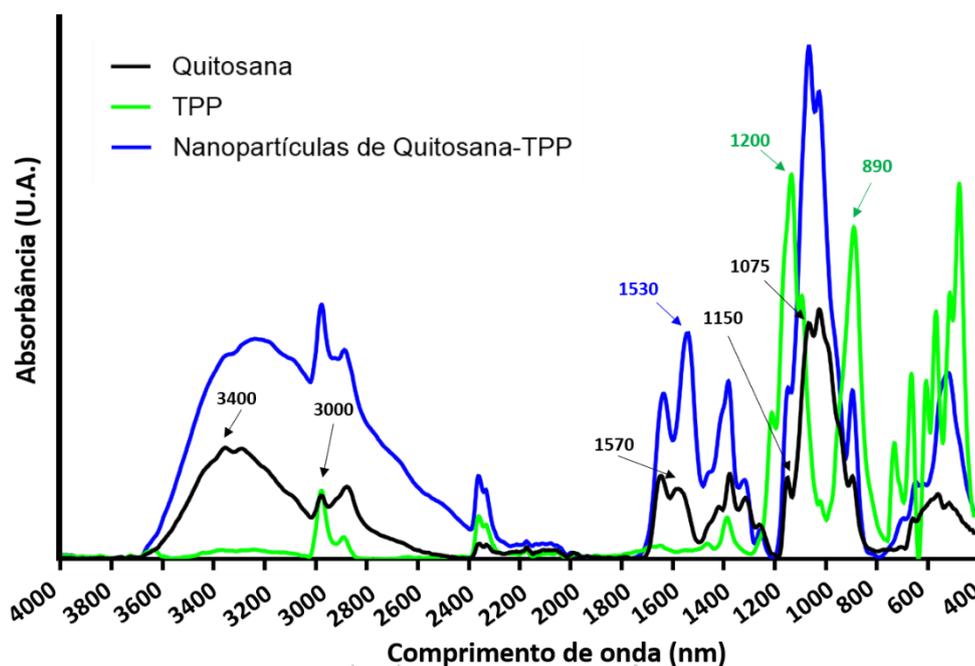


Figura 3.5 Espectros de FT-IR da Quitosana e das NPQui-TPP liofilizadas.

A quitosana apresenta espectro de absorvância com picos característicos de materiais polissacarídicos. Em comprimentos de onda próximos a 3400 cm^{-1} , as bandas de absorção são atribuídas ao estiramento dos grupos hidroxila, juntamente com vibrações sobrepostas do estiramento N-H da amina primária e amida II. Entre 3000 e 2800 cm^{-1} estão as bandas resultantes das vibrações C-H; em 1150 cm^{-1} e 1075 cm^{-1} estão as referentes ao estiramento assimétrico do C-O e do C-O-C, respectivamente. O duplete assinalado em 1570 cm^{-1} é atribuído às vibrações da posição C2 do grupo amino NH_2 (PAPADIMITRIOU et al., 2008; ANTONIOU et al., 2015).

No espectro referente ao TPP encontramos duas principais regiões com bandas intensa em 1200 cm^{-1} , que são ser atribuídas a estiramento $\text{P}=\text{O}$ e em 890 cm^{-1} , relacionadas a ligações dos grupos fosfato $\text{P}-\text{O}$ e $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ (ANTONIOU et al., 2015).

Como resultado da reticulação desses dois polímeros (quitosana-TPP), o espectro resultante obtido nas amostras de nanopartículas, indica a manutenção de diversos grupos identificados em ambos, com algumas alterações importantes nas posições e intensidades das vibrações. As vibrações referentes aos fosfatos da TPP (em 1200 e 890 cm^{-1}) são fortemente reduzidas e parcialmente sobrepostas pela

banda dos grupos C-O-C da quitosana. A principal mudança se dá na vibração em 1530 cm^{-1} , correspondente aos grupos amino protonados da quitosana (NH_3^+), com alteração no caráter de absorbância, o que configura uma complexação entre os dois materiais. Ou seja, as análises por espectroscopia de infravermelho confirmam que interações de caráter iônico, entre a quitosana e o tripolifosfato de sódio, são o mecanismo formador das nanopartículas por geleificação (PAPADIMITRIOU et al., 2008; ANTONIOU et al., 2015).

3.2.3 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Termogravimetria (TG), é considerada uma técnica eficiente para a avaliação da estabilidade estrutural de um material através da análise de seu comportamento térmico e que vem sendo empregada com frequência em análises de nanopartículas (AOUADA, 2009; LOREVICE et al., 2012; MARTELLI. et al. 2013).

Os resultados das análises realizadas nas amostras de H8_V1500_PC indicam certa similaridade entre as curvas de degradação da quitosana pura e das nanopartículas (Figura 3.6-a). De maneira geral, o primeiro estágio de decomposição para ambos materiais ocorre em temperaturas próximas a $80\text{ }^\circ\text{C}$, correspondente a uma perda de massa de cerca de 8% para a quitosana pura e em torno de 12% para o material nanoparticulado. Essas perdas correspondem à evaporação da água residual fracamente ligadas aos grupos hidroxilas da matriz. A partir da desidratação, as respostas térmicas se diferenciam, com uma rápida degradação para NPQui-TPP a partir de $162\text{ }^\circ\text{C}$ e uma estabilização estrutural da quitosana até $230\text{ }^\circ\text{C}$. Em $300\text{ }^\circ\text{C}$ a perda de massa de ambos são correspondentes, com uma redução de 43% com respeito a massa inicial.

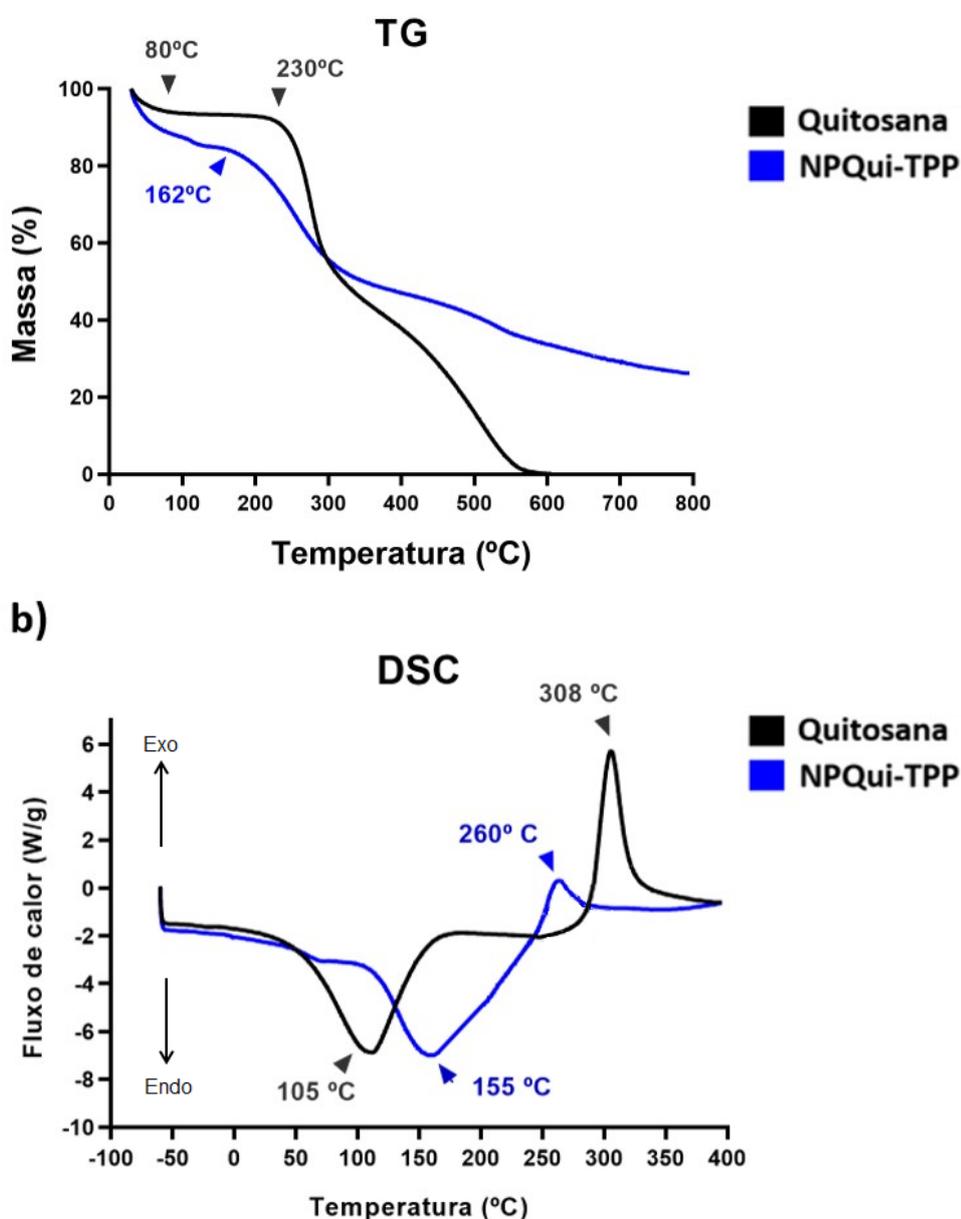


Figura 3.6 Resultados da caracterização térmica da Quitosana pura e das Nanopartículas de Quitosana-TPP. a) Curvas de termogravimetria (TG); b) Termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

A partir desta temperatura tem-se o início de processos de reações oxidativas e hidrólises levando à despolimerização das cadeias. Registra-se perdas rápidas para a quitosana, até pirolise total em torno de 570 °C e uma maior estabilidade para o material entrecruzado com degradações menos acentuadas, chegando a uma massa residual de 26% em 800 °C. As diferenças de massas encontradas ao final do ciclo térmico associadas ao perfil em que ocorrem as degradações indicam um considerável efeito estabilizante da reticulação com o TPP, em comparação com o polímero puro.

Análises complementares realizadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), auxiliam na interpretação das transformações térmicas que ocorrem em ambos materiais. Os termogramas relativos às variações de fluxo de calor nas amostras (Figura 3.6-b) descrevem um perfil térmico similar com picos endotérmicos, a 105 °C para a quitosana e 155 °C para o sistema NPQuitTPP, temperaturas nas quais toda a umidade é removida das amostras. Nesta região ocorrem também o início da despolimerização pelo rompimento das ligações entre as aminas e acetilaminas com as unidades monoméricas de glicose na quitosana (ZAWDZKI & KACZMAREK, 2010).

O deslocamento e alargamento do pico endotérmico observado para as nanopartículas devem-se a presença dos grupos fosfatos do TTP, que são altamente hidrofílicos e se ligam com a água de forma mais intensa, requerendo assim um aumento da temperatura para que o rompimento das ligações de hidrogênio, estabelecidas entre as unidades OH dos fosfatos e os grupos amina da quitosana, ocorram e a desorção da água seja mais efetiva (Zawadzki & Kaczmarek, 2010).

Com o aumento da temperatura ocorre a inversão do fluxo com aparecimento de um pico exotérmico em 260 °C para a NPQuitTPP, decorrente da degradação estrutural das ligações simples entre os fosfatos, e a 308 °C para a quitosana, que está relacionado com a decomposição estrutural, principalmente com o rompimento das ligações glicosídicas, que são covalentes e compatíveis com temperaturas mais elevadas de despolimerização (BREDA et al., 2017) . A partir desses valores, ambos os materiais seguem para uma total decomposição pirolítica (carbonização).

3.3 Avaliação do potencial antifúngico das Nanopartículas de Quitosana-TPP

3.3.1 Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)

O ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi realizado através de diluições em meio líquido com o intuito de definir as concentrações mínimas das suspensões de NPQui-TPP que atuem positivamente na inibição do crescimento fúngico, inicialmente em condições *in vitro*. A Figura 3.7 ilustra os aspectos visuais dos tubos nas diversas concentrações de nanopartículas referentes ao crescimento dos fungos *A.alternata* e *P.expansum*, no primeiro e no sétimo dias de interação.

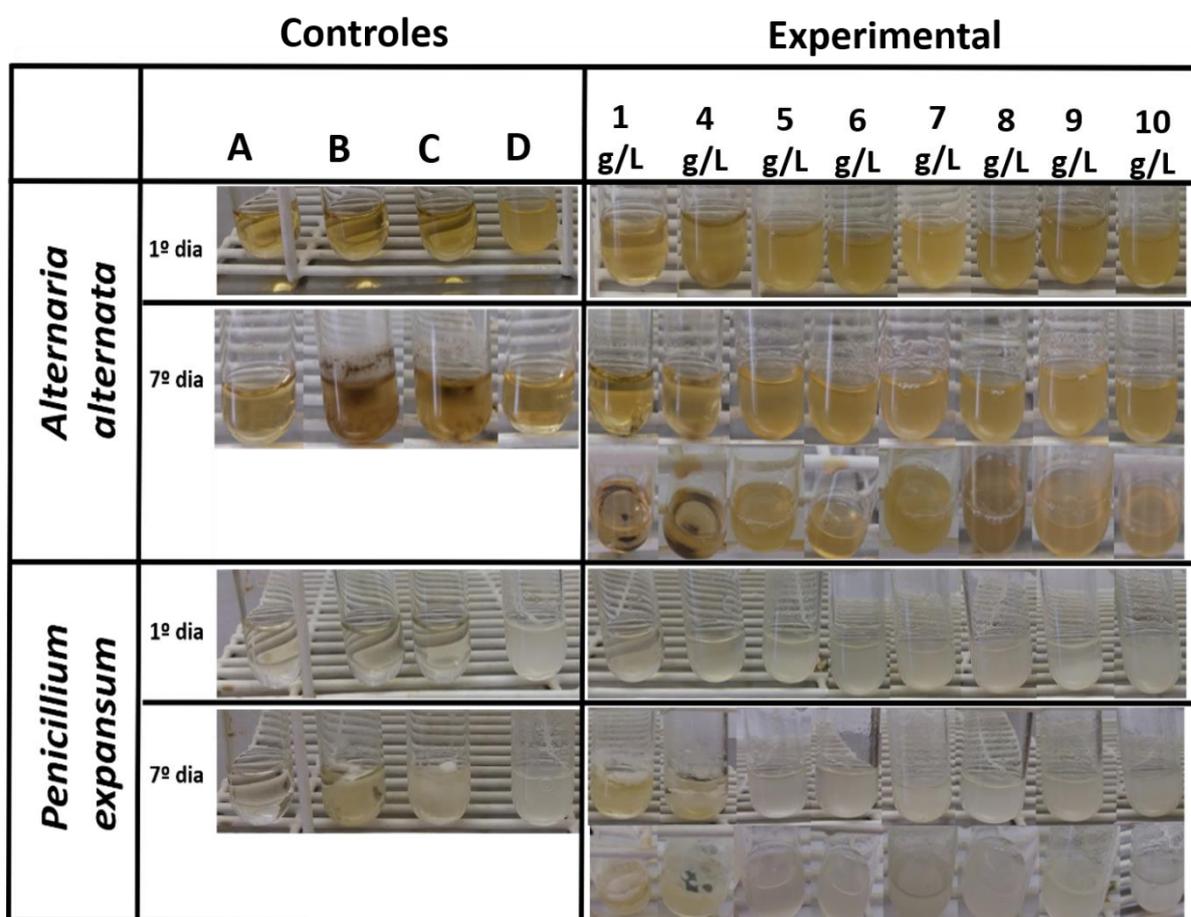


Figura 3.7 Ensaio de Concentração mínima inibitória (MIC). Crescimento de *A. alternata* e *P. expansum* no 1º e no 7º dias de ensaio dos tubos controle A (Meio BDB+ Ácido acético + TPP); B (Meio BDB + Suspensão fúngica); C (Meio BDB + Ác. Acético + TPP) e D (Meio BDB + Suspensão de Nanopartículas de Quitosana-TPP) e tubos experimentais, em diferentes ângulos, com nanopartículas de Quitosana-TPP com concentrações de 1 a 10 g/L.

A ausência de crescimento nos controles A e D, sugere que não houve contaminação cruzada no experimento e que não havia contaminação fúngica anterior ao início do ensaio nas NPQui-TPP. Como esperado, houve crescimento nos tubos do grupo B, utilizado como controle positivo, na comparação com os demais grupos.

O grupo controle C foi montado com o intuito de confirmar que a atividade antifúngica observada pelas NPQui-TPP deve-se unicamente a ação da quitosana e não dos demais compostos utilizados em sua síntese (ácido acético e TPP). Portanto, o grupo C foi composto somente pelo meio de cultivo BDB, suspensão fúngica padronizada, ácido acético e o TPP e, como foi registrado crescimento fúngico nestes tubos, pode-se inferir que o TPP e o ácido acético não apresentam efeito inibitório ao crescimento de *P. expansum* e *A. alternata*, sendo assim a

atividade antimicrobiana observada nas NPQui-TPP dependente somente da quitosana.

Embora a Figura 3.7 apresente tubos com concentrações de nanopartículas até 10 g/L, as proporções testadas foram de até 25 g/L. A partir de 7 g/L contudo, não foram observados crescimentos aparentes para ambos os fungos, permitindo um afinilamento experimental para a próxima etapa de análise microbiológica. Estes tubos se mantiveram com o aspecto similar ao controle negativo (Controle "A"), não sendo observadas alterações perceptíveis em sua turbidez, diferentes das suspensões com concentrações menores de 7 g/L de quitosana, nos quais o aumento de turbidez fica evidente, indicando o crescimento dos microrganismos ou de colônias em formação.

Definiu-se assim uma concentração mínima inibitória (MIC) em meio aquoso de 7 g/L de NPQui-TPP, a partir da qual o crescimento de ambos fungos foram inibidos.

3.3.2 Crescimento Radial em meio sólido

Para a avaliação da atividade em meio sólido, os aspectos dos crescimentos foram acompanhados em placas de Petri em meio básico BDA, em diferentes concentrações de NPQui-TPP. Na Figura 3.8 estão apresentadas imagens características do crescimento fungico e os valores dos diâmetros finais das colônias apresentados na Tabela 3.1.

Em relação aos controles, os resultados repetem os obtidos em meio líquido, sendo observados crescimentos fúngicos somente nos controles B e C. Embora nos testes de diluição em meio aquoso a concentração mínima inibitória (MIC) de nanopartículas tenha sido de 7 g/L para ambos os fungos inoculados, no Ensaio de Crescimento Radial em meio sólido, os resultados divergiram. Houve uma tendência de diminuição do crescimento, inferida através da redução dos tamanhos de suas colônias, com o aumento da concentração das NPQui-TPP até a ausência total de crescimento, o que ocorreu nas placas nas concentrações de 8 g/L para *A. alternata* e 9 g/L para *P. expansum*. A necessidade de maiores teores de quitosana para uma inibição eficiente em meio sólido era esperada e se deve ao fato de as partículas apresentarem menor mobilidade no gel, o que reduz a probabilidade de contatos superficiais entre a quitosana e a estrutura dos fungos.

Uma exceção nesta tendência de redução das colônias com o aumento do teor de nanopartículas ocorreu nas placas com concentração de NPQui-TPP de 4g/L, nas quais foram observados um maior crescimento em relação as placas de 1g/L. Este crescimento pode ser atribuído, possivelmente, ao fato de que a quitosana, até certa concentração, serve como fonte de carbono para estes microrganismos, conforme resultados anteriores já publicados para ensaios realizados para diversos outros fungos (LI et al., 2008; BOONLERTNIRUN, BOONRAUNG & SUVANASARA, 2017; DA SILVA et al., 2019).

A pequena diferença entre os valores de MIC encontrados para os dois fungos avaliados também era esperada, considerando que a sensibilidade à quitosana é dependente da composição estrutural de cada espécie (GOY; MORAIS & ASSIS, 2016). Um exemplo desta relação é a quantidade de ácidos graxos insaturados, que é proporcional a sensibilidade do microorganismo à quitosana, provavelmente por influenciar na interação entre a parede celular e os grupos positivamente carregados da quitosana (VERLEE, MINCKE & STEVENS, 2017).

Uma das dificuldades normalmente encontradas na interpretação dos resultados de análises antifúngicas envolvendo quitosana consiste em dimensionar os efeitos de parâmetros intrínsecos, como os decorrentes dos processos de obtenção do material, pH, temperatura, massa molar, grau de desacetilação e a fonte de extração da quitina. Estes parâmetros interferem nas características finais do material, alterando, em maior ou menor grau, suas atividades antimicrobianas, o que reflete nos valores de Concentração Mínima Inibitória (MIC), assim como as características biológicas das linhagens de fungos, que também respondem distintamente às interações (VERLEE, MINCKE & STEVENS, 2017).

De um modo geral, pode-se afirmar que baixas concentrações a quitosana podem atuar como um estímulo para o crescimento fúngico e a partir de uma determinada concentração (em nosso caso, 8 e 9 g/L), passa a ter efeito fungistático ou mesmo fungicida (TAMER et al., 2014), como será definido nos ensaios a seguir.

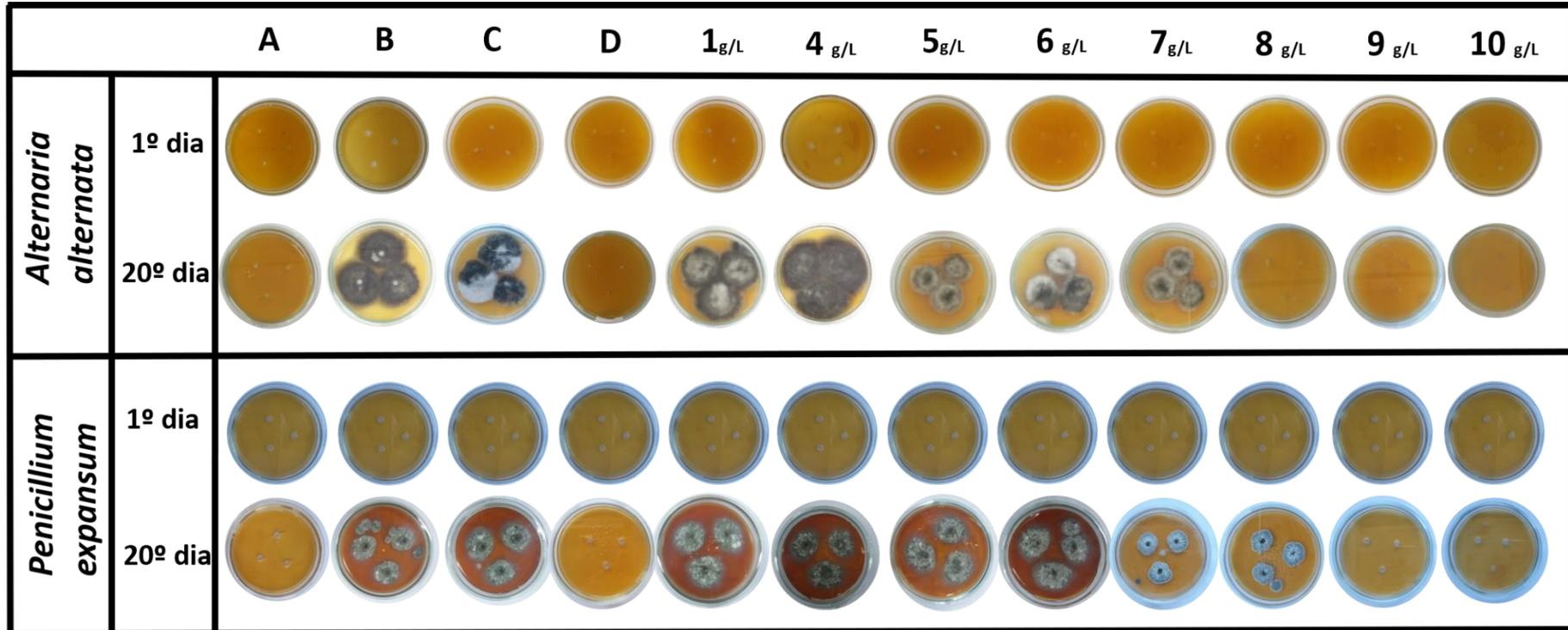


Figura 3.8 – Ensaio de Crescimento Radial. Crescimento de *A. alternata* e *P. expansum* no 1º e no último dia de ensaio nas placas controle A (Meio BDA+ Ácido acético + TPP); B (Meio BDA + Suspensão fúngica); C (Meio BDA + Ác. Acético + TPP) e D (Meio BDA + Suspensão de Nanopartículas de Quitosana-TPP) e placas do grupo experimental com nanopartículas de Quitosana-TPP com concentrações de 1 a 10 g/L.

3.3.3 Índice Fungioestático (IF)

Os valores com os diâmetros finais das colônias e os respectivos valores dos Índices Fungioestáticos, conforme estimados pelo procedimento descrito no Item 2.3.4, estão dispostos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Valores dos diâmetros finais das colônias e Índices Fungioestáticos (IF) do Ensaio de Crescimento Radial. Crescimento de *A. alternata* e *P. expansum*. Controle A (Meio BDA+ Ácido acético + TPP); B (Meio BDA + Suspensão fúngica); C (Meio BDA + Ác. Acético + TPP) e D (Meio BDA + Suspensão de Nanopartículas de Quitosana-TPP) e placas experimentais com nanopartículas de Quitosana-TPP com concentrações de 1 a 10 g/L.

Amostras	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Penicillium expansum</i>	
	Diâmetro final da colônia (7º dia) (cm)	Índice Fungioestático (%)	Diâmetro final da colônia (20º dia) (cm)	Índice Fungioestático (%)
Controle A	0,00 ^d	-	0,00 ^d	-
Controle B	4,33 ± 0,29 ^{a,b}	-	4,23 ± 0,46 ^b	-
Controle C	3,63 ± 0,65 ^{b,c}	-	4,21 ± 0,21 ^b	-
Controle D	0,00 ^d	-	0,00 ^d	-
1g/L	4,34 ± 0,29 ^{a,b}	- 0,31 ± 6,70 ^c	4,57 ± 0,11 ^b	- 7,71 ± 2,71 ^c
4 g/L	4,71 ± 0,66 ^a	- 8,80 ± 15,18 ^c	5,11 ± 0,09 ^a	-20,29 ± 2,36 ^d
5 g/L	3,21 ± 0,11 ^c	25,93 ± 2,32 ^b	5,27 ± 0,06 ^a	- 24,22 ± 1,36 ^d
6 g/L	3,13 ± 0,06 ^c	27,47 ± 1,34 ^b	4,34 ± 0,15 ^b	-2,20 ± 3,60 ^c
7 g/L	2,87 ± 0,15 ^c	33,64 ± 3,54 ^b	3,12 ± 0,19 ^c	26,89 ± 4,72 ^b
8 g/L	0,00 ^d	100 ± 0 ^a	2,90 ± 0,15 ^c	32,39 ± 3,61 ^b
9 g/L	0,00 ^d	100 ± 0 ^a	0,00 ^d	100 ± 0 ^a
10 g/L	0,00 ^d	100 ± 0 ^a	0,00 ^d	100 ± 0 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Os resultados apontam para diferenças estatisticamente significativas na comparação do crescimento de ambos fungos avaliados. Os valores negativos de IF apresentados nas concentrações de 1 e 4g/L de NPQui-TPP, para *A.alternata* e de 1, 4, 5 e 6 g/L para *P. expansum* evidenciam que, nestas concentrações, houve um crescimento e não a inibição comparativamente ao Controle B, utilizado como referência, indicando a ineficiência dessas concentrações de nanopartículas na inibição do crescimento em meio sólido.

Para *A. alternata*, as concentrações de 6 e 7 g/L levam a crescimentos intermediários com valores de IF em 27,47 e 33,64%, respectivamente. Já para o *P.*

expansum foram obtidos valores de IF entre 26,89 e 32,39 % para 7 e 8g/L de NPQui-TPP, respectivamente. A partir da concentração de 8g/L para *A. alternata* e 9g/L para *P.expansum* não houve crescimento fúngico mesmo após 20 dias de ensaio e, com isso, e o índice fungistático atinge seu máximo valor com inibição de 100% do crescimento.

Embora, como apresentado, os exatos mecanismos pelos quais ocorrem essa atividade antifúngica sejam ainda objetos de investigação, as principais hipóteses sugerem que a ação esteja relacionada a interações eletrostáticas superficiais que promovem trocas iônicas e resultam em instabilidade e fragmentações estruturais da membrana. Estas lesões comprometem a permeabilidade da parede celular, gerando um desequilíbrio osmótico com perdas dos fluidos intercelulares, além de outros mecanismos que ocorreriam simultaneamente, decorrentes da penetração das partículas no microrganismo (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009; AZEREDO et al., 2018).

Estudo conduzido por TAMER et al. 2014, indica também que a ação de inibição do crescimento das hifas pode ser decorrente de uma alteração do pH plasmático provocada pela quitosana, relacionada à diminuição da atividade da enzima H⁺ATPase, que provocaria acúmulos de prótons no meio intracelular, resultando na inibição do fluxo quimiosmótico (responsável pelo transporte de H⁺ e K⁺). Esse desequilíbrio levaria a uma desorganização do citoplasma, retração da membrana plasmática e consequente perda do conteúdo intracelular.

Por sua vez, YOUNES et al. 2014, relacionam a ação da quitosana à redução do crescimento hifal e à interferência na produção de esporângios e liberação de zoósporos. Ou seja, tem sido atribuída à quitosana uma atividade multifatorial, cujas ações ocorrem de forma isolada ou conjuntamente, inibindo o crescimento ou mesmo acarretando na morte do microrganismo.

3.4 Revestimento e caracterização de frutas com Nanoartículas de Quitosana-TPP

3.4.1 Perda de Massa

A manutenção do teor de água em frutas e hortaliças é fundamental à sua conservação. A água é o maior constituinte celular e o meio no qual a maioria das reações bioquímicas essenciais ocorrem. A transpiração é a responsável pelas maiores perdas de líquidos, seja pela evaporação através da superfície ou pela difusão das moléculas entre os espaços intercelulares para o meio externo (THOMPSON et al., 1998; DÍAZ-PÉREZ, 2019;).

Antes da colheita, a transpiração é um processo vantajoso que, além de promover o resfriamento do fruto, gera um gradiente que permite que a água e nutrientes presentes no solo sejam captados, o que faz com que ocorra um equilíbrio em seu conteúdo hídrico total (ASSIS & DE BRITTO, 2014; DÍAZ-PÉREZ, 2019).

Após a colheita, a perda de água ocasiona a desintegração da membrana celular e o extravasamento de solutos que, por consequência, gera alterações irreversíveis nas características sensoriais, como diminuição da firmeza, murchamento, perda de brilho e alterações na cor e sabor. O conjunto desses efeitos são resultados do processo de senescência e aceleram a degradação do fruto (BEN-YEHOSHUA & RODOV, 2003).

Um dos objetivos da aplicação de biopolímeros na formação de uma cobertura comestível, é o de formar uma barreira transparente e semipermeável que seja capaz de reduzir as taxas de respiração, transpiração e, desta forma, minimizar as perdas de água (LEE et al., 2003; ASSIS & DE BRITTO, 2011; AZEREDO et al., 2018).

A aplicação da quitosana e de suas nanopartículas nas frutas em análise neste trabalho (maçãs e goiabas), indicaram ação de barreira ao transporte de umidade, conforme observado pelas taxas de perda de massa, dispostas na Figura 3.9, expressas em porcentagem em relação à massa inicial e comparadas com amostras referências sem coberturas: M_C- para maçãs e G_C- para goiabas.

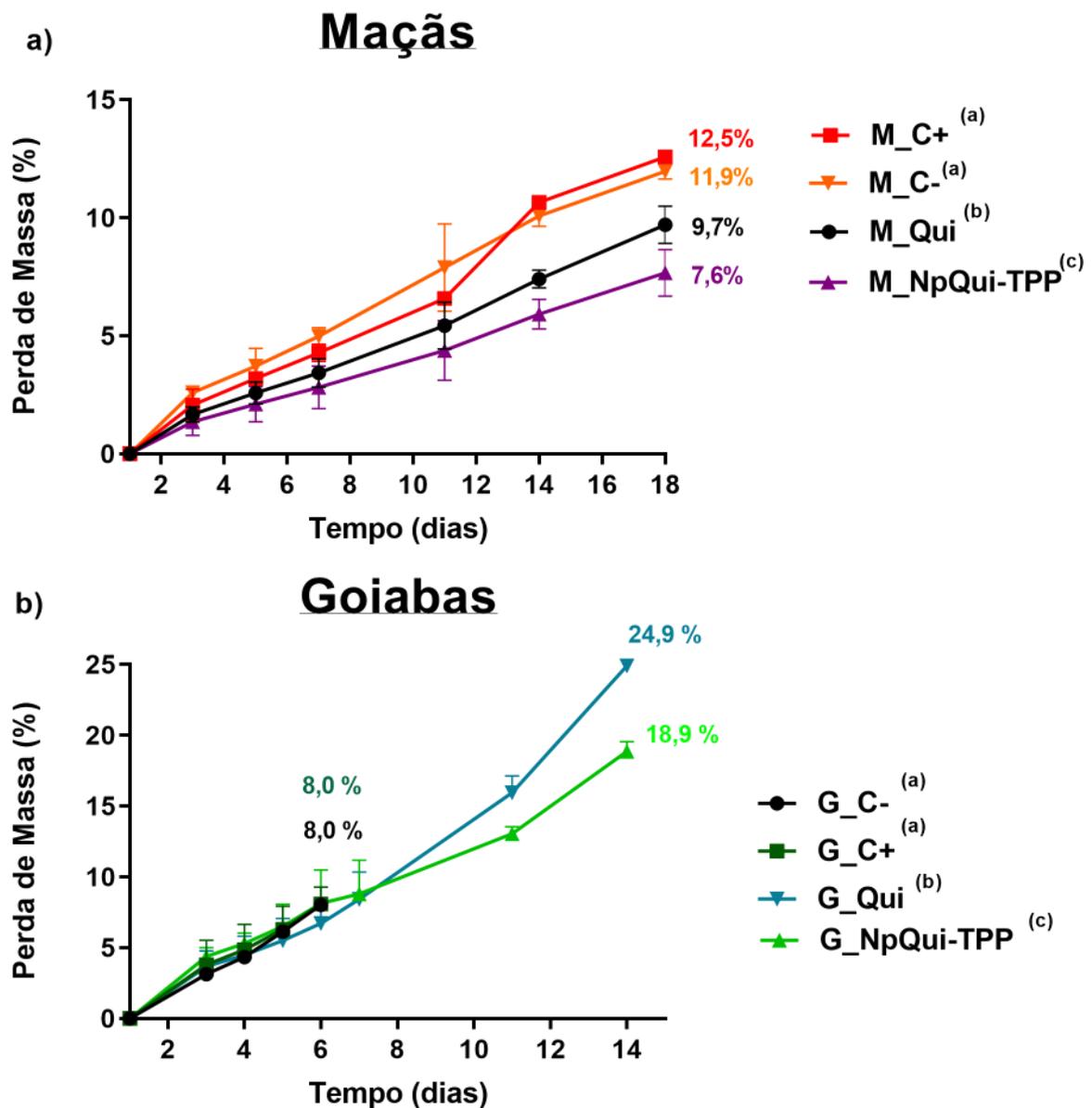


Figura 3.9 Análise de perda de massa. Curvas de porcentagem de perda de massa de a) maçãs e b) goiabas durante 18 e 15 dias, respectivamente. Frutas sem cobertura: M_C- e G_C-. Frutas revestidas e inoculadas com suspensão de esporos (*A. alternata* e *P. expansum*): M_C+ e G_C+. Frutas revestidas com aspersão de nanopartículas: M_NpQui-TPP e G_NpQui-TPP (sem inoculação de fungos) e amostras referências, revestidas por com gel de quitosana: M_QUI e G_QUI. Letras diferentes ao lado dos nomes das amostras indicam que há diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Todas as amostras apresentam perdas contínuas ao longo do tempo de estocagem com comportamento linear crescente. Para as maçãs, as maiores taxas de perda de massa, ao final dos 18 dias de acompanhamento, foram registradas nas amostras M_C+ (12,58%), grupo de frutas este que representa o controle positivo (inoculadas com fungos). O controle negativo (M_C-), apresentou reduções

similares, de 11,97% (Figura 3.9-a). Maiores taxas de perda de massa comparativas para esses grupos eram esperadas, já que o controle negativo não apresenta nenhum tipo de revestimento e, portanto, não apresenta nenhuma barreira adicional limitante às trocas gasosas com o meio externo (ASSIS & DE BRITTO, 2014).

Já o controle positivo (M_C+), embora seja de amostras revestidas, foi avaliado após inoculação com *A. alternaria* e *P. expansum*. Estas frutas apresentaram maiores perdas de massa, o que foi atribuído à infestação fúngica que promove danos no epicarpo elevando a taxa respiratória e, conseqüentemente, à uma maior perda de água (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2012; TAMER et al., 2014; PILON et al., 2015).

As amostras de maçãs revestidas com a suspensão de nanopartículas (M_NpQui-TPP), e quitosana não nanoparticulada (M_Qui), apresentaram taxas de perdas significativamente menores em relação aos grupos controle, com valores de 7,66% e 9,71% respectivamente. Estas diferenças tornaram-se mais relevantes a partir do 14º dia de análise, evidenciando o efeito de barreira proporcionado pela cobertura de quitosana.

Já no experimento com goiabas, as frutas do controle (G_C- e G_C+), foram descartadas após 6 dias do início das medidas. As goiabas apresentam elevada senescência com rápido apodrecimento, evidenciada por perdas marcantes de consistência, escurecimento intenso e crescimento de microrganismos fúngicos, mesmo na ausência de inoculação prévia.

Em contrapartida, as goiabas revestidas (amostras G_Qui e G_NpQui-TPP), tiveram as taxas de amadurecimento reduzidas, conservando razoável integridade que permitiram a análise ao longo de 14 dias. Embora as perdas de massa sejam superiores as das maçãs após duas semanas, as coberturas proporcionaram um aumento na vida útil (em condições de temperatura e umidade não controladas), de 8 dias a mais, em comparação com as não revestidas. Nos grupos de goiabas revestidas, G_Qui e G_NpQui-TPP, as taxas de perda de massa foram de 24,91 e 18,91%, respectivamente (Figura 3.9-b).

Durante os primeiros 6 dias, em todos os quatro grupos avaliados não houve diferenças significativas entre as taxas de perda de massa. Todos apresentavam valores próximos a 8%, embora fosse evidente a diferença nas características instrumentais das frutas, como será apresentado nas análises de textura e cor.

Ainda que seja um material com caráter hidrofílico, com sítios de alta polaridade devido a presença de grupos amino e acetamido (ASSIS & DA SILVA, 2003), o efeito protetor de coberturas de quitosana, como barreira redutora da perda de água e manutenção da firmeza, tem sido amplamente descrito na literatura em frutas como morango (HAN et al., 2004), mamão (DOTTO, VIEIRA & PINTO, 2015), manga (CHIEN, SHEU & YANG, 2007), maçã (ASSIS & PESSOA, 2004), e pêra (XIAO et al., 2010). Diversos outros trabalhos descrevem demais efeitos benéficos, como a diminuição do escurecimento, inibição do crescimento microbiano e a manutenção de polifenóis e vitaminas, mesmo quando utilizada em suspensões não nanoparticuladas (HAN et al., 2004; ASSIS & DE BRITTO, 2014; PASQUARIELLO et al., 2015; PETRICCIONE et al., 2015a; KAYA et al., 2016).

O revestimento por quitosana consiste na formação de uma película fina (com espessuras variando de microns a nanômetros), transparente, invisível a olho nu, formada pelo estabelecimento de ligações entre o epicarpo e o material polissacarídico. Tais ligações garantem a razoável estabilidade da cobertura, mesmo quando submetidas a procedimentos convencionais de lavagem (YIEN et al., 2012; ASSIS & DE BRITTO, 2014).

Os resultados do presente trabalho indicam que, embora ambas formas de quitosana avaliadas sejam eficientes em diminuir as taxas de perda de massa de maçãs e goiabas, as nanoparticuladas (NPQui-TPP) apresentaram um maior efeito protetivo. Esta maior eficiência, provavelmente está relacionada ao menor tamanho da partícula e conseqüentemente maior área superficial, associada a uma distribuição mais homogênea proporcionada pela aplicação por aspersão.

3.4.2 Análise de Firmeza

As medidas da variação da firmeza nas amostras, realizadas por análise de penetrometria estão representadas na Figuras 3.10. Por apresentarem composições e estruturas distintas, é esperado que haja diferenças nos padrões de alteração de firmeza entre as maçãs e as goiabas. Na Figura 3.10-a temos a variação na firmeza de maçãs, conforme medidas realizadas em dias alternados ao longo de 18 dias.

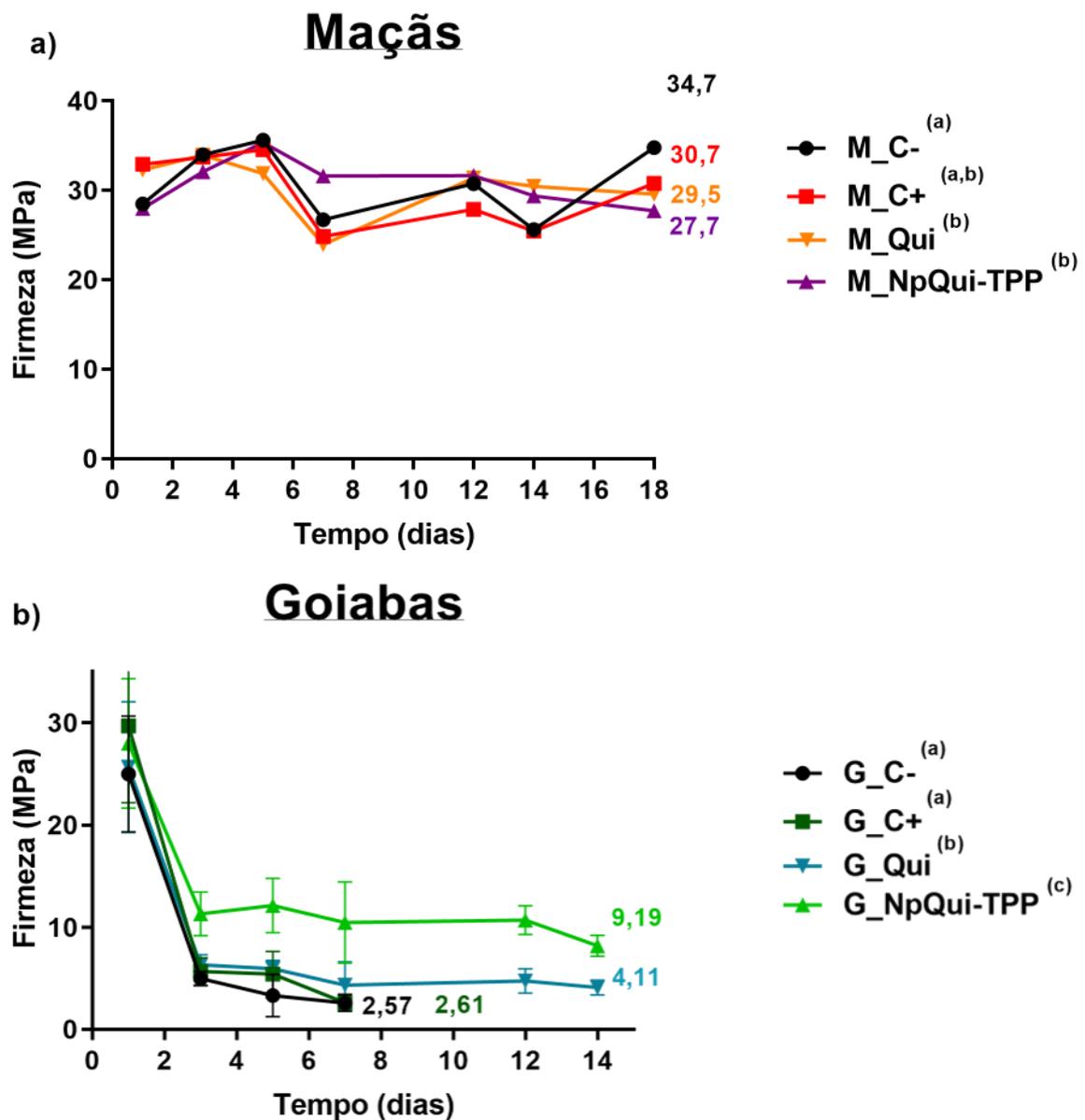


Figura 3.10 Análise de Textura. Curvas de variação de textura (MPa) de a) maçãs e b) goiabas durante 18 e 15 dias, respectivamente. Frutas sem revestimento: M_C- e G_C-; frutas aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum*: M_C+ e G_C+; frutas revestidas com gel de quitosana M_QUI e G_QUI e com nanopartículas de quitosana-TPP: M_NpQUI-TPP e G_NpQUI-TPP. Letras diferentes entre parênteses ao lado da legenda indicam que há diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

A firmeza medida nas maçãs, indicam como esperado, valores mais estáveis que os medidos para as goiabas, embora com flutuação. Essas flutuações não estão unicamente vinculadas a desidratação das frutas. Segundo CALBO & NERY, 1995 e FERREIRA, 2011, tais flutuações estão também relacionadas à degradação das lamelas e a um aumento na elasticidade da casca e da polpa, associados ao acúmulo de fibras que ocorre com a perda de água.

Costa e colaboradores (2012), em análise da firmeza, em 83 diferentes cultivares de maçãs ao longo de dois meses de armazenamento, atribuem as flutuações das medidas também como decorrentes de reações enzimáticas irregulares, que são as principais responsáveis pela degradação da parede celular, da lamela média e degradações de demais componentes (COSTA et al., 2012).

Embora processos degradativos de mesma natureza também ocorram nas goiabas, suas características fisiológicas associadas a um menor grau de esterificação das pectinas, alta taxa de respiração, elevada quantidade de água e de volume gasoso, resultam em um metabolismo intenso (ABREU et al., 2012), com rápida perda de massa em um decaimento acentuado e uniforme de sua firmeza (Figura 3.10-b).

Como a medida da firmeza é uma avaliação indireta da turgescência, definida pelo volume gasoso intercelular tecidual e do nível de degradação da lamela média, que oferece resistência mecânica à penetração da sonda (probe) (FERREIRA, 2011), esta tem sido usualmente empregada como uma inferência indireta do grau de maturação (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

As maçãs, como ensaiadas, confirmam valores comparativos de resistência superiores às goiabas e, portanto, menos susceptíveis a danos mecânicos e alterações em sua firmeza. Neste sentido, Stopa e colaboradores (2018), indicam que até 50% das injúrias normalmente presentes em maçãs sejam decorrentes de impactos ocorridos durante armazenamento e transporte, ainda que boa parte dos danos se torne visível somente após alguns dias (FERREIRA, 2011).

Já nas goiabas, por apresentarem curto período de conservação, principalmente na temperatura ambiente, a firmeza tem sido um dos principais parâmetros na estimativa do grau de amadurecimento (AZZOLINI, JACOMINO & BRON, 2004; LI et al., 2017a; YILDIZ & WILEY, 2017).

Com relação ao efeito das coberturas, pode ser observado pela Figura 3.10-b que houve um rápido decaimento da firmeza, de forma similar, em todos os grupos analisados nos três primeiros dias. No sétimo dia as frutas do controle (G_C- e G_C+) foram descartadas, por apresentarem alta senescência e baixas firmezas, nos valores de 2,57 e 2,61 MPa respectivamente.

As amostras revestidas com quitosana (G_Qui), apresentaram comportamento similar, embora com firmeza ligeiramente maior, o que tornou possível dar continuidade as análises ao longo dos 14 dias. Não houve crescimento

fúngico visível nestas amostras e sua firmeza apresentou valores finais de 4,11 MPa. Este valor é 44,7% menor do que o observado no grupo com revestimento nanoparticulado, G_NPQui-TPP, indicando a maior eficiência da cobertura de nanopartículas na manutenção da firmeza das frutas, o que ocorre em todo o período de análise (Figura 3.10-b). Cabe salientar que, por ser uma fruta mais sensível, a goiaba está mais sujeita a sofrer maiores injúrias durante e após a colheita, além de degradações naturais. Tais injúrias promovem o aumento da produção de etileno e da taxa respiratória, o que favorece uma rápida deterioração (AZZOLINI, JACOMINO & BRON, 2004; BASSETTO, JACOMINO & PINHEIRO, 2005; FERREIRA, 2011)

Adicionalmente, as variações genótípicas da cultivar, tanto para as maçãs como para as goiabas, associadas as características agro-ambientais, maturidade no ponto de colheita, manuseio e exposições a fitopatógenos, também exercem forte influencia na evolução textura e maturação, o que dificulta a comparação com dados disponíveis na literatura (AZZOLINI, JACOMINO & BRON, 2004; BAILEY & DAY, 2004; ROUPHAEL & KYRIACOU, 2018).

3.4.3 Análise colorimétrica: Luminosidade (L*) e Ângulo Hue (°h)

A cor é uma propriedade fundamental em produtos alimentícios e, na maioria dos casos, um indicador de sua integridade, qualidade, grau de amadurecimento e/ou frescor (FERREIRA, SPRICIGO & SARGENT, 2017). Em nossos experimentos, não foram observadas grandes diferenças visuais entre os grupos de maçãs avaliados ao longo do tempo, como pode ser observado pelas amostras que ilustram a Figura 3.11.

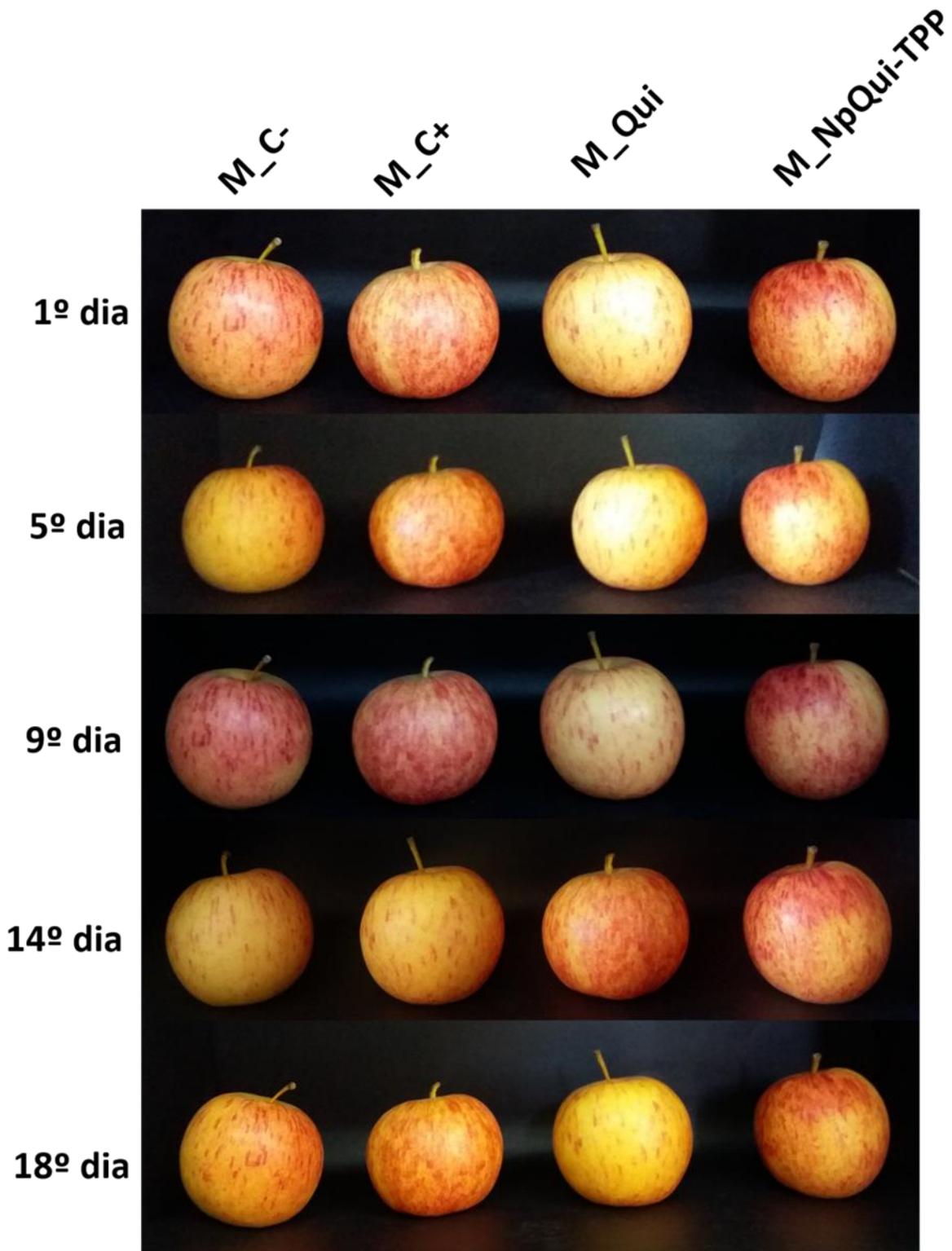


Figura 3.11 Aspecto visual de maçãs revestidas e não-revestidas ao longo do tempo. Frutas sem revestimento, controle negativo: M_C-; Frutas aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum*, controle positivo: M_C+; Frutas revestidas com gel de quitosana não nanoparticulada: M_Qui; Frutas revestidas com nanopartículas de Quitosana-TPP: M_NpQui-TPP.

Essa ausência de alterações visuais em maçãs era, de certa maneira esperada, já que são frutas que apresentam uma vida útil consideravelmente extensa, com pouca alteração de pigmentação ao longo da maturação e o período do experimento não foi suficiente para possibilitar alterações perceptíveis a olho nu. Por isso, foram realizadas medidas instrumentais por análise colorimétrica, aqui apresentadas pela variação temporal da luminosidade (L^*) e do ângulo de Hue (Figura 3.12), que representam, quantitativamente, a intensidade de luz refletida e a tendência do predomínio de uma cor em uma superfície, respectivamente.

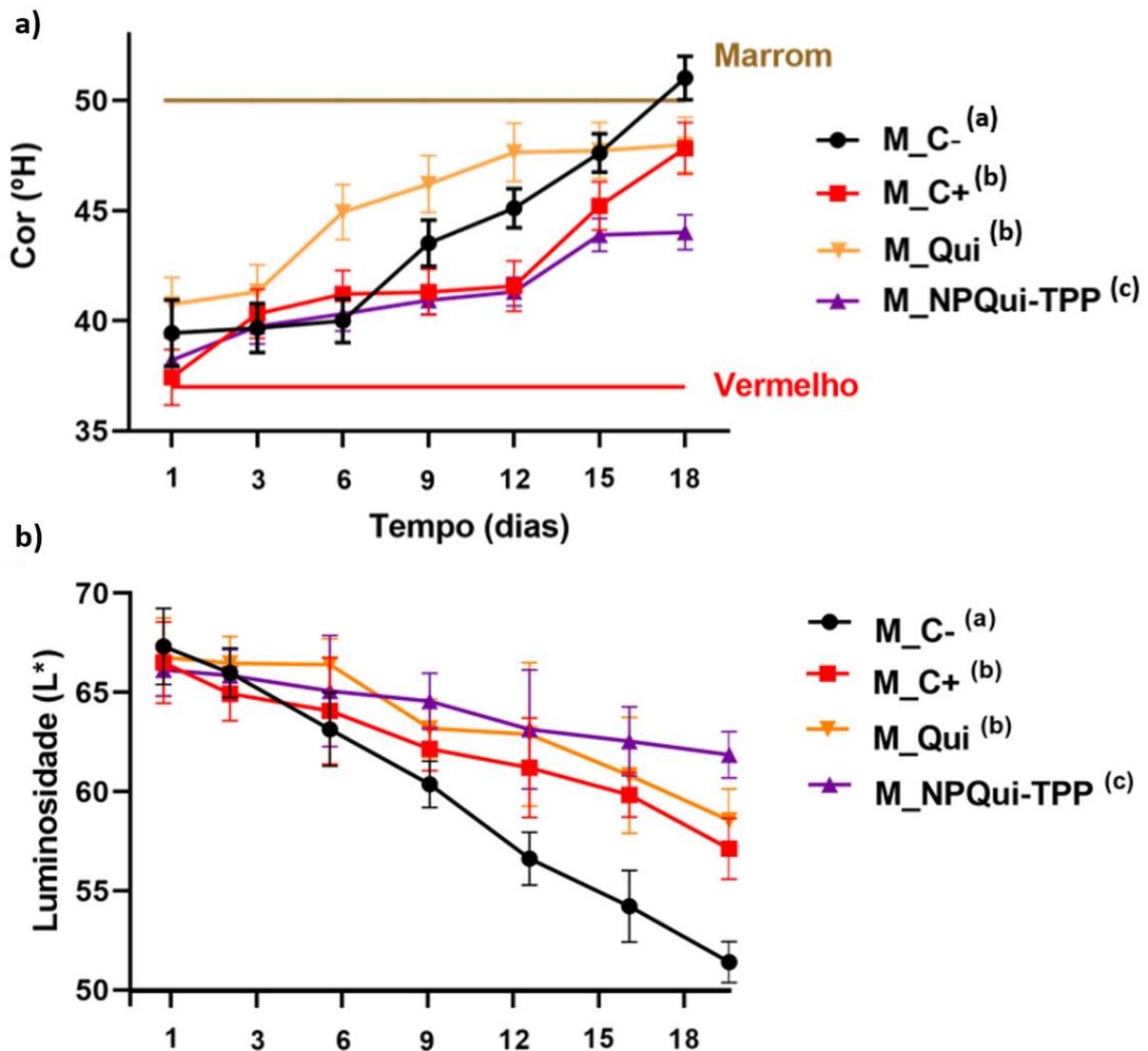


Figura 3.12 Análise colorimétrica de maçãs. (a) Variação do ângulo Hue ($^{\circ}$ H); (b) Variação na Luminosidade (L^*); Frutas sem revestimento (controle negativo): M_C-; Frutas aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum* e NPQuit-TPP (controle positivo): M_C+; Frutas revestidas com gel de quitosana não nanoparticulada: M_QUI; Frutas revestidas com nanopartículas de Quitosana-TPP: M_NpQui-TPP. Letras diferentes entre parênteses ao lado da legenda indicam que há diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

As medidas do ângulo Hue indicam evolução entre duas matizes, de predominantemente vermelho inicialmente para marrom ao longo dos 18 dias, indicando a ocorrência de escurecimento superficial da fruta. Os valores iniciais foram próximos a 39°, sem diferenças estatísticas significativas entre as amostras. Todos os grupos apresentaram tendência ao escurecimento, embora em diferentes intensidades. Após os 18 dias de análises, os valores apresentados foram de 51,03° para M_C-; 47,83° para M_C+; 48,01° para M_QUI e o menor, de 44,03°, para as amostras revestidas com as nanopartículas (M_NPQUI-TPP). Ou seja, o maior escurecimento no período foi registrado para o controle negativo (M_C-) e o menor para a cobertura nanoestruturada (M_NPQUI-TPP), em proporção numérica 13,72% menor em relação a M_C-. Os demais grupos, controle positivo (M_C+) e o revestido com quitosana não nanoparticulada (M_QUI), ficaram em valores intermediários e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Tais resultados são corroborados pelo decaimento nos valores observados no parâmetro de luminosidade (L^*). Embora os 4 tratamentos avaliados tenham partido de valores iniciais próximos e sem diferenças estatísticas, ao longo do período analisado o padrão de escurecimento ficou evidenciado.

A menor porcentagem de decaimento de L^* , que é um indicativo de um processo de escurecimento menos intenso, foi a da amostra M_NPQUI-TPP (6,48%). Os grupos M_C+ e M_QUI não apresentaram diferenças significativas entre si (14,11 e 12,32%, respectivamente) e nas maçãs o controle negativo M_C- foi o que apresentou a maior tendência de escurecimento (23,65%) no período.

As alterações colorimétricas em maçãs podem ser atribuídas à degradação natural dos pigmentos responsáveis pela cor avermelhada, principalmente as antocianinas cianidina-3-galactosídeo (IGLESIAS, ECHEVERRIA & SORIA, 2008), e à produção de subprodutos de cores de tonalidades marrom relacionados às alterações na parede celular decorrentes da senescência (ESPLEY et al., 2019). Com o tempo, a coloração avermelhada se torna menos intensa com predominância de tons mais escuros (IGLESIAS, ECHEVERRIA & SORIA, 2008; ESPLEY et al., 2019), em concordância com os resultados obtidos.

Em relação as alterações de cores nas goiabas, a Figura 3.13 apresenta os aspectos visuais das amostras analisadas. Nota-se que as frutas do controle (G_C- e G_C+), as quais foram descartadas após o sexto dia, apresentavam consideráveis sinais de senescência e podridão, com profundas alterações colorimétricas e visual

presença de fungos. Já as frutas revestidas (G_QUI e G_NpQUI-TPP), que foram analisadas durante 14 dias, embora apresentassem significativas alterações colorimétricas, estas foram consideravelmente menos intensas do que os outros grupos.



Figura 3.13 Aspecto visual das goiabas revestidas e não-revestidas ao longo do tempo. Frutas sem revestimento, controle negativo: G_C-; Frutas aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum*, controle positivo: G_C+; Frutas revestidas com gel de quitosana não nanoparticulada: G_Qui e frutas revestidas com nanopartículas de Quitosana-TPP G_NpQui-TPP.

Na Figura 3.14 temos os valores quantitativos das alterações colorimétricas, através da comparação da evolução temporal dos valores de L^* e $^{\circ}H$. O padrão de alteração de cor das goiabas caracteriza-se pela hidrólise das moléculas de clorofila, variando rapidamente do verde à tonalidade de amarelos no amadurecimento. Nas amostras analisadas, o $^{\circ}H$ variou de valores de 120° (verde predominante) até próximos a 90° (amarelo absoluto), ou seja, significativas alterações de tons no período analisado.

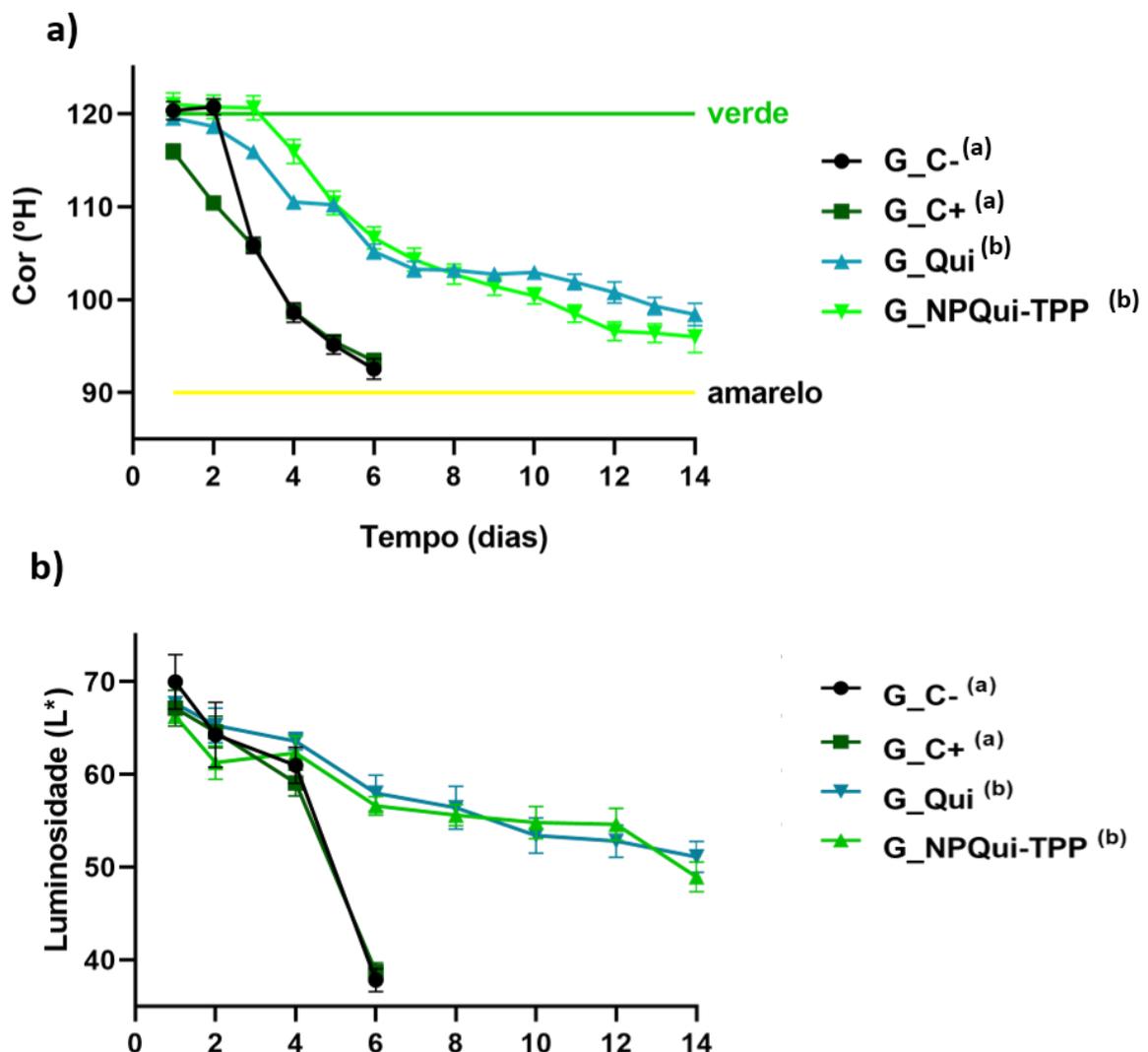


Figura 3.14 Análise colorimétrica de goiabas. (a) Variação do ângulo Hue ($^{\circ}H$); (b) Variação na Luminosidade (L^*); Frutas sem revestimento (controle negativo): G_C-; Frutas aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum* e NPQuit-TPP (controle positivo): G_C+; Frutas revestidas com gel de quitosana não nanoparticulada: G_Qui; Frutas revestidas com nanopartículas de Quitosana-TPP: G_NpQui-TPP. Letras diferentes entre parênteses ao lado da legenda indicam que há diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Nas frutas dos grupos controle G_C- e G_C+ foram observados, como nos demais ensaios, variações expressivas das características colorimétricas, com valores de ΔL^* proporcionalmente 23,09 e 19,42% respectivamente menores em 6 dias que as medidas iniciais. Alterações próximas a estas foram medidas nas amostras revestidas (G_NPQui-TPP e G_QUI) somente no 14^o dia de análise, quando os valores numéricos foram de 98,42° e 96,01°, respectivamente.

O decaimento dos valores de L^* observados estão de acordo com as variações de ΔL^* encontradas, uma vez que as goiabas dos grupos controles apresentaram decaimentos e, portanto, processos de escurecimento significativamente mais intensos em relação aos seus valores iniciais (45,95 e 42,31%, respectivamente).

Ao contrário do que foi observado nas maçãs, as medidas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas amostras revestidas com o gel de quitosana (G_QUI) e as nanopartículas (G_NPQui-TPP), indicando o efeito positivo da quitosana, nas duas formas avaliadas, com respeito à manutenção da coloração.

As alterações de cores e o escurecimento geral observado em frutas ao longo da maturação são, na realidade, resultado de vários mecanismos que ocorrem simultaneamente envolvendo, além da desidratação, a descompartimentação das células, a proliferação de microrganismos, e uma intensa ação dos grupos de enzimas polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases (PDO), que catalisam a oxidação dos compostos fenólicos, convertendo-os em o-quinonas na presença de oxigênio molecular (ESPLEY et al., 2019; NICOLAS et al., 1994). As quinonas resultantes são compostos de estrutura aromática as quais, aglomeradas, geram pigmentos escuros (melaninas). Embora este tipo de reação seja amplamente descrita como a principal causadora do escurecimento das polpas, ela também ocorre na casca e contribui para a geração de tons com tendência marrom observados nas frutas em estágios próximos à podridão (ESPLEY et al., 2019; NICOLAS et al., 1994).

3.4.4 Concentração de Sólidos Solúveis (Δ Brix)

A concentração de sólidos solúveis, representada pela medida do Δ Brix, é uma estimativa indireta da quantidade de açúcares presentes na amostra. Quanto maior a concentração de açúcares, maior é o desvio da luz detectado pelo refratômetro e, portanto, maior o valor do Δ Brix (ROHANI, ZAIPUN & NORHAYATI,

1997; SANTOS et al., 2013). Como ocorre o aumento dos teores de açúcares à medida que uma fruta amadurece, os valores medidos do °Brix fornecem informações do estágio de amadurecimento.

Os conteúdos iniciais e finais de sólidos solúveis das maçãs e goiabas, após 18 e 14 dias respectivamente, estão dispostos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Concentração de Sólidos Solúveis (°Brix) de maçãs e goiabas. Valores iniciais e finais de maçãs e goiabas analisadas: M_C- e G_C-: Frutas sem revestimento; M_C+ e G_C+: Frutas aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum*; M_NpQui-TPP e G_NpQui-TPP: frutas revestidas com Nanopartículas de Quitosana-TPP; M_QUI e G_QUI: frutas revestidas com gel de quitosana.

Amostras	Maçãs		Goiabas	
	°Brix inicial	°Brix Final	°Brix inicial	°Brix Final
C-	13,1 ± 0,1 (a)	15,9 ± 0,7 (a)	11,1 ± 1,0 (a)	14,5 ± 0,4 (a)
C+	13,6 ± 0,5 (a)	14,9 ± 0,2 (a)	11,6 ± 0,14 (a)	14,2 ± 0,2 (a)
Quitosana	14,1 ± 0,2 (a)	15,0 ± 0,2 (a,b)	10,7 ± 0,31 (a)	12,1 ± 0,2 (b)
NPQui-TPP	13,3 ± 0,3 (a)	13,7 ± 0,1 (a)	10,0 ± 0,11 (a)	11,1 ± 0,2 (c)

Letras diferentes na mesma coluna que há diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Como pode ser observado, houve aumento nos teores de açúcares em todos os lotes analisados. As amostras controle M_C- e M_C+ apresentam os maiores aumentos com °Brix de 21,4 e 9,5% respectivamente para as maçãs, e de 30,4% a 22,5% para as goiabas e, portanto, similares aos apresentados por Lopes-Filho (1993) e Santos et al., (2013). Esses valores foram inferiores para as amostras recobertas: de 6,1 (G_QUI) e 4,5% (G_NPQuit-TPP) para as maçãs, e de 13,4 (G_QUI) e 11% (G_NPQuit-TPP) para as goiabas, em relação aos seus respectivos controles.

As frutas revestidas apresentaram, comparativamente, porcentagens de aumento de sólidos solúveis menores em relação aos controles, expressando uma menor intensidade dos processos de senescência. Resultados estes coerentes com as medidas de perda de massa (Item 3.4.1), no qual a ordem decrescente das taxas de perdas, entre os grupos analisados, foi a mesma. Esta correlação era esperada pois a medida que a fruta perde água, o teor de açúcar tende a aumentar (SANTOS et al., 2013). O aumento na concentração de sólidos solúveis, em todas as amostras, é natural por ser decorrente da síntese e utilização de carboidratos

solúveis e ácidos orgânicos do tecido vegetal em vias metabólicas durante o processo de amadurecimento (ROHANI, ZAIPUN & NORHAYATI, 1997).

Para as maçãs, o aumento da concentração de sólidos solúveis foi 3,5 e 4,8 vezes menores nas frutas revestidas com quitosana não nanoparticulada (M_QUI) e nanoparticulada (M_NPQUI-TPP), respectivamente, em relação ao controle negativo (M_C-), confirmando a ação dos revestimentos de quitosana na diminuição das taxas respiratórias e da atividade metabólica.

Assim como nas demais análises, as coberturas de nanoparticuladas NPQUI-TPP (M_NPQUI-TPP e G_NPQUI-TPP) apresentaram também um maior efeito sobre a redução dos teores de sólidos solúveis comparados com a quitosana não nanoparticulada (M_QUI e G_QUI).

3.4.5 Análise Microbiológica de frutas revestidas com Nanopartículas de Quitosana-TPP

A intensidade do crescimento microbiano nas frutas foi analisada como resultado das contagens expressas em Unidades Formadoras de Colônia (log CFU⁻¹), conforme apresentadas nas Figuras 3.15-a para maçãs e 3.15-b para as goiabas.

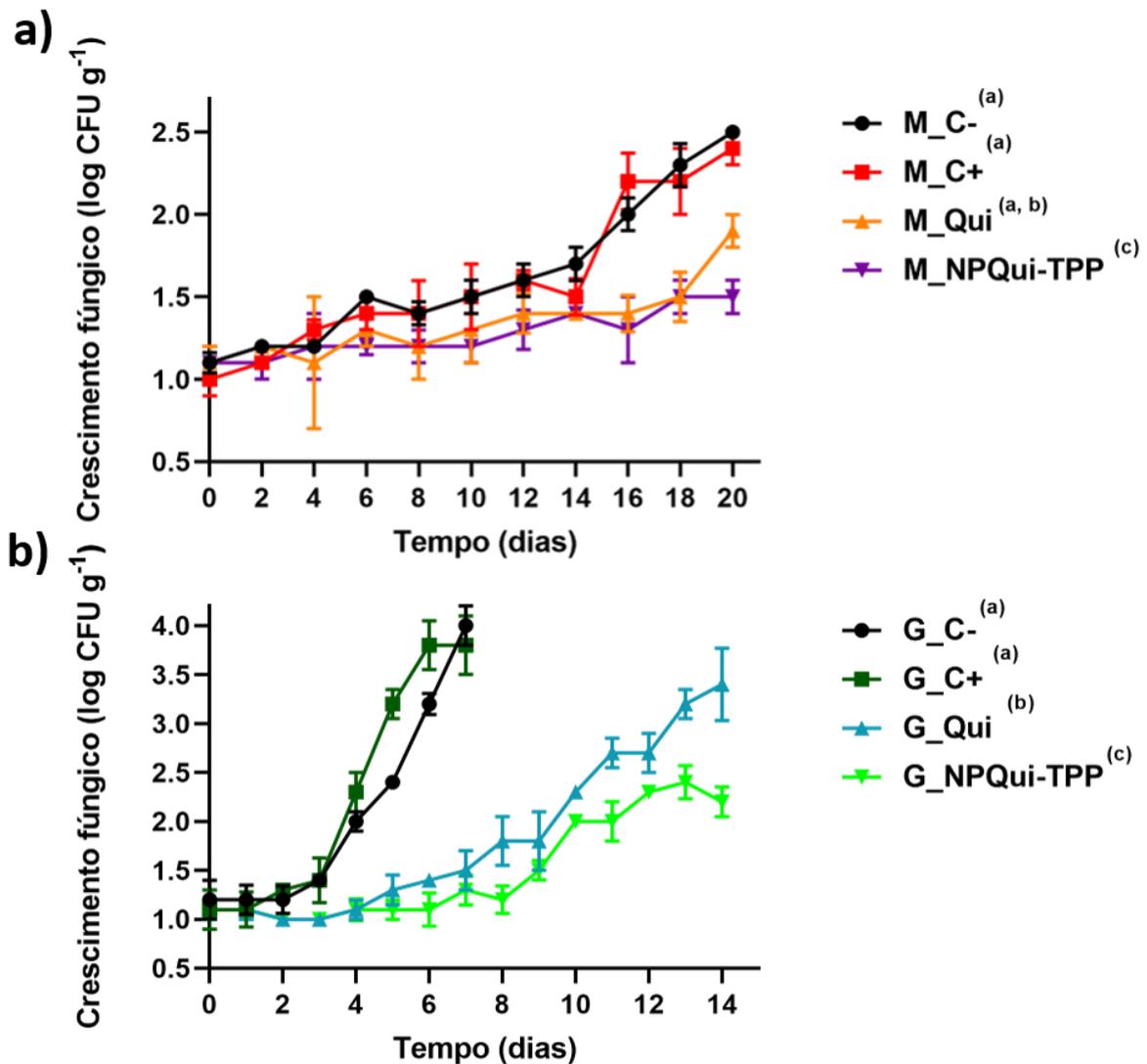


Figura 3.15 Contagem Microbiana (log CFU/g⁻¹) durante período de armazenamento. A) M_C-: Maçãs sem revestimento (controle negativo); M_C+: Maçãs aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum* e NPQuit-TPP (controle positivo) ; M_Qui: Maçãs revestidas com gel de quitosana não nanoparticulada; M_NpQui-TPP: Frutas revestidas com Nanopartículas de Quitosana-TPP. B) G_C-: Goiabas sem revestimento (controle negativo); G_C+: Goiabas aspergidas com suspensão de esporos de *A. alternata* e *P. expansum* e NPQuit-TPP (controle positivo) ; G_Qui: Goiabas revestidas com gel de quitosana não nanoparticulada; G_NpQui-TPP: Goiabas revestidas com Nanopartículas de Quitosana-TPP. Letras diferentes entre parênteses ao lado da legenda indicam que há diferença estatisticamente significativa (Tukey, p <0,05).

Nos resultados pode-se notar que desde o primeiro dia de análise, foi observado crescimento microbiano em todos os grupos analisados. Não só nas amostras inoculadas como também nas demais. O crescimento fúngico era esperado, considerando que o intuito das presentes medidas não foi mantê-las em

condições estéreis, mas analisá-las em condições não controladas, comumente encontradas em mercados e *hortifrutis*. Embora nas análises *in vitro* (Item 3.3.1) tenham sido observadas a ausência de colônias de *P.expansum* e *A.alternata*, a partir das concentrações de nanopartículas de 8 e 9g/L, respectivamente, tal padrão não era esperado que se reproduzisse nas análises microbiológicas conduzidas diretamente nas frutas. A presença de água, abundância de nutrientes, o baixo pH e outras características físico-químicas, favorecem as condições para que microrganismos fúngicos se estabeleçam e cresçam, mesmo após etapas de higienização (TRIPATHI & DUBEY, 2004), como a realizada anteriormente ao processo de revestimento.

Na contagem do crescimento microbiano nas maçãs (Figura 3.15-a), as diferenças mais significativas foram registradas a partir do 14º dia de análise. Ao final do experimento, as maçãs dos grupos controle (M_C- e M_C+) não apresentaram diferenças significativas entre si, mas os valores médios de crescimento fúngico (CFU) foram 20 e 23% superiores em relação às maçãs revestidas com quitosana e NPQui-TPP, respectivamente.

Ambas coberturas apresentam uma ação inibidora similar e estável, confirmando a atividade antifúngica da quitosana, com diferenças apenas no final do experimento, no qual as maçãs do grupo M_NPQui-TPP apresentaram valores de CFU aproximadamente 21% menor que as medidas nas maçãs revestidas com quitosana não nanoparticulada (M_Qui), indicando uma melhor manutenção do controle do crescimento fúngico das nanopartículas, conforme valores medidos ao final do período analisado.

Para as goiabas, as diferenças entre os grupos analisados foram mais evidentes. O crescimento fúngico ocorreu em maiores taxas, com acentuada proliferação nos grupos controle (G_C- e G_C+), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Uma melhor ação inibidora das coberturas nanoparticuladas ficou mais evidente entre as goiabas revestidas, para as quais os valores de CFU encontrados foram, respectivamente, 17,6 (G_Qui) e 28,2% (NPQui-TPP) menores do que os apresentados pela média dos últimos dias de medidas das amostras G_C+ e G_C-. Os valores médios de CFU observados nas amostras revestidas com as nanopartículas (G_NPQui-TPP) foram inferiores que revestidas com quitosana não nanoparticulada (G_Qui) em quase todo o período de análise.

Cabe contextualizar que a estimativa da perda de alimentos por contaminação fúngica gera prejuízos da ordem de 45 bilhões de dólares (ABD-ELSALAM et al., 2019), fazendo-se necessário o controle microbiano, o que é realizado pela aplicação de milhares de toneladas de defensivos agrícolas. Como já comentado, 90% do volume de fungicidas aplicados são sintéticos e não atingem seu alvo em sua totalidade, fazendo necessária a aplicação de um elevado volume para que haja uma resposta efetiva (ABD-ELSALAM et al., 2019).

Neste contexto, a vantagem dos materiais antifúngicos nanométricos consiste em sua grande área superficial podendo proporcionar uma maior reatividade e potencialização de seus efeitos inibidores mesmo quando empregados em menores quantidades (AZEREDO et al., 2018; ABD-ELSALAM et al., 2019).

Adicionalmente, as nanopartículas do sistema NPQui-TPP, desenvolvidas no presente trabalho, além de terem por base produtos naturais atóxicos, visam a conservação na condição pós-colheita, ou seja, são aplicadas diretamente nas frutas colhidas, o que contribui para uma redução do volume aplicado, em comparação com antifúngicos empregados no campo.

A eficiência das NPQui-TPP no controle do crescimento de *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*, medida em maçãs e goiabas permite classificar este material como “Nanofungicida”, uma vez que são considerados nanofungicidas as substâncias intencionalmente utilizadas na escala nanométrica, as quais apresentem novas propriedades ou propriedades intensificadas relacionadas à diminuição do crescimento fúngico (ABD-ELSALAM et al., 2019).

Nanopartículas de quitosana, obtidas por métodos similares, foram avaliadas por CHOOKHONGKHA, SOPONDILOK & PHOTCHANACHAI (2012), na educação do crescimento de *Colletotrichum capsici*, *C. gloesporioides* e por YIEN e colaboradores (2012), em *Rhizopus* sp. e *Aspergillus niger*, também com indícios de melhora da atividade inibidora, com ações igualmente atribuídas à maior área superficial apresentada pelas nanopartículas.

Capítulo 4 – Conclusões

- ✓ Com base nas diversas condições experimentais avaliadas, os parâmetros considerados ideais para a síntese de nanopartículas do sistema Quitosana-TPP (NPQui-TPP), pelo método de geleificação ionotrópica, foram 8 cm de altura de gotejamento do reticulante (TPP) em relação ao gel de quitosana na velocidade de agitação de 1500 rpm, seguido de ultrassonicação de 30 % de amplitude durante 2 minutos.
- ✓ A introdução de ultrassonicação após a síntese possibilitou uma sensível redução da instabilidade das nanopartículas em meio aquoso, reduzindo a tendência de agregação, conseqüentemente conservando as características originais de tamanhos, o que permite que a aplicação seja realizada na forma de aspersão e com reprodutibilidade aceitável.
- ✓ Nanopartículas de Quitosana-TPP, com diâmetros médios de 117,3 nm, sintetizadas à partir de quitosana comercial com alto grau de desacetilação (85%), foram capazes de inibir satisfatoriamente o crescimento dos fungos *A. alternata* e *P. expansum*, nas concentrações de 8 e 9 g/L respectivamente, nos ensaios realizados *in vitro*.
- ✓ Para os testes *in vivo*, com aplicações via *spray*, a formulação com concentração de 9 g/L foi suficiente na inibição do crescimento fúngico em ambas frutas analisadas.
- ✓ Tanto as coberturas formadas pela nebulização das NPQui-TPP quanto aquelas obtidas com a quitosana não nanoparticulada, apresentaram efeito protetivo e capacidade de atenuar as alterações dos parâmetros fisiológicos relacionados à senescência de maçãs e goiabas, quando comparados aos grupos controle.
- ✓ As coberturas de NPQui-TPP mostraram-se mais eficientes comparativamente às de quitosana não nanoparticulada, com ações superiores com respeito à redução das taxas de perda de massa fúngico em ambas as frutas e efeitos mais significativos sobre a perda de firmeza em goiabas e nas alterações de cor medidas nas maçãs.
- ✓ As NPQui-TPP representam um sistema relativamente simples de processo e de aplicação, principalmente por aspersão, com vantagens consideráveis com respeito ao volume aplicado e às respostas protetoras, conforme dados

apresentados nos ensaios realizados em goiabas e maçãs, na condição pós-colheita.

Referências

- ABD-ELSALAM, K. A. et al. Nanobiofungicidas: Present concept and future perspectives in fungal control. In: **Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives**. Elsevier, 2019. p. 315–351.
- ABRAFRUTAS - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados. **Fruticultura: Setor em Expansão**. In: <https://abrafrutas.org/2018/08/14/fruticultura-setor-em-expansao/> - Acesso em 16/03/2020 .
- ABREU, J. R. DE et al. Sugar fractionation and pectin content during the ripening of guava cv. Pedro Sato. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 156–162, 2012.
- AGRAWAL, S.; RATHORE, P. Nanotechnology pros and cons to agriculture: a review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 3, n. 3, p. 43–55, 2014.
- AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 483, 2016.
- AL-NAAMANI, L.; DOBRETSOV, S.; DUTTA, J. Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 231–237, 2016.
- AL-HETAR, M. Y. et al. Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 4, p. 2434–2439, 2011.
- ALGHUTHAYMI, M. A.; BAHKALI, A. H. Toxigenic profiles and trinucleotide repeat diversity of *Fusarium* species isolated from banana fruits. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 324–330, 2015.
- ALI, A. et al. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food chemistry**, v. 124, n. 2, p. 620–626, 2011.
- AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, v. 47, n. 2, p. 89–144, 1998.
- ANTONIOU, J. et al. Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 465, p. 137–146, 2015.
- AOUADA, M. R. DE M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- ASSIS, O. B. G.; DA SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223–228, 2003.
- ASSIS, O. B.G.; BRITTO, D. Evaluation of the antifungal properties of chitosan coating on cut apples using a non-invasive image analysis technique. **Polymer International**, v. 60, n. 6, p. 932–936, 2011.
- ASSIS, O. B. G.; DE BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87, 2014.

- ASSIS, O. B. G.; DE BRITTO, D. Evaluation of the antifungal properties of chitosan coating on cut apples using a non-invasive image analysis technique. **Polymer International**, v. 60, n. 6, p. 932–936, 2011.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51–62, 2016.
- ATIA, M. M. M. et al. Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans* and activation of defence mechanisms in tomato to late blight. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 23, n. 2, p. 175–197, 2005.
- AZEREDO, H. et al. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p.31-35, 2009.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 139–145, 2004.
- BAILEY, C. J.; DAY, C. Metformin: its botanical background. **Practical Diabetes International**, v. 21, n. 3, p. 115–117, 2004.
- BALDWIN, E. A.; HAGENMAIER, R.; BAI, J. **Edible coatings and films to improve food quality** CRC Press, 2011.
- BARROS, T. T. DE. **Produção e caracterização de filmes de polpa de mamão com adições de nanoestruturas, processados em modo batelada**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2016.
- BASHIR, H. A.; ABU-GOUKH, A.-B. A. Compositional changes during guava fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 557–563, 2003.
- BASSETTO, E.; JACOMINO, A. P.; PINHEIRO, A. L. Conservation of Pedro Sato'guavas under treatment with 1-methylcyclopropene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 433–440, 2005.
- BEN-YEHOSHUA, S.; RODOV, V. Transpiration and water stress. In: **Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables**. v. 2p. 111–159, 2003.
- BERETTA, C. et al. Quantifying food losses and the potential for reduction in Switzerland. **Waste Management**, v. 33, n. 3, p. 764–773, 2013.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C.; SUVANASARA, R. Application of chitosan in rice production. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 18, n. 2, 2017.
- BORGES, O. et al. Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4–5, p. 278–290, 2007.
- BUSH, R. K.; PROCHNAU, J. J. *Alternaria*-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 2, p. 227–234, 2004.
- BREDA, C. A. et al. Effect of chitosan coating enriched with pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) peel extract on quality and safety of tomatoes (*Lycopersicon esculentum Mill.*) during storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 6, p. e13268, 2017.
- BUSH, R. K.; PROCHNAU, J. J. *Alternaria*-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 2, p. 227–234, 2004.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17–MR71, 2007.
- BRITTO, D., SANTOS, M. F. & ASSIS, O. B. G. Evaluation of chitosans with different

- degrees of acetylation as fungicide coating on cut apples. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 1, p. 16-21, 2012.
- CALBO, A. G.; NERY, A. A. Medida de firmeza em hortaliças pela técnica de aplanção. **Horticultura Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 14-18, 1995.
- CALVO, P. et al. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, n. 1, p. 46-53, 1997.
- CARVALHO, E. C. Q. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 2, n. 1, 1995.
- CHACON, M. et al. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly (D, L lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 99-107, 1999.
- CHIEN, P.-J.; SHEU, F.; YANG, F.-H. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 1, p. 225-229, 2007.
- CHILLO, S. et al. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 2, p. 159-168, 2008.
- CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. **Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**, Vol. 1, 479p. UFLA: Lavras, 2005.
- CHOOKHONGKHA, N.; SOPONDILOK, T.; PHOTCHANACHAI, S. **Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and chilli seed quality**. I International Conference on Postharvest Pest and Disease Management in Exporting Horticultural Crops - PPDM2012 973. **Anais**, 2012
- COATES, L.; JOHNSON, G. Postharvest diseases of fruit and vegetables. **Plant Pathogens and Plant Diseases**, p. 533-548, 1997.
- COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 337-358, 2003.
- COSTA, F. et al. Texture dynamics during postharvest cold storage ripening in apple (*Malus domestica Borkh.*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 69, p. 54-63, 2012.
- COTA-ARRIOLA, O. et al. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. **Polymer International**, v. 60, n. 6, p. 937-944, 2011.
- CRUZ-ROMERO, M. C. et al. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 393-397, 2013.
- DA SILVA, R. A. et al. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. **Documentos n. 250, Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, RJ, 49p. 2008.
- DALMAS, F. et al. Viscoelastic behavior and electrical properties of flexible nanofiber filled polymer nanocomposites. Influence of processing conditions. **Composites Science and Technology**, v. 67, n. 5, p. 829-839, 2007.
- DE ALMEIDA, V. E. S.; CARNEIRO, F. F.; VILELA, N. J. Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar, riscos socio ambientais e políticas públicas para promoção da saúde. **Actas em Saúde Coletiva**, v. 4, n. 4, p. 84-99, 2009".
- DE SALAMANCA, A. E. et al. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 4, p. 1416-1425, 2006.
- DEVLIEGHIERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and

- vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703–714, 2004.
- DICH, J. et al. Pesticides and cancer. **Cancer Causes & Control**, v. 8, n. 3, p. 420–443, 1997.
- DOGHEIM, S. M. et al. Monitoring of pesticide residues in Egyptian fruits and vegetables during 1997. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n. 11, p. 1015–1027, 2002.
- DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; PINTO, L. A. A. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 126–130, 2015.
- DU, W. et al. Antibacterial activity against *E. coli* O157: H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, 2008.
- ECKERT, J. W.; RATNAYAKE, M. Host-pathogen interactions in postharvest diseases. In: **Post-harvest Physiology and Crop Preservation**, p. 247–264, 1983
- EL-ELERYAN, E. E. Effect of chitosan and green tea on the quality of Washington Navel orange during cold storage. **American Journal of Plant Physiology**, v-10, p. 43-54, 2015.
- ELNAGGAR, Y. S. R. et al. Intranasal piperine-loaded chitosan nanoparticles as brain-targeted therapy in Alzheimer's disease: optimization, biological efficacy, and potential toxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 10, p. 3544–3556, 2015.
- ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1819–1841, 2013.
- ESMAELZADEH-GHAREDAAGHI, E. et al. Effects of processing parameters on particle size of ultrasound prepared chitosan nanoparticles: An Artificial Neural Networks Study. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 17, n. 5, p. 638–647, 2012.
- ESPLEY, R. V. et al. Red to brown: an elevated anthocyanic response in apple drives ethylene to advance maturity and fruit flesh browning. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1248, 2019.
- ESTEVEZ, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v.27, n. 5, p.798-806, 2004.
- FÀBREGAS, A. et al. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 446, n. 1–2, p. 199–204, 2013.
- FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 6, p. 292–303, 2011.
- FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21–27, 2012.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food Loss and Waste Database, 2019**. in: <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/flw-data/en/>. Acesso em 16/03/2020
- FERREIRA, M. D. Tecnologias pós-colheita em frutas e hortaliças. **Instrumentação Pós-Colheita em Frutas e Hortaliças**, 1 ed.: Embrapa Instrumentação, S. Carlos Cap 5, p-100-111, 2011.
- FERREIRA, M. D.; SPRICIGO, P. C.; SARGENT, S. A. Colheita e beneficiamento.

- Instrumentação Pós-Colheita em Frutas e Hortaliças**, 2 ed.: Embrapa Instrumentação, S. Carlos,. Cap 2, p.65-85, 2017.
- FONSECA MOREIRA DA SILVA, J. et al. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, v. 74, n. 4, 2015.
- GAN, Q. et al. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2–3, p. 65–73, 2005.
- GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3758–3767, 1998.
- GIERSZEWSKA .M, & OSTROWSKA-CZUBENKO, J. Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications. **Carbohydrate Polymers**. 154, 501-511, 2016.
- GNACH, A. et al. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 6, p. 1561–1584, 2015.
- GOL, N. B.; CHAUDHARI, M. L.; RAO, T. V. R. Effect of edible coatings on quality and shelf life of carambola (*Averrhoa carambola* L.) fruit during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 78–91, 2015.
- GOY, R. C.; BRITTO, D. DE; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v. 19, n. 3, p. 241–247, 2009.
- GUSTAVSSON, J. et al. Global Food Losses and Food Waste, Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). **Swedish Institute for Food and Biotechnology**, Düsseldorf, Interpack, p.431-446, 2011.
- HAMILTON-KEMP, T. R. et al. Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 7, p. 1083–1091, 1992.
- HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Induced resistance to disease in plants. **Science & Business Media**, v. 4, 2013.
- HAN, C. et al. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 33, n. 1, p. 67–78, 2004.
- HAN, J. H. Edible films and coatings: a review. In: **Innovations in Food Packaging 2nd ed.**, p. 213–255, 2014.
- HJORTH, K. et al. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America–A Nordic project. **Food Control**, v. 22, n. 11, p. 1701–1706, 2011.
- HONG, K. et al. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 172–178, 2012.
- HU, Y.-L. et al. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 3351, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Produção de frutas no Brasil. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas> Acesso em: 22 fev.2019.
- IBRAHIM, S. M. et al. Effect of low molecular weight chitosan coating on physico-chemical properties and shelf life extension of pineapple (*Ananas sativus*). **Journal of Forest Products and Industries**, v. 3, n. 3, p. 161–166, 2014.
- IGLESIAS, I.; ECHEVERRIA, G.; SORIA, Y. Differences in fruit colour development, anthocyanin content, fruit quality and consumer acceptability of eight ‘Gala’ apple strains. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 1, p. 32–40, 2008.

- INGLE, A. P.; DURAN, N.; RAI, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1001–1009, 2014.
- JAYAKUMAR, R. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 227–232, 2010.
- JI, C.; FAN, Y.; ZHAO, L. Review on biological degradation of mycotoxins. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 127–133, 2016.
- JONASSEN, H.; KJØNIKSEN, A.-L.; HIORTH, M. Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 10, p. 919–929, 2012.
- KABAK, B. Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment. **Food chemistry**, v. 211, p. 8–16, 2016.
- KARABULUT, O. A. et al. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 2, p. 103–111, 2002.
- KARABULUT, O. A.; BAYKAL, N. Evaluation of the use of microwave power for the control of postharvest diseases of peaches. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 2, p. 237–240, 2002.
- 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.
- KASZUBA, M. et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1927, p. 4439–4451, 2010.
- KATAS, H.; ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 2, p. 216–225, 2006.
- KAYA, M. et al. Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 355–360, 2016.
- KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.
- KERCH, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 159–166, 2015.
- KOMARNICKI, P. et al. Evaluation of bruise resistance of pears to impact load. **Postharvest Biology and Technology**, v. 114, p. 36–44, 2016.
- KOUKARAS, E. N. et al. Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 10, p. 2856–2862, 2012.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.
- LEE, J. Y. et al. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. **LWT-Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 323–329, 2003.
- LI, G. et al. Varietal differences among the phenolic contents and antioxidant activities of white and red fleshed guava during maturation and ripening stages. **International Journal of Biochemistry Research & Review**, p. 1–9, 2017a.

- LI, K. et al. Microwave-assisted degradation of chitosan for a possible use in inhibiting crop pathogenic fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 767–773, 2012.
- LI, T. et al. Application of Proteomics for the Investigation of the Effect of Initial pH on Pathogenic Mechanisms of *Fusarium proliferatum* on Banana Fruit. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2327, 2017b.
- LIU, J. et al. Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 2, p. 153–160, 2013.
- LOPES FILHO, J. C. **Aproveitamento da maçã industrial (*Pirus malus* L.) da região de Guarapuava-PR para produtos alimentícios utilizando tecnologia simplificada**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 1993.
- LOREVICE, M. V et al. Development of novel guava puree films containing chitosan nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2711–2717, 2012.
- MA, Z. et al. Comprehensive in vitro and in vivo risk assessments of chitosan microparticles using human epithelial cells and *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 341, p. 248–256, 2018.
- MARTELLI, M. R. et al. Effect of chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water vapor permeability of banana puree films. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, 2013.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. DOS S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.
- MENDES, L. D. et al. Avaliação in vitro da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *penicillium expansum*/. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 1, p. 116–128, 2016.
- NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.
- NICOLAS, J. J. et al. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 34, n. 2, p. 109–157, 1994.
- OLIVEIRA JUNIOR, E. N. et al. Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 800–809, 2012.
- OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 87–94, 2008.
- OTEIZA, J. M. et al. Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. **LWT-Food Science and Technology**, v. 80, p. 200–207, 2017.
- OUESLATI, S. et al. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2376–2381, 2012.
- PAPADIMITRIOU, S. et al. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 44–54, 2008.
- PARK, S. et al. Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 11, p. 2055–2081, 2012.
- PASQUARIELLO, M. S. et al. Influence of postharvest chitosan treatment on enzymatic browning and antioxidant enzyme activity in sweet cherry fruit.

Postharvest Biology and Technology, v. 109, p. 45–56, 2015.

PATEL, V. R.; AGRAWAL, Y. K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 81, 2011.

PETRICCIONE, M. et al. Influence of a chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of loquat fruit during postharvest life. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 287–296, 2015.

PETRICCIONE, M. et al. The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 2, p. 394–408, 2015b.

PILON, L. et al. Chitosan nanoparticle coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attributes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 440–448, 2015.

PONCE, A. G. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 294–300, 2008.

QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 16, p. 2693–2700, 2004.

QIN, Y. et al. Synthesis and characterization of dithiocarbamate chitosan derivatives with enhanced antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 388–393, 2012.

REETZ, E. R. et al. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2014**. Santa Cruz do Sul, 136p. 2015.

ROHANI, M. Y.; ZAIPUN, M. Z.; NORHAYATI, M. Effect of modified atmosphere on the storage life and quality of Eksotika papaya. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 25, p. 103–114, 1997.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 10, p. 438–447, 2009.

ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity**. American Phytopathological Society, 326p, 1994.

ROUPHAEL, Y.; KYRIACOU, M. C. Quality and safety of fresh fruits and vegetables at harvest. **Science Horticulturae**, v.239, p.78-79, , 2018.

RYCHLIK, M. Mycotoxins Except Fusarium Toxins in Foods. In: **Chemical Contaminants and Residues in Food** .2nd Ed., Elsevier. p. 279–294, 2017.

SABAGHI, M. et al. Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110, p. 224–228, 2015.

SALGADO, P. R. et al. Edible films and coatings containing bioactives. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 86–92, 2015.

SALO, P. M. et al. Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 4, p. 892–898, 2006.

SANTOS, M. L. et al. Estudo físico-químico de maçã desidratada em secador convectivo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 1, p. 30–37, 2013.

SASTRY, S.; BUFFINGTON, D.; BAIRD, C. D. Transpiration rates of certain fruits and vegetables. **ASHRAE Journal American Society of Heating, Refrigerating, & Air Conditioning**, 239p., 1977.

SAWTARIE, N.; CAI, Y.; LAPITSKY, Y. Preparation of chitosan/tripolyphosphate

- nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 110–117, 2017.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**. v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCRAMIN, J. A. et al. Characterisation of zein–oleic acid films and applications in fruit coating. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 2145–2152, 2011.
- SELMANOĞLU, G. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 12, p. 2019–2024, 2006.
- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y.-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 37–51, 1999.
- SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 5, 2014.
- SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v. 50, n. 3, p. 205–221, 2009.
- SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Characteristics and properties of purified chitosan in the neutral, acetate and hydrochloride forms. **Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 58–64, 2001.
- SINGH, A. et al. Plant-nanoparticle interaction: an approach to improve agricultural practices and plant productivity. **International Journal of Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 8, p. 25–40, 2015
- SMILANICK, J. L. et al. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 226–238, 2008.
- SONG, J. et al. Hexanal vapor is a natural, metabolizable fungicide: Inhibition of fungal activity and enhancement of aroma biosynthesis in apple slices. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, n. 5, p. 937–942, 1996.
- SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 84–95, 2007.
- STOPA, R. et al. Determining the resistance to mechanical damage of apples under impact loads. **Postharvest Biology and Technology**, v. 146, p. 79–89, 2018.
- TAMER, M. M. S. et al. Antifungal activity of aminated chitosan against three different fungi species. **Key Engineering Materials, Volume 1: Current State-of-the-Art on Novel Materials**, v. 1, p. 415, 2014.
- TANG, E. S. K.; HUANG, M.; LIM, L. Y. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, n. 1–2, p. 103–114, 2003.
- TEIXEIRA, E. DE M. et al. Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida. **Polímeros**, v.20, n.4, p. 264-268, 2010.
- THOMPSON, D. S. et al. **Interactions between environment, fruit water relations and fruit growth**. VI International Symposium on Processing Tomato & Workshop on Irrigation & Fertigation of Processing Tomato 487. **Anais**.1998
- TOROVIĆ, L. et al. Patulin in fruit juices: occurrence, bioaccessibility, and risk assessment for Serbian population. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1–11, 2018.
- TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 71–77,

2005.

TREICHEL, M. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2016**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 88p., 2016.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 3, p. 235–245, 2004.

TSAI, M. L.; BAI, S. W.; CHEN, R. H. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 448–457, 2008.

VAN DEN BROEK, L. A. M. et al. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237–242, 2015.

VENTURINI, M. E.; ORIA, R.; BLANCO, D. Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Sweetheart. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 15–21, 2002.

VERO, S. et al. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 1, p. 91–98, 2002.

WANG, W. et al. Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 8, p. 3461–3465, 1996.

WATSON, P. J.; TUZINSKI, P. A. **Study of zeta potential for material particles in chemical additive solutions**. US Department of the Interior, Bureau of Mines, v. 9229, 1989.

WOUDENBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? **Studies in Mycology**, v. 82, p. 1–21, 2015.

XIAO, C. et al. Combined action of pure oxygen pretreatment and chitosan coating incorporated with rosemary extracts on the quality of fresh-cut pears. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1003–1009, 2010.

YAN, F. et al. Biocontrol of post-harvest *Alternaria alternata* decay of cherry tomatoes with rhamnolipids and possible mechanisms of action. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1469–1474, 2015.

YIEN, L. et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, 2012.

YILDIZ, F.; WILEY, R. C. Preservation methods for minimally processed refrigerated fruits and vegetables. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. Food Engineering Series. Springer, Boston, MA, 548p., 2017.

YOUNES, I. et al. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57–63, 2014.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011.

ZAWADZKI, J. & KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394–400, 2010

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1–18, 2007.