

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

OTÁVIO DA MATA CUNHA

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES  
BIOPOLIMÉRICOS DE DIETILAMINOETIL QUITOSANA DE  
ALTA MASSA MOLECULAR

São José do Rio Preto  
2019

OTÁVIO DA MATA CUNHA

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES  
BIOPOLIMÉRICOS DE DIETILAMINOETIL QUITOSANA DE  
ALTA MASSA MOLECULAR

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP- Proc 17/13762-7

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera  
Aparecida de Oliveira Tiera

São José do Rio Preto  
2019

C972s Cunha, Otávio da Mata  
Síntese e atividade antimicrobiana de filmes biopoliméricos de dietilaminoetil quitosana de alta massa molecular / Otávio da Mata Cunha. - - São José do Rio Preto, 2019  
83 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto  
Orientadora: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

1. Quitosana. 2. Derivados. 3. Dietilaminoetil. 4. Filmes biopoliméricos I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor (a).

OTÁVIO DA MATA CUNHA

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES  
BIOPOLIMÉRICOS DE DIETILAMINOETIL QUITOSANA DE  
ALTA MASSA MOLECULAR

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP- Proc17/13762-7

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida de Oliveira Tiera  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Pires  
UNESP – Câmpus de Presidente Prudente

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Cristina Schmitt Cavalheiro  
USP – Câmpus de São Carlos

São José do Rio Preto  
8 de Março de 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado minha família, amigos e todos que estiveram do meu lado durante esta jornada.

Agradeço ao Departamento de Química e Ciências Ambientais e a todos que fazem parte deste, seu corpo docente, funcionários técnico-administrativo e técnicos de laboratórios, os quais que ofereceram todo o suporte e assistência para a minha formação durante esses 2 anos. E também a todos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, sua direção e administração.

Ao Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia, na forma da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vera Aparecida de Oliveira Tiera e do Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Márcio José Tiera. Agradeço pelos 2 anos de aprendizado, pelo auxílio e suporte na pesquisa. E também a todos os colegas de laboratório.

A Embrapa Instrumentação, na forma do Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Odílio Benedito Garrido de Assis e a todos funcionários e técnicos, pela parceria e suporte técnico e científico na pesquisa.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 17/13762-7 e 16/15736-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP), Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) pelas análises realizadas e ao Departamento da Engenharia de Alimentos do IBILCE/UNESP pelas análises realizadas.

Agradeço em especial a minha família, que sempre me deu suporte em seguir minha jornada, pelo incentivo, amor e carinho de sempre.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigado.

*APRENDIZADO*

*AINDA FALTA DESCOBRIR A SERENIDADE*

*AINDA FALTA DOMINAR A ANSIEDADE*

*E APRENDER A ESPERAR*

*AINDA ME FALTA PACIFICAR*

*DEIXANDO O CORAÇÃO FICAR MUDO*

*AINDA FALTA APRENDER QUASE TUDO*

**ANNA DUARTE**

## RESUMO

Os derivados de quitosana (CH) substituídos com grupos dietilaminoetil (CH-DEAE) e DODECIL (CH-DEAE-DD), mostram excelente atividade de inibição contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e a atividade antimicrobiana está relacionada com o grau de modificação estrutural, concentração e massa molecular dos polímeros. Partindo deste pressuposto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de filmes processados a partir desses derivados com potencial aplicação como revestimento comestível na conservação pós-colheita de frutas e hortaliças. A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* que impactam a produção e conservação de alimentos. Para a obtenção dos filmes, primeiramente modificou-se a estrutura da quitosana de alta massa molecular (Mw), 282 KDa, pela reação de substituição por grupos DEAE seguida da reação com dodecildeído e posterior redução com borohidreto de sódio. A quitosana e seus derivados foram caracterizados por RMN <sup>1</sup>H, obtendo-se graus de substituição (GS) de 40% de grupos DEAE e 3% de DD. Os filmes biopoliméricos foram obtidos por “casting” e caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As análises de Termogravimetria (TG) indicaram que a adição de plastificantes, glicerol e sorbitol, resulta na formação de uma blenda polimérica e os resultados das propriedades mecânicas corroboraram com essa análise, uma vez que as modificações químicas realizadas na estrutura quitosana propiciaram uma melhor maleabilidade nos filmes biopoliméricos. As imagens dos filmes obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM) mostraram uma superfície lisa, sem porosidade e rachaduras. A difração de Raios X (DRX) mostrou que os derivados de quitosana sintetizados possuem uma estrutura mais amorfa que a quitosana comercial. A citotoxicidade dos polímeros foi avaliada utilizando células 3T3 e mostraram viabilidade celular acima de 90% para todos os polímeros, indicando que esse material pode ser



usado como revestimento de frutas e sementes. Os resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* mostrou que os filmes biopoliméricos de derivados anfifílicos de quitosana são mais eficazes que filmes de CH contra os fungos *Alternaria* e *Penicillium*. Para o recobrimento de frutas, os resultados mostraram que o filme CH-DEAE-DD apresentou uma melhor eficiência na conservação de alimentos.

Palavras-chave: quitosana, derivados, dietilaminoetil, filmes biopoliméricos.

## **ABSTRACT**

*Chitosan (CH) derivatives substituted with diethylaminoethyl (CH-DEAE) and DODECIL (CH-DEAE-DD) groups show excellent inhibition activity against fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and antimicrobial activity is related to the degree of modification structural, concentration and molecular mass of the polymers. Based on this assumption, the present study had the objective to obtain films processed from these derivatives with potential application as edible coating in the post-harvest conservation of fruits and vegetables. The antimicrobial activity of the films was evaluated against the fungi *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* that impact the production and conservation of foods. To obtain the films, the structure of the high molecular weight chitosan (Mw), 282 KDa, was first modified by the substitution reaction by DEAE groups followed by the reaction with dodecyl aldehyde and subsequent reduction with sodium borohydride. Chitosan and its derivatives were characterized by <sup>1</sup>H NMR, obtaining degrees of substitution (DS) of 40% of DEAE groups and 3% of DD. The biopolymer films were obtained by casting and characterized by Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR). The thermogravimetric (TG) analyzes indicated that the addition of plasticizers, glycerol and sorbitol, results in the formation of a polymer blender and the results of the mechanical properties corroborated with this analysis, since the chemical modifications carried out in the chitosan structure provided better malleability in biopolymer films. The images obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) showed a smooth surface with no porosity and cracking. X-ray diffraction (XRD) showed that the synthesized chitosan derivatives have a more amorphous structure than the commercial chitosan one. The cytotoxicity of the polymers was assessed using 3T3 cells and showed cell viability above 90% for all polymers, indicating that this material can be used as a coating of fruits and seeds. The results of the in vitro*

*antimicrobial activity showed that the biopolymer films of amphiphilic chitosan derivatives are more effective than CH films against the fungi Alternaria and Penicillium. For the coating of fruits, the results showed that the CH-DEAE-DD film showed a better efficiency in food preservation.*

*Keywords: chitosan, derivatives, diethylaminoethyl, biopolymer films.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da quitina e quitosana.....	17
<b>Figura 2.</b> (a) Estrutura química dos polímeros. (b) Efeitos das diferentes hidrofobicidades dos polímeros: Índice de inibição dos derivados DEAE-CH-Dody (1,0 g / L) no crescimento micelial do <i>A. flavus</i> .....	19
<b>Figura 3.</b> Imagens obtidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão das hifas do fungo <i>A. flavus</i> crescidas na ausência do polímero (A, B), na presença de quitosana modificada com DEAE (C, D) e na presença de quitosana modificada com DEAE e 20% de grupos dodecil (F).....	20
<b>Figura 4.</b> Estrutura e crescimento dos fungos.....	21
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do fluconazol.....	22
<b>Figura 6.</b> Estruturas químicas das micotoxinas produzidas pelos fungos do gênero <i>Alternaria</i> , sendo: a) AOH (alternariol); b) AME (monomeril alternariol); c) ALT (altenuene).....	23
<b>Figura 7.</b> Estrutura química da patulina.....	24
<b>Figura 8.</b> Filme biopolimérico de quitosana comercial obtido por casting.....	26
<b>Figura 9.</b> Representação do método da gota séssil para determinação do ângulo de contato.....	32
<b>Figura 10.</b> Ilustração de experimento de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> em placa de 96 poços.....	34
<b>Figura 11.</b> Esquema de síntese dos derivados anfifílicos de quitosana.....	35
<b>Figura 12.</b> Mecanismo da reação da quitosana com dietilaminoetil.....	36
<b>Figura 13.</b> Mecanismo da reação da quitosana com dodecil aldeído.....	36
<b>Figura 14.</b> Gráfico da titulação potenciométrica da quitosana comercial.....	37
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H dos polímeros estudados, sendo: a) CH; b) CH-DEAE; c) CH-DEAE-DD.....	39
<b>Figura 16.</b> Estrutura química da pululana.....	41
<b>Figura 17.</b> Cromatograma da análise de GPC para: a) CH; b) CH-DEAE.....	42
<b>Figura 18.</b> Curvas TG/DTG dos filmes de quitosana preparados com diferentes proporções de glicerol: a) CH; b) CH + 5% Glicerol; c) CH + 10% Glicerol; d) CH + 20% Glicerol.....	44
<b>Figura 19.</b> Curvas TG/DTG para os filmes de: a) CH-DEAE; b) CH-DEAE-DD.....	45
<b>Figura 20.</b> Estrutura do derivado anfifílico de quitosana (a) e espectro de infravermelho para os filmes biopoliméricos (b).....	49
<b>Figura 21.</b> Reação ocorrida no método de MTT em que o sal de tetrazólio é quebrado para a formação de formazan.....	52
<b>Figura 22.</b> Citotoxicidade da quitosana e derivados com o aumento da concentração de células 3T3 usando o método MTT. Dados representam média ± desvio padrão (n = 7).....	53
<b>Figura 23.</b> Resultados de grau de hidrofiliicidade para os filmes sintetizados.....	54
<b>Figura 24.</b> Difractogramas de Raios X para os filmes biopoliméricos.....	56
<b>Figura 25.</b> Imagens de MEV para as amostras: a) CH superficial; b) CH fratura; c) CH-DEAE superficial; d) CH-DEAE fratura; e) CH-DEAE-DD superficial; f) CH-DEAE-DD fratura.....	57
<b>Figura 26.</b> Imagens de AFM para: a) CH; b) CH-DEAE; c) CH-DEAE-DD.....	59

<b>Figura 27.</b> Imagens mostram filmes biopoliméricos enrugados ao entrar em contato com o meio de cultura sólido, sendo: a) CH; b) CH-DEAE; c) CH-DEAE-DD.....	60
<b>Figura 28.</b> Atividade antimicrobiana in vitro, sendo a) filmes biopoliméricos contra <i>Penicillium expansum</i> ; b) soluções de polímeros contra <i>Penicillium expansum</i> ; c) filmes biopoliméricos contra <i>Alternaria alternata</i> ; d) soluções de polímeros contra <i>Alternaria alternata</i> ; e) filmes biopoliméricos contra <i>Alternaria solani</i> ; f) soluções de polímeros contra <i>Alternaria solani</i> .....	61
<b>Figura 29.</b> Atividade antimicrobiana in vivo em morangos armazenados em 28 °C em estufa incubadora BOD ao longo de 5 dias de experimento. ....	66
<b>Figura 30.</b> Atividade antimicrobiana in vivo em bananas armazenados em 28 °C em estufa incubadora BOD ao longo de 5 dias de experimento. ....	67
<b>Figura 31.</b> Atividade antimicrobiana in vivo em maçãs fatiadas armazenadas em 28 °C em estufa incubadora BOD ao longo de 5 dias de experimento. ....	69
<b>Figura 32.</b> Atividade antimicrobiana in vivo em tomates armazenados em 28 °C em estufa incubadora BOD ao longo de 5 dias de experimento. ....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores do índice de polidispersividade para as amostras estudadas....	42
<b>Tabela 2.</b> Detalhamento dos eventos térmicos associados da análise térmica dos filmes.....	47
<b>Tabela 3.</b> Propriedades mecânicas dos filmes biopoliméricos. Dados representam média $\pm$ desvio padrão (n=7).....	50
<b>Tabela 4.</b> Valores de WVP para os filmes biopoliméricos sintetizados. Dados representam média $\pm$ desvio padrão (n=3). ....	51

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	15
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	16
2.1. Antimicrobianos a base de quitosana e seus derivados.....	16
2.2. Fungos .....	21
2.3. Fungos do gênero <i>Alternaria</i> .....	23
2.4. Fungos do gênero <i>Penicillium</i> .....	24
2.5. Coberturas comestíveis .....	25
<b>3. Objetivos</b> .....	27
3. 1. Objetivos específicos .....	27
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	27
4.1. Síntese da quitosana substituída com cloreto de 2-cloro-N,N-dietilaminoetil (DEAE) .....	27
4.2. Síntese da quitosana substituída com grupos dodecil (DD).....	28
4.3. Determinação do grau de desacetilação (GD) por Titulação Potenciométrica.....	28
4.4. Determinação do grau de desacetilação (GD) por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H).....	29
4.5. Determinação da massa molecular por cromatografia de permeação em gel (GPC) .....	29
4.6. Preparação dos filmes .....	29
4.6.1. Filmes biopoliméricos com a adição de plastificantes.....	29
4.6.2. Filmes biopoliméricos sem a adição de plastificantes .....	30
4.7. Caracterização dos filmes biopoliméricos de quitosana .....	30
4.7.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	30
4.7.2. Medida Termogravimétrica (TG).....	30
4.7.3. Propriedades Mecânicas.....	31
4.7.4. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP) .....	31
4.7.5. Ângulo de contato .....	31
4.7.6. Difração de Raios X ( DRX).....	32
4.7.7. Ensaio de citotoxicidade dos polímeros .....	32
4.7.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
4.7.9. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	33
4.8. Estudo da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	34
4.9. Recobrimento de frutas .....	35
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	35
5.1. Síntese dos derivados de quitosana .....	35
5.2. Determinação do grau de desacetilação (GD) por Titulação Potenciométrica.....	37
5.3. Caracterização das amostras por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H).....	38

5.4. Determinação da massa molecular por cromatografia de permeação em gel (GPC) .....	41
5.5. Preparação dos filmes .....	43
5.6. Caracterização dos filmes biopoliméricos de quitosana .....	43
5.6.1. Termogravimetria (TG).....	43
5.6.1.1. Termogravimetria dos filmes biopoliméricos com adição de plastificantes.....	44
5.6.1.2. Termogravimetria dos filmes biopoliméricos sem adição de plastificantes.....	45
5.6.2. Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos filmes biopoliméricos.....	48
5.6.3. Propriedades Mecânicas.....	49
5.6.4. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP) .....	51
5.6.5. Ensaio de citotoxicidade dos polímeros .....	51
5.6.6. Ângulo de contato .....	53
5.6.7. Difração de Raios X (DRX).....	54
5.6.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
5.6.9. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	58
5.7. Estudo da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	60
5.8. Recobrimento de frutas .....	64
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>72</b>



## 1. Introdução

No mercado mundial de pesticidas comerciais, o uso de fungicidas químicos corresponde a 17,5% (DE et al., 2014). Dessa forma é evidente a necessidade do desenvolvimento de tecnologias sustentáveis que não causem danos ao meio ambiente e à saúde humana. Os biofungicidas se destacam por possuírem potencial para combater pragas. Portanto, fungicidas baseados em produtos naturais (BONILLA & SOBRAL, 2016) e óleos essenciais (NOGUEIRA et al., 2010) são opções muito interessantes para a produção de biofungicidas. A busca por compostos não tóxicos para a fabricação de tais inibidores de crescimento de fungos tem recentemente impulsionado a pesquisa neste campo (ALKAN & YEMENICIOGLU, 2016). Neste cenário, a quitosana tem sido considerada como um promissor agente antimicrobiano, cuja atividade tem sido principalmente atribuída à interação eletrostática entre suas cadeias policatiônicas e à parede celular e membranas celulares dos microrganismos (SAHARIAH & MÁSSON, 2017, KONG et al., 2010).

O armazenamento de alimentos é uma das etapas fundamentais para evitar a contaminação e intoxicação alimentar, e requer vários procedimentos para manter a qualidade dos mesmos. Materiais que podem servir para o revestimento de alimentos estão sendo cada vez mais estudados. Assim, estes materiais devem apresentar características como controle de gases (vapor d'água, oxigênio e etileno, por exemplo), ter boa maleabilidade, ser estável termicamente e apresentar efeito antimicrobiano, além de não causar danos ao meio ambiente. Fungos, por exemplo, do gênero *Aspergillus*, *Alternaria* e *Penicilium*, entre outros, comumente atingem frutos durante o processo de armazenamento, causando podridão e, conseqüentemente, a diminuição do tempo de vida do fruto (CISSÉ et al., 2012; GHAOUTH et al., 1996; VÁSCONEZ et al., 2009; MAGHSOUDLOU et al., 2012; HU, WANG e WANG, 2016). Segundo BRITTO e ASSIS (2010), após a colheita, as frutas aumentam sua respiração, levando a uma maior produção de CO<sub>2</sub> e uma geração auto catalítica de etileno, favorecendo seu amadurecimento. Para desacelerar o processo de amadurecimento de frutas e

vegetais, é aconselhado armazenar estes alimentos em atmosfera com alta quantidade de CO<sub>2</sub> e baixa concentração de O<sub>2</sub>, diminuindo, assim, o processo metabólico dos alimentos (BAI, HUANG e JIANG, 1988). O armazenamento incorreto de alimentos provoca aceleração na podridão dos mesmos, devido às condições favoráveis para a proliferação dos microrganismos presentes no ambiente. A contaminação de alimentos pode se dar por fungos, bactérias e leveduras. Segundo MURANYI (2013), a deterioração de alimentos pode ocorrer por fatores químicos, físicos e também microbiológicos, como perda de água, mudanças na coloração provocadas por enzimas, oxidação e crescimento de microrganismos. O Brasil, um país tipicamente tropical, apresenta condições favoráveis à proliferação de fungos em alimentos devido a altas temperaturas e umidade registrada na maior parte do país. Outros fatores que favorecem o crescimento de fungos são danos mecânicos, além do fato de que a contaminação por fungos em alimentos não é conhecida e considerada por grande parte da população. A proliferação de fungos em alimentos não só altera o paladar e o aspecto visual, como também pode proporcionar a liberação de micotoxinas que podem afetar a saúde do consumidor. A proliferação de fungos pode ser influenciada pela atividade de água, pH e substrato, além da temperatura e umidade, já citados (PEREIRA, CARVALHO e PRADO, 2002; SILVA, 2012).

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Antimicrobianos a base de quitosana e seus derivados**

A quitina, encontrada naturalmente em exoesqueleto de caranguejos, camarões e lagostas é uma fonte natural e renovável de quitosana (ELSABEE e ABDOBU, 2013). A distinção entre quitina e quitosana baseia-se na proporção das unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose, que são unidas por ligação glicosídica  $\beta$  (1→4), conforme pode ser visto na Figura 1 (FRÁGUAS et al., 2015).

## 6. Conclusões

Pode-se concluir que a síntese dos derivados anfifílicos de quitosana foi realizada com sucesso e confirmada pelas técnicas de caracterização. Os filmes biopoliméricos foram obtidos por *casting* e exibiram boa maleabilidade proporcionada pelas modificações químicas na cadeia da quitosana. A análise de termogravimetria indicou que a estabilidade térmica do biomaterial não se altera com as modificações químicas realizadas. Os resultados de ângulo de contato indicam que o grupo hidrofílico DEAE exerce maior efeito no caráter hidrofílico do material do que o grupo hidrofóbico DD.

Sobre as propriedades mecânicas, pode-se dizer que o decréscimo do módulo de Young e da tensão máxima na ruptura, junto com o acréscimo da elongação máxima, indica uma melhor maleabilidade dos filmes biopoliméricos causada pelas próprias modificações químicas realizadas na cadeia da quitosana. O ensaio de citotoxicidade mostra que a viabilidade celular manteve-se acima de 90% em todos os casos estudados, indicando que os filmes biopoliméricos podem ser usados para revestimento de frutas, sementes e grãos. As imagens superficiais dos filmes, obtidas por MEV e AFM, mostram uma superfície lisa, sem porosidade e fraturas. Já as análises de DRX mostram que os derivados de quitosana sintetizados possuem uma estrutura amorfa em comparação com o material de partida, estando diretamente relacionado a solubilidade do polímero.

A atividade antimicrobiana *in vitro* mostrou a eficácia dos filmes biopoliméricos no combate ao crescimento dos fungos do gênero *Alternaria* e *Penicillium*, ficando acima dos 80% de taxa de inibição. Para as soluções de polímeros, pôde-se observar que o fungo do gênero *Penicillium* é mais resistente que o fungo do gênero *Alternaria*, mas mesmo assim as soluções do derivado anfifílico mostraram-se ser mais eficazes que as soluções de quitosana comercial e que o fluconazol. Sobre o revestimento em frutas, a aplicação dos filmes biopoliméricos mostraram-se alta eficiência no aumento do tempo de prateleira dos frutos, tendo o morango como destaque.

Por fim, conclui-se que modificações químicas em quitosana de alta massa molecular é uma boa alternativa para se obter filmes biopoliméricos com boa maleabilidade mantendo as características iniciais do polímero.

## 7. Referências Bibliográficas

ABUGOCH, L. E.; TAPIA, C.; VILLAMÁN, M. C.; PEDRAM-YAZDANI, M.; DÍAZ-DOSQUE, M. Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 879-886, 2011.4

ALKAN, D., YEMENICIOGLU A. Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens, **Food Hydrocolloids**, 55, 1-10, 2016.

ASSIS, O. B. D.; ALVES, H. C. Metodologia minima para a produção de filmes comestíveis de quitosana e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Comunicado Técnico**, p. 1-5, v. 49, 2002.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Review: edible protective coatings for fruits: fundamentals and applications. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n.2, p. 87-97, 2014.

ASTM D5725-99, Standard Test Method for Surface Wettability and Absorbency of Sheeted Materials Using an Automated Contact Angle Tester (Withdrawn 2010), ASTM International, West Conshohocken, PA, 2008, [www.astm.org](http://www.astm.org)

ASTM D882-97, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International, West Conshohocken, PA, 1997, [www.astm.org](http://www.astm.org)

ASTM E 96-92, Standard Test Method for Water Vapor Transmission, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2000, [www.astm.org](http://www.astm.org)

AZEREDO, H. M. C. Edible Coatings. **Advances in Fruit Processing Technologies**, cap. 12, p. 345-356, 2012.

BAI, R.; HUANG, M.; JIANG, Y. Selective permeabilities of chitosan-acetic acid complex membrane and chitosan-polymer complex membranes for Oxygen and Carbon dioxide. **Polymer Bulletin**, v. 20, p. 83-88, 1988.

BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Food Bioscience**, v.16, p. 17-25, 2016.

BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Hydrophilic and morphological aspects of films based on quaternary salts of chitosan for edible applications. **Packaging Technology and Science**, v. 23, p. 111-119, 2010.

CANER, C.; VERGANO, P. J.; WILES, J. L. Chitosan Film Mechanical and Permeation Properties as Affected by Acid, Plasticizer, and Storage. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 6, p. 1049-1053, 1998.

CAZON, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMIREZ, J. A.; et al. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, 68, 136-148, 2017.

CHAVES, J. A. P.; SILVA, H. A. S.; SANTANA, S. A. A.; VIEIRA, A. P.; BEZERRA, C. W. B. Estudos cinéticos da degradação térmica da quitosana e quitosana modificada. **Associação Norte Nordeste de Química**, 2008.

CISSÉ, M.; MONTET, D.; LOISEAU, G.; DUCAMP-COLLIN, M-N. Influence of the concentrations of chitosan and glycerol on edible films properties showed by response surface methodology. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 20, p. 830-837, 2012.

CLARK, D. P.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V. *Microbiologia de Brock*, 12<sup>a</sup> ed., Porto Alegre, Artmed, 2010.

CORY, A. H.; OWEN, T. C.; BARLTROP, J. A.; CORY, J. G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communications**, v. 3, p. 207-212, 1991.

COSTA, M. J.; CERQUEIRA, M. A.; RUIZ, H. A.; FOUIGNIES, C.; RICHEL, A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; AGUEDO, M. Use of wheat bran arabinoxylans in chitosan-based films: Effect on physicochemical properties. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 305-311, 2015.

DE, A., Borse, R., Kumar, A., Mozundar, S., Targeted delivery of pesticide using biodegradable polymeric nanoparticles. (1<sup>st</sup> ed.) New York: Springer, (Chapter 2), 634, 2014.

DEBANDI, M. V.; BERNAL, C.; FRANCOIS, N. J. Development of biodegradable films based on chitosan/glycerol blends suitable for biomedical applications. **Journal of Tissue Science & Engineering**, v. 7, p. 1 – 9, 2016.

DESBRIERES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 21-28, 1996.

DHALL, R. K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 435-450, 2013.

DIAS, A. M.; TABOGA, S. R.; VILLAMAYOR, P.; LIMA, A. M. F.; TIERA, M. J.; CABRERA, M.; GARRIDO, O. B.; TIERA, V. A. O. Antimicrobial activity of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl chitosan against *Aspergillus Flavus*: A

- combination of fungistatic and fungicidal mechanisms. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p.433-444, 2018.
- DOULABI, A. H.; MIRZADEH, H.; IMANI, M.; SAMADI, N. Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend film: Physical and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 48-56, 2013.
- ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 1819 – 1841, 2013.
- FENG, F.; LIU, Y.; ZHAO, B.; HU, K. Characterization of half N-acetylated chitosan powders and films. **Procedia Engineering**, v. 27, p. 718-732, 2012.
- FRÁGUAS, R. M.; SIMÃO, A. A.; FARIA, P. V.; QUEIROZ, E. R.; JUNIOR, E. N. O.; ABREU, C. M. P. Preparation and characterization chitosan edible films. **Polímeros**, v. 25, p. 48-53, 2015.
- GABRIEL, J. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Synthesis, characterization, and antifungal activities of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl chitosan against *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5725-2531, 2015.
- GHAFFARI, A.; NAVAEI, K.; OSKOUI, M.; BAYATI, K.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit® RS intended for sigmoidal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 175-786, 2007.
- GHAOUTH, A. E.; ARUL, J.; ASSELIN, A.; BENHAMOU, N. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. **Mycological Research**, v. 9, p. 769-779, 1996.
- GHAOUTH, A. E.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Postharvest Pathology and Mycotoxins**, v. 82, p. 398-408, 1992.
- GHAOUTH, A. E.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R.; BOULET, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 1618-1620, 1991.
- GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.29, p. 10-17, 1996.
- GUO, Z., XING, R., ZHONG, Z., JI, X., WANG, L., & LI, P. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**, 694-697. 2008.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 2005.

HERNANDEZ-LAUZARDO A.N., BAUTISTA-BANOS S., VELAZQUEZ-DEL VALLE M.G., MENDEZ-MONTEALVO M.G., SANCHEZ-RIVERA M.M., BELLO-PEREZ L.A., Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifera*. **Carbohydrate Polymers**, 73, 841-847, 2008.

HU, D.; WANG, H.; WANG, L. Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 398-405, 2016.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L-Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 344-353, 2004.

IGNATOVA, M., MANOLOVA, N., RASHKOV, I. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. **European Polymer Journal**, 43, 1112-1122, 2007.

JEON, C.; HÖLL, W. H. Chemical modification of chitosan and equilibrium study for mercury ion removal. **Water Research**, v. 37, p. 4770-4780, 2003.

JIANG, X. Z.; GE, Z. Z.; XU, J.; LIU, H.; LIU, S. Y. Fabrication of multiresponsive shell cross-linked micelles possessing pH-controllable core swellability and thermo-tunable corona permeability. *Biomacromolecules* 2007, 8, 3184–3192.

JUNIOR, E. N. O.; GUEDDARI, N. E. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; FRANCO, T. T. Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 800-809, 2012.

JUNIOR, I. D. S.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, p. 189-197, 2005.

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

KULIKOV, S. N., LISOVSKAYA, S. A., ZELENIKHIN, P. V., BEZRODNYKH, E. A., SHAKIROVA, D. R., BLAGODATSKIKH. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: molecular weight-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 74, 169-178, 2014.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; CABEZUDO, S.; DE LA CABA, K. Environmental assesment of chitosan-based films. **Journal of Cleaner Production**, v. 41, p. 312-316, 2013.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M. T.; DE LA CABA, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 889-899, 2013.

LI, H.; WANG, Y.; LIU, F.; YANG, Y.; WU, Z.; CAI, H.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; LI, P. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mecanisms involved. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 77-83, 2015.

LI, M.Q., CHEN, X.G., LIU, J.M., ZHANG, W.F., TANG, X.X. Molecular weight-dependent antifungal activity and action mode of chitosan against *Fulvia fulva* (Cooke) Ciffri. **J Appl Polym Sci**;119(6):3127–35, 2011.

LI, Z.; YANG, F.; YANG, R. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 378-387, 2015.

LIM, S. H., HUDSON, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, 339, 313-319, 2004.

LIU, M.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; YU, C.; CAO, S. Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. **Food Hydrocolloids**, v.33, p. 186-191, 2013.

MACÊDO, M. O. C.; MACÊDO, H. R. A.; SILVA, G. C.; SILVA, M. A. M.; JÚNIOR, C. A. Estudo comparativo da modificação superficial de membranas de quitosana tratadas por plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7.2, p. 95-103, 2012.

MAGHSOUDLOU, A.; MAGHSOUDLOU, Y.; KHOMEIRI, M.; GHORBANI, M. Evaluation of anti-fungal activity of chitosan and its effect of the moisture absorpotion and organoleptic characteristics of pistachio nuts. **International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**, v. 2, p. 65 – 69, 2012.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M.O.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M.M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, Structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 305-315, 2010.



- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63; 1983.
- MURANYI, P. Functional edible coatings for fresh food products. **Journal Food Processing & Technology**, v. 4, 2013.
- NOGUEIRA, J. H. C., GONÇALEZ, E., GALLETI, S. R., FACANALI, R., MARQUES, M. O., FELÍCIO, J. D. Ageratum conyzoides essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. International. **Journal of Food Microbiology**, 137, 55-60, (2010).
- OSTRY, V. Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, p.175-188, 2008.
- PÁDUA, R. A. F.; JUNIOR, M. M. Toxicological aspects and occurrence of patulin in apple juice. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 535-542; 2005.
- PEDRO, R. O.; TAKAKI, M.; GORAYEB, T. C. C.; BIANCHI, V. L.; THOMEIO, J. C.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, v. 168, p. 50-55, 2013.
- PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*, São Paulo, Pearson, 1997.
- PEREIRA, F. S.; LANFREDI, S.; GONZÁLEZ, E. R. P.; AGOSTINI, D. L. S.; GOMES, H. M.; MEDEIROS, R. S. Thermal and morphological study of chitosan metal complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 129, p. 291-301, 2017.
- PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, 141-156, 2002.
- REDDY, M. V. B.; BARKA, E. A.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. **Hort Science**, v. 32, p. 467-468, 1997.
- RIVERO, S.; DAMONTE, L.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. An insight into the Role of Glycerol in Chitosan Films. **Food Biophysics**, v. 11, p. 117-127, 2016.
- RODRÍGUES-NUÑÉS, J.; MADERA-SANTANA, T. J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J; VALDEZ, H. S. Chitosan/Hydrophilic Plasticizer-Based

Films: Preparation, Physicochemical and Antimicrobial Properties. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, p. 41-51, 2014.

SAHARIAH, P.; MÁSSOM, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure-activity relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, p. 3946-3868, 2017.

SCHLEMMER, D.; SALES, M. J. A. Preparação, caracterização e degradação de blendas PS/TPS usando glicerol e óleo de buriti como plastificantes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 6-13, 2010.

SCOTT, P. M. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. **Journal of AOAC International**, v. 84, p. 1809-1817, 2001.

SEBTI, ISSAM; CHOLLET, EMILIE; DEGRAEVE, PASCAL; ET AL. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, 55(3), 693-699, 2007.

SEYFARTH, F., SCHLIEMANN, S., ELSNER, P., HIPLER, U.-C. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. **International Journal of Pharmaceutics**, 353, 139-148, 2008.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y.-J. Food applications of chitin and chitosan. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 37-51, 1999.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Plasticizing and antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol on biodegradable cassava starch films. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SILVA, B. P. **Purificação e caracterização de quitosanas comerciais**. 32f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SILVA, S. E. R. **Decomposição dos alimentos: ação dos microrganismos**. 2012. 36 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, Ed 6ª, Rio de Janeiro: LTC, cap. 3, p. 67-73, 2000.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6ª edição, LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 1996.

SOUZA, R. H. F. V.; TAKAKI, M.; DE OLIVEIRA PEDRO, R.; GABRIEL, J.S., TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of

chitosan on the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Molecules** (Basel.Online), 18, 4437-4450, 2013.

SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N.; THARANATHAN, R. N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1113-1122, 2007.

STINSON, E. E.; BILLS, D. D.; OSMAN, S. F.; SICILIANO, J.; CEPONIS, M. J.; HEISLER, E. G. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 960-963, 1980.

SUN, L.; DU, Y.; FAN, L.; CHEN, X.; YANG, J. Preparation, characterization and antimicrobial activity of quarternized carboxymethyl chitosan and application as pulp-cap. **Polymer**, v. 47, p.1796-1804, 2006.

Syntor Fine Chemicals home page, <http://www.syntor.co.uk/> diethylaminoethyl-chloridehydrochloride (acessado em 16 de fevereiro, 2018).

TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZI, M.; VOTTERO, P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from Squid Chitin. **Polymer**, v. 41, p. 2463-2469, 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10<sup>a</sup> edição, Artmed, Porto Alegre, 2012.

VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237-242, 2015.

VÁSCONEZ, M. B.; FLORES, S. K.; CAMPOS, C. A.; ALVARADO, J.; GERSCHENSON, L. N. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v. 42, p. 762-769, 2009.

VO, DUC-THANG; LEE, CHENG-KANG ; Cells capture and antimicrobial effect of hydrophobically modified chitosan coating on *Escherichia coli*. **Carbohydrate Polymers**, 164, 109-117, 2017.

WANG, L.; WU, H.; QIN, G.; MENG, X. Chitosan disrupts *Penicillium expansum* and controls postharvest blue mold of jujube fruit. **Food control**, v. 41, p. 56-62, 2014.

YEN, M-T.; YANG, J-H.; MAU, J-L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 15-21, 2009.

YOO, S. -H., LEE, K. H., LEE, J. -S., CHA, J., ARK, C. S., LEE, H. G., Physicochemical Properties and Biological Activities of DEAE-Derivatized *Sphingomonas Gellan*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6235 - 6239, 2005.

YOUNES I., SELIMI S., RINAUDO M., JELLOULI K., NASRI M., Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, 185, 57-63, 2014.

ZHENG, L-Y, ZHU, J-F, Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, **Carbohydrate Polymers.**, 54, 527-530, 2003.