

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 20/09/2020



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

Anna Carolina Rodrigues Santos Alves

**Síntese, Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Filmes
Biopoliméricos de Derivados de Quitosana**

São José do Rio Preto

2019

Anna Carolina Rodrigues Santos Alves

**Síntese, Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Filmes
Biopoliméricos de Derivados de Quitosana**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Ap. de O. Tiera

São José do Rio Preto

2019

A474s

Alves, Anna Carolina Rodrigues Santos

Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de filmes biopoliméricos de derivados de quitosana / Anna Carolina Rodrigues Santos Alves. -- São José do Rio Preto, 2019

111 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - 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. Biomaterial. 3. Anfifílico. 4. Filmes. 5. Atividade antifúngica. I. Título.

Anna Carolina Rodrigues Santos Alves

**Síntese, Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Filmes
Biopoliméricos de Derivados de Quitosana.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Vera Ap. de Oliveira Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Mauro
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Iêda Aparecida Pastre Fertoni
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Carla Cristina Schmidt Cavalheiro
IQSC- USP – São Carlos

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Perpétua Casciotori
UFScar – São Carlos

São José do Rio Preto

20 de setembro de 2019

Dedico ao meu primo Marcelo, que inesperadamente foi morar ao lado de Deus durante a jornada desse trabalho, deixando uma saudade infinita em meu coração. Ele que sempre soube arrancar as minhas melhores gargalhadas, hoje tenho absoluta certeza, de que lá do céu ele sorri por essa conquista, a qual ele tanto me incentivou. Minha eterna saudade e amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, por ser minha fortaleza em todos os momentos da realização desse trabalho. Houve momentos tão difíceis em que tudo parecia estar errado, mas Ele cuidadosamente me amparava e mostrava o quão forte eu poderia ser e que eu jamais estaria sozinha diante de qualquer obstáculo.

À minha grande família, que não importa a distância, se faz presente em todos os momentos da minha vida. Em especial à minha mãe Cleide e meu pai Osmar, meus alicerces, as pessoas que mais amo e admiro. Obrigada por todos os sacrifícios que fizeram ao longo de toda vida para que eu e meus irmãos pudéssemos realizar nossos sonhos, obrigada por todo incentivo, pelo exemplo de conduta e honestidade que são base para mim, pelo apoio incondicional, pelo amor que me manteve firme na realização desse sonho mesmo diante de tantos obstáculos que juntos tivemos que enfrentar ao longo dessa jornada. Aos meus maiores presentes da vida, meus irmãos Vinicius e Vittor, que sempre me incentivaram, apoiaram e caminharam comigo. Sem vocês nada disso seria possível e nem faria sentido. Obrigada por serem meu porto seguro, eu amo vocês!

Ao meu marido e grande amor Fabio, pela paciência, cumplicidade e amor dedicados a mim que, principalmente nos momentos mais difíceis, me fortaleceram e impulsionaram à conclusão desse trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vera Tiera, por confiar a mim a realização deste trabalho, pela orientação, ensinamentos e pela parceria ao longo desses anos.

A todos que passaram pelo Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) durante esses nove anos, desde a minha iniciação científica até a conclusão do doutorado, em especial a Me. Amanda Manchini, Me. Mirelle Takaki, Me. Vítor Freire, Me. André Martinez, Dr. Maicon Petrônio, Hemelen Amoroso, Dr^a. Aline Lima, e Me. Grazieli Martins agradeço pela amizade, pela parceria, desabafos, e pelos desafios que enfrentamos juntos, muito obrigada!

Às minhas amigas desde a graduação, Dr^a. Mariana Bastos, Dr^a. Isabela Carreira, Bruna Borges e Carla Tukamoto, por estarem sempre comigo, me incentivarem, tornando essa jornada mais leve.

À Me. Laís Amado e Me. Mariana Garcia, pelo grande auxílio na realização dos experimentos de permeabilidade ao vapor de água e de propriedades óticas, obrigada por todos os ensinamentos compartilhados.

À Professora Dr^a. Maria Aparecida Mauro, por ter permitido com que eu utilizasse os equipamentos do seu laboratório, para realização dos experimentos de atividades óticas e permeabilidade ao vapor de água.

À Professora Dr^a. Célia Maria Landi Franco, por ter disponibilizado o Difractômetro de Raios X e à Flávia Villas Boas pela ajuda na operação do equipamento.

À Professora Dr^a. Ana Carolina Conti e Silva, por disponibilizar o texturômetro e à técnica Alana pelo auxílio durante as análises.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE-UNESP), por oferecer a infraestrutura necessária para execução deste projeto. E a todos os funcionários da UNESP, que direta ou indiretamente, foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Meu mais sincero obrigada.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Santa Teresa de Calcutá (O segredo, 2019)

*“Senhor, fazei de mim um instrumento da Vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor.
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.
Onde houver discórdia, que eu leve a união.
Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.
Onde houver erro, que eu leve a verdade.
Onde houver desespero, que eu leve a esperança.
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.
Onde houver trevas, que eu leve a luz.
Ó Mestre, fazei que eu procure mais:
consolar, que ser consolado;
compreender, que ser compreendido;
amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe.
É perdoando que se é perdoado.
E é morrendo que se vive para a vida eterna”.*

Oração de São Francisco de Assis (Canção Nova, 2019).

RESUMO

O biopolímero quitosana apresenta propriedades biológicas favoráveis, incluindo caráter antioxidante, antimicrobiana, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, ação anti-inflamatória e capacidade de formar filmes, o que a torna um material de grande interesse. Visando à melhoria das propriedades desse biomaterial, o presente trabalho teve como objetivo realizar a síntese e caracterização de derivados anfifílicos de quitosana com potencial para formação de filmes. Os derivados foram obtidos a partir de quitosana comercial (CH_C) previamente desacetilada (CH_D) e despolimerizada (CH_L), que foram submetidos à reação com o cloridrato de 2-cloro-*N,N*-dietetilamina. O derivado hidrofílico obtido (DEAE-CH_L) foi posteriormente modificado com o grupo dodecil aldeído por meio de reação de alquilação, resultando no derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH_L-Dod). A massa molecular média foi determinada utilizando cromatografia de permeação em gel (CPG), e os valores obtidos foram de 208 kDa para CH_C, 143 kDa para CH_D, 11 kDa para CH_L e 14 kDa para DEAE-CH_L. O grau de desacetilação e os graus de substituições pelos grupos DEAE e Dod foram determinados por meio da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H). O grau de desacetilação da CH_C foi de 77% e da CH_D foi de 97%. Os graus de substituição por DEAE e Dod foram de 44 e 24%, respectivamente. Filmes de diferentes formulações dos polímeros foram produzidos com concentrações crescentes de dois agentes plastificantes, glicerol e sorbitol (5%, 10% e 20%) e foram caracterizados por suas propriedades estruturais, solubilidade, propriedades óticas, mecânicas, térmicas, permeabilidade ao vapor de água e antifúngicas. Por meio dos resultados obtidos, verificou-se que a composição química dos polímeros, a massa molecular e a presença de plastificantes influenciaram significativamente nas suas características e afetaram muito as propriedades mecânicas, espessura, cor e propriedades de barreira. O estudo antifúngico contra *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Penicillium expansum* mostraram que os filmes contendo os grupos DEAE e Dod exibiram maior atividade antifúngica que as quitosanas não modificadas. As propriedades mecânicas de filmes altamente solúveis foram melhoradas pelos plastificantes nas porcentagens de 5 e 10%, indicando esses derivados como potenciais candidatos para o revestimento de grãos e frutos de várias culturas.

Palavras - chave: quitosana, biomaterial, anfifílico, filmes, atividade antifúngica.

ABSTRACT

Chitosan biopolymer has favorable biological characteristics, including antioxidant, antimicrobial characters, low toxicity, biodegradability, biocompatibility, anti-inflammatory action and film display ability, or makes it a material of great interest. Aiming at improving the properties of this biomaterial, the present work aimed to characterize and characterize amphiphilic chitosan compounds with potential for film formation. The derivatives were taken from deacetylated (CH_D) and depolymerized (CH_L) commercial chitosan (CH_C), which were reacted with 2-chloro-N,N-diethylethylamine hydrochloride. The hydrophilic derivative used (DEAE- CH_L) was further modified with the dodecyl aldehyde group by alkylation reaction, resulting in no amphiphilic chitosan derivative (DEAE- CH_L -Dod). An average molecular weight gel permeation chromatography (CPG) was used, and the values were 208 kDa for CH_C , 143 kDa for CH_D , 11 kDa for CH_L and 14 kDa for DEAE- CH_L . The degree of deacetylation and the degree of substitution of the DEAE and Dod groups were used by the hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) technique. The degree of deacetylation of CH_C was 77% and the CH_D was 97%. The degrees of substitution of DEAE and Dod were 44 and 24%, respectively. Films of different polymer formulations were used with crescents of two plasticizing agents, glycerol and sorbitol (5%, 10% and 20%) and were characterized by their specific characteristics (IV and XRD), solubility, optical, mechanical, thermal properties. water vapor and antifungal permeability. Through the obtained results, it was verified that the chemical composition of the polymers, the molecular mass and the presence of plasticizers influenced the characteristics and greatly affect the mechanical characteristics, thickness, color and substance use. The antifungal study against *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, and *Penicillium expansum* shows that the films published by the DEAE and Dod groups exhibited higher antifungal activity than as unmodified chitosans. As mechanical properties of highly soluble films have been improved by plasticizers at 5 and 10% percentages, these rates are applied as a requirement for the coating of grains and fruits of various crops.

Keywords: chitosan, biomaterial, amphiphilic, films, antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura idealizada da quitina e da celulose.....	21
Figura 2 - Representação da estrutura idealizada da quitina ($x > y$) e quitosana ($y \geq x$).....	22
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura química do glicerol.....	26
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura química do sorbitol.....	27
Figura 5 - Esquema ilustrativo da rota de sínteses para obtenção dos derivados de quitosana e suas respectivas caracterizações.....	30
Figura 6 - Quitosana em pó obtida após o processo de desacetilação.....	31
Figura 7 - Preparação dos filmes biopoliméricos.....	35
Figura 8 - Porta- amostra contendo filme de quitosana para análise de DRX.....	37
Figura 9 - À esquerda, filme fixado na cápsula de alumínio contendo CaCl_2 anidro e à direita as cápsulas dispostas nos dessecadores antes de serem armazenados na BOD a 25°C	38
Figura 10 - Corpo de prova após o rompimento durante a realização do ensaio de tração.....	39
Figura 11 - Solução de BDA utilizada para crescimento dos fungos.....	41
Figura 12 - Esquema da reação de desacetilação da quitosana comercial.....	44
Figura 13 - Espectro de RMN ^1H da quitosana comercial (CH_C) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a 70°C	45
Figura 14 - Espectro de RMN ^1H da quitosana desacetilada (CH_D) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a 70°C	45
Figura 15 - Esquema da reação de despolimerização da quitosana.....	46
Figura 16 - Esquema da reação de síntese do derivado hidrofílico de quitosana (DEAE-CH_L).....	47
Figura 17 - Esquema da reação de síntese do derivado anfifílico de quitosana ($\text{DEAE-CH}_\text{L}\text{-Dod}$).....	47
Figura 18 - Fórmula estrutural idealizada do derivado anfifílico de quitosana ($\text{DEAE-CH}_\text{L}\text{-Dod}$).....	48
Figura 19 - Espectro de RMN ^1H da quitosana modificada com o grupo hidrofílico DEAE (DEAE-CH_L) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a 70°C	49
Figura 20 - Espectro de RMN ^1H pra o derivado anfifílico de quitosana ($\text{DEAE-CH}_\text{L}\text{-Dod}$) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a 70°C	50

Figura 21 - Filme biopolimérico obtido a partir de quitosana.....	52
Figura 22 - Espectros na região do infravermelho para os filmes de quitosana e seus derivados sintetizados.....	53
Figura 23 - Difrátogramas dos filmes de CH _C , CH _D , CH _L , DEAE-CH _L , DEAE-CH _L -Dod.....	55
Figura 24 - Difrátogramas dos filmes de CH _C contendo glicerol (a) e sorbitol (b) na formulação.....	56
Figura 25 - Difrátogramas dos filmes de (a) DEAE-CH _L e (b) DEAE-CH _L -Dod contendo glicerol na formulação.....	57
Figura 26 - Percentual de solubilidade dos filmes de quitosana produzidos sem agentes plastificantes na formulação (a) e aspecto visual dos filmes ao término do ensaio de solubilidade em água (b).....	59
Figura 27 - Efeito da porcentagem de plastificante na solubilidade em água de filmes preparados com CH _L (a) e seus derivados DEAE-CH _L (b) e DEAE-CH _L -Dod (c).....	60
Figura 28 - Efeito da porcentagem de plastificante na solubilidade em água de filmes preparados com CH _C (a) e CH _D (b).....	62
Figura 29 - Filmes de CH _C (a), CH _D (b), CH _L (c), DEAE-CH _L (d) e DEAE-CH _L -Dod (e).....	63
Figura 30 - Escala de cores CIELAB e representação dos parâmetros a* e b* dos filmes de quitosana em plano cartesiano.....	64
Figura 31 - Opacidade em função das porcentagens de glicerol (a) e sorbitol (b) para os filmes preparados com quitosana e seus derivados.....	65
Figura 32 - Permeabilidade ao vapor de água e espessura dos filmes preparados com quitosana e seus derivados. (a) sem plastificante e com porcentagens crescentes de (b) glicerol e (c) sorbitol.....	69
Figura 33 - Tensão máxima dos filmes de quitosana preparados com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).....	72
Figura 34 - Módulo de elasticidade dos filmes de quitosana preparados com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).....	74
Figura 35 - Deformação na ruptura de filmes preparados com quitosana e seus derivados, aumentando as porcentagens de (a) glicerol e (b) sorbitol.....	76
Figura 36 - Curvas de TG-DTG para os filmes de quitosana comercial (CH _C), quitosana desacetilada (CH _D) e quitosana despolimerizada (CH _L).....	78

Figura 37 - Curvas de TG-DTG para os filmes de quitosana despolimerizada (CH _L) e derivados de quitosana DEAE-CH _L e DEAE-CH _L -Dod.....	79
Figura 38 - Efeito da concentração no índice de inibição do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	81
Figura 39 - Atividades antifúngicas comparativas de quitosana de baixas massas moleculares contra <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i> e <i>Penicillium expansum</i>	82
Figura 40 - Viabilidade celular de células fibroblastos 3T3/NIH na presença dos polímeros.....	84
Figura 41 - Aspecto visual após 15 dias de armazenamento à 25 °C. Tomate à esquerda foi revestido com filme PVC e à direita o tomate que foi revestido com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH _L -Dod).....	85
Figura 42 - Aspecto visual após 15 dias de armazenamento à 25 °C. À esquerda maçã que foi revestida com filme PVC e à direita a maçã que foi revestida com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH _L -Dod).....	85
Figura 43 - Aspecto visual após 5 dias de armazenamento à 25 °C. À esquerda banana que foi revestida com filme PVC e à direita a banana que foi revestida com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH _L -Dod).....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.....	29
Tabela 2 - Teor dos plastificantes, glicerol e sorbitol utilizados no preparo dos filmes.....	35
Tabela 3 - Relação entre a massa do polímero e a concentração das soluções de polímeros utilizadas nos ensaios microbiológicos.....	40
Tabela 4 - Propriedades da quitosana e seus derivados.....	51
Tabela 5 - Propriedades de cor dos filmes de quitosana e seus derivados.....	66
Tabela 6 - Permeabilidade média ao vapor de água dos filmes de quitosana preparados com porcentagens crescentes de glicerol e sorbitol, acondicionados em umidade relativa de 53%.....	70
Tabela 7 - Espessura média dos filmes de quitosana preparados com porcentagens crescentes de glicerol e sorbitol a uma umidade relativa de 53%.....	70
Tabela 8 - Valores de temperatura máxima de degradação, porcentagens de massa perdida e porcentagens de massa residual dos polímeros.....	80
Tabela 9 - Valores dos índices de inibição (%) obtidos para os diferentes derivados de quitosana testados contra o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BDA - batata dextrose agar

CH_C - quitosana comercial

CH_D - quitosana desacetilada

CH_L - quitosana degradada

CPG - cromatografia de permeação em gel

DEAE - cloridrato de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina

DEAE-CH_L - quitosana com dietiletilamina (derivado hidrofílico)

DEAE-CH_L-Dod - quitosana com dietiletilamina e dodecil (derivado anfílico)

Dod - dodecil aldeído

DRX - difração de raio-X

DTG - análise térmica diferencial

Embrapa - empresa brasileira de pesquisa agropecuária

GD - grau de desacetilação

GS_{Dod} - grau de substituição por grupos dodecila

GS_{DEAE} - grau de substituição por grupos DEAE

IV - espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

M_n - massa molecular numérica média

M_w - massa molecular ponderal média

Pdi - polidispersividade

PVA - permeabilidade ao vapor de água

RMN ¹H - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TG - análise termogravimétrica

UR - umidade relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 QUITINA E QUITOSANA.....	21
1.2 A QUITOSANA NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS.....	23
1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA.....	24
1.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS.....	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 REAGENTES.....	29
3.2 SÍNTESES DOS DERIVADOS DE QUITOSANA.....	29
3.2.1 Reação de desacetilação da quitosana comercial.....	31
3.2.2 Reação de despolimerização da quitosana desacetilada.....	31
3.2.3 Síntese do derivado hidrofílico de quitosana.....	32
3.2.4 Síntese do derivado anfifílico de quitosana.....	32
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	33
3.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....	33
3.3.2 Determinação da massa molecular média por cromatografia de permeação em gel (CPG).....	33
3.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular.....	34
3.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE QUITOSANA.....	35
3.4.1 Preparo das soluções filmogênicas.....	35
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	36
3.5.1 Armazenamento e Espessura dos filmes.....	36
3.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV).....	36
3.5.3 Análise por difração de raios-X (DRX).....	36
3.5.4 Solubilidade em água.....	37
3.5.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	37
3.5.6 Propriedades mecânicas.....	38
3.5.7 Ensaio de cor e Opacidade.....	39

3.5.8	Análise Termogravimétrica (TG).....	40
3.6	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	40
3.6.1	Atividade antimicrobiana das soluções de quitosana.....	40
3.6.2	Determinação do índice de inibição do crescimento fúngico.....	42
3.6.3	Atividade antimicrobiana de filmes de quitosana.....	42
3.7	APLICAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS COMO REVESTIMENTO DE ALIMENTOS.....	43
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA E DE SEUS DERIVADOS.....	43
4.1.1	Reação de desacetilação da quitosana comercial.....	43
4.1.2	Determinação do grau de desacetilação da quitosana por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....	44
4.1.3	Reação de despolimerização da quitosana desacetilada.....	46
4.1.4	Reação para obtenção do derivado hidrofílico de quitosana.....	47
4.1.5	Reação para obtenção do derivado anfifílico de quitosana.....	47
4.1.6	Determinação do grau de substituição por grupos DEAE e dodecila dos derivados de quitosana.....	48
4.1.7	Determinação da massa molecular média dos polímeros por CPG.....	51
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS.....	52
4.2.1	Espessura e aparência dos filmes.....	52
4.2.2	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.....	53
4.2.3	Difração de raios-X.....	54
4.2.4	Solubilidade em água.....	58
4.2.5	Ensaio de cor e Opacidade.....	63
4.2.6	Permeabilidade ao vapor de água.....	67
4.2.7	Propriedades mecânicas.....	71
4.2.8	Análise Termogravimétrica.....	76
4.3	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	80
4.3.1	Avaliação do efeito da concentração da quitosana e dos derivados na inibição do crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	80
4.3.2	Avaliação do efeito da concentração da quitosana e dos derivados na inibição do crescimento do fungo <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria alternata</i> e <i>Penicillium expansum</i>	82

4.4 ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR: CITOTOXICIDADE DOS POLÍMEROS.....	83
4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS EM FRUTOS.....	85
5 CONCLUSÃO.....	87
6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	88
7 REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE A - Rendimentos das sínteses.....	99
APÊNDICE B - Curva analítica e cromatogramas de CPG.....	100
APÊNDICE C - Espectros na região do infravermelho para os filmes.....	101
APÊNDICE D - Solubilidade em água dos filmes.....	106
APÊNDICE E - Ganho de massa em função do tempo.....	107

1 INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios estão sujeitos à contaminação por fungos e bactérias, causando reações indesejáveis que prejudicam as propriedades de sabor, odor, cor e textura, resultando em produtos de baixa qualidade sensorial e inadequados para consumo. Em alimentos embalados, por exemplo, a contaminação tem um impacto significativo na qualidade, que depende de uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos (LUCERA et al., 2012). Para aumentar a segurança e o prazo de validade de alimentos prontos para consumo, os aditivos sintéticos têm sido amplamente utilizados. No entanto, eles gradualmente estão perdendo participação de mercado devido às preocupações com as consequências para a saúde. Nesse sentido, a busca por produtos que sejam ecologicamente funcionais e economicamente viáveis tem impulsionado as pesquisas sobre compostos biodegradáveis com potencial antimicrobiano. Os aditivos naturais ou semissintéticos para conservação de alimentos foram desenvolvidos para impedir o crescimento de patógenos, garantindo um diferencial de qualidade e apoiando a expansão do mercado (SIRIPATRAWAN, VITCHAYAKITTI, 2016; FLORES-HERNÁNDEZ et al., 2014). Em particular, a quitosana tem sido considerada um potencial conservante para produtos alimentícios devido à sua atividade antimicrobiana e outras propriedades notáveis, como a biodegradabilidade e seu caráter não tóxico. A quitosana também tem a capacidade de formar filmes que podem ser usados para melhorar a qualidade dos alimentos e o prazo de validade dos mesmos (TAVARIA et AL., 2013; VERLEE, MINCKE, STEVENS, 2017). Por exemplo, ela tem sido utilizada como um filme comestível para a proteção de sementes (SILVA-CASTRO, 2018) e também em produtos alimentares frescos (SARTORI, MENEGALLI, 2016) e seu derivado carboximetil comercializado como Nutrasave® foi recentemente lançado como um revestimento inovador para frutas frescas (ERKMEN, BARAZI, 2018).

A atividade antimicrobiana da quitosana tem sido relatada contra diferentes microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras (XING et al., 2015). Embora a quitosana possua propriedades favoráveis a serem empregues no campo de proteção de alimentos, uma de suas limitações é a baixa solubilidade em pH neutro devido ao pKa de seus grupos amina (6,2 - 6,4). Além disso, os filmes preparados a partir de uma solução de quitosana geralmente não possuem propriedades apropriadas, portanto, durante o processo e dependendo da aplicação pretendida, podem ser necessários plastificantes ou agentes de reticulação para melhorar suas propriedades mecânicas e de

formação de filme (RODRÍGUEZ-NÚÑES et al., 2014; GAUDIN et al., 2000). Para superar essas limitações, a modificação química da quitosana é uma alternativa que pode fornecer as propriedades necessárias, bem como aumentar a ação antifúngica desse polissacarídeo. A inserção de grupos variados na cadeia polimérica da quitosana pode modificar suas propriedades físico-químicas, aumentando a solubilidade e a atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias patogênicos de plantas e animais (YANG et al., 2018). Estudo realizado por Xing e colaboradores (2016), no qual foi utilizada uma quitosana modificada com oleoyl, demonstrou um aumento dos índices de inibição em ensaios realizados contra os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Botryosphaeria dothidea*, *Nigrospora oryzae*, *Alternaria tenuissima*, *Gibberella seae* e *Fusarium culmorum*. Outras abordagens envolvendo a modificação utilizando pequenas moléculas (SOUZA et al., 2015), íons metálicos (IL'INAA et al., 2017), argilas (CASARIEGO et al., 2009), óleos (LI et al., 2019) e outros aditivos (BAJIC et al., 2019) às formulações também são frequentemente utilizadas para melhorar as propriedades mecânicas e a atividade antimicrobiana dos filmes.

Estudos anteriores realizados pelo laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) – IBILCE/UNESP mostraram que os derivados anfifílicos de quitosana apresentaram excelente atividade inibitória contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os derivados substituídos com conteúdos variados de grupos dodecila e grupos hidrofílicos como o propiltrimetilamônio (VIEGAS DE SOUZA et al., 2013), pentiltrimetilamônio (TAKAKI et al., 2013) e dietilaminoetil (GABRIEL, TIERA, DE OLIVEIRA TIERA, 2015) apresentaram altos índices de inibição contra esses fungos. Além disso, a atividade antifúngica desses polímeros anfifílicos demonstrou ser fortemente dependente da massa molecular, do conteúdo hidrofóbico e da concentração dos polímeros. Desta forma, para realização do presente trabalho, foi levantada a hipótese de que derivados anfifílicos de quitosana de baixa massa molecular, obtidos a partir de quitosana poderiam ser usados para formar filmes com atividade antimicrobiana melhorada contra alguns fungos comuns e para tanto, um derivado com baixa massa molecular (M_w) e contendo grupos DEAE e dodecila foi selecionado devido à sua alta atividade contra os fungos do gênero *Aspergillus* (GABRIEL, TIERA, DE OLIVEIRA TIERA, 2015; DIAS et al., 2018).

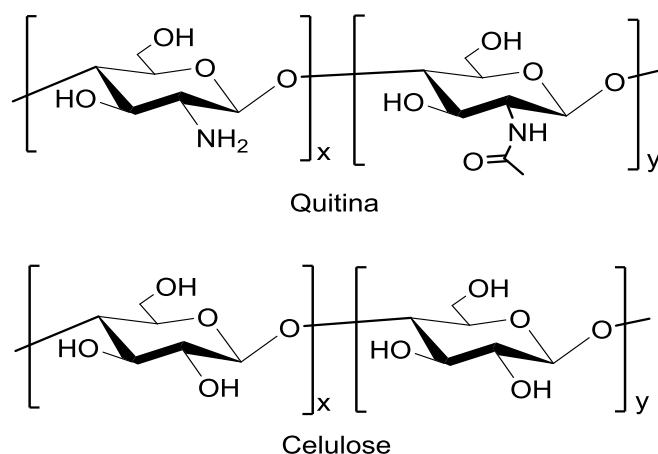
Nesse contexto, realizou-se um estudo comparativo utilizando quitosana de diferentes M_w para a preparação de filmes, com o objetivo de investigar as propriedades do filme e sua ação antifúngica contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*,

Alternaria alternata e *Penicillium expansum*. Os filmes para os ensaios *in vitro* foram preparados por *casting*, que consiste em uma técnica bastante simples na qual a formação do filme se consolida pela evaporação do solvente sobre uma superfície apolar plana (ACEVEDO-FANI et al., 2015; VAN DEN BROEK et al., 2015). Para que os filmes sejam aplicados em embalagem ou como coberturas para alimentos, é necessário o conhecimento de suas propriedades físico-químicas. Geralmente são adicionados agentes plastificantes aos filmes à base de polissacarídeos com o objetivo de diminuir a interação entre as cadeias poliméricas e assim reduzir a fragilidade, o que impede determinadas aplicações. Assim, o efeito de diferentes quantidades de agentes plastificantes, como o glicerol e o sorbitol, também foram avaliados com o objetivo de ajustar as propriedades dos filmes e também de suas possíveis aplicações.

1.1 QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um polissacarídeo de origem animal encontrado amplamente na natureza, sendo o segundo mais abundante, inferior apenas em relação à celulose e é caracterizado por uma estrutura fibrosa. Encontra-se presente na parede celular de vários fungos e é o principal componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes, insetos e crustáceos, fornecendo suporte e sustentação (CAMPANA-FILHO et al., 2007). A estrutura química da quitina é semelhante à celulose, tendo como diferença um grupo hidroxila em cada monômero, substituindo os grupos amina e acetamida da quitina (Figura 1).

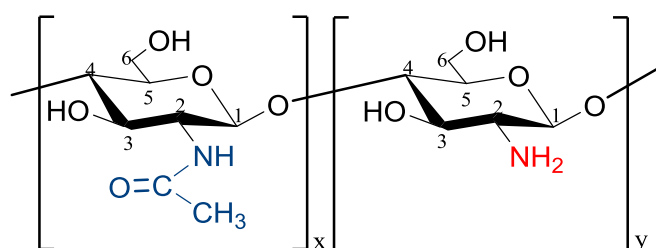
Figura 1 - Representação da estrutura idealizada da quitina e da celulose.



Fonte: Elaborado pela autora.

A quitina é o precursor direto da quitosana, sendo a reação de hidrólise básica da quitina, o procedimento mais utilizado para essa obtenção. Ambas são constituídas por monômeros de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, unidos por ligações glicosídicas de configuração β (1 \rightarrow 4), sendo que o diferencial entre esses polímeros está na proporção entre essas unidades (Figura 2), uma vez que na quitina as unidades acetamida estão em maior quantidade, enquanto que na quitosana os grupos amina predominam (pelo menos 50 - 60%), conseqüentemente uma distinção entre quitina e quitosana se dá com base no grau de desacetilação (RAAFAT e SAHL, 2009). A desacetilação total da quitina raramente é realizada, uma vez que, para esse fato ocorra, faz-se necessária a realização de sucessivas reações de hidrólise básica, podendo resultar numa despolimerização da cadeia (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 2 - Representação da estrutura idealizada da quitina ($x > y$) e quitosana ($y \geq x$).



Fonte: Elaborado pela autora.

A solubilidade é o principal fator que limita a utilização da quitina e é o que permite a distinção entre os dois polímeros, pois a quitina apresenta-se insolúvel em soluções aquosas e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, enquanto a quitosana embora também seja insolúvel em água, apresenta-se solúvel em soluções de acidez moderada (ácido clorídrico, ácido fórmico e ácido acético) e a dissolução se dá pela protonação dos grupos amina presentes na estrutura da quitosana em meio ácido ($-\text{NH}_3^+$) (VARNA et al., 2003). A quitosana é um polímero versátil, pois apresenta sítios reativos em sua estrutura (grupos amina ligados ao C2 e hidroxilas ligadas aos C3 e C6 dos monômeros) que possibilita a realização de modificações estruturais por meio de reações químicas para inserção de novas moléculas, resultando em um maior grau de solubilidade e ampliando sua variedade de aplicações (KUMAR et al., 2000). A quitosana é caracterizada principalmente com base em seu grau de desacetilação (GD) e pela sua massa molecular (M_w). Comercialmente, a quitosana encontra-se disponível

com aproximadamente 80% de unidades desacetiladas e massas moleculares variando entre 100 e 1000 kDa. Não existe um padrão específico para definir M_w , mas é aceito que M_w abaixo de 50 kDa são consideradas quitosanas de baixa massa molecular, enquanto que quitosanas de média massa molecular são as que se encontram com M_w no intervalo de 50 - 150 kDa e acima de 150 kDa considera-se como sendo quitosana de alta massa molecular (GOY, BRITTO, ASSIS, 2009).

A aplicação deste biopolímero abrange diversas áreas e diferentes usos tais como: tratamento de água (como agente floculante para clarificação, remoção de íons metálicos), na agricultura (adubo para as plantas e mecanismos defensivos), na indústria de cosméticos (esfoliante para a pele), na indústria de alimentos (embalagens, fungicida e bactericida), na indústria farmacêutica (controle de colesterol, agente cicatrizante), na área biomédica (liberação controlada de fármacos, reconstrução óssea) (AZEVEDO et al., 2007).

1.2 A QUITOSANA NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS

Para que um determinado material seja considerado um biomaterial, este deve apresentar como característica imprescindível, a biocompatibilidade, ou seja, deve exercer a função a qual foi destinado ocasionando o mínimo de reações inflamatórias ou tóxicas possíveis (WILLIAMS, 1999). Os polímeros biodegradáveis vêm se destacando em estudos visando diferentes aplicações tanto no meio ambiente quanto em sistemas biológicos, visto às inúmeras vantagens de se utilizar um polímero de origem natural em substituição a outros materiais que causam acentuados impactos ao ambiente. Em particular ressalta-se o uso de quitosana como biomaterial em diversas áreas, por se tratar de um polímero que apresenta propriedades biológicas favoráveis, incluindo caráter antioxidante, antimicrobiano, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, ação anti-inflamatória e capacidade de formar filmes, o que a torna um material de grande interesse (AZEVEDO et al., 2007). Estudos envolvendo a aplicação de quitosana vêm se destacando no meio científico a medida com que cresce o conhecimento a respeito de sua funcionalidade em diversas áreas e sua ampla aplicabilidade torna-se ainda maior considerando as diferentes formas nas quais ela pode ser utilizada, como por exemplo, soluções, filmes, géis e nanopartículas (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

A quitosana se tornou alvo de muito interesse na comunidade científica e tem sido aplicada em diversas pesquisas como agente antimicrobiano contra uma vasta gama de microrganismos, tais como, algas, bactérias, leveduras e fungos em estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo utilizada tanto como solução, quanto na forma de filmes (TAVARIA et al., 2013). Porém, com o crescimento de estudos envolvendo este polissacarídeo, torna-se imprescindível compreender fatores intrínsecos e extrínsecos que possa afetar sua atividade antimicrobiana (massa molecular, viscosidade, força iônica, concentração, pH, temperatura, entre outros.) e os possíveis mecanismos de ação, visando uma melhor compreensão quanto ao seu potencial antimicrobiano.

Há diversos estudos descritos na literatura que buscam compreender a atividade antimicrobiana da quitosana contra diferentes microrganismos e embora ainda não esteja definido um mecanismo exato para essa atividade, na literatura científica é possível encontrar a elucidação de alguns modelos para tentar compreender a interação que ocorre entre o polímero e o microrganismo alvo. O modelo que mais é abordado pelos pesquisadores, mostra as interações eletrostáticas entre o polímero, com seus grupos positivamente carregados ($-\text{NH}_3^+$), e as moléculas com resíduos de carga negativa como lipossacarídeos e proteínas presentes no envoltório celular do microrganismo, resultando em uma desestruturação da parede celular, com consequente perda dos constituintes intracelulares. Desse modo, derivados de quitosana catiônicos apresentam-se como uma proposta promissora, pois acredita-se que quanto maior o número de cargas positivas presentes na estrutura química do polímero, maior será a sua atividade antimicrobiana (GOY et al., 2009; MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010). Outro mecanismo de ação proposto por alguns trabalhos na literatura se dá pela atuação da quitosana como um agente de quelação de metais, resultando na retenção de nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo (DUTTA et al., 2009 e GOY et al., 2009).

A compreensão do mecanismo de ação dos derivados de quitosana na inibição do crescimento fúngico possibilita potencializar a ação, além de incrementar a seletividade e eficácia do polímero. Em estudos recentes realizados no laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) – IBILCE/UNESP por DIAS e colaboradores (2018), mostrou que a interação de derivados anfifílicos de quitosana com modelos de membranas, liga-se fortemente à superfície da membrana celular e que essa adsorção é

muito reforçada pela presença de lipídios carregados negativamente, que também são encontrados na composição da membrana do fungo *Aspergillus flavus*. Os resultados obtidos confirmam que a agregação de constituintes da parede celular, induzida pelo derivado anfifílico, e observada por microscopia eletrônica de transmissão mostram claramente o comprometimento da parede celular como um efeito primário na inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* (DIAS, 2018).

1.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS

Considerando a acentuada limitação na biocompatibilidade e biodegradabilidade que existe em relação ao uso dos polímeros sintéticos, cada vez mais estão sendo intensificados os estudos envolvendo polímeros naturais, destacando-se o uso da quitosana em diversas pesquisas, nas quais visa-se o desenvolvimento de embalagens de produtos alimentícios. Além da quitosana, estudos promissores envolvendo o uso de outros polissacarídeos, tais como o alginato e a pectina, estão sendo realizados empregando-os no preparo de revestimentos e embalagens (LUVIELMO; LAMAS, 2012).

São notórios os avanços em pesquisas na preparação e aplicação de filmes baseados em quitosana com múltiplas funcionalidades. Em estudos recentes, filmes de quitosana vêm sendo aplicados no desenvolvimento de novas embalagens, Warsiki (2018) utilizou a quitosana associada ao permanganato de potássio para desenvolver embalagens absorvedoras de etileno para prolongar o tempo de prateleira de tomates. Garcia et al., (2018) analisaram a estrutura de novos materiais tendo como base a quitosana, relacionando as propriedades mecânicas dos filmes de acordo com a variação na composição, confirmando o bom caráter da quitosana quanto a formação de filmes.

Sun et al., (2017) estudaram as propriedades físicas, mecânicas e bioativas de filmes de quitosana incorporados com polifenóis e constataram que os materiais estudados apresentaram propriedades melhores quando comparada com filmes compostos apenas por quitosana e que, portanto, podem ser uma alternativa promissora em substituição aos materiais sintéticos, pois apresentam um ótimo potencial como material de embalagem bioativa para prolongar a vida de prateleira dos alimentos.

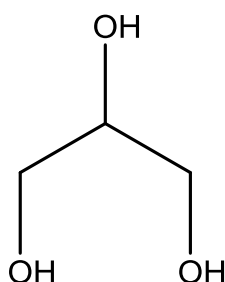
Kaya et al., (2018) estudaram pela primeira vez a incorporação de extratos de caule, folhas e sementes de *Pistacia terebinthus*, popularmente conhecida como terebinto ou cornalheira (ricos em compostos fenólicos) à quitosana para produção de

filmes e constataram que a incorporação desses extratos vegetais aumentou efetivamente as atividades antioxidante, antimicrobiana e elasticidade dos filmes, apresentando-se como um material alternativo para embalagem de alimentos.

Embora a quitosana tenha boa capacidade de formação de filmes, a adição de agentes plastificantes para elaboração dos mesmos é um método cada vez mais utilizado em busca de melhorar as propriedades dos filmes, tais como as propriedades mecânicas, térmicas e estruturais. Os plastificantes em geral são poliálcoois de baixa massa molecular e seu uso se dá com o intuito de reduzir as forças intermoleculares polímero-polímero e promover um distanciamento entre as cadeias, proporcionando maior flexibilidade na rede polimérica (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, 2014). A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes é um fator muito importante e depende da compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizado, de modo a evitar a separação precoce no decorrer do processo de secagem da solução filmogênica. A quantidade de plastificante varia de acordo com a rigidez do material ao qual ele será incorporado. No entanto, há concentrações nas quais se observa um efeito contrário, conhecido como antiplastificante, onde ao invés de tornar o filme mais flexível, ele se torna mais rígido e quebradiço (GAUDIN et al., 2000).

Dentre os plastificantes mais utilizados na produção de filmes com quitosana, destaque-se o uso de glicerol e sorbitol. O glicerol, popularmente conhecido como glicerina, é um triálcool, cujo nome oficial (IUPAC) é 1,2,3-propanotriol (Figura 3), à temperatura ambiente apresenta-se como um líquido incolor, inodoro e viscoso. Apresenta uma natureza altamente hidrofílica devido à presença de três grupos hidroxilas em sua estrutura química, responsáveis por realizar interações de hidrogênio com a água (BEATRIZ et al., 2011).

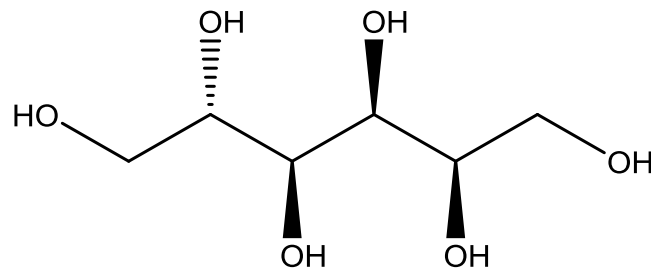
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura química do glicerol.



Fonte: Elaborada pela autora.

O plastificante sorbitol, também denominado como glucitol, é um poliálcool muito utilizado na indústria de alimentos como agente plastificante em filmes biopoliméricos, cuja estrutura química apresenta seis grupos hidroxilas (Figura 4), o que facilita a formação de interações de hidrogênio com as cadeias poliméricas.

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura química do sorbitol.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na literatura constam estudos de filmes, cuja base é quitosana com uso de glicerol e sorbitol como plastificantes. Em um estudo publicado por Fakhoury e seus colaboradores (2012), constatou-se que os filmes de quitosana com sorbitol possuíam melhores propriedades físico-químicas do que aqueles contendo glicerol.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que uma quitosana com alto grau de desacetilação pode ser obtida de modo eficiente a partir do processo reacional de hidrólise básica, visto que o grau de desacetilação obtido para quitosana comercial foi de 77% e após a reação de desacetilação o valor obtido foi de 97%, conforme a caracterização realizada por RMN ^1H . Esta técnica também foi utilizada para avaliar os efeitos dos demais processos reacionais realizados e permitiu concluir que os procedimentos de sínteses utilizados, tanto com grupos DEAE quanto com grupos dodecila são viáveis para a obtenção de derivados de quitosana. Os dados de CPG mostraram a variação da massa molecular dos polímeros que foram submetidos à reação de desacetilação e a despolimerização da cadeia polimérica por oxidação em meio ácido. Os resultados dos ensaios microbiológicos em solução demonstraram que a modificação hidrofóbica na cadeia polimérica da quitosana aumentou consideravelmente a atividade antifúngica.

As modificações químicas na estrutura da quitosana resultaram em grandes alterações na coloração dos filmes. Os derivados DEAE-CH_L e DEAE-CH_L-Dod combinam propriedades interessantes que resultaram da modificação com grupos amina terciários. Primeiramente, forneceu à quitosana uma densidade de carga positiva em uma faixa mais ampla de pH e permitiu maior solubilidade, o que significa bom potencial para aplicação como um filme comestível. Além disso, a solubilidade pode ser ajustada pela composição com os plastificantes. A presença dos grupos DEAE e dodecila diminui a permeabilidade ao vapor de água e a espessura dos filmes, proporcionando uma atividade antifúngica significativa contra todos os fungos testados e, ao mesmo tempo, não conferindo toxicidade a quitosana. As propriedades mecânicas podem ser melhoradas com a adição de plastificantes e, portanto, o ajuste apropriado da composição química e da massa molecular pode melhorar outras propriedades, expandindo as aplicações potenciais desses filmes para revestimentos. No geral, a modificação com os grupos DEAE e dodecila proporcionou aos filmes atividades antifúngicas melhoradas contra alguns fungos comuns, conferindo potencial a esses derivados como revestimentos e filmes comestíveis para grãos e frutas.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento do presente trabalho foram devidamente tratados antes de serem descartados. As águas de lavagem da quitosana obtidas após o processo de desacetilação, apresentavam elevado pH, logo tiveram seu pH ajustado para aproximadamente 7 com a utilização de descartes de HCl, antes de serem descartadas na rede pública de esgoto. Os resíduos gerados durante a realização dos ensaios microbiológicos foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos antes de serem descartados. Os demais resíduos cujo tratamento não pode ser realizado foram corretamente armazenados, identificados e encaminhados ao entreposto de resíduos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP).

7 REFERÊNCIAS

ACEVEDO-FANI, A. et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168-177, 2015.

ASTM International. ASTM D882-12, **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**, 2012.

ASTM International. ASTM E96/96-16: **Standard test methods for water vapor transmission of materials**, 2016.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89- 97, 2005.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 23, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M.E.; RABEA, E.I. Synthesis and Structure-Activity Relationship of N-(Cinnamyl) Chitosan Analogs as Antimicrobial Agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 185-192, 2013.

BAJIĆ, M. et al. Chitosan-Based Films with Incorporated Supercritical CO₂ Hop Extract: Structural, Physicochemical, and Antibacterial Properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 261-268, 2019.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: Um Breve Histórico e Aplicação em Sínteses Estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.

CASARIEGO A. et al. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1895–1902, 2009.

CHANGA, W. et al. Zhong Preparation of chitosan films by neutralization for improving their preservation effects on chilled meat. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 50–61, 2019.

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

DIAS, A.M. et al. Insights on the Antifungal Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus Flavus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 433-444, 2018.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, 114, 1173 - 1182, 2009.

EPURE, V. et al. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.947- 952, 2011.

ERKMEN, O.; BARAZI, A.O. General Characteristics of Edible Films. **Journal of Food Biotechnology Research**, v. 2, 1-3, 2018.

ESCAMILLA - GARCÍA, M. et al. Physical, Structural, Barrier, and Antifungal Characterization of Chitosan–Zein Edible Films with Added Essential Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2370, 2017.

FARIAS, M. G. et al. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola. **Química Nova**, v. 35, p. 546-552, 2012.

FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 155 - 163, 2016.

FIORI, A.P.S.M.; GABIRABA, V.P. Preparação e caracterização de nanocompósitos poliméricos baseados em quitosana e argilo minerais. **Polímeros**, v. 24, p. 628-635, 2014.

FLORES - HERNÁNDEZ, C.G. et al. All Green Composites from Fully Renewable Biopolymers: Chitosan-Starch Reinforced with Keratin from Feathers. **Polymers**, v. 6, p. 686-705, 2014.

Frases de Madre Tereza de Calcutá. **O Segredo**, 2019. Disponível em: <<https://osegredo.com.br/frases-de-madre-tereza-de-calcuta/>>. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

GABRIEL, J. D. S.; TIERA, M. J.; DE OLIVEIRA TIERA, V. A. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activities of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus flavus*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5725-5731, 2015.

GARCIA, C. E. G. et al. Biomaterials Based on Electrospun Chitosan. Relation between Processing Conditions and Mechanical Properties. **Polymers**, v. 10, p. 1-19, 2018.

GAUDIN, S. et al. Antiplasticisation and Oxygen Permeability of Starch-Sorbitol Films. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 33- 37, 2000.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, p. 241-247, 2009.

GUO, Z. et al. Comparative Study of the Influence of Active Groups of Chitosan Derivatives on Antifungal Activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 2553-2556, 2013.

HAMDI, M. et al. Acetylation Degree, a Key Parameter Modulating Chitosan Rheological, Thermal and Film-Forming Properties. **Food Hydrocolloids**, v. 87, 48-60, 2019.

HANANI, Z.A.N. et al. Development and Characterization of Biodegradable Composite Films Based on Gelatin Derived from Beef, Pork and Fish Sources. **Foods**, v. 2, p. 1-17, 2013.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n, p. 344-353, 2004.

HUNTERLAB. Disponível em: <<https://www.hunterlab.com/>>. Acesso em: 17/07/2018

IL'INAA, A. V. et al. In vitro Antifungal Activity of Metal Complexes of a Quaternized Chitosan Derivative with Copper Ions. **Microbiology**, v. 86, p. 590-595, 2017.

JAYAKUMAR, R. et al. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, n. 79, p. 1-8, 2010.

JUNIOR, I. D. S. et al. General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, p. 189-197, 2005

KAYA, M. et al. Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 287-297, 2018.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. **Advanced Drug Delivery reviews**, v. 62, p. 3-11, 2010.

KIM, C. H.; CHUN, H. J. A Synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro. **Polymer Bulletin**, v. 42, p. 25-32, 1999.

KUMAR RAVI, M. N. V. A Review of Chitin and Chitosan Applications. **Reactive & Functional Polymers**, v.46, p. 1-27, 2000.

LANGVAD, F. A Rapid and Efficient Method for Growth Measurement Of Filamentous Fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 97-100, 1999.

LECETA, I. et al. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 889-899, 2013.

LI, Z. et al. Preparation, Characterization and Anti-Aflatoxigenic Activity of Chitosan Packaging Films Incorporated with Turmeric Essential Oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 420-434, 2019.

Lima, A. M. F. **Estudo de propriedades físico- químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de liberação de fármacos.** Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, v. 30, p. 832- 837, 2007.

LUCERA, A. et al. A. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2012.

LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, p. 8-15, 2012.

MA, X. et al. Effect of Sorbitol Content on Microstructure and Thermal Properties of Chitosan Films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1294-1297, 2018.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 305-315, 2010.

MEDEIROS, M. A. et al. Influência da Temperatura e da Natureza do Catalisador na Polimerização do Glicerol. **Polímeros**, v. 20, p. 188- 193, 2010.

MORILLON, V. et al. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 67-89, 2002.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais**. Ed. Artliber, 2009.

MURPHY, E. F. et al. Characterization of protein adsorption at the phosphorylcholine incorporated polymer water interface. **Macromolecules**, p. 4545 - 4554, 2000.

OLIVEIRA, F. D. P. P. et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, v. 24, p. 1-11, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N.; MELO, I. S.; FRANCO, T. T. Changes in Hyphal Morphology due to Chitosan Treatment in Some Fungal Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 637-646, 2012.

OLIVEIRA JR, E.N. et al. Growth of Phytopathogenic Fungi in the Presence of Partially Acetylated Chitooligosaccharides. **Mycopathologia**, v. 166, p. 163-174, 2008.

Oração de São Francisco. **Canção Nova**, 2019. Disponível em: <<https://formacao.cancaonova.com/igreja/santos/oracao-de-sao-francisco/>>. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

PARK, S.Y.; MARSH, K.S.; RHIM, J.W. Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 194-197, 2002.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Ed. Cengage Learning, 2010.

RAAFAT, D.; SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 186-201, 2009.

RHIM, J. W. et al. Chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 2006.

RODRÍGUEZ-NÚÑES, J. et al. Chitosan/Hydrophilic Plasticizer-Based Films: Preparation, Physicochemical and Antimicrobial Properties. **Journal of Polymers Environment**, p. 41-51, 2014.

SARTORI, T.; MENEGALLI, F.C. Development and Characterization of Unripe Banana Starch Films Incorporated with Solid Lipid Microparticles Containing Ascorbic Acid. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 210-219, 2016.

SILVA-CASTRO, I. et al. Application of Bioactive Coatings Based on Chitosan and Propolis for *Pinus spp.* Protection against *Fusarium circinatum*. **Forests**, v. 9, p. 685, 2018.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving Functional Properties of Chitosan films as Active Food Packaging by Incorporating with Propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695-702, 2016.

SOBRAL, P. J. A. et al. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência e Engenharia**, v. 8, p. 60 – 67, 1999.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, B. **Química Orgânica**, 8 ed. Tradução de Robson Mendes Matos, Revisão Técnica Délio Soares Raslan- Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SOUZA, M.P. et al. Development and Characterization of an Active Chitosan-Based Film Containing Quercetin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 2183-2191, 2015.

SUN, L. et al. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v.163, p.81-91, 2017.

TAKAKI, M. et al. Synthesis, characterization and study of quaternary derivatives of chitosan: in vitro study against *Aspergillus flavus*. **Advances in Chitin Science – Volume XIV**, 2013.

TANADA- PALMU, P. S. et al. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, v. 64, p. 291-297, 2005.

TAVARIA, F.K. et al. A Quitosana como Biomaterial Odontológico: Estado da Arte. **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 29, p. 110-120, 2013.

TIEN, C.L. et al. N-Acylated Chitosan: Hydrophobic Matrices for Controlled Drug Release. **Journal of Controlled Release**, v. 93, p. 1– 13, 2003.

TIERA, M. J. et al. Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine-Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions. **Biomacromolecules**, v.7, p. 3151 - 3156, 2006.

TØMMERAAS, K. et al. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 137-144, 2001.

VALDERRAMA, N.; ALBARRACÍN, W.; ALGECIRA. N. Physical and Microbiological Evaluation of Chitosan Films: Effect of Essential Oils and Storage. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 9, p. 262-269, 2015.

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

VARNA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrates Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2003.

VIEGAS DE SOUZA, R. H. F. et al. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Molecules**, v. 18, p. 4437-4450, 2013.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C.V. Recent Developments in Antibacterial and Antifungal Chitosan and Its Derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.

WANG, L. et al. Chitosan Disrupts *Penicillium Expansum* and Controls Postharvest Blue mold of Jujube Fruit. **Food Control**, v. 41, p. 56-62, 2014.

WARSIKI, E. Application of chitosan as biomaterial for active packaging of ethylene absorber. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 141, 2018.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

XING, K. et al. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 569–588, 2015.

XING, A. K. et al. Synthesis and in Vitro Antifungal Efficacy of Oleoyl-Chitosannanoparticles Against Plant Pathogenic Fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 830-836, 2016.

YANG, J. et al. Cellulose - Chitosan Antibacterial Composite Films Prepared from LiBr Solution. **Polymers**, v. 10, p. 1058-65, 2018.

YOUNES, I. et al. M. 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.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 394-400, 2010.