

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**SAMARA SOARES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE GEL DE  
QUITOSANA NO CRESCIMENTO DE *Rhizopus  
stolonifer***



Rio Claro - SP  
2024

SAMARA SOARES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE GEL DE QUITOSANA NO  
CRESCIMENTO DE *Rhizopus stolonifer***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro - SP  
2024

S676a Soares, Samara  
Avaliação do efeito inibitório de gel de quitosana no crescimento de *Rhizopus stolonifer* / Samara Soares. -- Rio Claro, 2024  
40 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Michel Brienzo

1. Quitosana. 2. Revestimento. 3. Biogel. 4. Filme. 5. Biodegradável. I. Título.

SAMARA SOARES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE GEL DE QUITOSANA NO  
CRESCIMENTO DE *Rhizopus stolonifer***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Michel Brienzo (orientador)

Prof. Dr. Jaiber Rodriguez Llanos

Prof. Dr. Eddyn Solorzano

Aprovado em: 11 de Novembro de 2024

Assinatura do discente

Assinatura do orientador

*Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais, cuja dedicação e amor foram essenciais em cada passo da minha jornada acadêmica. Sem vocês, este sonho não seria possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que iluminou meu caminho durante esta jornada. Ao meu pai, Valter, e à minha mãe, Solange, por todo o apoio e suporte durante a graduação. À minha avó, Lurdes, pelo amor, carinho e afeto que me motivaram a seguir meus sonhos. Sou grata à minha tia, Edilene, que sempre acreditou em mim e foi uma das minhas maiores torcidas. Você é minha lembrança mais preciosa e sei que está feliz por mim, de onde estiver.

Agradeço ao meu namorado, Daniel, que em todos os momentos difíceis esteve ao meu lado, me encorajando, dando forças e acreditando em mim. Viver a graduação ao seu lado tem sido um verdadeiro privilégio. À minha gatinha, Nina, agradeço por todo o suporte emocional ao longo da graduação e por ter tornado este processo mais leve e alegre. Sou grata à Giovana, minha melhor amiga, por toda a amizade e apoio, por ter me incentivado a estudar na Unesp e ser uma veterana incrível, tornando esta trajetória ainda mais especial. Aos amigos que fiz durante esse período, agradeço pelos momentos únicos e especiais que compartilhamos. Cada um de vocês ocupa um lugar especial no meu coração.

Agradeço ao Professor Dr. Michel Brienzo por estar sempre presente e pela orientação durante essa jornada. Sou grata também à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe UNESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo apoio financeiro nos dois últimos anos. A todos os Professores e Professoras incríveis que tive ao longo da graduação, agradeço por fazerem a diferença em minha formação. Por fim, agradeço à UNESP, que me proporcionou aprendizado e me permitiu realizar meu sonho, além de conhecer pessoas que transformaram minha vida e levarei para sempre comigo.

“Você não pode passar um único dia sem ter um impacto no mundo ao seu redor. O que você faz faz a diferença, e você tem que decidir que tipo de diferença você quer fazer.” (Jane Goodall, 1934).

## RESUMO

A quitosana é produzida pela desacetilação alcalina parcial da quitina e apresenta propriedades antimicrobianas. O gel de quitosana tem sido estudado como cobertura de frutas devido à sua propriedade comestível e ação de conservação. No entanto, não é conhecida a influência da desacetilação parcial na ação protetora e antimicrobiana da quitosana. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito inibitório do gel de quitosana no crescimento de *Rhizopus stolonifer*, um dos principais microrganismos que provocam apodrecimento de frutos, considerando diferentes graus de desacetilação (GD). Foram empregadas quitosanas com GD variados para produção de gel em placas. Dos géis obtidos, foram selecionados aqueles cujas propriedades de revestimento aparentam ser mais viáveis para aplicação em morangos frescos, visando avaliar o efeito protetivo como coberturas de frutas. Para avaliar a eficácia antifúngica da quitosana, alguns morangos foram inoculados com esporos de *R. stolonifer* antes de receber os revestimentos. Observou-se que o GD da quitosana influenciou diretamente no efeito protetivo do gel: coberturas com quitosana em GD maiores (60% e 75%) prolongaram o tempo de conservação dos morangos em relação à cobertura com GD menor (45%). O GD de 45% foi capaz de dobrar o tempo de conservação dos morangos em relação aos frutos não revestidos, provando ter um efeito protetivo significativo. Todas as coberturas geraram uma proteção considerável contra *R. stolonifer*, contudo, quanto maior o GD, maior foi a ação protetora contra a desidratação dos frutos. Portanto, este estudo mostrou que o gel de quitosana em diferentes graus de desacetilação é capaz de aumentar o tempo de conservação e inibir o crescimento de *R. stolonifer* em morangos. A desacetilação envolve custos ambientais e econômicos, assim, o uso de quitosanas menos desacetiladas pode contribuir para amenizar estes problemas.

**Palavras-chave:** quitosana; revestimento; biogel; filme; biodegradável.



## ABSTRACT

Chitosan is produced by the partial alkaline deacetylation of chitin and exhibits antimicrobial properties. Chitosan gel has been studied as a coating for fruits due to its edible nature and conservation action. However, the influence of partial deacetylation on the protective and antimicrobial action of chitosan is not well understood. In this context, the present study aimed to evaluate the inhibitory effect of chitosan gel on the growth of *Rhizopus stolonifer*, one of the main microorganisms causing fruit rot, considering different degrees of deacetylation (DD). Chitosans with varying DDs were used to produce gels on plates. From the obtained gels, those with the most viable coating properties for application on fresh strawberries were selected to evaluate their protective effect as fruit coatings. To assess the antifungal efficacy of chitosan, some strawberries were inoculated with *R. stolonifer* spores before receiving the coatings. It was observed that the DD of chitosan directly influenced the protective effect of the gel: coatings with higher DDs (60% and 75%) extended the shelf life of strawberries compared to the coating with a lower DD (45%). The DD of 45% was able to double the shelf life of strawberries compared to uncoated fruits, demonstrating a significant protective effect. All coatings provided considerable protection against *R. stolonifer*; however, the higher the DD, the greater the protective action against fruit dehydration. Therefore, this study showed that chitosan gel at different degrees of deacetylation can increase shelf life and inhibit the growth of *R. stolonifer* in strawberries. Deacetylation involves environmental and economic costs; thus, the use of less deacetylated chitosans may help mitigate these issues.

**Keywords:** chitosan; coating; biogel; film; biodegradable.

**Title in english:** Evaluation of the inhibitory effect of chitosan gel on the growth of *Rhizopus stolonifer*.

## SUMÁRIO

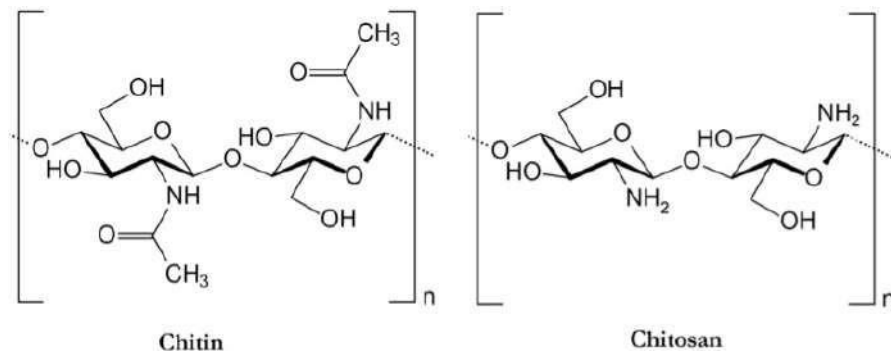
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1 Quitina e quitosana .....	9
1.2 Propriedades antimicrobianas da quitosana .....	11
1.3 <i>Rhizopus stolonifer</i> e a podridão mole em frutos .....	13
1.4 Aplicação da quitosana no revestimento de alimentos .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 Desacetilação da quitina .....	18
3.2 Grau de desacetilação.....	18
3.3 Produção de biogel em placa .....	19
3.4 Preparo das soluções de revestimento.....	19
3.5 Aplicação dos revestimentos para avaliar o efeito protetivo da quitosana .....	19
3.6 Inoculação com <i>R. stolonifer</i> para avaliar o efeito antifúngico da quitosana .....	20
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Desacetilação da quitina .....	21
4.2 Caracterização visual do biogel em placa.....	22
4.3 Efeito protetivo de frutas .....	23
4.4 Efeito inibitório de <i>R. stolonifer</i> .....	25
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
REFERÊNCIAS .....	33

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Quitina e quitosana

A quitosana é um polímero natural derivado da quitina (Llanos *et al.*, 2021). Ambas são formadas por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcNAc), unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), contudo, na quitosana predominam os grupos GlcN, enquanto que na quitina os grupos GlcNAc prevalecem (Macedo *et al.*, 2022), conforme observa-se na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química da quitina e da quitosana



Fonte: Younes & Rinaudo (2015).

A quitina é o polímero mais abundante depois da celulose, sendo encontrada, principalmente, na casca dos crustáceos, como caranguejo, camarão e lagosta (Figura 2) e na parede celular de alguns fungos (Reyes, 2019).

Figura 2 – Cascas de crustáceos para síntese de quitosana



Fonte: Ismail *et al.* (2023).

O processo de obtenção de quitosana a partir da casca de crustáceos se inicia com a extração da quitina. Esta etapa envolve uma série de tratamentos químicos sequenciais, como desmineralização (retirada de minerais), desproteínização (remoção de proteínas) e despigmentação (eliminação de pigmentos) (Junior *et al.*, 2021). A quitina é então transformada em quitosana através de um processo adicional de desacetilação, que envolve a remoção dos grupos acetila da cadeia molecular da quitina, deixando um grupo amino completo (Qavami *et al.*, 2017; Potivas & Laokuldilok, 2014).

O grau de desacetilação se refere à porcentagem de unidades monoméricas que estão desacetiladas. Deste modo, à medida que este número se aproxima de 50%, a quitina passa a ser denominada quitosana (Junior *et al.*, 2021; Qavami *et al.*, 2017; Brasselet *et al.*, 2019). Embora a quitosana esteja disponível comercialmente em diferentes graus de desacetilação, o grau médio da maioria das quitosanas comerciais é de 70-90%, raramente ultrapassando 95% (Potivas & Laokuldilok, 2014). Isto se deve ao fato da quitina ser um biopolímero semicristalino e haver acessibilidade limitada aos sítios reativos contidos no domínio cristalino, o que faz com que a desacetilação não ocorra de forma homogênea e completa ao longo de todas as cadeias (Abdou, Nagy & Elsabee, 2008).

A presença de vários grupos acetilamina na estrutura da quitina a torna insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos em função do elevado grau de empacotamento das cadeias, o que acaba limitando seu uso (Zargar, Asghari & Dashti, 2015). A quitosana, por outro lado, apresenta solubilidade em solução aquosa diluída de ácidos e boa reatividade, devido à protonação dos grupos amino livres da cadeia polimérica. Deste modo, sua versatilidade depende principalmente do alto grau de grupos amino (Almeida, 2009; Llanos *et al.*, 2021).

A quitosana se destaca por ser renovável, atóxica, biodegradável, biocompatível, além de ter diversas bioatividades, como efeito antimicrobiano (antifúngico e antibacteriano), antiinflamatório, antioxidante e anticancerígeno (Crini *et al.*, 2019; Mujtab *et al.*, 2019). Apresenta excelentes características mecânicas, forma películas sem a adição de aditivos e tem boa permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono. Seus produtos são altamente viscosos, assemelhando-se a gomas naturais. Geralmente, as películas de quitosana pura são coesas, compactas e possuem um contorno suave na superfície, sem poros ou fissuras (Shit & Shah,

2014). Graças às propriedades mencionadas, este composto possui uma ampla gama de aplicações, como observa-se no Quadro 1 (Zerpa *et al.*,2017).

Quadro 1 – Aplicações da quitosana

Área	Aplicações
<b>Alimentação / Nutrição</b>	Conservação de alimentos, suplementos nutricionais, antioxidantes, prebióticos, clarificação de bebidas, agente emulsificante, agente estabilizante, fibra dietética, agente antigastrite e encapsulador de lipídio.
<b>Cosméticos</b>	Hidratante, tratamento de acne, suplemento em tratamentos capilares.
<b>Tratamento de água</b>	Remoção de íons metálicos, redutor de odores, eliminação de polímeros sintéticos e fracionadores.
<b>Ciências médicas e farmacêuticas</b>	Encapsulamento, uso periodontal, antitumoral, anticancerígeno, anticoagulante, regenerador de pele e osso, suturas e lentes de contato.
<b>Ciência dos materiais</b>	Hidrocolóide, eletroquímicos, embalagens, fibras têxteis, membranas poliméricas, matrizes de imobilização e géis.
<b>Agricultura</b>	Mecanismo de defesa em plantas, estimulação do crescimento, recobrimento de sementes, fertilizantes e nutrientes do solo.
<b>Microbiológico</b>	Antibacteriano, fungicida e bactericida.
<b>Imunológico</b>	Modificação da resposta biológica, imunopotenciador e estimulante.

Fonte: Adaptado de Zerpa *et al.* (2017).

## 1.2 Propriedades antimicrobianas da quitosana

Os mecanismos de ação pelos quais a quitosana exerce atividade antimicrobiana ainda não foram completamente esclarecidos, mas o mais aceito se refere às interações entre as cargas positivas da quitosana com moléculas aniônicas da superfície celular, alterando a permeabilidade da membrana e comprometendo o metabolismo do microrganismo, podendo, em muitos casos, levar à lise celular (Liu *et al.*, 2004; Valenzuela & Arias, 2012).

De acordo com Goy, Brito e Assis (2009) e Xing *et al.* (2015), a ação antimicrobiana da quitosana pode ocorrer através de três mecanismos: (1) a interação iônica superficial entre a quitosana e o microrganismo, resultando no

vazamento de eletrólitos e outros constituintes proteicos pela parede celular; (2) a penetração da quitosana no núcleo dos microorganismos, inibindo a síntese de RNA e proteínas; e (3) a formação de uma barreira externa impermeável que impede a absorção de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano ao mesmo tempo em que altera a excreção de metabólitos na matriz extracelular. Além disso, é possível que mais de um desses mecanismos ocorra ao mesmo tempo durante a ação antimicrobiana da quitosana.

Estudos sugerem que o efeito da quitosana sobre bactérias gram-positivas e gram negativas são distintos. No caso das gram-positivas, acredita-se que a quitosana de alta massa molar gera películas na superfície celular, impedindo a absorção de nutrientes. Por outro lado, em gram-negativas, a quitosana de baixo peso molar penetra com mais facilidade nas células, desequilibrando o metabolismo desses microorganismos (Silva *et al.*, 2006). De acordo com Liu (2004) e Chung & Chen (2008), a interação eletrostática entre os grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana e os grupos fosfolipídios da membrana celular de bactérias Gram-negativas danifica essa membrana, provocando a saída de material intracelular.

Alguns estudos demonstram ainda que o dano à membrana plasmática é maior em graus mais altos de desacetilação, tanto em bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas. Isto ocorre porque quanto maior o grau de desacetilação, maior é a densidade de carga positiva fornecida pelo grupo amino protonado nas cadeias e, com isso, maior é a atividade antibacteriana do polímero (Martins *et al.*, 2014). O papel dominante do grau de desacetilação na inibição microbiana foi relatado por estudo de Takahashi *et al.*, (2008), no qual membranas de quitosana com GD maiores foram capazes de inibir o crescimento bacteriano.

Além do grau de desacetilação, outros fatores que influenciam a ação antimicrobiana da quitosana são a massa molecular, pH e temperatura. Estas variáveis atuam modificando a estrutura química da quitosana, e, deste modo, o potencial de ligação às membranas celulares dos microorganismos (Gomes, 2007).

Em termos gerais, a atividade antifúngica da quitosana é menos eficiente quando comparada à antibacteriana (Macedo, 2022). Possivelmente, a maior resistência dos fungos à ação da quitosana se dá porque, além da membrana plasmática, eles apresentam parede celular, dificultando para o polímero romper a célula e acessar o meio intracelular, pois precisa transpor as duas barreiras (Raven, Evert & Eichhorn, 2007).

A atividade antifúngica da quitosana provavelmente se deve ao seu caráter catiônico. A interação dos grupos aminos livres com os resíduos negativos das macromoléculas presentes na parede dos fungos modifica a permeabilidade da membrana plasmática, resultando na alteração das principais funções (Benhamou, 1992; Zerpa *et al.*, 2017). Outro possível mecanismo de ação é a inibição da síntese de algumas enzimas presentes nos fungos ou a ocorrência de alterações citológicas (Zerpa *et al.*, 2017).

Apesar de inibir o desenvolvimento de várias espécies fúngicas, a quitosana é menos eficaz com aquelas que a possuem como componente na parede celular. Fungos com quitosana na parede celular são menos afetados pela aplicação de doses razoáveis dela por dois motivos: (1) a presença natural de quitosana na parede celular não gera efeitos adversos para o microrganismo e (2) as interações eletrostáticas da quitosana adicionada, carregada positivamente em meio ácido, provavelmente são menos eficazes em paredes celulares que já possuem quitosana do que em paredes com material cujas cargas são negativas (Zerpa *et al.*, 2017).

### **1.3 *Rhizopus stolonifer* e a podridão mole em frutos**

*Rhizopus stolonifer* é um dos principais responsáveis por perdas de frutos pós colheita, podendo causar danos em diversas culturas como morango, pêssago, mamão, graviola, fruta-do-conde, jaca, dentre outras espécies de importância econômica (Cenargen, 2024). Este fungo é o causador da podridão-mole, também conhecida como podridão-de-*Rhizopus* (Ramos-Garcia *et al.*, 2012). Embora possa ocorrer no campo, a incidência da doença é maior no período pós colheita, sendo mais severa durante o armazenamento e a comercialização (Oliveira *et al.*, 2011).

*R. stolonifer* é um fungo saprófita, que se desenvolve em pedaços de fruta ou material orgânico, no qual o micélio aéreo se reproduz de forma sexuada ou assexuada. A reprodução sexuada leva à formação de um zigósporo, cujas paredes espessas conferem resistência para que o fungo se mantenha latente em solo por vários meses, suportando condições adversas, como falta d'água e temperaturas extremas, até poder retomar seu desenvolvimento (Adaskaveg, Förster & Sommer, 2002; Rivera, 1999).

O ciclo da doença se inicia quando os esporos são disseminados pelo vento e caem na superfície do fruto. Os esporos de *R. stolonifer* são comuns na atmosfera e

infectam os tecidos vegetais dos frutos maduros por meio das feridas, contusões ou aberturas naturais. Em seguida, as hifas secretam enzimas pectinolíticas que degradam as substâncias de pectina na lamela média de células, causando perda de coesão entre as células que, sob tensão podem ser movidas, gerando o aspecto de podridão mole e aquosa dos frutos (Pinto *et al.*, 2013; Agrios, 2008). Além disso, o patógeno causa o desenvolvimento de um mofo sobre os frutos, que inicia branco e evolui para uma coloração preta (Reis & Costa, 2011), como pode ser observado na Figura 3.

Os frutos colhidos, mesmo sem apresentar sintomas, podem carregar estruturas do fungo na superfície, os quais, após a colheita, podem se disseminar rapidamente pelo contato com o suco que escorre dos frutos infectados para os sadios, dentro das embalagens (Dias, Costa & Canuto, 2007). A podridão pode causar danos antes mesmo dos frutos chegarem ao mercado, acarretando depreciação do produto e conseqüentemente pouco ou nenhum valor comercial (Cenargen, 2024).

Figura 3 – Morango recoberto com micélio e estruturas reprodutivas escuras do fungo *Rhizopus stolonifer*.



Fonte: Ueno, Bernardo. Embrapa, [s.d.].

#### 1.4 Aplicação da quitosana no revestimento de alimentos

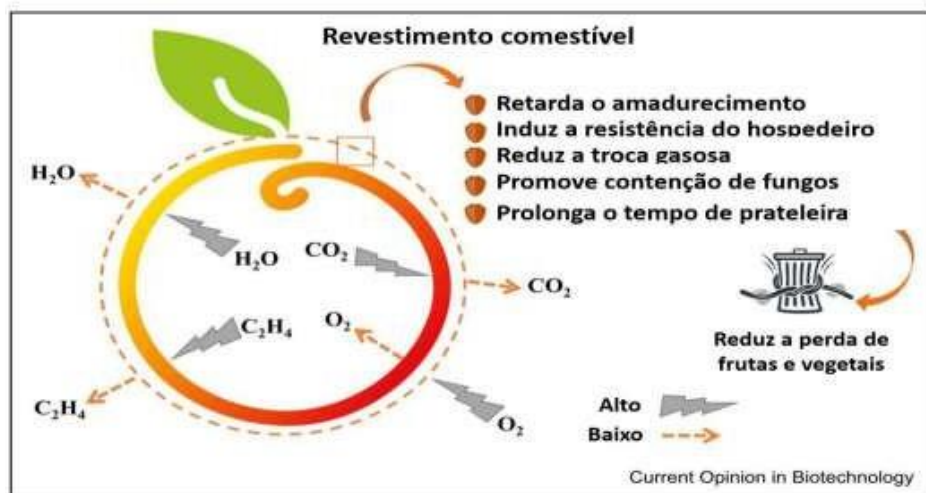
Frutas frescas como morango e goiaba são suscetíveis à podridão em função de danos mecânicos, contato com o solo e forma de armazenamento (Hajji *et al.*, 2018). O controle da deterioração fúngica de frutas é feito através de fungicidas, no entanto, essas substâncias apresentam efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente (Lafarga *et al.*, 2019). O uso de fungicidas pode ser nocivo ao consumidor,



principalmente, ao ser aplicado no período pós-colheita, devido ao curto intervalo de tempo até o consumo (Farzaneh *et al.*, 2015). Além do fungicida, as embalagens plásticas utilizadas para cobrir frutas e outros alimentos também geram grandes problemas ambientais e de saúde, pois são produzidas com polímeros sintéticos à base de petróleo (Shit & Shah, 2014). Assim, é fundamental a formulação de embalagens que possam ser aplicadas na proteção de alimentos frescos, aumentando sua vida útil contra o ataque de fungos, e que sejam uma alternativa aos produtos sintéticos.

Muito se tem estudado coberturas comestíveis à base de protetores naturais com ação antimicrobiana. Estes agentes são capazes de aumentar a vida de prateleira das frutas sem causar efeitos tóxicos ao consumidor (Hassan *et al.*, 2018). O mecanismo de ação dos revestimentos consiste na alteração da composição da atmosfera em torno do fruto, criando uma espécie de barreira à troca de gases, como oxigênio, dióxido de carbono e etileno, envolvidos no processo respiratório. Esta “barreira” atrasa os processos de amadurecimento e senescência e, conseqüentemente, dificulta o desenvolvimento do patógeno (Romanazzi & Mourni, 2022), conforme observa-se na Figura 4.

Figura 4 – Resumo esquemático do mecanismo de ação do revestimento comestível.



Fonte: Romanazzi & Mourni (2022).

A aplicação de quitosana em embalagens de alimentos pode ocorrer na forma de filmes de embalagem ou por meio da impregnação direta de alimentos em soluções de quitosana (Lai *et al.*, 2014). Revestimentos à base de quitosana têm demonstrado um alto potencial para prolongar o tempo de armazenamento dos

frutos, conforme foi relatado com bananas (Suseno *et al.*, 2014), kiwis (Kaya *et al.*, 2016), laranjas (Adetunji *et al.*, 2018), tomates (Costa *et al.*, 2012), maçãs (Botelho *et al.*, 2010), entre outros. Contudo, para a maioria destes estudos, foram empregadas apenas quitosanas com alto grau de desacetilação. Poucos trabalhos na literatura abordaram a atividade antimicrobiana das quitosanas a partir de variações neste parâmetro.

Dado o exposto, o presente trabalho buscou avaliar como o grau de desacetilação da quitosana afeta seu efeito protetivo em revestimento de frutas, bem como sua capacidade de inibir microrganismos, utilizando o *Rhizopus stolonifer* como modelo. O efeito protetivo foi investigado a partir da aplicação direta do biogel em morangos estéreis. Para avaliar se a quitosana pode atuar diretamente sobre o crescimento de *R. stolonifer*, a aplicação do revestimento foi precedida por inoculação dos frutos com esporos desta espécie.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente estudo visou produzir quitosana com diferentes graus de desacetilação, para avaliar o efeito da desacetilação na inibição de microrganismos, empregando o *R. stolonifer* como modelo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desacetilar a quitina comercial para obter quitosana com diferentes graus de desacetilação;
- Analisar o efeito protetivo do biogel de quitosana como revestimento comestível em morangos;
- Avaliar a ação inibitória do biogel de quitosana contra *R. stolonifer*, monitorando a incidência visual de fungos em morangos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi empregada quitina comercial da China, com grau de desacetilação (GD)  $\approx 10\%$  e quitosana da marca Sigma-Aldrich, GD  $\geq 75\%$ . O *Rhizopus stolonifer*, fungo filamentoso utilizado neste estudo, faz parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) onde se encontra preservado por meio de ultracongelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foi coletado na fazenda Corumbataí, em Corumbataí - SP (coordenada  $22^{\circ}17'21.73''\text{S}$ ;  $47^{\circ}39'22.89''$ ) em um jardim de fungo de formiga cortadeira, e apresenta o código LESF 012.

#### 3.1 Desacetilação da quitina

A quitina foi desacetilada conforme método de Souza (2017). Uma solução de 400 mL de hidróxido de sódio 50% (m/v) foi adicionada a 4 g de quitina com grau de desacetilação (GD) inicial de  $\approx 10\%$ . Para dar início à desacetilação, a mistura foi submetida à agitação em um reator de aço inoxidável com capacidade de 600 mL. A reação ocorreu sob temperaturas e tempos variáveis para obter diferentes GD. Após o término da reação, a mistura foi vertida em um papel filtro e submetida à etapa de lavagem com água destilada para remoção do NaOH. Obtida a neutralização do pH, a quitosana recuperada foi levada à estufa para secagem.

#### 3.2 Grau de desacetilação

O grau de desacetilação das amostras foi determinado de acordo com o método de Tan *et al.* (1998). 0,05 g de quitosana comercial (GD  $\geq 75\%$ ) foi solubilizada em 20 mL de HCl 0,10 mol/L e diluída com 10 mL de água destilada. A solução foi então homogeneizada com um agitador magnético por 40 minutos e, em seguida, titulada com NaOH 0,1 mol/L. A partir do registro dos valores de pH, gerou-se uma curva de titulação potenciométrica, com dois pontos de inflexão - o primeiro corresponde à neutralização do excesso de ácido e o segundo à desprotonação dos grupos aminos (Souza, 2013). O volume de NaOH em cada ponto foi aplicado à Equação 1 (Tan *et al.* 1998), em que A é a quantidade de GlcNAc determinada / 204 e W é a massa da amostra de quitosana utilizada. Por fim, o GD obtido foi comparado ao fornecido pelo fabricante a fim de avaliar a precisão da metodologia.

$$DD = 100 - [A / (W - 204A) / 161 + A] \times 100$$

Equação 1. Fórmula de Titulação Potenciométrica, reproduzida de Tan *et al.* (1998).

### 3.3 Produção de biogel em placa

A produção de biogel em placa foi feita conforme método de Chen *et al.* (2009) & Lavorgna *et al.* (2010). 1 g de quitosana foi dissolvida em 100 mL de solução de ácido acético 2%, mantendo uma agitação de 550 rpm durante 4 h a 25 °C. Faltando 30 minutos para o término da agitação, foi adicionada à mistura 0,476 mL de glicerina. Após a etapa de solubilização, a solução filmogênica foi deixada em repouso de um dia para o outro para remoção das bolhas formadas, e vertida em placa de Petri plástica (aproximadamente 40 g em cada placa). Por fim, a secagem foi feita a 37 °C durante 48 h, resultando na formação de biofilmes.

### 3.4 Preparo das soluções de revestimento

Foram preparadas três soluções de revestimento diferentes: (1) quitosana com GD 45%; (2) quitosana com GD 60% e (3) quitosana com GD 75%. As soluções foram preparadas conforme o método para produção de biogel (Item 3.3), mas sem a etapa de secagem e com a quantidade de quitosana sendo duplicada visando garantir maior aderência aos morangos. Deste modo, 2 g de quitosana foi dissolvida em 100 mL de solução de ácido acético 2%, mantendo uma agitação de 550 rpm durante 4 h a 25 °C. Faltando 30 minutos para o término da agitação, foi adicionada à mistura 0,476 mL de glicerina.

### 3.5 Aplicação dos revestimentos para avaliar o efeito protetivo da quitosana

Os morangos foram adquiridos em um varejão na cidade de Rio Claro - SP. Foram selecionados morangos de cor e maturidade uniformes (3/4 da superfície com coloração vermelha) e sem lesões visíveis. Inicialmente, os frutos foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio 2% durante 15 minutos e lavados com água corrente. Após secagem natural, foram imersos nas soluções filmogênicas de quitosana. Frutos sem cobertura foram utilizados como controle. Os morangos ficaram expostos ao ambiente (entre 22-25 °C) durante 8 dias e o aparecimento de microrganismos foi monitorado, assim como a deterioração.

### 3.6 Inoculação com *R. stolonifer* para avaliar o efeito antifúngico da quitosana

Este teste foi baseado na metodologia de Park *et al.* (2015). Após higienização com hipoclorito de sódio 2%, morangos foram mergulhados por 30 s em suspensões de  $1,1 \times 10^4$  esporos/mL de *R. stolonifer* em fluxo laminar. Finalizada a inoculação, aguardou-se 1 h para secagem dos morangos.

Os morangos inoculados foram então mergulhados em soluções de revestimento por 30 s. Foram usados 5 morangos para cada tratamento (GD 45%, 60% e 75%) e 5 morangos como controle (apenas inoculados com esporos, sem revestimento de quitosana). Em seguida, os frutos foram dispostos em placas de Petri estéreis para secagem.

Os morangos ficaram expostos ao ambiente (entre 22-25 °C) durante 8 dias e o aparecimento de microrganismos foi monitorado, assim como a deterioração. Os frutos foram avaliados quanto à incidência visível de mofo nos dias 0, 2, 4, 6 e 8. Os morangos foram considerados infectados quando uma lesão visível na superfície foi observada.

Para facilitar a observação dos frutos, a avaliação visual foi padronizada de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Avaliação visual de morangos

Pontuação	Aparência	Cor
1	Completamente mofado	Preta
2	Parcialmente mofado	Parcialmente preta
3	Perda de água evidente	Vermelho escuro
4	Aparência boa	Vermelho
5	Aparência ótima	Vermelho brilhante

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Desacetilação da quitina

Para testar a precisão da metodologia na determinação do GD, as titulações potenciométricas foram feitas em triplicata e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da titulação potenciométrica

<b>ID amostras</b>	<b>Grau de desacetilação obtido (%)</b>
1	73,0
2	69,6
3	69,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Como se pode observar, os valores de GD obtidos nas três titulações estão bem próximos entre si. Além disso, se aproximam do valor fornecido pelo fabricante (GD≈75%), sugerindo que a metodologia de Tan *et al.* (1998) possui boa precisão, podendo ser usada como padrão para determinar o GD das amostras desacetiladas subsequentemente.

Obtida a metodologia para determinação do GD, foram iniciados os testes de desacetilação. Os primeiros experimentos foram feitos com o uso de um agitador magnético comum, de modo que a quitina foi desacetilada em um frasco Schott ao invés do reator. Contudo, a desacetilação não obteve sucesso na maior parte dos testes, dada a dificuldade em manter a temperatura da solução constante. O melhor resultado pode ser conferido na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado do teste de desacetilação sem o uso do reator

<b>Massa quitina (g)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>GD (%)</b>	<b>Volume de água gasto (L)</b>	<b>Massa recuperada (g)</b>
4	110	3	54,1	14	0,8

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A metodologia apresentou capacidade de desacetilação média, visto que não ultrapassou o GD de 54,1%. Além disso, os testes consumiram em média 12 L de água na etapa de lavagem para a remoção completa do NaOH, sendo um altíssimo consumo de água quando comparado ao rendimento do processo. Deste modo, na tentativa de tornar o processo de desacetilação mais eficiente e reduzir o desperdício de água, optou-se por utilizar o reator nos testes subsequentes, visto que seu alto desempenho tem sido relatado em outros estudos (Hiroshi *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2015).

Tabela 4 – Resultado dos testes de desacetilação com o uso do reator

Massa de quitina (g)	Temperatura de reação (°C)	Tempo de reação (h)	GD (%)	Desvio padrão do GD	Volume de água gasto (L)	Massa de quitosana recuperada (g)
	110	1	37		6,5	
	110	2	46		6,5	
4	120	3	54	9,48	6	1,6
	140	3	62		5	
	140	4	54		5	

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

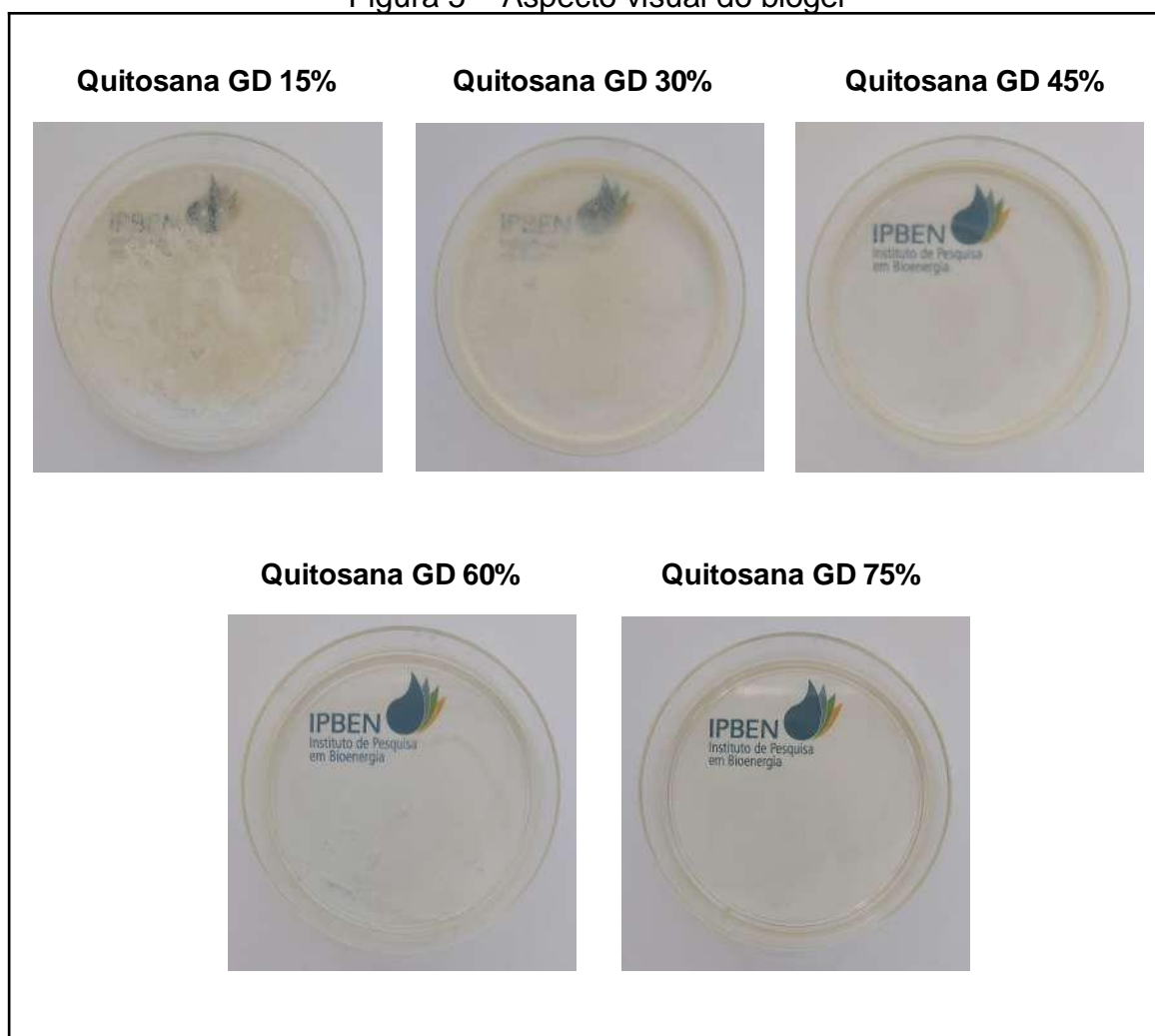
Os valores de GD obtidos apresentam uma média de 50,6 e um desvio padrão de 9,48, sugerindo uma distribuição moderadamente dispersa. O uso do método combinado com o reator mostrou boa capacidade de desacetilação, dado que, partindo de uma quitina com GD baixo ( $\approx 10\%$ ), foi possível obter quitosanas com GD de até 62%. O aumento nos GD com o tempo e a temperatura de reação confirma que essas variáveis influenciam a eficiência da reação, conforme apontado na literatura (Veiga, 2011). Além disso, cerca de 40% da massa de quitina empregada foi recuperada como quitosana, indicando que o rendimento do processo não foi afetado pelas mudanças de tempo e temperatura.

#### 4.2 Caracterização visual do biogel em placa

Após 48 h de secagem, as placas foram retiradas da estufa, finalizando o processo de formação do biogel. O aspecto do biogel para cada grau de desacetilação da quitosana pode ser visto na Figura 5.



Figura 5 – Aspecto visual do biogel



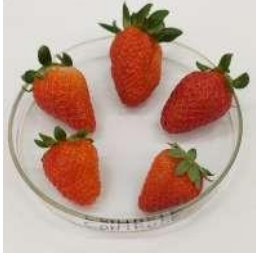

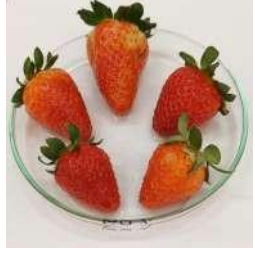





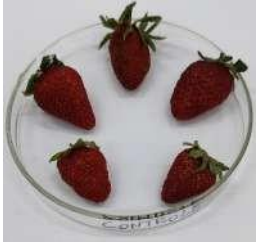



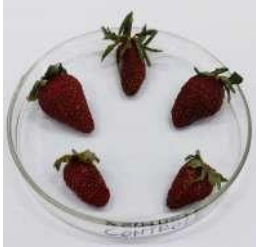







Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Géis contendo quitina com GD 15% e 30% apresentaram coloração esbranquiçada e aspecto quebradiço, enquanto géis produzidos com quitosana com GD 45%, 60% e 75% adquiriram maior transparência e flexibilidade, demonstrando que, conforme o grau de desacetilação da quitosana aumenta, melhores são as propriedades físicas do biogel, corroborando com Rosendo (2016).

#### 4.3 Efeito protetivo de frutas

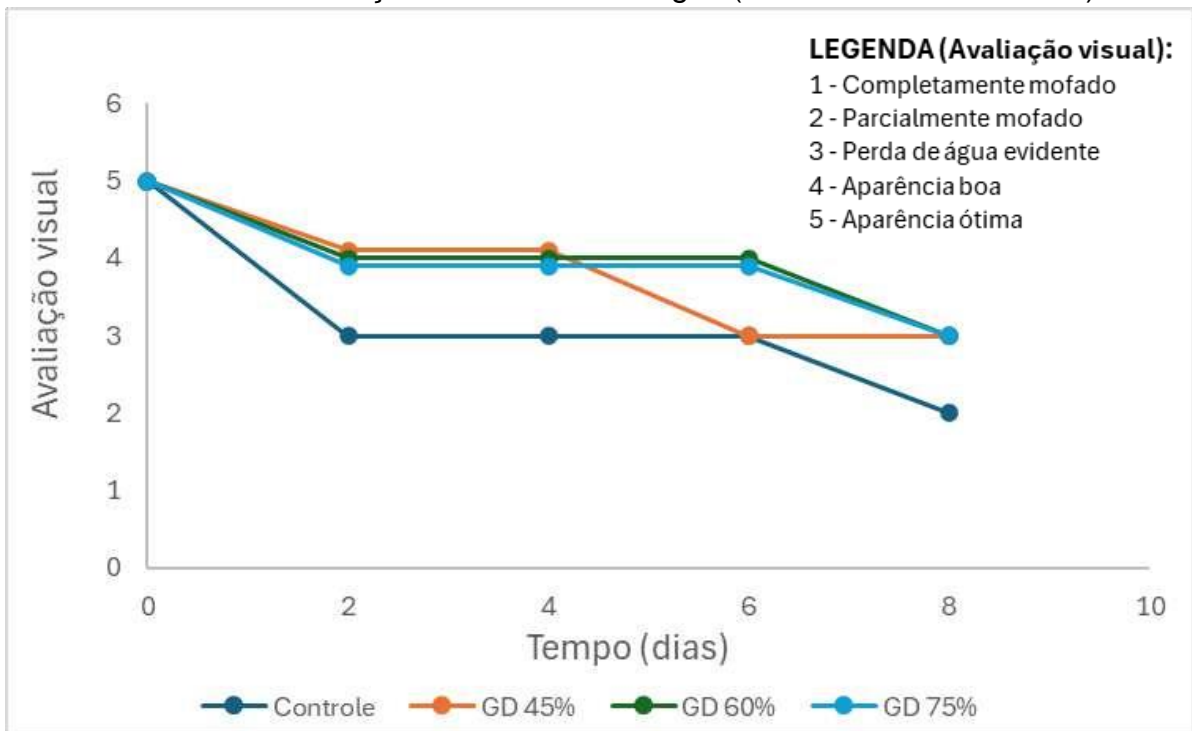
Dado que os maiores graus de desacetilação geraram propriedades físicas melhores no biogel, optou-se por utilizar a solução de quitosana nos graus 45%, 60% e 75% para testar o efeito protetivo como cobertura de morangos. A Figura 6 ilustra o processo do experimento de preservação de morango para o grupo controle e revestimentos de quitosana GD 45%, 60% e 75% ao longo de 8 dias.

Figura 6 – Aspecto visual dos morangos

	<b>Controle</b>	<b>45%</b>	<b>60%</b>	<b>75%</b>
<b>Dia 0</b>				
<b>Dia 2</b>				
<b>Dia 4</b>				
<b>Dia 6</b>				
<b>Dia 8</b>				

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Gráfico 1 – Avaliação visual dos morangos (de acordo com Tabela 1)




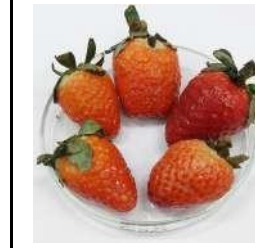


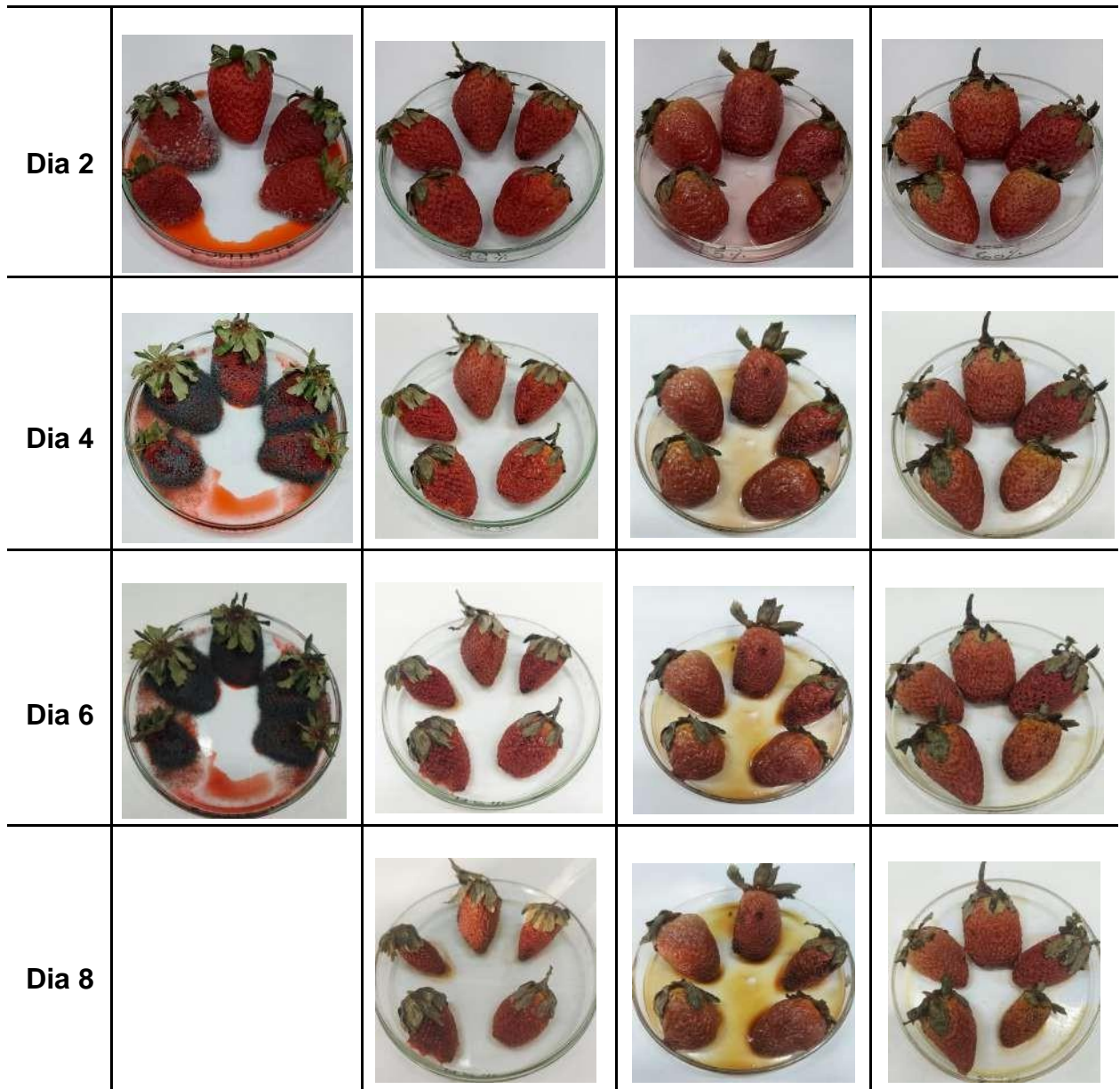
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Comparando o aspecto visual dos morangos ao longo de 8 dias, foi possível observar que os morangos controle (sem revestimento) ficaram em condições de consumo até o 2º dia, tendo seu processo de degradação iniciado a partir do 4º dia, com mudança de cor e perda progressiva de volume. Por outro lado, os morangos que receberam o revestimento com GD 45% se mantiveram conservados até o 4º dia. Já os morangos tratados com quitosana com GD 60% e 75% ficaram aptos para consumo até o 6º dia.

#### 4.4 Efeito inibitório de *R. stolonifer*

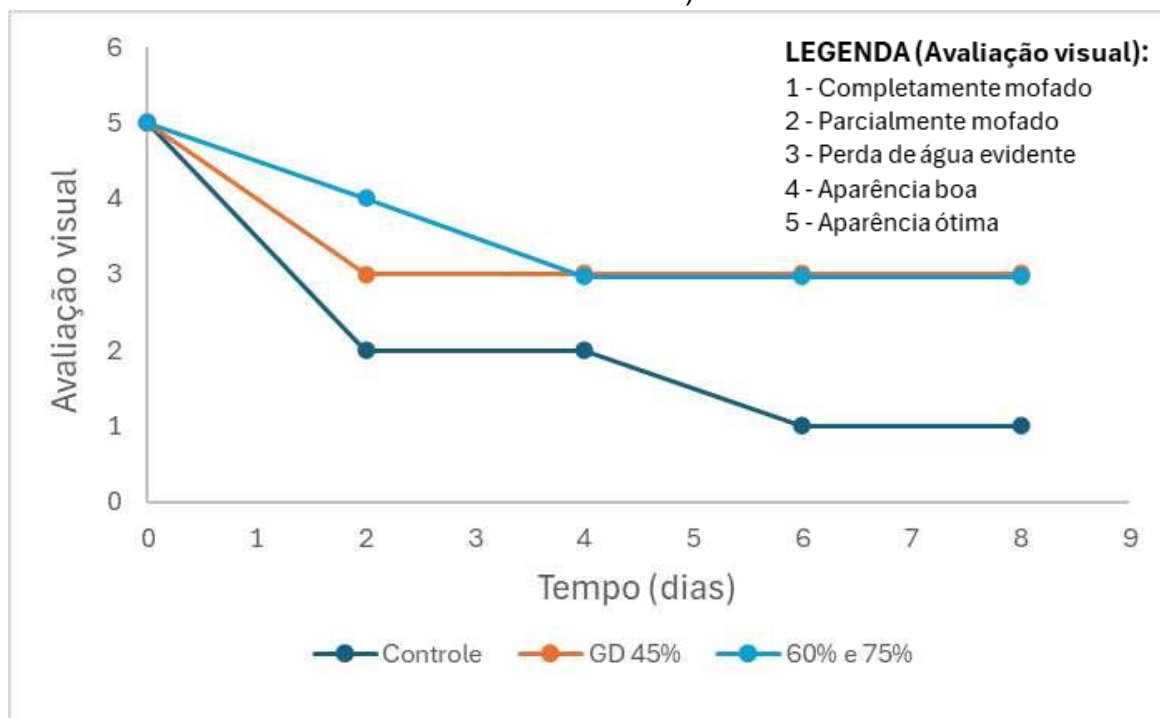
Figura 7 – Aspecto visual de morangos inoculados com *R. stolonifer*

	Controle	45%	60%	75%
Dia 0				



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Gráfico 2 – Avaliação visual dos morangos inoculados com *R. stolonifer* (de acordo com Tabela 1)



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A observação do aspecto visual dos morangos (Figura 7) mostrou que os controles (sem revestimento) apresentaram deterioração fúngica visível logo no 2º dia de exposição. Em contraste, nos morangos tratados com quitosana não houve crescimento do fungo, independente do grau de desacetilação. Nota-se que quanto menor o GD da quitosana, menor o efeito protetor contra a desidratação – morangos revestidos com quitosana de GD 45% apresentaram perda de água já no 2º dia, evidenciada pela redução de volume; a desidratação ficou ainda mais visível no 8º dia, quando encolheram para metade do seu volume original. Por outro lado, morangos revestidos com quitosana nos GD 60% e 75% começaram a desidratar apenas a partir do 4º dia. Quanto às alterações na coloração, todos os morangos tratados passaram de um vermelho para uma coloração mais escurecida a partir do 4º dia.

## 5 DISCUSSÃO

O estudo de biopolímeros com propriedades antimicrobianas para aplicação em embalagens de alimentos vem sendo cada vez mais recorrente. Podem ser derivados de produtos animais (polissacarídeos, proteínas, lipídios), materiais vegetais (celulose, amido, outros polissacarídeos, proteínas), fontes microbianas (dextrana, xantana, pululana) e polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros derivados naturalmente (ácido polilático) (Priyadarshi *et al.*, 2019). Estes biopolímeros oferecem uma alternativa biodegradável para revestir alimentos graças à sua potencial capacidade de formação de filme, contribuindo para a redução do uso de conservantes químicos e de materiais de embalagem não degradáveis (Sharma *et al.*, 2018).

A quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação química da quitina (produto animal) e seu emprego, além de trazer todas estas vantagens, tem o diferencial de proporcionar um destino sustentável aos resíduos gerados pelo processamento de crustáceos. Estima-se que cerca de 6 a 8 milhões de toneladas de lixo de marisco são geradas globalmente a cada ano (FAO, 2019). Estes resíduos (cascas, carapaças, vísceras e água de lavagem e descarte, entre outros) são descartados no meio ambiente, e, por conter altas concentrações de compostos que podem poluir o solo e a água, prejudicam a biodiversidade e a qualidade de vida das comunidades que vivem próximas às áreas de descarte (Rios *et al.*, 2020).

A simplicidade e eficiência da extração química da quitosana fazem com que esse ainda seja o método mais comum usado na indústria. No entanto, este processo apresenta alguns empasses. Para a obtenção de quitosana com alta desacetilação, são necessárias concentrações mais altas de NaOH, gerando custos de produção elevados (Pelletier *et al.*, 1990). Além disso, a remoção do NaOH após a reação gera uma grande quantidade de águas residuais tóxicas (Kim *et al.*, 1997). Foi pensando nestes problemas que o presente trabalho buscou avaliar a influência do grau de desacetilação da quitosana em suas propriedades antimicrobianas - se uma quitosana com GD menor apresentar ação igual ou semelhante a uma quitosana com GD elevado, essa substituição poderia ser mais viável tanto do ponto de vista econômico, como ambiental.

Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são temperatura, tempo

de reação, concentração da solução alcalina e razão quitosana/base (Veiga, 2011). Neste estudo, a reação de desacetilação foi feita com alterações de tempo e temperatura, e os resultados (Tabela 3) mostram que estes parâmetros, de fato, exercem efeito sobre o GD. Com o aumento da temperatura, o GD da quitina aumentou gradualmente. Os maiores GD foram alcançados em temperaturas de até 120 °C e 140 °C. De acordo com Ismail *et al.* (2023), isto pode ser devido ao fato de que as interações moleculares em temperaturas elevadas facilitam a quebra dos grupos acetil, resultando em uma conversão mais significativa da quitina em quitosana. O mesmo ocorreu com o tempo - o GD aumentou progressivamente com o aumento das horas de reação. Contudo, quando o tempo continuou a aumentar, o GD diminuiu, provavelmente porque o aumento excessivo do tempo de reação pode levar à degradação das moléculas de quitosana, afetando o grau de desacetilação (Wen-bo *et al.*, 2011). Portanto, a partir da metodologia empregada, as condições ótimas de temperatura e tempo de reação para alcançar o maior GD foram 140 °C e 3 horas.

Além de permitir alcançar GD maiores, o uso do reator trouxe outro resultado positivo: a redução do desperdício de água. Durante a etapa de lavagem, que é feita após a desacetilação para a remoção do NaOH residual, é necessário um grande volume de água, o que gera bastante preocupação ambiental e econômica (Assis & Brito, 2008). Com o uso do reator, o consumo médio de água caiu pela metade em relação à desacetilação feita em frasco Schott, economizando cerca de 50% de água. Além da economia de água, o reator permitiu obter amostras com GD superior a 54%. De acordo com Hirashi *et al.* (1995), os reatores de aço inoxidável permitem um controle preciso da temperatura, o que é essencial para uma desacetilação eficiente.

No teste para avaliar o efeito protetivo dos revestimentos de quitosana, foi demonstrado que o biogel apresentou uma notável capacidade de preservação, visto que morangos revestidos permaneceram em condições de consumo por mais tempo em comparação aos morangos não revestidos. Provavelmente, este resultado se deve à capacidade do revestimento de quitosana de retardar a respiração, reduzir a produção de etileno, minimizar a perda de umidade, inibir o crescimento microbiano e preservar a cor natural, a textura e a qualidade nutricional dos morangos (Priyadarshi, El-Araby & Rhim, 2024).

Ficou claro ainda o efeito do grau de desacetilação na extensão da vida útil dos frutos, pois morangos tratados com quitosana em GD 45% tiveram seu tempo de conservação dobrado em relação aos frutos não tratados, enquanto morangos revestidos com quitosana nos GD 60% e 75% foram capazes de triplicar este tempo. Esse foi um efeito já esperado, sendo uma das possíveis razões o fato de que a atividade antioxidante da quitosana depende de um grau maior de desacetilação (Priyadarshi, El-Araby & Rhim, 2024). Os grupos amino presentes na quitosana podem reagir diretamente com radicais livres e formar macromoleculares estáveis, evitando a oxidação de nutrientes por radicais livres em morangos (Xie, Xu & Liu, 2001).

*Rhizopus stolonifer* é um dos principais patógenos responsáveis pela deterioração pós-colheita de morangos, levando a perdas significativas durante o armazenamento e transporte (Liu *et al.*, 2024). Dada a ameaça que *R. stolonifer* representa para estes frutos, a avaliação do efeito antimicrobiano da quitosana buscou focar nesta espécie. Os resultados mostraram que o crescimento dos esporos na superfície dos morangos foi retardado pelos tratamentos de quitosana. Enquanto os frutos sem revestimento foram tomados por fungo logo no segundo dia, todos os tratamentos foram capazes de inibir o crescimento fúngico visível durante todo o tempo de observação. Este resultado comprova a atividade antifúngica da quitosana. A principal hipótese para o mecanismo de ação da quitosana se refere aos grupos funcionais amino da estrutura, que geram uma carga líquida positiva sob condições de solução levemente ácidas. Estes grupos interagem com grupos funcionais de carga negativa presentes na superfície das células microbianas, alterando suas principais funções (Benhamou, 1992; Priyadarshi *et al.*, 2024).

Além de comprovar o efeito antifúngico da quitosana, este teste ainda mostrou que GD maiores estão associados a uma melhor proteção contra a dessecação dos frutos. Este efeito pode ser devido ao fato de que o revestimento de quitosana regula as trocas de gás e água entre as frutas e o ambiente, retardando o processo de respiração e prolongando a vida útil. A barreira de proteção formada pelo gel impede a perda de água do fruto, mantendo seu turgor e firmeza (Priyadarshi *et al.*, 2024).

É válido ressaltar que, durante todo o monitoramento, os morangos ficaram expostos a uma temperatura de 22-25 °C. Tendo em vista que temperaturas menores preservam os frutos por mais tempo, se esses experimentos tivessem sido



realizados em ambientes refrigerados, os revestimentos testados poderiam alcançar uma performance ainda melhor. Este é um resultado interessante, particularmente, para aplicações comerciais, pois visando combater *R. stolonifer* e preservar a qualidade do morango, são adotadas estratégias como resfriamento imediato após a colheita, manutenção de baixas temperaturas de armazenamento e minimização de danos aos frutos (Liu *et al.*, 2024 ).

Muitos esforços vêm sendo feitos com o intuito de encontrar métodos de extração de quitosana mais sustentáveis, bem como aprimorar as propriedades funcionais (Priyadarshi, El-Araby & Rhim, 2024). Indo de encontro a esses objetivos, o presente estudo mostrou que GD intermediários (em torno de 50% e 60%), associados a menores custos de produção, são capazes de proporcionar tanto um efeito de preservação como um efeito inibitório contra *Rhizopus stolonifer*, causador da podridão mole em frutos.

As pesquisas atuais estão concentradas em investigar a ação combinada da quitosana com aditivos antimicrobianos, como óleos e extratos naturais, compostos polifenólicos e nanoestruturas, visando alcançar um efeito antimicrobiano mais significativo (Priyadarshi & Rhim, 2020). Portanto, para futuros trabalhos, sugere-se o estudo da quitosana em diferentes GD associada a esses aditivos, visando aumentar a acessibilidade comercial da quitosana e, conseqüentemente, suas possibilidades de aplicação, não apenas em embalagens de alimentos, mas em diversos outros produtos.

## 6 CONCLUSÃO

Em relação ao efeito protetivo da quitosana, foi possível concluir que a desacetilação influenciou diretamente neste aspecto, pois quitosanas mais desacetiladas (GD 60% e 75%) conservaram a qualidade dos morangos por maior tempo em relação à menos desacetilada (GD 45%). Revestimentos com graus de desacetilação intermediários (45% e 60%) foram capazes de prolongar o tempo de vida útil dos morangos, mostrando ter um ótimo efeito protetivo.

Quanto ao efeito inibitório da quitosana contra *Rhizopus stolonifer*, o grau de desacetilação influenciou apenas na desidratação dos frutos, pois a quitosana com o GD menor (45%) foi menos eficiente na proteção contra a perda de água do que as quitosanas com GD maiores. Apesar disso, todos os revestimentos de quitosana foram capazes de proteger os morangos contra o crescimento deste fungo.

Quitosanas menos desacetiladas são atraentes do ponto de vista econômico devido aos altos custos envolvidos no processo de desacetilação. Portanto, os resultados obtidos somados ao caráter biodegradável, natural e atóxico da quitosana tornam os revestimentos à base de quitosana uma alternativa para reduzir o uso de agrotóxicos e substituir embalagens plásticas convencionais de frutas.

## REFERÊNCIAS

- ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource technology*, v. 99, n. 5, p. 1359-1367, 2008.
- ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTER, H. Y.; SOMMER, N. F. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: A. Kader (ed) *Postharvest Technology of horticultural Crops*. 4 ed. University of California. Oakland, California, USA. p. 163-195, 2002.
- ADETUNJI, C. O. et al. Prolonging the shelf life of 'Agege Sweet' orange with chitosan–rhamnolipid coating. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 59, 687, 2018.
- AGRIOS, G. N. *Fitopatología*. 2ª ed. México, Limusa. 856p, 2008.
- ALI, A.; MUHAMMAD, M. T. M.; SIJAM, Y.; SIDIQI, K. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chem.*, 124, pp. 620-626, 2011.
- ALMEIDA, T. L. Desenvolvimento de membrana de quitosana composta de PVAI e quitosana compatível com sistema dermoepidérmico. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo – SP, 2009.
- ASSIS, O.; BRITO, D. Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carnicultura. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 14, n. 1, 2008.
- BOTELHO, T.; MAIA, A. J.; RICKLI, E. H.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R. Quitosana sem controle de *Penicillium* sp na pós-colheita de maçãs. *Revista Brasileira de Agroecologia*.5(2), 200-206, 2010.
- BRASSELET, C.; PIERRE, G.; DUBESSAY, P.; DOLS-LAFARGUE, M.; COULON, J.; MAUPEU, J.; DELATTRE, C. Modification of chitosan for the generation of functional derivatives. *Applied Sciences (Switzerland)* 9, 2019.
- CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*. p. 305–315, 2010.
- CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, v. 33, n. 3, p. 215-221, 2007.
- CENARGEN. Fungos Relatados em plantas no Brasil. Disponível em: <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/micbanco01a.asp>> Acesso em agosto de 2024.
- CHEN, L. et al. Preparation and properties of chitosan/lignin composite films. *Chinese Journal of Polymer Science*, Hackensack, v. 27, n. 05, p. 739–746, 2009.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Biore-source Technology*, 99, 2806-2814, 2008.

COSTA, T. L. E.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, F. K. G.; AROUCHA, M. M.; LEITE, R. H. L. Avaliação de coberturas comestíveis compostas por quitosana e argila sem revestimento em tomates sob refrigeração pelo método dipping. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7(5),12-19, 2012.

CRINI, N. M.; LICHTFOUSE, E.; TORRI, G.; CRINI, G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1667-1692. 2019.

DIAS, M. S. C.; COSTA, H.; CANUTO, R. S. Manejo de doenças do morangueiro. *Informe Agropecuário*, v. 28, n. 236, p. 64-77, 2007.

Embrapa. Podridão mole do morango. Embrapa. Disponível em: [https://www.cnpqv.embrapa.br/uzum/morango/pod\\_mole.html](https://www.cnpqv.embrapa.br/uzum/morango/pod_mole.html). Acesso em: 13 ago. 2024.

FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics, 2019.

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

GOMES, R. V. Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para o uso na biodegradação de hidrocarbonetos. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2007.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 3, p.241-47, 2009.

HAJJI, S.; YOUNES, I.; AFFES, S.; BOUFI, S.; NASRI, M. Optimization of the formulation of chitosan edible coating supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocolloids*. p. 375-392, 2018.

HASSAN, B.; CHATHA, S. A. S.; HUSSAIN, A. I.; ZIA, K. M.; AKHTAR, N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. p. 1095-1107, 2018.

HIROSHI, K.; YUUJI, M.; RYUICHI, M.; NORIKO, M.; EMIKO, K.; TOMITARO, I. *Production of chitosan*, 1995.

HOLANDA, A. L. Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB, 2011.

IMRE, B.; PUKÁSZNKY, B. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. *European Polymer Journal*. v. 49, p. 1215-1233, 2013.

IMRE, B.; GARCÍA, L.; PUGLIA, D.; VILAPLANA, F. Reactive compatibilization of plant polysaccharides and biobased polymers: Review on current strategies, expectations and reality. *Carbohydrate Polymers*. v. 209, p. 20-37, 2019.

ISMAIL, R. et al. Investigating the effect of deacetylation temperature on the characterization of chitosan from crab shells as a candidate for organic nanofluids. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, v. 103, n. 2, p. 55-67, 2023.

JUNIOR, A. F. et al. Nanocompósitos de lactato de quitosana e NPsAg com atividade antimicrobiana. 2021.

KAYA, M.; ČESONIENE, L.; DAUBARAS, R.; LESKAUSKAITE, D.; ZABULIONE, D. Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 355, 2016.

KIM, C. Y. et al. Efeito da desacetilação na sorção de corantes e cromo na quitina. *Journal of Applied Polymer Science*, 1997.

LAFARGA, T.; COLÁS-MEDÀ, P.; ABADÍAS, M.; AGUILÓ-AGUAYO, I.; BOBO, G.; VIÑAS, I. Strategies to reduce microbial risk and improve quality of fresh and processed strawberries: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. p. 197-212, 2019.

LAI, W. et al. Preparação de filme composto de fosfônio quaternário de quitosana/álcool polivinílico reticulado com ácido cítrico e sua aplicação na preservação de morango. *Food Chemistry*, p. 139908, 2024.

LAVORGNA, M. et al. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 291–298, 2010.

LECETA, I.; PENALBA, M.; ARANA, P.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. *European Polymer Journal*. p. 170-179, 2015.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Shitosan kills bactéria through cell membrane damage. *International Journal of Food of Microbiology*, v. 95, p. 147-155, 2004.

LIU, Q.; et al. *Rhizopus stolonifer* and related control strategies in postharvest fruit: A review. *Heliyon*, 2024.

LLANOS, J.; TADINI, C.; GASTALDI, E. New strategies to fabricate starch/chitosan-based composites by extrusion. *Food Eng.* 290 p, 2021.

MACEDO, J. B. et al. Atividade antimicrobiana de quitosanas e seus derivados: Influência das características estruturais. *Química Nova*, v. 45, n. 06, p. 690-704, 2022.

MARTINS, A. F. et al. Atividade antimicrobiana de derivados de quitosana contendo frações N-quaternizadas em sua estrutura: uma revisão. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 11, p. 20800-20832, 2014.

MEDEIROS, G. A. Sandálias de borracha: uma proposta de trabalho temática para o conteúdo de polímeros. Universidade de Brasília, Instituto de Química. Brasília – DF, 2011.

MENG, X.; LI, B.; LIU, J.; TIAN, S. Physiological responses and quality attributes of table grapes fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chem.*, 106, p. 501-508, 2008.

MUJTAB, M.; MORSI, R. E.; KERCH, G.; ELSABEE et al. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, p. 889–904, 2019.

MUNHOZ, D. R. et al. Sustainable Production and in vitro Biodegradability of Edible Films from Yellow Passion Fruit Coproducts via Continuous Casting, *ACS Sustain. Chem. Eng*, 6, p. 9883–9892, 2018.

OLIVEIRA, A. V. et al. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por Leveduras killer Visando Aplicação em Morangos Pós-colheita. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 13, n. 3, p. 353–364, 2011.

OLIVEIRA, C. C.; ANDRADE, F. K.; DRUZIAN, J. I. Quitina e quitosana: Uma revisão sobre suas propriedades químicas, físicas e biológicas. *Química Nova*, 44(4), 427-441. 2021.

PALMA-GUERREIRO, J.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of applied Microbiology*, 104(2), p. 541-553, 2008.

PARK, S. et al. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of food science*, v. 70, n. 4, p. M202-M207, 2005.

PELLETIER, A. I. et al. Transformação de quitina/quitosana por tratamento termo-mecano-químico incluindo caracterização por despolimerização enzimática. *Biotecnologia e Bioengenharia*, 1990.

PINTO, L. R. R. *Stolonifer* apresenta micélio bem desenvolvido, hifas cenocíticas, esporângios escuros sustentados por esporangióforos longos, além de rizóides que fixam a hifa ao substrato. 2013. 63 f. Tese (Mestrado em Ciências - fitopatologia). Universidade de São Paulo. Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2013.

POTIVAS, T.; LAOKULDILOK, T. Deacetylation of chitin and the properties of chitosan films with various deacetylation degrees. *Food Appl. Biosci*, v. 13, p. 559-568, 2014.

PRIYADARSHI, R. et al. Food packaging: Natural and synthetic biopolymers. *Encyclopedia of polymer applications*. 1st ed., pp. 1325–1342, 2019.

PRIYADARSHI, R.; RHIM, J. Filmes funcionais biodegradáveis à base de quitosana para aplicações em embalagens de alimentos. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 62, p. 102346, 2020.

PRIYADARSHI, R.; EL-ARABY, A.; RHIM, J. Chitosan-based sustainable packaging and coating technologies for strawberry preservation: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 134859, 2024.

PRIYADARSHI, R. et al. Advances in strawberry postharvest preservation and packaging: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 23, n. 4, p. e13417, 2024.

QAVAMI, N.; NAGHDI, B. H.; LABBAFI, M.; MEHREGAN, M.; TAVAKOLI, M.; MEHRAFIN, A. Overview on Chitosan as a valuable ingredient and biostimulant in pharmaceutical industries and agricultural products. *Trakia Journal of Science* 15, 83– 91, 2017.

RAMOS-GARCÍA, M. et al. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  in fresh tomatoes. *Crop Protection*, 38, 1-6, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REIS, A.; COSTA, H. *Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle*. 2011.

REYES, J. F. V. et al. Producción de quitosano a partir de desechos de camarón generados del procesamiento industrial. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, v. 4, 2019.

RIOS, F. S. et al. Crustacean waste generation and disposal: Environmental and public health impacts. *Journal of Environmental Management*, 267, 110563, 2020.

RIVERA, C. G. *Conceptos introductorios a la fitopatología*. Primera reimpressão: editorial universidad estatal a distancia san José Costa Rica, 2007. p 44-45, 1999.

ROMANAZZI, G.; MOUMNI, M. Chitosan and other edible coatings to extend shelf life, manage postharvest decay, and reduce loss and waste of fresh fruits and vegetables *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 78, 102834, ISSN 0958-1669, 2022.

ROSENDO, R. *Desenvolvimento e Caracterização de Scaffolds de Quitosana/ Cissus verticillata (L.)*. Tese de D.Sc., PPGCEMat./UFCG, Campina Grande, PB, Brasil, 2016.

SHARMA, B.; MALIK, P.; JAIN, P. Biopolymer reinforced nanocomposites: A comprehensive review. *Materials Today Communications*. 16:353-63, 2018.

SHIT, S. C.; SHAH, P. M. Edible polymers: challenges and opportunities. *Journal of Polymers*, 2014.

SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química nova*, v. 29, p. 776-785, 2006.

SILVA, S. M., et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Scientific World Journal*, 2018.

SOUZA, R. H. F. V. Síntese, caracterização e estudo de derivados anfífilos de quitosana: estudo in vitro contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. São José do Rio Preto, 2013.

SOUZA, J. Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de tecidos. 144f, 2017.

SUSENO, N.; SAVITRI, E.; SAPEI, L.; PADMAWIJAYA, K. S. Improving Shelf-life of Cavendish Banana Using Chitosan Edible Coating. *Procedia Chemistry*, 9, p. 113, 2014.

TAKAHASHI, T. et al. Efeito inibitório do crescimento em bactérias de membranas de quitosana reguladas com grau de desacetilação. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, n. 3, p. 485-491, 2008.

TSAI, G. J.; HWANG, S. P. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisheries Science*, v. 70, p. 675-681, 2004.

VALENZUELA, C.; ARIAS, J. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal. *Avan. Cien. Veter.*, 27: 33-47. 2012.

VEIGA, S. C. P. Estudos físico-químicos de N-acetilação de quitosanas em meio homogêneo. São Carlos, 2011.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. Atividade antioxidante de derivados de quitosana solúveis em água. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 13, p. 1699-1701, 2001.

XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 35, 569– 588. 2015.

WEN-BO, L.; CHAO, T.; XIN-AN, Z. Chitosan Degradation by Pulsed Electric Field in Acetic Acid Homogeneous Phase. *Food Science*, 2011.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*. MDPI AG, 2015.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Rev.*, 2, 204, 2015.

ZERPA, J. M.; RINCÓN, M. C.; RINCÓN, D.; COLINA, J. A. V. Efecto del uso de quitosano en el mejoramiento del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L. variedad sd20a). *Revista de investigación agraria y ambiental*, 8(2), 151-165, 2017.