



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

IHASMYN DOS SANTOS NUNES

**NANOCOMPÓSITO QUITOSANA-GOMA ARÁBICA-ÓLEO DA SEMENTE DO
MARACUJÁ (*Passiflora edulis f. flavicarpa*): BIOTECNOLOGIA
ECOSUSTENTÁVEL PARA OBTENÇÃO DE PRODUTO NATURAL
ANTIFÚNGICO**

**RECIFE
2021**

IHASMYN DOS SANTOS NUNES

**NANOCOMPÓSITO QUITOSANA-GOMA ARÁBICA-ÓLEO DA SEMENTE DO
MARACUJÁ (*Passiflora edulis f flavicarpa*): BIOTECNOLOGIA
ECOSUSTENTÁVEL PARA OBTENÇÃO DE PRODUTO NATURAL
ANTIFÚNGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia,
Bioprocessos e Bioprodutos,

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia M. Stamford.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Thayza C. M. Stamford.

**RECIFE
2021**

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Nunes, Ihasmyn dos Santos

Nanocompósito quitosana-goma arábica-óleo da semente do maracujá (*Passiflora edulis f flavicarpa*): biotecnologia ecosustentável para obtenção de produto natural antifúngico/ Ihasmyn dos Santos Nunes – 2021.

106 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Tânia Lúcia M. Stamford

Coorientadora: Thayza C. M. Stamford

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndice.

1. Nanotecnologia 2. Maracujá 3. Resíduos industriais I. Stamford, Tânia Lúcia M. (orient.) II. Stamford, Thayza C. M. (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-283

IHASMYN DOS SANTOS NUNES

**NANOCOMPÓSITO QUITOSANA-GOMA ARÁBICA-ÓLEO DA SEMENTE DO
MARACUJÁ (*Passiflora edulis f flavicarpa*): BIOTECNOLOGIA
ECOSUSTENTÁVEL PARA OBTENÇÃO DE PRODUTO NATURAL
ANTIFÚNGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 31/08/2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia M. Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Natália Ferrão Castelo Branco Melo
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

*A Deus fonte de toda iluminação...
Aos meus pais, Inácio e Lindinalva e ao meu irmão,
Inhayan pelo apoio incondicional, amizade e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive na minha vida e pelas graças alcançadas.

Agradeço aos meus pais, Inácio Nunes e Lindinalva Gomes, e ao meu irmão, Inhayan Nunes pelo amor, carinho, formação moral e educação ofertada a mim. Por tudo que fizeram sem medir esforços.

Ao meu esposo, Roberto Farias, pelo incentivo, encorajamento, amor e compreensão diários.

À minha cunhada, Hortência Farias, pela inspiração, apoio, sugestões e disponibilidade.

À minha sogra, Enilda Farias, pelas orações e carinho de sempre.

À minha orientadora, Professora Dr^a. Tânia Montenegro Stamford e minha coorientadora, Professora Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford, pela confiança em mim depositada, pelos conselhos, orientações, atenção e incentivo na realização deste trabalho.

À então chefe do Departamento de Química Fundamental, Professora Dr^a. Claudete Fernandes e ao chefe da Central Analítica do mesmo departamento, Professor Dr. Jorge Luiz Neves, por terem autorizado a realização deste curso, bem como aos queridos companheiros/amigos da Central Analítica (Abene, Dayse, Elaine, Elias, Eliete, Maria da Conceição, Natália, Pablo e Severino) pelo auxílio na realização das análises de caracterização dos materiais, e pelo incentivo e suporte a mim ofertado nos períodos em que eu precisei me ausentar para assistir às aulas.

À Professora Dr^a. Nereide Santos pela oportunidade de realização de parte deste trabalho em seu laboratório. À equipe do laboratório de Bioquímica, em especial, à Professora Dr^a. Rafaela Ferraz por ter me acolhido, pela paciência, pelo carinho e

pelos ensinamentos científicos que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marcos Lima da UFRPE pela sua disponibilidade em ajudar e orientações valiosas nas análises microbiológicas.

À Professora Dr^a Daniela Navarro e ao técnico Júlio César Aguiar pela disponibilidade e auxílio na caracterização do óleo da semente do maracujá.

Aos técnicos e alunos do Laboratório de Terras Raras do Departamento de Química Fundamental (UFPE), do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA (UFPE) e do Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (UFRPE) pela ajuda na realização das análises de caracterização dos materiais.

Aos amigos do LAMAp, Alberto, Alessandra, Camyla, Gerlane e Natália, pela ajuda na realização dos experimentos, especialmente à Alessandra pelo encorajamento e pelas atitudes positivas nos momentos mais difíceis.

Aos membros da banca pelas contribuições para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPE pela oportunidade cedida para obtenção do título de mestre. A Klayton Cabral pela disponibilidade e atenção sempre que precisei dos serviços da Secretaria da Pós-Graduação.

À FACEPE e ao CNPq pela concessão de financiamento para a execução da pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O processamento do maracujá gera toneladas de resíduos com repercussão ambiental. A semente do maracujá é rica em compostos bioativos com características antioxidante e antimicrobiana, tornando-se uma fonte alternativa para obtenção de produtos funcionais. O objetivo deste trabalho consistiu em preparar e caracterizar nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo óleo da semente de maracujá (NP-OSM) e avaliar a atividade antifúngica do sistema frente aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum siamense* e *Aspergillus niger*. O óleo da semente do maracujá (OSM) teve sua composição previamente determinada através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O OSM foi incorporado às nanopartículas de quitosana-goma arábica (NP) a partir de uma abordagem em duas etapas: emulsificação seguida de coacervação complexa. As propriedades físico-químicas das NP-OSM foram investigadas pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e termogravimetria/calorimetria exploratória diferencial (TGA/DSC). As atividades antifúngicas *in vitro* do OSM, das NP e das NP-OSM foram determinadas através das análises das concentrações inibitórias mínimas e das alterações morfológicas nos fungos. A atividade antifúngica *in vivo* das NP-OSM, por sua vez, foi avaliada pela aplicação de cobertura à base de NP-OSM em morangos previamente contaminados com *Aspergillus niger*. As NP-OSM apresentaram estrutura densa e esférica, e seus tamanhos variaram entre $213,6 \pm 28,4$ e $297,8 \pm 118,9$ nm. As análises de FTIR e TGA/DSC confirmaram o sucesso da encapsulação. As NP-OSM apresentaram atividade antifúngica contra ambos os fungos avaliados, sendo capazes de causar danos severos às hifas dos mesmos. A cobertura comestível à base de NP-OSM reduziu notavelmente a infecção fúngica visível em morangos armazenados sob refrigeração ($10 \pm 2^\circ\text{C}$) por 12 dias em 40%, tornando-se uma alternativa para o controle de infecções fúngicas com aplicações na agricultura e na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Fruticultura. Atividade antifúngica. Resíduos industriais. Compostos bioativos. Nanotecnologia.

ABSTRACT

The processing of passion fruit generates tons of waste with environmental repercussions. Passion fruit seed is rich in bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial characteristics, which makes it an alternative source for obtaining functional products. Therefore, the aim of this research was to prepare and characterize chitosan-gum arabic nanoparticles containing passion fruit seed oil (NP-OSM) and to evaluate the antifungal activity of the system against phytopathogenic fungi *Colletotrichum siamense* and *Aspergillus niger*. The composition of passion fruit seed oil (OSM) was previously determined through the technique of gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). OSM was incorporated into nanoparticles using a two-step approach: emulsification followed by complex coacervation. The physicochemical properties of NP-OSM were investigated by dynamic light scattering (DLS), Fourier transform infrared (FTIR), Scanning and Transmission electron microscopy (SEM and TEM) and thermogravimetry/calorimetry differential exploratory techniques (TGA/DSC). The *in vitro* antifungal activities of OSM, NP and NP-OSM were determined by analyzing minimal inhibitory concentrations and morphological changes in fungi. The *in vivo* antifungal activity of NP-OSM was evaluated by applying NP-OSM based coating to strawberries previously contaminated with *Aspergillus niger*. The NP-OSM showed a dense and spherical structure, and their sizes varied between 213.6 ± 28.4 and 297.8 ± 118.9 nm. FTIR and TGA/DSC analyzes confirmed the success of encapsulation. The NP-OSM showed antifungal activity against both fungi, being able to cause severe damage to their hyphae. NP-OSM based edible coating notable reduced the visible fungal infection in strawberries stored under refrigeration ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$) for 12 days by 40%, becoming an alternative to control fungal infections with applications in agriculture and food industry.

Keywords: Fruit growing. Antifungal activity. Industrial waste. Bioactive compounds. Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diferentes formas de nanopartículas: nanocápsulas (a) e nanoesferas (b).	24
Figura 2 -	Estrutura da quitina e da quitosana.	26
Figura 3 -	Grupos funcionais da molécula de quitosana.	28
Figura 4 -	Estrutura da goma arábica.	34
Figura 5 --	Esquema da interação entre quitosana e goma arábica.	37
Figura 6 -	Imagens das nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) - barras de escala representam 2 μm (a) e 1 μm (b) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) - barras de escala representam 1 μm (c) e 200 nm (d).	58
Figura 7 -	Espectros de infravermelho obtidos para a quitosana (QUI —), goma arábica (GA —), óleo da semente do maracujá (OSM —), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP —) e nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM —).	59
Figura 8 -	Termogramas (TG e DTG) obtidos para a quitosana (QUI —), goma arábica (GA —), óleo da semente do maracujá (OSM —), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP —) e nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM —).	62
Figura 9 -	Termogramas (DSC) obtidos para a quitosana (QUI —), goma arábica (GA —), óleo da semente do maracujá (OSM —), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP —) e nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM —).	65
Figura 10 -	Microscopia eletrônica de varredura de <i>C. siamense</i> . Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente do maracujá (2,25 mg/mL) (b), a nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (0,50 mg/mL) (c) e a nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (2,25 mg/mL e 1,5 mg/mL do material de parede) (d). As setas indicam: depressões (→), regiões de achatamento das hifas (→), pontos de inchaço (→), superfície enrugada (→), hifas com diâmetros distintos (→) e deposição de material (→).	71

- Figura 11 -** Microscopia eletrônica de varredura de *A. niger*. Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente do maracujá (3,0 mg/mL) (b), a nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (2,0 mg/mL) (c) e a nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (3,0mg/mL e 2 mg/mL do material de parede) (d). As setas indicam: superfície enrugada (→) e deposição de material (→). 73
- Figura 12 -** Aparência dos morangos previamente infectados com *A. niger* após 12 dias de armazenamento sob refrigeração: controle (sem cobertura) (a), recoberto com glicerol 2,5% (v/v) (b), recoberto com NP-OSM na concentração inibitória mínima (c). 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Aplicações recentes de nanopartículas de quitosana como carreadoras de compostos bioativos em alimentos.	31
Tabela 2 -	Composição das formulações.	42
Tabela 3 -	Esquema de preenchimento da placa de 96 poços.	47
Tabela 4 -	Composição percentual de ácidos graxos do óleo da semente do maracujá.	50
Tabela 5 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos no dia 0 para cada uma das formulações.	52
Tabela 6 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos durante 60 dias de estudo para cada uma das formulações.	55
Tabela 7 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos para a formulação NP-OSM antes e após liofilização utilizando crioprotetores.	57
Tabela 8 -	Atribuição das bandas do infravermelho dos materiais puros.	61
Tabela 9 -	Concentração inibitória mínima (CIM) (mg/mL).	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEASA/PE	Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco
CIM	Concentração inibitória mínima
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Espalhamento dinâmico da luz)
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> (Calorimetria exploratória diferencial)
FAO	<i>Food and Agriculture Administration of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i> (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos)
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)
GC-FID	<i>Gas chromatography with flame ionization detector</i> (cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização pela chama)
GC-MS	Gas chromatography with mass spectrometry (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> (Geralmente reconhecido como seguro)
LIKA	Laboratório de imunopatologia Keizo Asami
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NP	Nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica
NP-OSM	Nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo óleo da semente do maracujá
OSM	Óleo da semente do maracujá
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de ionização ácida
TGA	Análise termogravimétrica
TPP	Tripolifosfato pentassódico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1	ÓLEO DA SEMENTE DO MARACUJÁ.....	20
3.2	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E PERDAS PÓS-COLHEITA.....	22
3.3	NANOENCAPSULAÇÃO.....	24
3.4	QUITOSANA.....	25
3.5	GOMA ARÁBICA.....	33
3.6	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS: COACERVAÇÃO COMPLEXA..	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	MATERIAIS.....	39
4.2	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA SEMENTE DO MARACUJÁ.....	39
4.2.1	Derivatização para ésteres metílicos de ácidos graxos.....	39
4.2.2	Análise cromatográfica por GC-MS dos ésteres metílicos de ácidos graxos.....	40
4.3	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS.....	41
4.4	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM).....	41
4.5	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.....	42
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	43
4.6.1	Aspectos macroscópicos.....	43
4.6.2	Análise do tamanho de partícula e potencial zeta.....	43

4.6.3	pH.....	44
4.6.4	Morfologia.....	44
4.6.5	Estrutura química.....	45
4.6.6	Propriedades térmicas.....	45
4.7	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	46
4.7.1	Preparação do inóculo.....	46
4.7.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	46
4.7.3	Efeito das substâncias testes sobre a morfologia fúngica.....	48
4.7.4	Atividade antifúngica <i>in vivo</i> : bioatividade de cobertura comestível sobre o crescimento fúngico em morangos (<i>Fragaria x ananassa Duch.</i>).....	48
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ.....	50
5.2	NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM).....	51
5.3	ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ (NP- OSM).....	54
5.4	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.....	56
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	57
5.5.1	Morfologia.....	57
5.5.2	Estrutura química.....	58
5.5.3	Propriedades térmicas.....	61
5.5.4	Atividade antifúngica.....	66
5.5.4.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	66
5.5.4.2	Efeito das substâncias testes sobre a morfologia fúngica.....	70
5.5.4.3	Bioatividade antifúngica <i>in vivo</i> : bioatividade de cobertura comestível sobre o crescimento fúngico em morangos (<i>Fragaria x</i>	75

	<i>ananassa Duch.</i>).....	
6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES.....	98

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o posto de maior produtor mundial de maracujá (nome popular que recebem várias espécies do gênero *Passiflora*) e o maior exportador de suco concentrado da fruta. Essa produção resulta na geração de grandes quantidades de resíduos (cascas, bagaços e sementes), ou seja, partes da matéria-prima não utilizadas no processamento, representando um grande entrave da indústria alimentícia (COELHO; AZÊVEDO; UMSZA-GUEZ, 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

O número de estudos reportados na literatura relacionados à extração de compostos de fontes naturais, principalmente de resíduos gerados no processamento de alimentos, bem como de produtos agrícolas subutilizados, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (FREITAS et al., 2021). Estes resíduos podem ser fontes promissoras de compostos com aplicação em diversos nichos industriais e tecnológicos, proporcionando benefícios econômicos, além de gerar mudanças significativas quanto aos riscos ambientais em produções ecologicamente sustentáveis (GUALBERTO et al., 2021; KHALITH et al., 2022; MÁRMOL et al., 2021; VODNAR et al., 2017). A presença de bioativos em sementes de frutas permite que esses resíduos industriais sejam transformados em fontes alternativas de óleos com propriedades funcionais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, entre outras (MARTIN et al., 2020; MELO et al., 2019; PEREIRA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2021). E, assim sendo, surge como alternativa para o aproveitamento biotecnológico das sementes.

As infecções causadas por microrganismos constituem um dos principais problemas enfrentados pela cadeia produtiva de frutas, vegetais e grãos, uma vez que reduzem a qualidade do fruto e a quantidade disponível para comercialização, levando a perdas econômicas. Os fungos são responsáveis por cerca de 75% das infecções causadas por patógenos, com destaque para os gêneros *Aspergillus* e *Colletotrichum*, causadores das doenças conhecidas como mofo-preto e antracnose, respectivamente, que acometem morangos, uvas, tomates e frutas tropicais e geram perdas econômicas significativas em seus cultivos (MATROSE et al., 2020; ROBERTO et al., 2019; SINGH; SHARMA, 2018). O uso crescente de fungicidas químicos no controle dessas infecções pode resultar em níveis de exposição elevados, tanto a curto como em longo prazo, para os humanos, bem como sua

liberação em quantidades substanciais no meio ambiente pode impactar ecossistemas terrestres e aquáticos, além de contribuir para o surgimento de cepas resistentes, o que diminui a eficiência dos tratamentos existentes. Diante disso, pesquisadores têm buscado alternativas naturais que sejam seguras e eficazes que possam preservar a qualidade das frutas e prolongar seu tempo de vida útil (ROBERTO et al., 2019; ROMANAZZI et al., 2016)

Diversos estudos têm relatado a atividade antimicrobiana de óleos vegetais frente a um amplo espectro de microrganismos, inclusive bactérias e fungos fitopatogênicos (DABETIC et al., 2020; KARAOSMANOGLU et al., 2010; MEDINA et al., 2013; MEKAWI; KHAFAGI; ABDEL-RAHMAN, 2019). A capacidade de inibir o crescimento de microrganismos dos óleos vegetais é atribuída principalmente à ação de ácidos graxos e compostos fenólicos presentes em sua composição (DABETIC et al., 2020; NAZZARO et al., 2019). No entanto, ácidos graxos essenciais presentes nos óleos, a exemplo dos ácidos linoleico e linolênico (ômega 6 e ômega 3, respectivamente), são susceptíveis a reações de oxidação e degradação, principalmente na presença de luz, oxigênio e umidade (SOARES et al., 2019; JURIC et al., 2020). Assim, a micro/nanoencapsulação é uma das principais estratégias utilizadas na indústria para minimizar tais efeitos degradativos durante o processamento, distribuição e armazenamento (TIMILSENA et al., 2017).

Os materiais de parede desempenham uma função importante em sistemas de encapsulação, pois além de protegerem os compostos bioativos, determinam a estabilidade e as características das nanossistemas resultantes (DELSHADI et al., 2020; KEDIA; DUBEY, 2018). A encapsulação de compostos bioativos, em especial de óleos vegetais e essenciais, em matrizes biopoliméricas têm apresentado resultados promissores (ATTALLAH, 2020; CAMPO et al., 2017; SUN et al., 2021).

A quitosana, copolímero randômico formado pelas unidades de repetição glucosamina e N-acetil-glucosamina, é um polissacarídeo produzido principalmente a partir da quitina presente no carapaça de crustáceos e moluscos, no exoesqueleto e estruturas internas de insetos e na parede celular de alguns fungos, é um polímero atóxico, biocompatível e biodegradável (KUMAR et al., 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017)(KUMAR et al., 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). Este biopolímero apresenta propriedades peculiares, que vêm sendo estudadas em

aplicações médicas, industriais e tecnológicas. A goma arábica (ou goma acácia) é um agente encapsulante bastante utilizado, principalmente por apresentar características específicas de biocompatibilidade, boa formação de filme e propriedade emulsificante (AVADI et al., 2010)

Estudos sobre nanossistemas contendo apenas constituintes naturais como agente antimicrobiano ainda são limitados. Mediante o exposto, o objetivo desse trabalho consiste em preparar e caracterizar nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo óleo da semente de maracujá encapsulado e avaliar a atividade antifúngica desse sistema.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Preparar e caracterizar nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo óleo da semente do maracujá e avaliar a atividade antifúngica do sistema.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição em ácidos graxos livres do óleo da semente do maracujá (OSM);
- Preparar nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica e nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo óleo da semente do maracujá;
- Caracterizar as nanopartículas brancas e as nanopartículas contendo o óleo quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, morfologia, estrutura química e comportamento térmico;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas contendo o óleo;
- Avaliar o processo de liofilização das nanopartículas contendo o óleo utilizando diferentes crioprotetores;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo da semente do maracujá, das nanopartículas brancas e das nanopartículas contendo o óleo frente a cepas de fungos fitopatogênicos *Colletotrichum siamense* e *Aspergillus niger*;
- Avaliar a bioatividade de cobertura comestível a base de nanopartículas contendo o óleo;

3 REVISÃO BIBLOGRÁFICA

3.1 ÓLEO DA SEMENTE DO MARACUJÁ

O maracujá, nome popular de diversas espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*, é vastamente distribuído no continente americano, nos mais diversos habitats e condições climáticas (LUCARINI et al., 2019). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), o que evidencia a importância dessa atividade para a geração de renda e o desenvolvimento do agronegócio nacional (ARAUJO et al., 2020). Em 2019, a produção brasileira de maracujá foi de 593.429 toneladas, sendo as regiões Nordeste, Sudeste, Norte, Sul e Centro-oeste responsáveis por 64%, 15%, 7%, 11% e 2% da produção, respectivamente. Em Pernambuco, pode-se destacar a Mesorregião do São Francisco, responsável por mais de 50% da produção do estado (IBGE, 2019).

Embora consumido *in natura*, a maior parcela da produção do maracujá é direcionada para a indústria, onde são processados para a fabricação de polpas, doces em conservas e suco concentrado da fruta, sendo este último, o produto com maior impacto econômico no mercado do maracujá (ARAUJO et al., 2020). Holanda, Estados Unidos, Porto Rico, Japão e Alemanha são os principais importadores de suco concentrado de maracujá produzido no Brasil e juntos respondem pela compra de cerca de 76% da produção (COELHO; AZÊVEDO; UMSZA-GUEZ, 2016).

As sementes correspondem entre 4 e 12% do peso total do maracujá (ARAUJO et al., 2020). Esse percentual, quando aplicado sobre as toneladas de maracujá processadas anualmente na indústria, reflete a grande geração de resíduos do segmento. A semente do maracujá é rica em ácidos graxos, fitoesteróis, tocoferóis, compostos fenólicos e carotenoides, podendo ser utilizada como fonte alternativa de óleos com propriedades funcionais antioxidantes e antimicrobianas. Este tipo de reaproveitamento pode contribuir para a redução do impacto ambiental causado pela destinação inadequada dos subprodutos, bem como para a agregação de valor à cadeia produtiva do maracujá (COELHO; AZÊVEDO; UMSZA-GUEZ, 2016; REGIS; RESENDE; ANTONIASSI, 2015).

Os métodos utilizados para a extração de óleo a partir de sementes podem ser agrupados em convencionais, que incluem prensagem mecânica e extração com solventes, e alternativos, como extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico e extração com fluido comprimido (OLIVEIRA et al., 2016). Cada processo gera óleos com composições variadas, rendimentos de extração diferenciados e características de estabilidade distintas. A seleção do método mais apropriado para a extração deve ainda levar em consideração critérios como a necessidade de pré-tratamento da matéria-prima, o resíduo sólido gerado, o objetivo de aplicação e as características do óleo (SAMPAIO NETO; BATISTA; MEIRELLES, 2018).

Apesar de apresentar algumas desvantagens como a perda de compostos bioativos e redução da vida de prateleira dos óleos, devido à exposição à luz e oxigênio, a prensagem a frio continua sendo um dos métodos mais utilizados na extração de óleos (ARAUJO et al., 2020). É considerado um método bastante vantajoso do ponto de vista ambiental por não requerer solventes, além de ser de baixo custo e não causar degradação térmica dos compostos dos óleos (OLIVEIRA et al., 2016).

As sementes do maracujá já são utilizadas na produção de óleo tanto na indústria alimentícia, como na indústria de cosméticos. Nesta última de forma mais expressiva (BARRALES; REZENDE; MARTÍNEZ, 2015; FERREIRA et al., 2011). Na indústria de cosméticos, o óleo da semente do maracujá apresenta diversas aplicações, sendo utilizado em formulações de sabonetes, cremes, xampus e loções. O ácido linoleico (família ômega-6) presente no óleo contribui para a restauração da camada lipídica da pele, proporcionando hidratação e emoliência (PIANOVSKI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2021). Além disso, a presença de antioxidantes, tais como compostos fenólicos, permite que o óleo da semente de maracujá seja utilizado na prevenção de danos à pele causados pela radiação solar e do envelhecimento precoce (KRAMBECK et al., 2020; YAMAMOTO et al., 2016; YEPES et al., 2021).

O alto teor de ácidos graxos insaturados (superior a 85%) do óleo da semente do maracujá justifica o seu alto valor nutricional, apresentando qualidade equivalente à de outros óleos comestíveis, como óleo de soja, de girassol e de milho (LUCARINI et al., 2019). Seus principais ácidos graxos são: ácido linoleico (aproximadamente

51-73%), ácido oleico (13-21%), ácido palmítico (8-15%) e ácido linolênico (0-0,56%) (LIMA; XAVIER-JÚNIOR; STAMFORD, 2020; LUCARINI et al., 2019).

Os ácidos graxos poli-insaturados linoleico e linolênico, pertencentes às famílias ômega-6 e ômega-3, respectivamente, estão relacionados a diversas funções, em diferentes fases da vida humana. Por exemplo, atuam no desenvolvimento dos sistemas nervoso e imunológico, na regulação de expressão gênica; reduzem o colesterol e previnem doenças cardiovasculares fatais, diabetes, hipertensão, entre outras enfermidades (AYYILDIZ et al., 2015; SOARES et al., 2019; MARANGONI et al., 2020). Estes ácidos graxos são classificados como ácidos graxos essenciais, e devem ser obtidos por dieta, uma vez que o organismo humano não é capaz de sintetizá-los.

Estudos anteriores também indicam a semente do maracujá e o seu óleo como potencial alimento funcional, devido à sua ação antioxidante e antibacteriana frente a tanto cepas gram-negativas como gram-positivas, para este último grupo de forma mais eficiente (OLIVEIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2019; PUROHIT et al., 2021), sendo esta propriedade atribuída à presença de ácidos graxos e compostos fenólicos, principalmente flavonoides, já citados, e carotenoides, fitoesteróis e tocoferóis (DABETIC et al., 2020; NAZZARO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2019).

3.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E PERDAS PÓS-COLHEITA

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estima que um terço da produção mundial de alimentos destinados para consumo humano, o que equivale a aproximadamente 1,3 bilhões de toneladas, seja perdido anualmente (FAO, 2011).

Frutas e vegetais (F&V) constituem uma das categorias de alimentos com maiores percentuais de perdas ao longo da sua cadeia produtiva (FAO, 2019). F&V são organismos vivos, que mantêm seu metabolismo ativo mesmo após a colheita. São altamente perecíveis devido à elevada susceptibilidade à desidratação, danos mecânicos e deteriorações microbianas, que resultam na redução da sua qualidade

e da sua vida de prateleira, bem como em perdas econômicas substanciais (JAFARZADEH et al., 2021; NAIR et al., 2020). As infecções fúngicas são reconhecidas como a principal causa de perdas pós-colheita de frutas. Dentre os principais fungos fitopatogênicos, podem-se destacar os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Penicillium*, entre outros (HERNÁNDEZ et al., 2021; MATROSE et al., 2020).

A antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é uma das infecções mais comuns que afetam diversos cultivos de importância econômica (DINAH et al., 2018). A espécie *gloesporioides* é considerada a principal causadora da antracnose. No entanto, estudos filogenéticos recentes identificaram outras espécies, a incluir *C. chrysophilum*, *C. fragariae*, *C. fruticola*, *C. gloesporioides stricto*, *C. queenslandicum*, *C. tropicale* e *C. siamense*, associadas à antracnose em frutas como caju e manga cultivadas no Brasil (LIMA; LIMA, 2015; VELOSO; MARCOS; DOYLE, 2018). *Aspergillus niger*, espécie mais importante do gênero *Aspergillus*, além de causar a infecção conhecida como mofo-preto, que se caracteriza pelo amolecimento e escurecimento do tecido do fruto infectado e desenvolvimento de um micélio escuro, pode produzir micotoxinas nocivas à saúde do consumidor (BARRETO et al., 2016; WANG et al., 2015).

A estratégia comumente utilizada no manejo destas doenças em frutos é aplicação de fungicidas químicos sintéticos. No entanto, esses produtos encarecem o custo de produção e seu uso indiscriminado pode causar efeitos negativos sobre os animais, humanos e o meio ambiente, além de reduzir sua eficiência ao induzir a resistência de patógenos de plantas, o que gera a necessidade de se introduzir novos produtos ou utilizar doses mais altas dos produtos já existentes (FORTUNATI; MAZZAGLIA; BALESTRA, 2019; MALERBA; CERANA, 2019).

Apesar de existirem trabalhos que comprovam a ação antibacteriana do óleo da semente de maracujá, estudos relacionados à atividade antifúngica do óleo não foram identificados até o momento. Além disso, sua baixa solubilidade em água e seu alto grau de instauração, que o torna susceptível a reações de deterioração, limitam aplicação de forma direta do óleo da semente de maracujá em diferentes produtos (VASKOVA; BUCKOVA, 2015).

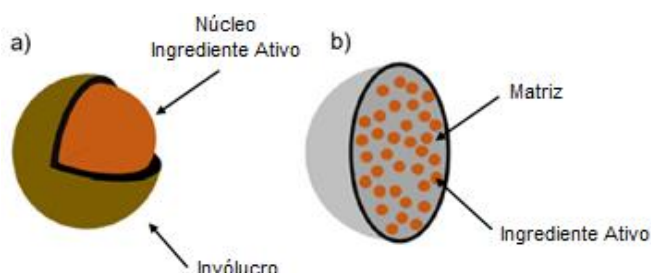
3.3 NANOENCAPSULAÇÃO

A encapsulação consiste em envolver absorver ou dispersar uma ou mais substâncias em estado sólido, líquido ou gasoso, em uma matriz homogênea ou heterogênea (ASSADPOUR; JAFARI, 2018; GHARANJIG et al., 2020; TIMILSENA et al., 2017).

O termo nanoencapsulação se refere ao encapsulamento em cápsulas ou vesículas pequenas em escala nanométrica (CARRILLO-INUNGARAY, M. ET AL., 2016). Embora algumas legislações, principalmente da área farmacêutica e de cosméticos, considerem que um material para que seja considerado em escala nanométrica deve ter dimensões entre 1 e 100 nm, o prefixo nano é comumente utilizado para partículas com várias centenas de nanômetros (ASSADPOUR; JAFARI, 2018; RODRÍGUEZ et al., 2016).

Nanopartículas ou nanocarreadores esféricos podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas consistem em vesículas onde o composto bioativo é encapsulado dentro de uma cavidade que consiste em um núcleo líquido interno, circundado por uma membrana polimérica. E as nanoesferas apresentam o bioativo uniformemente disperso em uma matriz (ASSADPOUR; JAFARI, 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Diferentes formas de nanopartículas: nanocápsulas (a) e nanoesferas (b).



Fonte: Adaptado de Raza et al. (2020).

Nanopartículas (bem como os nanomateriais de uma forma geral) podem exibir propriedades químicas, físicas, ópticas e biológicas (por exemplo, solubilidade, absorção, cor, transparência, atividade catalítica, atividade antimicrobiana) únicas e/ou melhoradas quando comparados aos seus correspondentes em tamanho maior

(SAIFI; KHAN; GODUGU, 2018; SUDHA et al., 2018). Este comportamento é atribuído principalmente ao aumento da razão entre área superficial e volume das nanopartículas, o que contribui para o aumento da reatividade química das mesmas, uma vez que também as tornam mais disponíveis para interagir com outras moléculas, partículas, sistemas e células (NASEER et al., 2018; SAIFI; KHAN; GODUGU, 2018).

Apesar de o principal objetivo da incorporação de compostos bioativos em nanopartículas ser a proteção destes contra fatores intrínsecos e extrínsecos, (umidade, temperatura, luz, oxigênio, degradação enzimática, pH), a redução do tamanho das partículas e o aumento da área superficial e da reatividade das mesmas, proporcionam também bons resultados em relação ao aumento da solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e liberação controlada de compostos encapsulados (JAFARI, 2017; PRAKASH et al., 2018).

É importante destacar que na indústria de alimentos é essencial a utilização de materiais aprovados para consumo humano (os chamados *food grade*) ou para contato com alimentos. Além disso, estes materiais precisam ser resistentes às condições de processamento, armazenamento e utilização (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020). O potencial de aplicação das nanopartículas depende ainda de fatores como a concentração utilizada, o formato e o tamanho das partículas (Yang et al., 2010).

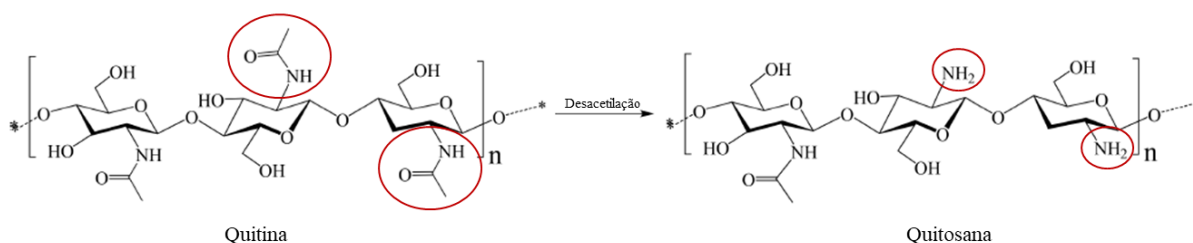
3.4 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo semicristalino linear, derivado da desacetilação parcial da quitina, homopolímero abundante formando por resíduos de β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina (Figura 2). A quitina é sintetizada por um grande número de organismos, desempenhando um papel estrutural no exoesqueleto de crustáceos, moluscos, anelídeos e insetos, e nas paredes celulares de fungos e leveduras (BASTIAENS et al., 2019; HU et al., 2004; KUMAR; SHAHID, 2020).

A quitosana é um dos biopolímeros mais utilizados na nanotecnologia (EL KNIDRI et al., 2018; MALERBA & CERANA, 2019). É formada tipicamente por duas

unidades de repetição: β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina e β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017) (Figura 2), sendo reconhecida pelo seu carácter renovável e por suas propriedades físico-químicas e funcionais atraentes, como a capacidade de formação de filmes, de adsorção e de quelação de metais, atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Por ser considerada um material GRAS (Geralmente reconhecido como seguro, do inglês *Generally Recognized as Safe*) pela FDA (EHF, 2012), a quitosana pode ser utilizada em aplicações em diversas áreas da ciência e tecnologia (KUMAR et al., 2019).

Figura 2 - Estrutura da quitina e da quitosana.



Fonte: Adaptado de Sahariah et al. (2017).

A conversão de quitina em quitosana em escala industrial utiliza, em quase sua totalidade, matéria-prima (quitina) proveniente de conchas de crustáceos, subproduto da atividade pesqueira, por meio de métodos biológicos ou químicos (YOUNES; RINAUDO, 2015). No entanto, a quitosana também está presente naturalmente como componente das paredes celulares de fungos em diferentes estágios do seu ciclo de vida (BASTIAENS et al., 2019). Especialmente fungos filamentosos da Ordem *Mucolares* (Classe dos *Zygomycetos*) têm se mostrado uma fonte interessante para a extração da quitosana (BASTIAENS et al., 2019; BERGER et al., 2018).

As propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana, por exemplo, sua solubilidade, viscosidade, flexibilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana e, por consequência, sua aplicabilidade, são significativamente influenciadas pelo peso molecular e grau de desacetilação do biopolímero (EL KNIDRI et al., 2018). Estes parâmetros, geralmente utilizados para a caracterização da quitosana são, por sua vez, afetados tanto pela fonte da matéria-prima, como pelo seu método de

extração (HAMDI et al., 2019). Em geral, considera-se que para que a molécula seja caracterizada como quitosana, seu grau de desacetilação precisa ser superior a 50% (EL KNIDRI et al., 2018).

A presença dos grupos aminos primários ao longo da sua estrutura conferem à quitosana caráter básico (base fraca), com pKa em torno de 6,3. Apesar de não ser solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos comuns, em valores de pH abaixo do seu pKa (6,3), os grupos aminos da quitosana são protonados (-NH_3^+), tornando-a um polieletrólito catiônico solúvel em soluções diluídas tanto de ácidos inorgânicos (por exemplo HCl, HBr, HNO_3 e HClO_4), como de ácidos orgânicos (como ácido cítrico, láctico, acético e fórmico) (EL KNIDRI et al., 2018; MORIN-CRINI et al., 2019; SAHARIAH; MÁSSON, 2017). Nestas condições, a elevada densidade de carga positiva da quitosana lhe permite interagir com biomoléculas negativamente carregadas estando, portanto, relacionada às diversas propriedades do polímero como capacidade de bioadesão, capacidade adsortiva, atividade antimicrobiana, entre outras (GRIFOLL-ROMERO et al., 2018; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

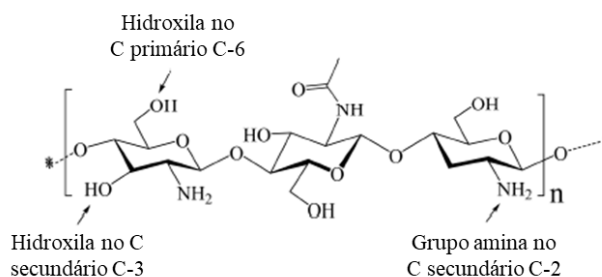
Vários estudos demonstraram que a quitosana apresenta atividade antimicrobiana frente a um amplo espectro de microrganismos (SAHARIAH; MÁSSON, 2017; YOUNES et al., 2014). No entanto, o mecanismo exato da ação antimicrobiana ainda não se encontra totalmente esclarecido. O mecanismo geralmente aceito propõe que a elevada densidade de carga positiva da quitosana permite que ela se ligue eficientemente à carga negativa das membranas celulares microbianas, alterando sua polaridade e permeabilidade, o que causa o extravasamento de componentes intracelulares importantes como proteínas e íons, e lhe permite adentrar a célula. Uma vez no interior da célula, a quitosana é capaz de interagir com o DNA, alterando sua conformação e inibindo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas. Esses processos resultam na morte celular (FERREIRA; NICOLETTI, 2021; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017).

A propriedade antimicrobiana da quitosana tem sido vastamente utilizada pela indústria alimentícia, nas mais diversas matrizes, tais como bebidas, produtos cárneos, frutas, vegetais, entre outros (TIAN; LIU, 2020). No caso da aplicação em frutas, por exemplo, coberturas à base de quitosana têm efeito duplo. Além da

atividade antimicrobiana, a cobertura cria uma barreira semipermeável ao redor da fruta, que modifica o ambiente interno, regula de forma eficaz as trocas gasosas, desacelera a respiração e os processos metabólicos e retarda o amadurecimento (MELO et al., 2018).

Cada monômetro da cadeia polimérica da quitosana apresenta 3 grupos funcionais reativos: 2 grupos hidroxilas, sendo o primeiro deles no carbono secundário C-3 e o segundo, no carbono primário C-6; e um grupo amino no carbono secundário C-2 (Figura 3). Além de tornarem a quitosana susceptível a modificações químicas, ao possibilitar a interação com diversos tipos de moléculas, estes grupos funcionais permitem ainda a conversão da quitosana em diferentes formas como matrizes, géis, membranas, micro e nanopartículas (DIVYA; JISHA, 2018; EL KNIDRI et al., 2018).

Figura 3 - Grupos funcionais da molécula de quitosana.



Fonte: Adaptado de Sahariah et al. (2017)

As nanopartículas de quitosana apresentam, portanto, as já discutidas características físico-químicas e biológicas favoráveis do polímero, além de suas “biopropriedades”, as quais se encontram aperfeiçoadas ou alteradas na forma de nanomateriais (DIVYA; JISHA, 2018). Com destaque para o alto potencial antimicrobiano, visto que, o tamanho pequeno e a alta densidade de carga, aumentam a interação entre o polímero e a superfície negativamente carregada das células dos microrganismos, e, conseqüentemente, potencializa sua atividade contra fungos e bactérias (KUMARASWAMY et al., 2018).

Nanopartículas de quitosana têm sido vastamente utilizadas como carreadores de compostos bioativos em aplicações biomédicas (transporte de drogas, genes, vacinas), na agricultura (promoção do crescimento e no controle de

praga nas plantas), além de atuar como suporte para a imobilização de enzimas em diferentes áreas (biomédica, tratamento de água residual, indústria de alimentos) (DIVYA; JISHA, 2018).

Patel et al. (2019) avaliaram o efeito antibiofilme de nanopartículas de quitosana contendo o antibiótico ciprofloxacina e funcionalizadas com alginato-liase sobre o biofilme produzido por *P. aeruginosa* obtido de amostras de clínicas de pacientes com fibrose cística. Foram comparados tratamentos com o antibiótico puro, antibiótico+enzima, nanopartículas contendo apenas o antibiótico e nanopartículas contendo o antibiótico funcionalizadas com alginato-liase. Nos ensaios de concentração inibitória mínima contra a *P. aeruginosa*, os tratamentos com nanopartículas proporcionaram uma inibição prolongada do crescimento microbiano mesmo com uma dose pequena (0,125 µg/mL) até 48 h. Enquanto os outros tratamentos não conseguiram manter a atividade. Comportamento atribuído à maior capacidade de penetração das nanopartículas e à liberação sustentada do fármaco promovida por estas.

Muthukrishnan et al. (2019) utilizaram nanopartículas de quitosana como carreadores de tiamina (Vitamina B1), a fim de aumentar a estabilidade da tiamina, uma vez que as vitaminas são bastante sensíveis às condições ambientais adversas. Os autores avaliaram os efeitos das nanopartículas no crescimento e na proteção contra a murcha causada por *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri* (FOC) em grão de bico (*Cicer arietinum*). As nanopartículas contendo tiamina, obtidas pelo método de gelificação iônica com tripolifosfato pentassódico (TPP), promoveram um percentual de germinação das sementes de 90%. Este valor é 15% superior à porcentagem obtida para sementes não tratadas. A aplicação foliar melhorou significativamente todos os parâmetros estudados relacionados ao crescimento, com destaque para a formação de raízes secundárias nas mudas, o que proporciona um aumento na captação de água e nutrientes do solo e pode auxiliar na redução do uso de fertilizantes.

Choudhary et al. (2019) aplicaram nanopartículas de quitosana carregadas com zinco no cultivo de milho. As nanopartículas apresentaram atividade antifúngica significativa contra *Curvularia lunata* e significativa inibição do crescimento micelial, entre 47,7% e 65,2% para tratamentos com nanopartículas contendo zinco com

concentração entre 0,08% e 0,16%. A germinação de esporos foi controlada entre 50,5% e 73,3% para todas as concentrações (0,01%-0,16%). Além disso, houve aumento nos níveis de todas as enzimas de defesa investigadas. Após a aplicação foliar, as lesões relacionadas à doença da murcha, causada por *C. lunata*, apareceram nas plantas controle entre 3-4 dias após a inoculação, enquanto que nas plantas tratadas com nanopartículas, as lesões apareceram menores e somente após 7-8 dias após inoculação. As nanopartículas, portanto, conseguiram reduzir a severidade da doença. A liberação gradual do composto ativo (Zn) é uma das principais vantagens da nanoencapsulação, o que mantém a sua atividade biológica por mais tempo, aumentando sua eficiência, além de evitar sua perda e a possível poluição ambiental (HE; DENG; HWANG, 2019; IAVICOLI et al., 2017).

Nadaroglu et al., (2019) utilizaram nanopartículas magnéticas de quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$) na imobilização de laccase de *Weissella viridescens* LB-37 aplicadas na degradação de alguns corantes azo (Direct Blue-15, Evans-Blue, Reactive Black-5, Acid Red-37). Em termos de reutilização, a enzima imobilizada conseguiu reter 47% de sua atividade após 10 ciclos. Resultado bastante interessante do ponto de vista industrial. Apesar da máxima atividade para a enzima livre e para a enzima imobilizada terem sido atingidas nas mesmas condições de temperatura e pH, 30 °C e pH 6,0, a atividade da enzima imobilizada foi maior e esta se mostrou mais resistente a variações das condições ambientais. A enzima solúvel perdeu cerca de 67% de sua atividade após 2 horas a 80 °C, enquanto a perda da enzima imobilizada foi de apenas 20%, nas mesmas condições. Em relação à aplicação final (remoção de corantes), após a adição de H_2O_2 , a enzima imobilizada alcançou os maiores percentuais de remoção para RB5, DB15 e EB, que foram 93%, 95% e 96%, respectivamente.

A Tabela 1 reúne aplicações recentes de nanopartículas de quitosana como transportadoras de diferentes compostos bioativos como óleos essenciais e compostos nutracêuticos na indústria de alimentos, bem como seus efeitos.

Tabela 1 - Aplicações recentes de nanopartículas de quitosana como carreadoras de compostos bioativos em Alimentos.

Bioativo	Limitação	Aplicação	Principais efeitos	Ref.
Óleo de moringa	Alta volatilidade.	Embalagem de queijo - nanofibras de gelatina.	Proteção e liberação controlada do óleo. Potencialização a atividade antimicrobiana.	Lin et al. (2019)
Lisozima	Instabilidade.	Agente antimicrobiano aplicado na forma direta ou incorporado em embalagens.	Aumento da estabilidade.	Wu et al. (2017)
Óleo de cravo-da-índia	Alta volatilidade e baixa solubilidade em água	Conservante em alimentos.	Liberação in vitro controlada por 56 dias e maior atividade antimicrobiana.	Hasheminejad et al. (2019)
Óleo de cravo-da-índia	Instabilidade em condições ambientais adversas e volatilidade.	Usado como conservante, tempero e corante.	Aumento da estabilidade térmica, atividade antioxidante e antimicrobiana.	Hadidi et al. (2020)
Óleo de cravo-da-índia	Alta instabilidade e volatilidade.	Cobertura para conservação de pepinos - microfibras de gelatina.	Além da atividade antimicrobiana, conservação dos parâmetros sensoriais.	Ceu et al. (2018)
Óleo essencial de lima	Alta instabilidade e volatilidade.	Agente antimicrobiano contra patógenos de origem alimentar para aplicações em embalagens.	Potencialização a atividade antimicrobiana.	Sotelo-Boyás et al. (2017)
Peptídeos derivados de peixe	Baixa biodisponibilidade	Potencial nutracêutico.	Aumento da absorção e da biodisponibilidade.	Zhao et al. (2019)
Nisina	Interação da nisina com componentes da matriz alimentícia, baixa solubilidade.	Bioconservante - Aplicação em embalagem para bife fresco.	Controle do crescimento microbiano e consequente aumento de tempo de prateleira.	Zimet al. (2018)

Continua...

Continuação da Tabela 1.

Nisina	Interação da nisina com componentes da matriz alimentícia e baixa solubilidade.	Aprovada com aditivo em alimentos. Aplicação em suco de laranja.	Atividade antimicrobiana. Efeito sinérgico QUI-NIS.	Lee et al. (2018)
Óleo de Krill	Solubilidade limitada em água e rápida instabilidade à oxidação.	Dieta Suplementar. Alimentos funcionais (fonte de óleo poli-insaturados ômega 3).	Prevenção da oxidação do óleo de Krill.	Haider et al. (2017)
β -galactosidade	Instabilidade, perda da atividade catalítica.	Imobilização de enzimas. Produção de alimentos sem lactose.	Manutenção da atividade catalítica.	Deng et al. (2020)
Ácido gálico	-	Cobertura para conservação de filés de peixe.	Conservação por até 11 dias (4 dias de extensão) e retardo da oxidação lipídica	Zarandona et al. (2021)
Óleo essencial de laranja doce.	-	Preservação de suco de frutas.	Atividade antimicrobiana e redução da influência do odor e sabor do óleo na aceitabilidade do produto.	Bento et al. (2020)
Óleo essencial de hortelã-pimenta e chá verde	Alta instabilidade.	Aplicação como conservante e antioxidante natural.	Aumento da estabilidade térmica, atividade antioxidante e antimicrobiana.	Shetta et al. (2019)
Extrato de casca de romã (polifenóis)	Instabilidade.	Embalagem para conservação de carne de porco (filme de zeína).	Aumento da estabilidade térmica e redução das contagens bacterianas (atividade antimicrobiana)	Cui et al. (2020)
Catequina e quecertina	Instabilidade.	Utilização como alimentos funcionais ou antimicrobianos e antioxidantes.	Liberação controlada, retenção da atividade antioxidante e aumento da atividade antimicrobiana (pela liberação sustentada).	Li et al. (2018)

Continua...

Continuação da Tabela 1.

Óleo essencial de estragão	Matriz alimentar complexa que pode limitar a bioatividade do óleo.	Cobertura (quitosana-gelatina) para a conservação de carne de porco.	Aumento da atividade antioxidante (retardo da oxidação lipídica e do escurecimento), atividade antimicrobiana e aspectos sensoriais (cor e odor). Extensão da validade do produto.	Zhang et al. (2020)
Óleo essencial de cinamomo	-	Incorporação em filmes de zeína.	Melhora das propriedades mecânicas e antimicrobiana do filme.	Vahedikia et al. (2019)
Luteína	Baixa solubilidade	Corante em alimentos.	Aumento de 12x a solubilidade em água da luteína.	Zhang et al. (2016)
Pectinase	Instabilidade, perda da atividade catalítica.	Clarificação de sucos de fruta.	Aumento da estabilidade térmica, manutenção da atividade catalítica mesmo após 7 ciclos (alta durabilidade)	Sojitra et al. (2017)
Resveratrol	-	Embalagem ativa de alimentos.	Melhora das propriedades mecânicas e promoção de atividade antimicrobiana e antioxidante à embalagem.	Glaser et al. (2019)

Fonte: A autora (2021).

3.5 GOMA ARÁBICA

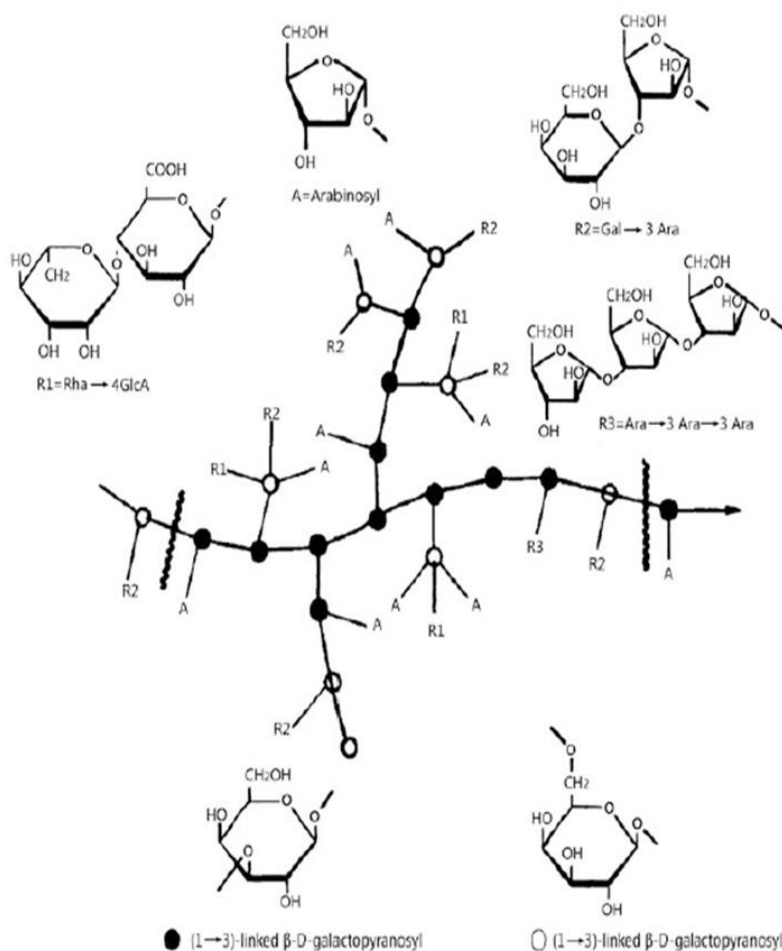
A goma arábica, também conhecida por goma acácia, é o exsudato seco obtido do tronco de árvores do gênero *Acacia*, em especial *Acacia Senegal* e *Acacia seyal*, encontradas principalmente na região africana de Sahe, no Sudão (A. et al., 2012; SAHA et al., 2017). Sua composição química é complexa, podendo variar de acordo com sua fonte, idade das árvores das quais foram obtidas e condições ambientais, como clima e qualidade do solo (DAUQAN; ABDULLAH, 2013).

A estrutura da goma arábica consiste basicamente de 3 frações principais: a maior delas é um polissacarídeo extremamente ramificado, no qual moléculas de $\beta(1\rightarrow3)$ galactose funcionam como uma haste e arabinose e ramnose (que terminam

em ácido glucurônico) servem como ramificações. O ácido glucurônico é encontrado na natureza geralmente na forma de sais de cálcio, potássio e magnésio. A segunda fração é um complexo arabinogalactana-proteína, estando a cadeia de arabinogalactana ligada covalentemente à proteína através dos grupos serina e hidroxiprolina. Por fim, a menor das frações é uma glicoproteína (Figura 4) (DROR; COHEN; YERUSHALMI-ROZEN, 2006; RAJABI et al., 2019).

A goma arábica é altamente solúvel em água (até 50% m/v) e apresenta baixa viscosidade, quando comparada com outras gomas. Tais propriedades são atribuídas à estrutura altamente ramificada, ao seu pequeno volume hidrodinâmico, além do relativo baixo peso molecular (DAUQAN; ABDULLAH, 2013; IZYDORCZYK et al., 2005). É biocompatível, biodegradável, não tóxica, sendo considerada um aditivo alimentar seguro segundo a FDA (DAVE; GOR, 2018; TAN et al., 2016).

Figura 4 - Estrutura da goma arábica.



Fonte: Zhao et al. (2015).

Este biopolímero tem sido vastamente utilizado em aplicações industriais como estabilizante, espessante e emulsificante nas indústrias farmacêutica e de alimentos (DAVE; GOR, 2018). Outras indústrias que utilizam a goma arábica, de maneira menos expressivas são a indústria de têxtil, de cerâmica, de papel e de cosméticos (DAUQAN; ABDULLAH, 2013).

A baixa viscosidade e a alta solubilidade da goma arábica viabilizam o seu uso como agente encapsulante para retenção e proteção de compostos bioativos, sendo utilizado principalmente na encapsulação de óleos, uma vez que produz emulsões estáveis no caso da maioria dos óleos, em ampla faixa de pH, bem como por sua habilidade de formar filmes (A. et al., 2012).

A parte proteica (hidrofóbica) da goma arábica funciona como um emulsificante, adsorvendo na superfície das gotículas de óleo, enquanto a parte do carboidrato (hidrofílica) impede a floculação e coalescência das gotas através de repulsão eletrostática e forças estéricas (IZYDORCZYK et al., 2005).

3.6 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS: COACERVAÇÃO COMPLEXA

Em geral, existem três abordagens envolvidas na síntese de nanoestruturas de diferentes materiais: “top-down”, “bottom-up” ou a combinação destas (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020; FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2020; PRAKASH et al., 2018). O processo “top-down” gera estruturas de dimensões nano através de processos físico-químicos a partir de uma estrutura nativa de tamanho maior que se divide em partículas finas por desintegrações sucessivas utilizando várias operações como, por exemplo, moagem, micro fluidificação ou homogeneização (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2019; YADAV et al., 2019). Já na metodologia “bottom-up”, as nanopartículas são sintetizadas utilizando métodos químicos e biológicos por automontagem de átomos ou moléculas em novos núcleos que crescem em dimensões de nanoescala ou pela formação de coacervados de proteína-polissacarídeos (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020; VILLENA DE FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018).

Dentre os diferentes métodos utilizados na síntese de nanopartículas de quitosana, pode-se citar: emulsificação, gelificação iônica, coacervação, micelas reversas, nanoprecipitação, e métodos baseados em equipamentos especializados como *spray dryer* e *eletrospraying*. As propriedades físico-químicas da quitosana tais como peso molecular e grau de acetilação, bem como o método de produção das nanopartículas influenciam diretamente a forma, o tamanho e a carga superficial das nanoestruturas (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020; AL-DHABAAN et al., 2018; RASHKI et al., 2021).

A coacervação consiste no fenômeno físico-químico de separação das fases de um sistema coloidal desencadeada por fatores externos, por exemplo, alterações no pH, força iônica, temperatura e solubilidade do meio sob condições especiais de reação. A fase “rica” em colóides é denominada coacervato, enquanto a fase “pobre” em colóides é conhecida como fase de equilíbrio (HECKERT BASTOS et al., 2020; TIMILSENA et al., 2019).

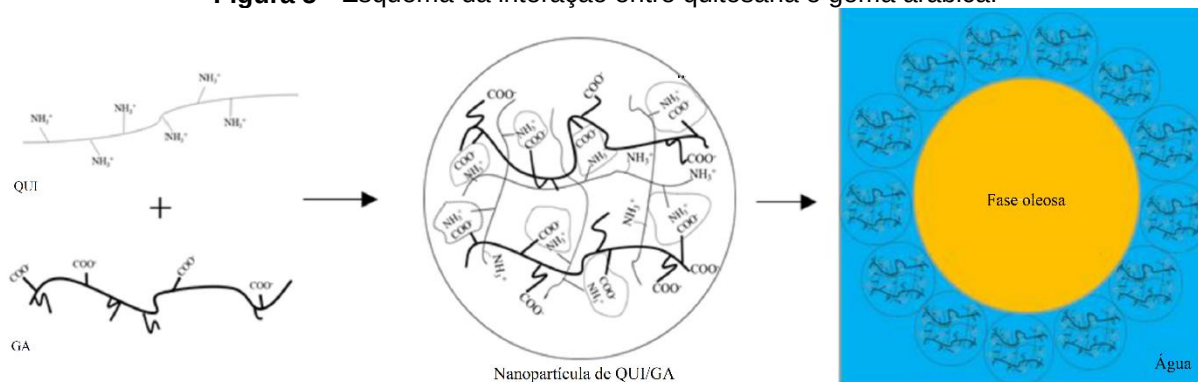
A coacervação é considerada uma das tecnologias mais utilizadas na encapsulação de ingredientes alimentícios e farmacêuticos. Além das condições brandas de operação, tais como baixas temperaturas e ausência de solventes químicos perigosos, a coacervação complexa apresenta uma série de vantagens comparada às outras técnicas de encapsulação, a incluir: alta eficiência de encapsulação, baixa concentração dos polímeros envolvidos, liberação controlada, aumento da estabilidade e proteção dos compostos bioativos nanoencapsulados contra condições ambientais adversas (FERREIRA; NICOLETTI, 2021; GHARANJIG et al., 2020; MARQUES DA SILVA et al., 2015; VUILLEMIN et al., 2019).

A coacervação complexa resulta da interação coloidal entre dois ou mais polímeros de cargas opostas, geralmente uma proteína e um polissacarídeo, formando complexos insolúveis devido à repulsão ao solvente (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020; HECKERT BASTOS et al., 2020; TIMILSENA et al., 2019). Na literatura, são reportados inúmeros pares de biopolímeros utilizados na encapsulação tanto de substâncias hidrofóbicas com hidrofílicas por coacervação complexa. Dentre as proteínas, pode-se citar gelatina, proteínas do soro de leite, proteína de soja, albumina do ovo. Já os polissacarídeos incluem alginato, quitosana, goma arábica, carboximetilcelulose, entre outros (TIMILSENA et al., 2019).

Além da interação eletrostática entre os polímeros de cargas opostas, principal força envolvida no processo de coacervação, outros parâmetros a serem considerados no processo são a razão entre a massa dos biopolímeros envolvidos, a densidade de carga dos mesmos, a concentração de sal e o pH do meio reacional e a estabilidade e solubilidade dos complexos formados (FERREIRA; NICOLETTI, 2021).

Em valores ácidos de pH, a biomolécula da quitosana torna-se positivamente carregada devido à protonação dos grupos amins, o que lhe permite interagir com outras moléculas negativamente carregadas (RAJABI et al., 2019). Quando o pH está acima de 2,2, os grupos carboxilas da goma arábica são largamente dissociados, levando à abertura da molécula da goma em uma estrutura expandida com grande quantidade de sítios ativos negativos (OLIVEIRA et al., 2018; TAN et al., 2016). Diversos estudos têm mostrado que os grupos aminos da quitosana podem interagir com os grupos carboxilas da goma arábica formando micro ou nanocomplexos ao redor de gotículas de óleos promovendo uma barreira de proteção contra sua deterioração (Figura 5) (HAN et al., 2020; TAN et al., 2016). Comparada a outros polissacarídeos, a goma arábica demonstrou ter mais sítios de interação e carga negativa para interação com a quitosana carregada positivamente (AVADI et al., 2010). Sendo, portanto, uma combinação eficiente para a formação de complexos.

Figura 5 - Esquema da interação entre quitosana e goma arábica.



Fonte: Adaptado de Han et al. (2020).

Diante do potencial apresentado pelas sementes do maracujá como fonte de óleos com propriedades funcionais antioxidantes e antimicrobianas, é importante o desenvolvimento de estratégias que permitam o reaproveitamento desses resíduos, de forma a agregar valor à cadeia produtiva do maracujá, bem como de proporcionar benefícios do ponto de vista social, vista ambiental, científico e tecnológico.

Parte desta revisão bibliográfica foi publicada como capítulo de livro (NUNES et al., 2021), DOI 10.37885/210303528.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O óleo da semente de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) foi extraído pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAp) da UFPE a partir de sementes doadas pela empresa Oriente Polpas de frutas, localizada na Região Metropolitana do Recife. As sementes foram previamente lavadas em água corrente e higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 1,0% (v/v) durante 15 minutos. Após nova lavagem com água corrente, foram secas durante 12 horas a 40°C em estufa de circulação de ar e resfriadas à temperatura ambiente em dessecador (FERREIRA et al., 2011; REGIS; RESENDE; ANTONIASSI, 2015). O óleo bruto, obtido pelo método de prensagem a frio em prensa manual Piteba, foi armazenado em frasco âmbar rosqueado e mantido a -18°C (MALACRIDA; JORGE, 2012).

Quitosana de baixo peso molecular (grau de desacetilação entre 75 e 85%) e Tween 80 (HLB 15,0) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A goma arábica (*Acacia senegal*) foi obtida na Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Millipore (Milli-Q Plus, Millipore Corp., Massachusetts, EUA).

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ

O óleo extraído das sementes teve sua composição determinada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Previamente, foram preparados ésteres metílicos de ácidos graxos utilizando método descrito por Joseph e Ackman (1992) com adaptações conforme apresentado no Tópico 4.2.1.

4.2.1 Derivatização para ésteres metílicos de ácidos graxos

Inicialmente, pesou-se aproximadamente 150 mg de óleo, que foram ressuspensos em 2 mL de clorofórmio. Adicionaram-se então 2 mL de solução de

NaOH (0,5M) em metanol e a mistura foi aquecida em banho maria a 100°C por 5 minutos para a completa dissolução. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de BF₃ em metanol (1,3M) em atmosfera inerte e deixou-se sob refluxo por 30 minutos. Depois, a mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação juntamente com 20mL (4 porções de 5mL) de heptano. Agitou-se vigorosamente por 1 minuto e esperou-se a separação das fases. Coletou-se a fase heptano (superior), orgânica, desprezando a fase aquosa (inferior). Secou-se a fase orgânica em sulfato de sódio anidro e filtrou-se em papel de filtro. Por fim, purificou-se e dividiu-se a fração obtida em cromatografia em coluna utilizando-se gradiente de eluentes (heptano puro, heptano 1:1 diclorometano e diclorometano puro), sendo o volume de solventes de cada fração reduzido sob fluxo de nitrogênio a temperatura ambiente antes da análise por cromatografia gasosa (JOSEPH ; ACKMAN, 1992).

4.2.2 Análise cromatográfica por GC-MS dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Os ésteres metílicos foram analisados pela injeção de 1 µl da fase orgânica no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS) em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series GC-MS (voltagem do filamento: 70 Ev; voltagem do detector: 1,3 KV) (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 µm espessura da película). A aquisição de dados do detector de massa foi feita no modo scan, com tempo de aquisição de 36,75 min e corte do solvente em 3,25 min; faixa de massas: 35 a 550 a.m.u (unidade de massa atômica. Hélio (99,9999%) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A temperatura do forno do cromatógrafo foi programada como segue: temperatura inicial de 150 °C mantida por 2 minutos, aumento de 150 °C para 230 °C a uma taxa de aquecimento 5 °C/min e temperatura final mantida por 7 min, temperatura do forno novamente ajustada até 260 °C, a uma taxa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹, sendo a temperatura final mantida por 7,5 minutos. A temperatura do injetor foi de 230 °C e a temperatura da interface foi de 260 °C.

Os ésteres metílicos de ácido graxos foram identificados pela co-injeção com padrão de ácido graxo (F.A.M.E. Mix C4-C24) (F.A.M.E Mix Supelco® 37, Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, EUA), bem como pela comparação por similaridade de seus espectros de massa com aqueles disponíveis na biblioteca do espectrômetro de massas do *National Institute of Standards and Technology* (NIST, Wiley). Os ésteres graxos foram então quantificados através da técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) utilizando equipamento Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália) equipado com uma coluna VB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm interno diâmetro, 0,25 µm de espessura), nas mesmas condições utilizadas para a análise de GC-MS (SOUZA et al., 2021). Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFPE.

4.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

A solução de quitosana (1,0% (m/v)), pH~4,0) foi preparada pela dissolução da quitosana de baixo peso molecular em solução aquosa de ácido acético 1,0% (v/v) sob agitação magnética (800 rpm), em temperatura ambiente, durante a noite. A goma arábica (2,0% (m/v), pH~5,0) foi dispersa em água ultrapura, sob agitação magnética (800 rpm), até completa dissolução.

4.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ (NP-OSM)

As nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente de maracujá (NP-OSM) foram preparadas com base na metodologia descrita previamente por Rutz et al. (2017) com algumas modificações. Inicialmente o procedimento consistiu na emulsificação entre a solução de quitosana 1,0% (m/v), o Tween 80 (HBL 15,0) e diferentes quantidades de OSM, conforme a Tabela 2. A mistura foi homogeneizada em ultra-turrax (T25, IKA, Alemanha) a 8000 rpm durante 5 minutos, para formação da emulsão e mantida sob agitação magnética (400 rpm) por 30 minutos. Posteriormente, as nanopartículas foram formadas pela adição por gotejamento com o auxílio de uma seringa adaptada, da solução de goma arábica 2,0% (m/v) à emulsão. O sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos para permitir a completa complexação entre os polímeros. As dispersões de

nanopartículas foram submetidas à centrifugação (2.000 rpm) por 10 minutos. Nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) foram preparadas seguindo o mesmo procedimento, sem a adição do OSM, de forma a avaliar a influência do óleo nas nanopartículas.

Tabela 2 - Composição das formulações.

Formulação	POL:OSM (m/m)	Polímeros (material de parede)			OSM (mg)	Tween 80 (mg)
		Quitosana (mg)	Goma arábica (mg)	Total (mg)		
NP	1:0	150,0	300,0	450,0	0	130,0
NP-OSM-0,25	1:0,25	150,0	300,0	450,0	112,5	130,0
NP-OSM-0,50	1:0,50	150,0	300,0	450,0	225,0	130,0
NP-OSM-0,75	1:0,75	150,0	300,0	450,0	337,5	130,0

POL: Polímeros; OSM: óleo da semente de maracujá.

Fonte: A autora (2021).

A estabilidade das nanopartículas (em triplicata) foi avaliada através do seu aspecto macroscópico e dos valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga superficial e pH, como descrito a seguir. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (4°C) e analisadas após 7, 21, 30 e 60 dias para acompanhar possíveis mudanças nos parâmetros.

4.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

Após a preparação, nanopartículas contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) também foram avaliadas quanto ao processo de liofilização utilizando 5,0% (m/v) de manitol e de trealose como agentes crioprotetores. Os crioprotetores foram adicionados individualmente às dispersões de nanopartículas recém-preparadas após a etapa de centrifugação e dissolvidos sob agitação magnética suave durante 5 minutos (GOKCE et al., 2014; RAMPINO et al., 2013). Em seguida, as amostras foram congeladas a -80 °C durante 24 horas e submetidas à liofilização em equipamento EZ-DRY (FTS Systems, Nova York, EUA) durante 48 horas. Após a liofilização as amostras foram redispersas em água ultrapura e analisadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga superficial e pH.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.6.1 Aspectos macroscópicos

Foram analisadas as seguintes características: coloração, translucência azulada, presença de gotículas de óleo na superfície ou aderidas ao frasco, deposição de resíduos, formação de grumos ou de cremagem e separação de fases. Todas as avaliações foram feitas através de observação visual.

4.6.2 Análise de tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho do raio hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foram determinados pela técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz ou DLS (*Dynamic Light Scattering*), utilizando o equipamento Zetasizer (Nano ZS90, Malvern, Reino Unido) a 25°C com laser de 633 nm e ângulo de detecção fixo de 90°. Alíquotas de 0,1 mL de cada uma das formulações foram previamente diluídas para 1 mL com água ultrapura filtrada (Millex®, 0,22 µm) para evitar fenômenos de espalhamentos múltiplos (Tan et al., 2016). O tamanho das nanopartículas foi calculado automaticamente de acordo com o movimento Browniano das mesmas utilizando a equação de Stokes-Einstein (TSAI et al., 2011).

A determinação do potencial Zeta das nanopartículas foi realizada através da técnica de mobilidade eletroforética a 25°C, no mesmo equipamento. De forma semelhante, as amostras foram previamente diluídas 1:10 com água ultrapura filtrada (Millex®, 0,22 µm). Os valores de mobilidade eletroforética foram automaticamente convertidos em potencial Zeta (mV) com base no modelo de Smoluchowski (UMERSKA et al., 2018).

Tanto para tamanho de partícula e índice de polidispersão, como para potencial Zeta, três medidas subsequentes foram determinadas para cada formulação e os valores expressos no formato média $\pm$ desvio padrão.

As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Ciências farmacêuticas da UFPE.

4.6.3 pH

O pH das nanopartículas foi avaliado utilizando medidor de pH digital PHS3BW (Bel Engineering, Monza, Itália) equipado com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, a 25°C e sem diluição prévia.

4.6.4 Morfologia

A morfologia das nanopartículas contendo o óleo da semente de maracujá (NP-OSM) foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A análise de MEV foi realizada utilizando microscópio EVO LS15 (ZEISS, Oberkochen, Alemanha). Para isso, 5 µL da dispersão de nanopartículas (NP-OSM) foi depositada diretamente em um “*stub*” e deixada para secar em estufa (37°C) durante 24 horas. Posteriormente, a amostra foi recoberta com uma camada de 10 nm de Au-Pd em sistema de metalização Fine Coat *Ion Sputter* JFC 1100 (JEOL, Tóquio, Japão) e visualizada no microscópio eletrônico de varredura sob tensão de aceleração de 10 kV e magnificação entre 5.000 e 20.000x (XING et al., 2016).

Um microscópio FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin (Hitachi Ltd, Japão) foi utilizado para a análise de MET. Antes da análise, 50 µL da dispersão fresca de nanopartículas (NP-OSM) foram diluídos 5 vezes com água ultrapura. Uma gota da amostra diluída foi então depositada em uma grade de cobre de 200 mesh revestida com carbono (SPI, Supplies®, EUA). O líquido em excesso foi removido com papel de filtro e a amostra deixada para secar a 25°C. Por fim, a grade foi transferida para microscópio para a aquisição das imagens (SHARKAWY; BARREIRO; RODRIGUES, 2019). E as imagens analisadas em um software analisador de imagens Tecnai Imaging & Analysis (Gatan Digital Micrograph, EUA).

As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE.

4.6.5 Estrutura química

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada para a análise da estrutura química dos polímeros usados como materiais de parede (quitosana e goma arábica), do OSM e das nanopartículas liofilizadas (NP e NP-OSM), bem como para identificar possíveis interações entre eles. A aquisição dos espectros das amostras foi feita utilizando espectrofotômetro IR-Tracer (Shimadzu Japão) acoplado a acessório de reflectância total atenuada ou ATR (*Attenuated Total Reflectance*). Para a realização das análises, tanto os materiais sólidos como o óleo foram depositados diretamente no cristal de seleneto de zinco e diamante para serem analisadas no modo ATR. Um total de 16 varreduras foram realizadas para cada medida com resolução de 4 cm^{-1} , na região entre 4.000 cm^{-1} e 600 cm^{-1} .

As medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas da UFRPE.

4.6.6 Propriedades térmicas

As análises de termogravimetria (TGA) e de DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) foram utilizadas para avaliar a estabilidade térmica dos materiais de parede, do OSM e das nanopartículas liofilizadas (NP e NP-OSM). A análise de TGA foi realizada em um analisador térmico simultâneo TG-DTA DTG-60H (Shimadzu, Japão), no Laboratório de Terras Raras do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Para tanto, 10 mg de cada amostra foram colocados em cadinhos de platina e aquecidos de 25 a 900°C , a uma taxa de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio (100 mL/min) (HADIDI et al., 2020).

Para a análise de DSC, 2 mg de cada amostra foram aquecidos em cadinhos de alumínio entre 30 e 380°C , a uma taxa de aquecimento de $50^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, com um fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$ (HADIDI et al., 2020). Sendo esta última análise realizada utilizando equipamento DSC Q20 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA), na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

4.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.7.1 Preparação do inóculo

As cepas de fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger* URM 7282 e *Colletotrichum siamense* CMM 4077 utilizadas nos testes antimicrobianos pertencem à coleção de cultura da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Centro de Biociências, UFPE, Recife, Brasil) e à coleção de fungos fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Brasil), respectivamente.

Inicialmente, os fungos foram cultivados em meio BDA (batata dextrose ágar) entre 25°C e 28°C durante 7 dias para suficiente esporulação. Os esporos fúngicos foram coletados com o auxílio de um swab e suspensos em água destilada estéril. O número de esporos presentes na suspensão foi quantificado utilizando um hemocítômetro. A concentração de esporos obtida foi ajustada com água destilada estéril para fornecer um inóculo fúngico padrão de aproximadamente 10^6 esporos/mL (OLIVEIRA et al., 2014).

4.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana do óleo da semente do maracujá livre (OSM), do óleo da semente do maracujá encapsulado em nanopartículas de quitosana-goma arábica (NP-OSM) e de nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) foi avaliada contra *Colletotrichum siamense* e *Aspergillus niger* através do método de microdiluição em caldo.

A emulsão estoque de óleo da semente do maracujá, cuja concentração foi calculada pela razão entre a massa de óleo utilizada no preparo da dispersão de nanopartículas contendo o óleo e o volume final da mesma, foi previamente preparada solubilizando o óleo em água estéril contendo Tween 80 1,0% (m/m) e DMSO 1,0 % (m/m). Ambas as substâncias já haviam demonstrado não causar inibição do crescimento fúngico nas concentrações utilizadas neste estudo (LIMA et al., 2016; ZGODA; PORTER, 2001).

O procedimento de microdiluição em placas de 96 poços foi realizado de acordo com Alves et al. (2008), com adaptações. As substâncias testes foram adicionadas a cada um dos poços em concentrações que variaram entre 0,75 e 4,5 mg/mL para o óleo livre ou encapsulado em nanopartículas (OSM ou NP-OSM) e entre 0,5 e 3,0 mg/mL para as nanopartículas brancas (NP). Em seguida foi adicionado o meio Sabouraud e o inóculo de cada um dos fungos, de forma que o volume final de cada poço fosse de 100 μ L (Tabela 3). Simultaneamente, poços contendo meio acrescido das substâncias teste, mas sem microrganismos foram usados como controles de esterilidade e culturas sem substâncias testes sob as mesmas condições de crescimento foram utilizadas como controles negativos (DIVYA et al., 2019).

Tabela 3 - Esquema de preenchimento da microplaca de 96 poços.

Poço	Substância teste μ L	Meio Sabouraud μ L	Inóculo μ L	Volume final do poço μ L	[OSM] _f (mg/mL)	[NP] _f (mg/mL)
A1	60	20	20	100	4,50	3,00
B1	50	30	20	100	3,75	2,50
C1	40	40	20	100	3,00	2,00
D1	30	50	20	100	2,25	1,50
E1	20	60	20	100	1,50	1,00
F1	10	70	20	100	0,75	0,50
G1	80	20	-	-	-	-
H1	-	80	20	-	-	-

[OSM]_f: concentração final do óleo da semente do maracujá; [NP]_f: concentração final das nanopartículas de quitosana-goma arábica.

Fonte: A autora (2021).

Todo o ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas entre 25°C e 28°C durante 96 horas (KIM et al., 2020). Após a incubação, a CIM foi considerada a menor concentração da substância teste capaz de inibir completamente o crescimento fúngico mediante inspeção visual (ausência de turvação) (KALAGATUR; GHOSH; SUNDARARAJ, 2018).

4.7.3 Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica

Os efeitos das substâncias testes sobre a morfologia fúngica foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Inicialmente, 0,6 mL do inóculo fúngico padrão (10^6 esporos/mL) foram inoculados em caldo Sabouraud (2,4 mL) acrescido de solução de óleo da semente do maracujá (OSM), de nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) e de nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) em concentrações sub-inibitórias (para o *C. siamense*, utilizou-se 50% da CIM, 75% da CIM e 20% da CIM para OSM, NP-OSM e NP, respectivamente; para o *A. niger*, utilizou-se 67% da CIM para todas as substâncias) e incubados entre 25°C e 28°C por 96 horas (SHARMA; TRIPATHI, 2008). As amostras controle cresceram no meio sem as substâncias teste. Em seguida, fragmentos dos micélios foram coletados e lavados com solução salina (pH 7,2) por 3 vezes, 10 minutos cada e fixados com glutaraldeído 2,5% com verde malaquita 0,05% em tampão fosfato 0,1M por 1 hora a 28°C. Após a fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato 0,1M por 10 minutos. As amostras foram então gradativamente desidratadas em etanol nas concentrações de 50%, 70% e 90% (5 minutos cada) e na concentração de 100% por 3 vezes de 10 minutos. Em sequência, as amostras foram imersas em hexametildisilazina (HDMS) 100% por 5 minutos para secagem. Por fim, as amostras foram mantidas em dessecador por 24 horas e em seguida foram montadas em suportes de alumínio, metalizadas com ouro (espessura de 10nm) e observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL LV 5600 (Tóquio, Japão) operando a 18kV (BERGER et al., 2016).

4.7.4 Atividade antifúngica *in vivo*: bioatividade de cobertura comestível sobre o crescimento fúngico em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Os morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.) foram adquiridos na CEASA/PE (Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco) 3 dias após a colheita, inspecionados quanto à ausência de danos mecânicos ou infecções fúngicas visíveis e padronizados de acordo com a cor e o tamanho.

Os frutos foram divididos em 3 grupos. O primeiro grupo foi imerso na cobertura à base de nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da

semente de maracujá (NP-OSM). Para a preparação da cobertura, a dispersão de nanopartículas foi diluída em água estéril contendo glicerol (2,5% v/v), utilizado como plastificante, até a CIM (determinada anteriormente). O segundo grupo foi considerado o controle positivo, no qual o fruto foi recoberto por solução de glicerol 2,5% (v/v) e o terceiro grupo, controle negativo, que corresponde aos frutos sem cobertura. Os 3 grupos foram armazenados em temperatura de refrigeração ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$), separadamente (MELO et al., 2020a).

Inicialmente, os morangos foram higienizados com hipoclorito de sódio (1% v/v) por 15 minutos, lavados com água potável e deixados para secar por 2 horas em temperatura ambiente. Os frutos receberam tratamento “curativo”, isto é, foram inoculados antes de receberem as coberturas comestíveis. Para tal, os morangos foram imersos durante 1 minuto na solução do inóculo fúngico de *Aspergillus niger* (10^6 esporos/mL) sob agitação suave utilizando um bastão de vidro estéril. Após isso, foram imersos durante 1 minuto nas soluções de coberturas comestíveis, colocados em um filtro de nylon para drenar o excesso de líquido das amostras e deixados para secar a temperatura ambiente. Por fim, foram acondicionadas em recipientes de polietileno com tampa (OLIVEIRA et al., 2014).

Cada tratamento incluiu 20 frutos, os quais foram armazenados sob refrigeração e examinados após 12 dias quanto à sinais de infecção fúngica visível. Os resultados foram expressos em percentual de fruto infectado (FENG; ZHENG, 2007; LIU et al., 2007).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com estatística descritiva (média e desvio padrão) e testes inferencial (ANOVA seguido pelo teste de tukey) para determinação das diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como a média estimada $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA SEMENTE DO MARACUJÁ

O perfil de ácidos graxos dos óleos vegetais está relacionado às suas propriedades físico-químicas, nutricionais e de estabilidade (AYYILDIZ et al., 2015). Os ácidos graxos detectados e quantificados no óleo da semente do maracujá (OSM) estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição percentual de ácidos graxos do óleo da semente do maracujá.

Ácido graxo	(%)
Ácido palmítico (C16:0)	15,35
Ácido esteárico (C18:0)	4,76
Ácido oleico (C18:1)	10,69
Ácido linoleico (C18:2)	63,35
Ácido linolênico (C18:3)	-
Outros	5,85
AGS	20,11
AGPI	63,35
AGPI/AGS	3,15

AGS: ácidos graxos saturados; AGI: ácidos graxos poli-insaturados.

Fonte: A autora (2021).

Em conformidade com o observado por outros autores, o ácido linoleico (C18:2) foi o ácido predominante no OSM, correspondendo a 63,35% do total de ácidos graxos. Pereira et al. (2019) obtiveram percentuais ligeiramente superiores de ácido linoleico (66,64-68,99%) no perfil de ácidos graxos de óleos da semente do maracujá amarelo extraídos por Soxhlet, extração assistida por ultrassom e extração com fluido supercrítico.

O OSM apresentou conteúdos significativos dos ácidos palmítico (C16:0) (15,35%) e oleico (C18:1) (10,69%). Pereira et al. (2019) e Malacrida & Jorge (2012), no entanto, observaram maiores percentuais de ácido oleico em comparação com o ácido palmítico no óleo da semente do maracujá amarelo extraído por Soxhlet. Purohit et al. (2021), por sua vez, encontraram percentuais muito próximos de ambos os ácidos graxos (13,2-13,8%) no óleo da semente do maracujá amarelo (variedades Manipur e Assam).

Variações na composição química do OSM podem ser atribuídas a diversos fatores, a incluir: fatores climáticos e ambientais, genótipos testados, processo de secagem das sementes, métodos de extração do óleo, entre outros (KASEKE; LINUS; AMOS, 2020; LUCARINI et al., 2019; PETROPOULOS et al., 2021).

O consumo de óleos de sementes está associado a diversos efeitos benéficos à saúde humana como à redução do risco de doenças cardiovasculares (KASEKE; LINUS; AMOS, 2020). A relação AGPI/AGS é um bom indicador da qualidade nutricional dos óleos e de acordo com o Departamento Britânico de Saúde deve ser superior a 0,45 (DABETIC et al., 2020). O OSM apresentou valor elevado de AGPI/AGS (3,15), comparável a valores obtidos tanto para óleos vegetais tradicionais, como os óleos de soja (3,30) e de milho (3,72) e como para óleos não convencionais, como os óleos da semente de abóbora (2,55) e da semente de uva (3,95-4,65) (AYYILDIZ et al., 2015; DABETIC et al., 2020; PETROPOULOS et al., 2021). O percentual elevado de ácidos insaturados, bem como a ausência de ácido α -linolênico contribuem ainda para a estabilidade oxidativa do OSM (DABETIC et al., 2020; PUROHIT et al., 2021).

5.2 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DO MARACUJÁ (NP-OSM)

As nanopartículas foram obtidas através de abordagem em duas etapas. A primeira correspondeu à emulsificação do óleo na solução de quitosana e a segunda, à auto-organização de coacervados (coacervação complexa) ao redor das gotículas de óleo, que se deu pela interação eletrostática entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa da goma, sob condições especiais de reação (BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014).

O processo de complexação entre os polímeros ocorreu espontaneamente, sendo evidenciado pelo aumento da turbidez tão logo as soluções poliméricas foram misturadas (KUROIWA et al., 2015). Todas as formulações apresentaram aspecto azulado, característico da formação de nanopartículas, sem formação de grumos ou de cremagem.

A Tabela 5 apresenta as características físico-químicas obtidas para as dispersões de nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) e nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente de maracujá (NP-OSM).

Tabela 5 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos no dia 0 para cada uma das formulações.

Formulação	POL:OSM	Parâmetro			
		$\varnothing$ (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)	pH
NP	1:0	173,3 $\pm$ 26,1	0,404	47,72 $\pm$ 5,76	4,00
NP-OSM-0,25	1:0,25	297,8 $\pm$ 118,9	0,664	24,58 $\pm$ 6,55	4,50
NP-OSM-0,50	1:0,50	213,6 $\pm$ 28,4	0,479	16,57 $\pm$ 6,03	4,50
NP-OSM-0,75	1:0,75	246,0 $\pm$ 15,4	0,460	15,01 $\pm$ 7,64	4,50

POL: polímero; OSM: óleo da semente de maracujá; $\varnothing$: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; Potencial ζ : potencial zeta. Resultados representados como valor médio $\pm$ desvio-padrão.

Fonte: A autora (2021).

Valores semelhantes de tamanho de partícula (<300 nm) foram observados na encapsulação de compostos bioativos de açafrão em nanopartículas de quitosana e goma arábica utilizando a técnica de coacervação complexa (RAJABI et al., 2019). Oliveira et al. (2018), por sua vez, obtiveram uma faixa maior de tamanho de partícula, variando entre 140 $\pm$ 18 e 749 $\pm$ 363 nm, ao encapsular geraniol em nanopartículas de quitosana e goma arábica pela mesma técnica. Tais diferenças podem ser atribuídas às diferentes razões entre a massa dos polímeros, às características dos compostos encapsulados, ao uso ou não de emulsificantes, ao tipo de agitação, entre outros fatores (CAMPO et al., 2017). O aumento do conteúdo inicial de óleo levou ao aumento do tamanho e à redução do potencial zeta das partículas, o que está de acordo com o observado por Hadidi et al. (2020), Hasheminejad et al. (2019), e Karimirad et al., (2020). Com exceção para a formulação NP-OSM-0,25, que apesar de ter o menor conteúdo inicial de óleo, apresentou maior tamanho.

O índice de polidispersão (PDI) é representado por um valor numérico (adimensional) que varia entre 0 e 1, e é utilizado para avaliar a distribuição de tamanho das partículas em suspensão (AVADI et al., 2011). As formulações apresentaram valores de PDI entre 0,404 e 0,664, tendo a formulação NP-OSM-0,25

apresentado também o maior valor de PDI. Os valores de PDI obtidos indicam uma tendência à polidispersão. A estabilidade dos sistemas coloidais também está relacionada ao PDI, onde maiores valores indicam maior instabilidade (FATHI et al., 2019; VILLEGAS; JAIME; CERVANTES, 2021).

A etapa de emulsificação é determinante para o tamanho da partícula e a distribuição de tamanho das mesmas e pode ser influenciado por diversos parâmetros, a incluir: velocidade e tempo de agitação, densidade e viscosidade das soluções envolvidas, proporção entre os volumes da fase dispersa e a fase contínua, entre outros (BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014). Segundo Kuroiwa et al. (2015), o tempo para produzir uma distribuição estreita de tamanho de nanopartículas (população mais homogênea) diminui com o aumento da razão de volume entre a fase dispersante a fase contínua. Sendo assim, a quantidade de óleo adicionada na formulação NP-OSM-0,25, bem como o tempo de agitação, podem não ter sido suficientes para formação de uma emulsão estável. Diante do exposto, a avaliação da estabilidade da formulação NP-OSM-0,25 foi então descontinuada.

O potencial zeta, medida da carga superficial das nanopartículas, é fortemente influenciado pela segunda etapa da formação das nanopartículas por coacervação complexa, que envolve a interação eletrostática entre os polímeros de carga oposta e depende de vários fatores como a densidade de carga dos polímeros e a relação entre a massa deles, a força iônica e o pH do meio, entre outros (FERREIRA; NICOLETTI, 2021).

Tem sido relatado que a faixa de pH adequada para a obtenção de coacervados de quitosana e goma arábica está entre 3,5 e 5,0 (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2007), estando o pH de todas as formulações dentro desta faixa.

A solução de quitosana (pH=3,88) apresentou carga eletrocinética líquida igual a $54,83 \pm 5,86$. Em condições ácidas de pH (abaixo do seu pKa), os grupos aminas ($-NH_2$) da quitosana se encontram protonados ($-NH_3^+$), o que lhe confere alta densidade de carga positiva (SAHARIAH; MÁSSON, 2017). A solução de goma arábica (pH=4,9), por sua vez, apresentou carga eletrocinética líquida igual a $-21,03 \pm 4,78$ mV atribuída aos grupos carboxilas desprotonados ($-COO^-$) da goma arábica, que ocorrem em pH acima de 2,2 (TAN et al., 2016). Os valores são semelhantes aos obtidos por Rabelo et al. (2019) e Baiocco et al. (2021) nas mesmas condições

de pH. A redução da carga líquida do sistema verificada para a nanopartícula branca em relação à solução de quitosana pode ser explicada pela interação entre as cargas da quitosana e da goma arábica, indicando a formação de nanopartículas (XU et al., 2018). Em complementação, a redução da carga de superfície observada à medida que a massa inicial de óleo aumentou pode ser devido à diminuição da disponibilidade dos grupos aminas da quitosana, que podem estar interagindo com o óleo, o que leva à redução da carga superficial líquida (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019; SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019b; SOTELO-BOYÁS et al., 2017).

5.3 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GOMA ARÁBICA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DO MARACUJÁ (NP-OSM)

As formulações foram avaliadas a longo prazo por 7, 21, 30 e 60 dias para identificar possíveis modificações em seus aspectos macroscópicos e parâmetros físico-químicos. Em relação aos aspectos macroscópicos, no dia 7 verificou-se que a formulação NP-OSM-0,75 apresentava leve cremagem, facilmente dispersível. A formação de cremagem pode estar associada ao excesso de óleo, uma vez que NP e NP-OSM-0,50 permaneceram sem alterações substanciais em seus aspectos macroscópicos.

Quanto às características físico-químicas, todas as formulações mantiveram tamanho de partícula abaixo de 250 nm, PDI abaixo de 0,5 e potencial zeta positivo ao longo dos 60 dias de avaliação (Tabela 6). Aparentemente, o sistema ainda não havia atingido o equilíbrio na primeira leitura, o que é alcançado entre 0 e 7 dias, evidenciado pela estabilização do tamanho de partícula e do potencial zeta, bem como pela redução do PDI (RAMPINO et al., 2013). Na literatura, tem-se que valores altos de potencial zeta, isto é, acima de 30 mV em módulo, promovem estabilidade longa, enquanto valores abaixo de 20 mV promovem curta estabilidade (SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019b). No entanto, o potencial zeta não é o único fator responsável pela estabilidade do sistema coloidal. Outras forças repulsivas de curto alcance como interações de hidratação, de flutuação térmica e estéricas, que são geradas quando um surfactante não-iônico como o Tween 80 é adicionado ao sistema, desempenham um papel importante ao lado do potencial zeta na

estabilidade das nanopartículas, o que pode justificar a estabilidade do sistema mesmo com valores baixos de potencial zeta (KUROIWA et al., 2015; SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019b).

Tabela 6 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos durante 60 dias de estudo para cada uma das formulações.

Parâmetro	Tempo Dias	Formulação		
		NP	NP-OSM-0,50	NP-OSM-0,075
Ø (nm)	0	173,3 ± 26,1	213,6 ± 28,4	246,0 ± 15,4
	7	167,9 ± 4,6	168,9 ± 21,4	204,7 ± 24,3
	21	193,5 ± 22,6	157,9 ± 19,8	174,8 ± 7,0
	30	217,7 ± 44,8	154,5 ± 21,0	179,2 ± 9,22
	60	242,7 ± 36,8	154,5 ± 18,4	179,2 ± 10,5
PDI	0	0,404	0,479	0,460
	7	0,172	0,343	0,330
	21	0,129	0,352	0,316
	30	0,104	0,308	0,314
	60	0,259	0,285	0,334
Potencial ζ (mV)	0	47,72 ± 5,76	16,57 ± 6,03	15,01 ± 7,64
	7	34,98 ± 1,96	5,99 ± 0,85	6,42 ± 0,88
	21	35,90 ± 5,49	7,64 ± 2,45	5,66 ± 1,28
	30	32,60 ± 2,15	4,91 ± 0,75	6,07 ± 1,09
	60	40,33 ± 1,16	6,50 ± 0,40	5,78 ± 0,76
pH	0	4,00	4,50	4,50
	7	4,00	4,25	4,25
	21	4,00	4,00	4,00
	30	4,00	4,00	4,00
	60	4,00	4,00	4,00

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; Potencial ζ: potencial zeta (carga superficial). Resultados representados como valor médio ± desvio-padrão.

Fonte: A autora (2021).

Ao fim do período de armazenamento, NP-OSM-0,5 proporcionou a formação de nanopartículas com tamanhos menores, carga superficial positiva e se mostrou mais estável ao longo do tempo, sendo caracterizada e utilizada nos demais testes, citada apenas como NP-OSM.

5.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

A liofilização, processo de remoção de água (gelo) através de sublimação, é uma tecnologia bastante utilizada para garantir a estabilidade de suspensões de nanopartículas durante longos períodos de armazenamento (RAMPINO et al., 2013; REZENDE et al., 2003). No entanto, em alguns casos a liofilização pode causar a agregação ou fusão irreversível das nanopartículas e estresses mecânicos que impossibilitam a manutenção das suas características iniciais (UMERSKA et al., 2018). A liofilização de NP-OSM aumentou em cerca de 3,15 vezes o tamanho das nanopartículas (resultado não mostrado). O tamanho é uma das características determinantes para a aplicação das nanopartículas. Diante disso, foram realizados testes adicionando crioprotetores às dispersões antes da liofilização.

O efeito da adição de manitol e trealose desidratada, ambos a 5,0% (m/v) pode ser visualizado na Tabela 7. Crioprotetores, geralmente carboidratos (glicose, frutose, sacarose, manitol), formam uma camada amorfa ao redor das nanopartículas, garantindo um espaçamento entre as mesmas, evitando assim a agregação e danos à estrutura das nanopartículas ao longo do ciclo de desidratação e reidratação (REZENDE et al., 2003). Diferentemente de Rampino et al. (2013), que obteve melhores resultados com trealose, resultados de tamanho e distribuição de tamanho das partículas mostraram que o manitol teve melhor desempenho na prevenção da formação dos aglomerados de nanopartículas, porém não o suficiente para fazê-las manter o seu tamanho original.

Em teste realizado com o dobro de manitol (10,0% (m/v)), o tamanho de partícula foi ainda maior, além de a amostra ter se mostrado instável (material aderiu à parede do tubo). O excesso de crioprotetor também pode ser prejudicial no processo de liofilização, causando a agregação das nanopartículas (GOKCE et al., 2014). Novos experimentos devem ser realizados a fim de avaliar a influência de uma faixa mais ampla de concentrações de manitol. Novos experimentos são necessários para avaliação da influência de uma faixa mais ampla de concentrações de manitol, a fim de determinar a concentração ótima. Diante disso, a liofilização foi adotada apenas para a obtenção de nanopartículas para caracterização quando as técnicas analíticas assim o exigiam.

Tabela 7 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga superficial obtidos para a formulação NP-OSM antes e após liofilização utilizando crioprotetores.

Formulação	Parâmetro	Em suspensão	Condições de liofilização	
			Manitol 5,0% (m/v)	Trealose 5,0% (m/v)
NP-OSM	$\varnothing$ (nm)	129,9 $\pm$ 1,6	376,2 $\pm$ 35,6	579,6 $\pm$ 49,9
	PDI	0,351	0,091	0,305
	Potencial ζ (mV)	22,37 $\pm$ 1,76	28,53 $\pm$ 0,29	32,00 $\pm$ 0,82
	pH	3,75 $\pm$ 0,00	4,75 $\pm$ 0,00	4,75 $\pm$ 0,00

$\varnothing$: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; Potencial ζ : potencial zeta (carga superficial). Resultados representados como valor médio $\pm$ desvio-padrão.

Fonte: A autora (2021).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

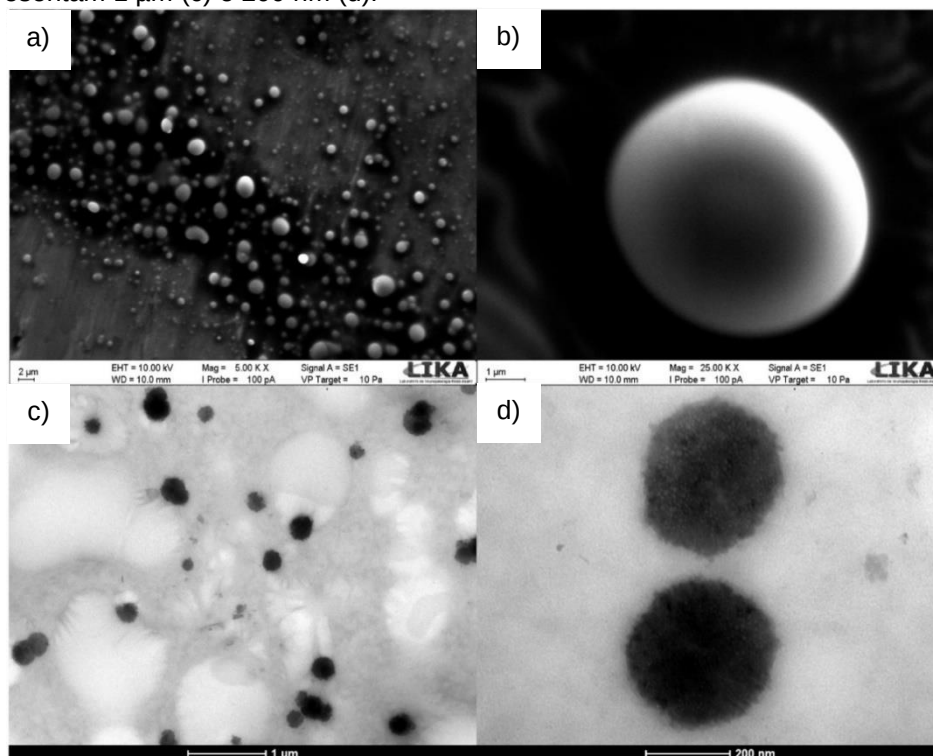
5.5.1 Morfologia

A morfologia das NP-OSM foi avaliada pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (Figura 6).

As Figuras 6a e 6b apresentam as imagens das NP-OSM obtidas por MEV sob diferentes magnificações. As micrografias evidenciaram a estrutura esféricas das NP-OSM, bem como a ausência de fraturas na superfície das mesmas, confirmando o sucesso da encapsulação (MEHRAN; MASOUM; MEMARZADEH, 2020). Percebe-se a presença de populações de partículas com tamanhos diferentes, o que caracteriza o PDI encontrado para a formulação na análise por DLS.

As Figuras 6c e 6d, por sua vez, mostram imagens das NP-OSM obtidas por MET. As partículas apresentaram estrutura densa, semelhante ao observado por Tang et al. (2003) para nanopartículas de quitosana-TPP, forma aproximadamente esférica, tamanho submicrométrico e alguns aglomerados. Nota-se ainda a presença de uma névoa, a qual, acredita-se, possa estar relacionada ao excesso de polímeros, que permaneceram em estado difuso e que também tem sua contribuição para valores mais altos de PDI (ANTONIOU et al., 2015). Resultados de MEV e MET estão consistentes com os obtidos por DLS.

Figura 6 - Imagens das nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente de maracujá (NP-OSM) obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) - barras de escala representam 2 μm (a) e 1 μm (b) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) - barras de escala representam 1 μm (c) e 200 nm (d).



Fonte: A autora (2021).

5.5.2 Estrutura química

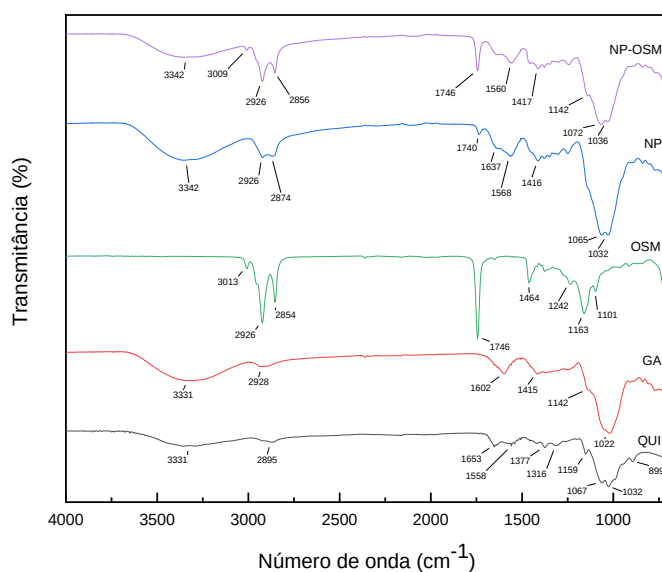
A técnica de espectroscopia de infravermelho está baseada na interação entre grupos funcionais presentes na amostra analisada com radiações eletromagnéticas. Ela permite identificar e classificar vibrações moleculares (estiramento, flexão e torções das ligações químicas) características desses grupos, fornecendo assim, informações estruturais sobre a amostra (LUCARINI et al., 2020).

A Figura 7 apresenta os espectros de infravermelho obtidos para quitosana (QUI), goma arábica (GA), óleo da semente do maracujá puro (OSM) e nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) e nanopartículas contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM).

O espectro obtido para a quitosana mostra bandas características do polímero. O pico largo em 3331 cm^{-1} , é atribuído à deformação axial do O-H, e aparece sobreposto à banda de deformação axial do N-H (grupo amina). O pico próximo a 2895 cm^{-1} , por sua vez, representa o estiramento alifático das ligações C-

H presentes na estrutura da quitosana (BAIOCCO; PREECE; ZHANG, 2021). No espectro da quitosana é possível identificar ainda bandas características de amidas em 1653 cm^{-1} (vibração do estiramento C=O, das unidades acetiladas, amida I), 1558 cm^{-1} (vibração da flexão N-H, amida II) e 1377 cm^{-1} (vibração do estiramento C-N, amida III) (RABELO et al., 2019). A observação do pico em 1653 cm^{-1} é um indicativo da presença de unidades acetilada na estrutura da quitosana, o que já era esperado, considerando o grau de desacetilação do polímero utilizado no trabalho (75-85%) (MAHARDIKA; JUMNAHDI; WIDYANINGRUM, 2019). Os picos abaixo de 1150 cm^{-1} são considerados característicos de polissacarídeos, e estão presentes tanto no espectro da quitosana, como no espectro da goma arábica e de suas nanopartículas (RABELO et al., 2019).

Figura 7 - Espectros de infravermelho obtidos para a quitosana (QUI —), goma arábica (GA —), óleo da semente do maracujá (OSM —), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP —) e nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM —).



Fonte: A autora (2021).

As bandas na região de 3331 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} também são observadas no espectro da goma arábica. Os picos característicos em 1602 cm^{-1} e 1415 cm^{-1} são atribuídos à vibração do estiramento assimétrico e simétrico do sal do ácido carboxílico (COO^-), respectivamente (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010).

No espectro das NP, modificações na região carbonil-amida, como o pequeno deslocamento do pico da amida I de 1653 cm^{-1} para 1637 cm^{-1} , bem como o desaparecimento do pico em 1602 cm^{-1} , atribuído ao grupo C=O do ácido glucorônico da goma arábica, sugerem a interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ e COO^- dos polímeros (BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2020).

Em relação ao espectro obtido para o OSM, a ausência de bandas entre 3400 e 3300 cm^{-1} , geralmente atribuídas a hidroxiperóxidos, é um indicativo da boa qualidade do óleo (PUROHIT et al., 2021). A faixa entre 2800 e 3100 cm^{-1} corresponde à região de estiramento C-H. Nesta região foram observados vários picos, o que pode ser explicado pela complexidade química dos triglicerídeos presentes no óleo (LUCARINI et al., 2019). O pico intenso em 1746 cm^{-1} , por sua vez, é atribuído às ligações duplas C=O dos grupos ésteres e está relacionada à presença dos ácidos graxos e seus glicerídeos (LUCARINI et al., 2020). As bandas em 1163 e em 1101 cm^{-1} representam a vibração do estiramento -C-O e reforçam a presença de ésteres (ELGEGREN et al., 2019; PUROHIT et al., 2021). A região abaixo de 1600 cm^{-1} , conhecida como região de *fingerprint* ou de impressão digital, é bastante rica em informações estruturais. Pequenas diferenças, quase imperceptíveis a olho nu, podem ser úteis na diferenciação de óleos de diferentes sementes, como o óleo de girassol, de oliva e de maracujá, uma vez que seus espectros são bastante parecidos (KIEFER et al., 2019).

As NP-OSM apresentaram perfil de bandas semelhante ao do OSM, evidenciando o sucesso da incorporação do óleo às nanopartículas. Observa-se ainda redução da intensidade dos picos característicos do OSM, sugerindo que este pode estar interagindo com a quitosana (KUROIWA et al., 2021). Todos os picos característicos do OSM e das NP apareceram no mesmo (ou muito próximos) número de onda, um indicativo de que não houve reação química entre os grupos funcionais do óleo e dos materiais de parede, sendo o processo de interação e de aprisionamento do óleo predominantemente físico (HOSSEINI et al., 2013; TAVARES et al., 2019).

A Tabela 8 reúne os principais grupos químicos identificados nos espectros dos materiais de parede e do óleo puro, aos quais foram atribuídas as bandas observadas nos respectivos espectros.

Tabela 8 - Atribuição das bandas do infravermelho dos materiais puros.

Atribuições	n° de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
Quitosana	3331	Vibração do estiramento O-H sobreposto ao estiramento N-H
	2895	Vibração do estiramento C-H
	1653	Vibração do estiramento C=O (amida I)
	1558	Vibração da flexão N-H (amida II)
	1377	Vibração do estiramento C-N (amida III)
	1159	Vibração do estiramento simétrico C-O-C
	1036	Vibração do estiramento C-O
Goma arábica	3331	Vibração do estiramento O-H sobreposto ao estiramento N-H
	2928	Vibração do estiramento C-H
	1602 e 1415	Vibração dos estiramentos assimétrico e simétrico do COO ⁻
Óleo da semente do maracujá	3100-2800	Vibração do estiramento C-H
	1746	Vibração do estiramento C=O
	1163 e 1101	Vibração do estiramento -C-O

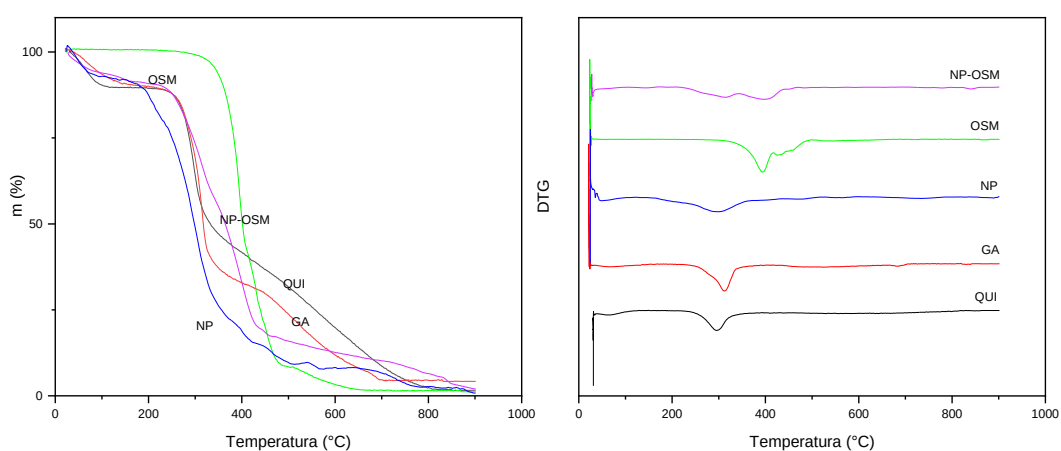
Fonte: A autora (2021).

5.5.3 Propriedades térmicas

A análise termogravimétrica (TGA) apresenta a relação entre a perda de massa de uma amostra e mudanças de temperatura. Já a DTG, curva obtida a partir da primeira derivada da curva de TGA em relação à temperatura (ou ao tempo) caracteriza a taxa de perda de massa durante o aquecimento e permite identificar com clareza, na forma de picos, temperaturas em que ocorrem as perdas máximas de massa (HOSSEINI et al., 2013). Essas temperaturas são denominadas temperaturas de degradação (T_d), parâmetro importante sobre a estabilidade térmica dos materiais, que ajudam no direcionamento da aplicação industrial dos mesmos (XU et al., 2018; YOKSAN; JIRAWUTTHIWONGCHAI; ARPO, 2010).

A Figura 8 apresenta as curvas termogravimétricas (TG e DTG) obtidas para os materiais de parede (QUI e GA), o óleo da semente do maracujá (OSM) e nanopartículas de quitosana-goma arábica com e sem o óleo encapsulado (NP-OSM e NP).

Figura 8 - Termogramas (TG e DTG) obtidos para a quitosana (QUI —), goma arábica (GA —), óleo da semente do maracujá (OSM —), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP —) e nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM —).



Fonte: A autora (2021).

Os materiais de parede apresentaram perfis semelhantes de perda de massa, dividido em 3 etapas. A etapa inicial (abaixo de 175°C) com perda de massa de aproximadamente 10% pode ser atribuída à liberação de água adsorvida e ligada e evidencia o caráter hidrofílico dos polímeros (GOMATHI et al., 2017; HOSSEINI et al., 2013). Na segunda e principal etapa de perda de massa, as temperaturas de degradação da QUI e da GA foram 296 e 313 °C, respectivamente. Esses eventos resultam em 40 e 50% de perda de massa, que estão relacionadas à decomposição e despolimerização dos materiais de parede, o que inclui a clivagem, decomposição e despolimerização de alguns anéis de carboidratos, bem como a degradação das unidades desacetiladas e acetiladas da QUI (TAVARES et al., 2019; XIAO et al., 2019). A última etapa (acima de 325 °C) ocorre de forma mais lenta e corresponde à decomposição do carbono residual (VILLAR-CHAVERO et al., 2018).

Ramakrishnan et al. (2021), Tavares et al. (2019) e Villegas et al. (2021) encontraram taxas máximas de decomposição da QUI em temperaturas que variaram entre 300 e 318 °C. Villegas et al. (2021) mostraram ainda que diferenças no peso molecular e grau de desacetilação da quitosana influenciam a sua T_d .

O termograma e a T_d obtidos para a GA estão de acordo com as curvas obtidas para a goma acácia comercial, assim como para gomas de outras espécies (goma *Acacia nilotica*, goma *Sterculia striata*, goma Hsian-tsao) (BHUSHETTE; ANNAPURE, 2020; FREITAS et al., 2020; JOSEPH et al., 2021; YOU; LING; MING, 2018).

As NP, também apresentaram 3 eventos térmicos, sendo o principal entre 180°C e 350 °C ($T_d=299^\circ\text{C}$), atribuído à decomposição do material de parede. Em comparação com os polímeros individuais, a T_d das nanopartículas foi maior que a da QUI e menor que a da GA. Esta diferença pode ser considerada um indicativo da complexação, estando associado à mudança na organização natural dos polímeros (RAMAKRISHNAN et al., 2021; XIAO et al., 2019).

O OSM exibiu 3 etapas de perda de massa. A primeira delas entre 270 e 400°C ($T_d=396^\circ\text{C}$), a segunda entre 400 e 470°C e a terceira entre 480 e 600 °C. Os dois primeiros eventos respondem pela redução de aproximadamente 90% da massa do óleo da semente de maracujá e estão associados à decomposição dos componentes acilglicerois do óleo. É nesta região que ocorre a degradação dos ácidos insaturados presentes no óleo, tais como os ácidos linoleico e oleico (PEREIRA et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2020). A terceira etapa de perda de massa entre 480 e 600 °C é atribuída à decomposição de ácidos graxos saturados (SANTOS et al., 2002). Em temperaturas acima de 600 °C, a massa residual (cinzas e resíduos) do óleo da semente do maracujá é muito pequena, o que evidencia a baixa quantidade de material inorgânico em sua composição (VASCONCELOS et al., 2020).

Das curvas termogravimétricas do OSM pode-se destacar ainda a elevada estabilidade do óleo. Nenhum evento térmico é observado abaixo de 275 °C, temperatura muito acima das utilizadas em processos industriais. Apesar do conteúdo elevado de ácidos graxos insaturados, óleos extraídos por prensagem a frio conseguem manter altos níveis de compostos antioxidantes, como δ e γ -

tocoferóis, predominantes no caso do OSM, que previnem a oxidação dos ácidos graxos insaturados, conferindo estabilidade oxidativa aos óleos (MALACRIDA; JORGE, 2012; PEREIRA et al., 2017; PIOMBO et al., 2006; SILVA; JORGE, 2016).

Quando comparadas às NP, as NP-OSM apresentaram uma região adicional de perda de massa, entre 360 e 440°C, atribuída à decomposição do óleo. Além disso, nota-se o deslocamento do evento térmico atribuído à decomposição do material de parede, que anteriormente apresentava T_d igual a 299 °C e passou para 313°C. A quitosana, em certas condições pode apresentar caráter hidrofóbico, interagindo fisicamente com substâncias de mesma natureza, a exemplo dos óleos, como observado anteriormente na análise de FTIR, o que pode ter contribuído para o aumento da temperatura de degradação do invólucro e, portanto, da estabilidade térmica do sistema (AMIRI et al., 2020; PAULA et al., 2011).

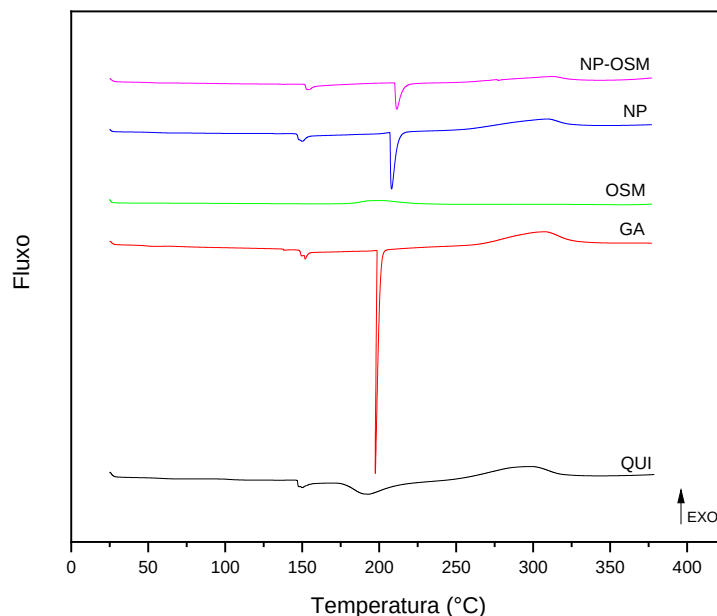
A análise de DSC permite identificar transições físicas ou químicas que ocorrem nas amostras em função da temperatura (SHADDEL et al., 2018). Efeitos endotérmicos (pico para baixo) geralmente estão relacionados à desidratação e mudanças de fases, enquanto efeitos exotérmicos (pico para cima) correspondem à degradação dos materiais (RUTZ et al., 2016).

As curvas de DSC obtidas para os materiais são apresentadas na Figura 9.

Os termogramas de QUI e GA apresentaram picos endotérmicos, característicos de desidratação, abaixo de 200 °C e picos exotérmicos, atribuídos à decomposição dos polímeros, em 288 e 307°C para quitosana e goma arábica, respectivamente. Tais resultados coincidem com os dados obtidos a partir das análises de TGA e DTG. Perfis semelhantes de decomposição para QUI e GA foram relatados por You et al. (2018), Daoub et al. (2018) e Villegas et al. (2021).

A curva de DSC do OSM apresentou um único pico exotérmico largo em 200 °C, que pode ser atribuído à decomposição de compostos insaturados (RUTZ et al., 2016).

Figura 9 – Termogramas (DSC) obtidos para a quitosana (QUI —), goma arábica (GA —), óleo da semente do maracujá (OSM —), nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP —) e nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM —).



Fonte: A autora (2021).

Tem sido relatado que a incorporação adequada de compostos bioativos em polímeros encapsulantes leva ao deslocamento e/ou desaparecimento dos eventos endotérmicos e exotérmicos característicos do composto encapsulado nas curvas de DSC (SHADDEL et al., 2018). O pico característico do OSM não foi observado no termograma das NP-OSM na faixa de temperatura estudada, o que sugere que o mesmo foi eficientemente incorporado à matriz polimérica. Oliveira et al. (2017) relacionaram a ausência do pico característico do OSM no termograma de DSC de nanopartículas de PLGA contendo o óleo à alta eficiência de encapsulação determinada por espectrometria na região do UV-Vis (91%). Comportamento também observado por Hadidi et al. (2020) ao encapsular óleo de cravo em nanopartículas de quitosana-TPP.

5.5.4 Atividade antifúngica

5.5.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antifúngica das substâncias testes foi avaliada frente aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum siamense* e *Aspergillus niger*. Os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos encontram-se na Tabela 9.

Ambos os fungos se mostraram sensíveis ao OSM, que apresentou concentração inibitória mínima igual a 4,5 mg/mL tanto para o *C. siamense* como para o *A. niger*. Os óleos vegetais são uma mistura complexa de compostos químicos ativos que podem atuar de forma sinérgica, lhes conferindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas contra um amplo espectro de microrganismos (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN, 2020; PRAKASH et al., 2018).

Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (CIM) (mg/mL).

Substância teste	<i>C. siamense</i>		<i>A. niger</i>	
	[OSM]	[NP]	[OSM]	[NP]
OSM	4,50	-	4,50	-
NP-OSM	3,00	2,00	4,50	3,00
NP	-	2,50	-	3,00

[OSM]: concentração do óleo da semente do maracujá; [NP]: concentração das nanopartículas de quitosana-goma arábica.

Fonte: A autora (2021).

A capacidade antimicrobiana dos óleos vegetais é geralmente atribuída às altas concentrações de ácidos graxos e seus acilglicerídeos (CORDOVA-ALBORES et al., 2016). As cadeias alquílicas dos ácidos graxos, principalmente dos poli-insaturados, podem ser incorporadas às membranas fosfolipídicas dos microrganismos, aumentando sua permeabilidade, o que leva ao extravasamento de componentes celulares importantes, resultando em uma desordem metabólica e, por consequência, na morte celular (DABETIC et al., 2020; XING et al., 2016).

A maioria dos trabalhos que tratam da atividade antimicrobiana de óleos vegetais se referem à atividade contra bactérias e leveduras (ALQAHTANI et al., 2019; KARAOSMANOGLU et al., 2010; NAZZARO et al., 2019; PUROHIT et al., 2021). Dados sobre a atividade contra fungos filamentosos de tais óleos ainda são escassos. Petropoulos et al. (2021) avaliaram a atividade antifúngica de 4 óleos

vegetais extraídos das sementes de linhaça (*Linum usitatissimum* L.), onze-horas (*Portulaca olearacea* L.), luffa (*Luffa aegyptica* Mill.) e abóbora (*Cucurbita máxima* L.) contra diversos fungos fitopatogênicos. Em relação ao *A. niger*, os óleos apresentaram valores de CIM inferiores ao encontrado neste trabalho, variando entre 0,5 e 2,0 mg/mL. Enquanto a CIM dos antifúngicos sintéticos benzoato de sódio (E211) e metabissulfito de potássio (E224) foram iguais a 1,0 mg/mL. Os autores atribuíram os efeitos antifúngicos dos óleos estudados aos lipídeos presentes nos óleos.

Abdelillah et al. (2013) associaram a ação antifúngica do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) contra *Aspergillus spp.* às altas concentrações dos ácidos linoleico e linolênico. Este primeiro, aparece como composto majoritário no perfil de ácidos graxos obtido para o OSM (63,35%).

Óleo da semente de uva (*Vitis Vinifera* L. r ssp. sativa) variedade Sauvignon Blanc quando aplicado puro contra *Candida albicans* conseguiu promover um halo de inibição de $17,50 \pm 3,54$ mm (DABETIC et al., 2020). Nesse mesmo estudo, os autores encontraram boa correlação ($r=0,501$) entre o ácido linoleico e, consequentemente, ácidos graxos poli-insaturados e a atividade antibacteriana do óleo da semente de uva contra *S. aureus*. De forma interessante, fenólicos totais e tocoferóis apresentaram boa ($r=0,490$) e forte ($r=0,747$) correlação com a atividade antibacteriana do óleo contra o mesmo microrganismo.

Hajji et al. (2020) associaram a presença de δ e γ -tocopheróis à atividade antifúngica de óleo da semente de *Peganum harmala*. δ e γ -tocopheróis são os tocoferóis predominantes no OSM, caracterizado anteriormente por Silva & Jorge (2016), Pereira et al. (2019) e Pereira et al. (2017). Compostos fenólicos, através dos grupos hidroxilas, podem atuar na parede celular dos fungos (OLIVEIRA et al., 2019; SKEELS et al., 2020). Tais resultados sugerem que compostos antioxidantes presentes no OSM, além dos lipídeos, podem ter contribuído para sua atividade antifúngica.

Óleos vegetais costumam apresentar sabores e odores marcantes, e sua aplicação em altas concentrações no controle de microrganismos em alimentos pode causar alterações nas propriedades organolépticas do produto, reduzindo sua

aceitação comercial. A encapsulação, além de proteger os compostos bioativos de condições de processamento adversas, pode minimizar tais modificações, ao promover a liberação controlada do óleo, ou ainda em alguns casos, diminuir a concentração necessária (DELSHADI et al., 2020; HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019; MAHATO et al., 2019). Nanopartículas de quitosana constituem um dos sistemas mais comumente utilizados para a encapsulação de óleos vegetais, devido à sua disponibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade (CHAUDHARI et al., 2021; DELSHADI et al., 2020).

Após a incorporação do OSM às nanopartículas de quitosana-goma arábica, observou-se a redução da CIM do óleo de 4,50 mg/mL para 3,0 mg/mL para o *C. siamense* e a manutenção da CIM em 4,50 mg/mL para o *A. niger* (Tabela 9).

Hasheminejad et al. (2019) verificaram que nanopartículas de quitosana contendo o óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*) proporcionaram maior índice de inibição do crescimento de micélios de *A. niger* quando comparado ao óleo livre. Mesmo na maior concentração aplicada (3 mg/mL), enquanto as nanopartículas contendo o óleo inibiram totalmente (100%) o crescimento fúngico, o percentual de inibição do óleo livre foi menor que 70%. O mesmo foi observado por Hadidil et al. (2020) ao avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*) contra bactérias de origem alimentar (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhi* e *E. coli*). Os autores atribuem a melhora da atividade antimicrobiana do óleo à proteção conferida pelo invólucro, que previne a perda de compostos voláteis ativos do óleo, prolongando sua atividade.

Por outro lado, Shetta et al. (2019) observaram que a encapsulação do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) em nanopartículas de quitosana reduziu o efeito antibacteriano do óleo contra *E. coli*. Este comportamento foi associado à composição da parede celular do microrganismo e à forte interação química entre o óleo e as nanopartículas de quitosana, além do perfil lento de liberação das moléculas do óleo a partir das nanopartículas.

Nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) apresentaram boa atividade antifúngica contra ambos os fungos, com CIM igual a 2,5 mg/mL e 3,0

mg/mL para *C. siamense* e *A. niger* respectivamente. Estes resultados estão em conformidade com os dados reunidos por Verlee et al. (2017), que mostraram que a quitosana apresenta atividade antifúngica contra diferentes fungos, e CIM variando entre 0,01 e 7,5 mg/mL.

Nascimento et al. (2020) reportaram que a exposição de *C. gloesporioides* à quitosana a 10 mg/mL (equivalente ao dobro da CIM) foi capaz de inibir completamente o crescimento radial dos micélios. O mesmo efeito foi observado por Berger et al. (2018) para *C. siamense* quando quitosana fúngica ou de crustáceo foram aplicadas na mesma concentração (10 mg/mL). Nanopartículas de quitosana-TPP (3 mg/mL), por sua vez, proporcionaram aproximadamente 80% de inibição no crescimento radial micelial de *A. niger* (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019).

O valor da CIM para as NP frente a *A. niger* encontrado neste trabalho (3,0 mg/mL) foi ligeiramente maior que o determinado por Melo et al. (2020) (2,5 mg/mL) para nanopartículas de quitosana fúngica e TPP e por Ing et al. (2012) (entre 1,7143 e 2,4286 mg/mL) que expôs os fungos às nanopartículas de quitosana de alto peso molecular e TPP.

Embora a atividade antimicrobiana da quitosana e suas nanopartículas esteja bem documentada na literatura, o mecanismo exato da sua ação sobre os microrganismos ainda não está totalmente esclarecido. Dentre os mecanismos propostos, aquele geralmente aceito propõe que os grupos aminos protonados da quitosana lhe conferem densidade elevada de carga positiva, o que permite que ela se ligue eficientemente às moléculas negativamente carregadas (fosfolipídios, proteínas, aminoácidos) das membranas celulares microbianas, alterando sua polaridade e permeabilidade, o que causa inicialmente o extravasamento de íons pequenos, como K^+ e PO_4^{3-} , seguido de moléculas maiores como ácidos nucleicos e outras substâncias importantes. A quitosana pode ainda adentrar a célula, interagir com ácidos nucleicos, interrompendo a síntese de RNA e proteínas. Tais processos resultam na morte celular (FERREIRA et al., 2020; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017; ZAHID et al., 2012).

A atividade antifúngica da quitosana e de seus derivados depende de diversos fatores que incluem suas propriedades físico-químicas (grau de

desacetilação, massa molecular), bem como a espécie fúngica contra as quais irá atuar (YOUNES et al., 2014). Propriedades de superfície desses microrganismos, como composição da parede e membrana celulares representam um fator importante na sensibilidade de fungos filamentosos à quitosana (ARANDA-MARTINEZ; LOPEZ-MOYA; LOPEZ-LLORCA, 2016).

Palma-Guerrero et al. (2010) observaram que fungos sensíveis à quitosana apresentavam conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico) significativamente mais elevados que o conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados e saturados em comparação com os fungos resistentes à quitosana, sugerindo que a permeabilização das membranas fúngicas pela quitosana seja dependente da sua fluidez. Segundo Lopez-Moyá et al. (2019), o baixo conteúdo de glucanas na parede celular dos fungos aumenta a sensibilidade à quitosana. Já Allan & Hadwiger (1979) verificaram que fungos que apresentam quitosana como um dos componentes da parede celular são mais resistentes a esse biopolímero. Esta última observação ajuda a explicar o valor superior de CIM encontrado para o *A. niger* em relação ao *C. siamense*, bem como o fato da encapsulação do óleo da semente do maracujá em nanopartículas de quitosana não ter proporcionado melhoras na atividade inibitória do óleo para o *A. niger* após a nanoencapsulação, uma vez que esse fungo apresenta cerca de 10% de quitosana em sua composição (KLIS; RAM; GROOT, 2007).

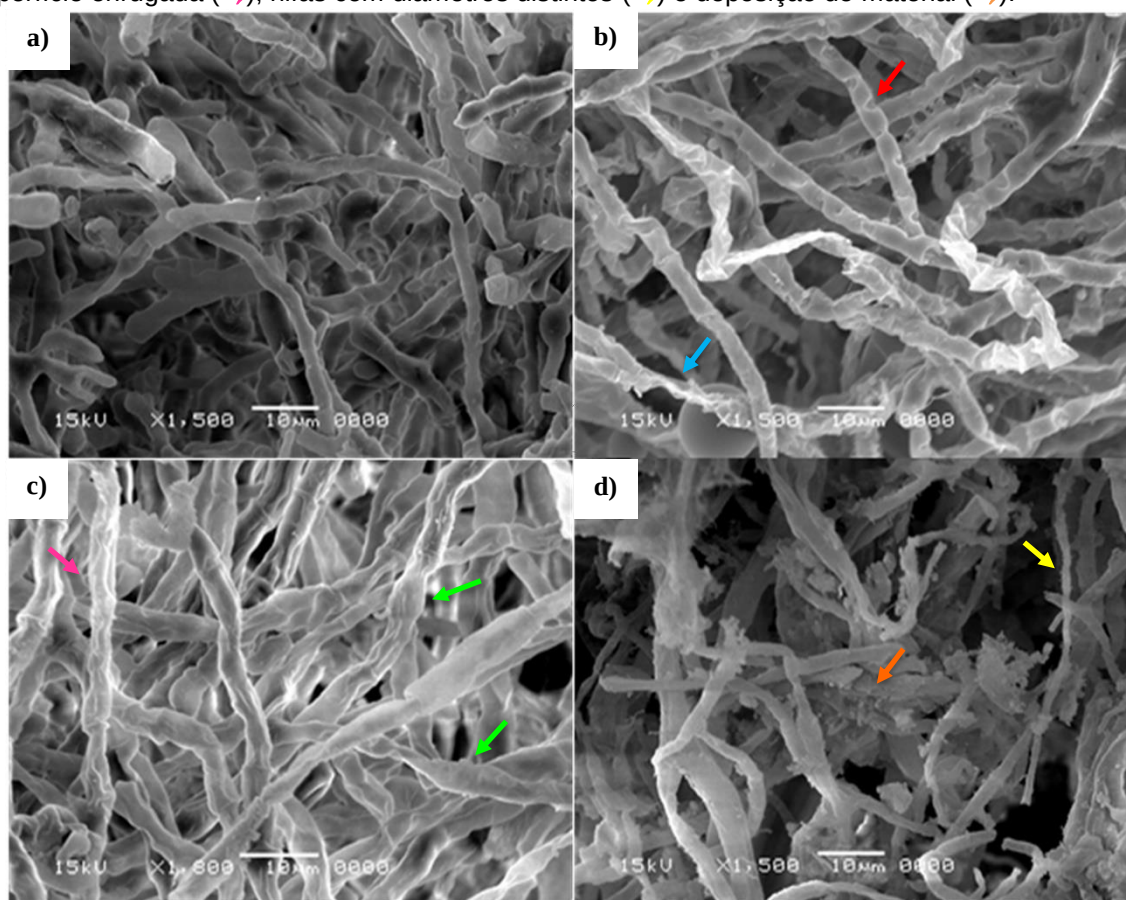
5.5.4.2 Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica

Os efeitos das substâncias testes na morfologia de *C. siamense* e *A. niger* podem ser observados nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

As hifas de *C. siamense* crescidas na ausência de substâncias teste apresentaram estrutura típica, superfície lisa, sem deformações ou danos aparentes (Figura 10a). Todas as substâncias testes aplicadas nas concentrações sub-inibitórias foram capazes de induzir alterações na morfologia de *C. siamense*. Hifas expostas ao óleo da semente do maracujá (OSM) (2,25 mg/mL) apresentaram aspecto irregular e depressões ao longo de sua superfície (Figura 10b). Comportamento semelhante ao observado por Cordova-Albores et al. (2016) ao expor *Fusarium oxysporum f sp. gladioli* ao óleo de *Jatropha curcas*. Em algumas

regiões é possível observar ainda o achatamento das hifas, característico da perda de material citoplasmático.

Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de *C. siamense*. Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente de maracujá (OSM) (2,25 mg/mL) (b); a nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) (0,50 mg/mL) (c) e a nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) (2,25 mg/mL do óleo e 1,50 mg/mL do material de parede) (d). As setas indicam: depressões (→), regiões de achatamento das hifas (→), pontos de inchaço (→), superfície enrugada (→), hifas com diâmetros distintos (→) e deposição de material (→).



Fonte: A autora (2021).

Hifas crescidas na presença de nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) (0,5 mg/mL) mostraram-se distorcidas, com diâmetros distintos e superfície enrugada (Figura 10c). Estudos anteriores relataram a capacidade da quitosana e de suas nanopartículas, não apenas de inibir o crescimento fúngico, como também de causar danos morfológicos e estruturais às hifas. (BERGER et al., 2018) reportaram que hifas de *C. frutícola* tratadas com quitosana fúngica (7500 ppm) também apresentaram rugosidade, além de depressões em sua superfície. Tais alterações sugerem que a forma pela qual as nanopartículas de quitosana e

goma arábica inibem o crescimento de *Colletotrichum* provém da interação direta com a parede celular fúngica. Como citado anteriormente, a elevada carga superficial das nanopartículas de quitosana lhe confere a capacidade de se ligar eletrostaticamente aos fosfolipídios presentes na membrana celular fúngica, gerando uma desestabilização da membrana e alterando de sua permeabilidade (PALMA-GUERRERO et al., 2010; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). Membrana e parede celulares estão intimamente ligadas, visto que, complexos de sintase associados à membrana plasmática são responsáveis pela formação de componentes importantes da parede celular (por exemplo, quitina e β -glucanas). Assim sendo, perturbações causadas à membrana e a tais reações enzimáticas podem afetar a forma e o crescimento dos fungos (LOPEZ-MOYA; SUAREZ-FERNANDEZ; LOPEZ-LLORCA, 2019).

As nanopartículas brancas (NP) ainda foram capazes de causar pontos de inchaços ao longo das hifas. Modificação similar foi identificada por Nascimento et al. (2020) em hifas de *C. gloesporioides* expostas à solução de quitosana em ácido cítrico (2,5 mg/mL) e que pode estar relacionada à perda do balanço osmótico da célula, também em consequência do aumento da permeabilidade da membrana (GÁLVEZ-IRIQUI et al., 2019; PEI et al., 2020).

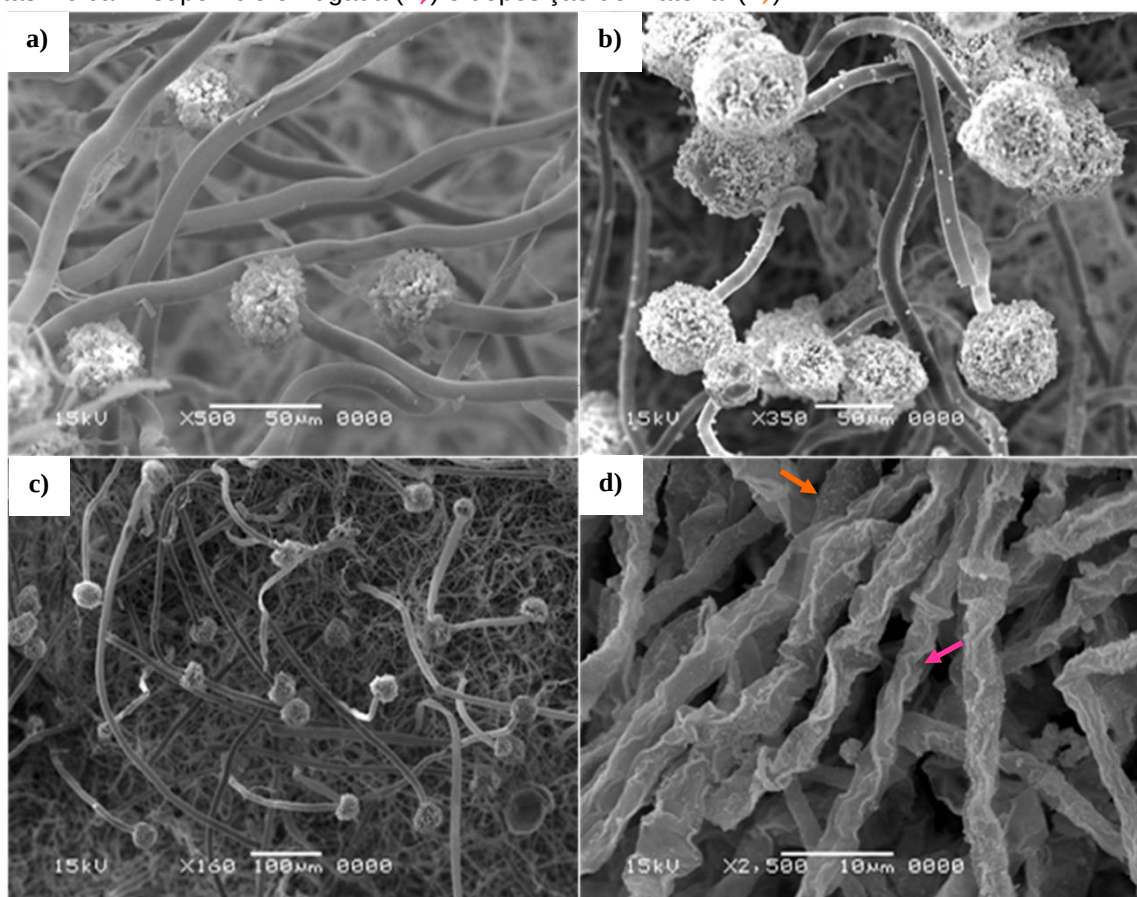
O óleo da semente do maracujá nanoencapsulado (NP-OSM) (2,25 mg/mL do óleo e 1,50 mg/mL do material de parede) causou danos severos as hifas expostas. As hifas apareceram aglomeradas, com diferentes diâmetros e apresentaram deposição de material em sua superfície. Algumas delas perderam sua parede celular e aparecem totalmente colapsadas (Figura 10d). O depósito de material observado resulta na sua deformação devido à alta transferência de energia e o bloqueio da captação de nutrientes, resultando em sua morte. (SHARMA; DEWANJEE; KOLE, 2016; XING et al., 2015)

Conforme afirmado por Bautista-Baños et al. (2003) e verificado na Figura 10c, fungos do gênero *Colletotrichum* são extremamente sensíveis à quitosana. Portanto, a incorporação do óleo da semente do maracujá em nanopartículas desse biopolímero pode ter contribuído para aumentar a severidade dos danos causados ao fungo. Além disso, apesar de se encontrar na mesma concentração na qual foi aplicado na sua forma livre (2,25 mg/mL), a encapsulação do óleo da semente do

maracujá pode ter lhe proporcionado uma distribuição mais homogênea ao longo da superfície celular, bem como promovido sua liberação sustentada, o que também pode ter contribuído para uma melhor atividade antifúngica (RIBES et al., 2016).

Micélios controle de *A. niger* apresentaram hifas tubulares e conidióforos com morfologia regular e uniforme. Conídios foram produzidos em grande quantidade (Figura 11a). O óleo da semente do maracujá (OSM) (3,0 mg/mL) bem como as nanopartículas brancas (NP) (2,0 mg/mL) não foram capazes de causar alterações significativas na morfologia de *A. niger* (Figura 11b e 11c).

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura de *A. niger*. Micélio controle (a), após exposição ao óleo da semente de maracujá (OSM) (3,0 mg/mL) (b); a nanopartículas brancas de quitosana-goma arábica (NP) (2,0 mg/mL) (c) e a nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) (3,0 mg/mL do óleo e 2,0 mg/mL do material de parede) (d). As setas indicam: superfície enrugada (→) e deposição de material (→).



Fonte: A autora (2021).

Uma concentração 4 vezes menor das nanopartículas brancas (0,5 mg/mL) causou alterações na estrutura de *C. siamenses* (Figura 10c), o que ratifica as observações feitas na seção anterior sobre a resistência e a sensibilidade do *A. niger* e do *C. siamense* à quitosana, respectivamente. Vale ressaltar que neste ensaio foram utilizadas concentrações sub-inibitórias, que podem não ter sido suficientes para causar modificações na morfologia de *A. niger*. Interessantemente, micélios expostos às nanopartículas contendo o óleo da semente do maracujá encapsulado (NP-OSM) nas mesmas concentrações testadas individualmente (3,0 mg/mL do óleo e 2,0 mg/mL do material de parede) foram capazes de causar danos severos às hifas de *A. niger*. É possível observar finas granulações depositadas na superfície das hifas, que se apresentaram distorcidas e extremamente enrugadas. As NP-OSM foram capazes ainda de inibir a especialização das hifas e a conidiação, que é fundamental para reprodução e sobrevivência do fungo (Figura 11d).

O tamanho nanométrico das nanopartículas e, conseqüentemente, a elevada razão entre sua área superficial e seu volume podem ter proporcionado um maior contato entre o óleo e a parede celular fúngica. Além disso, considerando a resistência do *A. niger* à quitosana, a presença de óleo adsorvido em sua superfície pode ter facilitado a entrada das nanopartículas de quitosana-goma arábica nas células, potencializando a atividade antifúngica de ambas as substâncias (SHARMA et al., 2010; SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019).

Este é o primeiro trabalho a relatar a atividade antifúngica do óleo da semente de maracujá. Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente esclarecido, os resultados da análise ultraestrutural mostraram que o óleo da semente do maracujá e nanopartículas brancas de quitosana e goma arábica foram capazes de causar danos às hifas de *C. siamense*. E que a aplicação de nanopartículas de quitosana e goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá não só causou danos mais severos ao *C. siamense* que as duas substâncias utilizadas individualmente, como também foi capaz de induzir alterações na morfologia de *A. niger*, tornando-se uma alternativa para o controle destas espécies. No entanto, novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos exatos da interação entre as substâncias testes e os fungos.

5.5.4.3 Determinação da atividade antifúngica *in vivo*: bioatividade de coberturas sobre o crescimento fúngico em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.)

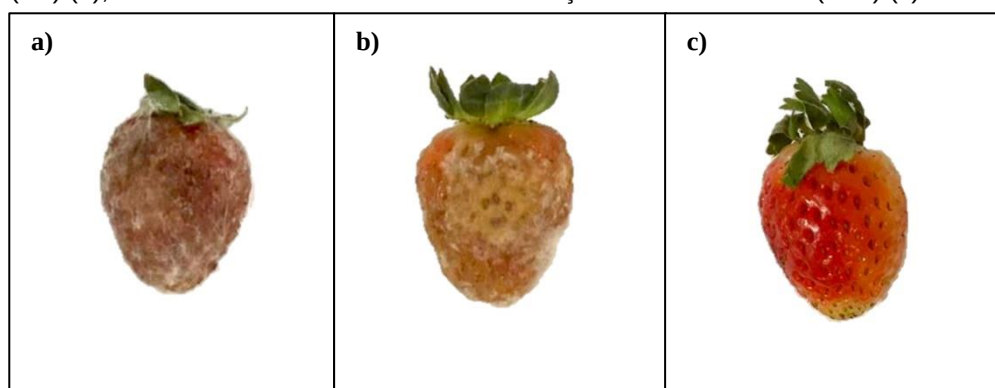
O morango é uma fruta amplamente cultivada em todo mundo devido a seus aroma e sabor atraentes e seu elevado valor econômico (Wang et al., 2015). No entanto, possui vida de prateleira extremamente curta (aproximadamente 5 dias sob refrigeração) em consequência da sua rápida desidratação, alterações fisiológicas, danos mecânicos e susceptibilidade a deterioração por fungos, o que limita sua comercialização e consumo (OLIVEIRA et al., 2019; VALENZUELA et al., 2015).

Coberturas e filmes comestíveis à base de nanopartículas de quitosana (incorporadas ou não com compostos antimicrobianos) têm proporcionado resultados promissores na preservação de frutas e vegetais (MELO et al., 2018; CORREA-PACHECO et al., 2017; DIVYA et al., 2019; GONZÁLEZ-SAUCEDO et al., 2019; MOHAMMADI; HASHEMI; MASOUD, 2015). Ao fim do período de armazenamento, a cobertura à base de nanopartículas de quitosana-goma arábica contendo o óleo da semente do maracujá (NP-OSM) aplicada na CIM proporcionou o menor percentual de infecção visível (60%) em morangos previamente infectados por *Aspergillus niger* armazenados a $10 \pm 2^\circ\text{C}$, enquanto no grupo controle (sem cobertura) e no grupo coberto com glicerol (2,5% v/v) os percentuais de incidência do mofo-preto foram de 100 e 90%, respectivamente. Esses resultados corroboram a atividade antifúngica do nanossistema verificada *in vitro*.

A aplicação de cobertura baseada em nanopartículas de quitosana fúngica (2,5 mg/mL) proporcionou a Melo et al. (2020b) reduções de 30, 45 e 50% na incidência de infecção causada por *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, respectivamente, em morangos infectados artificialmente. Mohammadi et al. (2015) também avaliaram o efeito de coberturas de nanopartículas de quitosana na conservação pós-colheita de morangos. Os tratamentos baseados em nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana contendo óleo de *Zataria multiflora* não só apresentaram os menores índices de mofo-cinza (66,67 e 16,67%), como também foram capazes de retardar o início dos sintomas da doença.

A Figura 12 apresenta a aparência dos morangos com e sem coberturas após 12 dias de armazenamento. Nota-se que o fruto do grupo controle está completamente contaminado, enquanto morangos recobertos com NP-OSM mantiveram sua aparência ao fim do período de armazenamento, fator importante para a aceitabilidade dos consumidores (PAVINATTO et al., 2019).

Figura 12 - Aparência dos morangos previamente infectados com *A. niger* após 12 dias sob refrigeração: controle (sem cobertura) (a); recoberto com glicerol 2,5% (v/v) (b); recoberto com NP-OSM na concentração inibitória mínima (CIM) (c).



Fonte: A autora (2021).

As coberturas comestíveis formam uma barreira semipermeável ao redor da fruta, que regula as trocas gasosas, reduz a perda de umidade e a taxa de respiração, mantendo a sua qualidade (TOVAR et al., 2018; YUAN; CHEN; LI, 2016). Ademais, devido à sua hidrofobicidade, a presença do OSM nas nanopartículas pode ter potencializado as propriedades da barreira física (BARRETO et al., 2016). De acordo com Oliveira et al. (2014), baixas temperaturas de armazenamento contribuem para a desaceleração do processo de maturação do fruto, além de diminuir a patogenicidade dos fungos. Os fatores apresentados em associação com a capacidade das NP-OSM de atuar diretamente sobre *A. niger* demonstrada nos ensaios de atividade antifúngica *in vitro* resultaram na redução da incidência do mofo-preto em morangos e extensão do seu tempo de prateleira.

6 CONCLUSÃO

O óleo da semente do maracujá (OSM) foi eficientemente incorporado às nanopartículas de quitosana-goma arábica (NP) via emulsificação e coacervação complexa. O tamanho das partículas está diretamente relacionado ao conteúdo inicial de óleo, enquanto o potencial zeta apresenta relação inversa. A formulação NP-OSM-0,50 mostrou-se mais estável durante o armazenamento sendo, portanto, escolhida para caracterização e utilizada nos demais experimentos. NP-OSM foram completamente caracterizadas por MEV, MET, FTIR e TGA/DSC. Tanto o OSM como as NP-OSM apresentaram atividade antifúngica contra *C. siamense* e *A. niger*. Experimentos de atividade antifúngica *in vitro* (efeito na ultraestrutura fúngica) demonstraram que o óleo da semente de maracujá nanoencapsulado (NP-OSM) apresentou performance superior à do óleo livre (OSM), quando aplicado na mesma concentração. A aplicação de cobertura à base de NP-OSM reduziu significativamente a incidência de mofo-preto em morangos previamente infectados com *A. niger*, em comparação com frutos sem cobertura, tornando-se uma alternativa aos antifúngicos sintéticos para a indústria de alimentos. Além disso, proporciona um novo direcionamento às sementes, subproduto da cadeia produtiva do maracujá, agregando valor e tornando o processo mais sustentável.

REFERÊNCIAS

A., M. et al. Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier. **Products and Applications of Biopolymers**, 2012.

ABDELILLAH, A. et al. Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Linum usitatissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 443–448, 2013.

AKBARI-ALAVIJEH, S.; SHADDEL, R.; JAFARI, S. M. **Nanostructures of chitosan for encapsulation of food ingredients**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

AKBARI-ALAVIJEH, S.; SHADDEL, R.; JAFARI, S. M. Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 105, n. February, p. 105774, 2020.

AL-DHABAAN, F. A. et al. **Chitosan-Based Nanostructures in Plant Protection Applications**. [s.l.: s.n.].

ALLAN, C. R.; HADWIGER, L. A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental Mycology**, v. 3, n. 3, p. 285–287, 1979.

ALQAHTANI, F. Y. et al. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Lepidium sativum* seed oil. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 1089–1092, 2019.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008.

AMIRI, A. et al. Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: Characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system. **Food Chemistry**, v. 310, n. August 2019, p. 125821, 2020.

ANNU et al. Chitosan based nanomaterials for biomedical applications. **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**, p. 543–562, 2018.

ANTONIOU, J. et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan – tripolyphosphate nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 465, p. 137–146, 2015.

ARANDA-MARTINEZ, A.; LOPEZ-MOYA, F.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Cell wall composition plays a key role on sensitivity of filamentous fungi to chitosan. p. 1–12, 2016.

ARAUJO, M. E. V. et al. Physical properties of yellow passion fruit seeds (*Passiflora edulis*) during the drying process. **Scientia Horticulturae**, v. 261, n. November, p. 109032, 2020.

ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. **Nanoencapsulation: Techniques and Developments for Food Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

ATTALLAH, O. A. Essential oil loaded pectin / chitosan nanoparticles preparation and optimization via Box – Behnken design against MCF-7 breast cancer cell lines †. p. 8703–8708, 2020.

AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

AVADI, M. R. et al. Ex Vivo Evaluation of Insulin Nanoparticles Using Chitosan and Arabic Gum. **ISRN Pharmaceuticals**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

AYYILDIZ, H. F. et al. Evaluation of Fatty Acid Composition, Tocols Profile, and Oxidative Stability of Some Fully Refined Edible Oils. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 9, p. 2064–2076, 2015.

BAIOCCO, D.; PREECE, J. A.; ZHANG, Z. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Encapsulation of hexylsalicylate in an animal-free chitosan-gum Arabic shell by complex coacervation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 625, n. April, p. 126861, 2021.

BARRALES, F. M.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Supercritical CO₂ extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, p. 183–192, 2015.

BARRETO, T. A. et al. A Chitosan Coating Containing Essential Oil from *Origanum vulgare* L. to Control Postharvest Mold Infections and Keep the Quality of cherry tomato fruit. **Frontiers in Microbiology**, v. 7:1724, n. November, 2016.

BASTIAENS, L. et al. Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation. **Chitin and Chitosan**, p. 1–34, 2019.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v. 22, p. 1087–1092, 2003.

BENTO, R. et al. Chitosan nanoemulsions of cold-pressed orange essential oil to preserve fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 331, n. March, p. 108786, 2020.

BERGER, L. R. R. et al. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained

from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, v. 92, p. 45–54, 2016.

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

BHUSHETTE, P. R.; ANNAPURE, U. S. Characterization of *Acacia nilotica* exudate gum and its film. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 6, p. 3058–3066, 2020.

BUTSTRAEN, C.; SALAÜN, F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 608–616, 2014.

CAMPO, C. DE et al. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 234, p. 1–9, 2017.

CARRILLO-INUNGARAY, M. ET AL., 2016. **Advances and Perspectives**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 27

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

CHAUDHARI, A. K. et al. Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 149, n. January, p. 112019, 2021.

CHOUDHARY, R. C. et al. Zinc encapsulated chitosan nanoparticle to promote maize crop yield. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 126–135, 2019.

COELHO, E. M.; AZÊVEDO, L. C.; UMSZA-GUEZ, M. A. FRUTO DO MARACUJÁ: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E INDUSTRIAL, PRODUÇÃO, SUBPRODUTOS E PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA Emanuela Monteiro Coelho 1 *, Luciana Cavalcanti de Azêvedo 2 , Marcelo A Umsza-Guez 3. **Cad. Prospec., Salvador**, v. 9, n. 3, p. 323–336, 2016.

CORDOVA-ALBORES, L. C. et al. Microscopic study of the morphology and metabolic activity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* treated with *Jatropha curcas* oil and derivatives. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, p. 28–35, 2016.

CORREA-PACHECO, Z. N. et al. The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Growth in vitro and on cv Hass Avocado and Fruit Quality. **Journal of phytopathology**, v. 165, p. 297–305, 2017.

CUI, H. et al. The antibacterial activity of clove oil/chitosan nanoparticles embedded

gelatin nanofibers against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on cucumber. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. July 2017, p. 69–78, 2018.

CUI, H. et al. Biodegradable zein active film containing chitosan nanoparticle encapsulated with pomegranate peel extract for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, n. April, p. 100511, 2020.

DABETIC, N. M. et al. Grape Seed Oil Characterization: A Novel Approach for Oil Quality Assessment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 6, p. 1–10, 2020.

DAOUB, R. M. A. et al. Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 3, p. 241–249, 2018.

DAUQAN, E.; ABDULLAH, A. Utilization of gum Arabic for industries and human health. **American Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1270–1279, 2013.

DAVE, P. N.; GOR, A. **Natural polysaccharide-based hydrogels and nanomaterials: Recent trends and their applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

DELSHADI, R. et al. Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. **Trends in Food Science and Technology**, v. 104, n. June, p. 72–83, 2020.

DENG, Z. et al. Cellulose nanocrystals incorporated β -chitosan nanoparticles to enhance the stability and in vitro release of β -galactosidase. **Food Research International**, v. 137, p. 109380, 2020.

DINAH, P. et al. International Journal of Food Microbiology Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D. C. ex Nees) Stapf essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. June 2017, p. 87–94, 2018.

DIVYA, K. et al. Optimization of chitosan nanoparticle synthesis and its potential application as germination elicitor of *Oryza sativa* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1053–1059, 2019.

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

DROR, Y.; COHEN, Y.; YERUSHALMI-ROZEN, R. Structure of Gum arabic in Aqueous Solution. **Journal of polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 44, p. 3265–3271, 2006.

EHF, P. GRAS Notice 000443: Shrimp-derived chitosan. n. 443, p. 1–150, 2012.

EL KNIDRI, H. et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin

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

ELGEGREN, M. et al. Ultrasound-Assisted Encapsulation of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo.) Oil in Alginate-Chitosan Nanoparticles. **Polymers**, v. 11, 2019.

ESPINOSA-ANDREWS, H. et al. Gum arabic-chitosan complex coacervation. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 4, p. 1313–1318, 2007.

ESPINOSA-ANDREWS, H. et al. Determination of the gum Arabic-chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 541–546, 2010.

FATHI, M. et al. Food-Grade Colloidal Systems for the Delivery of Essential Oils Food-Grade Colloidal Systems for the Delivery of Essential Oils. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–45, 2019.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention**. Roma: FAO, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of food and agriculture: Moving forward on food loss and waste reduction**. Roma: FAO, 2019

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1126–1130, 2007.

FERREIRA, B. S. et al. Comparative properties of amazonian oils obtained by different extraction methods. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5874–5885, 2011.

FERREIRA, D. C. M. et al. **Chitosan nanocomposites for food packaging applications**. [s.l: s.n.].

FERREIRA, S.; NICOLETTI, V. R. Microencapsulation of ginger oil by complex coacervation using atomization: Effects of polymer ratio and wall material concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 291, p. 110214, 2021.

FORTUNATI, E.; MAZZAGLIA, A.; BALESTRA, G. M. Sustainable control strategies for plant protection and food packaging sectors by natural substances and novel nanotechnological approaches. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 986–1000, 2019.

FRANCISCO, E. V. DE; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotecnologia na indústria agroalimentar Palavras-chave. n. 2009, p. 1–30, 2020.

FREITAS, A. A. R. et al. *Sterculia striata* gum as a potential oral delivery system for protein drugs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1683–1692, 2020.

FREITAS, L. C. et al. From waste to sustainable industry : How can agro-industrial wastes help in the development of new products ? **Resources , Conservation & Recycling**, v. 169, n. January, 2021.

GÁLVEZ-IRIQUI, A. C. et al. Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p. 2985–3000, 2019.

GHARANJIG, H. et al. Development and optimization of complex coacervates based on zedo gum, cress seed gum and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 148, p. 31–40, 2020.

GLASER, T. K. et al. Nanoparticles with Incorporated Resveratrol as Potential Active Packaging. **MDPI-materials**, v. 12, p. 1–20, 2019.

GOKCE, Y. et al. Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: influence on particle size. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2014.

GOMATHI, T. et al. International Journal of Biological Macromolecules Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1794–1806, 2017.

GONZÁLEZ-SAUCEDO, A. et al. Postharvest Biology and Technology Extension of the postharvest quality of bell pepper by applying nanostructured coatings of chitosan with *Byrsonima crassifolia* extract (L .) Kunth. **Postharvest Biology and Technology**, v. 149, n. April 2018, p. 74–82, 2019.

GRIFOLL-ROMERO, L. et al. Chitin deacetylases: Structures, specificities, and biotech applications. **Polymers**, v. 10, n. 4, p. 1–29, 2018.

GUALBERTO, N. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant activities in the agro-industrial residues of acerola (*Malpighia emarginata* L .), guava (*Psidium guajava* L .), genipap (*Genipa americana* L .) and umbu (*Spondias tuberosa* L .) fruits assisted by ultrasonic or shaker . v. 147, n. June, 2021.

HADIDI, M. et al. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, n. February, p. 116075, 2020.

HAIDER, J. et al. Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a dietary supplement. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 27–34, 2017.

HAJJI, A. et al. High Reserve in δ -Tocopherol of *Peganum harmala* Seeds Oil and Antifungal Activity of Oil against Ten Plant Pathogenic Fungi. **Molecules**, v. 25, p. 4–13, 2020.

HAMDI, M. et al. Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 48–60, 2019.

HAN, J. et al. Environmental stability and curcumin release properties of Pickering emulsion stabilized by chitosan/gum arabic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 202–211, 2020.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F. The effect of clove essential oil loaded chitosan nanoparticles on the shelf life and quality of pomegranate arils. **Food Chemistry**, v. 309, n. November 2018, p. 125520, 2020.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, n. September 2018, p. 113–122, 2019.

HE, X.; DENG, H.; HWANG, H. MIN. The current application of nanotechnology in food and agriculture. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 1, p. 1–21, 2019.

HECKERT BASTOS, L. P. et al. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 102, n. December 2019, 2020.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. Á. et al. Microencapsulation of vanilla oleoresin (*V. Planifolia andrews*) by complex coacervation and spray drying: Physicochemical and microstructural characterization. **Foods**, v. 9, n. 10, 2020.

HERNÁNDEZ, A. et al. Anti-fungal activity of phenolic sweet orange peel extract for controlling fungi responsible for post-harvest fruit decay. **Fungal Biology**, v. 125, n. 2, p. 143–152, 1 fev. 2021.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

HU, K. J. et al. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 1, p. 45–52, 2004.

IAVICOLI, I. et al. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 329, p. 96–111, 2017.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal (PAM) 2019**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 01 jun. 2021

ING, L. Y. et al. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with

Their Physical Properties. v. 2012, 2012.

IZYDORCZYK, M. S. et al. Polysaccharide Gums: Structures, Functional Properties, and Applications. n. January, 2005.

JAFARI, S. M. **An overview of nanoencapsulation techniques and their classification.** [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

JAFARZADEH, S. et al. **Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables** *Advances in Colloid and Interface Science* Elsevier B.V., 1 maio 2021.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary Column Gas Chromatographic Method for Analysis of Encapsulated Fish Oil Ethyl Esters: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 488–506, 1992.

JOSEPH, R. M. et al. Industrial Crops & Products Development and characterization of cellulose nanofibre reinforced Acacia nilotica gum nanocomposite. **Industrial Crops & Products**, v. 161, n. January, p. 113180, 2021.

JURIĆ, S. et al. Vegetable Oils Rich in Polyunsaturated Fatty Acids: Nanoencapsulation Methods and Stability Enhancement. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–38, 2020.

KALAGATUR, N. K.; GHOSH, O. S. N.; SUNDARARAJ, N. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles Encapsulated With Cymbopogon martinii Essential Oil on Plant Pathogenic Fungi Fusarium graminearum. v. 9, n. June, p. 1–13, 2018.

KARAOSMANOGLU, H. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of turkish extra virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8238–8245, 2010.

KARIMIRAD, R.; BEHNAMIAN, M.; DEZHSETAN, S. Bitter orange oil incorporated into chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and their potential application on antioxidant and antimicrobial characteristics of white button mushroom. **Food Hydrocolloids**, v. 100, n. December 2018, p. 105387, 2020.

KASEKE, T.; LINUS, U.; AMOS, O. Heliconia Fatty acid composition , bioactive phytochemicals , antioxidant properties and oxidative stability of edible fruit seed oil : effect of preharvest and processing factors. **Heliyon**, v. 6, n. June, p. e04962, 2020.

KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Nanoencapsulation of Essential Oils: A Possible Way for an Eco-Friendly Strategy to Control Postharvest Spoilage of Food Commodities From Pests. **Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms**, v. 1, p. 501–522, 2018.

KHALITH, S. B. M. et al. Synthesis and characterization of polyphenols functionalized graphitic hematite nanocomposite adsorbent from an agro waste and its application for removal of Cs from aqueous solution. **Chemosphere**, v. 286, n. Part 1, p. 131493,

2022.

KIEFER, J. et al. Identification of passion fruit oil adulteration by chemometric analysis of FTIR spectra. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 1–13, 2019.

KIM, Y. H. et al. Comparative antibacterial and antifungal activities of sulfur nanoparticles capped with chitosan. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, n. February, p. 104178, 2020.

KLIS, F. M.; RAM, A. F. J.; GROOT, P. W. J. DE. 4 A Molecular and Genomic View of the Fungal Cell Wall. 2007.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

KRAMBECK, K. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Lipid nanocarriers containing Passiflora edulis seeds oil intended for skin application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, n. April, p. 111057, 2020.

KUMAR, D.; SHAHID, M. **Natural materials and products from insects: Chemistry and applications**. [s.l: s.n.].

KUMAR, S. et al. Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 12, 2019.

KUMARASWAMY, R. V. et al. Engineered chitosan based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, n. 2017, p. 494–506, 2018.

KUROIWA, T. et al. Formulation and stabilization of nano- / microdispersion systems using naturally occurring edible polyelectrolytes by electrostatic deposition and complexation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 226, p. 86–100, 2015.

KUROIWA, T. et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Biocompatible homogeneous particle formation via the self-complexation of chitosan with oleic acid and its application as an encapsulation material for a water-insoluble compound. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 624, n. May, p. 126808, 2021.

LEE, E. H.; KHAN, I.; OH, D. H. Evaluation of the efficacy of nisin-loaded chitosan nanoparticles against foodborne pathogens in orange juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 3, p. 1127–1133, 2018.

LI, F. et al. The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent. **Food Research International**, v. 111, n. May, p. 351–360, 2018.

LIMA, D. et al. A coating composed of chitosan and *Cymbopogon citratus* (DC. Ex Nees) essential oil to control *Rhizopus* soft rot and quality in tomato fruit stored at room temperature. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 0316, n. June, 2016.

LIMA, G. S. DE; XAVIER-JÚNIOR, F. H.; STAMFORD, T. C. M. Óleo da semente de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): COMPOSIÇÃO QUÍMICA E FUNCIONALIDADE EM ALIMENTOS. In: **Equidade e sustentabilidade no campo da segurança alimentar global**. [s.l.: s.n.]. p. 63–75.

LIMA, N. B.; LIMA, W. G. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, p. 679–688, 2015.

LIN, L.; GU, Y.; CUI, H. Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, n. November 2018, p. 86–93, 2019.

LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 300–306, 2007.

LOPEZ-MOYA, F.; SUAREZ-FERNANDEZ, M.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants. 2019.

LUCARINI, M. et al. Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Seed oil. In: **Fruit Oils: Chemistry and Functionality**. [s.l.: s.n.]. p. 577–603.

LUCARINI, M. et al. Grape seeds: Chromatographic profile of fatty acids and phenolic compounds and qualitative analysis by FTIR-ATR spectroscopy. **Foods**, v. 9, n. 1, 2020.

MAHARDIKA, R. G.; JUMNAHDI, M.; WIDYANINGRUM, Y. Chitin Deacetylation Shells of *Portunus pelagicus* L. Using Microwave Irradiation. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 353, n. 1, 2019.

MAHATO, N. et al. Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 611–625, 2019.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow Passion Fruit Seed Oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. v. 55, n. February, p. 127–134, 2012.

MALERBA, M.; CERANA, R. Recent applications of chitin- and chitosan-based polymers in plants. **Polymers**, v. 11, n. 5, p. 1–9, 2019.

MARANGONI, F. et al. Dietary linoleic acid and human health: Focus on

cardiovascular and cardiometabolic effects. **Atherosclerosis**, v. 292, n. June 2019, p. 90–98, 2020.

MÁRMOL, I. et al. Food and Bioproducts Processing Valorization of agro-food by-products and their potential therapeutic applications. **Food and Bioproducts Processing**, v. 128, p. 247–258, 2021.

MARQUES DA SILVA, T. et al. Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 49, 2015.

MARTIN, M. E. et al. Grape (*vitis vinifera* L.) seed oil: A functional food from the winemaking industry. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1–20, 2020.

MATROSE, N. A. et al. Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review. **Food Bioscience**, p. 100840, 2020.

MEDINA, E. et al. Effect of antimicrobial compounds from olive products on microorganisms related to health , food and agriculture. **Microbial pathogen and strategies for combating them: Science, technology and education**, p. 1087–1094, 2013.

MEHRAN, M.; MASOUM, S.; MEMARZADEH, M. Industrial Crops & Products Microencapsulation of *Mentha spicata* essential oil by spray drying : Optimization , characterization , release kinetics of essential oil from microcapsules in food models. **Industrial Crops & Products**, v. 154, n. June, p. 112694, 2020.

MEKAWI, E. M.; KHAFAGI, E. Y.; ABDEL-RAHMAN, F. A. Effect of pre-harvest application with some organic acids and plant oils on antioxidant properties and resistance to *Botrytis cinerea* in pepper fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 257, n. July, p. 108736, 2019.

MELO, N. F. C. B. et al. Quality of Postharvest Strawberries : Comparative Effect of Fungal Chitosan Gel , Nanoparticles and Gel Enriched with Edible Nanoparticle Coatings. **International Journal of Food Studies**, v. 9, n. October, p. 373–393, 2020a.

MELO, N. F. C. B. et al. In vivo and in vitro antifungal effect of fungal chitosan nanocomposite edible coating against strawberry phytopathogenic fungi. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 11, p. 3381–3391, 2020b.

MELO, P. T. S. et al. Combining Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) Puree, Pectin, and Chitosan Nanoparticles into Novel Edible Films for Food Packaging Applications. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 8, p. 2228–2233, 2019.

MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; MASOUD, S. Nanoencapsulation of *Zataria multi fl* ora essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea* , the causal agent of gray mould disease. **Innovative**

Food Science and Emerging Technologies, v. 28, p. 73–80, 2015.

MORIN-CRINI, N. et al. **Fundamentals and Applications of Chitosan**. [s.l.: s.n.].

MUTHUKRISHNAN, S.; MURUGAN, I.; SELVARAJ, M. Chitosan nanoparticles loaded with thiamine stimulate growth and enhances protection against wilt disease in Chickpea. **Carbohydrate Polymers**, v. 212, n. February, p. 169–177, 2019.

NADAROGLU, H. et al. Biodegradation of some azo dyes from wastewater with laccase from *Weissella viridescens* LB37 immobilized on magnetic chitosan nanoparticles. **Journal of Water Process Engineering**, v. 31, n. May, 2019.

NAIR, M. S. et al. **Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier B.V., , 1 dez. 2020.

NASCIMENTO, J. I. G. et al. Chitosan–citric acid edible coating to control *Colletotrichum gloeosporioides* and maintain quality parameters of fresh-cut guava. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1127–1135, 2020.

NASEER, B. et al. Importance and health hazards of nanoparticles used in the food industry. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 6, p. 623–641, 2018.

NAZZARO, F. et al. Antibacterial activity of three extra virgin olive oils of the campania region, southern italy, related to their polyphenol content and composition. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 1–10, 2019.

NUNES, I. S. et al. Nanopartículas de quitosana: técnicas de obtenção e aplicações na indústria de alimentos. **in: Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1ed.: Editora Científica Digital, v. 4, p. 345-369, 2021.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 54–61, 2014.

OLIVEIRA, D. A. et al. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55–62, 2016.

OLIVEIRA, D. A. et al. ENCAPSULATION OF PASSION FRUIT SEED OIL BY MEANS OF SUPERCRITICAL ANTISOLVENT PROCESS. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2017.

OLIVEIRA, J. et al. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, n. May 2018, p. 261–267, 2019.

OLIVEIRA, J. L. et al. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles:

A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 5325–5334, 2018.

OTHMAN, A. S. Research Article Bactericidal Efficacy of Omega-3 Fatty Acids and Esters Present in *Moringa oleifera* and *Portulaca oleracea* Fixed Oils Against Oral and Gastro Enteric Bacteria. [s.d.].

PALMA-GUERRERO, J. et al. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. **Molecular microbiology**, v. 75, n. January, p. 1021–1032, 2010.

PATEL, H.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. A newly emerging trend of chitosan-based sensing platform for the organophosphate pesticide detection using Acetylcholinesterase- a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 85, n. August 2018, p. 78–91, 2019.

PAULA, H. C. B. et al. Preparation and characterization of chitosan / cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. **Materials Science & Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 173–178, 2011.

PAVINATTO, A. et al. Jo ur na l P re of. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

PEI, S. et al. Postharvest Biology and Technology Inhibitory e ff ect and possible mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fructicola*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 163, n. December 2019, p. 111126, 2020.

PEREIRA, M. G. et al. Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2017.

PEREIRA, M. G. et al. Effect of Extraction Process on Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Oil from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa*) Seeds. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 9, p. 2611–2625, 2019.

PETROPOULOS, S. A. et al. applied sciences Antimicrobial Properties , Cytotoxic Effects , and Fatty Acids Composition of Vegetable Oils from Purslane , Linseed , Luffa , and Pumpkin Seeds. 2021.

PIANOVSKI, A. R. et al. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249–259, 2008.

PIOMBO, G. et al. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). **OCL**, v. 13, p. 195–199, 2006.

PRAKASH, B. et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1–11, 2018.

PUROHIT, S. et al. Materials Science for Energy Technologies Evaluation of thermophysical , biochemical and antibacterial properties of unconventional vegetable oil from Northeast India. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 4, p. 81–91, 2021.

RABELO, R. S. et al. Complexation of chitosan with gum Arabic, sodium alginate and k-carrageenan: Effects of pH, polymer ratio and salt concentration. **Carbohydrate**

RAJABI, H. et al. Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 578, n. March, p. 123644, 2019.

RAMAKRISHNAN, R. K. et al. Eco-Friendly and Economic , Adsorptive Removal of Cationic. **Polymers**, v. 13, p. 1–21, 2021.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1–2, p. 219–228, 2013.

RASHKI, S. et al. Nanopartículas à base de quitosana contra infecções bacterianas Palavras-chave. p. 1–29, 2021.

RAZA, Z. A. et al. Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. **Carbohydrate Research**, v. 492, n. April, p. 108004, 2020.

REGIS, S. A.; RESENDE, E. D. DE; ANTONIASSI, R. Oil quality of passion fruit seeds subjected to a pulp-waste purification process. Oil quality of passion fruit seeds subjected to a pulp-waste purification process Qualidade do óleo das sementes do maracujá submetidas ao processo de purificação dos resíd. p. 977–984, 2015.

REZENDE, S. et al. Revisão. v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

RIBES, S. et al. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf , lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. **Food Control**, p. 1–12, 2016.

ROBERTO, S. R. et al. Nanomaterials as alternative control means against postharvest diseases in fruit crops. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, p. 1–20, 2019.

RODRIGUES, J. et al. Environmental Technology & Innovation Vegetable fixed oils obtained from soursop agro-industrial waste : Extraction , characterization and preliminary evaluation of the functionality as pharmaceutical ingredients. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101379, 2021.

RODRÍGUEZ, J. et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **FRIN**, v. 83, p. 41–59, 2016.

ROMANAZZI, G. et al. Postharvest Biology and Technology Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 113, p. 69–76, 2016.

RUTZ, J. K. et al. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **FOOD CHEMISTRY**, v. 202, p. 324–333, 2016.

RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017.

SAHA, A. et al. Natural gums of plant origin as edible coatings for food industry applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 959–973, 2017.

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846–3868, 2017.

SAIFI, M. A.; KHAN, W.; GODUGU, C. Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 3–16, 2018.

SAMPAIO NETO, O. Z.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. DE A. The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 866–875, 2018.

SHADDEL, R. et al. International Journal of Biological Macromolecules Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1800–1810, 2018.

SHARKAWY, A.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A. E. Preparation of chitosan/gum Arabic nanoparticles and their use as novel stabilizers in oil/water Pickering emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, n. August, p. 115190, 2019.

SHARMA, D. et al. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1224–1229, 2010.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of Aspergillus niger (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 337–344, 2008.

SHARMA, R.; DEWANJEE, S.; KOLE, C. Chapter 12 Utilization of Nanoparticles for Plant Protection. In: **Plant Nanotechnology: Principles and Practices**. [s.l.: s.n.]. p. 1–383.

SHETTA, A.; KEGERE, J.; MAMDOUH, W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 731–742, 2019a.

SHETTA, A.; KEGERE, J.; MAMDOUH, W. International Journal of Biological Macromolecules Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. v. 126, p. 731–742, 2019b.

SILVA, A. C. DA; JORGE, N. Data Report Bioactive compounds of oils extracted from fruits seeds obtained from agroindustrial waste. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1–5, 2016.

SINGH, D.; SHARMA, R. R. **Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

SKEELS, L. et al. Industrial Crops & Products Comparison of chemical composition and biological activities of Algerian seed oils of Pistacia lentiscus L., Opuntia ficus indica (L.) mill. and Argania. **Industrial Crops & Products**, v. 151, n. April, p. 112456, 2020.

SOARES, B. S. et al. Microencapsulation of sachinchi oil (Plukenetia volubilis L.) using complex coacervation: Formation and structural characterization. **Food Chemistry**, v. 298, n. February, p. 125045, 2019.

SOJITRA, U. V.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 677–685, 2017.

SOTELO-BOYÁS, M. et al. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 409–414, 2017.

SOUZA, T. G. DOS S. et al. Biological safety of Syagrus coronata (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 272, n. January, 2021.

SUDHA, P. N. et al. **Chapter 12 - Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

SUN, Y. et al. Fennel essential oil loaded porous starch-based microencapsulation as an efficient delivery system for the quality improvement of ground pork. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 464–474, mar. 2021.

TAN, C. et al. Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 236–245, 2016.

TAVARES, L. et al. Microencapsulation of Garlic Extract by Complex Coacervation Using Whey Protein Isolate / Chitosan and Gum Arabic / Chitosan as Wall Materials : Influence of Anionic Biopolymers on the Physicochemical and Structural Properties of Microparticles. p. 2093–2106, 2019.

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

TIMILSENA, Y. P. et al. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369–381, 2017.

TIMILSENA, Y. P. et al. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1276–1286, 2019.

TOVAR, C. D. G. et al. Chitosan coatings enriched with essential oils: effects on funga decay of fruits and mechanisms of action. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 61–71, 2018.

TSAL, M. L. et al. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 756–761, 2011.

UMERSKA, A. et al. Freeze drying of polyelectrolyte complex nanoparticles : effect of nanoparticle composition and cryoprotectant selection. 2018.

VAHEDIKIA, N. et al. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, n. January, p. 25–32, 2019.

VALENZUELA, C. et al. Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality. **EJBT**, v. 18, n. 6, p. 406–411, 2015.

VASCONCELOS, O. et al. Utilization of agroindustrial residue from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds as a source of fatty acids and bioactive substances. **Food Science and Technology**, v. 2061, p. 1–8, 2020.

VASKOVA, H.; BUCKOVA, M. Thermal degradation of vegetable oils: Spectroscopic measurement and analysis. **Procedia Engineering**, v. 100, n. January, p. 630–635, 2015.

VELOSO, J. S.; MARCOS, P. S. C.; DOYLE, V. P. Why species delimitation matters for fungal ecology : *Colletotrichum* diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. **Fungal Biology**, v. 122, 2018.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–

283, 2017.

VILLAR-CHAUVERO, M. M. et al. Thermal and kinetics of the degradation of chitosan with different deacetylation degrees under oxidizing atmosphere. **Thermochimica Acta**, v. 670, n. October, p. 18–26, 2018.

VILLEGAS, Y.; JAIME, P.; CERVANTES, L. Impact of the molecular weight on the size of chitosan nanoparticles: characterization and its solid - state application. **Polymer Bulletin**, v. 78, n. 2, p. 813–832, 2021.

VILLENA DE FRANCISCO, E.; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of Food Engineering**, v. 238, p. 1–11, 2018.

VODNAR, D. C. et al. Identification of the bioactive compounds and antioxidant , antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. **Food Chemistry**, v. 231, p. 131–140, 2017.

VUILLEMIN, M. E. et al. Gum Arabic and chitosan self-assembly: Thermodynamic and mechanism aspects. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 463–474, 2019.

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

WU, T. et al. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 192–200, 2017.

XIAO, J. et al. International Journal of Biological Macromolecules Complex coacervation of carboxymethyl konjac glucomannan and chitosan and coacervate characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 436–445, 2019.

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

XING, K. et al. International Journal of Biological Macromolecules Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 830–836, 2016.

XU, T. et al. Retention and release properties of cinnamon essential oil in antimicrobial films based on chitosan and gum arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 84, p. 84–92, 2018.

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

YAMAMOTO, T. et al. Piceatannol exhibits anti- - inflammatory effects on macrophages interacting with adipocytes. **Food Science and Nutrition**, 2016.

YEPES, A. et al. Purple passion fruit seeds (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) as a promising source of skin anti-aging agents : Enzymatic , antioxidant and multi-level computational studies. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 102905, 2021.

YOKSAN, R.; JIRAWUTTHIWONGCHAI, J.; ARPO, K. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. v. 76, p. 292–297, 2010.

YOU, G.; LING, X.; MING, M. Food Hydrocolloids Preparation and characterization of hsian-tsao gum and chitosan complex coacervates. **Food hydrocolloids**, v. 74, p. 255–266, 2018.

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

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan fi lms and coatings containing essential oils : The antioxidant and antimicrobial activity , and application in food systems. **FRIN**, v. 89, p. 117–128, 2016.

ZAHID, N. et al. Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp . and maintain quality of tropical fruits during cold storage. **Journal of Applied Microbiology**, p. 925–939, 2012.

ZARANDONA, I. et al. Horse mackerel (*Trachurus trachurus*) fillets biopreservation by using gallic acid and chitosan coatings. **Food Control**, v. 120, n. July 2020, 2021.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Abstract. v. 39, n. 3, p. 221–225, 2001.

ZHANG, H. et al. Effect of chitosan-gelatin coating containing nano-encapsulated tarragon essential oil on the preservation of pork slices. **Meat Science**, v. 166, n. February, p. 108137, 2020.

ZHANG, H.; JUNG, J.; ZHAO, Y. Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catechins and catechins-Zn complex loaded β -chitosan nanoparticles of different particle sizes. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 82–91, 2016.

ZHAO, C. et al. The Effect of Gum Arabic on the Dispersion of Cement Pastes. p. 483–494, 2015.

ZHAO, Y. et al. Chitosan/sodium tripolyphosphate nanoparticles as efficient vehicles for enhancing the cellular uptake of fish-derived peptide. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 1–9, 2019.

ZIMET, P. et al. Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 107–116, 2018.

APÊNDICE A – Artigo publicado no International Journal of Biological Macromolecules



of chitin from the shells of crustaceans a valuable commercially [8]. This polymer is soluble in some inorganic and organic acids, such as hydrochloric, phosphoric, lactic, acetic, citric, and formic acid. The physicochemical and biological properties of chitosan, e.g., solubility, rheology, polycationic action, and antimicrobial activity, among others, depend on several factors, such as the degree of deacetylation (DD), molecular weight, and the degree of ionization, which is strongly influenced by the pH and pKa of the acid used as solvent [14–16]. Because it is biocompatible, biodegradable, and non-toxic, and has a high capacity to form films, chitosan has been approved as a food additive by the US Food and Drug Administration, and is widely used as a fruit coating [4,6,7,14,15].

In this context, we carried out a study with the objective of verifying, for the first time, the effectiveness of edible chitosan–citric acid (CHI–CA) coatings to inhibit the growth of and promote ultrastructural changes in *C. gloeosporioides*, as well as their ability to maintain quality parameters of minimally processed guava fruit during storage at room temperature and under refrigeration.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Commercially mature fruit of *Psidium guajava* ‘Pakama’ were purchased from CEASA Pernambuco, Recife, Brazil. The fruit were selected for the absence of signs of mechanical damage or deterioration, and standardized for uniformity of size, color, and form. The chemicals used, sodium chloride, hydrochloric acid, and citric acid were of analytical grade P.A. from Sigma-Aldrich, Brazil. The culture media, Sabouraud broth and Sabouraud agar, were obtained from HIMEDIA, India. All other reagents used in this study were analytical grade P.A., and obtained from commercial sources.

2.2. Test microorganism and inoculum preparation

The test microorganism, *Colletotrichum gloeosporioides* (URM 2335), was obtained from the Mycology Collection of the Department of Mycology (URM), Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). For assays, Sabouraud agar medium was inoculated with the stock culture at 28 °C for 120 h to sporulation, and the spore suspension was subsequently prepared in sterile saline solution (0.85 g/100 mL NaCl). The number of spores in the suspension was quantified using a hemocytometer. The spore concentration was adjusted to 10^6 spores/mL [11].

2.3. Extraction and characterization of chitosan obtained from shells of *Litopenaeus setiferus*

Chitosan was obtained from chitin deacetylation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) shells by demineralization, deproteinization, and deacetylation. The shells, a waste product of the shrimp farming industry, were provided by Neptune Company S/A, located in Recife, Pernambuco, Brazil. First, the shrimp shells were washed with distilled water to remove dirt and residue, dried in an oven at 70 °C for 6 h and milled in an electric mill to obtain a meal. Then, the meal (1 g) was demineralized by suspension in a 5% HCl solution (1 L), while stirring for 1 h at 25 °C. The material was filtered and washed with distilled water to remove calcium salts until the pH was 7.0 ± 0.2 . Subsequently, the meal (1 g) was deproteinized with the addition of 5% NaOH (1 L) at 100 °C for 30 min in an auto-clave steam flow. The chitinous material was then washed to near neutral pH, and dried in an oven at 70 °C for 6 h. Chitosan was obtained by deacetylation of chitin (1 g) with 30% NaOH (1 L) at 121 °C and 1 atm for 15 min. The chitosan obtained was washed until the pH was 7.0 ± 0.2 and dried in an oven at 70 °C for 6 h and stored in polypropylene packaging at -10 ± 2 °C.

Chitosan was characterized for its chemical structure by infrared (IR) spectroscopy using a spectrophotometer, FT-IR model MB-102 (BOMEM, Quebec, Canada) [8,15]; degree of deacetylation by hydrogen nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR) in a Varian Mercury Plus 300 MHz Spectrometer (Varian, Inc., California, United States of America) [17]; molecular weight by viscosimetry using an AVS-350 viscometer (Schott-Götte), type/capillary: Cannon-Fenske $d_{\text{max}} = 1.01$ mm, at 25 ± 0.01 °C. To determine intrinsic viscosity $[\eta]$, a chitosan solution was prepared (using 1% HCl as solvent) at concentrations ranging from 0.1 to 2.5 mg/mL. Viscosimetric molecular weight was expressed in g/mol, using the Mark-Houwink equation, with $K = 1.81 \times 10^{-3}$ and $a = 0.93$ [8].

2.4. Determination of the minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration of chitosan–citric acid against *Colletotrichum gloeosporioides*

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of CHI–CA against *C. gloeosporioides* (spore suspension with final concentrations adjusted to 10^6 spores/mL) were determined by a serial macrodilution test in Sabouraud broth at 28 °C for 120 h. All assays were repeated five times, in the presence or absence of a CHI–CA solution (with final concentrations adjusted to 100, 50, 25, 1.25, 0.625, 0.312, and 0.0 mg/mL). To ensure that the citric acid did not influence antifungal activity, preliminary tests were carried out to demonstrate that the citric acid solution (1%) did not inhibit the growth of the fungal strain tested. Based on the MIC, different concentrations of CHI–CA (MIC/2, MIC, and MIC $\times$ 2) were chosen to verify the effects on radial mycelial growth and ultrastructure of *C. gloeosporioides*.

2.5. Effects of chitosan–citric acid on *Colletotrichum gloeosporioides* radial mycelial growth

Inhibition of radial mycelial growth of *C. gloeosporioides* was determined using the substrate poisoning technique (dilution in solid media) [8]. Petri dishes (90 mm) contained Sabouraud agar without test substance (negative control), or with 1% citric acid (positive control), or CHI–CA at concentrations of MIC/2, MIC, and MIC $\times$ 2 (test treatments). The Petri dishes were incubated at 28 °C until the negative control was fully covered with mycelia. The radial mycelial growth was measured in millimeters daily (every 24 h). The percentage of mycelial growth inhibition (%MGI) was calculated using the equation [18]

$$\%MGI = [(C - T)/C] \times 100$$

where C was the colony diameter in the negative control assay and T was the diameter of the colony growing in Sabouraud agar supplemented with 1% citric acid (positive control) or CHI–CA at the concentration of each of the test treatments.

2.6. Effect of chitosan–citric acid on the ultrastructure of *Colletotrichum gloeosporioides*

To analyze morphological changes, samples of mycelia and conidia were taken from the test strain grown on Sabouraud broth at 72 h, 28 °C, and 150 rpm and 24 h, 28 °C, and 150 rpm, respectively, in the presence of different CHI–CA concentrations (MIC/2 and MIC). The samples treated at both concentrations were washed in buffered saline solution (pH 7.2) twice for 10 min. They were then fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 1 h at room temperature (28 °C). After fixation, all samples were again washed twice with phosphate buffer for 10 min. Subsequently, postfixation with 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer was performed for 1 h at 28 °C under dark conditions. The samples were then washed again with 0.1 M phosphate buffer and dehydrated in ethanol at the proportions of 50%, 70%, 90% (5 min intervals for each exchange), and 100%

(three times, 10 min each exchange). Afterwards, the samples were dried in hexamethyldisilazane, followed by assembly in aluminum stubs and subsequent gold/palladium metallization. Once prepared, samples were examined with a scanning electron microscope model JSM-5600LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). As controls, samples (mycelia and spores) that were not exposed to CHI-CA were fixed and observed similarly.

2.7. Preparation of minimally processed guava fruit for analysis of quality

Initially, the selected guavas were washed with soap to remove impurities, immersed in a 1% sodium hypochlorite solution for 15 min, washed with potable water, and dried naturally for 1 h in circulating air. The guavas were then peeled and cut longitudinally into 1-cm thick slices. The guava slices were immersed in CHI-CA solution (MIC) for 10 s and dried for 1 h at $24 \pm 2^\circ\text{C}$. The same procedure was performed with the control samples, exchanging CHI-CA for 0.5% glycerol. After drying, all samples were packed in Styrofoam trays (15×15 cm), covered with 60 μm thick polyethylene film, and stored for 14 days at cold temperature ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) and for 7 days at room temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.8. Physicochemical analysis of minimally processed guava fruit coated with chitosan–citric acid

The minimally processed guava fruit were evaluated for weight loss and general quality parameters, such as color, soluble solids, titratable acidity, pH, ascorbic acid content, and total sugar content at different storage times (0, 3, 7, and 14 days). The methodologies used were according to AOAC [19]. The surface color of the sliced fruit was measured in three different equatorial positions with the CIELab system ($L^*a^*b^*$) [20]. The hue angle (h°) and chroma (C^*) were measured with a CR-300 colorimeter (Minolta Model CR-400, MINOLTA Co., Osaka, Japan).

2.9. Rot incidence and microbiological parameters in minimally processed guava fruit coated with chitosan–citric acid

The minimally processed guava fruit, previously treated as described in Subsection 2.7, were evaluated for rot incidence and microbiological parameters. Molds and yeasts were counted using the surface plating technique, after incubation in Sabouraud agar for 5 days at $28 \pm 1^\circ\text{C}$. The results were expressed in CFU/g of sample. *Salmonella* was detected after pre-enrichment of the sample in lactose broth, followed by a selective enrichment step using tetrathionate broth and selenite cystine broth. Plating was then carried out on bismuth sulfite agar and Helixton enteric agar. Fecal coliform bacteria were determined by the multiple-tube fermentation technique. Bacteria of the coliform group (MPN).

2.10. Sensory analysis of minimally processed guava fruit coated with chitosan–citric acid

This study was submitted to the Ethics Committee on human research of the Health Center at the Federal University of Pernambuco (certificate number 05736012.4.0000.5208 and protocol number 195488). Minimally processed guavas coated with CHI-CA or glycerol were subjected to acceptance and preference tests throughout the 7 days of cold storage. One hundred untrained testers participated in the affective acceptance and preference tests. The analysis was performed in individual booths under controlled temperature and lighting conditions. Samples with CHI-CA or glycerol coating were served simultaneously after removing from refrigerated storage, with each participant receiving approximately 50 g of minimally processed guava, served in disposable white dishes and randomly coded with three digits. The testers were asked to eat a salty biscuit and drink water between samples to avoid aftertaste effects. Appearance, color, flavor, texture,

and overall assessment were rated with a nine-point structured hedonic scale ranging from one (dislike very much) to nine (like very much). Purchase intention was rated with a five-point structured hedonic scale ranging from one (certainly would not buy) to five (certainly would buy) [11].

2.11. Statistical analysis

The experiments had a standard randomized design, with each plot represented by four fruit with five replicates. The experimental data were analyzed using the statistical software SigmaStat 2.0. Statistical analyses included descriptive statistics (mean and standard deviation) and inferential (mean comparison) tests to determine statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatments. Significant effects were determined by analysis of variance followed by multiple means comparison with Tukey's test ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of chitosan

The structural characterization by infrared spectroscopy of chitosan from *L. vannamei* shells (Fig. 1A) is in agreement with that reported in the literature [8,15]. The spectrum (Fig. 1A) shows a broad peak at 3350.60 cm^{-1} , corresponding to the axial deformation of OH, which appears to overlap the band of the axial NH (amine group) deformation. This indicates formation of an intermolecular hydrogen link; the displacement of the higher frequency band indicates an increase in the structural order [15]. The free primary amine group ($-\text{NH}_2$) at the C2 position of glucosamine also provides another peak in the region between 1220 and 1020 cm^{-1} which is observed in the spectrum at 1078.45 cm^{-1} . The peak at 2875.30 cm^{-1} represents C–H aliphatic stretching, and the peak at 1655.24 cm^{-1} corresponds to axial deformation of the band C=O of the amide group I to chitin. This suggests that the sample is not completely deacetylated. The vibrational mode of the angular deflection of the NH (amide II) connect is appears as a shoulder at 1592.20 cm^{-1} . The peak at 1320.22 cm^{-1} represents the C–O stretch of the primary alcohol group ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). The axial deformation appears in the amide C–N at 1378.93 cm^{-1} .

The degree of deacetylation (DD) and molecular weight of chitosan depend on the source and the process of obtaining it, which influences the final physicochemical and biological properties of chitosan, such as solubility, capacity as a cationic polyelectrolyte, antimicrobial activity, and capacity to form films, among others [14–16]. The average viscosimetric molecular weight of chitosan obtained in this study was $1.6 \times 10^5\text{ g/mol}$ (16 kDa; Fig. 1B), which is considered low. The method of chitosan extraction from crustacea, which usually involves high temperatures and concentrated NaOH solutions, may lead to the breaking of the polymer resulting in chitosan of a low molecular weight [8,14,15]. According to Oliveira et al. [11], molecular weight is an important property of chitosan as a coating for fruit, because lower molecular weight influences the tensile strength of the chitosan coating film, reducing it without increasing the permeability of the film.

The DD by $^1\text{H NMR}$ should be performed at 50°C to prevent intermolecular and intramolecular interactions of chitosan since these interactions modify the relaxation time responsible for integration of peaks, thereby influencing the value of the DD obtained. The DD directly affects the solubility of chitosan, which must be greater than 50% so that the polymer has better solubility in weak acid solution [14,15]. The DD obtained in our study was 64% (Fig. 1C).

3.2. In vitro antifungal effect of chitosan–citric acid against *Colletotrichum gloeosporioides*

CHI-CA had MIC and MFC values of 5.0 mg/mL (0.5%) and 10 mg/mL (1%) against *C. gloeosporioides*, respectively. The control with 1% citric

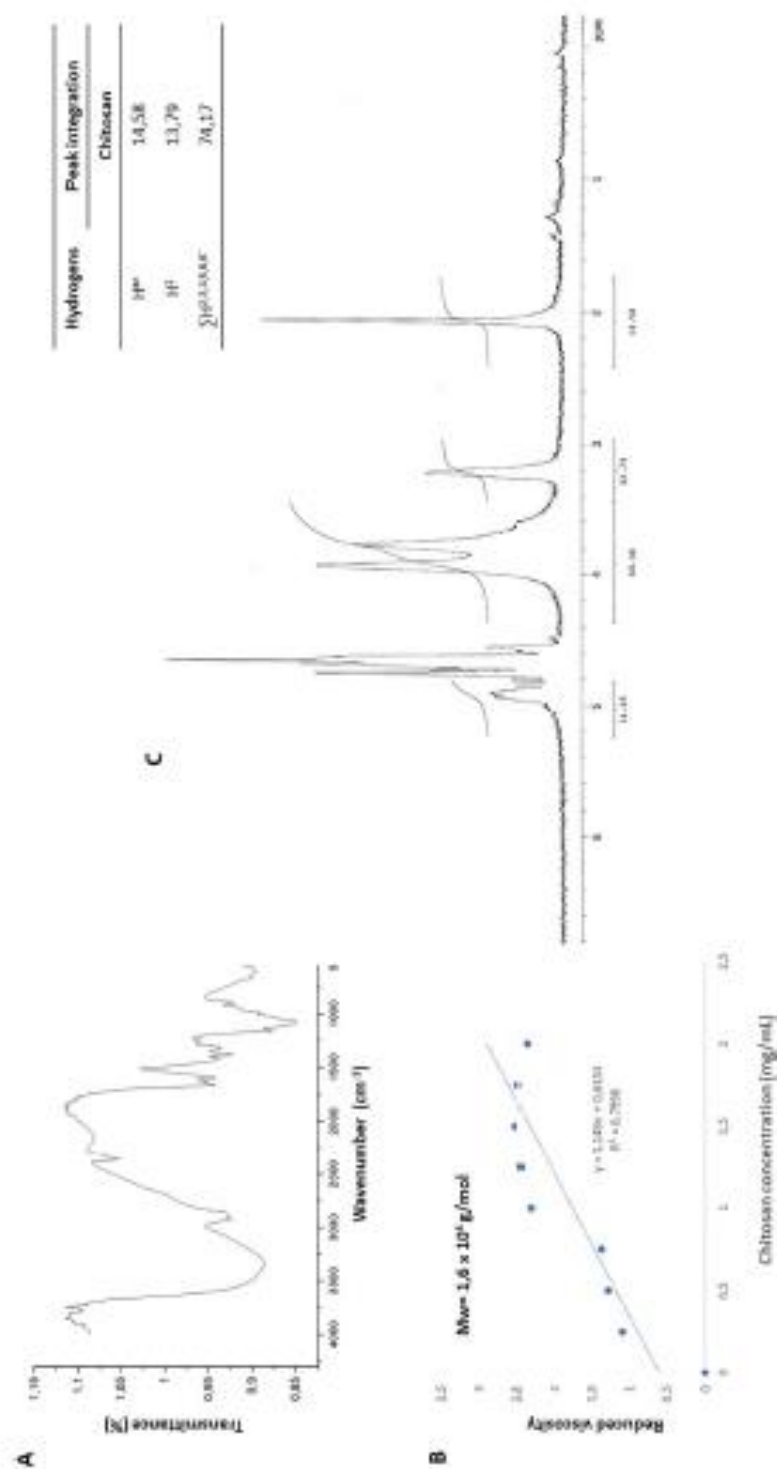


Fig. 1. Infrared spectra (A), Viscometric molecular weight (B), and proton nuclear magnetic resonance (C) of chitosan from a fish extract from 116 patients between the 80s

acid showed fungal growth in all replicates, excluding the possibility of citric acid being the active ingredient with antimicrobial property in the edible coating.

Previous studies have suggested different mechanisms for the antifungal activity of chitosan [8,11]. The first mechanism is that chitosan increases the permeability of the fungal membrane and causes leakage of intracellular contents. This occurs probably due to the interaction between the chitosan amino group in a polycation form (positively charged) and phospholipid components of the fungal membrane (negatively charged). In the second mechanism, chitosan interrupts the availability of essential nutrients important for fungal metabolism. In this case, chitosan acts as a chelating agent by binding to trace metals. In the third mechanism, chitosan (low molecular weight) is incorporated into the cell and interacts with DNA, and may affect the production of essential proteins and enzymes [8,9,11].

Different concentrations of CHI-CA, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, and 10.0 mg/mL, corresponding to MIC/2, MIC, and MIC $\times$ 2, respectively, were evaluated for the dose action on radial mycelial growth (Fig. 2). CHI-CA inhibited the mycelial growth of *C. gloeosporioides* in a concentration-dependent mode, which agrees with reports in the literature [8–10]. The inhibition rate of CHI-CA at lower concentration (2.5 mg/mL) was 44% with two days of growth. However, continuous growth was observed from the second day onwards. In the case of CHI-CA at 5.0 mg/mL, mycelia began to grow only on the fourth day of the incubation period. In this case, mycelial growth was inhibited by 87% compared to the control (absence of CHI-CA). Nevertheless, the inhibitory effect of CHI-CA gradually decreased during incubation until the end of growth. When CHI-CA was applied at 10 mg/mL (1%), total inhibition of mycelial growth was observed during the entire incubation period, since this concentration corresponded to MIC. These results differ from those of Zahid et al. [9], which demonstrated maximum inhibition of *C. gloeosporioides* radial mycelial growth at 2% chitosan. The difference between the results may be due to the process of obtaining chitosan, with physicochemical heterogeneity in the degree of deacetylation and molecular weight, as well as due to the type and concentration of the acid used for solubilization of the polymer [8].

3.3. Ultrastructural effects of chitosan-citric acid on conidial germination and hyphae

The effects of CHI-CA on the morphology and cell surface of conidia during germination and on hyphae are shown in Fig. 3. In the control sample, some cylindrical conidia could be seen, some of which had started the process of germination. The conidia and short germ tubes had a smooth surface and rounded apices (Fig. 3A). In the sample treated with 2.5 mg/mL CHI-CA (Fig. 3B), conidia and long germ tubes had a rough surface and were highly wrinkled, wrinkled, and severely damaged. The treatment with 5.0 mg/mL CHI-CA induced similar morphological changes, with roughened and highly wrinkled conidia and germ tubes (Fig. 3C). Moreover, due to the presence of many germinating conidia even after 24 h of incubation, we can infer that CHI-CA inhibited the elongation of the germ tube.

In the control sample without CHI-CA (Fig. 3D), mycelia exhibited homogeneous and regular hyphae, with a smooth external surface and rounded apices. In the treatment with CHI-CA applied at a rate of 2.5 mg/mL (Fig. 3E), the hyphae were distorted, irregular, and with swellings throughout. When the CHI-CA concentration was increased to 5.0 mg/mL, more drastic effects induced by the biopolymer were observed, with fragmentation or segmentation and disruption of the hyphae (Fig. 3F). In a detailed view, it is possible to observe hyphal fragmentation originating with oval structures with a distinct size, which appear to be arthrospores (Fig. 3G).

Our results corroborate those of Zahid et al. [9] who observed hyphal agglomeration and abnormal conidial shapes in *C. rosea* and *C. gloeosporioides* when treated with chitosan nanoemulsions. Furthermore, Zhou et al. [10] found distorted and rough hyphae after exposure to chitosan. In addition, they reported that *Plasma* membranes combined with chitosan resulted in serious damage to *C. gloeosporioides*, including distorted and concave hyphae after 12 days of incubation, and shriveled and collapsed hyphae after 25 days of incubation. However, in our study, chitosan alone at both concentrations was able to cause severe lesions, such as shriveled and collapsed hyphae, in *C. gloeosporioides*.

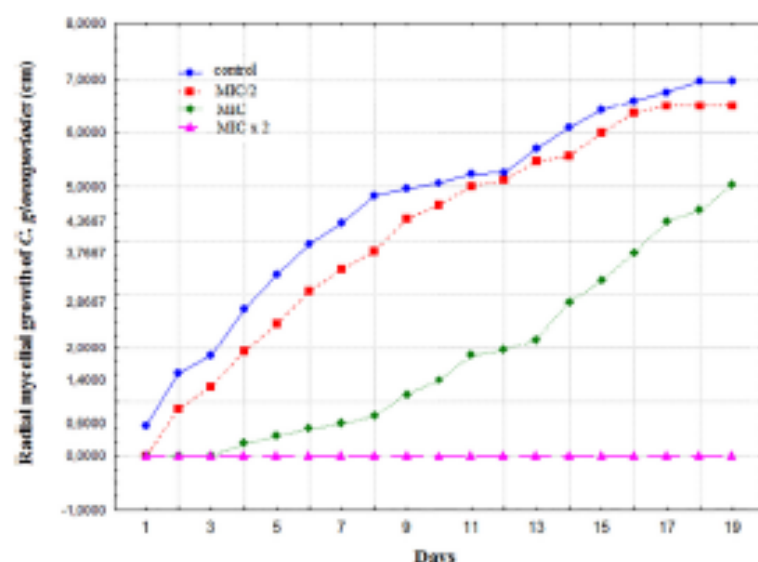


Fig. 2. Radial mycelial growth (cm) of *Colletotrichum gloeosporioides* (URM2335) in Sabouraud agar with 1% citric acid (control) or different chitosan-citric acid concentrations of 2.5 mg/mL (MIC/2), 5.0 mg/mL (MIC), and 10.0 mg/mL (MIC $\times$ 2) over 19 days. MIC = minimum inhibitory concentration.

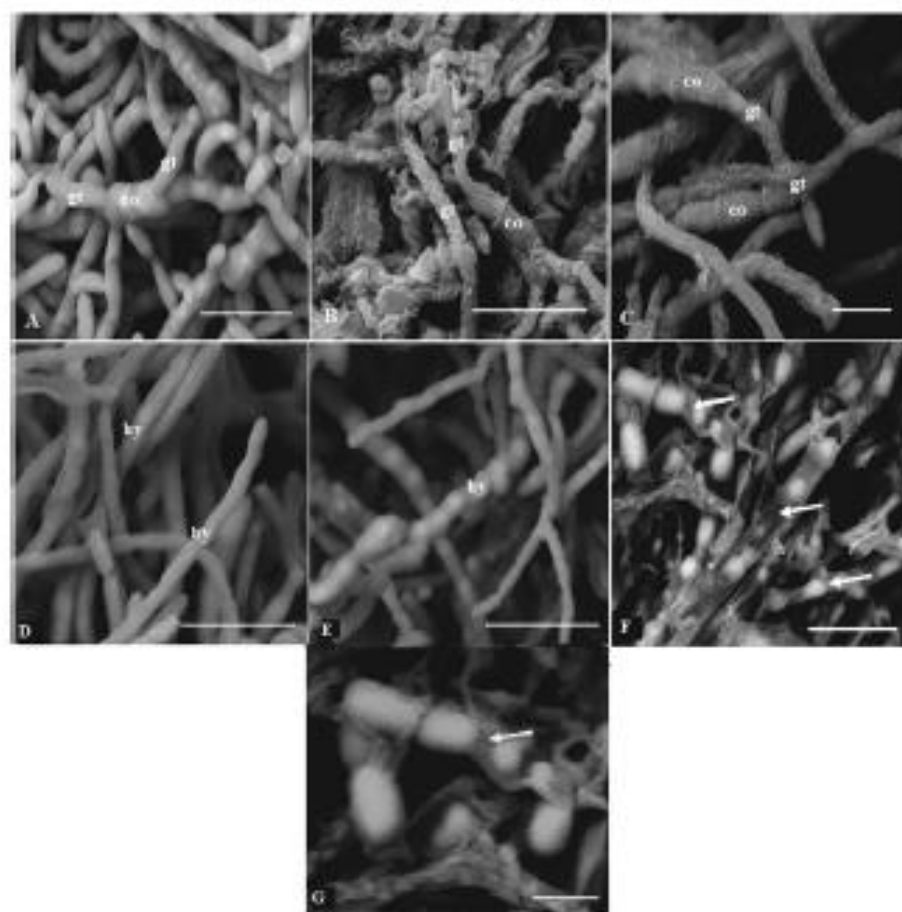


Fig. 3. Scanning electron micrographs showing the effects of chitosan-chitosan-chitosan on conidial germination and on hyphae of *G. glaberrima*. Control sample showing conidia (co) germinated in the absence of chitosan-chitosan-chitosan (A); ultrastructural alterations in conidia (co) and germ tubes (gt) induced by chitosan-chitosan-chitosan at 2.5 mg/ml (B) and 5.0 mg/ml (C); hyphae (hy) in the control sample in the absence of chitosan-chitosan-chitosan (D); ultrastructural changes in hyphae (hy) induced by chitosan-chitosan-chitosan at 2.5 mg/ml (E) and 5.0 mg/ml (F); and the death of hyphae treated with 5.0 mg/ml chitosan-chitosan-chitosan (G). Arrows indicate hyphae fragmentation in response to chitosan-chitosan-chitosan treatment. Bars: 10 μ m (A, B, D, E, F), and 5 μ m (C, G).

The wrinkled and wilted hyphae observed in our study may be due to loss of cytoplasmic content. Previous studies have shown similar effects on the morphology and ultrastructure of phytopathogenic fungi as a result of the action of chitosan diluted in 1% acetic acid [21]. In addition, mature hyphae with 3 days of growth may be more sensitive to chitosan-chitosan-chitosan action than expanding germ tubes.

Our results clearly show how CHI-CA induces marked changes in the surface morphology of fungal spores during germination and of growing hyphae, and correspond very well with the results of *in vitro* antifungal studies that have found high inhibitory rates with different concentrations of chitosan, which suggests the use of this polymer to prevent food contamination and against infections already developed.

3.4. Effects on physicochemical characteristics of minimally processed guava

The physicochemical changes in fresh-cut guava coated with 0.5% glycine (control) and CHI-CA were evaluated throughout storage at

24 °C for 7 days and under refrigeration at 4 °C for 14 days (Table 1). All parameters evaluated changed during storage at the two different temperatures. The fresh-cut guava coated with glycine or CHI-CA showed similar results for soluble solids, total sugar, and ascorbic acid. These parameters decreased during storage, independent of the storage temperature, with significantly lower values for the control than for the fresh-cut guava treated with CHI-CA ($p < 0.05$).

On the other hand, titratable acidity and pH did not differ significantly ($p > 0.05$) between the control and CHI-CA coated guava samples, although the former increased at 24 °C and decreased at 4 °C. These show that the physical barrier created by the glycine or CHI-CA coating, as well as low storage temperature, limit the respiratory and metabolic processes of the fruit, reducing the loss of nutritional components such as soluble solids and titratable acidity [2,46,47]. There was a general loss of fresh mass in samples maintained at both temperatures, with losses significant increasing ($p < 0.05$) as a function of storage time in both control and CHI-CA samples. The loss of weight in fruits and fresh vegetables is due especially to water loss caused by respiration and transpiration [4,5].

Table 1
Mean $\pm$ SD values for physicochemical quality of fresh-cut fruit of the guava cultivar Paluma coated with 0.5% glycerol (control) or 5 mg/ml chitosan- α -lipoic acid (CHI-CA) during storage at 24 °C and 4 °C for 7 and 14 days, respectively.

Treatment	24 °C			4 °C			
	0	3	7	0	3	7	14
Soluble solids (°Brix)							
Control	12.10 $\pm$ 0.10Aa	10.93 $\pm$ 0.25Bb	8.57 $\pm$ 0.06Cb	12.10 $\pm$ 0.11Aa	11.97 $\pm$ 0.15Aa	11.67 $\pm$ 0.11Ba	10.83 $\pm$ 0.15Ca
CHI-CA	12.00 $\pm$ 0.20Aa	11.83 $\pm$ 0.11Aa	9.83 $\pm$ 0.06Ba	10.40 $\pm$ 0.24Ab	10.10 $\pm$ 0.10Bb	9.83 $\pm$ 0.08Bb	9.20 $\pm$ 0.09Cb
Titrimetric acidity in citric acid (g kg⁻¹)							
Control	0.62 $\pm$ 0.01Cb	0.68 $\pm$ 0.02Ba	0.73 $\pm$ 0.01Aa	0.62 $\pm$ 0.01Ab	0.55 $\pm$ 0.02Ba	0.52 $\pm$ 0.02Ba	0.50 $\pm$ 0.01Ca
CHI-CA	0.65 $\pm$ 0.01Ba	0.68 $\pm$ 0.02Aa	0.70 $\pm$ 0.00Aa	0.65 $\pm$ 0.01Aa	0.58 $\pm$ 0.01Ba	0.54 $\pm$ 0.02Ca	0.51 $\pm$ 0.01Ca
Ascorbic acid (°Brix)							
Control	8305 $\pm$ 229Aa	8016 $\pm$ 0.19Ba	78.10 $\pm$ 0.13Ba	8305 $\pm$ 229Aa	8105 $\pm$ 1.09Ba	78.57 $\pm$ 1.01Ba	72.43 $\pm$ 0.91Ca
CHI-CA	6902 $\pm$ 1.72Ab	6411 $\pm$ 0.23Bb	62.46 $\pm$ 0.47Bb	6902 $\pm$ 1.72Ab	6580 $\pm$ 0.33Bb	62.70 $\pm$ 0.31Bb	58.47 $\pm$ 0.46Cb
pH							
Control	3.25 $\pm$ 0.01Aa	3.22 $\pm$ 0.02Aa	3.68 $\pm$ 0.03Ba	3.25 $\pm$ 0.01Aa	3.27 $\pm$ 0.04Ba	3.78 $\pm$ 0.05Ba	3.88 $\pm$ 0.03Ca
CHI-CA	3.25 $\pm$ 0.02Aa	3.21 $\pm$ 0.02Aa	3.69 $\pm$ 0.03Ba	3.25 $\pm$ 0.02Aa	3.28 $\pm$ 0.03Ca	3.83 $\pm$ 0.05Ba	3.89 $\pm$ 0.02Aa
Total sugar (g kg⁻¹)							
Control	8.08 $\pm$ 0.14Ab	7.50 $\pm$ 0.04Ba	5.84 $\pm$ 0.04Cb	8.08 $\pm$ 0.14Ab	7.32 $\pm$ 0.03Bb	7.06 $\pm$ 0.10Bb	6.72 $\pm$ 0.11Cb
CHI-CA	9.86 $\pm$ 0.01Aa	7.95 $\pm$ 0.05Ba	6.73 $\pm$ 0.07Ca	9.86 $\pm$ 0.10Aa	8.27 $\pm$ 0.12Ba	8.02 $\pm$ 0.11Ca	7.76 $\pm$ 0.04 Ba
Mass loss (%)							
Control	0.00 $\pm$ 0.00Aa	3.50 $\pm$ 0.19Ba	8.27 $\pm$ 0.46Ca	0.00 $\pm$ 0.00Aa	1.18 $\pm$ 0.16Bb	3.58 $\pm$ 0.43Cb	8.20 $\pm$ 0.10 Ca
CHI-CA	0.00 $\pm$ 0.00Aa	3.28 $\pm$ 0.25Ba	8.37 $\pm$ 1.28Ca	0.00 $\pm$ 0.00Aa	1.26 $\pm$ 0.28Bb	3.63 $\pm$ 0.35Cb	8.82 $\pm$ 1.54 Ca

The same uppercase letters in the same row indicate that the means do not differ significantly ($p > 0.05$; Tukey's test); the same lowercase letters for the same storage time and same analysis indicate that the means do not differ significantly ($p > 0.05$; Student's t -test).

Our results demonstrate the efficiency of CHI-CA to retard fruit maturation. This is probably due to the reduction in the rates of respiratory and metabolic processes, which delays fruit maturation by lowering sugar hydrolysis [24,6]. Furthermore, the filmogenic properties of chitosan allow it to form a semipermeable barrier around the fresh-cut fruit, modifying the internal atmosphere by lowering oxygen and/or elevating carbon dioxide while suppressing ethylene production [24–7,11].

The results of guava color retention at 24 °C and 4 °C are found in Table 2. At 24 °C and 4 °C, the L values increased in both samples, which may be related to the ripening process [1]. It may also be related to the loss of the initial vivid red color of the mesocarp of the fresh cut guava. The mesocarp becomes less red in color because of the natural occurrence of dehydration, enzymatic browning, and fungal proliferation which operate simultaneously [5]. Guava treated with CHI-CA showed smaller L values than the control samples at the end of storage (Table 2), which may be due to chitosan acting as a barrier and

preventing color changes and delaying the ripening process [5]. In our study, preservation of color was also demonstrated by the results for a^* , b^* , and C^* , which show the tendency of the fruit to become less green or yellow due to the degradation of chlorophyll pigments and formation of carotenoids. Both samples presented the rose-red coloration expected by consumers [5]; thus, the edible CHI-CA coating is able to preserve this important quality attribute.

3.5. Effects of edible chitosan- α -lipoic acid coating on rot incidence and microbiological parameters of fresh-cut guava

In the analysis of total coliforms (at 35 °C) and fecal coliforms (at 45 °C), values lower than 1/g were found in all samples and at both storage temperatures. Similar results were obtained for the tests for *Salmonella* spp., with absence in all the samples evaluated (data not shown). During the 14 days of storage, variation and increase in the number of molds and yeasts were observed in samples (control and CHI-CA)

Table 2
Color parameters a^* , b^* , L^* , and C^* values (mean $\pm$ SD) for fresh-cut fruit of the guava cultivar Paluma coated with 0.5% glycerol (control) or with 5 mg/ml chitosan- α -lipoic acid (CHI-CA), during storage at 24 °C and 4 °C for 7 and 14 days, respectively.

Treatment	24 °C			4 °C			
	0	3	7	0	3	7	14
L^*							
Control	41.08 $\pm$ 1.04Ca	44.62 $\pm$ 0.83Ba	47.66 $\pm$ 0.29Aa	41.62 $\pm$ 1.03Ca	41.32 $\pm$ 0.64 Da	43.57 $\pm$ 0.33Ba	46.40 $\pm$ 0.16Aa
CHI-CA	39.19 $\pm$ 0.42Bb	42.80 $\pm$ 0.52Ab	43.57 $\pm$ 0.32Ab	39.19 $\pm$ 0.42Bb	39.45 $\pm$ 0.40Bb	41.85 $\pm$ 0.24Ab	41.71 $\pm$ 0.01Ab
a^*							
Control	25.30 $\pm$ 0.21Ab	26.48 $\pm$ 0.63Aa	25.39 $\pm$ 0.47Aa	25.64 $\pm$ 0.20Bb	26.48 $\pm$ 0.39Aa	26.42 $\pm$ 0.11Aa	24.36 $\pm$ 0.20Cb
CHI-CA	27.45 $\pm$ 0.57Aa	26.88 $\pm$ 0.32Aa	26.01 $\pm$ 0.86Aa	27.78 $\pm$ 0.23Aa	26.39 $\pm$ 0.23Ba	26.31 $\pm$ 0.18Ba	25.86 $\pm$ 0.13Ba
b^*							
Control	14.05 $\pm$ 0.55Ba	17.47 $\pm$ 0.30Aa	18.12 $\pm$ 0.18Aa	14.32 $\pm$ 0.17 Ba	15.36 $\pm$ 0.32Ca	16.07 $\pm$ 0.12Aa	18.51 $\pm$ 0.25Ab
CHI-CA	12.62 $\pm$ 0.40Cb	14.39 $\pm$ 0.21Bb	15.33 $\pm$ 0.38Ab	12.73 $\pm$ 0.25Cb	15.57 $\pm$ 0.10Ba	16.15 $\pm$ 0.10Aa	16.66 $\pm$ 0.29Ab
C^*							
Control	29.36 $\pm$ 0.19Cb	32.40 $\pm$ 0.48Aa	31.36 $\pm$ 0.14Ba	28.42 $\pm$ 0.19Bb	30.48 $\pm$ 0.13Aa	30.73 $\pm$ 0.19Aa	30.81 $\pm$ 0.10Aa
CHI-CA	30.72 $\pm$ 0.12Aa	30.52 $\pm$ 0.27Ab	30.79 $\pm$ 0.20Ab	30.72 $\pm$ 0.12Aa	30.54 $\pm$ 0.34Aa	30.85 $\pm$ 0.10Aa	30.82 $\pm$ 0.10Aa

Means indicated with the same uppercase letters in columns and lowercase letters in rows are not significantly different (Tukey's test; $p > 0.05$).

Table 3

Results of sensory analysis and the intention to purchase fresh-cut fruit of the guava cultivar Palamacoated with 0.3% glycerol (control) or 5 mg/mL chitosan-citric acid (CHI-CA) during storage at 4 °C for 7 days. Mean $\pm$ SD values are given for the mean rating of appearance, color, aroma, flavor, and overall assessment, based on a hedonic scale from 1 = dislike very much to 9 = like very much, and purchase intent based on a hedonic scale from 1 = certainly would not buy to 5 = certainly would buy.

Treatment	Number of days of storage at 4 °C		
	0	3	7
Appearance			
Control	7.64 $\pm$ 1.29Aa	6.10 $\pm$ 1.50Ba	6.32 $\pm$ 1.90Ba
CHI-CA	7.66 $\pm$ 1.17Aa	6.26 $\pm$ 1.67Ba	6.20 $\pm$ 1.90Ba
Color			
Control	7.36 $\pm$ 1.53Aa	6.98 $\pm$ 1.55Aa	6.14 $\pm$ 1.90Bb
CHI-CA	7.84 $\pm$ 1.13Aa	5.96 $\pm$ 1.80Ca	6.82 $\pm$ 1.90Ba
Aroma			
Control	6.88 $\pm$ 1.46Aa	6.98 $\pm$ 1.29Aa	5.40 $\pm$ 1.81Bb
CHI-CA	5.90 $\pm$ 1.88Ab	6.20 $\pm$ 2.17Aa	6.76 $\pm$ 1.90Aa
Flavor			
Control	7.00 $\pm$ 1.76Aa	6.00 $\pm$ 1.78Ba	5.30 $\pm$ 1.90Bb
CHI-CA	6.52 $\pm$ 2.07Aa	5.98 $\pm$ 2.12Aa	6.28 $\pm$ 2.02Aa
Overall assessment			
Control	7.48 $\pm$ 1.07Aa	6.06 $\pm$ 1.35Ba	5.94 $\pm$ 1.56Cb
CHI-CA	6.70 $\pm$ 1.76Ab	6.26 $\pm$ 1.56Aa	6.68 $\pm$ 1.92Aa
Purchase intent			
Control	4.16 $\pm$ 0.86Aa	3.18 $\pm$ 0.98Ba	3.10 $\pm$ 1.07Bb
CHI-CA	3.74 $\pm$ 1.29Aa	3.28 $\pm$ 1.19Aa	3.72 $\pm$ 1.32Aa

The same uppercase letters in the same row indicate that the means do not differ significantly ($p > 0.05$; Tukey's test). The same lowercase letters in the same storage time and same analysis indicate that the means do not differ significantly ($p > 0.05$; Student's *t*-test).

stored at 24 °C and 4 °C (Supplementary data). However, in guavas coated with CHI-CA and stored at 4 °C, fewer microorganisms were present.

3.5. Sensorial evolution

Changes in sensory attributes of fresh-cut guava treated with CHI-CA and glycerol (control) during storage are presented in Table 3. There were no significant differences ($p > 0.05$) between the days of analysis for the CHI-CA samples for attributes of flavor, aroma, and overall assessment. The overall high sensory qualities of fresh-cut guava treated with CHI-CA contributed to testees stating their intention to “possibly buy this fruit” (Table 3).

4. Conclusions

This study demonstrated that chitosan with low molecular weight and 64K deacetylation can be obtained from shrimp (*L. vannamei*) shells by treatment at high temperature with a short exposure time. Chitosan is adequately dissolved in 1% citric acid, allowing the production of an edible CHI-CA coating. *C. gloeosporioides* is inhibited by CHI-CA, which shows fungistatic and fungicidal action, and induces morphological changes on the spore surface, as well as on fungal hyphae. Fresh-cut guava coated with CHI-CA maintained quality parameters during storage, and preserved their sensorial characteristics. Our results show that the use of edible CHI-CA coating is a promising strategy for improving the postharvest quality of fresh-cut guava fruit.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.067>.

Acknowledgements

The authors thank the FACEPE (APQ 0566-5.07/14), CNPq (40295/2013-8 and 436172/2018-6), and PROPEQ/UFPE (23076.040914/2017-47) for financial support and research grants and the IEAN/UN/

UFPE, Analytical Center of DQF/UFPE, and CETENE for technical support and access to facilities.

Author statement

All authors read, approved, and agreed with the submission of the manuscript for International Journal of Biological Macromolecules.

All experimental work with human subjects have been reviewed by the appropriate ethics committees Ethics Committee on human research of the Health Center at the Federal University of Pernambuco (certificate number 05736012.4.0000.5208), under protocol number 195.488.

Author contributions

Julia Idalice Gois Nascimento: Conceptualization, Investigation, Roles/writing - original draft, Thaysa Christina Montenegro Stamford: Contributed to supervision, Conceptualization, Methodology, Investigation, Roles/writing - original draft, Provided the resources, Funding acquisition, Natalia Ferreira Castelo Branco Melo: Investigation, Formal analysis, Visualization, Thaisany dos Santos Nunes: Investigation, Marcos Antônio Barbosa Lima: Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Maria Manuela Esteves Pinheiro: Conceptualization, Roles/writing - original draft, Thaisany Montenegro Stamford-Aranda: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Newton Pereira Stamford: Contributed to supervision, Conceptualization, Investigation, Provided the resources, Roles/writing - original draft, Tânia Lúcia Montenegro Stamford: Contributed to supervision, Conceptualization, Provided the resources, Investigation, Roles/writing - original draft, Funding acquisition, Project administration.

All authors contributed to the Writing - review & editing and approved the final article.

Declarations of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] W.B. Silva, G.M.C. Silva, D.B. Santana, A.R. Salvador, D.B. Medeiros, L. Belykh, N.M. Silva, M.J.M. Cordeiro, G.R. Melo, Chitosan delays ripening and ROS production in guava (*Psidium guajava* L.) fruit, *Food Chem.* 242 (2018) 202–210, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.052>.
- [2] A.B. Aquino, A.F. Blank, L.C. Santana, Impact of edible chitosan-citric acid coating enriched with apple polyphenols on the shelf life of guava (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature, *Food Chem.* 25 (2018) 108–116, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.077>.
- [3] G.H.A. Teixeira, L.C. Cunha Jr., A.S. Ferraz, J.F. Durigan, Quality of guava (*Psidium guajava* L., cv. Palamão) fruit stored in low- O_2 controlled atmosphere is negatively affected by increasing levels of CO_2 , *Postharvest Biol. Technol.* 111 (2016) 62–68, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.022>.
- [4] K. Hong, J. Xia, L. Zhang, D. Sun, D. Gong, Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage, *Sci. Hort.* 148 (2012) 172–178, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.002>.
- [5] L.A. Rizzo, D. Brito, J.S. Rizzo, T.A. Gamali, R.G. Odile, Effect of chitosan-guar gum-methylcellulose edible coatings in extending the shelf life of fresh and cut guava, *Food Packag. Shelf Life* 5 (2015) 68–74, <https://doi.org/10.1016/j.foodpack.2015.06.001>.
- [6] E.L. Sousa, C.V. Sales, C.E.V. Oliveira, L.A.A. Lopes, M.J. Correia, L.R.R. Berger, T.C.M. Stamford, Efficacy of a coating composed of chitosan from *Musca domestica* and carboxymethylcellulose to control *Aspergillus* growth and the quality of cherry tomato fruits, *Food Microbiol.* 6 (2015) 722, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.022>.
- [7] L. Ma, M. Zhang, B. Bhattacharya, Z. Guo, Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables, *Trends Food Sci. Technol.* 68 (2017) 23–38, <https://doi.org/10.1016/j.tfs.2017.03.005>.
- [8] L.R.R. Berger, T.C.M. Stamford, K.A.R. Oliveira, A.M.P. Pessoa, M.A.B. Lima, M.M.E. Pinheiro, M.R.S. Oliveira, L.G. Franco, M. Magnani, E.L. Sousa, Chitosan produced from *Musca domestica* using agroindustrial by-product and its efficacy to inhibit *Callosobruchus* species, *Int. J. Biol. Macromol.* 110 (2018) 625–631, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.178>.
- [9] N. Zaki, A. Ali, S. Mankam, Y. Siddiqui, M. Maghso, Potential of chitosan-coated nanomaterials in controlling *Aspergillus* spp. and maintaining quality of tropical fruits during cold storage, *J. Appl. Microbiol.* 113 (2012) 825–838, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3077.2012.02588.x>.

- [10] Y. Zhou, L. Zhang, K. Zeng, Efficacy of chitin membrane films combine with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and postharvest of action, *Biol. Control* 96 (2016) 38–47, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.001>.
- [11] C.E.V. Oliveira, C.V.S. Magrini, A.L.S. Pente, G.M. Campesato, T.C.M. Stamford, E.L. Souza, Effects of chitosan from *Caenorhabditis elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.), *Int. J. Food Microbiol.* 171 (2014) 54–61, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.006>.
- [12] H. Arsan, V. Zaitsev, R. Poon, E. Powrie, Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit, *Postharvest Biol. Technol.* 87 (2014) 21–26, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.09.007>.
- [13] V.L.R. Oliveira, R.C. Santos, R.H.L. Leite, E.M.M. Araújo, K.N.O. Silva, Use of biopolymer coating hydrophobized with beeswax in post-harvest conservation of guava, *Food Chem.* 259 (2018) 35–44, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.101>.
- [14] R.S. Bileshi, D. Selvakumar, K. Kadivella, N.S. Kumar, Chitosan as an environment friendly bioherbicide – a review on recent modifications and applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 150 (2020) 1072–1083, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>.
- [15] E. Fernández-Martín, M. Acuña, E. López-Caballero, C. Gómez-Guillén, P. Montero, M. Remolado-García, Preparation and molecular characterization of chitosan obtained from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shells, *J. Food Sci.* 79 (9) (2004) 1720–1721, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.12572>.
- [16] C. Duan, X. Meng, J. Meng, M.J.H. Khan, L. Dai, A. Khan, X. An, J. Zhang, T. Huo, Y. Ni, Chitosan as a preservative for fruit and vegetables: a review on chemistry and antimicrobial properties, *J. Biosci. Bioprod.* 4 (1) (2019) 11–21, <https://doi.org/10.21967/jbbsv4i1.889>.
- [17] A. Hira, H. Odani, A. Nakajima, Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy, *Polym. Bull.* 26 (1991) 87–94, <https://doi.org/10.1007/BF00289352>.
- [18] P.D.L. Oliveira, K.A.R. Oliveira, W.A.S. Vieira, M.P.S. Oliveira, E.L. Souza, Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil, *Int. J. Food Microbiol.* 266 (2018) 87–94, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.018>.
- [19] AOAC – Association Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International, 19th ed. AOAC International, Washington, 2002.
- [20] CIE – Commission Internationale de l'Éclairage, Colorimetry, second ed. CIE Publication, Vienna, 1986.
- [21] N.S.T. Santos, A.J.A.A. Aguiar, C.E.V. Oliveira, C.V. Sales, S.M. Silva, R.S. Silva, T.C.M. Stamford, E.L. Souza, Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Oryzopsis vilgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.), *Food Microbiol.* 32 (2012) 346–352, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.014>.