

Potencial Antifúngico a *Penicillium expansum*
de Filmes de Polissacarídeos à Base
de Quitosana e Trimetil Quitosana



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
140**

Potencial Antifúngico a *Penicillium expansum*
de Filmes de Polissacarídeos à Base
de Quitosana e Trimetil Quitosana

*Douglas de Britto
Odílio Benedito Garrido de Assis*

Embrapa Semiárido
Petrolina, PE
2020

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>
Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido
BR 428, km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23
CEP 56302-970, Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600
Fax: (87) 3866-3815

Comitê Local de Publicações

Presidente
Flávio de França Souza

Secretária-Executiva
Juliana Martins Ribeiro

Membros
Ana Cecília Poloni Rybka, Bárbara França Dantas, Diogo Denardi Porto, Éider Manoel de Moura Rocha, Geraldo Milanez de Resende, Gislene Feitosa Brito Gama, José Maria Pinto, Pedro Martins Ribeiro Júnior, Rita Mércia Estigarríbia Borges, Sidinei Anunciação Silva, Tadeu Vinhas Voltolini.

Supervisão editorial
Sidinei Anunciação Silva

Revisão de texto
Sidinei Anunciação Silva

Normalização bibliográfica
Sidinei Anunciação Silva

Tratamento das ilustrações
Nivaldo Torres dos Santos

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Eldey Marcos Dias Nunes
Sidinei Anunciação Silva

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Semiárido

Britto, Douglas de.

Potencial antifúngico a *Penicillium expansum* de filmes de polissacarídeos à base de quitosana e trimetil quitosana / Douglas de Britto, Odílio Benedito Garrido de Assis. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2020.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.
ISSN 1808-9968.

1. Pós-colheita. 2. Preservação de alimento. 3. Tecnologia de alimento. 4. Filme comestível. 5. Fungo. I. Britto, Douglas de. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de. III. Título. IV. Série.

CDD 641.4

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	14
Conclusões.....	24
Referências	25

Potencial Antifúngico a *Penicillium expansum* de Filmes de Polissacarídeos à Base de Quitosana e Trimetil Quitosana

Douglas de Britto¹

Odílio Benedito Garrido de Assis²

Resumo – O controle alternativo pós-colheita de frutos e hortaliças para diminuir e erradicar infecções por microrganismos como fungos é vantajoso sob vários aspectos, principalmente do ponto de vista da sustentabilidade e segurança alimentar. Cada vez mais, o mercado consumidor tem buscado por produtos seguros, com baixo ou nenhum resíduo de agrotóxicos e produzidos de forma sustentável, com baixo impacto ambiental. Alguns compostos naturais como os óleos essenciais, polifenóis e alguns polissacarídeos, como quitosana, apresentam atividade antimicrobiana, apresentando-se, assim, como uma alternativa mais segura e sustentável. Neste trabalho, filmes do polissacarídeo quitosana e de seu derivado trimetil quitosana (TMQ) foram avaliados quanto à sua capacidade antifúngica contra *Penicillium expansum*, fungo muito comum e responsável por elevadas perdas pós-colheita em maçãs. A quitosana modificada TMQ apresentou alta capacidade de inibição do crescimento radial da colônia do fungo em estudo in vitro, principalmente para soluções mais diluídas em comparação com a quitosana não modificada. Da mesma forma, em estudo in vivo, a quitosana modificada TMQ inibiu o crescimento de fungos sobre o pericarpo da maçã, principalmente a partir de solução não acidificada. Estes resultados indicam que estes polissacarídeos modificados têm potencial para serem usados como filmes comestíveis antifúngicos.

Termos para indexação: filme comestível, fitopatógeno, antimicrobiano.

¹ Químico, D.Sc. em Química, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

² Físico, D.Sc. em Ciência e Engenharia dos Materiais, pesquisador da Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP.

Antifungal Potential to *Penicillium expansum* of Chitosan and Trimethyl Chitosan Based Polysaccharide Films

Abstract – Post-harvest alternative control to decrease or to eliminate infections by microorganisms such as fungi is advantageous in several aspects, mainly regarding sustainability and food safety. The consumer market has been looking for safe products, with little or no pesticide residue, and produced in a sustainable way, with low environmental impact. Some natural compounds such as essential oils, polyphenols and some polysaccharides, e.g., chitosan, exhibit antimicrobial activity, thus forming a safer and more sustainable alternative. In this work, films of the polysaccharide chitosan and its derivative trimethyl chitosan were evaluated for their antifungal capacity against *Penicillium expansum*, a very common fungus responsible for high post-harvest losses. The trimethyl modified chitosan showed high ability to inhibit the radial growth of fungal colony for in vitro study, mainly for more dilute solutions in comparison with non-modified chitosan. Further, in an in vivo study, the trimethyl modified chitosan inhibited the spread of fungi on sliced apple, mainly from neutral solution. Such results showed that these modified polysaccharides have the potentiality to be used as antifungal edible films.

Index terms: edible film, phytopathogen, antimicrobial.

Introdução

O Brasil tem posição privilegiada em relação à fruticultura, ocupando o terceiro lugar de maior produção mundial. A partir da organização das cadeias produtivas, o Brasil tem conquistado o mercado externo e conseguido abastecer o interno. Mesmo diante de aspectos antagônicos como adversidades climáticas, problemas logísticos de armazenamento (incluindo perdas pós-colheita) e de abastecimento, a produção de frutas tem alcançado bons resultados. De um lado, os últimos dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que se referem a 2011, indicam que houve aumento de 6,77% na colheita em relação a 2010, em uma cesta de 20 espécies de frutas acompanhadas pela estatal, atingindo quase 45 milhões de toneladas colhidas. Por outro lado, as pesquisas oficiais indicam que a área cultivada com frutíferas diminuiu em 0,26% em 2011, comparativamente ao ano anterior, sugerindo maior produtividade dos pomares. Naquele ano, os vários cultivos ocupavam 2,2 milhões de hectares (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2013).

No entanto, a elevada perda pós-colheita é um problema que tem sido foco de muitos estudos e investimentos. De fato, essas perdas são mais intensas em regiões tropicais devido à ocorrência de condições ambientais favoráveis à degradação, aliadas à ausência de uma infraestrutura adequada como cadeia de frio apropriada à conservação e logística de transporte dos produtos colhidos. O Brasil apresenta uma das maiores taxas de perdas pós-colheita de frutas e hortaliças do mundo, em torno de 35-40%, comparado com a Europa (25%) e aos Estados Unidos (16%). No total, as perdas de hortifrutícolas em nosso país chegam a 10 milhões de toneladas/ano de produtos colhidos e não consumidos (Assis et al., 2009; FAO, 2011; Luengo; Calbo, 2011). Estes valores podem variar para os diferentes tipos de cultivares comercializados.

Uma das possíveis formas de controlar ou minimizar tais perdas é a utilização de filmes e recobrimentos protetores, possibilitando, assim, elevar a vida útil dos produtos. Estes recobrimentos consistem em suspensões compostas de ingredientes naturais como polissacarídeos, proteínas e/ou lipídeos que são depositados sobre as frutas e, após a evaporação do solvente, formam uma película contínua. Estes tratamentos alteram de forma positiva a migração de vapor d'água e as trocas gasosas com o meio, reduzem as infecções e possibilitam um melhor apelo visual por incrementar o brilho superficial (Cazon et al., 2017).

Dentre as formulações processadas a partir dos mais diferentes tipos de materiais, alguns em particular, destacam-se por apresentarem atividade antimicrobiana. A quitosana e seus derivados estão entre esses materiais e têm sido aplicadas com resultados promissores como revestimentos antimicrobianos (Goy et al., 2009; Madanipour et al., 2019).

As infecções por microrganismos como fungos, bactérias e, em menor escala, vírus, estão entre as principais causas de perda pós-colheita em produtos vegetais. Dentre esses, os fungos estão mais frequentemente envolvidos com as podridões de frutos, sendo o grupo de microrganismos de maior frequência e atividade. Atribui-se aos fungos cerca de 80% a 90% do total de perdas causadas por agentes microbianos (Oliveira et al., 2006). As bactérias são frequentemente responsáveis pela deterioração de hortaliças, sendo o grupo de podridão-mole (*Pectobacterium* sp.) o mais comum. O padrão de ataque é, em geral, uma infecção primária, onde o agente causador aproveita-se de danos mecânicos ou mudanças físicas e fisiológicas que pre-dispõe o tecido ao ataque do mesmo. Em seguida, podem ocorrer infecções secundárias por diversos tipos de microrganismo saprófitos (Chitarra, 2006).

Diante deste cenário, têm surgido diversas formas de controle como o biológico, cultural, físico, genético, químico e outros alternativos com atmosfera modificada. Cada um destes métodos apresenta suas vantagens e limitações, sendo motivo de pesquisas contínuas (Oliveira et al., 2006). O controle biológico envolve o uso de microrganismos antagonistas que impedem o desenvolvimento do patógeno. Esta forma de controle tem grande apelo ambiental por não deixar resíduo no alimento. O controle genético também tem apelo ambiental e consiste em manejo de acessos de uma espécie de planta resistente a certos patógenos. Envolve também estratégias biotecnológicas como a transgenia. Muitas vezes, estas formas de controle podem ser integradas (controle químico pré-colheita), controle cultural (manejo do patossistema abrangido pelo patógeno), controle físico (cadeia do frio, choque térmico, radiação UV), etc.

Estudos empregando controles alternativos têm avançado muito por combinar muitas vantagens como apelo ambiental, valoração de resíduos da biomassa, embalagem ativa, aumento de qualidade, segurança alimentar etc. (Galgano et al., 2015; Mellinas et al., 2016). Com efeito, este tipo de controle tem um potencial muito grande de desenvolvimento por empregar conceitos tecnológicos de ponta como a nanotecnologia (Hernandez et al., 2015).

Os gêneros *Penicillium* e *Alternaria* estão entre os principais patógenos de ocorrência pós-colheita no Brasil, sendo o *P. expansum* um microrganismo que causa altos níveis de degradação (Pepeljnjak et al., 2002). Este gera também a micotoxina patulina que, mesmo em pequena proporção, provoca alterações significativas no sabor. Contra este patógeno, vários sistemas de controle têm sido propostos, sendo o alternativo via recobrimento com filmes com propriedade antifúngica aquele tem um grande potencial de desenvolvimento (Britto, Assis, 2012; Simonaitiene et al., 2015).

Revestimentos à base de quitosana mostram-se eficazes contra o crescimento de fungos, principalmente o *P. expansum*, em maçãs in natura pós-colhidas (Britto; Assis, 2012; Madanipour et al., 2019; Simonaitiene et al., 2015). Igualmente, outros fungos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *P. expansum* e *P. digitatum* foram controlados em testes in vitro e in vivo com diversas culturas como maçãs, uva, kiwi e citros (El Guilli et al., 2016; Hua et al., 2019; Karpova et al., 2019; Stocco et al., 2019). A quitosana foi eficaz também contra a germinação de esporos *P. expansum* in vitro e in vivo em estudos com maçãs 'Fuji' (*Malus domestica* Borkh.) e jujuba (*Ziziphus jujube* Mill. cv. Dongzao) (Yu et al., 2007; Wang et al., 2014). Uma inibição completa dos valores de germinação de esporos *P. expansum* foi conseguida em ensaio in vitro, quando a concentração polimérica de quitosana foi $\geq 0,3\%$. Para o teste in vivo, o tratamento com quitosana de maior concentração (1%) e com a menor viscosidade ($\eta = 12$ cP) foi o mais eficaz.

A capacidade antimicrobiana da quitosana pode ser aumentada a partir de modificações químicas em sua estrutura, por exemplo, via reação de metilação extensiva (Figura 1). Assim, são obtidos sais quaternários de quitosana de caráter catiônico e solúvel em meio neutro ou alcalino. Um possível processo para a obtenção desses derivados é pela adição covalente de um substituinte contendo um grupo amino quaternário (Curti et al., 2003) ou, de forma mais eficiente, por meio da metilação com agentes metilantes como o dimetilsulfato (Britto et al., 2011a), formando a trimetilquitosana (TMQ). Tanto a TMQ como a quitosana têm sido muito utilizadas como agentes fungicidas ou fungistáticos (Goy et al., 2009).

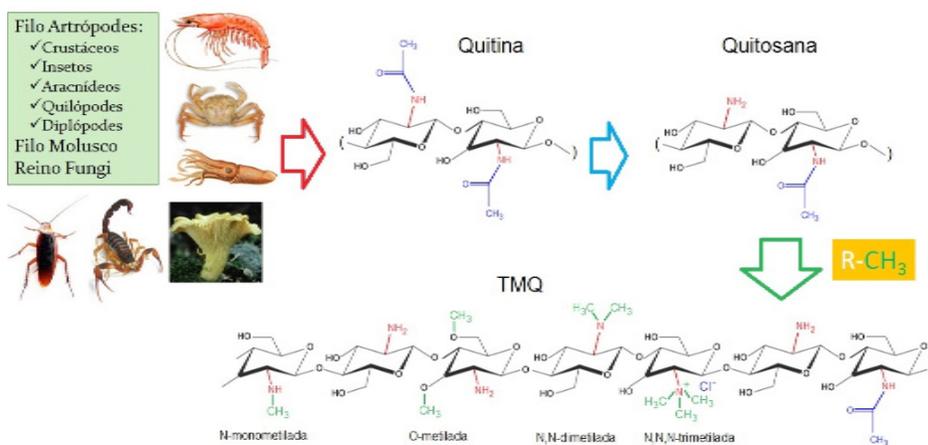


Figura 1. Ilustração das principais fontes e das estruturas químicas de quitina, quitosana e N,N,N-trimetilquitosana (TMQ).

Sais quaternários de quitosana como a TMQ foram testados contra várias bactérias, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Follmann et al., 2016; Zhang et al., 2018; Jia et al., 2001; Sun et al., 2006). Além de outros fatores estruturais como grau de substituição e diferentes contra-ions, o solvente utilizado na solubilização do derivado também apresenta influência. De acordo, a atividade antibacteriana da TMQ aumenta à medida que a concentração de ácido acético aumenta (Jia et al., 2001). A partir destes estudos é evidente que o número de cargas positivas ao longo da cadeia de polímero, que são maiores em ácido do que num meio neutro, afeta grandemente a atividade antibacteriana.

Estudos recentes têm mostrado que os derivados de quitosana modificada quimicamente têm maior atividade antifúngica que a quitosana não modificada (Badawy, 2010; El-Ghaouth et al. 2000a, 2000b; Mi et al., 2018; Wei et al., 2019; Zhang et al., 2018). Estes estudos incluem patógenos como *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum*, *Phomopsis asparagi*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium graminearum*, *Gibberella zeae* e *Physalospora piricola*. Foi verificado, também, que algumas propriedades estruturais tais como grau de substituição, tipos de grupos substituintes e contra-ions da TMQ interferem na atividade antifúngica.

Esta atividade tem sido bem documentada na literatura, sendo o modelo mais aceito o relacionado à natureza policatiônica do polissacarídeo que interage com sítios aniônicos presentes nas proteínas das paredes celulares dos microrganismos. Tal interação é mediada por forças eletrostáticas entre grupos NH₂ protonados presentes na quitosana e os resíduos negativos nas superfícies celulares. Essa troca iônica interfere diretamente na parede celular dos fungos, causando alterações na permeabilidade nas membranas e provocando instabilidade osmótica (Tsai; Su, 1999).

Mesmo diante desta potencialidade, encontram-se poucos trabalhos de testes in vivo, empregando-se os derivados de quitosana como filmes comestíveis. Um dos primeiros trabalhos foi com glicolquitosana (El-Ghaouth et al. 2000a; 2000b). Mais recentemente, o derivado carboximetilquitosana foi avaliado em toranja (*Citrus paradise* Macf.) (Wang et al., 2019)

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar formulações de quitosana e de seus derivados hidrossolúveis trimetil quitosana, obtidos a partir de diferentes métodos, como soluções precursoras formadoras de filmes e analisa a potencialidade destes revestimentos como agente antifúngico contra *Penicillium expansum* para emprego como revestimento comestível.

Material e Métodos

O meio de cultura utilizado na forma líquida foi batata-dextrose (BD) de origem comercial, preparado diluindo-se na proporção 24 g para cada 1.000 mL de solução da suspensão do teste de germinação de esporos *P. expansum*. O meio de cultura sólido utilizado nas placas de Petri foi batata-dextrose-ágar (BDA) de origem comercial, preparado diluindo-se 39 g para cada 1.000 mL de água destilada. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave (121 oC, 20 minutos).

As soluções de quitosana (Qui) e seus derivados foram preparados em soluções de ácido acético 1% e água destilada, respectivamente, nas concentrações 0,1 g L⁻¹; 1,0 g L⁻¹; 5,0 g L⁻¹ e 10,0 g L⁻¹, deixando em agitação até sua completa solubilização. A quitosana empregada foi de origem comercial de média massa molar (~4,0 10⁵ g mol⁻¹) e grau de acetilação de 20%. Os derivados de quitosana utilizados foram sais hidrossolúveis trimetil quitosana (TMQ) obtidos na Embrapa Instrumentação, a partir de reações especí-

ficas da quitosana com dimetilsulfato e com cloreto de glicidil trimetil amônio (Britto et al., 2011a). O grau de substituição foi aproximadamente 40%. Estes derivados foram denominados, respectivamente, TMQ-DMS e TMQ-Gli.

O fungo *P. expansum* foi isolado de maçãs contaminadas e replicado em placa de Petri com o meio de cultura BDA. Isolaram-se, cautelosamente, os esporos, crescendo-os em placa de Petri até notar visualmente a uniformidade desta espécie de fungo. A partir deste fungo colonizado sobre as placas, preparam-se as suspensões de esporos.

As suspensões de esporos para os testes de crescimento radial das colônias de fungo foram preparadas, adicionando-se às placas de Petri colonizadas 50 mL de solução esterilizada de polissorbato 80 (0,1% v/v), a fim de liberar os esporos presentes nas placas, e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL.

Da mesma forma, para os testes de germinação em suspensão, as suspensões de esporos foram preparadas adicionando-se às placas de Petri colonizadas 50 mL de água destilada esterilizada, sem adição de polissorbato 80, pois durante as análises percebeu-se que este prejudica a germinação dos esporos. A concentração dos esporos foi determinada utilizando-se a câmara de Neubauer. Para o teste, utilizou-se uma concentração de $1,0 \times 10^6$ esporos mL⁻¹.

Em capela de fluxo laminar, com todo material esterilizado, prepararam-se placas de Petri contendo meio de cultura BDA e fizeram-se três poços na superfície do meio de cultura com o auxílio da parte superior de uma pipeta de Pasteur. Depois, recobriu-se com 15,0 mL de solução inibidora (citadas anteriormente), aguardando-se cerca de 20 minutos para que a solução fosse absorvida. Em seguida, adicionou-se nos poços 10 µL da suspensão $1,0 \times 10^6$ esporos mL⁻¹.

O desenvolvimento dos fungos foi registrado diariamente a partir do segundo dia, por um período de 6 dias e o crescimento radial da colônia foi medido com a ajuda de software de edição de imagens, ImageJ®. As amostras-controle foram feitas da mesma maneira com água destilada e com solução de ácido acético 1% v/v (HAc-1%), sem a adição da solução inibidora. Os dados de crescimento micelial foram expressos em percentual de crescimento em relação à área total da placa de Petri de 90 mm de diâmetro. O experimento foi

realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições e uma placa por parcela. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

O preparo das suspensões para o teste de germinação foi feito em capela de fluxo laminar, com todo o material esterilizado. Preparou-se a suspensão de esporos em tubos de ensaio de 3,0 mL com tampas, adicionando-se 12 mg do meio sólido BD em 300 μ L da solução de esporos a $1,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1} . A este volume, adicionou-se 200 μ L da solução do inibidor devidamente concentrado para que as concentrações finais fossem como as estabelecidas anteriormente. Depois, incubou-se shaker com agitação orbital de 120 RPM pelo tempo e temperatura encontrados na observação das condições ideais (25 °C e 26 horas). Em seguida, a suspensão de esporos foi observada em um microscópio ótico e com ajuda de uma câmera digital foram registradas imagens dos esporos em câmera de Neubauer. Por meio das imagens digitais, realizou-se a contagem de esporos germinados e expressos em percentagem em relação aos não germinados. Preparam-se amostras-controles da mesma forma sem a adição do inibidor, que foi substituído por 200 μ L de água destilada esterilizada ou ácido acético 1%. O experimento foi realizado em duplicata em delineamento inteiramente casualizado com três repetições e parcela de um tubo por repetição. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

Dada a diferença encontrada entre o meio sólido (crescimento micelial) e líquido (germinação de conídios) nos experimentos in vitro, foi feito um experimento qualitativo in vivo para avaliar o desenvolvimento do fungo sobre o pericarpo de maçã cv. Gala. Este teste foi realizado com a quitosana modificada TMQ-DMS por ser solúvel tanto em água como em meio ácido acético 1%, permitindo melhor comparação dos resultados.

As maçãs foram adquiridas em estabelecimento comercial, fatiadas ao meio e mergulhadas por 30 segundos em solução de TMQ-DMS a $0,1 \text{ g L}^{-1}$, utilizando-se como solvente água deionizada e solução de ácido acético a 1%. As maçãs foram acondicionadas em estufa (28 °C, 80% RH) e, após 8 dias, foi realizada a avaliação da infecção natural por fungos por meio do percentual do fruto afetado. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e parcela experimental de um fruto. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

Resultados e Discussão

O desenvolvimento do fungo *P. expansum* (Holmes, 2018), avaliado pelo método do crescimento radial, não foi afetado pelas diferentes concentrações de quitosana (Figura 2). Na literatura, encontram-se descritos diversos comportamentos em função das propriedades da quitosana e da metodologia de análise. A massa molar e o grau de acetilação podem influenciar a atividade antifúngica da quitosana (Britto et al., 2012). Da mesma forma, a atividade antifúngica tem se mostrado dependente da concentração de quitosana (Jitareerat et al., 2007; Liu et al., 2007; Wang et al., 2014). Nestes casos, a atividade antifúngica foi diretamente proporcional à concentração de quitosana. No entanto, a metodologia consistiu em colocar um disco de micélio com cerca de 2 semanas em contato com o meio de cultura BDA + quitosana.

Neste estudo, a suspensão contendo os conídios de *P. expansum* foi colocada diretamente nos poços contendo previamente a solução inibidora de quitosana. Isso pode resultar em diferentes tipos de desenvolvimento da colônia. Outros detalhes também precisam ser observados, como, por exemplo, o solvente usado para dissolver a quitosana, que, no caso do trabalho feito por Wang et al. (2014), foi ácido clorídrico a 1%. Liu et al. (2007), também relatou diferença entre o controle e diversas concentrações de quitosana, no entanto, embora havendo diferença estatística entre as concentrações de 0,1 g L⁻¹ a 10 g L⁻¹ para o crescimento do *P. expansum*, os valores absolutos ficaram próximos.

O derivado de quitosana via dimetilsulfato, TMQ-DMS, apresentou atividade antifúngica superior à quitosana (Figura 3). No entanto, este efeito inibidor foi inversamente proporcional à concentração, ou seja, para as concentrações mais diluídas o efeito inibidor foi maior que para as soluções mais concentradas. Uma possível causa desse efeito é que, particularmente para os materiais poliméricos como a quitosana e seus derivados, em soluções mais concentradas as cadeias assumem uma conformação enovelada. Esta conformação restringe as cargas positivas das cadeias, as quais são responsáveis pelo efeito fungistático destes materiais (Goy et al., 2009). De fato, considera-se que a atividade da quitosana contra fungos seja semelhante às observadas para bactérias, ou seja, apresentam efeito fungistático em vez de fungicida com um potencial para causar mudanças fisiológicas no fungo.

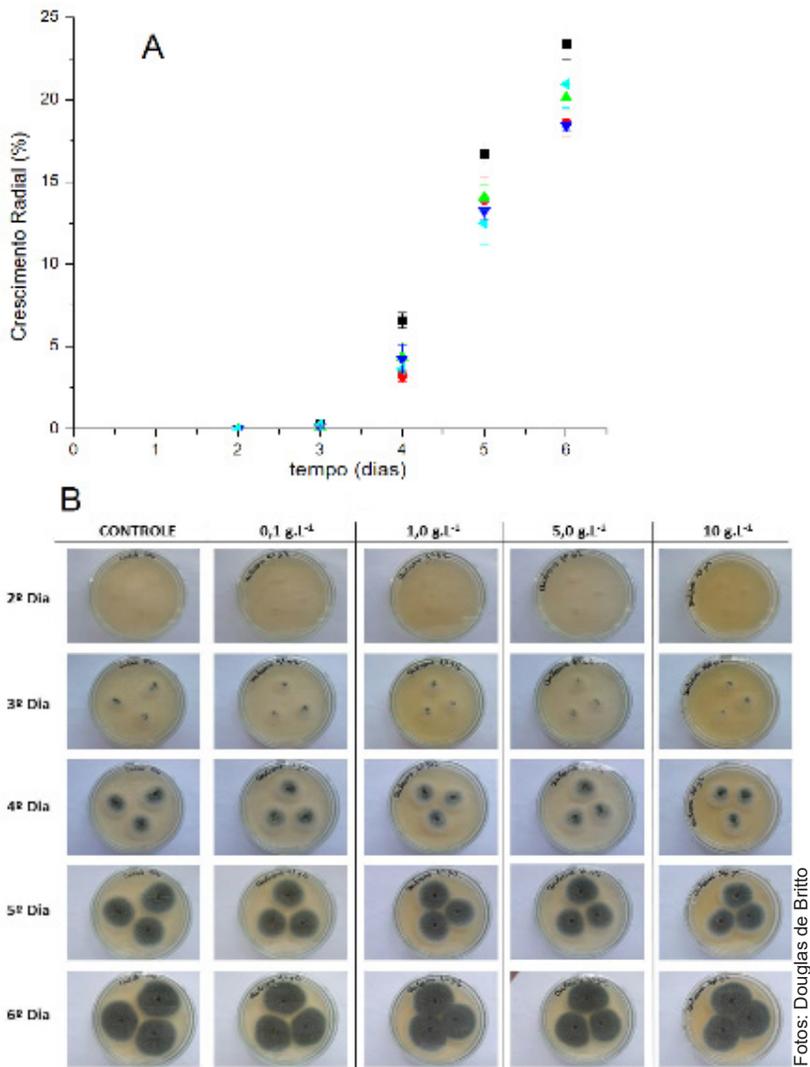


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de quitosana no crescimento radial de *Penicillium expansum* em meio BDA durante 6 dias de armazenamento a 25 °C em que A) corresponde: (■) controle ácido acético HAC¹%; soluções de quitosana a (●) 0,1; (▲) 1,0; (▼) 5,0 e (◄) 10,0 g L⁻¹ e B) fotografias correspondentes. Os dados se referem ao percentual médio de crescimento radial do fungo em relação à área total da placa de Petri.

Isso evidencia a potencialidade destes derivados de quitosana como agentes antifúngicos, em concordância com estudos anteriores (Jia et al., 2001; Sun et al., 2006). Estes resultados são muito promissores para a conservação pós-colheita de frutas em geral, pois, ao mesmo tempo em que mostra um potencial maior para os derivados, nota-se também que soluções mais diluídas são mais ativas. Outra importância dos derivados hidrossolúveis é que, por dispensarem o uso de soluções ácidas como para a quitosana, causam menores impactos fisiológicos na casca das frutas quando usados como coberturas comestíveis.

O derivado de quitosana TMQ-Gli não apresentou atividade antifúngica (Figura 4). Do ponto de vista químico, os dois derivados da quitosana são muito similares, visto que ambos apresentam carga positiva permanente devido à introdução de um nitrogênio quaternário (Britto et al., 2011b). A principal diferença é em relação ao grupo substituinte que no caso da TMQ-DMS é o nitrogênio da própria N-acetil-glicopiranosose que sofre a modificação (Figura 5A), enquanto que no caso da TMQ-Gli é introduzido um grupo nitrogenado quaternário à estrutura da quitosana (Figura 5B). A TMQ-Gli tem apresentado atividade antimicrobiana também, por exemplo, contra *Aspergillus niger* (Liu et al., 2015).

A análise da porcentagem de germinação dos esporos é um teste importante para confirmar a atividade antifúngica da quitosana original e da modificada quimicamente. A germinação inicia pelo alongamento do tubo germinativo (Figura 6), sendo o tamanho do tubo germinativo um indicativo também da capacidade inibidora da quitosana (Wang et al., 2014). O comportamento da germinação é típico, conforme observado em outros estudos (Liu et al., 2010).

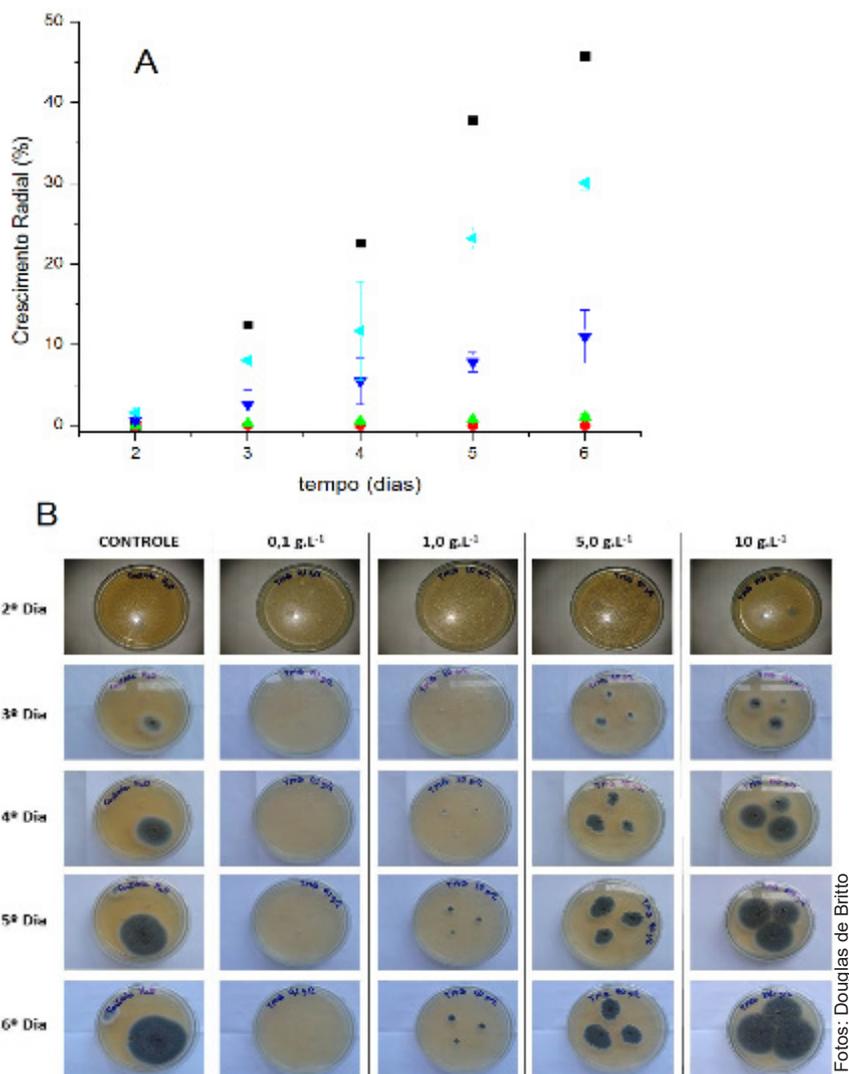


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações da quitosana modificada TMQ-DMS no crescimento radial de *Penicillium expansum* em meio BDA durante 6 dias de armazenamento a 25 °C, em que A) corresponde: (■) controle água destilada; soluções de TMQ-DMS a (●) 0,1; (▲) 1,0; (▼) 5,0 e (◄) 10,0 g L⁻¹ e B) fotografias correspondentes. Os dados se referem ao percentual médio de crescimento radial do fungo em relação à área total da placa de Petri.

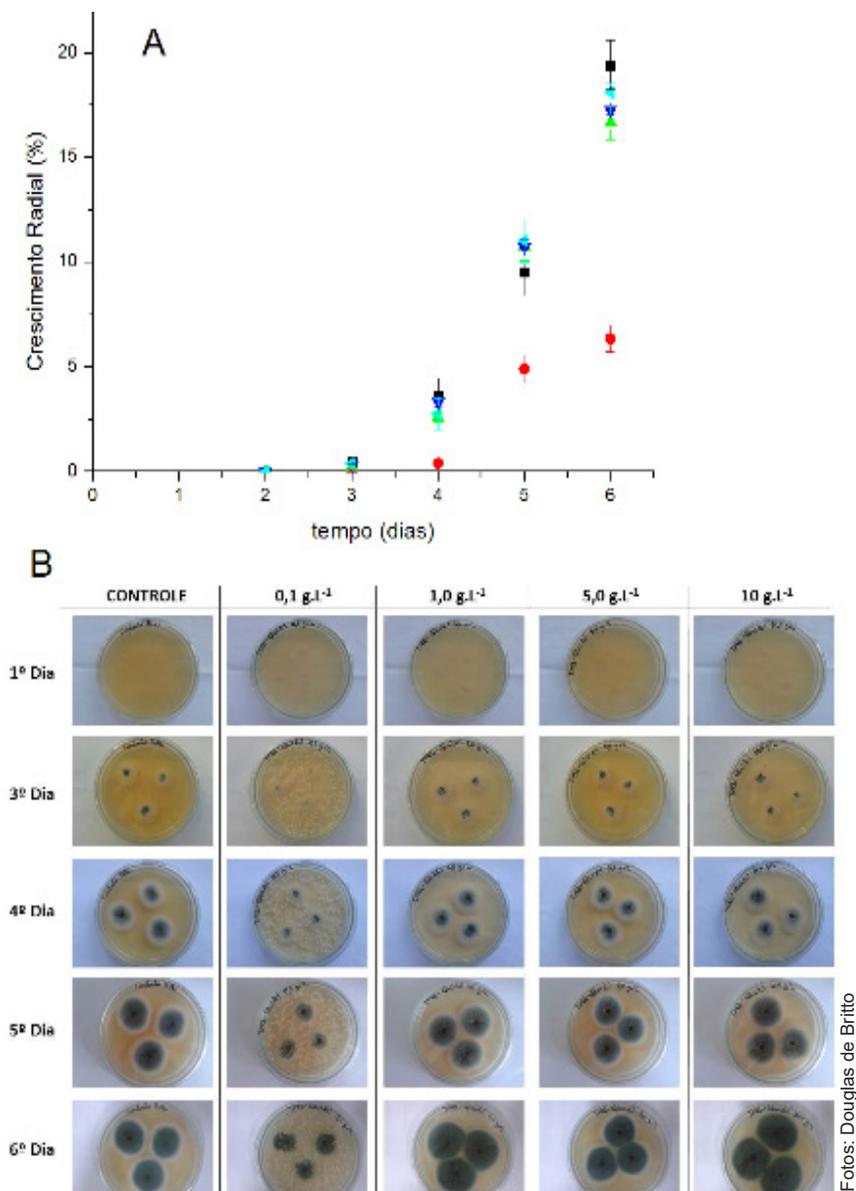


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações da quitosana modificada TMQ-Gli no crescimento radial de *Penicillium expansum* em meio BDA durante 6 dias de armazenamento a 25 °C em que A) corresponde: (■) controle água destilada; soluções de TMQ-Gli a (●) 0,1; (▲) 1,0; (▼) 5,0 e (◄) 10,0 g L⁻¹ e B) fotografias correspondentes. Os dados se referem ao percentual médio de crescimento radial do fungo em relação à área total da placa de Petri.

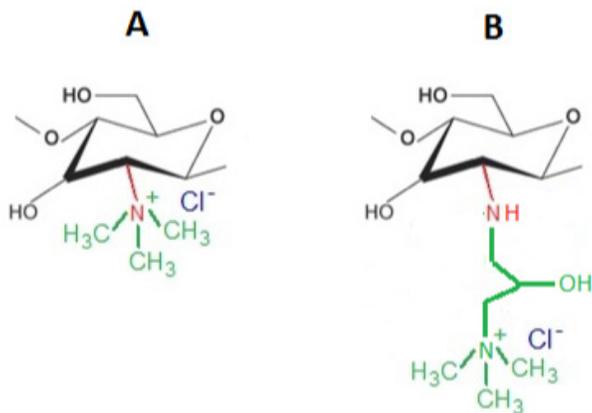


Figura 5. Representação de parte da estrutura química do polissacarídeo quitosana após modificação química via dimetilsulfato (A) e glicidil trimetil amônio (B).

Os resultados obtidos para a germinação do *P. expansum* são distintos daqueles obtidos pelo crescimento radial. Neste caso a quitosana apresentou eficiência maior que o derivado TMQ (Tabela 1, Figura 6A). Esta diferença pode estar relacionada à presença do ácido acético, solvente para a quitosana, que inibiu totalmente a germinação do fungo (Tabela 1 e Figura 6B). Em outros estudos, foi verificado que o ácido acético apresenta efeito inibidor no desenvolvimento de fungos como *P. expansum* (Osório et al., 2013) e *Colletotrichum gloeosporioides* (Jitareerat et al., 2007). Na concentração usada, o ácido acético pode causar a ruptura da parede celular entre outros danos fisiológicos (Hassan et al., 2015). Em meio líquido de BD, a exposição ao ácido acético foi mais intensa em relação ao experimento realizado em meio sólido de BDA usado no crescimento radial em que o ácido acético foi espalhado sobre a placa. Esta diferença na metodologia resultou em interação diferente a partir dos dois métodos.

Da mesma forma, para a quitosana modificada quimicamente, tanto para a TMQ-DMS como para a TMQ-Gli, o resultado do teste de germinação foi distinto daquele observado para o crescimento radial. Neste caso, o desenvolvimento dos esporos na presença dos derivados modificados quimicamente de quitosana (Tabela 1 e Figuras 6C, 6D) foram muito similares ao observado

para o controle em água destilada (Tabela 1 e Figura 6E). Isso comprova a evidência de mecanismo distinto para a interação dos polissacarídeos em meio líquido e sólido. No entanto, outros parâmetros dos derivados como grau de substituição e diferentes contra-íons podem influenciar na atividade antifúngica (Badawy, 2010; Follmann et al., 2016; Zhang et al., 2018; Wei et al., 2019).

A análise do desenvolvimento de fungos sobre o pericarpo de maçã confirma a forte influência do solvente no desenvolvimento do fungo (Figura 7). Em relação aos controles com ácido acético e água, observa-se que o ácido acético provocou o escurecimento enzimático do pericarpo da maçã (Britto et al., 2012; Britto; Assis, 2012).

Enzimas como peroxidase e polifenoloxidase, responsáveis por este escurecimento, quando em contato com oxigênio, geralmente são inativadas em pH baixo, mas alguns ácidos não apresentam este efeito inibidor. Os ácidos mais empregados para esta finalidade são os ácidos ascórbico e cítrico (Denoya et al., 2012.). No entanto, o ácido acético tem se mostrado ineficaz para esta finalidade em vários estudos de inibição enzimática (De Leonardis et al., 2010), revestimento de alface (Rodríguez et al., 2018.) e de banana (Apintanapong et al., 2007) minimamente processadas. Conseqüentemente, esta atividade enzimática pode ter implicado em outras mudanças bioquímicas que facilitaram o desenvolvimento dos fungos. Assim, a degradação no controle com ácido foi muito mais expressiva em relação ao controle em água.

Da mesma forma, para as amostras revestidas com TMQ-DMS, a extensão da degradação pelo ataque de fungos foi mais expressiva para o meio ácido em relação ao meio água destilada, confirmando o efeito deletério do ácido no pericarpo da fruta. Contudo, comparando-se as amostras revestidas com seus respectivos controles com ácido acético e água, observa-se que para as amostras revestidas a extensão da colonização pelos fungos foi inferior, principalmente para a amostra solubilizada em água (Figura 8). Desta forma, estes resultados são indicativos do efeito protetor ocasionado pela quitosana modificada. Esse efeito pode ser melhorado, controlando-se outros parâmetros da síntese química, como o grau de substituição.

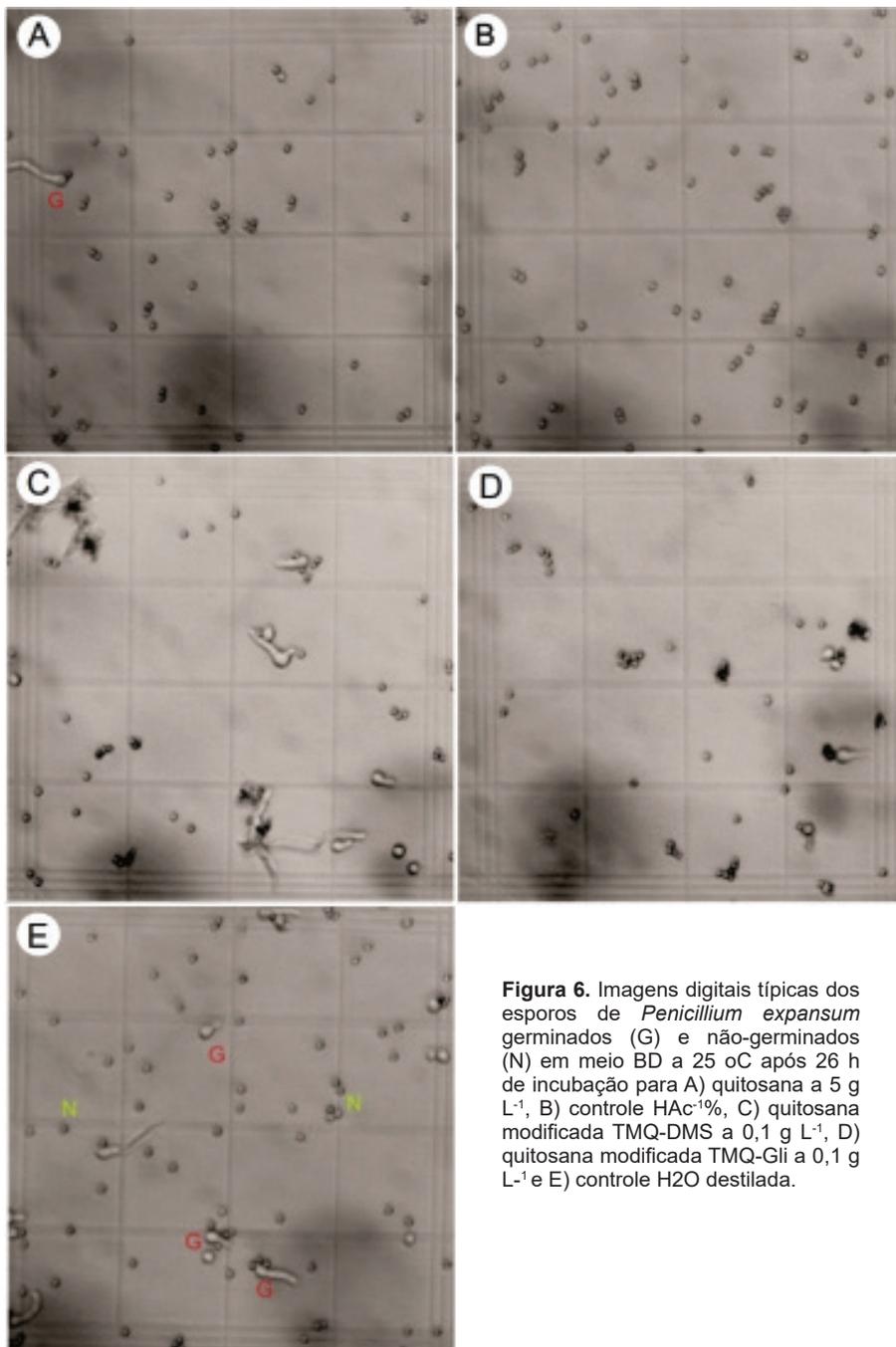


Figura 6. Imagens digitais típicas dos esporos de *Penicillium expansum* germinados (G) e não-germinados (N) em meio BD a 25 oC após 26 h de incubação para A) quitosana a 5 g L⁻¹, B) controle HAc 1%, C) quitosana modificada TMQ-DMS a 0,1 g L⁻¹, D) quitosana modificada TMQ-Gli a 0,1 g L⁻¹ e E) controle H₂O destilada.

Tabela 1. Efeito da quitosana original e modificada quimicamente com dimetilsulfato (TMQ-DMS) e glicidil trimetil amônio (TMQ-Gli) na germinação de esporos do fungo *Penicillium expansum* em quatro concentrações diferentes (em g L⁻¹).

Amostras	Germinação (%)
Controle HAc-1%	0
Controle H2O	9,3±4,0
Qui 0,1	0
Qui 1,0	0
Qui 5,0	0
Qui 10,0	0
TMQ-DMS 0,1	17,4±11,3
TMQ-DMS 1,0	9,0±5,7
TMQ-DMS 5,0	12,0±3,1
TMQ-DMS 10,0	14,1±6,8
TMQ-Gli 0,1	8,0±2
TMQ- Gli 1,0	8,0±1
TMQ- Gli 5,0	11,0±2
TMQ- Gli 10,0	8,0±2

Dados expressos como média ± desvio-padrão.

A análise do desenvolvimento de fungos sobre o pericarpo de maçã confirma a forte influência do solvente no desenvolvimento do fungo (Figura 7). Em relação aos controles com ácido acético e água, observa-se que o ácido acético provocou o escurecimento enzimático do pericarpo da maçã (Britto et al., 2012; Britto; Assis, 2012). Enzimas como peroxidase e polifenoloxidase, responsáveis por este escurecimento, quando em contato com oxigênio, geralmente são inativadas em pH baixo, mas alguns ácidos não apresentam este efeito inibidor. Os ácidos mais empregados para esta finalidade são os ácidos ascórbico e cítrico (Denoya et al., 2012.).

No entanto, o ácido acético tem se mostrado ineficaz para esta finalidade em vários estudos de inibição enzimática (De Leonardis et al., 2010), revestimento de alface (Rodriguez et al., 2018.) e de banana (Apintanapong et al., 2007) minimamente processadas. Consequentemente, esta atividade enzimática pode ter implicado em outras mudanças bioquímicas que facilitaram o desenvolvimento dos fungos. Assim, a degradação no controle com ácido foi

muito mais expressiva em relação ao controle em água. Da mesma forma, para as amostras revestidas com TMQ-DMS, a extensão da degradação pelo ataque de fungos foi mais expressiva para o meio ácido em relação ao meio água destilada, confirmando o efeito deletério do ácido no pericarpo da fruta. Contudo, comparando-se as amostras revestidas com seus respectivos controles com ácido acético e água, observa-se que para as amostras revestidas a extensão da colonização pelos fungos foi inferior, principalmente para a amostra solubilizada em água (Figura 8). Desta forma, estes resultados são indicativos do efeito protetor ocasionado pela quitosana modificada. Esse efeito pode ser melhorado, controlando-se outros parâmetros da síntese química, como o grau de substituição.



Figura 7. Fotografia mostrando o desenvolvimento de fungos espontâneos sobre o pericarpo de maçãs revestidas com filme de quitosana e quitosana modificada TMQ-DMS após 8 dias em estufa a 28 °C e 80% de umidade relativa.

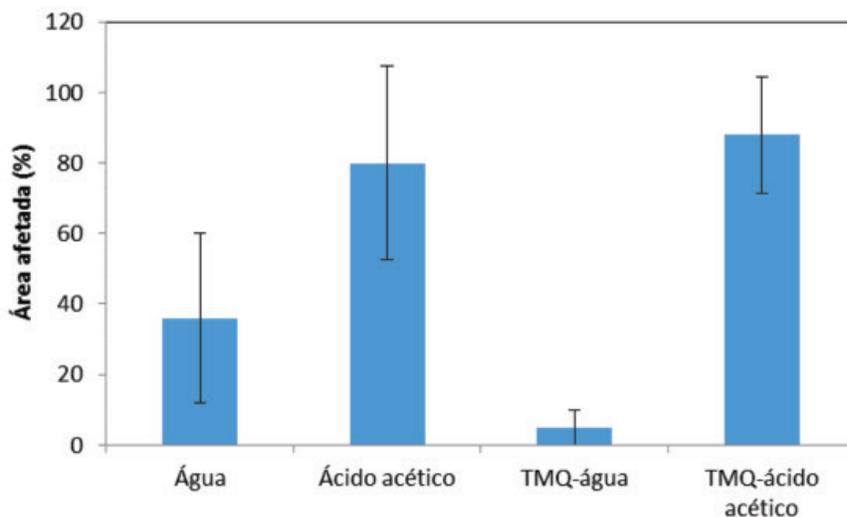


Figura 8. Variação da área do pericarpo da maçã afetada por fungos para os revestimentos de quitosana e quitosana modificada TMQ-DMS a partir da análise da fotografia mostrada na Figura 7.

Conclusões

O método de avaliação da atividade pelo crescimento radial da colônia de fungo mostrou que a quitosana modificada quimicamente via rota sintética com dimetilsulfato apresenta atividade antifúngica para o fungo *P. expansum*, principalmente em concentrações mais diluídas.

De um lado, o efeito inibidor foi inversamente proporcional às concentrações do polissacarídeo modificado. Por outro lado, a quitosana modificada via cloreto de glicidil trimetil amônio, embora possuindo também grupos de nitrogênio quaternário, não apresentou atividade antifúngica.

No teste germinativo os revestimentos não apresentaram efeito inibidor, provavelmente devido à influência do meio solvente no mecanismo de desenvolvimento do fungo. Entretanto, no teste in vivo com maçã recoberta com a solução filmogênica de quitosana modificada, o efeito antifúngico foi notório, principalmente para a formulação em água destilada.

Referências

- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2013. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/961574/1/OLIVEIRAAnuarioBrasFrutip782013.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2020.
- APINTANAPONG, M.; CHEACHUMINANG, K.; SULANSAWAN, P.; THONGPRASERT, N. Effect of antibrowning agents on banana slices and vacuum-fried slices. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 5, n. 3/4, p. 151-157, 2007.
- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D.; FORATO, L. A. **O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas in natura e minimamente processadas**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 29). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPDIA-2010/12624/1/BPD29-2009.pdf>. Acesso em: 14 maio 2019.
- BADAWY, M. E. I. Structure and antimicrobial activity relationship of quaternary N-alkyl chitosan derivatives against some plant pathogens. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, n. 2, p. 960-969, 2010.
- BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Chemical, biochemical, and microbiological aspects of chitosan quaternary salt as active coating on sliced apples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 599-605, 2012.
- BRITTO, D.; FREDERICO, F. R.; ASSIS, O. B. G. Optimization of N,N,N-trimethylchitosan synthesis by factorial design. **Polymer International** v. 60, p. 910-915, 2011a.
- BRITTO, D.; GOY, R. C.; CAMPANA FILHO, S. P.; ASSIS, O. B. G. Quaternary salts of chitosan: history, antimicrobial features, and prospects. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, 2011b. Disponível: <https://www.hindawi.com/journals/ijcc/2011/312539/>. Acesso em: 15 set. 2019.
- BRITTO, D.; SANTOS M. F.; ASSIS O. B. D.; Chitosan solutions with different degrees of acetylation as coating on cut apple. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 1, p. 15-21, 2012.
- CAZON, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMIREZ, J. A.; VAZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16304155?via%3Dihub>. Acesso em: 5 set. 2019.
- CHITARRA, A. B. Interferência da fisiologia na patologia pós-colheita. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. de H. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Cap. 3, p. 85-116.
- CURTI, E.; BRITTO, D.; CAMPANA FILHO, S. P.; Methylation of chitosan with iodomethane: Effect of reaction conditions on chemoselectivity and degree of substitution. **Macromolecular Bioscience**, 3, n.10, p. 571-576, 2003.
- DE LEONARDIS, A.; LUSTRATO, G.; MACCIOLA, V.; RANALLI, G. Application of chemical and physical agents in model systems to controlling phenoloxidase enzymes. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 4, p. 603-610, 2010.

- DENOYA, G. I.; ARDANAZ, M.; SANCHO, A. M.; BENÍTEZ, C. E.; GONZÁLEZ, C.; GUIDI, S. Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas. **RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 38, n. 3, p. 263-267, 2012.
- EL-GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; WILSON, C. L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of post harvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2000a.
- EL-GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; BROWN, G. E.; IPPOLITO, A.; WISNIEWSKI, M.; WILSON, C. L. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. **Plant Disease**, v. 84, n. 3, p. 243-248, 2000b.
- EL GUILLI, M.; HAMZA, A.; CLEMENT, C.; IBRIZ, M.; AIT BARKA, E. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan to control citrus green mold. **Agriculture**, v. 6, n. 2, 2016. Número do artigo: 12.
- FAO. **Global food losses and food waste: extent, causes and prevention**. Rome, 2011. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i2697e.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2020.
- FOLLMANN, H. D. M.; MARTINS, A. F.; NOBRE, T. M.; BRESOLIN, J. D.; CELLET, T. S. P.; VALDERRAMA, P.; CORREA, D. S.; MUNIZ, E. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. Extent of shielding by counterions determines the bactericidal activity of N,N,N-trimethyl chitosan salts. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 418-425, 2016.
- GALGANO, F.; CONDELI, N.; FAVATI, F.; DI BIANCO, V.; PERETTI, G.; CARUSO, M. C. Bio-degradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2015.
- GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.
- HASSAN, R.; EL-KADI, S.; SAND, M. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. **International Journal of Advances in Biology**, v. 2, n. 1, p.1-11, 2015.
- HERNANDEZ, J. A. T.; CHAVEZ, P. I. T.; WONG, B. R.; CHU, A. R.; JATOMEA, M. P.; URBINA, C. G. B.; VAZQUEZ, N. A. R.; FELIX, F. R. Micro- and nanoparticles by electrospray: Advances and applications in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 19, p. 4699-4707, 2015.
- HOLMES, G. **Blue mold (*Penicillium expansum*) link**. Athens: University of Georgia, 2018. Disponível em: <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1575469>. Acesso em: 12 mar. 2019.
- HUA, C. Y.; LI, Y. L.; WANG, X. F.; KAI, K.; SU, M. K.; SHI, W.; ZHANG, D. F.; LIU, Y. S. The effect of low and high molecular weight chitosan on the control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on kiwifruit and host response. **Scientia Horticulturae**, v. 246, p. 700-709, 2019.
- JIA, Z.; SHEN, D.; XU, W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 1, p. 1-6, 2001.
- JITAREERAT, P.; PAUMCHAI, S.; KANLAYANARAT, S.; SANGCHOTE, S. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica*) fruit. **Journal of Crop and Horticultural Science** v. 35, n. 2, p. 211-218, 2007.

- KARPOVA, N. V.; SHAGDAROVA, B. T.; LYALINA, T. S.; IL'INA, A. V.; TERESHINA, V. M.; VARLAMOV, V. P. Influence of the main characteristics of low weight chitosan on the growth of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 405-413, 2019.
- LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology** v. 44, p. 300-306, 2007.
- LIU, P.; LUO, L.; GUO, J.; LIU, H.; WANG, B.; DENG, B.; LONG, C. Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*. **Mycologia** v. 102, n. 2, p. 311-318, 2010.
- LIU, P.; MENG, W.; WANG, S.; SUN, Y.; ASHRAF, M. A. Quaternary ammonium salt of chitosan: preparation and antimicrobial property for paper. **Open Medicine**, v. 10, n. 1, p. 473-478, 2015.
- LUENGO, R. F. A.; CALBO, A. G. **Pós-colheita de hortaliças: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2011. 251 p.
- MADANIPOUR, S.; ALIMOHAMMADI, M.; REZAIE, S.; NABIZADEH, R.; KHANIKI, G. J.; HADI, M.; YOUSEFI, M.; BIDGOLI, S. M.; YOUSEFZADEH, S. Influence of postharvest application of chitosan combined with ethanolic extract of liquorice on shelflife of apple fruit. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 17, n. 1, p. 331-336, 2019.
- MELLINAS, C.; VALDES, A.; RAMOS, M.; BURGOS, N.; GARRIGOS, M. D.; JIMENEZ, A. Active edible films: current state and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 2, p. 1-15, 2016.
- MI, Y. Q.; TAN, W. Q.; ZHANG, J. J.; WEI, L. J.; CHEN, Y.; LI, Q.; DONG, F.; GUO, Z. Y. Synthesis, characterization, and antifungal property of hydroxypropyltrimethyl ammonium chitosan halogenated acetates. **Marine Drugs**, v. 16, n. 9, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165101/>. Acesso em: 5 jan. 2020.
- OLIVEIRA, S. M. A.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. Patologia pós-colheita. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 595-627.
- OSÓRIO, G. T.; OLIVEIRA, B. S.; DI PIERO, R. M. Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e o mofo cinzento em frutos de maçã. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 63-67, 2013.
- PEPELJNJAK, S.; ŠEGVIĆ, M.; OŽEGOVIĆ, L. Citrininotoxinogenicity of *Penicillium* ssp. isolated from decaying apples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 134-137, 2002.
- RODRIGUEZ, D. A.; ORTEGA-TORO, R.; PINEROS-CASTRO, Y. Propiedades fisicoquímicas, funcionales y microbiológicas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) adicionada con ácidos orgánicos. **Información Tecnológica**, v. 29, n. 4, p. 21-30, 2018.
- SIMONAITIENE, D.; BRINK, I.; SIPAILIENE, A.; LESKAUSKAITE, D. The effect of chitosan and whey proteins-chitosan films on the growth of *Penicillium expansum* in apples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1475-1481, 2015.
- STOCCO, A. F.; DIAZ, M. E.; ROMERA, M. C. R.; MERCADO, L. A.; RIVERO, M. L.; PONSONE, M. L. Biocontrol of postharvest *Alternaria* decay in table grapes from Mendoza province. **Biological Control**, v. 134, p. 114-122, 2019.

SUN, L.; DU, Y.; FAN, L.; CHEN, X.; YANG, J. Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulp-cap. **Polymer**, v. 47, n. 6, p. 1796-1804, 2006.

TSAI, G. J.; SU, W. H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 3. p. 239-243, 1999.

WANG, L.; WU, H.; QIN, G.; MENG, X. Chitosan disrupts *Penicillium expansum* and controls postharvest blue mold of jujube fruit. **Food Control**, v. 41, n. 1, p. 56-62, 2014.

WANG, F.; DENG, J.; JIAO, J. Y.; LU, Y. Y.; YANG, L.; SHI, Z. J. The combined effects of Carboxymethyl chitosan and *Cryptococcus laurentii* treatment on postharvest blue mold caused by *Penicillium italicum* in grapefruit fruit. **Scientia Horticulturae** v. 253, n. 27, p. 35-41, 2019.

WEI, L. J.; MI, Y. Q.; ZHANG, J. J.; LI, Q.; DONG, F.; GUO, Z. Y. Evaluation of quaternary ammonium chitosan derivatives differing in the length of alkyl side-chain: synthesis and antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 129, p. 1127-1132, 2019.

YU, T.; LI, H. Y.; ZHENG, X. D. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 261-266, 2007.

ZHANG, J. J.; TAN, W. Q.; LUAN, F.; YIN, X. L.; DONG, F.; LI, Q.; GUO, Z. Y. Synthesis of quaternary ammonium salts of chitosan bearing halogenated acetate for antifungal and antibacterial activities. **Polymers** v. 10, n. 5, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6415387/>. Acesso em: 8 jan. 2020.



Semiárido

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL