



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

NATÁLIA FERRÃO CASTELO BRANCO MELO

**BIOATIVIDADE DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE QUITOSANA EM
GEL E NANOPARTÍCULAS NA CONSERVAÇÃO DE MORANGOS (*FRAGARIA X
ANANASSA*)**

RECIFE
2020

NATÁLIA FERRÃO CASTELO BRANCO MELO

BIOATIVIDADE DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE QUITOSANA EM GEL E NANOPARTÍCULAS NA CONSERVAÇÃO DE MORANGOS (*FRAGARIA X ANANASSA*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof^o. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Coorientador: Prof^o. Dra. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Prof^o. Dr. Miguel Angel Pelágio Flores

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M528b Melo, Natália Ferrão Castelo Branco.
Bioatividade de coberturas comestíveis a base de quitosana em gel e nanopartículas na conservação de morangos (*fragaria x ananassa*) / Natália Ferrão Castelo Branco Melo. – 2020.
230 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Aspergillus niger*. 2. Frutas. 3. Nanotecnologia. 5. *Botrytis cinerea* I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-052)

NATÁLIA FERRÃO CASTELO BRANCO MELO

BIOATIVIDADE DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE QUITOSANA EM GEL E NANOPARTÍCULAS NA CONSERVAÇÃO DE MORANGOS (*FRAGARIA X ANANASSA*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Aprovada em: 19/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Michelle Galindo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Viviane Lansky Xavier de Souza Leão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud
Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Raquel Ramos Berger
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Com amor, dedico esse trabalho a Deus e aos meus queridos pais Maria do Carmo e Rodolfo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proteger e abrir meus caminhos durante a minha vida, proporcionando momentos de iluminação e aprendizagem.

À minha amada mãe, Maria do Carmo, pela sua dedicação, paciência, amor, compreensão, conselhos valiosos e apoio diário, que me dão forças para prosseguir em minha caminhada. Sua presença em minha vida me traz felicidade e faz de mim uma pessoa melhor.

Ao meu amado pai, Rodolfo, pela sua tranquilidade e compreensão durante todo tempo esse período. Sua valiosa paciência equilibra nossas vidas.

À minha madrinha querida, tia Fátima, pela ajuda, incentivo e orientação sobre a minha vida profissional.

À meu querido tio e pai, Tutuca, pelo seu carinho e apoio. Sempre disponível em ajudar a mim e a todos.

À minha querida tia Dora, pela sua eterna e valiosa torcida pelo meu sucesso.

À meu querido namorado Naércio. Sua presença, carinho, paciência e conselhos diários foram essenciais para me incentivar e consolar durante os momentos difíceis neste período.

À meu primo Vinícius por sua demonstração de empatia e exemplos de prévia vivência acadêmica.

À todos os outros familiares, vovó Lindalva, Luizinho, Davi e Lucas que mesmo distantes sempre torceram pelo meu sucesso e estiveram em meu coração.

À minha orientadora, Thayza Stamford, pela orientação e aprendizado acadêmico. Sua simpatia e disponibilidade em ajudar faz de você, além de uma orientadora, uma boa pessoa.

À professora Tânia que sempre esteve disponível em ajudar. Seu jeito meigo, inteligente e sincero me proporcionaram um grande aprendizado pessoal e profissional. Sua generosidade faz de você uma verdadeira professora.

À meu coorientador, Miguel Flores, sempre essencial desde a minha pesquisa de mestrado. Agradeço pela sua paciência, disponibilidade em ajudar, conselhos e atenção. Seu profissionalismo e dedicação me inspiram.

À minha coorientadora, Thatiana Stamford. Seus ensinamentos sobre nanotecnologia foram primordiais na minha atuação em pesquisa.

Aos meus queridos e presentes técnicos do departamento de nutrição, Vivaldo e Camilo do Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL). Agradeço pela ajuda e orientações nas análises realizadas, mas agradeço ainda mais pela amizade. Além de grandes professores, foram valiosos bons amigos que guardo em meu coração.

Ao LEAAL pela disponibilidade de equipamentos e materiais na realização das análises necessárias. Obrigada a todos os outros técnicos.

Ao professor Marcos Lima da UFRPE, pela sua ajuda e orientação nas análises microbiológicas. Sua paciência e disponibilidade em ajudar foram de grande valia para qualidade e finalização dos experimentos.

À Universidade Católica de Pernambuco, especialmente a professora Galba Takaki que disponibilizou o seu laboratório para realização dos experimentos. Sua acolhida no laboratório do Núcleo de Pesquisa de Ciências Ambientais e Biotecnologia foi valiosa em um momento de grande dificuldade no desenvolvimento de minha pesquisa. Obrigada também aos técnicos Humberto e André.

Ao professor André Galembeck, por disponibilizar seu laboratório, alunos e equipamentos. Agradeço também pelas suas sugestões sobre a pesquisa. Obrigada a todos os alunos do seu laboratório por me receberem tão bem todas as vezes que precisei.

À todos os integrantes do laboratório de microbiologia do Departamento de Nutrição, especialmente a Alberto, pela sua ajuda nos experimentos e nas análises estatística do trabalho.

À professora Luciana Franco, pela sua simpatia e ajuda na contagem dos esporos.

À professora Viviane Lansky, pela ajuda nas análises antioxidantes.

À empresa Kitozyme pelo fornecimento da quitosana microbiológica.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição pela oportunidade em desenvolver essa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos membros da banca que se dispuseram a participar e conferir importantes sugestões para melhoria deste trabalho.

Agradeço imensamente a todas as outras pessoas que não citei, mas que guardo em meu coração sua contribuição direta ou indireta para a realização da pesquisa.

Ser é ousar ser. (HESSE; HERMANN, 2012).

RESUMO

O morango é uma fruta que tem uma pequena vida de prateleira e alta susceptibilidade a infecções fúngicas. O gel de quitosana tem sido estudado como cobertura comestível em frutas devido a sua ação conservadora, mas acredita-se que suas características podem ser melhoradas através da incorporação de nanopartículas. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia do gel, nanopartículas e gel+ nanopartículas na conservação pós-colheita de morangos. Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial (2^4) para determinação dos parâmetros ideais para produção das nanopartículas. Em seguida, as nanopartículas foram submetidas as análises de DLS, microscopia eletrônica de varredura e FTIR e HET-CAM. A estabilidade coloidal das nanopartículas foi avaliada através das análises de tamanho, potencial zeta, turbidez, pH e índice de polidispersão. A ação antifúngica in vitro das substâncias teste foi determinada através das análises das concentrações inibitórias mínimas, do percentual de inibição do crescimento micelial, da germinação dos esporos fúngicos e alterações morfológicas dos fungos. Foi avaliado também a ação antioxidante das coberturas pelo método do DPPH, ABTS e FRAP e citotóxica pelo MTT. A ação antifúngica in vivo ocorreu nos morangos previamente contaminados com os fungos e posteriormente cobertos com as substâncias teste. Foram avaliados os aspectos sensoriais e físico-químicos dos morangos com e sem coberturas armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração (6 e 12 dias, respectivamente). Os parâmetros ideais encontrados para produção de nanopartículas foram: pH=4,0 e Q:TPP=4:1, Q=2mg/ml e TPP=1mg/ml. As nanopartículas apresentaram um tamanho=331.1nm, potencial zeta=+34mV, PDI=0.377 e foram consideradas biocompatíveis pelo teste do HET-CAM. Todas as coberturas a base de quitosana foram capazes de inibir o crescimento dos fungos pós-colheita e manter a qualidade físico-química e sensorial dos morangos. A cobertura feita com o gel+nanopartículas foi a que apresentou uma melhor antifúngica, conservadora e baixa citotoxicidade, sendo considerada a melhor cobertura capaz de manter a qualidade pós-colheita dos morangos, o que sugere que a nanotecnologia pode ser utilizada para melhorar as propriedades de coberturas comestíveis convencionais como o gel de quitosana.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*. Frutas. Nanotecnologia. *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

Strawberry is a fruit that has a short shelf life due to its high susceptibility to fungal infections. Chitosan gel has been widely studied as an edible coating in fruits, including strawberries, due to its antimicrobial and conservative action. It is believed that the characteristics of chitosan edible coatings can be improved by incorporating nanoparticles into the matrix. Therefore, the aim of this research was to evaluate the efficacy of chitosan based edible coatings (gel, nanoparticles and gel + nanoparticles) applied in post-harvest strawberries. First, a factorial design was carried out (2^4) to determine the ideal parameters for the production of chitosan nanoparticles. Then, the nanoparticles were characterized by the DLS technique, scanning electron microscopy, FTIR and HET-CAM test. The colloidal stability of the nanoparticles was evaluated through size analysis, zeta potential, turbidity, pH and polydispersity index. The *in vitro* antifungal action of test substances against *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* was determined by analysing the minimum inhibitory concentrations, percent inhibition of mycelial growth and germination of fungal spores. It was also evaluated the antioxidant action of the edible coatings by the DPPH, ABTS and FRAP method and the cytotoxicity by MTT test. The *in vivo* antifungal action occurred in the strawberries previously contaminated with fungal strains and subsequently coated with test substances. Physicochemical and sensorial aspects of strawberries with and without edible coatings stored at room and cold temperature were also determined for 6 and 12 days, respectively. The ideal parameters found for the production of nanoparticles were: pH=4.0, volume ratio between chitosan and sodium tripolyphosphate=4:1, chitosan concentration=2mg/ml and sodium tripolyphosphate concentration=1mg/ml. The nanoparticles presented a size = 331.1 nm, zeta potential=+34 mV, PDI=0.377 and non-toxic by the HET-CAM test. All chitosan edible coatings inhibited the fungal growth and kept the physicalchemical and sensory quality of strawberries. The edible coating made with gel+nanoparticle showed the best antifungal and conservative action and low cytotoxicity. Therefore, the results suggest that nanotechnology can be used to improve the properties of conventional edible coatings such as chitosan gel.

Keyword: *Aspergillus niger*. Fruits. Nanotechnology. *Botrytis cinerea*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura molecular da quitosana	31
Figura 2 -	Estrutura molecular das nanopartículas de quitosana	35
Figura 3 -	Diagrama de Pareto relacionado ao tamanho das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^4	58
Figura 4 -	Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana (A), da concentração de TPP (B) e da proporção Q:TPP (C) em diferentes valores de pH no tamanho das partículas (DLS).	59
Figura 5 -	Diagrama de Pareto relacionado ao PDI das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^4 .	60
Figura 6 -	Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana (A), da concentração de TPP (B) e da proporção Q:TPP (C) em diferentes valores de pH nos valores de PDI.	61
Figura 7 -	Diagrama de Pareto relacionado ao potencial zeta das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^4 .	62
Figura 8 -	Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana (A), da concentração de TPP (B) e da proporção Q:TPP (C) em diferentes valores de pH nos valores do potencial zeta.	63
Figura 9 -	Diagrama de Pareto relacionado ao tamanho das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^2	65
Figura 10 -	Diagrama de Pareto relacionado ao PDI das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^2	66
Figura 11 -	Diagrama de Pareto relacionado ao potencial zeta das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^2	66

Figura 12 -	Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana e TPP nos valores de DLS (A), PDI (B) e potencial zeta (C).	67
Figura 13 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana fúngica	69
Figura 14 -	Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de quitosana	71
Figura 15 -	Potencial zeta da nanopartícula de quitosana fúngica.	73
Figura 16 -	FTIR da quitosana e das nanopartículas de quitosana	75
Figura 17 -	Tamanho médio (a), PDI (b), potencial zeta (c), turbidez (d) e pH (e) das nanopartículas de quitosana fúngica armazenadas a 5, 25 e 40°C por 2 meses.	77
Figura 18 -	Membrana coriolantóide após a deposição das nanopartículas de quitosana fúngica (A) e microscopia óptica dos vasos analisados (B).	80
Figura 19 -	Percentual de inibição do radical DPPH (A) e ABTS (B) pelo gel de quitosana (—■—), nanopartículas (—●—) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana (—▲—).	83
Figura 20 -	Atividade antioxidante do gel de quitosana (—■—), nanopartículas (—●—) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana (—▲—) através do método FRAP.	84
Figura 21 -	MEV do micélio do <i>R. stolonifer</i> controle (A) e após exposição ao gel de quitosana (B), nanopartículas de quitosana fúngica (C) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana fúngica (D).	94
Figura 22 -	MEV do micélio do <i>B. cinera</i> controle (A) e após exposição ao gel de quitosana (B), nanopartículas de quitosana fúngica (C) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana fúngica (D).	95
Figura 23 -	MEV do micélio do <i>A. niger</i> controle (A) e após exposição ao gel de quitosana (B), nanopartículas de quitosana fúngica (C)	97

e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana fúngica (D).

- Figura 24 - Percentual de perda de peso dos morangos com e sem coberturas armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração 109
- Figura 25 - Percentual de infecção visível dos morangos com e sem coberturas armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração. 111
- Figura 26 - Aparência dos morangos com (glicerol, gel, NP = nanopartículas e gel + NP = gel enriquecido com nanopartículas) e sem coberturas comestíveis depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente. 113
- Figura 27 - Aparência dos morangos com e sem coberturas comestíveis (concentração CIM) previamente infectados com *B. cinerea* depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente. 116
- Figura 28 - Aparência dos morangos com e sem coberturas comestíveis (concentração CIM) previamente infectados com *R. stolonifer* depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente. 117
- Figura 29 - Aparência dos morangos com e sem coberturas comestíveis (concentração CIM) previamente infectados com *A. niger* depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente. 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial (2^4).	40
Tabela 2 -	Matriz do planejamento fatorial (2^4) das nanopartículas de quitosana.	41
Tabela 3 -	Características das nanopartículas de quitosana fúngica produzidas no planejamento fatorial 2^4 .	57
Tabela 4 -	Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial (2^2).	64
Tabela 5 -	Características das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^2 .	65
Tabela 6 -	Percentual de inibição de crescimento de HCT116 (Carcinoma colorretal humano), HL-60 (Leucemia promielocítica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), L929 (fibroblasto de camundongos) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongos) expostos ao gel de quitosana, nanopartículas de quitosana (nano) e gel enriquecido com nanopartículas (G+N).	82
Tabela 7 -	Concentração inibitória mínima das substâncias teste.	86
Tabela 8 -	Percentual de inibição do crescimento micelial dos fungos <i>B. cinerea</i> , <i>R. stolonifer</i> e <i>A. niger</i> depois de expostos a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas (NP) e gel enriquecido com nanopartículas (Gel + NP).	90
Tabela 9 -	Percentual de inibição da germinação dos esporos dos fungos <i>B. cinerea</i> , <i>R. stolonifer</i> e <i>A. niger</i> depois de expostos a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas (NP) e gel enriquecido com nanopartículas (Gel + NP).	92

Tabela 10 -	Média dos valores dos parâmetros físico-químico dos morangos armazenadas a temperatura ambiente (25°C) por 6 dias.	100
Tabela 11 -	Média dos valores dos parâmetros físico-químico dos morangos armazenadas a temperatura de refrigeração (12°C) por 12 dias.	101
Tabela 12 -	Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura ambiente (25°C) durante 6 dias.	106
Tabela 13 -	Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura de refrigeração (12°C) durante 12 dias.	107
Tabela 14 -	Percentual de frutas armazenadas a temperatura ambiente e infectadas artificialmente com os fungos <i>B. cinerea</i> , <i>R. stolonifer</i> e <i>A. niger</i> depois de expostas a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas e gel enriquecido com nanopartículas.	115
Tabela 15 -	Percentual de frutas armazenadas em refrigeração e infectadas artificialmente com os fungos <i>B. cinerea</i> , <i>R. stolonifer</i> e <i>A. niger</i> depois de expostas a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas e gel enriquecido com nanopartículas.	115
Tabela 16 -	Efeito das coberturas comestíveis nos atributos sensoriais dos morangos sem coberturas comestíveis (controle) e cobertos com glicerol, gel de quitosana (gel), nanopartículas de quitosana fúngica (NP) e gel de quitosana enriquecido com nanopartículas (N + G) armazenados em refrigeração.	120

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE MORANGOS.....	22
2.2	FUNGOS FITOPATÓGENOS DO MORANGO.....	24
2.2.1	<i>Botrytis cinerea</i>	25
2.2.2	<i>Rhizopus stolonifer</i>	27
2.2.3	<i>Aspergillus niger</i>	29
2.3	QUITOSANA.....	31
2.4	NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	34
3	HIPÓTESE.....	37
4	OBJETIVOS.....	38
4.1	OBJETIVO GERAL.....	38
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1	MATERIAIS.....	39
5.2	MÉTODOS.....	39
5.2.1	Planejamento fatorial para obtenção das nanopartículas de quitosana.....	39
5.2.2	Preparação da nanopartícula de quitosana.....	42
5.2.3	Caracterização da nanopartícula de quitosana.....	42
5.2.3.1	Medida de tamanho por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	42

5.2.3.2	Potencial Zeta.....	43
5.2.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
5.2.3.4	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	43
5.2.4	Estabilidade coloidal das nanopartículas de quitosana.....	44
5.2.5	Determinação da toxicidade.....	44
5.2.5.1	Teste da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM).....	44
5.2.5.2	Teste do MTT.....	45
5.2.6	Determinação da atividade antioxidante.....	46
5.2.6.1	Teste do DPPH.....	46
5.2.6.2	Teste do ABTS.....	46
5.2.6.3	Método de redução do ferro (FRAP).....	47
5.2.7	Determinação das concentrações inibitórias mínima das substâncias teste.....	48
5.2.8	Método <i>Checkboard</i>.....	49
5.2.9	Efeito das substâncias teste sobre o crescimento radial fúngico....	49
5.2.10	Efeito das substâncias teste sobre a germinação dos esporos fúngicos.....	50
5.2.11	Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica.....	50
5.2.12	Preparação das coberturas comestíveis para aplicação nos morangos.....	51
5.2.13	Efeito das coberturas sobre os parâmetros físico-químicos dos morangos.....	52

5.2.13.1	Umidade.....	52
5.2.13.2	pH.....	52
5.2.13.3	Acidez titulável.....	53
5.2.13.4	Sólidos solúveis.....	53
5.2.13.5	Índice de maturação.....	52
5.2.13.6	Antocianinas.....	53
5.2.13.7	Evolução da cor.....	54
5.2.13.8	Perda de peso.....	54
5.2.13.9	Percentual de infecção visível.....	54
5.2.14	Bioatividade das coberturas sobre o crescimento fúngico nos morangos.....	55
5.2.15	Análise sensorial dos morangos.....	55
5.2.16	Análise estatística.....	56
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
	REFERÊNCIAS.....	124
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	146
	APÊNDICE B – FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL.....	148
	APÊNDICE C – CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO "GLOBAL PROGRESS IN APPLIED MICROBIOLOGY - A MULTIDISCIPLINARY APPROACH.....	149
	APÊNDICE D – ARTIGO 1 (SHORT COMMUNICATION).....	154

APÊNDICE E – ARTIGO 2 (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD STUDIES – QUALIS A3).....	165
APÊNDICE F – ARTIGO 3 - FUNGAL CHITOSAN NANOCOMPOSITE EDIBLE COATING AS ANTIFUNGAL AGAINST STRAWBERRY PHYTOPATHOGENIC FUNGI: <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> EFFECTS ON MYCELIAL GROWTH, SPORE GERMINATION AND FUNGAL MORPHOLOGY.....	193
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	229

1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria ananassa Duch.*) é uma fruta não climatérica amplamente cultivada em todo mundo devido a seu aroma atraente, sabor doce, possibilidade de uso em diferentes produtos e elevado valor econômico (WANG et al., 2015). Apresenta uma pequena vida pós-colheita, normalmente estimada em 5 dias a 20°C, devido a sua rápida desidratação, tipo de cultivo em contato direto com o solo, alterações fisiológicas, danos mecânicos e susceptibilidade a deterioração por fungos, o que pode resultar em perdas de até 40% da produção durante o armazenamento da fruta (SHARMA, 2014; HAJJI et al., 2018).

Dentre os fungos que mais acometem os morangos, destacam-se o *Botrytis cinerea* que é capaz de crescer efetivamente em temperatura de refrigeração e causar um mofo cinzento no tecido da fruta, reduzindo o rendimento da produção em 30 a 60% (ROMANAZZI et al., 2016; LAFARGA et al., 2019). Outro fungo de importância na conservação pós-colheita de morangos é o *Rhizopus stolonifer*, responsável por causar manchas marrons e o amolecimento por podridão no tecido da fruta, levando ao colapso e exsudação tecidual. É prevalente durante o armazenamento refrigerado da fruta e pode tolerar condições quentes e secas (ROMANAZZI et al., 2013; LAFARGA et al., 2019). *Aspergillus niger* é outra espécie fúngica capaz também de acometer os morangos e causar danos a sua produção. A contaminação pode ocorrer durante a colheita, processamento e manipulação das frutas (JESSEN et al., 2013; LAFARGA et al., 2019).

Normalmente, o controle da deterioração fúngica de frutas é feito através de fungicidas, no entanto essas substâncias apresentam efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente (LIU et al., 2018; LAFARGA et al., 2019). Além disso, o uso de fungicidas é mais nocivo no período pós-colheita dos frutos devido ao curto intervalo de tempo entre o tratamento aplicado e o consumo (FARZANEH et al., 2015).

Surge, então, a necessidade do desenvolvimento de coberturas comestíveis a base de protetores naturais com ação antimicrobiana, capazes de retardar o amadurecimento da fruta, estender a vida de prateleira, mantendo a qualidade do produto e ao mesmo tempo sendo isentos de efeitos tóxicos ao organismo humano (HASSAN et al., 2018).

Dentre os protetores naturais mais utilizados na produção de coberturas comestíveis, destaca-se a quitosana, um heteropolímero natural composto por unidades B-1,4-D-glucosamina ligadas a N-acetilglucosamina que é encontrada na parede celular de fungos ou extraída a partir da desacetilação da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos (BAKSHI et al., 2019; BERGER et al., 2018). A vasta aplicação da quitosana em coberturas comestíveis deve-se as suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de formação de membrana e atividade antibacteriana e antifúngica (KERCH, 2015). Além disso, a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes, microesferas e nanopartículas (BAKSHI et al., 2019).

Apesar de existir vários estudos a respeito da utilização do gel de quitosana como cobertura comestível antimicrobiana (SHIEKH et al., 2013; VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014a; BASWAL et al., 2020; TOKATLI; DEMIRDÖVEN, 2020; VILAPLANA et al., 2020), atualmente ainda são necessários estudos que descrevam e comparem a ação da quitosana na forma de nanopartículas, pois estas devido ao seu pequeno tamanho apresentam efeitos diferenciados tanto no que diz respeito a sua ação conservadora como também a sua ação biológica, o que pode viabilizar sua utilização pela indústria de alimentos.

Portanto, frente ao reconhecido potencial biológico da quitosana e sua possível utilização na forma de nanopartículas, o presente estudo tem como objetivo avaliar, de forma comparativa, a ação antifúngica, antioxidante, conservadora e a toxicidade de cobertura comestível de quitosana na forma de nanopartículas, gel e gel enriquecido com nanopartículas na preservação de morangos (*Fragaria ananassa*), e com isso definir qual o melhor tipo de cobertura comestível a base de quitosana destinada a conservação pós-colheita dessa fruta.

Com os dados obtidos no estudo foi possível a produção de um capítulo de livro publicado no livro "Global progress in applied microbiology - a multidisciplinary approach" (apêndice C) e um artigo aceito para publicação na revista International Journal of Food Studies (apêndice E). Além disso, foram produzidos 2 artigos científicos que se encontram nos apêndices D e F.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Qualidade pós-colheita de morangos

O morango pertence à família das Rosáceas do gênero *Fragaria*, que contém ao todo 23 espécies (SHULAEV et al., 2008; LAFARGA et al., 2019). A espécie *Fragaria x ananassa* Duch, é um híbrido natural proveniente de cruzamentos de duas espécies, a *Fragaria virginiana* e a *Fragaria chiloensis* (STAUDT, 1962; STAUDT, 1989).

O interesse comercial de diversos países pelo morango é grande, devido alguns atributos que o seu pseudofruto possui, como por exemplo sua coloração vermelho-brilhante, odor agradável, textura macia, sabor levemente acidificado e suas propriedades nutritivas, que fazem desta fruta um produto muito apreciado pelos consumidores mundiais (LAFARGA et al., 2019). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), em 2013 a produção mundial de morangos foi liderada pela China, responsável por uma produção de 3.005.304 toneladas, seguido dos Estados Unidos e México, com 1.360.869 e 379.464 toneladas, respectivamente.

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo (CARÂMES et al., 2017). Estima-se que a sua oferta anual de morango corresponda a aproximadamente 150 mil toneladas, em uma área de aproximadamente 4 mil hectares. Os estados que são os maiores produtores são Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Acredita-se que 70% do morango brasileiro seja destinado ao consumo in natura, e os outros 30% às necessidades da indústria, especialmente ao mercado de frutas e derivados congelados (ANTUNES, 2013).

A cultura do morangueiro é importante economicamente, pois apresenta uma alta rentabilidade por área e movimenta outros setores da economia como o de insumos, mudas, transportes, embalagens e indústrias processadoras. O morangueiro possui porte herbáceo e rasteiro, e, apesar de apresentar ciclo perene, tem normalmente cultivo anual ou bianual devido a questões relacionadas à sua fitossanidade e produtividade. A parte comestível da cultura é um pseudofruto suculento e carnoso de coloração vermelha, com origem no receptáculo floral,

apresenta aparência atrativa e grande aceitação do público consumidor (FERLA et al., 2007; GIAMPIERI et al., 2012; LAFARGA et al., 2020).

O morango deve ser colhido quando estiver completamente maduro, pois trata-se de um pseudofruto não climatérico e por isso precisa alcançar a máxima qualidade em termos de aparência visual, textura, sabor e valor nutricional antes da realização da colheita (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008; LIU et al., 2018). Contudo, isso representa vários desafios, pois o fruto será menos firme, portanto mais sensível a ataques por microrganismos e a danos físicos durante o manuseio e o armazenamento pós-colheita (SÁNCHEZ et al., 2012; WANG et al., 2018).

Atualmente, o índice de amadurecimento do morango que define o momento da colheita dessa fruta é baseado exclusivamente na cor da superfície da baga. A fruta é considerada apta para ser colhida quando pelo menos três quartos da superfície apresenta a coloração vermelha (MITCHAM; MITCHELL, 2002). Contudo, durante a pós-colheita, as atividades das enzimas como a polifenol oxidase e a peroxidase reduzem o conteúdo de compostos responsáveis pela cor, ocasionando o escurecimento da fruta e também uma diminuição na sua atividade antioxidante (ESHGHI et al., 2014).

A cor do morango não influencia apenas na definição do momento da colheita, mas também é considerada um dos atributos da fruta que atraem diversos consumidores, assim como seu odor característico, textura macia, sabor atrativo, alto conteúdo de vitaminas e compostos antioxidantes como as antocianinas (ESHGHI et al., 2014; GIAMPIERI et al., 2015). Porém, o morango é altamente perecível, devido a sua vulnerabilidade a injúrias físicas, a contaminação por fungos, dessecação e desordens fisiológicas durante o seu armazenamento (VU et al., 2001; WANG et al., 2018; LAFARGA et al., 2019).

A sua alta susceptibilidade a contaminação, em comparação com outros tipos de frutas, ocorre, principalmente, devido a um baixo pH, uma elevada atividade de água, altos níveis de açúcares e outros nutrientes, elevada taxa respiratória e a presença de uma pele (epicarpo) que pode ser facilmente rompida, favorecendo a proliferação de microrganismos (VU et al., 2011; HASHMI et al., 2013; LAFARGA et al., 2019). Além disso, apresenta também uma elevada atividade fisiológica pós-colheita, com um curto período de amadurecimento e senescência o que torna sua

comercialização um grande desafio para a agroindústria (HAN et al., 2004; PERETTO et al., 2014).

O método mais utilizado para a manutenção da qualidade do morango e controle da sua deterioração é um rápido resfriamento após a colheita seguido do armazenamento em baixas temperaturas e alta umidade relativa de água. Contudo, mesmo utilizando baixas temperaturas a vida de prateleira do morango em temperaturas de refrigeração é normalmente inferior a 5 dias (GAOUTH et al., 1991; PERDONES et al., 2012).

Outros métodos também são utilizados no controle pós-colheita dos morangos, como por exemplo o emprego do calor e de atmosfera controlada. No entanto, a utilização dessas tecnologias pode causar alterações na cor, conteúdo de antioxidante e ácido ascórbico nesta fruta, perdendo desta forma sua qualidade comercial e nutricional (WANG et al., 2013).

Apesar do uso contínuo dessas tecnologias com o objetivo de prolongar a vida de prateleira dos morangos, mais de um quarto das frutas durante a safra são perdidas devido a deterioração fúngica (MAFTOONAZAD; RAMASWAMY, 2005). As doenças pós-colheita causadas por fungos são o resultado de infecções latentes que se iniciam no campo e também infecções que ocorrem através de feridas produzidas nas frutas durante a colheita ou a pós-colheita (FELIZIANI; ROMANAZZI, 2016).

2.2 Fungos fitopatógenos do morango

Na cadeia produtora de frutas e hortaliças, o principal problema é a ocorrência de doenças que aparecem principalmente após a colheita, o que leva a perda de qualidade do produto e redução na quantidade disponível para comercialização e consumo. Essas doenças estão relacionadas, principalmente, a incidência de podridões, sendo os fungos responsáveis por 80 a 90% dos danos de origem microbiológica em frutas (OLIVEIRA, 2006; USALL et al., 2016)

Os fungos são microrganismos onipresentes com uma grande capacidade de colonizar muitos tipos de substratos e proliferar-se intensamente (EL-SHIEKH et al., 2012; LAFARGA et al., 2019). Isso ocorre devido a sua capacidade de reprodução em condições de atividade de água (de 0,65 até 0,99) e pH reduzidos, em uma ampla

faixa de temperatura (< 0°C a 40°C) e a possibilidade de utilização de uma grande variedade de substratos, como fontes de carbono, nitrogênio e energia (TANIWAKI; SILVA, 2001; DAGNAS; MEMBRE, 2013; IKEDA et al., 2019). Segundo Henz et al. (2008), em frutos armazenados a temperatura de 21°C a 26°C, os danos devido a ocorrência de podridões fúngicas podem chegar a 98% aos 5 dias de armazenamento.

Um grande número de patógenos está associado às podridões de morangos após a colheita, entre eles os considerados mais importantes no Brasil são *B. cinerea* e *R. stolonifer* e com menor incidência *A. niger* (MASS, 1998; FARZANEH et al., 2015). As doenças consideradas as mais importantes na pós-colheita de morango são o mofo cinzento e a podridão mole, causadas pelos fungos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, respectivamente (ROMANAZZI et al., 2013; ROMANAZZI, 2016).

2.2.1 *Botrytis cinerea*

B. cinerea é considerado um fungo necrótico fitopatogênico pertencente ao filo Ascomycota (LI et al., 2012). É um dos mais importantes patógenos de frutas, pois causa sérias perdas em mais de 200 tipos de culturas em todo mundo, sendo comum tanto em cultivo protegido, como também pode alcançar níveis consideráveis em campo aberto e câmaras de armazenamento (MOUSSA et al., 2013; ELAD et al., 2015).

De acordo com uma revisão, o *B. cinerea* encontra-se em segundo lugar na lista dos 10 principais fungos fitopatogênicos, baseada em informações científicas e importância econômica (DEAN et al., 2012). Acredita-se que esse fungo seja responsável por 28-42% das perdas pós-colheita de morangos (WILLIAMSON et al., 2007; HASHMI et al., 2013).

Esse fungo pode causar diversos danos em frutas, vegetais e culturas ornamentais, tanto na pré como na pós-colheita, contudo os vegetais e pequenas culturas de frutas (uva, morango, framboesa, amora) são os mais afetados (WILLIAMSON et al., 2007; CARMICHAEL et al., 2018). Ele é capaz de infectar folhas, hastes, flores e frutas e é considerado o principal obstáculo ao transporte e armazenamento a longas distâncias (BOUCHRA, et al., 2003; XU et al., 2007; SANZANI et al., 2012; WAKEHAM et al., 2016).

O mofo cinzento causado por esse fungo é a doença pós-colheita mais significativa para o morango, pois causa prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008; UGOLINI et al., 2014; ROMANAZZI et al., 2016). Segundo Dias (1999), o mofo-cinzento provoca danos graves para a produção de morango em todas as áreas do mundo, chegando a reduzir em até 70% da sua produção.

A infecção ocorre inicialmente nas flores do morangueiro, ainda no campo, geralmente em tecido debilitado, como pétalas senescentes, para posteriormente infectar os tecidos saudáveis do fruto (MOUSSA et al., 2013). Os conídios do *B. cinerea* são facilmente disseminados pelo vento, pela água ou por insetos, podendo sobreviver saprofiticamente em matéria orgânica quando não há hospedeiros, ou sobreviver por escleródios ou micélios dormentes em restos de cultura (ROMANAZZI et al., 2016).

Embora o *B. cinerea* seja um fungo normalmente saprofítico, ele raramente é visto nas frutas presentes nos campos, ficando visível, na maioria das vezes, apenas durante o armazenamento (SUTTON et al., 2014; ROMANAZZI et al., 2016). Este fungo permanece latente por baixo das pétalas até o amadurecimento dos frutos, e depois ou perto da colheita transforma-se de um fungo saprofítico para um fungo parasita (POWELSON, et al., 1960; ROMANAZZI et al., 2013). Essa maior incidência de infecção pelo *B. cinerea* nos frutos pós-colheita deve-se não apenas as condições ambientais favoráveis, mas também à menor reatividade dos tecidos vegetais ocasionadas por um enfraquecimento dos seus mecanismos de defesa durante este período (ROMANAZZI et al., 2016).

O *B. cinerea* é responsável por uma grande diversidade de sintomas, apesar de variarem em função do hospedeiro e do órgão afetado. Esses sintomas são quase sempre caracterizados pela descoloração dos tecidos, aspecto úmido e necrótico das lesões e presença de crescimento cotonoso acinzentado (conídios e conidióforos) sobre as áreas afetadas. Em frutos verdes de morango, os sintomas são caracterizados pela presença de pequenas lesões marrons levemente depressivas. Já em frutos maduros, essas lesões tornam-se recobertas por um crescimento acinzentado constituído por estruturas do patógeno, que rapidamente tomam toda superfície do fruto. Com a evolução dos sintomas, os frutos podem apodrecer completamente ou ainda assumir a forma de mumificados (ROMANAZZI et al., 2016).

O mofo cinzento é agravado por uma alta umidade ambiental, baixa luminosidade e temperaturas moderadas (16 a 23°C). Valores de umidade relativa acima de 93% são ideais para a germinação dos conídios e penetração do fungo no fruto hospedeiro. Uma umidade relativa constantemente alta leva a sucessivos ciclos de infecção e esporulação fúngica, especialmente em micro lesões ou rachaduras que podem ocorrer durante a colheita e manipulação do fruto (WILLIAMSON et al., 1995; ROMANAZZI et al., 2016).

Normalmente, frutas frescas como o morango são armazenadas em temperaturas de refrigeração que variam entre 0° e 10°C. Contudo, baixas temperaturas podem diminuir, mas não impedir o crescimento do *B. cinerea*, pois esse fungo é capaz de crescer em um grande intervalo de temperatura que varia de 0° a 32°C, levando ao encurtamento do tempo de armazenamento e da comercialização dos morangos (ROMANAZZI et al., 2013; ROMANAZZI et al., 2016).

O *B. cinerea* é difícil de controlar porque apresenta uma variedade de modos de ataque ao fruto, hospedeiros diversos como fontes de inóculo, e é capaz de sobreviver como micélio ou conídios e por períodos prolongados como esclerócios, em detritos de culturas (WILLIAMSON et al., 2007; VELOSO; KAN, 2018). Além disso, o *B. cinerea* pode também secretar enzimas que degradam a parede celular do fruto, tais como poligalacturonases, celulasas, cutinases e hemicelulasas, o que agrava ainda mais a infecção causada por esse fungo (HUANG et al., 2011; LI et al., 2012; VELOSO; KAN, 2018).

2.2.2 *Rhizopus stolonifer*

O *Rhizopus stolonifer* é um fungo pertencente ao filo *Zygomycota*, ordem *Mucorales* e família *Mucoraceae*. O seu micélio é branco e haploide, contém filamentos vegetativos e uma estrutura de frutificação e com o tempo apresenta coloração marrom-acinzentada. Tem um molde filiforme e é uma espécie heterotrófica dependente, conhecida popularmente como o bolor-preto-do-pão (LIOU et al., 2007; MASSOLA JUNIOR; KRUGER, 2011; OLIVEIRA et al., 2019).

O *Rhizopus stolonifer* pode tolerar condições quentes, secas ou frias, pois é considerado um fungo saprofítico que se desenvolve e obtém nutrientes em pedaços

de fruta ou material orgânico. Seu micélio aéreo pode se reproduzir sexuada ou assexuadamente com a formação de esporangiósporos disseminados facilmente pelo ar (MASSOLA JUNIOR; KRUGER, 2011; OLIVEIRA et al., 2019). Na sua reprodução sexuada, há a formação de uma zigospora que tem paredes espessas capazes de conferir resistência para que o fungo permaneça latente no solo por vários meses, suportando condições de falta de água e altas temperaturas, até encontrar condições ambientais ótimas para seu crescimento e desenvolvimento (ADASKAVEG et al., 2002; BAGGIO et al., 2017)

Devido a essa característica saprofítica e a sua capacidade de formar zigospora, o *R. stolonifer* é conhecido como um fungo altamente destruidor. É considerado como um dos principais responsáveis por perdas pós-colheita em diversas culturas de frutas como a da graviola, fruta-do-conde, jaca, pêssego, mamão, morango, dentre outras espécies de importância econômica. Normalmente, não afeta frutos imaturos, sendo vistos no campo, principalmente em épocas chuvosas, apenas quando as frutas apresentarem grandes lesões (ZHANG et al., 2007; ROMANAZZI et al., 2013; KONG et al., 2019).

Geralmente, exige ferimentos para sua penetração, que normalmente ocorre devido ao manuseio inadequado durante a colheita, o transporte e o armazenamento. Por isso, frutos na pré-colheita e não injuriados não são os principais alvos de infecção por esse patógeno (BAGGIO et al., 2016). Posteriormente a sua penetração, há a colonização do fruto rapidamente, causando, depois de 2 ou 3 dias, uma podridão mole e aquosa, pois suas hifas secretam enzimas pectinolíticas que degradam as substâncias de pectina na lamela média, resultando em perda de coesão e degradação química das células, caracterizando a doença chamada "podridão mole". Após, aproximadamente, um dia do aparecimento desses sintomas, surgem as estruturas do patógeno, como os micélios, esporângios e esporangiósporos (AGRIOS, 2001; BAGGIO et al., 2017).

O *R. stolonifer* é o fungo responsável por causar a podridão mole em morangos, que é caracterizada por uma podridão macia e aquosa, com manchas castanhas na fruta, levando a um vazamento de suco e colapso dos tecidos, com liberação de substâncias de odor ácido ou fermentado. Além disso, é uma podridão capaz de se espalhar a temperaturas superiores a 4-6°C, (MAAS, 1998; ROMANAZZI et al., 2013; ZHOU et al., 2018). Esta é uma típica doença de pós-colheita, na maior parte dos casos, ocorrendo devido a ferimentos causados nos frutos e pela suscetibilidade dos

tecidos vegetais durante o processo de amadurecimento (SCARIOT, 2013; ZHOU et al., 2018).

A origem da infecção ocorre devido aos frutos conterem na sua superfície, o inóculo (esporângio do fungo). Os sintomas são muito característicos, já que os frutos maduros se apresentam com um aspecto mole, aquoso e com o suco escorrendo para fora. Na superfície há desenvolvimento abundante de micélios, esporangióforos, e esporângios do fungo agente causal (MAAS, 1998; SUN et al., 2015).

A podridão mole pode se disseminar facilmente, pois o suco liberado pelos frutos infectados dissemina o inóculo para os frutos sadios após a colheita. Esses frutos contaminados apresentam alterações na cor e na consistência e posteriormente se verifica sobre eles um crescimento micelial denso e branco, entremeado com esporângios e esporangióforos escuros (BAGGIO et al., 2016).

Essa fácil disseminação entre os frutos ocorre tanto na podridão mole como também no mofo cinzento e é considerada um fenômeno conhecido como “aninhamento” ou nidificação (MASS, 1998; BOSQUEZ-MOLINA et al., 2010). Isso ocorre, especialmente, no período pós-colheita, durante o armazenamento devido a produção do micélio aéreo dos fungos e a infecção por contato de frutas saudáveis com frutas infectadas que apresentam estolões miceliais. Por isso há uma grande dificuldade no controle dessas doenças em frutas após a colheita (ROMANAZZI et al., 2016).

2.2.3 *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* pertencente ao filo *Ascomycota* e compreende cerca de 250 espécies de fungos, sendo o *A. niger* o mais importante membro desse gênero (DYER; O’GORMAN, 2012; TANIWAKI et al., 2018). Essa espécie é encontrada em diversos tipos de habitats, especialmente presente no solo e em material de plantas em decomposição, agindo como um fungo saprobiótico (TOLOUEE et al., 2010; TANIWAKI et al., 2018). Por isso, é capaz de contaminar alimentos na pré e pós-colheita, durante o processamento, armazenamento e manuseio, já tendo sido encontrado em grãos, iogurte, frutos e vegetais (SAMSON et al., 2004; GOUGOULI; KOUTSOUMANIS, 2017; KOGKAKI et al., 2017; TANIWAKI et al., 2018).

Durante sua reprodução assexuada são originados conidióforos, estruturas especializadas que dão origem aos conídios, ou seja, esporos infectantes das espécies de *Aspergillus*, que quando produzidos são liberados no ar, sendo responsáveis pela preservação do genoma fúngico em condições ambientais adversas (OSHEROV; MAY, 2001; CABAÑES; BRAGULAT, 2018). A cor dos seus conídios pode variar de marrom-escuro a preto, possuem conidióforos que podem ser uni ou bisseriados e vesículas esféricas (SAMSON et al., 2007; KOGKAKI et al., 2017). Algumas cepas de *A. niger* produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, os quais podem ser micotoxinas, como a ocratoxina A e fumonisina B₂ que causam danos as células de mamíferos (HONG et al., 2013; TANIWAKI et al., 2018).

O crescimento deste fungo em material orgânico ocorre em ampla faixa de temperatura (6-47°C) e de pH (1,4-9,8) e apresenta atividade de água mínima de 0,88, o que favorece sua permanência em produtos secos como cacau e café. Além disso, possuem esporos resistentes à luz e à substâncias químicas, portanto, conseguem competir com outros microrganismos pelo domínio da contaminação de alimentos (SCHUSTER et al., 2002; CABAÑES; BRAGULAT, 2018).

O *A. niger* é o agente causador da podridão negra em frutas. A infecção deste agente patogênico em frutos caracteriza-se pelo amolecimento do local infectado seguido do desenvolvimento do mofo escuro que corresponde as estruturas de frutificação dos fungos, que com passar do tempo adquire uma tonalidade acinzentada, semelhante ao mofo cinzento, sendo responsável por causar grandes perdas para o produtor (WANG et al., 2015; PISANI et al., 2015).

Alguns autores relatam a presença do *Aspergillus* como agente de podridões em morangos (MAAS et al., 1998; FAIRE-CORDERO et al., 2003; ERAZO et al., 2019). Segundo Lopes (2011), o *A. niger* é relatado como um novo patógeno em frutos de morango pós-colheita no Brasil. Nessas frutas, a infecção pelo *A. niger* ocorre principalmente em feridas na superfície e causam mudanças na sua cor, textura e odor, diminuindo sua aceitabilidade e comercialização (VARGAS et al., 2004; ABDOLLAHI et al., 2011; ERAZO et al., 2019).

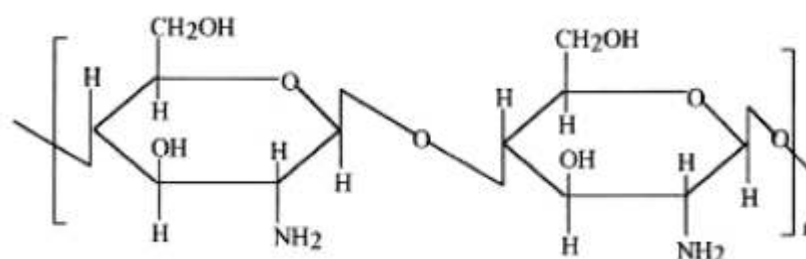
Na agricultura convencional, essas doenças que acometem os morangos (mofo cinzento, podridão mole e podridão negra) normalmente são gerenciadas

por tratamentos fungicidas que são aplicados em torno da floração, e são repetidos até a colheita, porém esses fungos têm apresentado resistência a diversos tipos de fungicidas (BARDAS et al., 2010; ERAZO et al., 2019). Além disso, na agricultura orgânica e após a colheita, o uso de fungicidas sintéticos para essas doenças não é permitido, conseqüentemente há uma busca crescente por parte da agroindústria por alternativas efetivas e seguras que controlem os fungos pós-colheita do morango (ROMANAZZI et al., 2013).

2.3 Quitosana

A quitosana é um heteropolímero biodegradável formado a partir de unidades glucosaminas ($\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-d-glucopirranose) ligadas a resíduos de unidades N-acetilglucosamina ($\beta(1,4)$ -2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopirranose) unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), como observado na figura 1 (FAI et al., 2011; BAKSHI et al., 2019). Apresenta uma estrutura molecular com grupos aminos e hidroxilas reativos considerada uma poliamina linear (SANTOS et al., 2003; BAKSHI et al., 2019).

Figura 1- Estrutura molecular da quitosana (AZEVEDO et al., 2007).



Esse biopolímero é insolúvel em água, mas dissolve-se em soluções aquosas que contenham ácidos orgânicos ou inorgânicos, formando, portanto, uma solução viscosa (BAKSHI et al., 2019). A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos aminos protonados na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água (SORLIER et al., 2001; KONG et al., 2015).

A quitosana pode ser obtida a partir da parede celular de fungos ou através da extração, purificação e desacetilação da quitina (HAMED et al., 2016; BAKSHI et al., 2019). A quitina é um biopolímero e é considerada a mais abundante fibra vegetal depois da celulose, sendo encontrada em celenterados, anelídeos, moluscos, artrópodes, insetos e microrganismos (SHIEKH et al., 2013; GHORMADE et al., 2017).

Comercialmente, a quitina para produção de quitosana é extraída a partir do exoesqueleto de crustáceos. No entanto, problemas sazonais, poluição causada pelo descarte de resíduos dos solventes utilizados na extração, custos elevados de produção, possibilidade de degradação da cadeia polimérica e heterogeneidade das propriedades físico-químicas da quitosana são exemplos de limitações inerentes ao processo de extração da quitosana a partir da quitina de crustáceo (GHORMADE et al., 2017; BERGER et al., 2018).

Uma alternativa viável e isenta dessas limitações inerentes ao processo de obtenção da quitosana a partir da quitina é a extração da quitosana da parede celular de fungos. A quitosana de origem fúngica não é afetada por fatores sazonais, pode ser produzida em larga escala usando resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo econômico e esse tipo de quitosana não contém proteínas que induzem reações alérgicas a crustáceos (VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014a; GHORMADE et al., 2017; BERGER et al., 2018).

Dentre as inúmeras características que distinguem a quitosana e seus derivados, dos demais polissacarídeos, destacam-se: a sua bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana (DIAS et al., 2013; BAKSHI et al., 2019). Vários estudos mostram que a quitosana apresenta uma atividade antimicrobiana contra um vasto número de microrganismos, sendo as leveduras e bolores os grupos mais sensíveis a sua ação antimicrobiana, seguidos pelas bactérias gram-positivas e gram-negativas (AIDER, 2010; ABDALLAH et al., 2017; VERLEE et al., 2017; CASTELO BRANCO MELO et al., 2018). A atividade antifúngica da quitosana tem sido observada contra *Penicillium digitatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Phomopsis asparagi*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, etc (GARCÍA-RINCÓN et al., 2014; LONG et al., 2014; KHEIRI et al., 2016; VERLEE et al., 2017).

Acredita-se que a quitosana apresente três mecanismos de ação contra os fungos. No primeiro mecanismo proposto, as cargas positivas da quitosana interagem com as cargas negativas dos componentes fosfolipídicos da membrana celular dos fungos, causando aumento da permeabilidade da membrana, com vazamento de componentes intracelulares e conseqüente morte fúngica. O segundo mecanismo refere-se a quitosana atuando como um agente quelante que liga-se a oligoelementos celulares, tornando indisponível nutrientes essenciais para o crescimento fúngico. Por último, acredita-se também que a quitosana é capaz de penetrar a parede celular de fungos e ligar-se ao seu DNA, inibindo a síntese do RNAm e afetando a produção de proteínas e enzimas essenciais à sobrevivência desse microrganismo (KONG et al., 2010; PALMA-GUERRERO et al., 2010; GALVAN MARQUEZ et al., 2013; KHEIRI et al., 2016; MA et al., 2017).

As propriedades da quitosana, principalmente a antimicrobiana, possibilita a utilização desse polímero pela indústria alimentícia em diversos tipos de alimentos, especialmente em frutos como cobertura comestível, pois se mostra efetiva no controle de sua deterioração (DEVLIEGHERE et al., 2004; DOTTO et al., 2015). Estudos realizados utilizando coberturas comestíveis a base de quitosana mostram resultados satisfatórios tanto em relação ao potencial antifúngico desse polímero como também a capacidade que a quitosana possui de prolongar a qualidade pós-colheita de diversos tipos de frutos especialmente os morangos (GOL et al., 2013; ROMANAZZI et al., 2013; VELICKOVA et al., 2013; SANGSUWAN et al., 2016; VENTURA-AGUILAR et al., 2018)

Estudos relatam que a quitosana utilizada como cobertura comestível age com efeito duplo, pois interfere diretamente no crescimento de patógenos e ativa várias respostas de defesa que induzem ou inibem diferentes atividades bioquímicas durante a interação da fruta com o patógeno (BATISTA-BAÑOS et al., 2006; CERQUEIRA et al., 2011; CASTELO BRANCO MELO et al., 2018). Ela age, também, formando uma película semipermeável que regula as trocas gasosas e reduz as perdas por transpiração, diminuindo a taxa de respiração e a perda de água da fruta. Além disso, esse polímero é responsável por uma diminuição da síntese de etileno da fruta, conseqüentemente retardando seu amadurecimento, aumentando a vida de prateleira desse alimento, facilitando o transporte a longas distâncias e ampliando seu período de comercialização (BATISTA-BAÑOS et al., 2006; ROJAS-GRAÜ et al., 2009). Tudo

isso ocorre sem alteração das propriedades sensoriais do produto devido ao fato da quitosana apresentar-se como um composto inodoro, insípido e capaz de formar uma cobertura comestível translúcida quando aplicada sobre a superfície do fruto (SHAO et al., 2015)

As propriedades que a quitosana apresenta e que tanto atrai o interesse da indústria de alimentos são favorecidas pelo fato deste polímero poder ser preparado em diferentes formas. Os principais tipos de preparo do polímero são na forma de géis, filmes, membranas, microesferas e nanopartículas, criando, desta forma, diversas possibilidades de aplicações (CAMPANA-FILHO et al., 2007; ESHGHI et al., 2014; MUJTABA et al., 2018).

2.4 Nanopartículas de quitosana

Nanotecnologia é um campo da nanociência que tem como objetivo a caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica (SAHOO et al., 2007; CARTELLE; ZURITA, 2015). Dentro desse campo, estão as pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de materiais na escala nanométrica (10^{-9}), os nanomateriais, pois acredita-se que neste tamanho esses materiais apresentariam melhores propriedades físicas e químicas (KALIA; PARSHAD, 2013).

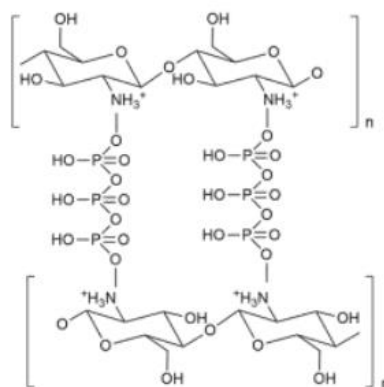
Os nanomateriais são definidos como um material que apresenta propriedades morfológicas menores que um micrômetro em pelo menos uma dimensão externa ou com uma estrutura interna em nanoescala. A principal característica que fornece aos nanomateriais suas propriedades específicas é seu pequeno tamanho, que aumenta sua área superficial proporcionando uma alta reatividade ao material em questão (FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018).

Quando esse nanomaterial contém as suas três dimensões na escala nanométrica, é denominado de nanopartícula. O tamanho, a estrutura e a composição química das nanopartículas são os responsáveis por suas características únicas e, portanto, por seu potencial em várias aplicações (BOUWMEESTER et al., 2009; NASKAR et al., 2019).

Vários materiais podem ser utilizados na produção de nanopartículas, no entanto a quitosana destaca-se entre eles devido a sua bioatividade, biocompatibilidade, por sua habilidade em aumentar a penetração de grandes moléculas por superfícies mucosas e por possibilitar a utilização de métodos alternativos de formulações que não requerem a utilização de solventes orgânicos e de surfactantes (ARNAUD-STAMFORD; STAMFORD, 2010; NASKAR et al., 2019).

A gelatinização iônica destaca-se como método que não utiliza solventes orgânicos tóxicos e surfactantes para a produção de nanopartículas de quitosana. Foi descrito pela primeira vez por Calvo et al. (1997) e consiste na adição por gotejamento de um poliânion (geralmente o tripolifosfato de sódio-TPP) a uma solução de quitosana para a formação das nanopartículas. Além disso, é um método capaz de produzir partículas com uma pequena distribuição de tamanho e alta carga superficial positiva (FAN et al., 2012). Tudo isso possibilita o uso pela indústria de alimentos das nanopartículas produzidas por gelatinização iônica (BOUGNICOURT et al., 2014).

Figura 2 - Estrutura molecular das nanopartículas de quitosana (Ma et al., 2017).



As nanopartículas de quitosana têm sido desenvolvidas para uso na indústria de alimentos visando inúmeras aplicações, tais como: melhorar a hidrofobicidade, continuidade, homogeneidade e manuseabilidade de coberturas comestíveis, prolongar a manutenção da cor e do aroma, principalmente quando aplicadas em frutos e agir como antimicrobiano natural (LOREVICE et al., 2012; FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018). Além disso, a nanotecnologia desempenha papel crucial na área de embalagens de alimentos (MIHINDUKULASURIYA et al., 2014). Recentes estudos tem mostrado um aumento da aplicação das nanopartículas de quitosana

diretamente em produtos alimentícios e materiais de embalagem como coberturas comestíveis antimicrobianas (AZEREDO et al., 2013; AL-NAAMANI et al., 2016; CASTELO BRANCO MELO et al., 2018; KUMAR et al., 2018). Segundo Maysoun et al. (2015), revestimentos comestíveis para frutas e hortaliças feitos de nanoestruturas, particularmente de quitosana, são a chave para possíveis avanços na área de conservação de alimentos.

Sabe-se que as nanopartículas apresentam maior afinidade por membranas biológicas com cargas negativas, o que pode ser capaz de estimular as respostas de defesa das plantas (QI et al., 2005). Além disso, o tamanho muito pequeno das nanopartículas de quitosana pode diminuir a perda de vapor de água e gases de frutos, mantendo outras propriedades desejáveis do revestimento comestível, os quais precisam de pequenas quantidades de quitosana para sua produção. Portanto, devido a todas essas características há uma crescente demanda por pesquisas que utilizem nanoestruturas de quitosana para prolongar a vida útil de frutas e expliquem seus efeitos no alimento (MAYSOUN et al., 2015).

3 HIPÓTESE

A utilização de gel, nanopartículas e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana em coberturas comestíveis são efetivas em inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos em morangos, conservando a qualidade microbiológica e físico-química desse fruto sem alterar seus atributos sensoriais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar, de forma comparativa, a ação antifúngica, antioxidante, conservadora e a toxicidade de coberturas comestíveis de quitosana na forma de nanopartículas, gel e gel enriquecido com nanopartículas na preservação de morangos (*Fragaria ananassa*) pós-colheita.

4.2 Objetivos específicos

- Otimizar a obtenção de nanopartículas de quitosana fúngica;
- Caracterizar as nanopartículas de quitosana fúngica produzidas;
- Elaborar coberturas comestíveis a base de quitosana fúngica;
- Determinar a biocompatibilidade e citotoxicidade das coberturas comestíveis a base de quitosana;
- Determinar a ação antioxidante das coberturas comestíveis a base de quitosana;
- Determinar a ação antifúngica *in vitro* e *in vivo* das coberturas comestíveis a base de quitosana contra os fungos *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*;
- Verificar o efeito das coberturas comestíveis a base de quitosana sobre os parâmetros físico-químicos e organolépticos dos morangos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

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

A quitosana (Kionutrime®) de origem fúngica obtida do micélio do *Aspergillus niger* não geneticamente modificado, foi fornecida pela empresa Kitozyme® Company (Herstal, Bélgica). A quitosana utilizada apresenta um grau de desacetilação de 86% e peso molecular de 4×10^3 g/mol segundo Melo et al. (2016). Todas as outras substâncias utilizadas foram obtidas através de fontes comerciais.

As cepas dos fungos fitopatogênicos (*Botrytis cinerea* URM 2802, *Rhizopus stolonifer* URM 3728 e *Aspergillus niger* URM 7282) utilizadas nos testes antimicrobianos pertencem a coleção de cultura da micoteca do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

5.2 Métodos

5.2.1 Planejamento fatorial para obtenção das nanopartículas de quitosana

As nanopartículas de quitosana foram produzidas pelo método de gelificação iônica com algumas modificações (CALVO et al., 1997). Inicialmente foi realizado o planejamento fatorial de 2^4 para avaliar a influência de parâmetros operacionais no método de gelificação iônica e com isso determinar os parâmetros ideais para a otimização da produção das nanopartículas (PINHO NEVES et al., 2014).

Quatro diferentes parâmetros foram estudados no planejamento fatorial: o pH da solução de quitosana, a concentração de quitosana [Q], a concentração de tripolifosfato de sódio [TPP] e a proporção de volume de quitosana para volume de TPP [Q:TPP] (Tabela 1). A solução de quitosana foi preparada diluindo o polímero, sob agitação magnética, nas soluções de pH (ácido acético 1% + hidróxido de sódio

1%) determinadas pelo planejamento fatorial. O TPP foi diluído em água deionizada também sob agitação magnética, durante 30 minutos em temperatura ambiente (25°C).

Tabela 1 - Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial (2⁴).

Parâmetro	Nível -1	Ponto Central	Nível +1
pH	3	4	5
[TPP] (mg/ml)	0,6	0,8	1,0
[Q] (mg/ml)	0,5	1,0	1,5
Q:TPP (ml/ml)	2:1	4:1	6:1

Para a preparação das nanopartículas, as soluções de TPP foram adicionadas às soluções de quitosana por gotejamento através de uma bomba peristáltica (Atlas Syringe Pump) na velocidade aproximada de 0,2ml/min. Durante esse processo as soluções de quitosana foram mantidas em agitação magnética e em temperatura ambiente. Logo após o gotejamento, as suspensões de nanopartículas permaneceram em agitação magnética por mais 1 hora.

As nanopartículas de quitosana formadas foram caracterizadas para determinação do seu tamanho médio, índice de polidispersão e carga superficial de cada partícula produzida. Os tamanhos dos raios hidrodinâmicos e o índice de polidispersão das nanopartículas de quitosana foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS - Dynamic Light Scattering).

Para determinação do tamanho das partículas, 3ml das suspensões de nanopartículas de quitosana foi colocado em cubetas de poliestireno e analisadas utilizando o equipamento Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK). As medidas foram operadas com o comprimento de onda de 633nm a 25°C com um ângulo de detecção de 90°C. O tamanho das nanopartículas foi calculado de acordo com o movimento Browniano das partículas utilizando a equação de Stokes-Einstein (TSAI et al., 2011).

A determinação do potencial zeta também foi realizada no mesmo equipamento sob as mesmas condições operacionais. Três medidas de cada formulação foram realizadas para determinação da média e do desvio padrão dos resultados. Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física da UFPE.

O planejamento fatorial de 2^4 resultou em um total de 20 experimentos (o ponto central foi repetido 4 vezes) (Tabela 2). Os dados foram analisados utilizando o software STATISTICA 10.0 (StafSoft, Inc.).

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial (2^4) das nanopartículas de quitosana.

Ensaio	pH	[TPP]	[Q]	[Q:TPP]
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	+	-	+
4	+	+	-	-
5	+	-	+	+
6	+	-	+	-
7	+	-	-	+
8	+	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	+	+	-
11	-	+	-	+
12	-	+	-	-
13	-	-	+	+
14	-	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	-
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

20 0 0 0 0

A formulação de nanopartículas de quitosana do planejamento fatorial que apresentou como resultado de sua caracterização um potencial zeta $>30\text{mV}$, PDI < 0.5 e o menor tamanho foi escolhida para aplicação como cobertura comestível em morangos e as subseqüentes análises.

5.2.2 Preparação da nanopartícula de quitosana

A nanopartícula produzida para ser aplicada como cobertura comestível em morangos foi feita de acordo com os melhores parâmetros definidos no planejamento fatorial para a produção de nanopartículas de quitosana. Com base nisto, foi inicialmente preparada, em agitação magnética, 24ml de solução de quitosana fúngica à 2mg/ml em solução (ácido acético 1% + NaOH 1%) de pH 4. Depois foi gotejado através de uma bomba peristáltica, em uma velocidade de 0,2ml/min, 6ml de TPP na concentração de 1mg/ml. A proporção de Q:TPP foi de 4:1. Após a adição do TPP, a suspensão de nanopartículas permaneceu em agitação magnética por 1 hora.

Por fim, toda a suspensão de nanopartículas foi liofilizada para posterior aplicação nos testes antimicrobianos e sua utilização para produção de cobertura comestível.

5.2.3 Caracterização da nanopartícula de quitosana

5.2.3.1 Medida de Tamanho por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O tamanho do raio hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) da nanopartícula de quitosana escolhida, foram determinados por DLS. A medida de DLS foi feita na suspensão de nanopartículas sem prévia diluição e operada em um comprimento de onda de 633nm a 25°C com um ângulo de detecção de 90°C, utilizando o Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK).

O tamanho das nanopartículas foi calculado de acordo com o movimento Browniano das partículas utilizando a equação de Stokes-Einstein (TSAI et al., 2011).

Três medidas subsequentes foram determinadas. A análise foi realizada no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física da UFPE.

5.2.3.2 Potencial Zeta

Para determinar as cargas superficiais (potencial zeta) da nanopartícula, 1,0 mL da solução utilizada na análise por DLS foi transferida para uma célula eletroforética. As medidas, em triplicata, foram realizadas em um comprimento de onda de 633nm com um ângulo de 90° a 25°C utilizando-se o Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK). Foi alterada apenas a configuração do equipamento do modo “size” para o modo “zeta”.

5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi usada para observar a morfologia e o tamanho das nanopartículas de quitosana. A nanopartícula foi liofilizada e fixada em stubs com fita dupla-face de carbono (Taab, Berkshire, UK) e cobertas com uma camada de 10nm de platina usando um sistema de metalização Bal-Tec MED 020. Em seguida, foi analisada no microscópio eletrônico de varredura (MEV-QUANTA 200FEG) do Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE).

5.2.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A análise de FTIR foi utilizada para caracterizar e comparar a estrutura química da quitosana e das nanopartículas de quitosana. As amostras liofilizadas foram inseridas diretamente no equipamento para análise. Os espectros no infravermelho foram obtidos em ampla região, de 650 a 4000 cm^{-1} , usando um Cary 630 FTIR espectrofotômetro da Agilent Technologies.

5.2.4 Estabilidade coloidal das nanopartículas de quitosana

Amostras da suspensão de nanopartículas de quitosana foram armazenadas em diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 40°C) e caracterizadas, sem nenhuma purificação prévia, através das análises de DLS, PDI, potencial zeta, pH e turbidez realizadas a cada 2 semanas durante 2 meses. A primeira análise foi realizada na mesma semana em que as nanopartículas foram produzidas e representou a semana zero.

As análises de DLS, PDI e potencial zeta realizadas seguiram a metodologia utilizada para caracterização das partículas. O pH das suspensões foi medido utilizando um phmetro (modelo: MICRONAL B474) a 25°C.

Foi analisado também a turbidez da solução de nanopartículas através da metodologia descrita por Jonassen et al. (2012), utilizando um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 500nm. A turbidez foi calculada usando a fórmula de Lambert-Beer (Equação 1).

$$\tau = -\frac{1}{L} \ln \frac{I_t}{I_0} \text{ (Eq. 1)}$$

Onde:

τ = turbidez

L = comprimento do caminho da luz na célula da amostra (1cm)

I_t = intensidade de luz transmitida através da amostra

I_0 = intensidade de luz transmitida através do solvente (água)

5.2.5 Determinação da toxicidade

5.2.5.1 Teste da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM)

O teste do HET-CAM foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Steiling et al. (1999). Foi testada a nanopartícula de quitosana (20mg/ml) diluída em ácido acético 1% com pH ajustado para 5,8 com NaOH 1%.

O teste foi feito no décimo dia de incubação dos ovos fecundados. Inicialmente, o reservatório acima do espaço aéreo do ovo foi removido. A membrana corioalantóide

do ovo foi exposta e umedecida com solução salina fisiológica a 0,9%. Uma alíquota de 200µL da substância teste foi aplicada na membrana corioalantóide. Em seguida, a membrana foi observada por 5 minutos a fim de identificar sinais de vasoconstrição, hemorragia e coagulação. O tempo (em segundos) que cada um dos sinais iniciou foi aplicado na Equação 2 (VARGAS et al., 2007).

$$\text{Índice de Irritação} = \frac{[(301-\text{hemorragia}) \times 5] + [(303-\text{lise}) \times 7] + [(301-\text{coagulação}) \times 9]}{300} \quad (\text{Eq. 2})$$

Através desta fórmula foi quantificado o potencial de irritação observado. O índice de irritação é determinado de acordo com os valores a seguir: 0,0-0,9, sem irritação; 1,0-4,9, leve irritação; 5,0-8,9, irritação moderada; e 9,0-21,0, grave irritação (STEILING et al. 1999). Todos os ensaios foram repetidos 5 vezes.

5.2.5.2 Teste do MTT

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

As linhagens celulares HCT116 (Carcinoma colorretal humano), HL-60 (Leucemia promielocítica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), L929 (fibroblasto de camundongos) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongos) foram mantidas em meio de cultura contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

As células HCT116, MCF-7, L929 e RAW 264.7 (10⁵ células/mL) e HL-60 (3 x 10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Após esse período, 10µL das soluções foram adicionados aos poços na concentração final de 50µg/mL para o gel (10mg/mL) pH 6,4, nanopartículas (10mg/mL) pH 7,4 e gel + nanopartículas (10mg/mL) pH 7,4. O fármaco doxorubicina (10µg/mL) foi utilizado como padrão. Após 72h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5mg/mL) e depois de 3h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 7.0 demo*. A avaliação da toxicidade foi feita de acordo com a escala proposta por Rodrigues et al. (2014): 95 - 100% de inibição celular – citotóxica; 70 - 90% de inibição celular - citotoxicidade moderada e < 50% de inibição celular – sem citotoxicidade.

5.2.6 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do gel, das nanopartículas e do gel enriquecido com nanopartículas foi analisada através dos testes da captura do radical livre DPPH, do ABTS e pelo método de redução do ferro (FRAP).

5.2.6.1 Teste do DPPH

A capacidade de inibição do radical livre DPPH pelas substâncias teste foi determinada de acordo com o método de Chen et al. (2015). 2,5ml de cada substância teste na sua concentração CIM/2, CIM e 2CIM foi adicionado separadamente em 2,5ml da solução de DPPH preparada em etanol (50mg/L).

A mistura foi agitada utilizando um vortex e incubada por 30 minutos a 33°C. Depois do período de incubação, a absorbância das amostras foi medida usando um UV-VIS espectrofotômetro (Agilent, USA) em um comprimento de onda de 517nm. O percentual de inibição do radical livre DPPH pelas substâncias teste foi calculado de acordo com a equação 3.

$$\text{Inibição do radical DPPH (\%)} = [1 - (A_a - A_b / A_c)] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

A_a = absorbância da amostra + solução de DPPH

A_b = absorbância da amostra sem a solução do DPPH

A_c = absorbância do branco controle sem a amostra

5.2.6.2 Teste do ABTS

Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia de Larrauri et al. (1997) com algumas modificações. O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5mL da solução estoque de ABTS (7mM) com 88µL da solução de persulfato de potássio (140mM). Em seguida, essa mistura permaneceu a temperatura ambiente no escuro durante 16 horas. Depois, foi diluído 1mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorbância de $0,70\text{nm} \pm 0,05\text{nm}$ a 734nm.

Em ambiente escuro, foi transferido separadamente 30µL de cada substância teste nas suas concentrações CIM/2, CIM e 2CIM para tubos de ensaio com 3,0mL do radical ABTS e em seguida os tubos foram homogeneizados no vortex. Após 6 minutos, a leitura da absorbância das amostras foi feita utilizando o UV-VIS espectrofotômetro (Agilent, USA) em um comprimento de onda de 734nm. O percentual de inibição do radical livre ABTS pelas substâncias teste foi calculado de acordo com a equação 4.

$$\text{Inibição do radical ABTS (\%)} = [1 - (A_a - A_b / A_c)] \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

A_a = absorbância da amostra + solução de ABTS

A_b = absorbância da amostra sem a solução do ABTS

A_c = absorbância do branco controle sem a amostra

5.2.6.3 Método de redução do ferro (FRAP)

O método FRAP realizado de acordo com o preconizado por Rahainee et al. (2017) com algumas modificações. O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25mL de tampão acetato (0,3M), mais 2,5mL de uma solução de TPTZ (10mM) e 2,5mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (20mM)

Em ambiente escuro, foi transferido 90µL de cada substância teste diluída em sua respectiva concentração inibitória mínima para tubos de ensaio contendo 270µL de água destilada e 2,7mL do reagente FRAP. Em seguida, os tubos foram homogeneizados no vortex e incubados a 37°C. Após 30 minutos, a leitura das absorbâncias foi feita utilizando o UV-VIS espectrofotômetro (Agilent, USA) em um comprimento de onda de 595nm. Os resultados obtidos foram expressos em µM de equivalente de ferro, utilizando sulfato ferroso como padrão.

5.2.7 Determinação das concentrações inibitórias mínimas das substâncias teste

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada separadamente para as nanopartículas de quitosana, gel de quitosana e gel de quitosana enriquecido com nanopartículas frente aos fungos fitopatogênicos do morango (*Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*).

A quitosana e as nanopartículas foram diluídas separadamente em ácido acético 1%, sendo o pH ajustado para 5,6 com NaOH 1% para obtenção da solução mãe (20mg/ml) que deu origem ao gel de quitosana e a solução de nanopartículas de quitosana (SHIGEMASA; MINAMI, 1996). Diferentes diluições seriadas do gel de quitosana e das nanopartículas de quitosana juntos foram feitas para determinar o CIM da combinação das substâncias frente aos fungos fitopatogênicos estudados.

Para determinar a concentração mínima inibitória (CIM) foi realizado o teste de macrodiluição em caldo. Inicialmente, os fungos foram cultivados em meio BDA (batata dextrose ágar) a 25°C-28°C por 7 dias para suficiente esporulação. Os esporos fúngicos foram coletados através de um swab e suspensos em solução salina 0,9% estéril. O número de esporos presentes na suspensão foi quantificado por um hematocítmetro. A concentração de esporos obtida foi ajustada com solução salina estéril para fornecer um inóculo fúngico padrão de 10^6 esporos/ml (RASOOLI; ABYANEH, 2004; RASOOLI; OWLIA, 2005).

Inicialmente, 0,5ml do inóculo fúngico padronizado em 10^6 esporos/ml foi inoculado em 2ml de meio Sabouraud líquido, com a concentração final do meio ajustada para 5ml. Em seguida, 2,5ml das soluções das substâncias teste em diferentes concentrações foram adicionados (SHARMA; TRIPATHI, 2008). Os tubos contendo a mistura do meio de cultura, inóculo fúngico e substância teste foram incubados a 25°C durante 7 dias ou até o crescimento fúngico visível do tubo controle (tubo sem a presença de substância teste). Ao final do período de incubação, a menor concentração de cada substância teste que não permitiu crescimento fúngico foi considerada a CIM (VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014a).

A solução de pH 5,6 (ácido acético ajustado com NaOH) utilizada para diluição das substâncias teste também foi testada como outro tipo de controle e não apresentou inibição do crescimento fúngico. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A inibição de crescimento de cada fungo foi avaliada separadamente para cada substância teste.

Baseado nos valores de CIM encontrados, diferentes concentrações (CIM/2, CIM, 2CIM) do gel, das nanopartículas de quitosana e do gel enriquecido com as nanopartículas de quitosana foram escolhidas para serem aplicadas nos subsequentes testes de atividade antifúngica.

5.2.8 Método *Checkboard*

O método *Checkboard* é uma técnica muito utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de combinações de substâncias. Através desse método, o resultado da CIM da mistura para cada fungo analisado foi classificado como sinergismo, aditivo, indiferente ou antagonismo, através do cálculo da concentração inibitória fracionada (CIF). A CIF foi calculada somando as concentrações inibitórias fracionadas do gel de quitosana (CIF_A) e das nanopartículas de quitosana (CIF_B), segundo a equação abaixo.

$$\left. \begin{array}{l} \text{CIF}_A = \text{CIM}_A \text{ combinação} / \text{CIM}_A \text{ sozinho} \\ \text{CIF}_B = \text{CIM}_B \text{ combinação} / \text{CIM}_B \text{ sozinho} \end{array} \right\} \text{CIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B \quad (\text{Eq. 3})$$

Os resultados foram interpretados da seguinte forma: sinergismo (< 0,5), aditivo (0,5 – 1,0), indiferente (>1,0), antagonismo (> 4,0) (SCHELZ et al., 2006).

5.2.9 Efeito das substâncias teste sobre o crescimento radial fúngico

A análise da inibição da massa micelial fúngica foi determinada utilizando a técnica do envenenamento do substrato de crescimento (diluição em meio sólido) (OLIVEIRA et al., 2017). Um disco de ágar (5mm de diâmetro) contendo micélio dos fungos analisados foi retirado de uma placa da cultura fúngica com 7 dias de crescimento. Em seguida, esse disco foi transferido para o centro de uma placa de

petri contendo BDA suplementado com gel de quitosana ou nanopartículas de quitosana ou a mistura de gel e nanopartículas nas concentrações de CIM/2, CIM e 2CIM e a placa foi incubada a 25°C. Foi preparada também uma placa de petri sem a presença das substâncias teste para representar o controle e uma placa de petri contendo a solução de pH 5,6 (solução utilizada anteriormente para dissolver as substâncias teste) que não exibiu nenhum efeito inibitório no crescimento radial micelial dos fungos testados.

O crescimento micelial radial foi medido diariamente durante 7 dias ou até o completo crescimento das placas controle. O diâmetro (mm) micelial radial de cada fungo foi medido em duas direções perpendiculares para obtenção do diâmetro médio. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de inibição do crescimento micelial radial em relação ao ensaio controle ao final do período da análise.

5.2.10 Efeito das substâncias teste sobre a germinação dos esporos fúngicos

Alíquotas de 0,1ml de cada solução contendo diferentes concentrações das substâncias teste (CIM/2, CIM e 2CIM) foram misturadas com 0,1ml da suspensão de esporos fúngicos (10^6 esporos/ml) obtidos de cultura com 7 dias de crescimento em ágar Sabouraud a 25-28°C. Depois, 0,1ml do sistema foi colocado no centro de lâminas de vidro estéreis e posteriormente incubadas em câmara úmida a 25-28°C por 24 horas. Em seguida, cada lâmina foi fixada com o corante azul lactofenol e a análise da germinação dos esporos foi realizada através da microscopia óptica. Aproximadamente 200 esporos foram contados em cada lâmina.

A efetividade das substâncias teste em inibir a germinação dos esporos foi observada através da comparação entre o número de esporos germinados no ensaio controle (no qual as substâncias teste foram substituídas por meio Sabouraud líquido) e no ensaio com a presença das substâncias teste (FENG; ZENG, 2007).

5.2.11 Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica

Inicialmente, 10^6 esporos/ml dos fungos foram coletados e inoculados em caldo Sabouraud acrescido de gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e da mistura

de ambos na concentração sub-inibitória (CIM/2) e incubados a 25°C sob agitação orbital de 150rpm por 3 dias (RASOOLI; OWLIA, 2005; RASOOLI et al., 2006). As amostras controle cresceram no meio sem as substâncias-teste. Em seguida, as amostras foram coletadas e lavadas com solução salina (pH 7,2) por 3 vezes, 10 minutos cada e fixadas com glutaraldeído 2,5% com verde malaquita 0,05% em tampão fosfato 0,1M por 1h a 28°C. Após a fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato 0,1M por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram 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. Após o tratamento com HDMS, as amostras foram mantidas em dessecador por 24h 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 operando a 18Kv (BATTISTELLI et al., 2005; TYAGI; MALIK, 2010)

5.2.12 Preparação das coberturas comestíveis para aplicação nos morangos

As substâncias teste aplicadas para coberturas comestíveis nos frutos foram: gel de quitosana, nanopartículas de quitosana solubilizadas em glicerol e gel de quitosana enriquecido com nanopartículas. O gel de quitosana foi utilizado na maior concentração inibitória mínima determinada para os fungos analisados. Para a formação do gel de quitosana, quitosana foi diluída em ácido acético a 1% e o pH do meio corrigido para 6,0 com adição de NaOH 1%.

As nanopartículas foram liofilizadas e diluídas em água destilada contendo glicerol (2,5ml / 100ml) como plastificante para melhorar a força e a flexibilidade da solução de cobertura. Já as nanopartículas que foram adicionadas ao gel de quitosana foram diluídas no próprio gel após a correção do pH do meio. A concentração utilizada das nanopartículas e da mistura do gel com nanopartículas também foi a maior CIM determinada para os fungos analisados.

Todas as diluições foram realizadas através de agitação magnética a temperatura ambiente para completa dispersão das substâncias constituintes.

5.2.13 Efeito das coberturas sobre os parâmetros físico-químicos dos morangos

Os morangos três dias após a colheita foram previamente selecionados de acordo com sua coloração e ausência de danos mecânicos e infecções fúngicas visíveis. Em seguida, foram mergulhados em solução de hipoclorito (1%v/v) por 15 minutos, lavados com água potável e deixados por 2 horas à temperatura ambiente para secar. Depois, os frutos foram divididos em 5 grupos, um controle negativo (sem tratamento), um controle positivo (fruto recoberto com glicerol na concentração de 2,5ml/100ml), o grupo do gel de quitosana, outro das nanopartículas de quitosana e outro do gel de quitosana enriquecido com nanopartículas. Os morangos foram imersos por 1 minuto no gel de quitosana, nas nanopartículas de quitosana, no gel enriquecido com nanopartículas e no glicerol.

Após este procedimento, os frutos foram deixados em temperatura ambiente durante 30 minutos para a secagem das coberturas comestíveis aplicadas. Cada tratamento incluiu 40 morangos que foram acondicionados em bandejas de polietileno com tampa e um grupo foi armazenado a temperatura ambiente por 6 dias enquanto outro grupo foi armazenado sob refrigeração por 12 dias (GOL et al., 2013; OREGEL-ZAMUDIO et al., 2017; SHAHBAZI et al., 2018).

Durante esse período, os morangos foram analisados a cada 3 dias de armazenamento (0, 3, 6 dias – grupo não refrigerado e 0, 3, 6, 9, 12 dias – grupo refrigerado) quanto a umidade, sólidos solúveis, pH, índice de maturação e acidez titulável, de acordo com as normas preconizadas pela AOAC (2012), percentual de infecção visível (CASTELO BRANCO MELO et al., 2018), perda de peso (GOL et al., 2013), antocianina (LEES; FRANCIS, 1972) e evolução da cor (CIE 1986).

5.2.13.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado por aquecimento dos frutos em estufa à 70°C por 24 horas até obtenção de massa seca (AOAC, 2012 - Método 934.06). Os resultados foram expressos em porcentagem.

5.2.13.2 pH

A amostra da fruta foi diluída em água destilada e o pH foi determinado por pHmetro digital da marca Micronal B474 (AOAC, 2012 - Método 918.12).

5.2.13.3 Acidez titulável

A amostra da fruta triturada foi diluída em água destilada foi acrescida do indicador fenoftaleína. A acidez total titulável, foi determinada por meio da titulação com solução de NaOH 0,1N, seguida da determinação do ponto de viragem em pH 8,2 utilizando um pHmetro digital (MICRONAL B474) (AOAC, 2012 - Método 920.149). Os resultados foram expressos em percentual de ácido cítrico.

5.2.13.4 Sólidos solúveis

Determinados por meio da leitura em refratômetro de bancada modelo MODEllausJENA, com os resultados expressos em °Brix (Método 932.12).

5.2.13.5 Índice de maturação

O índice de maturação dos morangos foi calculado pela relação do teor de sólidos solúveis e acidez titulável, de acordo com o preconizado por Perdones et al. (2012).

5.2.13.6 Antocianinas

O total de antocianinas presentes nos morangos foi estimado pelo método de Lees e Francis (1972). Inicialmente, 1 grama da polpa da fruta foi misturado com 20ml do solvente extrator (95% etanol: 1,5N HCl, 85:15) e a mistura foi deixada a uma temperatura de 4°C durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas em balão volumétrico e protegidas da luz (coberta com papel alumínio). Os resíduos remanescentes foram lavados com o solvente extrator para a completa remoção dos pigmentos. O volume do balão foi completado para 100ml com o mesmo solvente e a absorbância foi medida a 535nm para a quantificação do teor de antocianina. Os resultados foram expressos em mg/100g.

5.2.13.7 Evolução da cor

A cor dos morangos foi medida em 3 diferentes posições da fruta com o Sistema CIELab (L^* , a^* e b^*), utilizando um colorímetro Minolta Modelo CR-300 (Osaka, Japão) de acordo com a Comissão Internacional de Iluminação (CIE, 1986). Antes da medição de cor, o colorímetro foi calibrado com uma placa de cerâmica branca padrão ($L^* = 96$; $a^* = 0,14$, $b^* = 1,63$). Para a medição foi usado com o iluminante D65 (luz do dia normal) a um ângulo de 10° (VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014b).

Foram medidos os L^* e as coordenadas a^* e b^* . O parâmetro L^* está associado à luminosidade das amostras, a coordenada cromática a^* está associada à dimensão verde-vermelho e a coordenada cromática b^* está associada à dimensão azul-amarelo. Através das medidas das coordenadas a^* e b^* foi possível calcular o valor do ângulo hue (h^*ab) e do croma (C^*ab).

5.2.13.8 Perda de peso

A perda de peso foi medida durante todo o intervalo de tempo de armazenamento dos morangos e calculada de acordo com o preconizado por Gol et al. (2013). Os morangos foram pesados no dia da aplicação das coberturas e a cada 3 dias, seguindo o mesmo período de tempo determinado para as demais análises físico-químicas. O resultado foi calculado com base no percentual de perda de peso em relação ao peso inicial das frutas (peso referente ao dia da aplicação da cobertura).

5.2.13.9 Percentual de infecção visível

O número de frutas com sinais de decomposição visíveis devido a infecções por microrganismos foi calculado através da divisão do número inicial de frutas pelo número de morangos em decomposição multiplicado por 100. Os resultados foram expressos em porcentagem, de acordo com Castelo Branco Melo et al. (2018).

5.2.14 Bioatividade das coberturas sobre o crescimento fúngico nos morangos

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. Em seguida, foram imersos na solução do inóculo fúngico (10^6 esporos/ml) sob agitação magnética, onde permaneceram por 1 minuto. Posteriormente, as frutas foram imersas durante 1 minuto nas soluções de coberturas comestíveis das substâncias teste. Os frutos foram colocados em um filtro de nylon para drenar o excesso de líquido das amostras e após a sua secagem foram acondicionadas em recipientes de polietileno com tampa.

A infecção fúngica causada nos morangos foi realizada separadamente para cada espécie fúngica teste (*Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*). Os frutos foram divididos em 5 grupos, dos quais 3 grupos foram imersos por 1 minuto nas soluções contendo as substâncias teste (gel de quitosana, nanopartículas de quitosana e gel enriquecido com nanopartículas), 1 grupo foi o controle negativo, sem cobertura e 1 grupo foi o controle positivo no qual o fruto foi recoberto por glicerol 0,5% (VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014b). Os 5 grupos foram armazenados a temperatura ambiente (25°C) e a temperatura de refrigeração (12°C), separadamente.

Cada tratamento incluiu 30 frutas que foram avaliadas com 6 e 12 dias em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente. Os frutos foram examinados pela presença de infecção fúngica visível e os resultados foram expressos em percentual de fruta infectada (FENG; ZENG, 2007; LIU et al., 2007).

5.2.15 Análise sensorial dos morangos

A pesquisa foi submetida ao Comitê de ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e obteve aprovação através do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número: 58937016.3.0000.5208 (Anexo 1). Todos os provadores voluntários foram informados sobre a análise e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), conforme a Resolução 466/12 da CONEP.

As frutas controle e as tratadas com coberturas comestíveis nas mesmas concentrações das análises físico-químicas foram submetidas a análise sensorial 3 dias após aplicação das coberturas e em armazenamento refrigerado. Cada avaliador

recebeu 5 frutas contendo os diferentes tratamentos e codificadas com números de 3 dígitos aleatórios.

Foram realizados os testes afetivos de aceitação, intenção de compra e teste de ordenação de preferência por 100 provadores não treinados selecionados de forma aleatória entre alunos e funcionários do Departamento de Nutrição da UFPE. Todos os testes foram feitos sobre condições controladas de luz e temperatura no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFPE.

Para o teste de aceitação foi utilizada uma escala hedônica de 9 pontos, sendo avaliados os atributos de aparência, cor, firmeza, avaliação global, sabor e aroma. Para o teste de intenção de compra foi empregada uma escala hedônica de 5 pontos (DUTCOSKY, 2013) (Apêndice B).

5.2.16 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 ($p < 0,05$) entre os tratamentos e foi utilizado o software Origin (versão 9.1). Os resultados foram expressos como a média estimada \pm desvio padrão. No planejamento fatorial, os dados obtidos foram avaliados pelo software Statistica (versão 8.0).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

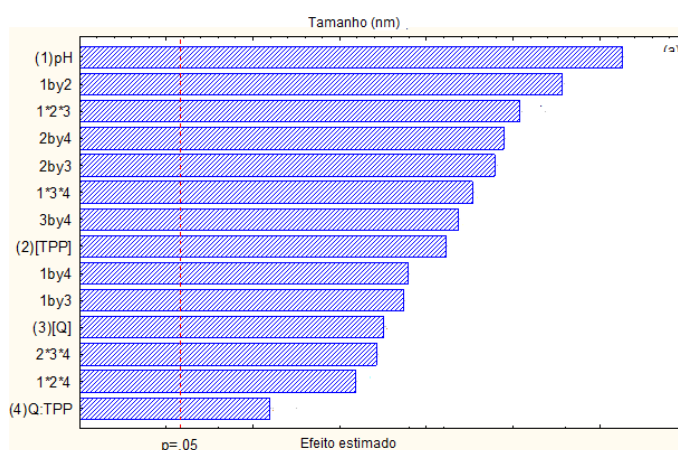
Os resultados do planejamento 2⁴ estão na Tabela 3 e foram publicados no livro do Biomicroworld 2018 (Apêndice C). As formulações de nanopartículas exibiram uma grande variação de tamanho (153,9 – 5841nm) (Tabela 3) e de acordo com o diagrama de Pareto (Figura 3) todos os parâmetros influenciaram significativamente ($p < 0.05$) nos resultados do DLS. Segundo Kiilll et al. (2016), a caracterização do tamanho das partículas é muito importante devido à forte influência que o tamanho tem em sua performance biológica.

Tabela 3 - Características das nanopartículas de quitosana fúngica produzidas no planejamento fatorial 2⁴.

Ensaio	Variável				Respostas		
	pH	[TPP]	[Q]	Q:TPP	DLS (nm) ± SD	PDI ± SD	PZ (mV) ± SD
01	(+) 5,0	(+) 1,0	(+) 1,5	(+) 6:1	1077 ± 117,5	0,737 ± 0,151	15,5 ± 27,0
02	(+) 5,0	(+) 1,0	(+) 1,5	(-) 2:1	787,9 ± 4,525	0,454 ± 0,042	12,3 ± 0,53
03	(+) 5,0	(+) 1,0	(-) 0,5	(+) 6:1	1414 ± 89,50	0,509 ± 0,028	18,8 ± 1,79
04	(+) 5,0	(+) 1,0	(-) 0,5	(-) 2:1	5841 ± 896,5	0,119 ± 0,094	11,5 ± 0,38
05	(+) 5,0	(-) 0,6	(+) 1,5	(+) 6:1	1404 ± 27,62	0,785 ± 0,129	13,7 ± 2,57
06	(+) 5,0	(-) 0,6	(+) 1,5	(-) 2:1	492,4 ± 11,27	0,512 ± 0,024	14,4 ± 0,84
07	(+) 5,0	(-) 0,6	(-) 0,5	(+) 6:1	385,9 ± 12,73	0,402 ± 0,045	18,7 ± 1,78
08	(+) 5,0	(-) 0,6	(-) 0,5	(-) 2:1	431,2 ± 149,3	0,312 ± 0,140	22,1 ± 2,19
09	(-) 3,0	(+) 1,0	(+) 1,5	(+) 6:1	312,4 ± 204,2	0,580 ± 0,016	28,5 ± 1,60
10	(-) 3,0	(+) 1,0	(+) 1,5	(-) 2:1	313,0 ± 5,463	0,306 ± 0,037	21,4 ± 0,65
11	(-) 3,0	(+) 1,0	(-) 0,5	(+) 6:1	182,4 ± 7,637	0,615 ± 0,000	19,9 ± 1,01
12	(-) 3,0	(+) 1,0	(-) 0,5	(-) 2:1	229,2 ± 72,70	0,322 ± 0,043	20,4 ± 0,66
13	(-) 3,0	(-) 0,6	(+) 1,5	(+) 6:1	821,0 ± 38,54	0,866 ± 0,040	34,0 ± 1,01
14	(-) 3,0	(-) 0,6	(+) 1,5	(-) 2:1	236,2 ± 2,810	0,418 ± 0,007	23,1 ± 0,40
15	(-) 3,0	(-) 0,6	(-) 0,5	(+) 6:1	925,0 ± 145,6	0,902 ± 0,087	28,2 ± 0,47
16	(-) 3,0	(-) 0,6	(-) 0,5	(-) 2:1	153,9 ± 32,74	0,586 ± 0,100	16,2 ± 0,70
17	(0) 4,0	(0) 0,8	(0) 1,0	(0) 4:1	231,3 ± 0,084	0,502 ± 0,007	19,5 ± 0,84
18	(0) 4,0	(0) 0,8	(0) 1,0	(0) 4:1	263,3 ± 4,809	0,426 ± 0,059	20,3 ± 1,20
19	(0) 4,0	(0) 0,8	(0) 1,0	(0) 4:1	267,8 ± 6,270	0,341 ± 0,008	21,5 ± 0,99
20	(0) 4,0	(0) 0,8	(0) 1,0	(0) 4:1	228,9 ± 8,262	0,433 ± 0,026	20,9 ± 1,27

Como pode ser observado na Figura 3, o valor do pH da solução de quitosana foi o parâmetro que mais influenciou no tamanho da partícula. As partículas que apresentaram tamanho micrométrico tiveram uma variável em comum, o pH = 5,0. De acordo com Pinho Neves et al. (2014), baixos valores de pH (< 4,5) favorecem a protonação dos grupos $-NH_2$ da cadeia polimérica da quitosana em $-NH_3^+$, o que promove a formação de partículas pequenas, ou seja, existem mais grupos aminos livres capazes de se ligar aos grupos fosfatos do TPP e, portanto, formar nanopartículas. Por isso, em pH 5,0 a cadeia de quitosana está menos protonada e apresenta mais dificuldade em ligar-se ao TPP, o que dificulta a formação de nanopartículas como observado nos ensaios 1, 3, 4 e 5.

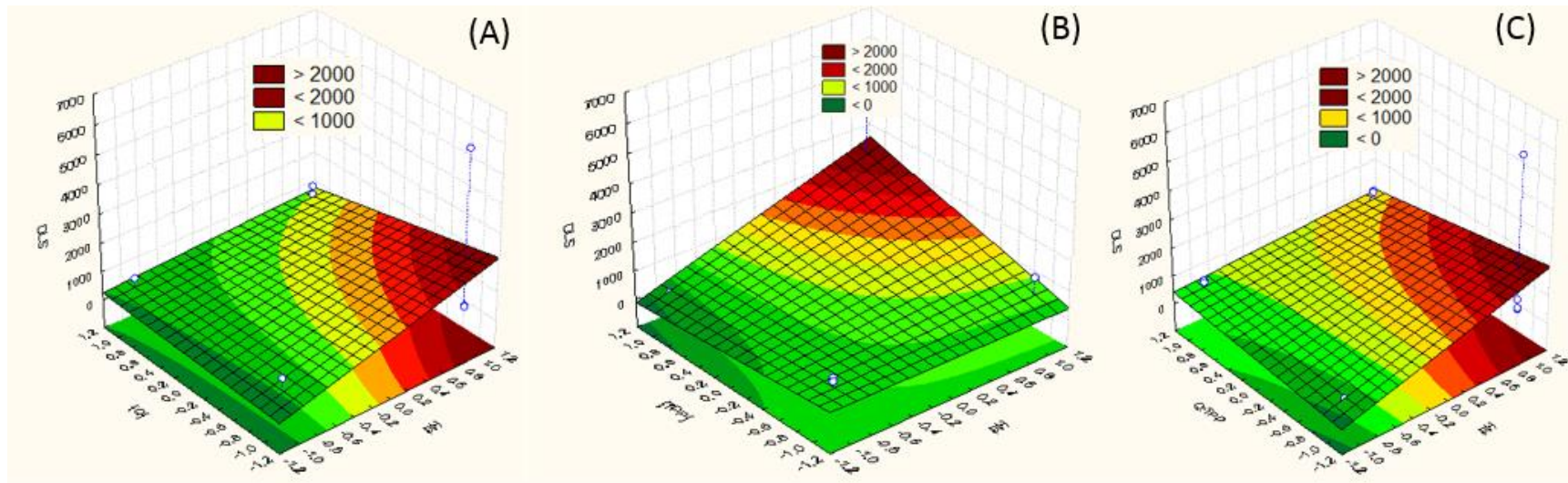
Figura 3 - Diagrama de Pareto relacionado ao tamanho das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^4 .



Além disso, o planejamento fatorial 2^4 também indicou que altas concentrações de TPP aumentam o tamanho das partículas, como pode ser observado na Figura 4. Segundo Bugnicourt et al. (2014), o excesso de moléculas de TPP favorece a ligação entre várias partículas ao mesmo tempo e conseqüentemente pode ocasionar o fenômeno de agregação, resultando na formação de grandes aglomerados de partículas.

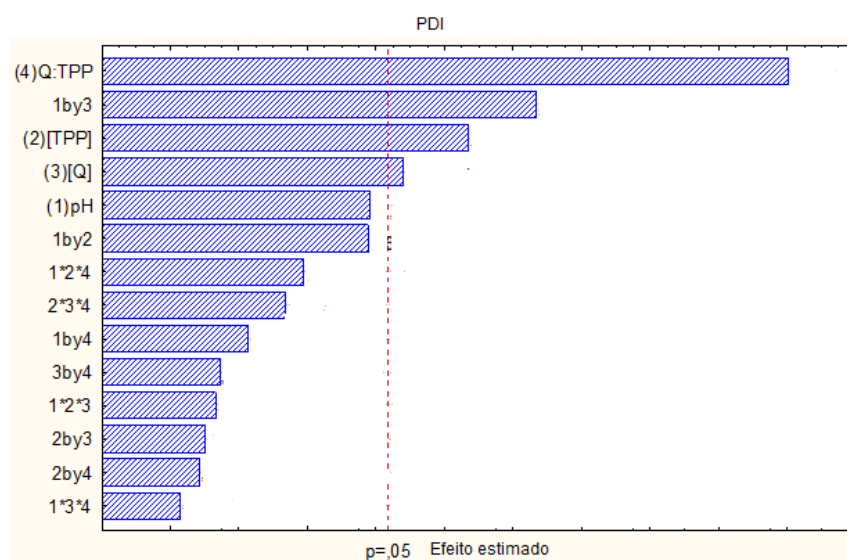
Comportamento oposto é observado ao analisar a influência da concentração de quitosana e da proporção Q:TPP no tamanho das partículas. Com o aumento dessas variáveis há uma diminuição no tamanho das partículas formadas, ou seja, é necessária a utilização de elevadas concentrações de quitosana para obtenção de partículas pequenas.

Figura 4 - Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana (A), da concentração de TPP (B) e da proporção Q:TPP (C) em diferentes valores de pH no tamanho das partículas (DLS).



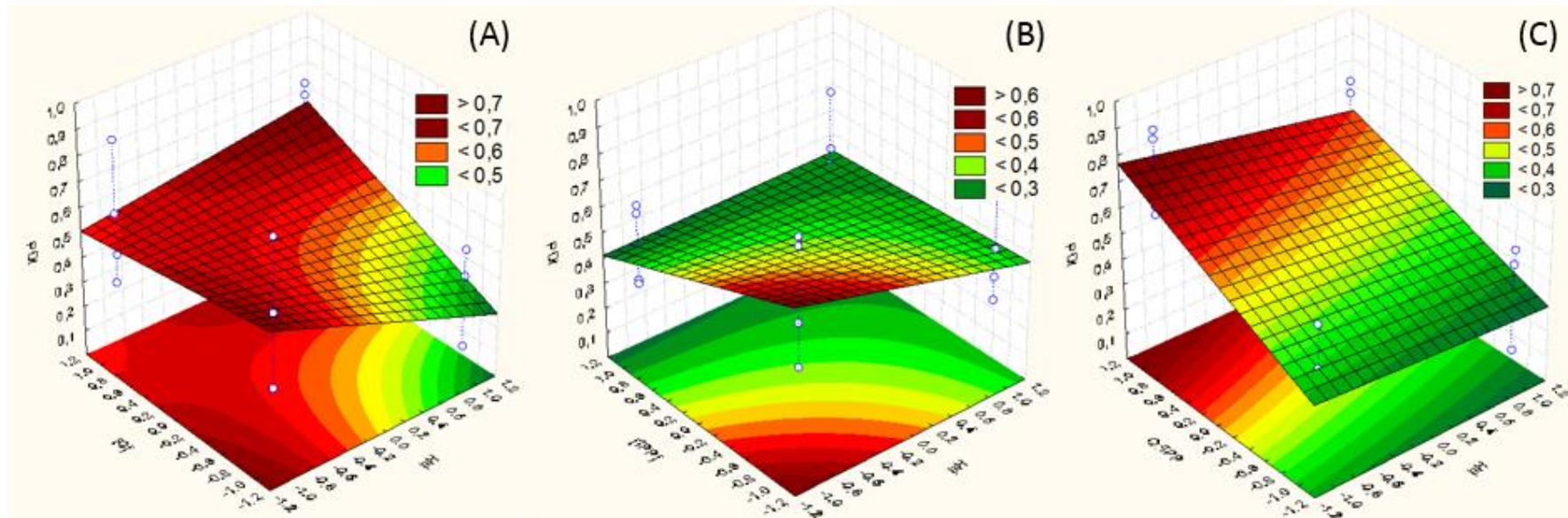
Os valores de PDI são utilizados para estimar a uniformidade do tamanho das partículas em suspensão (ING et al., 2012). Baixos valores de PDI (< 0.1) correspondem a formação de uma amostra de partículas monodispersas. De acordo com os resultados do planejamento fatorial 2^4 , os valores de PDI foram intensamente afetados pela concentração de quitosana e pela proporção Q:TPP (Figura 5). Quando houve o aumento dessas variáveis, os valores de PDI também aumentaram. Em altas concentrações de quitosana e da proporção Q:TPP (v/v), o equilíbrio entre as ligações de hidrogênio e as repulsões eletrostática entre algumas partículas pode ser quebrado levando a formação de agregados e comprometendo a dispersividade da suspensão (BUGNICOURT et al., 2014).

Figura 5 - Diagrama de Pareto relacionado ao PDI das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^4 .



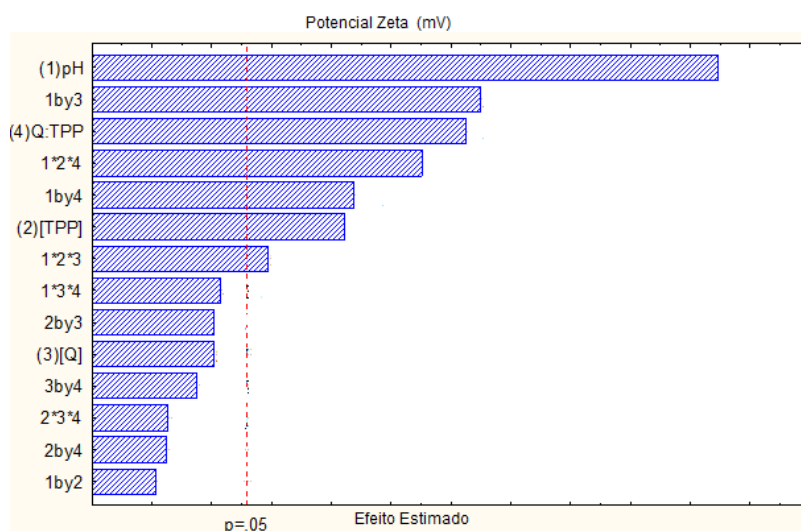
A formação desses agregados pode ser evitada com o aumento da concentração de TPP. O gráfico de superfície de resposta mostra que a concentração de TPP tem uma alta influência nos valores de PDI (Figura 6). Quando a concentração de TPP aumenta, os valores de PDI diminuem significativamente ($p < 0,05$).

Figura 6 - Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana (A), da concentração de TPP (B) e da proporção Q:TPP (C) em diferentes valores de pH nos valores de PDI.



Todas as partículas formadas com base no planejamento fatorial 2^4 apresentaram carga superficial positiva e isso se deve aos grupos aminos presentes na cadeia de quitosana. Para o potencial zeta, foi observado através do diagrama de Pareto, que apenas a concentração de quitosana não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 7).

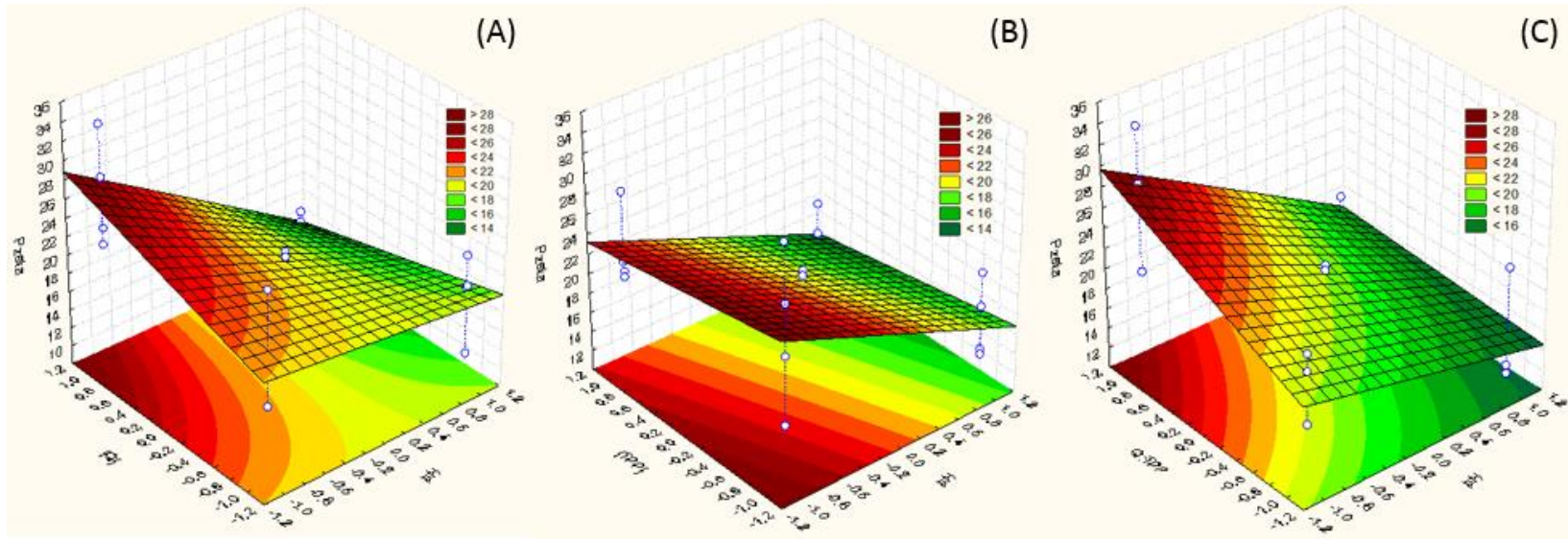
Figura 7 - Diagrama de Pareto relacionado ao potencial zeta das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^4 .



Os resultados também mostraram que o aumento do pH e da concentração de TPP diminuíram os valores do potencial zeta. Esse comportamento já é esperado porque, nessa situação os grupos aminos da molécula de quitosana diminuem e, portanto há uma menor quantidade de cargas na superfície da partícula formada (BUGNICOURT et al., 2014). Os resultados encontrados estão de acordo com os relatados por Rampino et al. (2013) e Fan et al. (2012).

No entanto, aumentando a proporção Q:TPP, indiretamente, aumenta a concentração de quitosana e conseqüentemente aumenta o potencial zeta (Figura 8). Apesar disso, no planejamento fatorial 2^4 apenas um experimento apresentou potencial zeta $>+30\text{mV}$, no entanto essa formulação tinha uma média de tamanho elevada (821nm).

Figura 8 - Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana (A), da concentração de TPP (B) e da proporção Q:TPP (C) em diferentes valores de pH nos valores do potencial zeta.



De acordo com Fabregas et al. (2013), nanopartículas com carga superficial acima de +30mV são mais estáveis, o que previne sua agregação depois da síntese. O tamanho e o potencial zeta das partículas são importantes propriedades que influenciam na atividade antifúngica das nanopartículas de quitosana. Nanopartículas com diferentes tamanhos e potencial zeta podem apresentar diferentes mecanismos de inibição contra fungos (ING et al., 2012).

Portanto, como não foi possível no planejamento fatorial 2^4 obter partículas de pequeno tamanho e potencial zeta $> +30\text{mV}$, um novo planejamento fatorial 2^2 foi realizado variando apenas as concentrações de quitosana e TPP e mantendo o valor de $\text{pH} = 4$ e a proporção $\text{Q:TPP} = 4:1$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial (2^2).

Parâmetro	Nível -1	Ponto Central	Nível +1
[Q]	2,0	2,25	2,5
[TPP]	0,8	0,9	1,0

Os resultados do planejamento fatorial 2^2 estão descritos na tabela 5. Esse segundo planejamento exibiu menor variação de tamanho entre as partículas produzidas em relação ao primeiro planejamento fatorial. Tanto a concentração de quitosana como a concentração de TPP aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os valores de DLS, ou seja, com o aumento dessas variáveis o tamanho das partículas aumentaram (Figura 9).

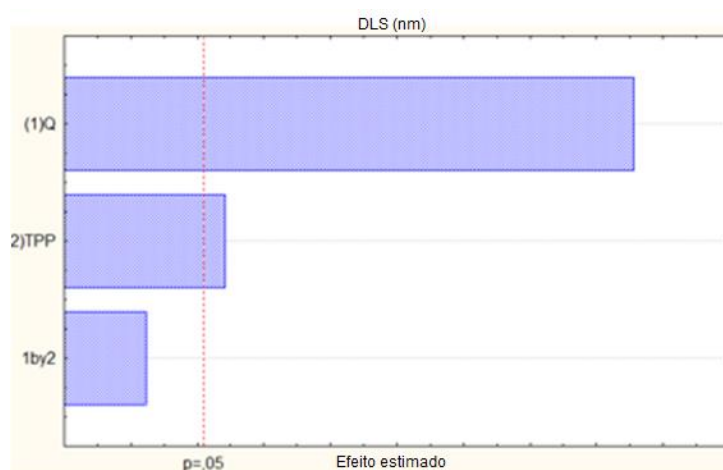
De acordo com vários autores, o tamanho das partículas aumenta com o aumento da concentração de quitosana porque as cadeias poliméricas aproximam-se uma das outras (uma elevada concentração de quitosana envolve um elevado número de cadeias poliméricas em apenas uma partícula) (FAN et al., 2012; RAMPINO et al., 2013; BUGNICOURT et al., 2014). Além disso, segundo Kiill et al. (2016), a quitosana em grande quantidade pode não solubilizar-se completamente favorecendo um aumento no tamanho das partículas ou até mesmo formando agregados. Portanto, a concentração de

quitosana é um parâmetro decisivo na síntese de nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica. Ela governa formação de nanopartículas individualizadas ou de grandes agregados (BUGNICOURT et al., 2014).

Tabela 5 - Características das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2².

Ensaio	Variáveis		Respostas		
	[Q] (mg/mL)	[TPP] (mg/mL)	DLS (nm) ± SD	PDI ± SD	PZ (mV) ± SD
01	(+) 2,5	(-) 0,8	462,2 ± 1,92	0,550 ± 0,002	25,3 ± 1,30
02	(+) 2,5	(+) 1,0	487,3 ± 2,40	0,491 ± 0,010	25,6 ± 0,40
03	(-) 2,0	(+) 1,0	331,1 ± 5,13	0,377 ± 0,008	34,0 ± 0,83
04	(-) 2,0	(-) 0,8	298,7 ± 5,25	0,593 ± 0,003	31,0 ± 1,00
05	(0) 2,25	(0) 0,9	433,6 ± 5,05	0,554 ± 0,007	18,7 ± 0,70
06	(0) 2,25	(0) 0,9	434,1 ± 3,45	0,555 ± 0,004	18,4 ± 0,56
07	(0) 2,25	(0) 0,9	433,5 ± 2,40	0,555 ± 0,005	18,5 ± 0,70

Figura 9 - Diagrama de Pareto relacionado ao tamanho das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2².



As concentrações de quitosana e TPP também influenciaram significativamente ($p < 0,05$) nos valores de PDI (Figura 10). Neste caso a concentração de TPP deve ser alta para obtenção de partículas com baixos valores de dispersão, como pode ser visto nos ensaios 2 e 3 da Tabela 5. No entanto, o oposto é observado para a concentração de quitosana. É necessário

que esta seja baixa (aprox. 2mg/ml) para obtenção de partículas com baixo PDI, o que novamente pode ser observado no ensaio 3.

Segundo o gráfico de pareto (Figura 11), o único fator que influencia significativamente os valores de potencial zeta das partículas produzidas no segundo planejamento fatorial foi a concentração de quitosana. Apenas as amostras 3 e 4 deste segundo planejamento fatorial apresentaram resultados $> +30\text{mV}$. É possível verificar que essas duas amostras foram produzidas com a mesma concentração de quitosana (2mg/ml). Este resultado está de acordo com os gráficos de superfície de resposta (Figura 12) que indicam que o aumento da concentração de quitosana para valores acima de 2mg/ml diminuem os valores do potencial zeta das nanopartículas.

Figura 10 - Diagrama de Pareto relacionado ao PDI das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^2 .

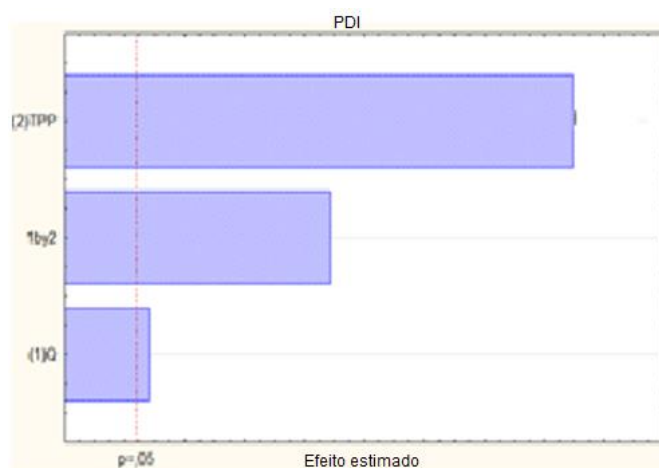


Figura 11 - Diagrama de Pareto relacionado ao potencial zeta das nanopartículas produzidas no planejamento fatorial 2^2 .

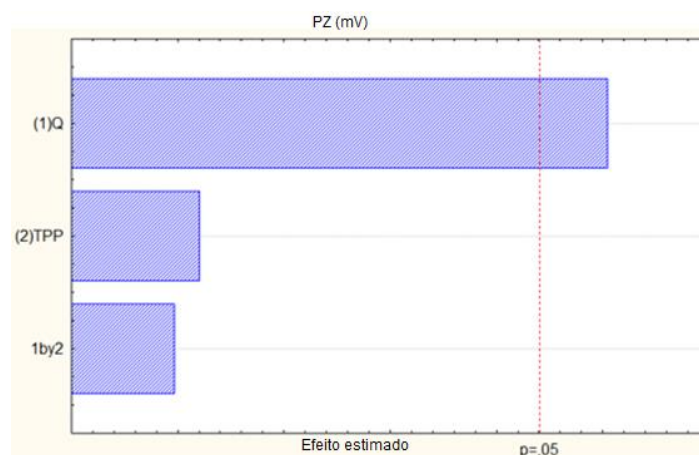
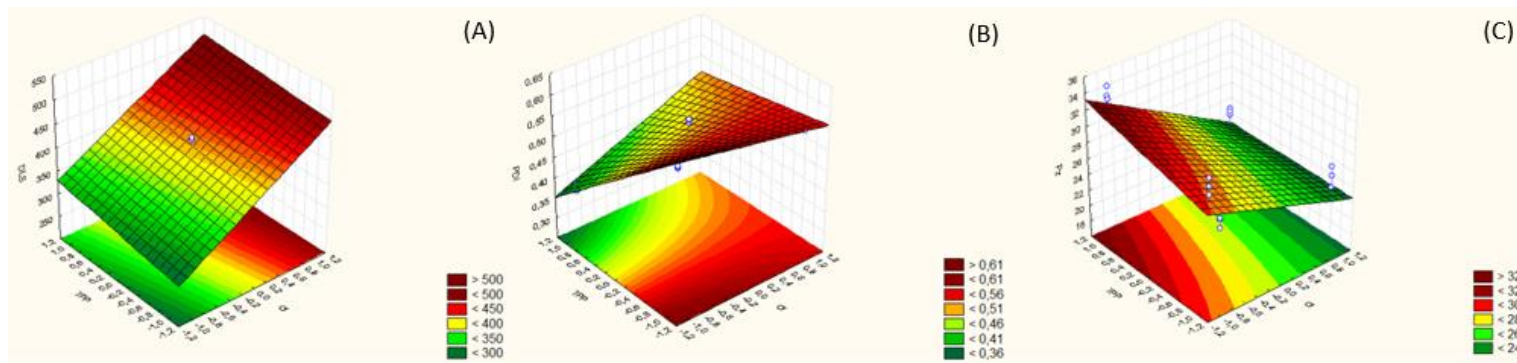


Figura 12 - Gráficos de superfície de resposta do efeito da concentração da quitosana e TPP nos valores de DLS (A), PDI (B) e potencial zeta (C).



Com base nesses resultados discutidos acima, a melhor concentração de quitosana para produção de nanopartículas de quitosana fúngica com potencial zeta $> 30\text{mV}$ é 2mg/ml . Além disso, para o potencial zeta a concentração de TPP não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto as nanopartículas produzidas com TPP na concentração de 1mg/ml apresentaram alto potencial zeta e baixo PDI quando comparada com as partículas sintetizadas com TPP na concentração de $0,8\text{mg/ml}$.

As amostras 3 e 4 foram as que apresentaram as menores médias de tamanho, contudo a amostra 4 exibiu um PDI elevado ($0,593$). Então, baseado nos resultados obtidos no primeiro (2^4) e segundo (2^2) planejamento fatorial, foi verificado que as melhores condições para obtenção de nanopartículas de quitosana fúngica monodispersas e com potencial zeta acima de $+30\text{mV}$ foi em $\text{pH} = 4,0$ e $\text{Q:TPP} = 4:1$ (definidos pelo planejamento fatorial 2^4), $\text{Q} = 2\text{mg/ml}$ e $\text{TPP} = 1\text{mg/ml}$ (definidos pelo planejamento fatorial 2^2).

Caracterização da nanopartícula de quitosana

Medidas de tamanho por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

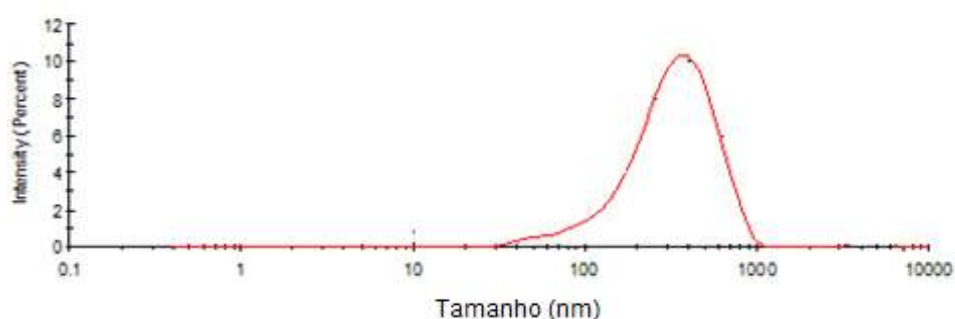
Entre as determinações fundamentais na compreensão dos materiais nanométricos está o tamanho médio das nanopartículas. É através de um tamanho nanométrico que se obtém uma grande área superficial e com isso propriedades diferenciadas em relação ao material em escala macro (BRUST; KIELY, 2002; TOLEDO, 2015).

A medição de tamanho das partículas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz é utilizada para mensurar o tamanho de partículas na região nanométrica, dispersas em um líquido. A técnica mede o movimento Browniano que é definido como movimento aleatório das partículas devido ao bombardeamento por moléculas de solvente que as rodeiam, ou seja, quanto maior a partícula mais lento será o movimento Browniano (JOHNSON; GABRIEL, 1995; TOLEDO, 2015).

O perfil de distribuição de tamanho mostrado na Figura 13 representa o diâmetro médio da nanopartícula de quitosana que está situado em 331,1nm ($\pm 7,21$). Com base na literatura esse tamanho favorece a atuação dessas partículas como agente anti-fúngico, já que Saharan et al. (2015) e Xing et al. (2016) produziram partículas com diâmetros de 374,3nm e 296,96nm, respectivamente para aplicação contra fungos fitopagênicos. Isso se deve a grande área superficial dessas partículas que permitirá a sua fácil fixação em maior número de fungos, o que contribuirá para sua ação antifúngica em coberturas comestíveis (MUBARAKALI et al., 2018).

Pilon et al. (2014) também produziu nanopartículas de quitosana para aplicação em frutas, neste caso em maçãs, e obteve um diâmetro médio de 300nm e resultados favoráveis da aplicação dessas partículas na conservação das maçãs. Portanto, o tamanho observado para as nanopartículas de quitosana fúngica contribuem não só para a sua ação antifúngica, mas também é importante para sua ação na manutenção da qualidade da fruta como cobertura comestível. Além disso, essas partículas não serão absorvidas pelo epitélio intestinal de humanos que venham a ingerir na cobertura comestível, já que segundo Severino et al. (2011), partículas >300nm são seguras em relação a adsorção pelo epitélio intestinal.

Figura 13 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana fúngica



Através da Figura 13, pode-se observar também que há apenas um pico, o que significa que existe apenas uma população de nanopartículas na amostra analisada. Esta uniformidade da amostra pode ser constatada através do baixo PDI de 0,377 ($\pm 0,026$) encontrado.

O PDI é um parâmetro indicativo da largura do pico correspondente ao tamanho da partícula e, portanto, um alto valor de PDI (~ 1) demonstra a existência de populações de partículas com diferentes tamanhos, o que pode significar a formação de agregados e ausência de uniformidade da amostra (HANAOR et al., 2012; O'CALLAGHAN et al., 2016). Desta forma, as partículas produzidas na presente pesquisa podem ser consideradas como nanopartículas poliméricas de comportamento monodisperso, devido a sua distribuição de tamanho e ao seu baixo PDI.

De acordo com Paomephan et al. (2018), a utilização de quitosana de baixo peso molecular favorece a formação de partículas pequenas e que apresentam uma uniformidade de tamanho. Isso pode ser constatado na presente pesquisa em que além de ser utilizada uma quitosana fúngica de baixo peso molecular, foi realizada também um prévio planejamento fatorial para otimizar a produção de uma nanopartícula com o tamanho desejado.

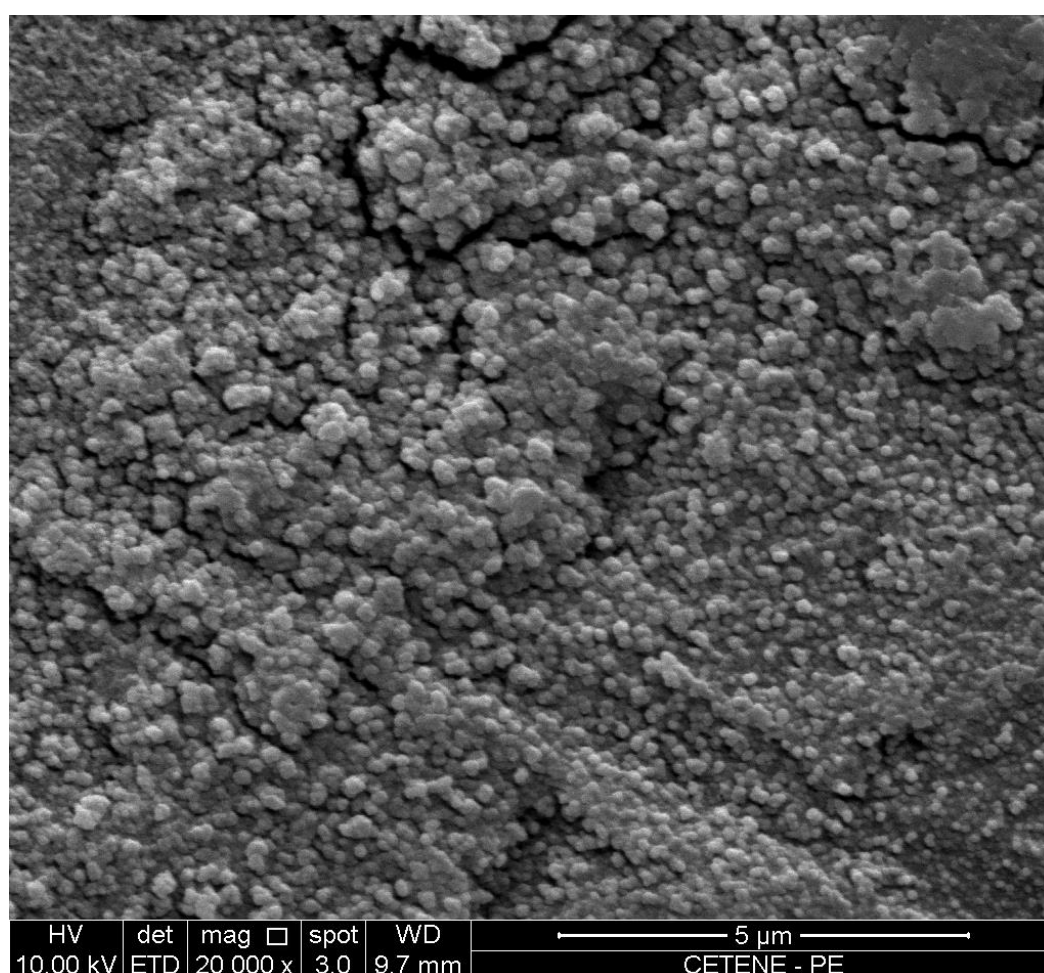
O tamanho é um dos fatores mais significativos quando relacionado a aplicabilidade dos materiais nanoestruturados. A uniformidade de tamanho encontrada na amostra favorece a atividade antifúngica das nanopartículas de quitosana (SAHARAN et al., 2013). Além disso, sabe-se que partículas com tamanho menor que 80nm permite sua penetração em tecidos através de finos capilares, o que viabiliza sua utilização na área farmacêutica (GAN et al., 2005). Porém, na indústria de alimentos essa capacidade de penetração das partículas não é desejada. Portanto, as nanopartículas produzidas para aplicação como cobertura comestível em morangos apresentam um tamanho que não é favorável a penetração celular, mas que é capaz de apresentar uma importante atividade antifúngica e conservadora.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica pela MEV das nanopartículas de quitosana mostraram nanoestruturas compactas, homogêneas, com morfologia esférica e formação de agregados entre as partículas (Figura 14). Segundo Fan et al. (2012), essa formação de agregados é causada pelas ligações de hidrogênio entre as nanopartículas que se formam durante o processo de secagem da amostra para análise pela MEV.

Resultado semelhante também foi encontrado por Hosseini et al. (2016), que mesmo tendo produzido nanopartículas menores (40-80nm) que a do presente estudo ainda assim observou a formação de agregados em sua amostra analisada pela MEV. Isso demonstra que os agregados que estão presentes na imagem microscópica estão relacionados muito mais ao processo de preparação (secagem) da amostra do que ao tamanho das partículas ou aos parâmetros utilizados na metodologia de sua produção.

Figura 14 - Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de quitosana



Percebe-se uma diminuição de tamanho das partículas observadas na MEV quando comparadas com a média de tamanho analisada pela técnica do DLS. Isso ocorre porque na análise do DLS as partículas encontram-se em suspensão (SCHAFFAZICK et al., 2003; KIILLI et al., 2017), além disso as partículas agregadas observadas na MEV são percebidas pelo DLS como uma única partícula o que faz com que o tamanho médio constatado pelo DLS aumente (SOUZA et al., 2016).

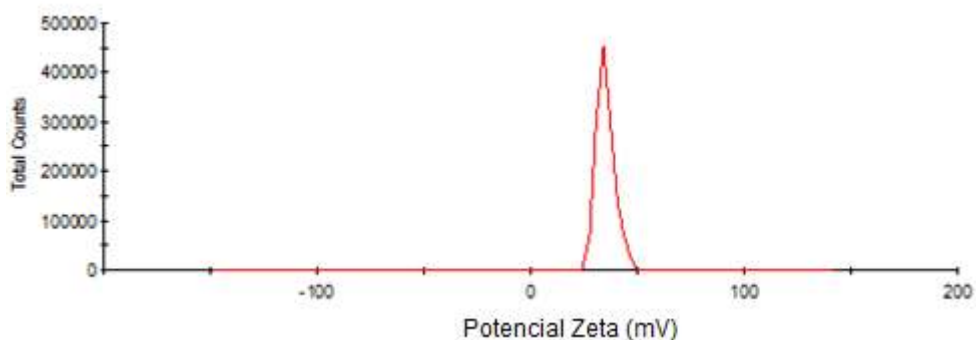
Pinho Neves et al. (2014), Hashad et al. (2016) e Rampino et al. (2013) também produziram nanopartículas de quitosana através do método de gelificação iônica e da mesma forma obtiveram nanopartículas homogêneas e esféricas, diferenciando das partículas produzidas em nosso estudo nos tamanhos observados, já que as concentrações de quitosana e TPP dos trabalhos citados variaram.

Potencial Zeta

O potencial zeta mede a magnitude da repulsão ou atração eletrostática das cargas entre partículas, sendo um parâmetro fundamental que afeta a estabilidade de uma suspensão coloidal (MALVERN 2014). A nanopartícula de quitosana produzida no presente estudo apresentou potencial zeta de +34mV, como pode ser observado na figura 15. Este resultado mostra que essa nanopartícula é estável, pois segundo Ing et al. (2012), nanopartículas de quitosana com carga superficial maior que +30mV são mais estáveis e este valor de referência é suficiente para prevenir que ocorra a agregação das partículas. Além disso, esse potencial demonstra também uma alta afinidade das partículas por membranas biológicas em meio aquoso (SAHARAN et al., 2013).

Valores altos de potencial zeta (>30mV) para nanopartículas de quitosana mostram que existem forças repulsivas no sistema coloidal, as quais são capazes de minimizar a atração entre as partículas e, portanto, evitar agregações. As cargas responsáveis pela produção dessas forças repulsivas são provenientes da cadeia polimérica de quitosana em que há grupos aminos livres (FAN et al., 2012).

Figura 15 - Potencial zeta da nanopartícula de quitosana fúngica.



A carga superficial final das nanopartículas de quitosana está relacionada a concentração de quitosana e de TPP utilizados para a produção das partículas (HASHAD et al., 2016). Durante o processo de gelificação iônica para a síntese das nanopartículas, as cargas negativas do TPP ligam-se as cargas positivas da quitosana. Os grupos aminos livres que não foram ligados ao TPP são os responsáveis pela carga superficial das partículas. Por isso a necessidade de encontrar-se um equilíbrio, obtido através da realização prévia do planejamento fatorial, entre as concentrações de quitosana e TPP para que ao mesmo tempo em que se formem partículas, mantenha-se também um elevado potencial destas partículas (CALVO et al., 1997).

Vários trabalhos tem relatado a presença de um potencial zeta positivo em nanopartículas de quitosana, estando de acordo com o resultado encontrado na presente pesquisa (JONASSEN et al., 2012; MOHAMMADI et al., 2015; CASTELO BRANCO MELO et al., 2018; MUBARAKALI et al., 2018). O potencial zeta encontrado de +34mV é especialmente semelhante ao relatado por Ing et al. (2012). Estes autores, também produziu nanopartículas com quitosana de baixo peso molecular para utilização contra fungos e encontrou um potencial zeta de +38mV. Segundo Ing et al. (2012), essas cargas superficiais das nanopartículas contribuem para seu efeito antifúngico, já que as cargas positivas das partículas interagem com as cargas negativas da parede celular microbiana o que leva a alterações na permeabilidade da membrana e conseqüentemente vazamento e morte celular. Portanto, o potencial zeta da nanopartícula produzida no presente estudo está adequando tanto do ponto de

vista da estabilidade coloidal da suspensão quanto da sua capacidade de favorecer a ação antifúngica das partículas.

Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

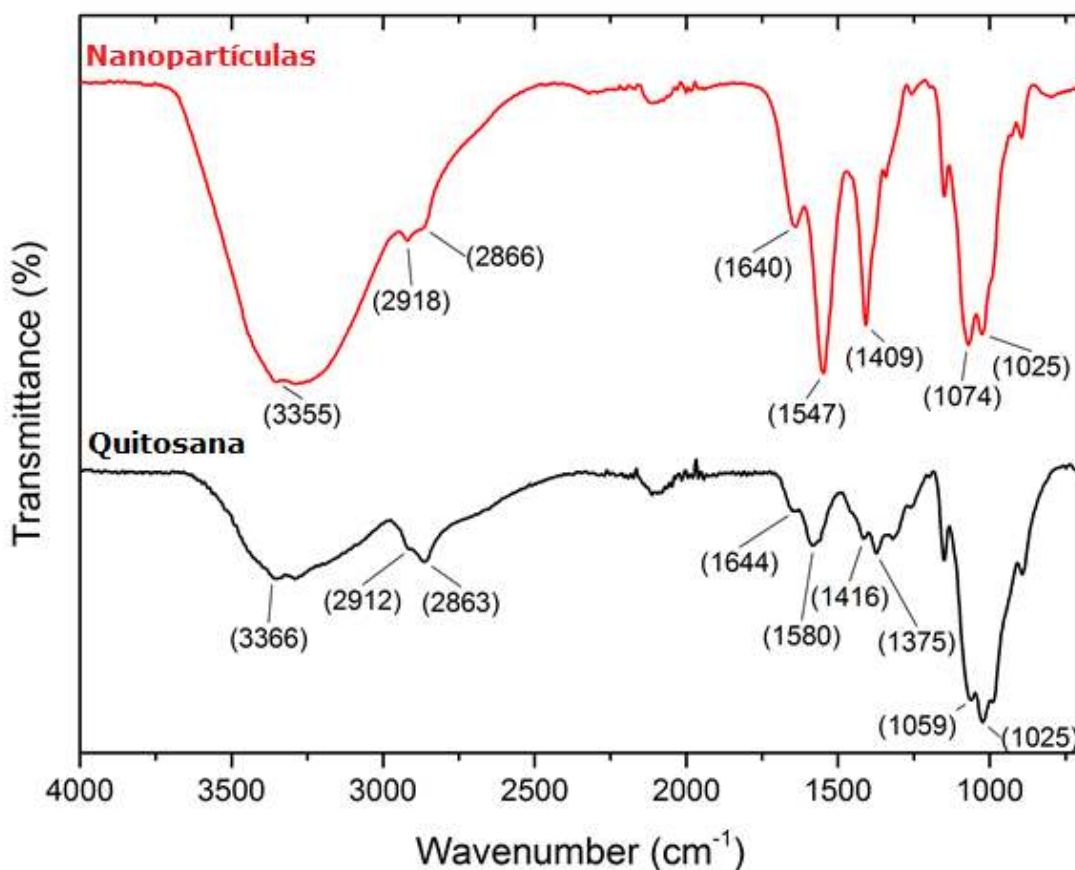
O espectro do infravermelho mostra a interação entre os átomos das moléculas através da formação de bandas, caracterizando a estrutura química da substância analisada (MILIOLI, 2011). Na Figura 16 são apresentados os espectros de infravermelho da quitosana e das nanopartículas de quitosana.

Foi observado que esses dois espectros diferem entre si, mostrando a formação das nanopartículas através da molécula inicial da quitosana. No espectro da quitosana, o pico 3366cm^{-1} , que corresponde ao estiramento O-H, é mais largo e mais plano do que o mesmo pico no espectro das nanopartículas (3355 cm^{-1}). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Hashad et al. (2016), Thandapani et al. (2017) e Pinho Neves et al. (2014) e sugere a redução das ligações de hidrogênio que ocorre devido a estrutura mais aberta resultante da interligação da quitosana com o TPP para formação das nanopartículas.

A banda 2863cm^{-1} no espectro da quitosana é atribuída ao estiramento C-H alifático da molécula. Para as nanopartículas de quitosana essa banda corresponde ao valor de 2866 cm^{-1} . Uma outra alteração no espectro que indica a formação das nanopartículas de quitosana é a mudança das bandas a 1644 e 1580 cm^{-1} da quitosana para 1640 e 1547 cm^{-1} no espectro das nanopartículas, representando, segundo Pinho Neves et al. (2014), os grupos CONH_2 e NH_2 , respectivamente.

O deslocamento dessas duas bandas também foi observado por outros autores (HU et al., 2008; PINHO NEVES et al., 2014; CASTELO BRANCO MELO et al., 2018) e sugere a ocorrência de interação entre as cargas positivas dos grupos aminos da molécula de quitosana e as cargas negativas dos grupos fosfatos da molécula de TPP. Além disso a banda 1644 cm^{-1} , no espectro da quitosana, corresponde ao estiramento C=O segundo Thandapani et al. (2017), já que a quitosana utilizada na presente pesquisa é cerca de 86% desacetilada.

Figura 16 - FTIR da quitosana e das nanopartículas de quitosana.



Apesar das diferenças, os dois espectros apresentam uma banda em comum a 1025 cm^{-1} que representa o estiramento C-O do grupo alcóolico primário. Perto desta banda está a banda 1059 cm^{-1} da quitosana e 1074 cm^{-1} das nanopartículas que correspondem ao estiramento C-N do grupo N-acetilglucosamina, segundo Castelo Branco Melo et al. (2018).

Todos os dados dos espectros analisados estão de acordo com os encontrados na literatura quando se comparam os espectros de infravermelho da quitosana e das nanopartículas (PINHO NEVES et al., 2014; SHAJAHAN et al., 2017; THANDAPANI et al., 2017; CASTELO BRANCO MELO et al., 2018). Além disso, como foi relatado acima, o espectro das nanopartículas preparadas na pesquisa mostrou os picos característicos da molécula de quitosana e as interações químicas na molécula do polímero com o TPP que ocorreram para a formação das partículas, confirmando

desta forma, o sucesso da metodologia empregada na formação de nanopartículas de quitosana fúngica.

Estabilidade coloidal das nanopartículas de quitosana

A Figura 17 mostra as modificações que ocorreram nos parâmetros analisados das nanopartículas de quitosana durante os dois meses de armazenamento. Foi observado que todas as amostras armazenadas em diferentes condições de temperatura apresentaram aumento de tamanho médio das partículas, o que também foi relatado por Tsai et al. (2011) e Rampino et al. (2013). No entanto, Fan et al. (2012) não observou mudanças significativas no tamanho das partículas após 20 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Mas, o período de armazenamento das nanopartículas desse autor foi bem inferior ao período analisado na presente pesquisa.

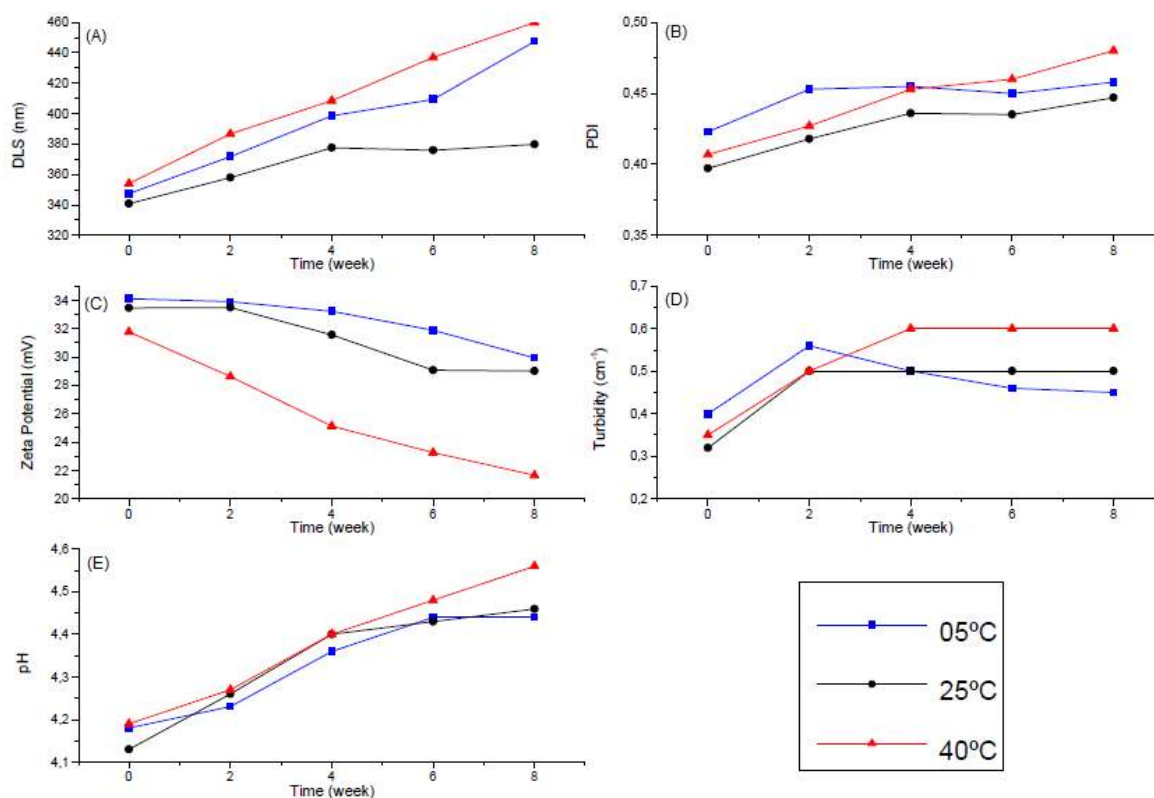
De acordo com López-León et al. (2005), a modificação no tamanho das partículas durante seu armazenamento deve-se a diferentes motivos, como por exemplo o fenômeno de agregação que proporciona um rearranjo mais eficiente da suspensão de partículas. A interação das cadeias poliméricas livres da quitosana com as nanopartículas proporciona uma reorganização das ligações intermoleculares e inchaço das partículas devido a presença do TPP que gera um influxo de água por osmose.

As amostras armazenadas a 40°C foram as que tiveram o maior aumento de tamanho que passou de 354nm para 460nm. Isso pode ser explicado pela formação de grandes agregados nessa temperatura de armazenamento. Al-Manasir et al. (2009) explicou que em altas temperaturas, as ligações de hidrogênio com a água são gradualmente desfeitas e, portanto, a hidrofobicidade do polímero é aumentada com o empacotamento dos segmentos hidrofóbicos, levando a um progressivo colapso da cadeia.

Em temperaturas acima de 32°C, a aderência hidrofóbica das nanopartículas de quitosana aumenta promovendo a formação de grandes agregados (López-León et al., 2005). Além disso, Jonassen et al. (2012), também relatou que o aumento na temperatura diminui a viscosidade da quitosana da suspensão favorecendo o movimento Browniano das nanopartículas e aumentando a frequência de colisões

entre as partículas e com isso uma permanente ligação entre elas. Portanto, todos esses fenômenos são responsáveis pela formação de agregados.

Figura 17 - Tamanho médio (a), PDI (b), potencial zeta (c), turbidez (d) e pH (e) das nanopartículas de quitosana fúngica armazenadas a 5, 25 e 40°C por 2 meses.



Segundo Morris et al. (2011), o tamanho das partículas é o fator mais importante para determinar sua estabilidade, mas não é o único. O aumento dos valores de PDI durante o período de armazenamento das amostras em diferentes temperaturas (Figura 17b) reflete também a formação de agregados e a perda de esfericidade das partículas. Novamente as amostras armazenadas a 40°C apresentaram um maior valor de PDI. Esse mesmo comportamento pode ser observado na figura 17e para os valores de pH das partículas armazenadas a 40°C.

Em valores de pH mais elevados há modificações nas cargas superficiais das partículas, com diminuição na quantidade de cargas positivas. Isso promove a formação de agregados já que o pK_a da quitosana é próximo a um pH neutro e com isso as partículas tendem a espontaneamente unirem-se em pH ligeiramente básicos,

nos quais elas encontram-se completamente sem cargas (LÓPEZ-LEÓN et al., 2005). Pode ocorrer também durante o período de armazenamento das nanopartículas em suspensão, uma ausência de forças repulsivas entre as partículas e isso faz com que o sistema perca sua estabilidade coloidal e comece a agregar (LÓPEZ-LEÓN et al., 2005). Portanto, a temperatura de 40°C favorece o aumento do pH da suspensão coloidal de nanopartículas o que parece induzir uma desestabilização desse sistema.

A agregação representa um problema recorrente na formação de nanopartículas. Normalmente ela ocorre devido a colisão e adesão das partículas durante seu armazenamento. As nanopartículas aglomeram-se umas com as outras para reduzirem sua área superficial e então reduzir a energia superficial livre (Tsai et al., 2011).

Isso mostra que baixas temperaturas são importantes para aumentar a estabilidade das partículas (Fan et al., 2012). A formação de aglomerados de nanopartículas pode ocorrer em qualquer temperatura, no entanto em baixas temperaturas é esperado um aumento da estabilidade em longo prazo das partículas, como pode ser observado nas amostras armazenadas em 5 e 25°C.

Outro importante parâmetro para avaliar a formação de agregados é a modificação da turbidez das amostras durante o tempo. Essa turbidez é afetada por vários fatores, entre eles o tamanho das partículas. A agregação das cadeias poliméricas ou das nanopartículas levam a formação de grandes partículas e com isso um aumento da turbidez da suspensão (Jonassen et al., 2012).

No início, a turbidez das amostras armazenadas a 25 e 40°C aumentou e depois de duas e quatro semanas de armazenamento, respectivamente, mantiveram-se constante (Figura 17d). Já nas amostras armazenadas a 5°C, a turbidez aumentou durante as duas primeiras semanas e depois diminuiu. Isso significa que a formação de agregados ocorreu mais intensamente nas primeiras 2 ou 4 semanas de armazenamento e depois deste período a agregação continua ocorrendo (como pode ser visto nos resultados de DLS e PDI), mas menos intensamente e não sendo capaz de modificar os valores de turbidez.

Todas as partículas exibiram potencial zeta positivo durante os dois meses da análise (Figura 17c). Resultado semelhante foi encontrado por Fan et al. (2012). Segundo esse autor, quando a quitosana e o TPP se misturam formam

espontaneamente complexos com cargas superficiais positivas, como pode ser confirmado pelas medidas do potencial zeta.

No entanto, pode-se observar que os valores de potencial zeta diminuem durante o período de armazenamento em todas as temperaturas analisadas. Uma maior diminuição foi encontrada nas amostras armazenadas a 40°C. Precocemente, na segunda semana de armazenamento, essas amostras apresentaram potencial zeta abaixo de +30mV. De acordo com Ing et al. (2012), nanopartículas com carga superficial maior que +30mV são mais estáveis e esse valor é suficiente para prevenir a agregação das partículas.

Os baixos valores de potencial zeta da amostra armazenada a 40°C refletem uma diminuição das forças repulsivas entre as partículas que afetam as interações intra e intermoleculares. Isso faz com que o sistema perca sua estabilidade coloidal e então, as nanopartículas sem cargas começam a agregar (LÓPEZ-LEÓN et al., 2005), o que pode ser verificado no gráfico do DLS (Figura 17a).

Em outras amostras, os valores de potencial zeta foram menores que +30mV apenas depois da sexta e da oitava semana para as amostras armazenadas a 25 e 5°C, respectivamente. Essas duas temperaturas foram as mais indicadas em retardar a diminuição dos valores de potencial zeta e conseqüentemente ajudaram a manter a estabilidade das partículas. De acordo com Saharan et al. (2015), partículas com cargas superficiais positivas são mais estáveis e exibem uma alta afinidade por membranas biológicas em meio aquoso e com isso uma maior atividade antifúngica. Portanto, as nanopartículas de quitosana não devem ser armazenadas na temperatura de 40°C, pois essa condição mostra-se inadequada para manutenção das características originais das partículas o que irá influenciar na sua aplicação como agente antifúngico.

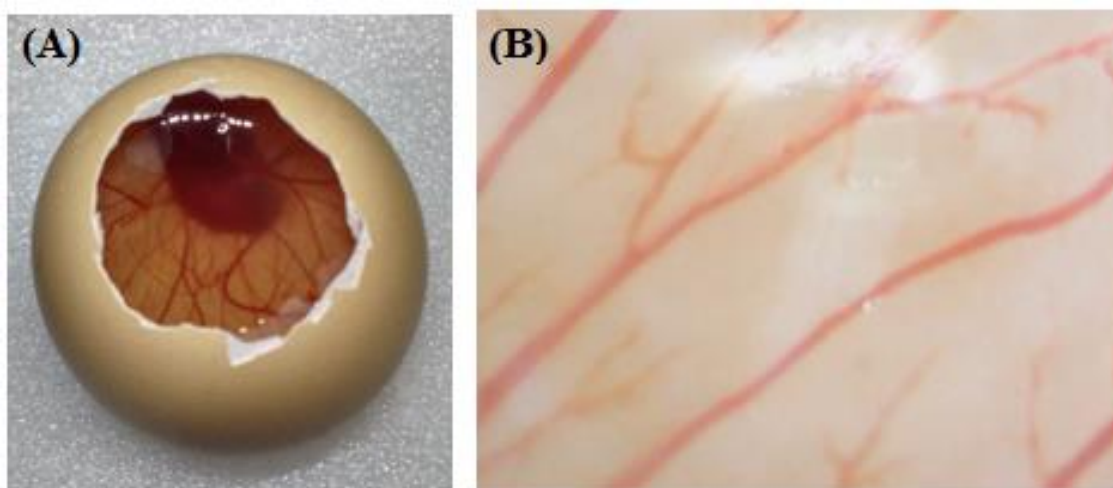
Já que as nanopartículas de quitosana se comportam como um sistema metaestável, diversos autores recomendam que elas sejam armazenadas liofilizadas para que sejam evitados as interações e modificações que ocorrem na suspensão coloidal das nanopartículas (LÓPEZ-LEÓN et al., 2004; FAN et al., 2012; MORRIS et al., 2011).

Determinação da toxicidade

Teste da membrana coriolantóide do ovo de galinha (HET-CAM)

O teste do HET-CAM foi utilizado para a análise de efeitos inflamatórios e vasculares causados pelas nanopartículas de quitosana utilizadas no presente estudo. Não foi observada nenhuma mudança na membrana coriolantóide do embrião, sem sinal de ocorrência de hemorragia, vasoconstricção e coagulação durante os 5 minutos de realização do teste (**Figura 18**). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Melo et al. (2016) que também produziu nanopartículas de quitosana fúngica e através do teste do HET-CAM não observou nenhum efeito vascular na membrana coriolantóide do ovo.

Figura 18 - Membrana coriolantóide após a deposição das nanopartículas de quitosana fúngica (A) e microscopia óptica dos vasos analisados (B).



É de extrema importância a avaliação toxicológica de materiais nanoestruturados, devido a seu tamanho e formato, capazes muitas vezes de penetrar em tecidos e causar danos celulares (RAMPINO et al., 2013). A técnica de gelificação iônica utilizada para produção das nanopartículas de quitosana evita o uso de agentes químicos tóxicos. Geralmente essa técnica usa o TPP como o agente de ligação para produção das partículas e de acordo com Jonassen et al. (2012), o TPP tem sido reconhecido pela FDA como um aditivo alimentar.

A não toxicidade de nanopartículas de quitosana vem sendo relatada também por outros autores (RAMPINO et al., 2013; BAPTISTA DA SILVA et al., 2016). Este

efeito não-tóxico dessas partículas deve-se a sua constituição ser de quitosana, que é um polímero seguro, não-tóxico e aprovado para aplicações dietéticas pelo FDA em alguns países (Japão, Itália e Finlândia) (KEAN; THANOU, 2010).

Outro fator importante para toxicidade é o tamanho das partículas. Existe uma relação entre o tamanho das partículas e sua internalização vascular (FREIRE et al., 2015). De acordo com GAN et al. (2005), partículas de tamanho pequeno (~100nm) apresentam captação arterial 3 vezes maior em comparação com nanopartículas maiores (~275nm). Na presente pesquisa, as nanopartículas de quitosana apresentaram um tamanho maior que 300nm e mostraram-se não tóxicas pela análise do HET-CAM o que viabiliza seu uso em alimentos. Isso demonstra, novamente, a importância do planejamento fatorial que ajudou na identificação dos parâmetros adequados para produção de nanopartículas com um adequado tamanho para aplicação em alimentos e sem a produção de efeitos tóxicos.

Teste de citotoxicidade pelo método do MTT

Na Tabela 6 encontram-se os percentuais de inibição celular das substâncias teste. As nanopartículas de quitosana apresentaram inibição de crescimento de todas as células testadas, mas segundo Rodrigues et al. (2014) nenhum desses percentuais encontrados caracterizam as nanopartículas como citotóxicas. Liu et al. (2009) também avaliou a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana em fibroblastos e não encontrou atividade tóxicas nesse tipo de célula.

De acordo com Loh et al. (2012), a citotoxicidade de nanopartículas está relacionada as cargas positivas presentes na sua superfície. Contudo, essas cargas são pH-dependentes, o que significa dizer que no pH utilizado no presente método (6,4) as cargas superficiais não estão suficientemente ionizadas a ponto de se ligarem intensamente com as cargas negativas das membranas das células e causar toxicidade.

Tabela 6 – Percentual de inibição de crescimento de HCT116 (Carcinoma colorretal humano), HL-60 (Leucemia promielocítica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), L929 (fibroblasto de camundongos) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongos) expostos ao gel de quitosana, nanopartículas de quitosana (nano) e gel enriquecido com nanopartículas (G+N).

Produtos teste	% inibição									
	RAW 264.7	EP	HL-60	EP	HCT116	EP	MCF-7	EP	L929	EP
Gel (10mg/mL) ph 6.4	0,00	0,00	80,16	0,32	65,36	0,56	23,52	1,83	12,51	7,46
Nano (10mg/mL) ph 7.4	11,31	2,75	53,73	1,56	18,98	2,73	13,96	10,79	14,07	4,65
G + N (10mg/mL) ph 7.4	0,00	0,00	41,88	3,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Doxorrubicina	79,68	0,11	74,28	2,62	74,18	6,33	72,77	2,46	76,58	1,74

Além disso, o pequeno tamanho das partículas também pode contribuir com sua citotoxicidade (NAFEE et al., 2009). No entanto, as nanopartículas de quitosana desenvolvidas na presente pesquisa apresentaram um tamanho pequeno capaz de exibir uma elevada atividade antifúngica, mas sem causar elevada toxicidade nas células testadas.

O gel de quitosana foi a substância que apresentou um maior percentual de inibição para as células cancerígenas testadas. Semelhante as nanopartículas de quitosana, o gel também causa toxicidade nas células através da interação eletrostática de suas cargas positivas com as cargas negativas presentes na membrana das células (JIA et al., 2009; NAFEE et al., 2009).

O gel de quitosana é capaz de aderir a superfície das células, apesar de usualmente ter uma menor capacidade de internalização celular o que contribui para uma baixa atividade citotóxica. Essa baixa internalização celular ocorre devido ao grande tamanho (> 1 um) da molécula de quitosana presente no gel (LOH et al., 2012).

Foi verificado que a mistura do gel com nanopartículas apresentou inibição do crescimento celular apenas para as células de leucemia promielocítica humana. Portanto, é possível sugerir que quando há a mistura do gel com as nanopartículas, o gel devido ao seu grande tamanho fica retido na superfície celular e arrasta com ele as partículas que também aderem a superfície da célula, sem internalização, diminuindo, desta forma, a citotoxicidade de ambos.

Os resultados encontrados viabilizam o uso das substâncias analisadas em alimentos. Do ponto de vista da citotoxicidade, o gel enriquecido com nanopartículas destacou-se como a substância mais indicada para aplicação em morangos pós-colheita, já que apresentou apenas inibição das células de leucemia promielocítica humana sem ser considerado citotóxico.

Atividade antioxidante

A figura 19 e 20 mostram que todas as substâncias testadas apresentaram atividade antioxidante de forma dose dependente, ou seja, com o aumento da concentração das substâncias houve um aumento de sua atividade antioxidante. Resultado semelhante a Chen et al. (2015) e MubarakAli et al. (2018). Esse comportamento pode ser claramente observado quando analisamos o gráfico do DPPH. Nesse teste, nenhuma substância na concentração CIM/2 foi capaz de sequestrar o radical livre DPPH. Apenas a partir da concentração CIM foi que as substâncias teste apresentaram percentual de inibição do DPPH.

Figura 19 - Percentual de inibição do radical DPPH (A) e ABTS (B) pelo gel de quitosana (—■—), nanopartículas (—●—) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana (—▲—).

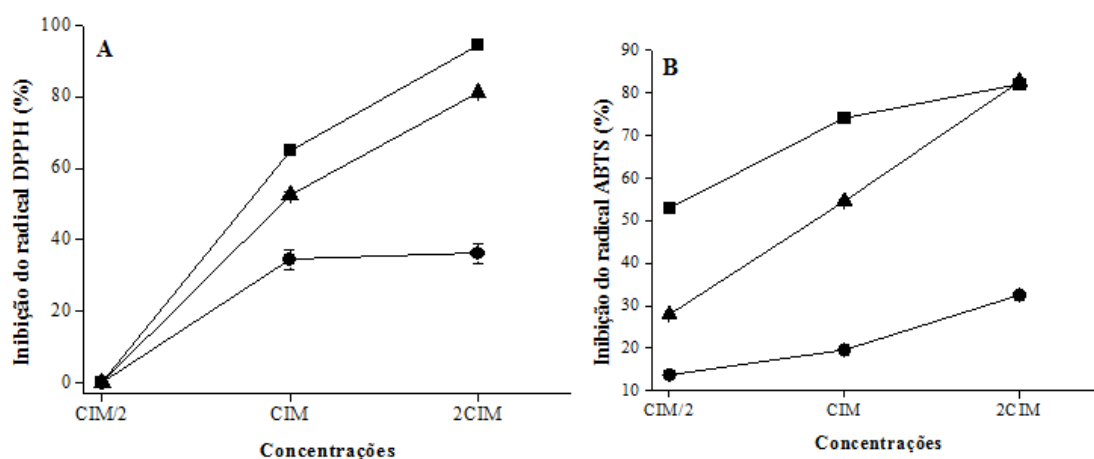
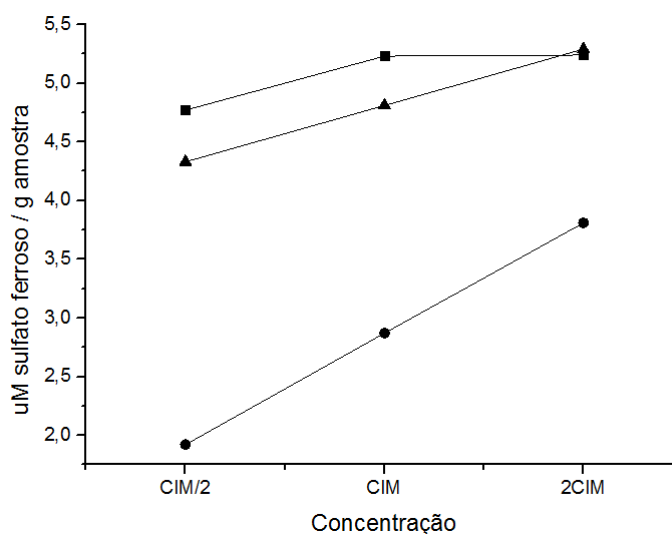


Figura 20 - Atividade antioxidante do gel de quitosana (■), nanopartículas (●) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana (▲) através do método FRAP.



O gel de quitosana foi a substância que apresentou uma maior atividade antioxidante. O seu percentual de inibição de radicais livres variou entre 81,14% (teste do DPPH) e 82,57% (teste do ABTS) na concentração 10mg/ml (2CIM), resultado semelhante ao encontrado por Yen et al. (2008) que relatou valores de 79,9-85,2% para quitosana de crustáceo também na concentração 10mg/ml.

Segundo Siripatrawan e Harter (2010), a atividade antioxidante da quitosana deve-se a presença dos grupos aminos na molécula desse polímero. Os radicais livres, ABTS, DPPH, íon férrico, reagem com os grupos aminos livres da molécula da quitosana para formar moléculas mais estáveis. Com isso, os grupos NH_2 transformam-se em NH_3^+ através da absorção do íon hidrogênio presente na solução do radical livre. Portanto, quanto maior o grau de desacetilação da molécula de quitosana maior a sua atividade antioxidante (YAN et al., 2008). Qin (1993), acrescenta ainda, que quitosanas completamente acetiladas apresentam uma pequena atividade quelante.

Na figura 19, observamos também que a nanopartícula de quitosana foi a substância teste que apresentou o menor percentual de inibição tanto do ABTS como do DPPH. Além disso as nanopartículas exibiram um menor poder de redução do íon

férrico (Figura 20). Isso provavelmente ocorreu devido ao menor número de grupos aminos livres presentes nas nanopartículas. Durante o processo de síntese das partículas pelo método de gelificação iônica, os grupos aminos da cadeia da quitosana ligam-se ao TPP para formação das nanopartículas (BUGNICOURT et al., 2014). Portanto, uma menor quantidade de grupos aminos livres estão presentes nas nanopartículas de quitosana quando comparamos com o gel de quitosana, o que contribuiu com a menor atividade antioxidante dessas partículas, já que são esses grupos que ligam-se aos radicais livres.

É importante ressaltar que a concentração CIM das nanopartículas de quitosana (2,5mg/ml) é metade da CIM do gel (5mg/ml). Isso sugere que as nanopartículas apresentaram menor atividade antioxidante do que o gel devido não apenas a menor quantidade de grupos aminos livres, mas também ao seu menor valor de CIM que foi utilizado nos testes.

Contudo, quando as partículas estão dispersas no gel de quitosana há um aumento em sua atividade antioxidante, chegando a obter resultados sem diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao gel quando ambos estão na concentração 2CIM no teste do ABTS. Isso mostra que o gel quando misturado com as nanopartículas não só é capaz de aumentar a atividade antimicrobiana das partículas, como observado pelo método checkboard, mas também é capaz de melhorar sua atividade antioxidante e sua capacidade de quelar íons férricos. Portanto, essa alta capacidade antioxidante e especialmente quelante de íons do gel de quitosana enriquecido com nanopartículas é uma característica dessa substância altamente vantajosa para a indústria de alimentos já que os íons férricos são um dos mais efetivos pro-oxidantes em sistemas alimentícios (YAMAGUCHI et al., 1988).

Concentração inibitória mínima das substâncias teste

Os resultados do CIM das substâncias teste para os fungos fitopatogênicos encontram-se na tabela 7. Os resultados para o CIM do gel de quitosana estão dentro da faixa recomendada por Verlee et al. (2017). Segundo esse autor o CIM de quitosana contra fungos varia de 0,01mg/ml a 7,75mg/ml. Além disso, os resultados das concentrações inibitórias encontrados na presente pesquisa são também melhores do que os que foram achados por outros autores. Santos et al. (2012) e

Guerra et al. (2015) também avaliaram a ação antifúngica de quitosana de crustáceo e obtiveram resultados de CIM igual a 10mg/ml para *R. stolonifer* e *A. niger* e 8mg/ml para *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger*, respectivamente. Esses diferentes valores de CIM encontrados não necessariamente estão relacionados com a diferente origem das quitosanas utilizadas, porque Vasconcelos de Oliveira et al. (2014a) e Vasconcelos de Oliveira et al. (2014b) utilizaram também quitosanas de origem fúngica e obtiveram valores de CIM de 15mg/ml para o *B. cinerea* e 7,5mg/ml para *A. niger* e *R. stolonifer* que são resultados tão altos quanto os encontrados pelos autores que trabalharam com quitosana de crustáceo.

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima (mg/ml) das substâncias teste.

Substância Teste	Fungo fitopatogênicos		
	<i>R. stolonifer</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. niger</i>
	URM 3728	URM 2802	URM 7282
Gel	4,0	4,0	5,0
Nanopartículas	1,5	1,5	2,5
Gel+Nanopartículas	1,0 + 0,5	1,0 + 0,5	2,0 + 1,5

Segundo Mellegard et al. (2011) e Verlee et al. (2017), esses diferentes valores de CIM da quitosana contra um mesmo tipo de fungo ocorrem devido as diferentes características físico-químicas desse polímero, como por exemplo seu grau de desacetilação e peso molecular. Badawy & Rabea (2009) e Hernandez-Lauzardo (2008) mostraram que o peso molecular é um fator determinante na ação antimicrobiana da quitosana. Esses autores constataram que a diminuição do peso molecular do polímero levaria a um aumento na sua atividade antifúngica in vitro. Isso deve-se a capacidade da quitosana de baixo peso molecular de penetrar na membrana fúngica e acumular-se no plasma imediatamente após sua adição a célula, o que sugere que o principal alvo de ação da quitosana de baixo peso molecular é a membrana plasmática do microrganismo (YOONKYUNG et al., 2008).

A quitosana utilizada na presente pesquisa apresenta um baixo peso molecular o que contribuiu para sua ação antifúngica e para encontrarmos os baixos valores de CIM. Além disso, o alto grau de desacetilação da quitosana é outro fator importante

para sua ação antimicrobiana. Como relatado por Kong et al. (2010), a quitosana apresenta uma estrutura policatiônica devido a presença dos grupos aminos na cadeia. Esses grupos proporcionam ao polímero uma alta densidade de cargas positivas que refletem o grau de desacetilação da molécula. Quanto maior a densidade de cargas positivas ou seja quanto maior seu grau de desacetilação, mais forte será sua interação eletrostática com a membrana plasmática dos fungos.

De uma forma geral, independentemente das características intrínsecas de cada quitosana, esse polímero apresenta um mecanismo de ação que ainda está sendo elucidado. Contudo, atualmente, tem sido sugerido que a quitosana apresente 4 mecanismos de ação antimicrobianos. O primeiro deles refere-se ao que foi relatado anteriormente em relação as cargas do polímero. Acredita-se que ocorre uma interação entre as cargas positivas da quitosana e as cargas negativas presentes na membrana celular fúngica, causando interferência nas trocas de nutrientes entre o meio extra e o intracelular. Essas cargas também competem com o cálcio pelos sítios eletronegativos das membranas microbianas comprometendo a integridade da mesma e como consequência causa a lise celular, libertando o material intracelular e resultando em morte da célula (YOONKYUNG et al., 2008; KONG et al., 2010; MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010; ING et al., 2012; MA et al., 2017). O segundo mecanismo propõe a atuação da quitosana como um agente quelante que liga-se a oligoelementos celulares, tornando indisponível nutrientes essenciais para o crescimento fúngico. O terceiro relaciona-se ao que também foi relatado anteriormente, neste caso em relação ao peso molecular. A quitosana de baixo peso molecular penetraria no núcleo celular e, posteriormente, interagindo com o DNA, interferindo na síntese de RNA-mensageiro, afetando a produção de proteínas e enzimas essenciais à sobrevivência do microrganismo. O último mecanismo proposto sugere a formação pela quitosana de uma camada impermeável ao redor da célula, causando o bloqueio do transporte intracelular (EATON et al, 2008; KONG et al., 2010; MARTINEZ- CAMACHO et al., 2010; PALMA-GUERRERO et al., 2010; ING et al., 2012; GALVAN MARQUEZ et al., 2013; KHEIRI et al., 2016; MA et al., 2017).

Com relação ao CIM encontrado para as nanopartículas, pode-se observar que houve uma diminuição em seus valores para todos os fungos analisados quando comparado com o gel de quitosana o que sugere uma potencialização da ação antifúngica da quitosana quando no formato de nanopartículas. Esses resultados

estão de acordo com o preconizado por Kheiri et al. (2016) que demonstrou que as nanopartículas de quitosana apresentam uma maior atividade antifúngica do que o gel de quitosana devido a suas características especiais (tamanho e cargas superficiais).

Segundo esses autores, a superfície celular fúngica é carregada negativamente o que atrai as nanopartículas de quitosana que são carregadas positivamente. Portanto, as nanopartículas que apresentam alta carga superficial interagem com os fungos em um maior grau do que o gel de quitosana. Além disso, por conta da grande área superficial das partículas elas podem ser facilmente adsorvidas na superfície das células fúngicas de modo a perturbar a membrana, o que pode levar a vazamento de componentes intracelulares e subsequente morte celular.

As nanopartículas de quitosana podem também penetrar no fungo, através de carregadores de proteínas e canais iônicos, e ligar-se aos ácidos nucleicos dessa célula, através da interação eletrostática entre as partículas que são catiônicas e o DNA fúngico que é aniônico. Isto pode causar uma variedade de danos na célula fúngica com a inativação da síntese de DNA e RNAm (ING et al., 2012).

Na Tabela 7, é possível observar também que para o *A. niger* os valores de CIM de todas as substâncias testadas foram maiores do que os encontrados para o *B. cinerea* e o *R. stolonifer*. Resultado semelhante ao encontrado por Ing et al. (2012), que também necessitou de maiores concentrações de nanopartículas de quitosana para inibição do crescimento do *A. niger*. Segundo Allan e Hadwiger (1979), fungos que apresentam quitosana como um dos componentes de sua parede celular são mais resistentes a ação desse polímero. Isso pode, portanto, explicar a maior resistência do *A. niger* ao gel e as nanopartículas de quitosana, já que essa espécie fúngica contém 10% de quitina em sua parede celular.

Com relação a associação do gel com as nanopartículas de quitosana, os valores necessários de cada substância para inibir o crescimento fúngico diminuí em relação ao CIM das substâncias agindo individualmente. Esse resultado sugere que, quando juntas, as substâncias teriam seus efeitos potencializados. Segundo Lee et al. (2010), no gel de quitosana as nanopartículas apresentam-se mais dispersas e quando as partículas estão bem dispersas na solução elas são mais eficientemente transportadas para a parede celular causando distúrbios e levando a uma maior atividade antimicrobiana.

Essa melhora das concentrações inibitórias da associação das substâncias teste pode ser comprovada também pelo método *checkboxboard*. Os resultados da CIF para todos os fungos analisados mostraram uma interação aditiva entre as substâncias. Castelo Branco Melo et al. (2018), também analisaram a ação antimicrobiana da associação do gel com nanopartículas de quitosana fúngica contra bactérias de origem alimentar e constatou que a associação das substâncias potencializaria seus efeitos levando a uma diminuição dos seus valores de CIM quando comparados com o CIM das substâncias agindo individualmente. No entanto, até o momento nenhum trabalho relatou a atividade da associação do gel e nanopartículas de quitosana contra fungos fitopatogênicos, sendo esta a primeira vez em que é demonstrada a melhora da atividade antimicrobiana da associação dessas substâncias contra esses tipos de fungos pós-colheita.

Efeito das substâncias teste sobre o crescimento radial e germinação dos esporos fúngicos

Na Tabela 8, é possível observar que as substâncias teste em todas as concentrações utilizadas foram capazes de inibir o crescimento micelial dos fungos pós-colheita dos morangos com percentuais de inibição que variaram entre 30,47% a 83,33% para o *B. cinerea*, 51,90% a 85,71% para o *R. stolonifer* e entre 30% a 72,85% para o *A. niger*. Os menores percentuais de inibição do crescimento micelial ocorreram nas amostra do gel de quitosana na concentração CIM/2, que diferiram significativamente ($p < 0.05$) em relação as outras substâncias teste aplicadas também na concentração sub-inibitória.

Alguns estudos mostraram que a inibição do crescimento micelial através da utilização da quitosana deve-se a interação desse polímero com a membrana celular fúngica e posterior rompimento dessa membrana. Isso tudo causaria vazamento celular e interferiria na atividade das enzimas responsáveis pelo crescimento fúngico (HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008; GARCÍA-RINCÓN et al., 2010; ASSIS & BRITTO, 2011). Apesar desse efeito, a utilização do gel de quitosana na concentração mais elevada (2CIM) não conseguiu atingir nem mesmo o percentual de inibição da associação do gel + nanopartículas na concentração CIM/2.

Já as nanopartículas apresentaram percentuais sempre acima dos encontrados para o gel, resultado semelhante ao encontrado por Sathiyabama e Parthasarathy (2016). Essa maior ação antifúngica das nanopartículas deve-se, segundo Kheiri et al. (2016), a alta área superficial das partículas o que facilita seu contato com as células fúngicas e posteriormente sua permeabilidade.

A associação do gel com as nanopartículas de quitosana foi a substância teste mais favorável para inibir o crescimento micelial *in vitro* de todos os fungos avaliados. Isso mostra mais uma vez que o efeito aditivo encontrado pelo método *checkboard* reflete uma interação positiva entre os polímeros e suas partículas, viabilizando o uso da associação do gel com nanopartículas em baixas concentrações, favorecendo um elevado potencial antifúngico.

Tabela 8 - Percentual de inibição do crescimento micelial dos fungos *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger* depois de expostos a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas (NP) e gel enriquecido com nanopartículas (Gel + NP).

Concentrações	Inibição do crescimento micelial (%)		
	Gel	NP	Gel + NP
<i>B. cinerea</i> URM 2802			
CIM/2	30,47% ($\pm 0,82$) ^{Cc}	52,38% ($\pm 4,12$) ^{Bc}	74,28% ($\pm 3,78$) ^{Ab}
CIM	43,80% ($\pm 0,82$) ^{Cb}	68,57% ($\pm 2,85$) ^{Bb}	83,33% ($\pm 2,18$) ^{Aa}
2CIM	60,00% ($\pm 0,00$) ^{Ba}	82,38% ($\pm 3,59$) ^{Aa}	82,85% ($\pm 1,43$) ^{Aa}
<i>R. stolonifer</i> URM 3728			
CIM/2	53,67% ($\pm 3,18$) ^{Bb}	51,90% ($\pm 2,18$) ^{Bb}	77,14% ($\pm 2,48$) ^{Ab}
CIM	59,93% ($\pm 5,77$) ^{Bab}	69,04% ($\pm 4,12$) ^{Ba}	85,23% ($\pm 3,60$) ^{Aa}
2CIM	64,77% ($\pm 3,18$) ^{Ca}	76,19% ($\pm 4,13$) ^{Ba}	85,71% ($\pm 1,43$) ^{Aa}
<i>A. niger</i> URM 7282			
CIM/2	30,00% ($\pm 2,47$) ^{Cc}	57,62% ($\pm 0,82$) ^{Bb}	64,28% ($\pm 0,00$) ^{Ab}
CIM	42,85% ($\pm 0,00$) ^{Bb}	63,80% ($\pm 0,82$) ^{Aa}	67,14% ($\pm 4,95$) ^{Aab}
2CIM	60,00% ($\pm 0,00$) ^{Ca}	65,71% ($\pm 1,43$) ^{Ba}	72,85% ($\pm 1,43$) ^{Aa}

^{a-c} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

^{A-C} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Ainda com relação a associação do gel com as nanopartículas, foi verificado que para os três fungos avaliados não houve diferença significativa entre essa substância na concentração CIM e 2CIM. Kheiri et al. (2016) sugere que com o aumento da concentração de quitosana há um aumento da viscosidade da solução o que restringe o contato entre a quitosana e a superfície celular fúngica. Portanto, a

CIM é a concentração máxima que deve-se utilizar a associação do gel com as nanopartículas, pois concentrações acima desta não acarretarão em aumento da atividade antifúngica dessa substância.

Ao ser analisada a ação das substâncias nos esporos fúngicos, observou-se uma maior capacidade de inibição dessa estrutura quando comparada com a inibição dos micélios (Tabela 9). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Palma-Guerrero et al. (2008) que relatou uma maior atividade da quitosana sobre os esporos do que sobre as hifas para outros tipos de fungos (*F. oxysporum* e *Verticillium dahliae*). Da mesma forma, Jitareerat et al. (2007) e Qiu et al. (2014) também demonstraram que a quitosana é mais efetiva em inibir a germinação dos esporos do que o crescimento micelial.

A presença de cargas positivas na quitosana faz com que ela interaja com as cargas negativas da superfície fúngica causando o agrupamento dos esporos, o que restringe o alongamento do tubo germinativo e o processo de germinação (XING et al., 2015). Cota-Arriola et al. (2013) sugere também que o retardo na germinação dos esporos tratados com quitosana pode ser atribuído a capacidade que a quitosana tem de quelar íons cálcio que são fundamentais para o processo de germinação. Esse mecanismo também pode ser aplicado pelas nanopartículas de quitosana, as quais por apresentarem grupos fosfatos, provenientes do TPP, tornam indisponíveis íons (Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2}) importantes para o crescimento fúngico. Além disso, as nanopartículas tem os grupos aminos da quitosana que interagem com a superfície fúngica, resultando em efeito semelhante ao gel de quitosana (COTA-ARRIOLA et al., 2013; XING et al., 2017).

Tabela 9 - Percentual de inibição da germinação dos esporos dos fungos *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger* depois de expostos a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas (NP) e gel enriquecido com nanopartículas (Gel + NP).

Concentrações	Inibição da germinação de esporos (%)		
	Gel	NP	Gel + NP
<i>B. cinerea</i> URM 2802			
CIM/2	72,36% ($\pm 1,41$) ^{Bb}	91,05% ($\pm 2,82$) ^{Aa}	93,49% ($\pm 1,41$) ^{Ab}
CIM	82,92% ($\pm 2,44$) ^{Ca}	91,87% ($\pm 1,41$) ^{Ba}	96,75% ($\pm 1,41$) ^{Aab}
2CIM	86,99% ($\pm 1,41$) ^{Ca}	94,31% ($\pm 1,41$) ^{Ba}	98,37% ($\pm 1,41$) ^{Aa}
<i>R. stolonifer</i> URM 3728			
CIM/2	58,20% ($\pm 2,42$) ^{Bb}	60,31% ($\pm 1,58$) ^{Bc}	91,53% ($\pm 0,92$) ^{Ac}
CIM	75,13% ($\pm 0,92$) ^{Ba}	77,77% ($\pm 1,58$) ^{Bb}	94,18% ($\pm 0,91$) ^{Ab}
2CIM	76,69% ($\pm 2,43$) ^{Ca}	85,18% ($\pm 2,43$) ^{Ba}	97,35% ($\pm 0,92$) ^{Aa}
<i>A. niger</i> URM 7282			
CIM/2	63,76% ($\pm 1,81$) ^{Cb}	73,91% ($\pm 0,87$) ^{Bc}	84,05% ($\pm 1,33$) ^{Ab}
CIM	65,79% ($\pm 1,00$) ^{Cb}	81,15% ($\pm 1,32$) ^{Bb}	91,01% ($\pm 1,33$) ^{Aa}
2CIM	81,15% ($\pm 1,32$) ^{Ca}	84,05% ($\pm 0,50$) ^{Ba}	93,33% ($\pm 0,50$) ^{Aa}

^{a-c} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

^{A-C} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

A potente ação antifúngica das substâncias a base de quitosana sobre os esporos é extremamente importante quando se considera a aplicação dessas substâncias em frutas. Os esporos são importantes estruturas de sobrevivência e disseminação fúngica em produtos agrícolas, capazes de causar infecções nos frutos e consequente perda pós-colheita (SOUSA et al., 2013). Portanto, as substâncias utilizadas na presente pesquisa mostram-se como uma alternativa para a inibição da germinação dos esporos e a conservação de frutas pós-colheita.

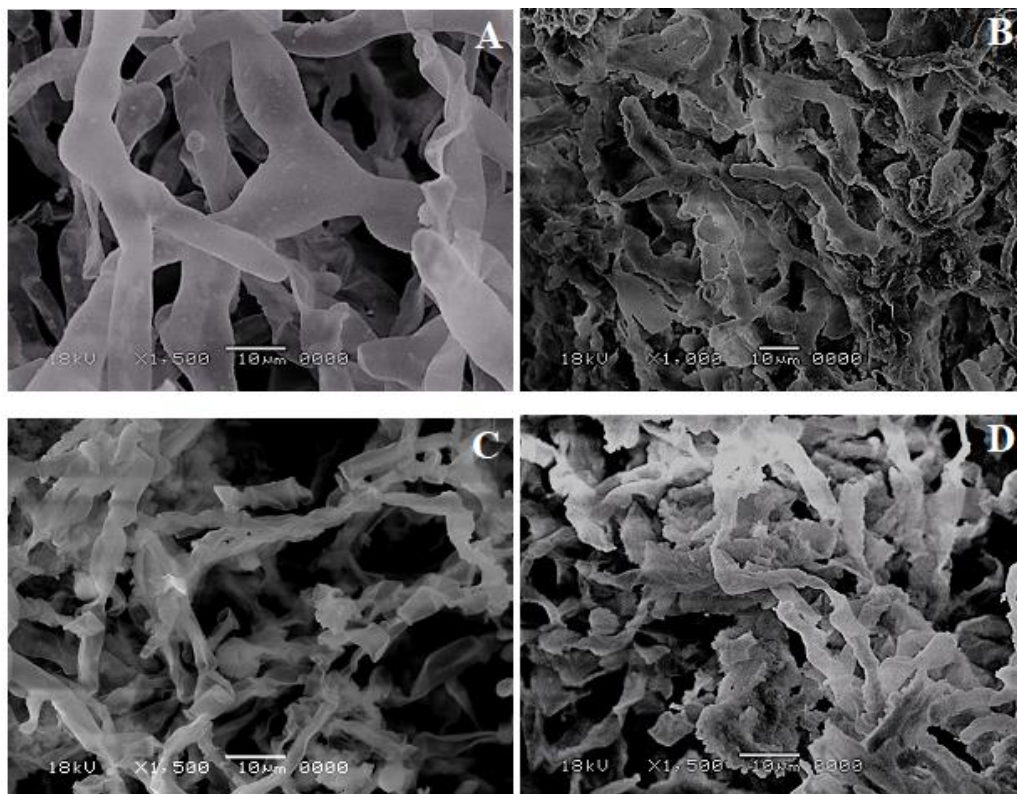
Efeito das substâncias teste sobre a morfologia fúngica

O efeito das coberturas comestíveis na morfologia do *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *A. niger* podem ser observados nas figuras 21, 22 e 23, respectivamente. Na amostra controle do *R. stolonifer* (Fig. 21A), as hifas apresentam uma estrutura típica, tamanho homogêneo e com uma superfície lisa. Quando as hifas do *R. stolonifer* foram expostas ao gel de quitosana fúngica (Fig. 21B) foi observado que houve um excessivo depósito de quitosana na superfície fúngica.

De acordo com Junior et al. (2012), o gel de quitosana, especialmente os que apresentam baixo peso molecular, tende a se depositar na superfície das hifas, bloqueando os canais iônicos e, portanto, dificultando a entrada de nutrientes essenciais na célula. Na presente pesquisa, foi utilizado uma quitosana de muito baixo peso molecular o que contribuiu para um crescimento anormal do *R. stolonifer*.

Na Figura 21C é possível observar a presença de hifas encolhidas e com perda de material citoplasmático (hifas vazias). Esse resultado demonstra que a ação da quitosana, no *R. stolonifer*, quando no formato de nanopartículas é muito mais severa do que ação da quitosana quando presente na forma de gel. De acordo com Ing et al. (2012), o tamanho e a carga superficial das nanopartículas são as principais características que contribuem com sua ação antifúngica. O tamanho nanométrico das partículas facilita sua entrada nas células dos microrganismos através de canais iônicos ou carreadores de proteínas (Sharma et al., 2010). Além disso, a elevada densidade de carga superficial positiva das nanopartículas de quitosana interagem facilmente com as cargas negativas da superfície celular dos fungos. Essa interação causa alteração na permeabilidade da membrana fúngica e eventualmente induz ao rompimento da célula e vazamento de material intracelular (Ing et al., 2012), ocasionando a formação de hifas vazias como foi observado na presente pesquisa.

Figura 21 - MEV do micélio do *R. stolonifer* controle (A) e após exposição ao gel de quitosana (B), nanopartículas de quitosana fúngica (C) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana fúngica (D).

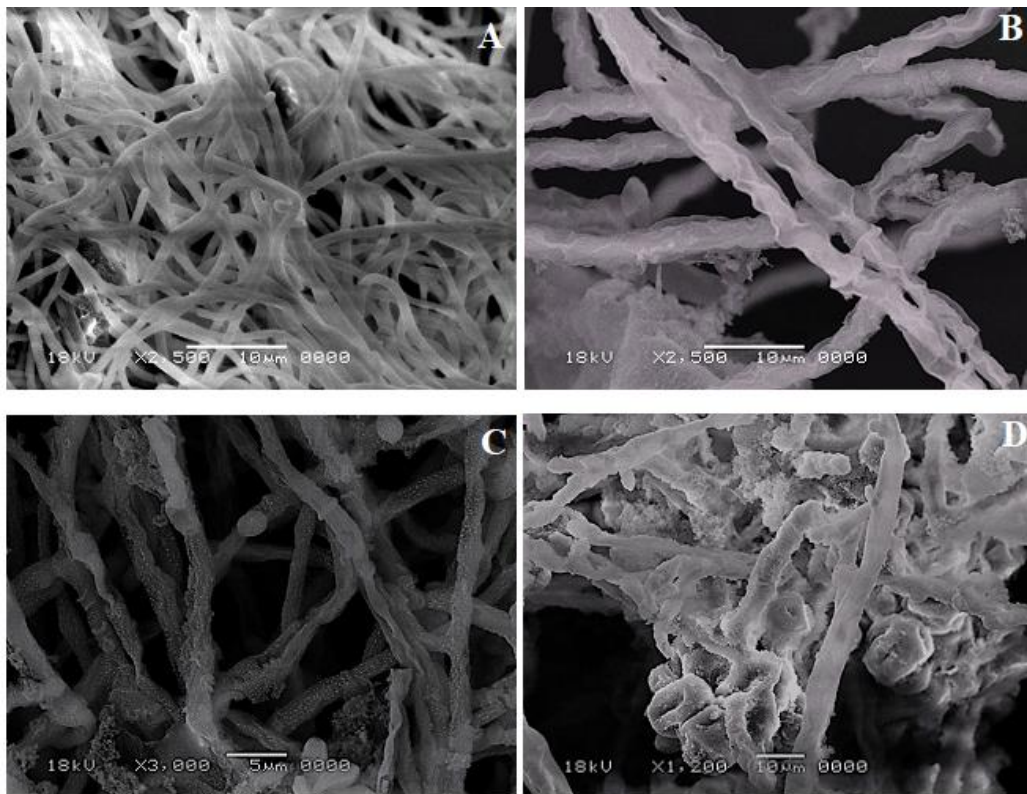


Quando o *R. stolonifer* é exposto a mistura do gel de quitosana com as nanopartículas, há uma interação de ambas as formas do polímero fazendo que observando-se a presença tanto do efeito do gel sozinho quanto do efeito das nanopartículas sozinhas (Fig. 21D). Esse resultado está de acordo com o que foi encontrado no método do *checkboxboard*, confirmando que a mistura das duas formas de quitosana analisadas apresenta um efeito aditivo, ou seja, um efeito melhor quando o gel e as nanopartículas estão juntos.

Com relação ao efeito das substâncias teste no *B.cinerea*, observou-se que o gel também se depositou na superfície das hifas, o que levou a sua agregação, mostrando um efeito semelhante ao que foi encontrado para o *R. stolonifer*. Contudo, o gel também foi capaz de formar “hifas vazias” (Figura 22B), o que sugere que o *B.cinerea* seria um fungo mais sensível a ação do gel de quitosana quando comparado com o *R. stolonifer* em que o gel apenas se depositou na superfície das hifas. Essa capacidade do gel em formar hifas vazias não é tão comum, mas já foi relatada por Kong et al. (2010) e Ma et al. (2017). Segundo esses autores, as cargas positivas da

quitosana interagem com as cargas negativas dos componentes fosfolipídicos da membrana celular dos fungos, causando aumento da permeabilidade da membrana, com vazamento de componentes intracelulares e, portanto, formação de hifas vazias.

Figura 22 - MEV do micélio do *B. cinerea* controle (A) e após exposição ao gel de quitosana (B), nanopartículas de quitosana fúngica (C) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana fúngica (D).



Da mesma forma, as nanopartículas de quitosana também causaram a formação de “hifas vazias”, mesmo efeito encontrado no *R. stolonifer*. Porém, além desse efeito é possível observar na imagem 22C que há um enrugamento na superfície do *B. cinerea*. Segundo Kheiri et al. (2016), devido a elevada área superficial das partículas, as nanopartículas podem ser bem absorvidas na superfície das células fúngicas, alterando a permeabilidade celular.

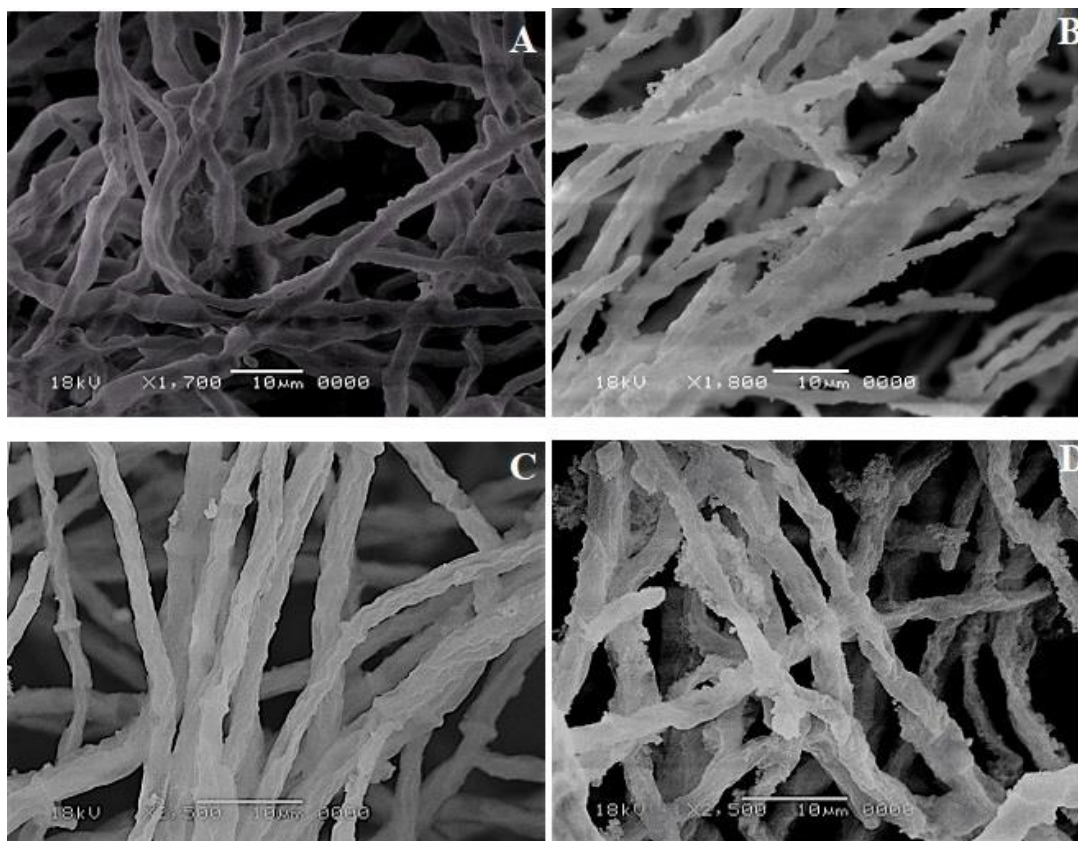
Na amostra do *B. cinerea* exposto a mistura do gel com as nanopartículas houve um predomínio do efeito do gel de quitosana com a formação de hifas mais largas e agregadas. No entanto, houve uma potencialização do efeito de ambas as

substâncias já que é possível observar a formação de hifas com formatos aberrantes (“abnormal shapes”).

Com relação ao *A. niger*, pode-se observar que as substâncias a base de quitosana apresentaram os mesmos efeitos que foram encontrados nos outros fungos, no entanto de uma forma menos intensa. Esse resultado já era esperado, pois como foi observado nos outros testes antifúngicos *in vitro*, o *A.niger* foi o fungo mais resistente a ação de todas as substâncias utilizadas na presente pesquisa. Essa maior resistência deve-se, como anteriormente citado, ao maior conteúdo de quitosana na parede celular do *A. niger*, o que segundo Ing et al. (2012) torna esse fungo mais resistente a ação de quitosana externa.

Contudo, apesar dessa maior resistência todas as substâncias mostraram alguma alteração morfológica nas hifas do *A. niger*. Além disso, o gel enriquecido com nanopartículas apresentou-se, novamente, como a substância a base de quitosana que ocasionou uma modificação mais pronunciada na estrutura fúngica. Isso sugere que a mistura das duas formas de quitosana (gel e nanopartículas) é capaz de potencializar as modificações morfológicas dos fungos, tornando-se portanto uma alternativa promissora no combate a fungos pós-colheita.

Figura 23 - MEV do micélio do *A. niger* controle (A) e após exposição ao gel de quitosana (B), nanopartículas de quitosana fúngica (C) e gel enriquecido com nanopartículas de quitosana fúngica (D).



Efeito das coberturas comestíveis sobre os parâmetros físico-químico dos morangos

Análise da umidade, sólidos solúveis, índice de maturação, pH, acidez total titulável e antocianinas

As mudanças nos parâmetros físico-químicos dos morangos com e sem coberturas comestíveis a base de quitosana armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração estão descritas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Segundo Oregel-Zamudio et al. (2017), os valores de sólidos solúveis durante o amadurecimento dos morangos podem variar entre 4,6% e 11,9%. Na presente

pesquisa, todos os morangos apresentaram teor de sólidos solúveis dentro desta faixa recomenda acima. No entanto, ao final do período de armazenamento em ambas as temperaturas, a amostra controle exibiu teor de sólidos solúveis significativamente maior ($p < 0,05$) do que as amostras com coberturas comestíveis a base de quitosana. Isso ocorreu porque a amostra controle continuou com seu metabolismo ativo, favorecendo a conversão do amido em ácido e açúcar, o que contribuiu para o aumento do seu °Brix (CAO et al., 2015). Esse resultado está de acordo com outros estudos que avaliaram apenas o gel de quitosana como cobertura comestível em morangos (PETRICCIONE et al., 2015), goiabas (HONG et al., 2012), uvas (VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014a), mamão (ALI et al., 2011) e tomates (GUERRA et al., 2015) e observaram menores valores de °Brix nessas frutas.

Os morangos com as coberturas comestíveis apresentaram menores valores de sólidos solúveis no final do período de armazenamento porque a quitosana modifica a atmosfera interna da fruta ocasionando redução no nível de O_2 e/ou aumento no nível de CO_2 , o que reduz a taxa de respiração e a atividade metabólica da fruta, reduzindo também a conversão de açúcares em CO_2 e água (GASEMNEZHAD et al., 2011).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no teor de sólidos solúveis dos morangos com as coberturas a base de quitosana. Isso sugere, portanto, que a ação da quitosana em manter o conteúdo de sólidos solúveis dos morangos independe do seu emprego na forma de gel ou nanopartículas.

Os valores de acidez titulável dos morangos com e sem cobertura comestível foram mantidos durante o período de armazenamento a temperatura ambiente. Segundo Gol et al. (2013), a acidez titulável está diretamente relacionada a quantidade de ácidos orgânicos presentes na fruta e no caso do morango os principais ácidos são o cítrico e o málico. Uma redução na acidez pode ocorrer devido a mudanças no metabolismo da fruta ou a utilização dos ácidos orgânicos no processo respiratório (HAJJI et al., 2018). As coberturas comestíveis reduzem a taxa de respiração da fruta e, portanto, retardam a utilização dos ácidos orgânicos o que mantém os valores de acidez titulável durante o armazenamento (YAMAN; BAYOINDIRLI, 2002).

Os morangos armazenados em temperatura de refrigeração também mantiveram os valores de acidez titulável em relação ao dia 0. Contudo, no dia 12, os morangos cobertos com o gel enriquecido com as nanopartículas diferiram significativamente ($p < 0,05$) da amostra controle e apresentaram o menor valor de acidez titulável. Isso ocorreu devido aos baixos valores de acidez titulável que essa amostra de morango já apresentava desde o início das análises. A cobertura comestível apenas manteve esses valores o que mostra que o gel enriquecido com nanopartículas é capaz de retardar o metabolismo da fruta, o que conseqüentemente diminui o consumo dos ácidos orgânicos, mantendo a acidez titulável. A manutenção da acidez titulável dos morangos é importante também porque favorece a manutenção da qualidade organoléptica dessa fruta (YANG et al., 2010).

Outro parâmetro físico-químico que demonstra a capacidade das coberturas comestíveis produzidas na presente pesquisa em retardar o amadurecimento dos morangos é o índice de maturação. O índice de maturação é um dos mais importantes parâmetros para avaliar a qualidade dos morangos, além de determinar a harmonia do *flavour* da fruta e a aceitabilidade por parte do consumidor (PETRICCIONE et al., 2015).

Os morangos armazenados em temperatura ambiente com as coberturas a base de quitosana diminuíram seus índices de maturação a partir do 3º dia de análise. Além disso, nesta mesma temperatura, as amostras com as coberturas diferiram significativamente ($p < 0,05$) ao final do período de armazenamento quando comparados com a amostra controle. Resultado semelhante ao encontrado por Perdonés et al. (2012) que utilizou coberturas de quitosana com óleo essencial de limão em morangos.

O aumento do índice de maturação durante o armazenamento está associado a progressão amadurecimento da fruta (PERDONÉS et al., 2012). Os baixos índices de maturação nas amostras com cobertura mostram a capacidade que as coberturas com quitosana aplicadas nos morangos armazenados em temperatura ambiente têm em retardar a atividade metabólica do fruto.

Contudo, em refrigeração, ao final do armazenamento, os morangos com e sem cobertura obtiveram índices de maturação que não diferiram significativamente. Resultado semelhante ao encontrado por Valenzuela et al. (2015). Segundo esses

autores, o aumento do índice de maturação durante no final do armazenamento é resultado do processo de senescência da fruta.

Tabela 10 - Média dos valores dos parâmetros físico-químico dos morangos armazenadas a temperatura ambiente (25°C) por 6 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	3	6
Sólidos solúveis (%)			
Controle	8,00(±0.02) ^{Aa}	8,27(±0.23) ^{Aa}	8,27(±0.23) ^{Aa}
Glicerol	8,20(±0.02) ^{Aa}	7,20(±0.00) ^{Bb}	8,10(±0.00) ^{Aa}
Gel	8,46(±0.58) ^{Aa}	7,17(±0.06) ^{Bb}	7,20(±0.00) ^{Bb}
Nano	8,13(±0.12) ^{Aa}	7,20(±0.00) ^{Bb}	6,93(±0.46) ^{Bb}
N + G	8,03(±0.06) ^{Aa}	7,20(±0.00) ^{Bb}	7,20(±0.00) ^{Bb}
Acidez titulável (% ácido cítrico)			
Controle	1,15(±0.01) ^{Aa}	0,88(±1.13) ^{Ab}	1,04(±0.02) ^{Aa}
Glicerol	1,07(±0.08) ^{Aab}	1,16(±0.05) ^{Aa}	1,18(±0.02) ^{Aa}
Gel	1,00(±0.01) ^{Bab}	1,06(±0.01) ^{Aab}	1,10(±0.01) ^{Aa}
Nano	1,06(±0.00) ^{Bab}	1,18(±0.03) ^{Aa}	1,12(±0.04) ^{Aba}
N + G	0,98(±0.01) ^{Ab}	1,11(±0.03) ^{Aab}	1,18(±0.11) ^{Aa}
Maturity index			
Controle	7,04(±0.04) ^{Aa}	9,38(±1.04) ^{Aa}	8,12(±0.16) ^{Aa}
Glicerol	7,59(±0.74) ^{Aa}	6,24(±0.26) ^{Ab}	6,89(±0.13) ^{Aab}
Gel	8,29(±0.59) ^{Aa}	6,82(±0.04) ^{Bb}	6,54(±0.08) ^{Bb}
Nano	7,64(±0.13) ^{Aa}	6,10(±0.14) ^{Bb}	6,03(±0.32) ^{Bb}
N + G	8,20(±0.06) ^{Aa}	6,48(±0.16) ^{Bb}	6,12(±0.59) ^{Bb}
pH			
Controle	3,58(±0.02) ^{Aa}	3,49(±0.02) ^{Bb}	3,05(±0.00) ^{Cb}
Glicerol	3,41(±0.01) ^{Ac}	3,42(±0.02) ^{Ac}	3,06(±0.08) ^{Bb}
Gel	3,49(±0.01) ^{Ab}	3,52(±0.02) ^{Ab}	3,45(±0.01) ^{Bab}
Nano	3,51(±0.01) ^{Ab}	3,41(±0.01) ^{Ac}	3,76(±0.57) ^{Aa}
N + G	3,50(±0.01) ^{Bb}	3,58(±0.01) ^{Aa}	3,39(±0.02) ^{Cab}
Umidade (%)			
Controle	94,69(±0.42) ^{Aa}	91,69(±0.00) ^{Aa}	88,22(±4.76) ^{Aa}
Glicerol	94,34(±0.42) ^{Aa}	92,62(±0.30) ^{Ba}	91,66(±0.15) ^{Ca}
Gel	93,94(±0.09) ^{Aa}	92,55(±0.14) ^{Ba}	92,12(±0.08) ^{Ba}
Nano	94,58(±0.21) ^{Aa}	92,14(±0.43) ^{Ba}	90,54(±0.23) ^{Ca}
N + G	94,31(±0.13) ^{Aa}	92,00(±0.47) ^{Ba}	91,40(±0.30) ^{Ba}
Antocianina (mg/100g)			
Controle	29,13(±0.02) ^{Ac}	25,97(±0.01) ^{Cc}	26,30(±0.03) ^{Ba}
Glicerol	37,04(±0.02) ^{Aa}	27,71(±0.08) ^{Bb}	25,02(±0.04) ^{Cb}
Gel	28,41(±0.05) ^{Ad}	23,98(±0.06) ^{Be}	23,51(±0.01) ^{Cc}
Nano	32,49(±0.01) ^{Ab}	25,66(±0.08) ^{Bd}	21,60(±0.01) ^{Cd}
N + G	26,00(±0.04) ^{Be}	28,72(±0.17) ^{Aa}	21,14(±0.05) ^{Ce}

^{a-e} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

^{A-C} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Tabela 11 - Média dos valores dos parâmetros físico-químico dos morangos armazenadas a temperatura de refrigeração (12°C) por 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
Sólidos solúveis (%)					
Controle	8,07(±0.12) ^{Bb}	8,13(±0.06) ^{Ba}	8,27(±0.23) ^{Ba}	8,53(±0.46) ^{Ba}	9,60(±0.00) ^{Aa}
Glicerol	8,47(±0.23) ^{Aa}	8,03(±0.06) ^{Aab}	8,13(±0.23) ^{Aa}	8,53(±0.46) ^{Aa}	8,67(±0.23) ^{Ab}
Gel	8,00(±0.00) ^{Ab}	8,00(±0.00) ^{Ab}	8,00(±0.00) ^{Aa}	8,27(±0.23) ^{Aa}	8,40(±0.04) ^{Ab}
Nano	8,07(±0.12) ^{Bb}	8,03(±0.06) ^{Bab}	8,00(±0.00) ^{Ba}	8,00(±0.00) ^{Ba}	8,40(±0.00) ^{Ab}
N + G	8,00(±0.00) ^{Ab}	8,00(±0.00) ^{Ab}	8,00(±0.00) ^{Aa}	8,00(±0.00) ^{Aa}	8,27(±0.23) ^{Ab}
Acidez titulável (% ácido cítrico)					
Controle	1,06(±0.01) ^{Aa}	1,04(±0.02) ^{Aa}	1,11(±0.08) ^{Aa}	1,06(±0.11) ^{Aa}	1,14(±0.02) ^{Aa}
Glicerol	1,18(±0.01) ^{Aa}	0,89(±0.42) ^{Ba}	1,02(±0.06) ^{ABab}	0,94(±0.01) ^{Ba}	1,14(±0.05) ^{Aa}
Gel	1,10(±0.01) ^{Aa}	1,00(±0.01) ^{Ab}	0,92(±0.01) ^{Bb}	0,93(±0.04) ^{Ba}	1,08(±0.02) ^{Ab}
Nano	0,97(±0.00) ^{Aa}	0,78(±0.23) ^{Aa}	1,02(±0.02) ^{Ab}	1,10(±0.06) ^{Aa}	1,08(±0.01) ^{Ab}
N + G	1,02(±0.15) ^{Aa}	1,00(±0.00) ^{Aa}	1,03(±0.00) ^{Ab}	1,05(±0.03) ^{Aa}	1,01(±0.00) ^{Ab}
Maturity index					
Controle	7,58(±0.05) ^{Aa}	7,69(±0.24) ^{Aa}	7,39(±0.31) ^{Ab}	8,34(±0.89) ^{Aa}	8,38(±0.16) ^{Aa}
Glicerol	7,14(±0.20) ^{Ba}	9,00(±0.43) ^{Aa}	8,00(±0.22) ^{ABab}	8,98(±0.67) ^{Aa}	7,76(±0.34) ^{Ab}
Gel	7,30(±0.04) ^{Ba}	8,02(±0.57) ^{ABa}	8,74(±0.07) ^{Aa}	8,78(±0.04) ^{Aa}	7,55(±0.11) ^{Ba}
Nano	8,24(±0.00) ^{Aa}	8,08(±0.76) ^{Aa}	7,80(±0.16) ^{Ab}	7,28(±0.37) ^{Aa}	7,74(±0.05) ^{Aa}
N + G	7,96(±1.17) ^{Aa}	8,00(±0.00) ^{Aa}	7,76(±0.00) ^{Ab}	7,62(±0.20) ^{Aa}	8,12(±0.28) ^{Aa}
pH					
Controle	3,45(±0.01) ^{Ab}	3,47(±0.01) ^{Ab}	3,30(±0.07) ^{Bc}	3,32(±0.00) ^{Bc}	3,33(±0.00) ^{Bd}
Glicerol	3,41(±0.01) ^{Cc}	3,50(±0.01) ^{Aa}	3,36(±0.00) ^{Bbc}	3,37(±0.01) ^{Bc}	3,37(±0.01) ^{Bcd}
Gel	3,46(±0.01) ^{Cb}	3,50(±0.00) ^{BCa}	3,52(±0.01) ^{Ba}	3,57(±0.00) ^{Aa}	3,54(±0.00) ^{Ab}
Nano	3,51(±0.00) ^{Aa}	3,41(±0.00) ^{Bc}	3,38(±0.00) ^{CDbc}	3,37(±0.00) ^{Dc}	3,39(±0.01) ^{Cc}
N + G	3,44(±0.01) ^{Ab}	3,46(±0.01) ^{Ab}	3,43(±0.02) ^{Ab}	3,45(±0.04) ^{Ab}	3,44(±0.01) ^{Ab}
Umidade (%)					
Controle	91,46(±0.06) ^{Ba}	91,27(±0.47) ^{Ba}	91,48(±0.09) ^{Bb}	91,88(±0.13) ^{Ba}	92,86(±0.17) ^{Ab}
Glicerol	90,94(±0.85) ^{Aa}	92,38(±0.48) ^{Aa}	92,80(±0.12) ^{Aa}	91,65(±0.74) ^{Aa}	92,91(±0.11) ^{Ab}
Gel	91,06(±0.12) ^{Ba}	91,48(±0.11) ^{Ba}	92,65(±0.17) ^{Aa}	92,49(±0.21) ^{Aa}	92,91(±0.08) ^{Ab}
Nano	90,78(±0.18) ^{Da}	91,31(±0.08) ^{CDa}	92,13(±0.28) ^{ABab}	91,60(±0.18) ^{BCa}	92,66(±0.15) ^{Ab}
N + G	92,08(±0.01) ^{Ca}	92,44(±0.04) ^{BCa}	92,98(±0.37) ^{ABa}	92,42(±0.01) ^{BCa}	93,42(±0.11) ^{Aa}
Antocianina					
Controle	28,60(±0.00) ^{Ac}	28,23(±0.03) ^{Ab}	25,98(±0.01) ^{Bab}	23,62(±0.01) ^{Cc}	22,71(±0.31) ^{Db}
Glicerol	39,88(±0.03) ^{Aa}	31,69(±0.58) ^{Ba}	24,87(±1.17) ^{Cb}	19,97(±0.04) ^{De}	21,05(±0.06) ^{Dc}
Gel	30,01(±0.16) ^{Ab}	24,54(±0.02) ^{Ed}	26,43(±0.02) ^{Da}	28,11(±0.03) ^{Ba}	27,64(±0.00) ^{Ca}
Nano	27,53(±0.00) ^{Ad}	26,68(±0.20) ^{Bc}	22,52(±0.00) ^{Cc}	21,89(±0.04) ^{Dd}	22,50(±0.02) ^{Cb}
N + G	22,40(±0.01) ^{De}	25,31(±0.24) ^{Bd}	25,68(±0.01) ^{Ab}	24,51(±0.01) ^{Cb}	22,51(±0.01) ^{Db}

^{a-e} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

^{A-E} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Dentre as amostras com tratamento apenas as com a cobertura de nanopartículas e gel enriquecido com nanopartículas apresentaram manutenção durante todos os dias dos seus índices de maturação. Diferentemente do que ocorreu nos morangos cobertos com glicerol e com gel de quitosana que apresentaram aumento dos seus índices de maturação durante o período de análise. Portanto, as coberturas de nanopartículas de quitosana e de gel enriquecido com nanopartículas mostraram-se mais eficazes em manter a uniformidade dos índices de maturação dos morangos armazenados em temperatura ambiente, conseqüentemente retardando sua senescência.

O retardo na senescência dos morangos com cobertura comestível a base de quitosana é observado também no conteúdo de antocianina dessa fruta. Todas as amostras analisadas apresentaram diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no conteúdo de antocianina quando comparada aos valores iniciais desse pigmento no início do período de armazenamento. Contudo, no último dia do armazenamento em temperatura ambiente a amostra controle apresentou o maior conteúdo de antocianina, diferindo significativamente de todas as outras amostras.

As coberturas comestíveis agem como uma barreira efetiva entre a fruta e o meio ambiente e a formação dessa barreira modifica as concentrações de CO_2 e O_2 na fruta afetando a síntese e degradação de antocianina. Portanto, o maior teor de antocianina na amostra controle pode estar relacionado ao avanço do processo de amadurecimento do fruto que inclui a síntese de pigmentos a partir da glicose (MENG et al., 2008).

Porém, a antocianina, pigmento responsável pela coloração vermelha dos morangos, reflete na qualidade sensorial e nos benefícios a saúde que essa fruta apresenta (VAN DE VELDE et al., 2013). Portanto, baixos valores desse pigmento pode comprometer a aceitabilidade sensorial da fruta. Em temperatura de refrigeração os morangos cobertos com gel enriquecido com nanopartículas mantiveram seu conteúdo de antocianina quando comparamos o primeiro e último dia de análise, mostrando-se efetivo em manter indiretamente a qualidade sensorial dos morangos mesmo depois de 12 dias de armazenamento refrigerado.

Com relação ao pH das frutas, houve uma tendência na diminuição do pH das amostras em relação aos valores do início e do final do período de armazenamento

dos morangos. Resultado semelhante ao encontrado por Velickova et al. (2013). Segundo Famiani et al. (2015), na polpa de diversas frutas ocorre um aumento de ácidos orgânicos durante grande parte do seu desenvolvimento e amadurecimento. Tem sido mostrado que o principal ácido orgânico acumulado nos morangos maduros é o ácido cítrico (FAMIANI et al., 2005; OREGEL-ZAMUDIO et al., 2017), o qual pode estar envolvido na diminuição do pH observada nas amostras.

Os morangos cobertos com nanopartículas e com gel enriquecido com nanopartículas e armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração, respectivamente, foram os únicos que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de pH durante todos os dias avaliados, o que sugere um retardo na senescência dessas amostras. É importante ressaltar que apenas as coberturas que tinham em sua composição nanopartículas de quitosana (sozinhas ou misturadas ao gel) foram capazes manter os valores de pH e retardar a senescência das frutas. Isso mostra que quando a quitosana está no formato de nanopartículas é possível que ela potencialize seus efeitos protetores contribuindo para a conservação dos parâmetros físico-químicos das frutas, algo que foi sugerido também por Castelo Branco Melo et al. (2018).

A determinação do teor de umidade dos morangos mostrou que ao final do período de armazenamento em temperatura ambiente a umidade das amostras não diferiu significativamente entre si ($p > 0,05$). Comportamento que foi repetido nas frutas armazenadas em refrigeração. A única exceção foram os morangos cobertos com gel enriquecido com nanopartículas, os quais apresentaram no dia 12 o maior teor de umidade que diferiu significativamente ($p < 0,05$) de todas as outras amostras.

Com base nesses dados é possível observar que a temperatura de armazenamento não interferiu de forma decisiva no controle da perda de umidade dos morangos, diferentemente do relatado por Vasconcelos de Oliveira et al. (2014a). Segundo Meng et al. (2008), a temperatura ambiente aumenta o metabolismo respiratório da fruta favorecendo a perda de umidade. No entanto, Castelo Branco Melo et al. (2018) sugere que o maior tempo de armazenamento das frutas em temperatura de refrigeração (12 dias) em relação as frutas que permaneceram em temperatura ambiente (6 dias) pode favorecer também a um avanço no metabolismo das frutas o que contribuiu para maior perda de umidade.

A cobertura feita da associação do gel com nanopartículas aplicada nos morangos armazenados em refrigeração mostra que a associação destas duas formas da quitosana, gel e nanopartículas, pode melhorar de forma significativa as propriedades de barreira de uma cobertura comestível. Segundo Amarante et al. (2001), as trocas gasosas entre a fruta e a atmosfera ocorre, frequentemente, através de poros abertos e da alta permeabilidade da pele da fruta. As coberturas de quitosana agem formando uma barreira entre a fruta e o ambiente externo, evitando dessa forma a perda de umidade (GUERREIRO et al., 2015). Quando associamos a esse tipo de cobertura a nanopartículas criamos um duplo efeito bloqueador, já que além da barreira formada pelo filme de quitosana teremos também o bloqueio dos poros presentes nas frutas pelas nanopartículas (CASTELO BRANCO MELO et al., 2018).

Além disso, é importante destacar que a concentração do gel e das nanopartículas (2mg/ml + 1mg/ml) na cobertura feita da associação dos dois é muito inferior a concentração que foi utilizada nas coberturas feitas apenas com o gel de quitosana (5mg/ml) e apenas com as nanopartículas (2,5mg/ml). Isso nos mostra que as duas formas de quitosana apresentam uma potencialização de suas propriedades de barreira quando juntas, mesmo em baixas concentrações. Portanto, a aplicação da nanotecnologia pode ser uma boa alternativa para melhorar as propriedades da quitosana, assim como, aumentar o custo benefício da utilização de coberturas comestíveis a base desse polímero (ESHGHI et al., 2014).

Evolução da cor

Os resultados da análise da cor dos morangos não refrigerados e refrigerados encontram-se na Tabela 12 e 13, respectivamente. Ao final do período de armazenamento, todos os morangos apresentaram uma diferença significativa na cor ($p < 0,05$), resultado semelhante ao encontrado por Perdones et al. (2012) e Velickova et al. (2013). As únicas exceções foram as amostras refrigeradas e cobertas com o gel e as nanopartículas de quitosana. Essas amostras mantiveram constantes seus valores de L ($p > 0,05$) durante todos os dias de análise.

A perda de água e o escurecimento superficial são um dos responsáveis por causar a diminuição do brilho em frutas sem coberturas comestíveis como pode ser observado na presente pesquisa e em outros estudos (BRASIL et al., 2012;

PERDONES et al., 2012; VELICKOVA et al., 2013; CASTELO BRANCO MELO et al., 2018). O escurecimento durante o armazenamento está relacionado também ao maior metabolismo da fruta em que ocorrem diversas reações enzimáticas e não enzimáticas (ADILLETA et al., 2016). Nesse sentido, as coberturas a base de quitosana produzidas na presente pesquisa agem diminuindo o processo metabólico dos morangos e com isso evitando o seu escurecimento, o que é potencializado em temperatura de refrigeração.

As temperaturas mais baixas do armazenamento refrigerado contribuíram, portanto, para a manutenção dos valores de L dos morangos cobertos com gel e nanopartículas, separadamente. Pois, segundo Velickova et al. (2013), temperaturas elevadas de armazenamento contribuem com o aumento da respiração da fruta e favorecem a ocorrência de alguns processos enzimáticos responsáveis pelo escurecimento dos morangos.

Os valores do ângulo hue permaneceram praticamente constantes durante o período de armazenamento de todas as amostras analisadas, resultado de acordo com o relatado por Perdones et al. (2012) e Guerreiro et al. (2015). Além disso, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a amostra controle e as amostras com coberturas ao final do período de armazenamento em ambas as temperaturas. Segundo o sistema CIELAB, se o ângulo estiver entre 0°C e 90°C , quanto maior este for, mais amarelo é o fruto, e, quanto menor este for, mais vermelho é o fruto. Com base nisso, é possível afirmar que as coberturas comestíveis produzidas não afetaram a coloração vermelha dos morangos, um importante atributo sensorial dessa fruta.

Tabela 12 – Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura ambiente (25°C) durante 6 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento		
	0	3	6
L*			
Controle	46,39 (±2.11) ^{Aa}	35,05 (±4.5H4) ^{Bb}	34,91 (±1.11) ^{Ba}
Glicerol	41,23 (±0.61) ^{Ab}	34,60 (±2.05) ^{Bb}	38,44 (±1.32) ^{Aa}
Gel	49,32 (±2.26) ^{Aa}	35,86 (±0.54) ^{Bb}	37,01 (±2.26) ^{Ba}
Nano	45,78 (±0.26) ^{Aa}	43,99 (±0.99) ^{Aa}	36,84 (±1.46) ^{Ba}
N + G	46,81 (±0.12) ^{Aa}	37,70 (±2.73) ^{Bab}	38,33 (±1.71) ^{Ba}
h*_{ab}			
Controle	25,02 (±0.96) ^{Aa}	24,77 (±5.04) ^{Ab}	27,86 (±2.92) ^{Aab}
Glicerol	25,89 (±0.19) ^{Aa}	25,21 (±2.45) ^{Ab}	19,46 (±4.46) ^{Ac}
Gel	18,99 (±1.77) ^{Bb}	33,71 (±1.75) ^{Aa}	33,70 (±0.70) ^{Aa}
Nano	24,69 (±0.44) ^{Aa}	21,68 (±0.64) ^{Bb}	24,48 (±0.20) ^{Abc}
N + G	23,55 (±0.04) ^{Aa}	23,42 (±1.03) ^{Ab}	22,62 (±3.33) ^{Abc}
C*_{ab}			
Controle	30,89 (±2.32) ^{Ab}	29,44 (±4.99) ^{Aab}	32,06 (±5,32) ^{Aab}
Glicerol	27,44 (±3.53) ^{Ab}	22,99 (±4.62) ^{Abc}	21,74 (±2,60) ^{Ac}
Gel	37,45 (±0.58) ^{Aa}	18,06 (±0.81) ^{Cc}	25,27 (±0.80) ^{Bbc}
Nano	27,08 (±1.42) ^{Bb}	36,02 (±1.03) ^{Aa}	36,34 (±3.06) ^{Aa}
N + G	37,45 (±1.36) ^{Aa}	28,03 (±6.07) ^{Bac}	25,70 (±1.04) ^{Bbc}

^{a-c} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

^{A-C} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Nano=nanopartículas de quitosana; Gel= gel de quitosana e N+G=mistura do gel de quitosana com as nanopartículas.

Tabela 13 – Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos armazenados em temperatura de refrigeração (12°C) durante 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
L*					
Controle	45,20 (±2.55) ^{Aa}	39,75 (±5.07) ^{ABa}	35,74 (±3.01) ^{Bb}	35,32 (±1.19) ^{Bb}	33,04 (±1.24) ^{Bb}
Glicerol	44,26 (±2.56) ^{Aa}	38,08 (±1.49) ^{BCa}	41,01(±1.62) ^{ABab}	36,88 (±0.70) ^{BCb}	35,16 (±1.29) ^{Cab}
Gel	37,87 (±6.37) ^{Aa}	39,70 (±1.23) ^{Aa}	37,34 (±0.14) ^{Ab}	37,92 (±0.74) ^{Aab}	33,84 (±0.38) ^{Ab}
Nano	43,37 (±9.13) ^{Aa}	39,34 (±1.11) ^{Aa}	44,71 (±1.39) ^{Aa}	41,38 (±0.64) ^{Aa}	38,12 (±0.92) ^{Aa}
N + G	46,30 (±4.86) ^{Aa}	41,32 (±1.06) ^{ABa}	40,83(±3.03) ^{ABab}	39,00(±1.45) ^{ABab}	34,84 (±1.68) ^{Bb}
h*_{ab}					
Controle	19,06 (±1.34) ^{Ba}	24,87(±6.00) ^{ABab}	33,64 (±3.21) ^{Aa}	26,12(±2.90) ^{ABb}	24,15 (±0.24) ^{Bb}
Glicerol	21,61 (±2.90) ^{Ba}	25,95 (±2.80) ^{Ba}	23,62 (±0.94) ^{Bbc}	25,61 (±4.66) ^{Bb}	36,24 (±3.28) ^{Aa}
Gel	28,47 (±7.41) ^{Ba}	25,09 (±2.34) ^{Bab}	26,51 (±2.74) ^{Bb}	44,34 (±8.53) ^{Aa}	27,41 (±0.79) ^{Bab}
Nano	21,61 (±5.93) ^{Aba}	27,87 (±1.43) ^{Aa}	16,00 (±0.66) ^{Bd}	24,20 (±0.94) ^{Ab}	25,34 (±0.32) ^{Aab}
N + G	17,58 (±4.06) ^{Ba}	17,25 (±0.20) ^{Bb}	19,03(±1.46) ^{ABcd}	23,80 (±1.90) ^{ABb}	29,66 (±8.82) ^{Aab}
C*_{ab}					
Controle	36,91 (±7.00) ^{Aa}	24,16 (±3.90) ^{ABb}	26,83 (±4.99) ^{ABb}	23,50 (±6.21) ^{ABb}	23,20 (±1.14) ^{Bb}
Glicerol	39,21 (±2.06) ^{Aa}	29,32 (±5.30) ^{BCb}	33,96 (±4.70) ^{ABb}	24,61 (±1.05) ^{Cb}	27,67 (±1.70) ^{BCb}
Gel	34,51 (±5.52) ^{Aa}	29,22 (±5.32) ^{Ab}	33,95 (±2.66) ^{Ab}	27,78 (±2.60) ^{Ab}	28,49 (±5.79) ^{Ab}
Nano	33,16 (±1.51) ^{Ca}	35,55(±6.45) ^{BCab}	49,99 (±1.17) ^{Aa}	43,11 (±3.12) ^{ABa}	41,95 (±2.10) ^{ACa}
N + G	32,71 (±2.42) ^{Ba}	43,90 (±5.43) ^{Aa}	44,01 (±1.17) ^{Aa}	37,30 (±2.16) ^{ABa}	23,57 (±3.09) ^{Cb}

^{a-c} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

^{A-D} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Nano=nanopartículas de quitosana; Gel= gel de quitosana e N+G=mistura do gel de quitosana com as nanopartículas.

Com relação aos valores de croma, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o controle e as frutas com coberturas a base de quitosana. A única exceção foi amostra coberta com nanopartículas e armazenadas em refrigeração. Quanto menor o valor do croma menos vívida a cor da fruta (VELICKOVA et al., 2013). Neste caso, a cobertura de nanopartículas nos morangos refrigerados foi a única que manteve a cor mais viva das frutas no último dia de análise, com o maior valor de croma que diferiu significativamente ($p < 0,05$) de todas as outras amostras.

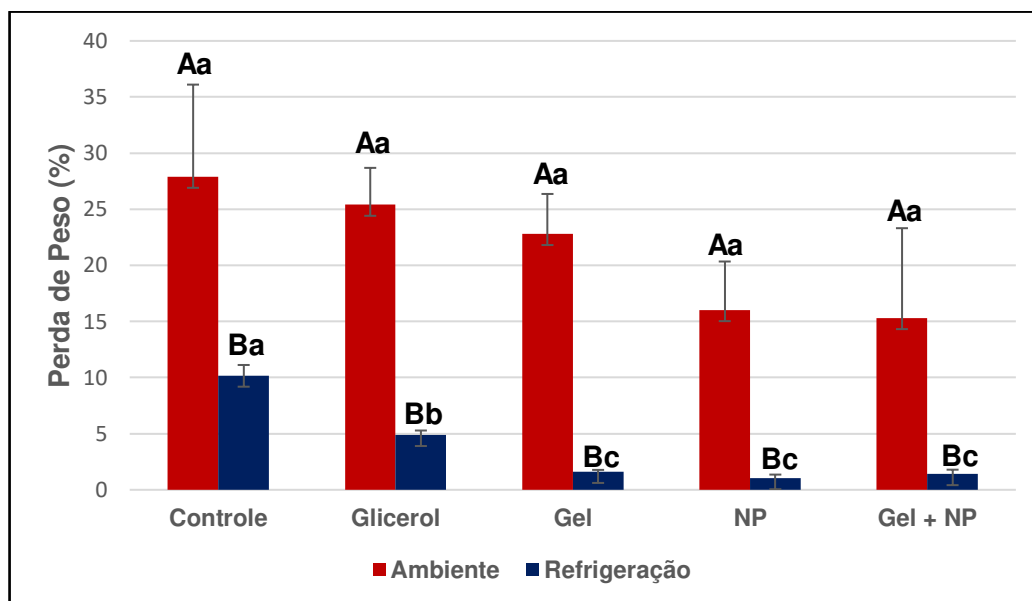
De um modo geral, as coberturas comestíveis produzidas mantiveram as características da cor dos morangos. As amostras refrigeradas cobertas com nanopartículas destacaram-se devido a manutenção do seus valores de L e maiores valores de croma, o que sugere que esse tipo de cobertura foi mais efetivo em evitar o escurecimento dos morangos e manter sua cor mais viva. Isso reflete o retardo do processo de senescência das amostras com nanopartículas.

Perda de peso

A perda de peso em frutas reflete principalmente a taxa de respiração e a perda de umidade para o ambiente externo. Os morangos são altamente susceptíveis a uma rápida perda de peso devido a sua pele extremamente fina, resultando no encolhimento e enfraquecimento do tecido da fruta (VELICKOVA et al., 2013). Vários fatores podem afetar a perda de peso cujos principais são os tratamentos pós-colheita aplicados a fruta e a temperatura de armazenamento (PETRICCIONE et al., 2015).

As amostras armazenadas a temperatura ambiente apresentaram elevada perda de peso e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados dessas amostras (**Figura 24**). Segundo Garcia et al. (1998), a máxima perda de peso comercialmente tolerada para os morangos é de 6%. Então, todas as amostras de frutas com e sem coberturas analisadas na presente pesquisa e armazenadas em temperatura ambiente estão fora do limite comercialmente aceitável, o que mostra que nenhuma cobertura comestível a base de quitosana foi capaz de evitar uma relevante perda de peso nessa temperatura avaliada.

Figura 24 - Percentual de perda de peso dos morangos com e sem coberturas armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração.



^{a-c} Diferentes letras na mesma temperatura significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.
^{A-B} Diferentes letras entre as temperaturas significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

Isso pode ter ocorrido devido a temperatura de armazenamento, já que a temperatura de refrigeração diminuiu em torno de 15 vezes a perda de peso dos morangos quando comparada com a temperatura ambiente. Diminuição semelhante a encontrada por Ventura-Aguilar et al. (2018) que utilizou coberturas a base de quitosana e extrato de canela.

Como foi relatado anteriormente, a perda de peso em frutas está associada com o processo de senescência e evaporação da água da fruta, portanto, em altas temperaturas ocorre um aumento da taxa respiratória da fruta, associada a uma perda de umidade e peso (ALI et al., 2015). Por isso, a perda de peso foi mais intensa nas amostras armazenadas em temperatura ambiente do que em refrigeração, resultado semelhante ao encontrado por Castelo Branco Melo et al. (2018) que utilizou coberturas de gel de quitosana + nanopartículas de quitosana para conservação de uvas.

De acordo com Khalifa et al. (2016), a quitosana é capaz de diminuir a perda de peso em frutas devido a sua propriedade filmogênica, na qual esse polímero age como uma barreira ao vapor de água e as trocas gasosas entre a fruta e o ambiente externo. Nos morangos armazenados em refrigeração, a cobertura feita com gel de

quitosana não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparada as coberturas com nanopartículas e gel + nanopartículas. Kaewklin et al. (2018) avaliou a perda de peso de tomates cobertos com filme de quitosana e filme feito com nanocompósito de quitosana-dióxido de titânio e observou que também não houve diferença significativa de perda de peso entre os tomates cobertos com o nanocompósito e com a quitosana sozinha.

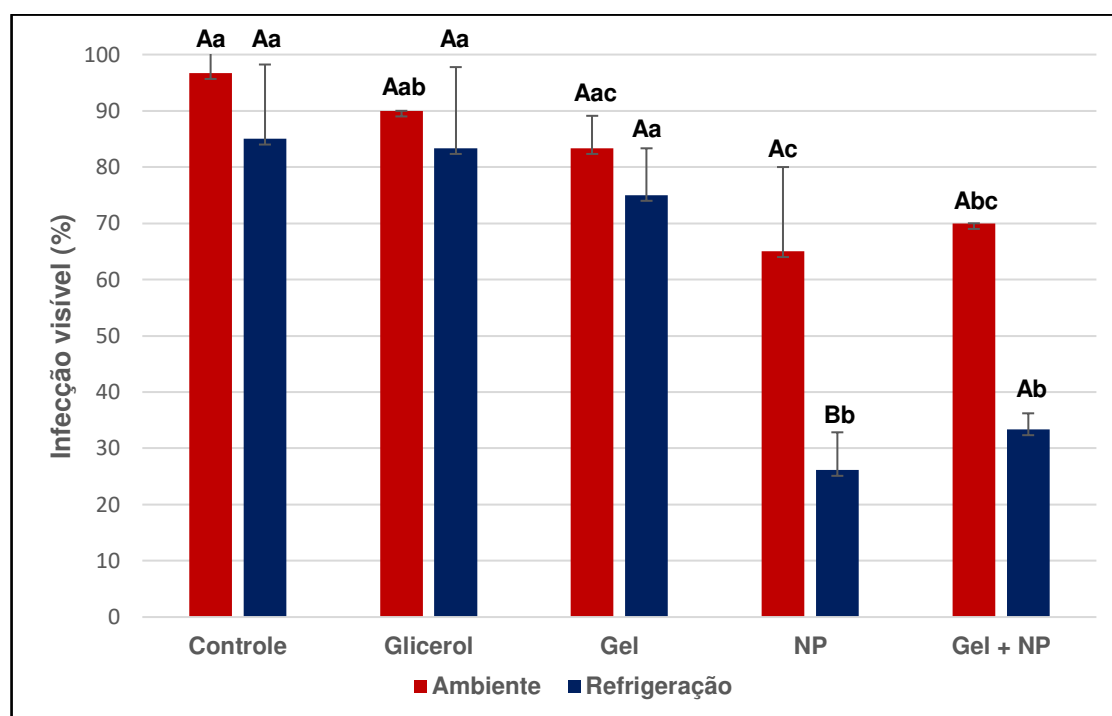
Portanto, a prevenção da perda de peso está mais relacionada a formação da barreira externa produzida pela cobertura comestível do que a forma do polímero presente nessa cobertura. No entanto, todos morangos com as coberturas comestíveis produzidas a base de quitosana e armazenados sob refrigeração apresentaram perda de peso comercialmente aceitável segundo Garcia et al. (1998).

Percentual de infecção visível

Devido a sua elevada atividade fisiológica, os morangos são frutas altamente perecíveis e que apresentam uma pequena vida de prateleira (Dhital et al., 2017). A utilização de coberturas de gel de quitosana para preservação microbiana de morangos tem sido extensivamente relatada por outros autores (Gol et al., 2013; Velickova et al., 2013). No entanto, até o momento a utilização de coberturas a base de nanopartículas de quitosana ainda é bastante incipiente. Segundo Castelo Branco Melo et al., (2018), a propriedade antimicrobiana da quitosana pode ser melhorada quando ela apresenta-se no formato de nanopartículas.

A Figura 25 mostra que os menores percentuais de infecção visível foram encontrados nos morangos cobertos com nanopartículas sozinhas ou associadas ao gel. Essas frutas obtiveram resultados que diferiram significativamente da amostra controle ($p < 0,05$) em ambas as temperaturas. Esse resultado reforça, portanto, a melhora da ação conservadora da quitosana quando no formato de nanopartículas, pois o resultado dos morangos cobertos apenas com o gel não diferiu significativamente ($p > 0,05$) em nenhuma das temperaturas em relação ao controle.

Figura 25 - Percentual de infecção visível dos morangos com e sem coberturas armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração.



^{a-c} Diferentes letras em uma mesma temperatura significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

^{A-B} Diferentes letras entre as temperaturas significam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de tukey.

De acordo com Hajji et al. (2018), a quitosana desempenha uma dupla função com relação a inibição de infecções em frutas. Ela interfere no crescimento fúngico, evitando, desta forma, o crescimento microbiano. Além disso, ela age também ativando muitos processos biológicos de defesa do tecido da fruta, como a produção de enzimas de defesa (El Gaouth et al., 1992; Gol et al., 2013; Velickova et al., 2013; Hajji et al., 2018).

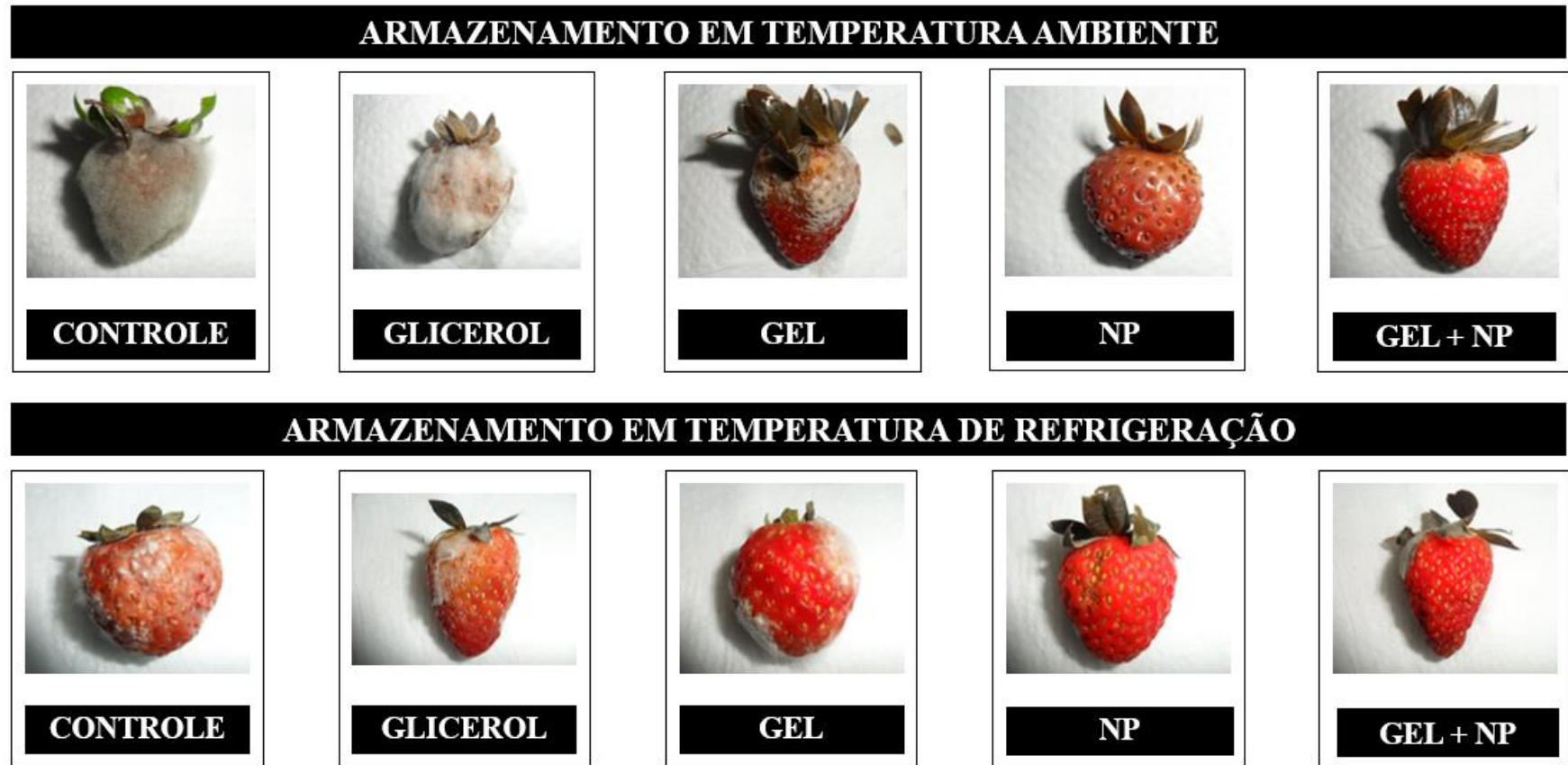
A cobertura comestível em si é outro fator que contribui para um menor percentual de infecção visível em frutas, pois ela age como uma barreira que evita o contato do morango com microrganismos externos (Gol et al., 2013; Hajji et al., 2018). A cobertura age também retardando a senescência das frutas e

segundo Neeta et al. (2013), a resistência a infecções fúngicas pode ser melhorada através do retardo da senescência.

Quando a cobertura de nanopartículas foi aplicada nos morangos refrigerados, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no seu percentual de infecção em relação aos morangos com esse mesmo tipo de cobertura, mas armazenados em temperatura ambiente (Figura 26). Assim como na presente pesquisa, Castelo Branco Melo et al. (2018) também observou que em temperaturas de refrigeração a ação conservadora da cobertura a base de nanopartículas de quitosana é potencializada. De acordo com Meng et al. (2008), baixas temperaturas diminuem o processo fisiológico da fruta e enfraquecem os patógenos, reduzindo a incidência de podridões.

Portanto, a presente pesquisa reafirma a ideia de que a utilização das quitosana no formato de nanopartículas potencializa sua ação conservadora em frutas, no caso em morangos, e essa ação pode ser ainda mais efetiva quando a fruta em questão for armazenada em baixas temperaturas. O gel de quitosana ainda é uma efetiva substância utilizada como cobertura comestível para preservação de frutas, não devendo ser subestimado. No entanto, com o advento da nanotecnologia modificações na escala nanométrica deste biopolímero trazem novas alternativas para a utilização do gel como cobertura comestível.

Figura 26 - Aparência dos morangos com (glicerol, gel, NP = nanopartículas e gel + NP = gel enriquecido com nanopartículas) e sem coberturas comestíveis depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente.



Bioatividade das coberturas comestíveis sobre o crescimento fúngico nos morangos

Os efeitos das coberturas comestíveis feitas com o gel, as nanopartículas e a mistura de ambos nos morangos infectados previamente com os fungos fitopatogênicos e armazenados durante 6 e 12 dias em temperatura ambiente e refrigeração estão presentes nas Tabela 14 e 15, respectivamente. A análise estatística revelou que em todos os grupos de fungos testados, os morangos sem cobertura comestível (controle) não diferiram significativamente ($p > 0,05$) dos morangos cobertos com glicerol. Portanto, a utilização do glicerol na cobertura comestível de nanopartículas de quitosana fúngica não interfere na ação antifúngica dessas partículas, servindo apenas como meio inerte de dispersão das nanopartículas para a produção da cobertura.

Em ambas as temperaturas, a cobertura comestível produzida com a mistura do gel + nanopartículas foi a que apresentou um menor percentual de infecção pelo *B. cinerea*. Esse resultado *in vivo* está de acordo com os resultados *in vitro* do percentual de inibição micelial e germinação dos esporos. Como relatado anteriormente pelo método *checkboxboard*, a mistura das duas formas de quitosana, gel e nanopartículas, apresenta um efeito aditivo o que significa que quando juntas ocorre uma potencialização de seu efeito antifúngico. Isso ocorre, segundo Lee et al. (2010), devido a uma melhor dispersão das partículas quando diluídas no gel, o que faz com que sejam mais eficientemente transportadas para a parede celular causando distúrbios no fungo em questão.

O gel foi a substância a base de quitosana que apresentou a menor capacidade de inibir o crescimento do *B. cinerea* nos morangos. Contudo o gel de quitosana contribuiu muito para reduzir a progressão da infecção e sua disseminação durante todo o período de armazenamento, além disso manteve os morangos com uma aparência de maior frescor quando comparado com as frutas controle e as cobertas com glicerol (Figura 27). Resultado semelhante ao relatado por Awad (2017) que também observou esse efeito da quitosana em diferentes variedades de morangos contaminados com *B. cinerea*.

Em temperatura de refrigeração, a cobertura feita com o gel apresentou um percentual de morangos infectados com *B. cinerea* semelhante ($p > 0,05$) aos morangos controle, aos cobertos com nanopartículas e aos cobertos com glicerol. Segundo Meng et al. (2008) e Vasconcelos de Oliveira et al. (2014), durante o armazenamento das frutas em temperatura de refrigeração ocorre uma diminuição dos processos fisiológicos da fruta e um enfraquecimento da patogenicidade dos fungos contaminantes. Portanto, como resultado desse enfraquecimento os morangos armazenados em temperatura de refrigeração apresentaram um menor percentual de infecção pelo *B. cinerea*, o que reflete na análise estatística desse grupo que não apresentou diferença significativa entre os grupos controle, glicerol, gel e nanopartículas.

Tabela 14 - Percentual de frutas armazenadas a temperatura ambiente e infectadas artificialmente com os fungos *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger* depois de expostas a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas e gel enriquecido com nanopartículas.

Amostras	Percentual de frutas infectadas (%)		
	<i>B. cinerea</i> URM 2802	<i>R. stolonifer</i> URM 3728	<i>A. niger</i> URM 7282
Gel	90,00% ($\pm 0,00$) ^b	75,55% ($\pm 13,46$) ^b	18,00% ($\pm 8,00$) ^b
NP	70,00% ($\pm 0,00$) ^c	30,00% ($\pm 0,00$) ^c	13,33% ($\pm 5,77$) ^b
Gel + NP	60,00% ($\pm 0,00$) ^d	25,00% ($\pm 0,00$) ^c	15,33% ($\pm 2,52$) ^b
Glicerol	96,67% ($\pm 2,89$) ^a	100,0% ($\pm 0,00$) ^a	70,00% ($\pm 0,00$) ^a
Controle	100,0% ($\pm 0,00$) ^a	100,0% ($\pm 0,00$) ^a	70,00% ($\pm 1,00$) ^a

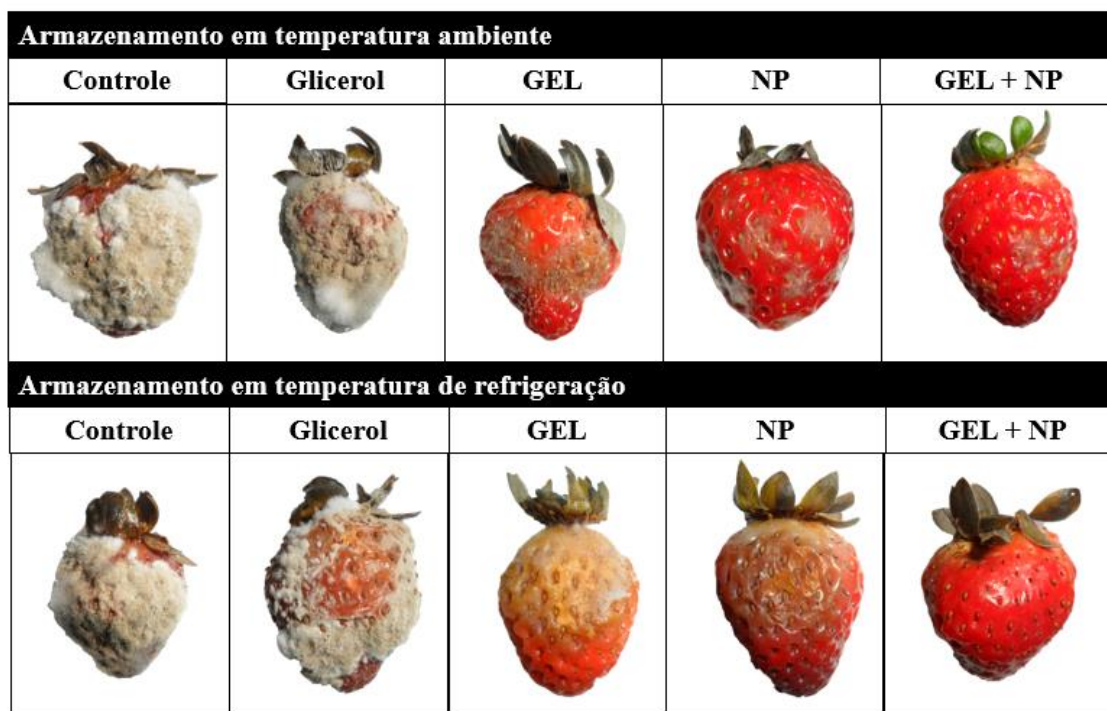
^{a-d} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 15 - Percentual de frutas armazenadas em refrigeração e infectadas artificialmente com os fungos *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger* depois de expostas a diferentes concentrações de gel de quitosana, nanopartículas e gel enriquecido com nanopartículas.

Amostras	Percentual de frutas infectadas (%)		
	<i>B. cinerea</i> URM 2802	<i>R. stolonifer</i> URM 3728	<i>A. niger</i> URM 7282
Gel	70,00% ($\pm 17,32$) ^{ab}	75,00% ($\pm 0,00$) ^a	75,00% ($\pm 15,00$) ^b
NP	66,67% ($\pm 5,77$) ^{ab}	40,00% ($\pm 5,00$) ^b	50,00% ($\pm 0,00$) ^c
Gel + NP	63,33% ($\pm 15,28$) ^{bc}	10,00% ($\pm 0,00$) ^c	40,00% ($\pm 0,00$) ^c
Glicerol	95,00% ($\pm 5,00$) ^a	81,10% ($\pm 18,28$) ^a	95,00% ($\pm 5,00$) ^a
Controle	96,67% ($\pm 5,77$) ^a	85,00% ($\pm 8,66$) ^a	100,0% ($\pm 0,00$) ^a

^{a-c} Diferentes letras na mesma coluna significam diferença significativa ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 27 - Aparência dos morangos com e sem coberturas comestíveis (concentração CIM) previamente infectados com *B. cinerea* depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente



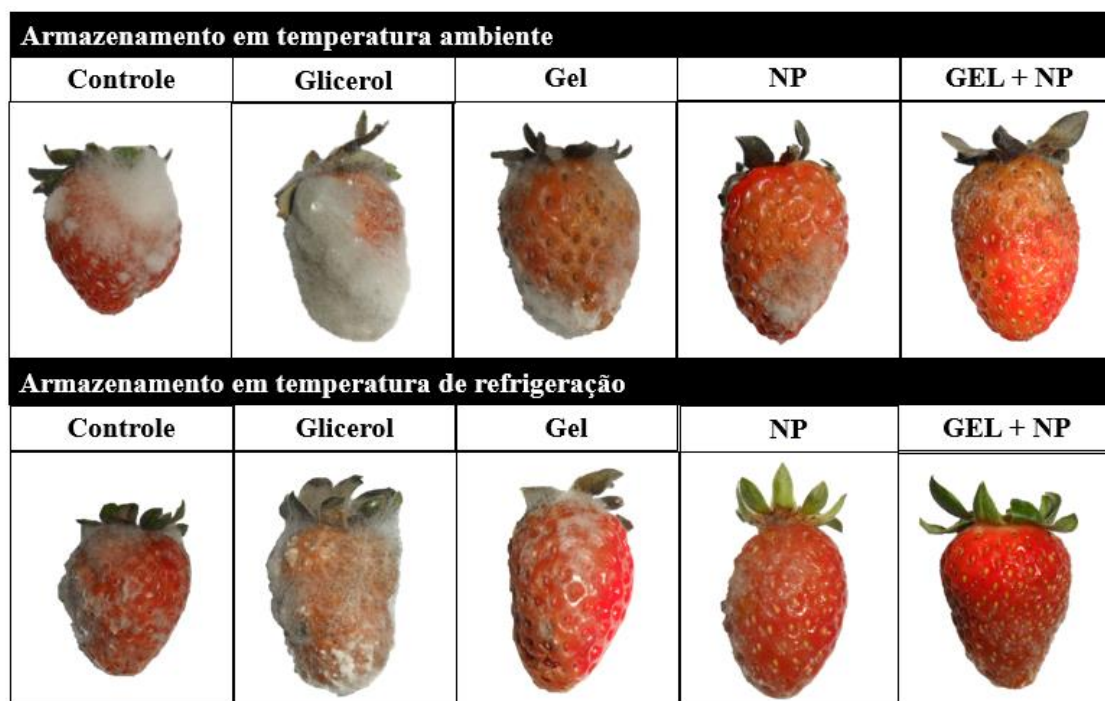
Com relação ao percentual de infecções causado pelo *R. stolonifer*, o gel de quitosana mostrou-se novamente como a substância a base de quitosana que apresentou a menor capacidade de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico em questão. No entanto, em temperatura ambiente, o efeito do gel de quitosana foi estatisticamente melhor ($p < 0,05$) do que o observado nas amostras controle e com glicerol. Hernández-Lauzardo et al. (2010), também demonstraram que o gel de quitosana foi capaz de retardar o crescimento do *R. stolonifer* em outros tipos de frutas como mamão, pêra e tomate.

O mecanismo pelo qual a quitosana afeta o crescimento e a sobrevivência dos fungos nas frutas está relacionado a capacidade que esse polímero tem em interferir com as cargas negativas das macromoléculas presentes na superfície fúngica, formando complexos polieletrólitos, afetando a permeabilidade celular fúngica e causando vazamento de componentes intracelulares (VASCONCELOS DE OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, Pastor et al. (2011) sugerem que o efeito da quitosana em inibir o crescimento fúngico em frutas está relacionado também a capacidade que a

quitosana tem em aumentar a produção de enzimas de defesa (ex: quitinases) e atividade antioxidante da própria fruta (ex: polifenol oxidase, peroxidase).

Por outro lado, em refrigeração não foi observada diferença significativa entre o gel e as amostras controle e cobertas com glicerol. Segundo Romanazzi et al. (2013), a podridão mole causada pelo *R. stolonifer* é capaz de se espalhar em temperaturas superiores a 4-6°C. Por isso, durante o armazenamento em refrigeração houve uma menor capacidade de disseminação desse fungo que refletiu em menores percentuais de infecção para as frutas controle e as cobertas com glicerol quando comparadas com o mesmo tipo de tratamento nos morangos armazenados em temperatura ambiente (Figura 28).

Figura 28 - Aparência dos morangos com e sem coberturas comestíveis (concentração CIM) previamente infectados com *R. stolonifer* depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente.

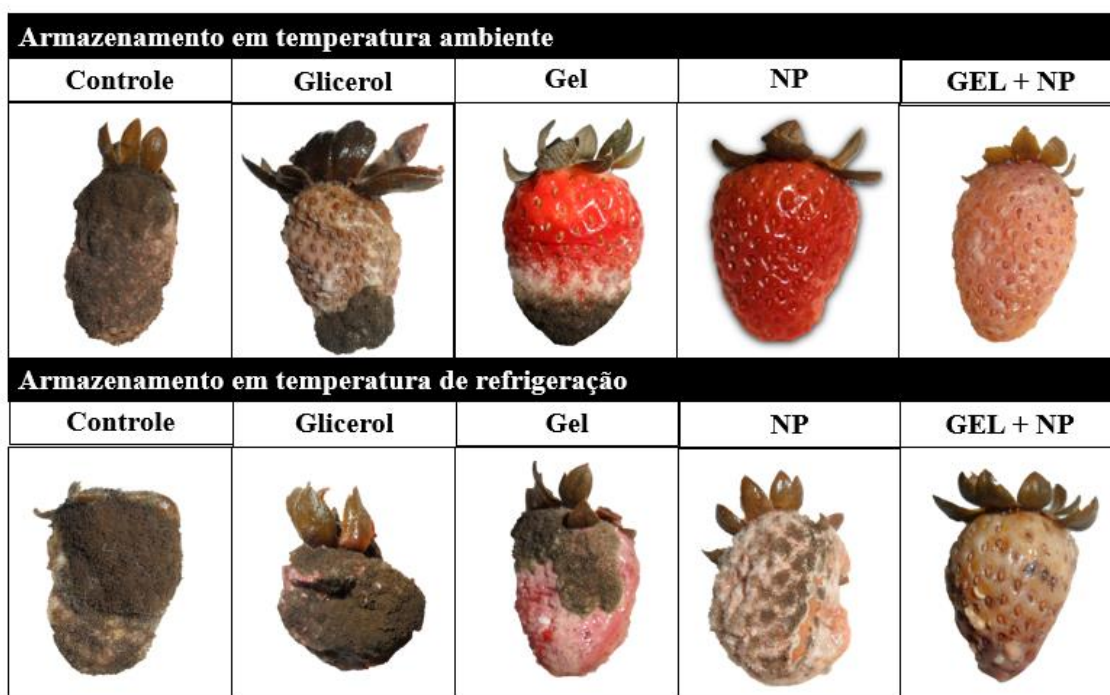


Assim como foi observado para o *B. cinerea*, a cobertura feita com o gel enriquecido com nanopartículas de quitosana fúngica mostrou-se, novamente, a substância mais efetiva em inibir o crescimento do *R. stolonifer* nos morangos. Contudo, em temperatura ambiente a cobertura feita apenas com nanopartículas apresentou percentual de inibição sem diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a

cobertura feita com a associação de gel + nanopartículas. Resultado semelhante foi encontrado para o *A. niger*, em ambas as temperaturas. Isso sugere que a ação antifúngica potencializada dessas coberturas deve-se principalmente a presença das nanopartículas, como já relatado anteriormente por Castelo Branco Melo et al. (2018) para bactérias patogênicas de origem alimentar.

O *A. niger* foi o fungo que apresentou as maiores alterações visuais na fruta, como pode ser observado na Figura 29. Segundo Wang et al. (2015) e Lichter et al. (2002), a infecção deste agente patogênico em frutos caracteriza-se pelo amolecimento do local infectado seguido do desenvolvimento do mofo escuro que corresponde as estruturas de frutificação dos fungos. Estas alterações foram mais intensas nos morangos controle e cobertos com glicerol, o que nos confirma a importância das coberturas comestíveis a base de quitosana em retardar o crescimento fúngico.

Figura 29 - Aparência dos morangos com e sem coberturas comestíveis (concentração CIM) previamente infectados com *A. niger* depois de 6 e 12 dias de armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente.



Segundo Kim et al. (2014), aplicação do inóculo fúngico na fruta antes da cobertura comestível faz com que a cobertura produza um ambiente com baixa concentração de oxigênio para os microrganismos, agindo como uma barreira. No entanto, a presença de nanopartículas nas coberturas não só intensifica a ação antimicrobiana do gel, como também favorece a formação de uma atmosfera modificada na fruta, suprimindo ainda mais o fornecimento de oxigênio para os microrganismos presentes (Castelo Branco Melo et al., 2018).

Portanto, na presente pesquisa a cobertura comestível a base de quitosana mais efetiva em inibir o crescimento de fungos pós-colheita em morangos foi o gel enriquecido com nanopartículas. A nanotecnologia, nesse caso, mostrou-se uma alternativa capaz de potencializar a ação do já convencional gel de quitosana, que junto as nanopartículas, mesmo em baixas concentrações conseguiu inibir o crescimento dos fungos fitopatógenos dos morangos, os quais são, segundo Usall et al. (2016), os principais responsáveis pelas perdas pós-colheita dessa fruta.

Análise sensorial

Os morangos controle e os cobertos com coberturas comestíveis a base de quitosana foram submetidos, 3 dias após a aplicação das coberturas, aos testes de aceitação, intenção de compra e ordenação preferencial por 100 avaliadores não treinados.

O grupo controle recebeu as maiores notas para todos os atributos analisados (Tabela 16). No entanto, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para os atributos de cor, sabor, aroma, firmeza e avaliação global entre o grupo controle e as frutas cobertas com gel de quitosana e nanopartículas separadamente. Portanto, esse resultado sugere que a forma do polímero de quitosana (gel ou nanopartículas) utilizada na cobertura comestível não influenciou na qualidade sensorial dos morangos.

De acordo com Vargas et al. (2006), a quitosana pode apresentar um sabor adstringente devido a sua diluição ser feita em meio ácido, mas esse sabor não foi observado nos morangos cobertos com gel de quitosana e nanopartículas separadamente, pois a análise sensorial foi realizada no terceiro dia de

armazenamento das frutas. Resultado semelhante ao encontrado por Velickova et al. (2013) e Castelo Branco et al. (2018).

Tabela 16 - Efeito das coberturas comestíveis nos atributos sensoriais dos morangos sem coberturas comestíveis (controle) e cobertos com glicerol, gel de quitosana (gel), nanopartículas de quitosana fúngica (NP) e gel de quitosana enriquecido com nanopartículas (N + G) armazenados em refrigeração.

Atributos	Controle	Glicerol	Gel	NP	N + G
Aparência	7.81(±1.51) ^a	6.61(±1.79) ^c	6.94(±1.91) ^{bc}	7.52(±1.44) ^{ab}	6.94(±1.75) ^{bc}
Cor	7.87(±1.46) ^a	6.95(±1.66) ^c	7.30(±1.71) ^{abc}	7.64(±1.44) ^{ab}	7.07(±1.75) ^{bc}
Aroma	7.50(±1.55) ^a	6.95(±1.70) ^{ab}	7.22(±1.55) ^{ab}	7.20(±1.56) ^{ab}	6.78(±1.66) ^b
Firmeza	8.04(±1.04) ^a	7.64(±1.43) ^a	7.52(±1.41) ^a	7.70(±1.49) ^a	7.59(±1.37) ^a
Sabor	7.61(±1.80) ^a	6.86(±1.75) ^b	7.51(±1.53) ^{ab}	7.58(±1.70) ^a	6.85(±1.94) ^b
Avaliação Global	7.77(±1.46) ^a	7.02(±1.48) ^b	7.43(±1.42) ^{ab}	7.68(±1.47) ^a	6.85(±1.71) ^b

^{a-c} Diferentes letras na mesma linha significam diferença significativa ($p < 0.05$) de acordo com o teste de tuckey.

É importante ressaltar que a cobertura comestível feita de gel e nanopartículas misturados diferiram significativamente ($p < 0,05$) do grupo controle para todas os atributos avaliados, exceto para a firmeza. Como foi previamente relatado, a cobertura feita de gel + nanopartículas aplicada aos morangos armazenados em refrigeração mostraram que a associação dessas duas formas de quitosana (gel e nanopartículas) podem melhorar significativamente as propriedades de barreira de uma cobertura comestível. Os morangos cobertos com gel + nanopartículas mantiveram seu índice de maturação e o pH, além de apresentaram também um maior percentual de umidade. A aplicação desse tipo de cobertura pode retardar o processo de amadurecimento da fruta, o que contribuiu para a menor aceitação desse tipo de amostra.

O teste de preferência mostrou que 38% dos avaliadores preferiram a amostra controle, seguida por 27% que preferiram a amostra com a cobertura comestível feita apenas de nanopartículas de quitosana, 18% gel de quitosana, 9% glicerol e gel + nanopartículas. Esse resultado é um reflexo do teste de aceitação, no qual esses dois tipos de amostras (controle e nanopartículas) obtiveram as maiores notas para a maioria dos parâmetros avaliados.

Com relação ao teste de intenção de compra, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as amostras com e sem coberturas. O grupo dos morangos cobertos apenas com as nanopartículas foram os únicos que não diferiram significativamente do grupo controle. Esses dois grupos apresentaram notas (controle: $4,34 \pm 1.03$ e nanopartículas: $4,09 \pm 1.10$) em torno de 4 pontos, o que significa que os provadores “possivelmente comprariam” esses morangos.

A terceira maior nota do teste de intenção de compra foi atribuída aos morangos cobertos com gel de quitosana ($3,84 \pm 1.10$) e cuja nota não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) da nota atribuída para o grupo das nanopartículas. Nenhuma diferença ($p > 0,05$) na intenção de compra do grupo coberto com glicerol ($3,61 \pm 1.10$) e com gel + nanopartículas ($3,64 \pm 1.14$) foi evidenciada. Esses dois grupos foram os menos aceitos tanto no teste de intenção de compra como também observado no resultado do teste de ordenação preferência.

No entanto, todas as amostras exibiram notas em torno de 4 pontos o que mostra que os avaliadores “possivelmente comprariam” essas frutas. Notas semelhantes foram relatadas por Castelo Branco Melo et al. (2018) que utilizou coberturas comestíveis feitas com gel quitosana + nanopartículas de quitosana fúngica para aplicação em uvas. As médias das notas observadas no teste de intenção de compra favorecem a utilização das coberturas produzidas na presente pesquisa a nível comercial.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O planejamento fatorial das nanopartículas de quitosana mostrou os melhores parâmetros para a produção das partículas utilizadas na presente pesquisa. Com a definição desses parâmetros, foram preparadas partículas com tamanho (331,1nm), potencial zeta (+34mV) e PDI (0,377) necessários para a produção de coberturas comestíveis conservadoras de morangos pós-colheita e atóxicas ao consumidor.

A avaliação da estabilidade coloidal das suspensões de nanopartículas de quitosana mostrou que a suspensão das partículas produzidas devem ser armazenadas em temperatura ambiente ou refrigeração. Essas temperaturas foram capazes de manter os parâmetros físico-químicos das partículas por mais tempo e conseqüentemente preservar sua atividade antifúngica, viabilizando seu uso na área de alimentos como agente antimicrobiano.

O uso das coberturas comestíveis a base de quitosana foi efetivo em manter a qualidade físico-química, microbiológica e sensorial de morangos pós-colheita. Essas coberturas atuaram como barreira à perda de umidade e de peso mantiveram o teor de sólidos solúveis e o índice de maturação das frutas nos valores mais baixos, preservaram a cor, antocianina, pH e acidez titulável dos morangos e reduziram o percentual de infecção visível, favorecendo dessa forma a conservação após a colheita dos morangos, sem, contudo, interferir nas características sensoriais dessa fruta.

Além disso, as coberturas apresentaram também uma importante atividade antioxidante segundo os testes de DPPH, ABTS e FRAP. O gel de quitosana enriquecido com nanopartículas destacou-se perante as outras substâncias teste não só com relação a sua relevante atividade antioxidante, mesmo utilizado em baixas concentrações, mas também a suas características conservadoras das qualidades físico-químicas dos morangos.

Todas as coberturas comestíveis a base de quitosana foram capazes também de inibir o crescimento *in vivo* e *in vitro* dos fungos fitopatogênicos de morangos pós-colheita. A mistura do gel com as nanopartículas apresentou um efeito aditivo segundo o método checkboard. Isso influenciou a ação antifúngica dessa substância, já que a

cobertura comestível feita com o gel de quitosana enriquecido com nanopartículas apresentou os melhores resultados antifúngicos.

Portanto, com base nos resultados obtidos, a cobertura comestível formada pela mistura do gel com nanopartículas mostra-se como uma alternativa promissora para conservação pós-colheita de morangos. A aplicação da nanotecnologia em coberturas comestíveis feitas com o convencional gel de quitosana pode melhorar as propriedades antimicrobianas e conservadoras do gel e trazer outros benefícios como um melhor custo benefício, já que há uma diminuição na concentração de quitosana necessária para inibição do crescimento fúngico pós-colheita.

REFERÊNCIAS

Abdollahi M, Hamzehzarghani H, Saharkhiz MJ. Effects of the essential oil of *Zataria Multiflora Boiss*, a thyme-like medicinal plant from Iran on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* both in vitro and on lime fruits. *Journal of Food Safety* 2011; 31:424–432.

Abdallah MR, Mahmaed MA, Mohamed HM, Emara MM. Improving the sensory, physicochemical and microbiological quality of pastirma (A traditional dry cured meat product) using chitosan coating. *LWT-Food Science and Technology* 2017; 86:247-253

Adaskaveg JE, Forster H, Sommer, NF. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: A. Kader (ed) *Postharvest Technology of horticultural Crops*. 4 ed. University of California. Oakland, California, USA. p. 163-195.

Adilleta G, Russo P, Senadera W, Di Matteo M. Drying characteristics and quality of grape under physical pretreatment. *Journal of Food Engineering* 2016; 172:9-18.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

Agrios GN. *Fitopatología*. Second Edition. Limusa. Mexico, D.F. 809, 2001.

Aider M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in food industry. *Food and science and technology* 2010; 43:837-842.

Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 1988; 48:589- 601.

Ali A, Muhammad MTM, Sijam K, Siddiqui Y. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry* 2011; 124:620-626.

Ali A, Noh NH, Mustafa MA. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and shelf life* 2015; 3:56-61.

Allan CR, Hadwiger LA. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall compositions. *Experimental Mycology* 1979; 3:285-287.

Al-Manasir N, Zhu K, Kjoniksen, AL, Knudsen KD, Karlsson G, Nystrom B. Effects of temperature and pH on the contraction and aggregation of microgels in aqueous suspensions. *Journal of Physical Chemistry* 2009; 113:11115-11123.

Al-Naamani L, Dobretsov S, Dutta J. Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2016; 38:231-237.

Amarante C, Banks NH, Ganesh S. Relationship between character of skin cover of coated pears and permeance to water vapour and gases. *Postharvest Biology and Technology* 2001; 21:291-301.

Antunes M.C. Qualidade de frutos de seis cultivares de morangueiro. Dissertação. Universidade Federal do Paraná: Departamento de fitotecnia e fitossanitarismo, 2013.

Arnaud-Stamford TM, Stamford TCM. Caracterização da quitosana e sua aplicação na nanotecnologia. In: FIGUEIREDO et al. *Biotechnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais*. Embrapa/IPA, 2010, 733-761.

Assis OBG, Britto D. Evaluation of the antifungal properties of chitosan coating on cut apples using a non-invasive image analysis technique. *Polymer International* 2011; 60:932-936.

Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2012. *Official methods of analysis of AOAC international (19th ed.)*. Método 934.06, método 981.12, método 920.149, método 932.12.

Awad HM. Antifungal potentialities of chitosan and *Trichoderma* in controlling *Botrytis cinerea*, causing strawberry gray mold disease. *Journal of Plant Protection and Pathology* 2017; 8:371-378.

Azeredo HMC. Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends in food science & Technology* 2013; 30:56-69.

Azevedo JR, Sizillo RH, Brito MB, Costa AMB, Serafini MR, Araújo AAS, Santos MRV, Lira AAM, Nunes RS. Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana-TPP contendo insulina. VII Congresso Brasileiro de análise Térmica e Calorimetria. Abril de 2010. São Paulo, Brasil.

Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2007; 2.3:27-34.

Baptista da Silva S, Ferreira D, Pintado M, Sarmiento B. Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery – *In vitro* tests. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016; 84:112-120.

Baggio JS, Gonçalves FP, Lourenço SA, Tanaka FAO, Pascholati SF, Amorim L. Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot. *Plant Pathology*, 65, 633-642, 2016.

Baggio JS, Hau B, Amorim L. Spatio-temporal analyses of *Rhizopus* rot progress in peach fruit inoculated with *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathology* 2017; 66:1452-1462.

Bardas GA, Veloukas T, Koutita O, Karaoglanidis GS. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qols and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science* 2010; 66:967–973.

Badawy MEI, Rabea EI. Biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2011; 1-29.

Bakshi PS, Selvakumar D, Kadirvelu K, Kumar NS. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2019; in press.

Baswal AK, Dhaliwal HS, Singh Z, Mahajan BVC, Kalia A, Gill KS Influence of carboxy methylcellulose, chitosan and beeswax coatings on cold storage life and quality of Kinnow mandarin fruit. *Scientia Horticulturae* 2020; 260: 108887.

Batista-Baños S, Hernández-Lauzardo NA, Velázquez-Del Valle MG, Hernández-Lopez M, Barka EA, Bosquez-Molina E et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 2006; 25:108-118.

Battistelli MR; De Sanctis R; De Bellis L; Cucchiatini M; Golbi P. *Rhodiola rósea* as antioxidante in red bloods cells: ultrastructural and hemolytic behavior. *Eur. J. Histochem* 2005; 9:243-254.

Berger LR, Stamford TCM, Stamford-Arnaud T, De Aalcântara S, Da Silva A, Da Silva A et al. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15:9082-9102.

Bosquez-Molina E, Ronquillo-De Jesús E, Bautista-Bañose S, Verde-Calvo JR, Morales-López J. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology* 2010; 57:132-137.

Bouchra C, Achouri M, Idrissi Hassani LM, Hmamouchi M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 89:165–169.

Brasil I, Gomes C, Puerta-Gomez A, Castelli-Perez M, Moreira R. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. *LWT – Food Science and Technology* 2012; 47:39-45.

Brust M, Kiely CJ. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2002; 202:175-186.

Bugnicourt L, Alcouffe P, Ladavière C. Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and

colloidally stable objects. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014; 457:476-486.

Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam NY, Hanges WY, Bulder AS, Herr C et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2009; 53:52–62.

Cabañas FJ, Bragulata MR. Black Aspergilli and ochratoxin A-producing species in foods. *Current Opinion in Food Science* 2018; 23:1-10.

Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science* 1997; 63:125-132.

Campana-Filho SP, Britto D, Curti E, Abreu FR, Cardoso MB, Battisti MV, et al. Extração, estruturas e propriedades α – e β - quitina. *Química Nova* 2007; 30:644-650.

Cao F, Guan C, Dai H, Li X, Zhang Z. Soluble solids content is positively correlated with phosphorus content in ripening strawberry fruits. *Scientia Horticulturae* 2015; 195:183-187.

Carâmes ETS, Alamar PD, Poppi RJ, Pallone JAL. Quality control of cashew apple and guava nectar by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 41–46, 2017.

Carmichael PC, Siyoum N, Jongman Ma, Korsten L. Prevalence of *Botrytis cinerea* at different phenological stages of table grapes grown in the northern region of South Africa. *Scientia Horticulturae* 2018; 239; 57-63.

Cartelle M, Zurita J. La nanotecnología en la producción y conservación de alimentos. *Revista Cubana de Alimentación e Nutrição* 2015; 25:184-207.

Castelo Branco Melo NF, Soares BLM, Diniz KM, Leala CF, Canto D, Flores MAP et al. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 2018; 139:56-66.

Castro CB, Manaães-De-Castro R, Medeiros AF, Queiróse A, Ferreira WT, LIMA-Filho JL. Effect of stress on the production of O₂ in alveolar macrophages. *Journal Neuroimmunol.* 2000; 108:68-71.

Cerqueira TS, Jacomino AP, Sasaki FF, Alleoni ACC. Recobrimento de goiabas com filmes proteicos e de quitosana. *Bragantia* 2011; 70:216-221.

Chen W, Li Y, Yang S, Yue L, Jiang Q, Xia W. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2015; 132:574-581.

Chien PJ, Sheu F, Lin HR. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry* 2007; 100:1160-1164.

CIE – Commission Internationale de Éclairage, 1986. *Colourimetry*, second ed. CIE Publication, Vienna, p.78.

Cota-Arriola O, Cortez-Rocha MO, Ezquerra-Brauer JM, Lizardi-Mendonza J, Burgos-Hernández A, Robles-Sánchez RM, et al. Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *Journal of Polymers and the Environmental* 2013; 21:971-980.

Cruz-Romero MC, Murphy T, Morris M, Cummins E, Kerry JP. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control* 2013; 34:393-397.

Cunha Junior LC, Jacomino AP, Ogassavara FO, Trevisan MJ, Parisi MCM. Armazenamento refrigerado de morango submetido a altas concentrações de CO₂. *Horticultura Brasileira* 2012; 30:688-694.

Dagnas S, Membre JM. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection* 2013; 76:538-551.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 2012; 13:414–430.

Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 2004; 21:703-714.

Dhital R, Joshi P, Becerra-Mora N, Umagiliyage A, Chai T, Kohli P et al. Integrity of edible nano-coatings and its effects on quality of strawberries subjected to simulated in-transit vibrations. *LWT-Food Science and Technology* 2017; 80:257-264.

Dias KB, Silva DP, Ferreira LA, Fidelis RR, Costa JL, Lopes Da Silva AL et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2013; 4:184-191.

Dias MSC. Doenças do Morangueiro. *Morango: Tecnologia Inovadora. Informe Agropecuário* 1999; 20:69-74.

Dotto GL, Vieira MLG, Pinto LAA. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. *LWT – Food Science and Technology* 2015; 64:126-130.

Dutcosky, S.D. *Análise sensorial de Alimentos*. 4^a ed. Curitiba: Champagnat: 2013. 531p.

Dyer PS, O'Gorman CM. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Reviews* 2012; 36:165-192.

Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Malcata FX. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy* 2008; 108:1128-1134.

El-Gaouth A, Arul J, Greniers J, Asselin A. Antifungal activity of chitosan on two post-harvest pathogens of strawberry fruit. *Phytopathology* 1992; 82:398-402.

El-Shiekh YWA, El-Din NH, Shaymall MAA, El-Din KAZ. Antifungal activity of some naturally occurring compounds against economically important phytopathogenic fungi. *Nature and Science* 2012; 10:114–123.

Elad Y, Vivier M, Fillinger S. Botrytis: the good, the bad and the ugly. In: Fillinger S, Elad Y, Vivier M. (Eds.), *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. Springer, Heidelberg, Germany, 1–15, 2015.

Erazo A, Mosquera SA, Rodríguez-Paéz JE. Synthesis of ZnO nanoparticles with different morphology: Study of their antifungal effect on strains of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*. *Materials Chemistry and Physics* 2019; 234:172-184.

Eshghi S, Hashemi M, Mohammadi A, Badii F, Mohammadhoseini Z, Ahmadik. Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne) during storage. *Food Bioprocess Technology* 2014; 7:2397–2409.

Fabregas A, Minarro M, Garcia-Montoya E, Perez-Lozano P, Carrillo C, Sarrate R, et al. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 446:199-204.

Fai AEC, Stamford TCM, Stamford-Arnaud TM, Santa-Cruz PA, Silva MCF, Campos-Takaki GM et al. Physico Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. *Molecules* 2011; 16:7143-7154.

Famiani F, Cultreeta NG, Battistelli A, Casulli V, Proietti P, Standardi A, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany* 2005; 56:2959-2969.

Famiani F, Cultreeta NG, Battistelli A, Casulli V, Proietti P, Standardi A, et al. The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents-a review. *Resvista Chapingo Serie Horticultura* 21.

Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surface B Biointerfaces* 2012; 90:21-27.

FAO. Dados agrícolas de FAOSTAT, Disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 18 ago. 2017.

Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisi M, Hadian J. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 2015; 109:145-151.

Faire-Cordero ML, Yáñez-Morales MJ, Ángel DN. Hongos patógenos em fruto defresa (*Fragaria x ananassa Duch.*) em postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatologia* 2003; 33:285-291.

Feliziani E, Romanazzie G. Postharvest decay of strawberry fruit: etiology, epidemiology, and disease management 2016; 6:47-63.

Feng W, Zeng X. Essential oils to control *Alternaria alternate* in vitro and in vivo. *Food Control* 2007; 18:1126-1130.

Frla, N.J.; Marchetti, M.M.; Gonçalves, D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria sp, Rosaceae*) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. *Biota Neotropica* 2007; 7:2.

Fernandes JC, Tavaría FK, Soares JC, Ramos OS, Monteiro MJ, Pintado ME, Malcata FX. Antimicrobial effects of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol.* 2008; 25:922–928.

Francisco EV, García-Estépa RM. Nanotechnology in the agrofood industry. *Journal of food engineering* 2018; 238:1-11.

Freire PLL, Stamford TCM, Albuquerque AJR, Sampaio FC, Cavalcantea HMM, Macedo RO et al. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2015; 45:183-187.

Galvan Marquez I, Akuaku J, Cruz I, Cheetham J, Golshani A, Smith ML. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 2013; 164:108-112.

Gan Q, Wang T, Cochrane C, Mccarrona P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surface B:Biointerfaces* 2005; 44:65–73.

Garcia JM, Medina RJ, Olías JM. Quality of strawberries automatically packed in different plastic films. *Journal of Food Science* 1998; 63:1037-1041.

García-Rincón J, Vega-Pérez J, Guerra-Sánchez MG, Hernández-Lauzardo NA, Peña-Díaz A, Velázquez-Del Valle MG. Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuil. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010; 93:275-278.

Gasemnezhad M, Nezhad MA, Gerailoo S. Changes in postharvest quality of loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits influenced by chitosan. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 2011; 54:40-45.

Ghaouth AE, Arul J, Ponnampalam R, Boulet M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 1991; 56:1618–1620.

Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S et al. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct.* 2015; 6:1386-1398.

Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 2012; 28:9-19.

Gol NB, Patel PR, Rao R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology* 2013; 85:185-195.

Gougouli M, Koutsoumanis KP. Risk assessment of fungal spoilage: A case study of *Aspergillus niger* on yogurt. *Food Microbiology* 2017; 65:264-273.

Guerra ICD, Lima De Oliveira PD, Pontes ALS, Lúcio ASSC, Tavares JF, Barbosa-Filho JM et al. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology* 2015; 214:168-178.

Guerreiro AC, Gago CM, Faleiro ML, Miguel MG, Antunes MD. The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology* 2015; 110:51-60.

Hajji S, Younes I, Affes S, Boufi S, Nasri M. Optimization of the formulation of chitosan edible coating supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocolloids* 2018; 83:375-392.

Hamed I, Özogul F, Regenstein JM. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology* 2016; 48:40-50.

Han C, Zhao Y, Leonard SW, Traber MG. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology* 2004; 33:67–78.

Hanaor DAH, Michelazzi M, Leonelli C, Sorrell CC. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *Journal of the European Ceramic Society* 2012; 32:235-244.

Hashad RA, Ishak RAH, Fahmy S, Mamsour S, Geneidi AS. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: optimization of formulation parameters for improving process yield at a novel pH using artificial neural networks. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016; 86:50-58.

Hashmi MS, East AR, Palmer JS, Heyes JA. Hypobaric treatment stimulates defence-related enzymes in strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 2013; 85:77-82.

Hassan B, Chatha SAS, Hussain AI, Zia KM, Akhtar N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 109:1095-1107.

Henz GP, Reis A, Silva KCC, Pereira SF. Incidência de doenças pós-colheita em frutos de morango produzidos no Distrito Federal. *Embrapa Hortaliças Boletim técnico* 2008; 13.

Hernández-Lauzardo AN, Batista-Baños S, Velásquez-Dela Valle MG, Méndez-Montevalvo MG, Sánchez-Rivera MM, Bello-Pérez LA. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers* 2008; 73:541-7.

Hernandez-Muñoz P, Almenar E, Del Valle V, Velez D, Gavara R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 2008; 110:428–435.

Hong K, Xie J, Zhang L, Sun D, Gong D. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry* 2012; 144:172-178.

Honge SB, Lee M, Kima DH, Varga J, Frisvad e JC, Perrone G. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *Plos One* 2013; 8:1-9.

Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry* 2016; 194:1266-1274.

Hua B, Pan C, Sun Y, Hou Z, Ye H, Hu B, et al. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56:7451-7458.

Hu Y, Jiang X, Ding Y, Ge H, Yuan Y, Yang C. Synthesis and characterization of chitosan-(polyacrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials* 2002; 23:3193-3201.

Huang R, Zhang LJ, Yang L, Che HJ, Jiang DH, Huang HC. Control of Postharvest Botrytis Fruit Rot of Strawberry by Volatile Organic Compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology* 2011; 101:859-869.

Huggins ML. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules:IV. Dependence on concentration. *Journal of the American Chemistry Society* 1942; 64:2716-2718.

Ikeda K, Park P, Nakayashiki H. Cell biology in phytopathogenic fungi during host infection: commonalities and differences. *Journal of General Plant Pathology* 2019.

Ing LY, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials* 2012; 1:1-9.

Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 6. ed., São Paulo: Instituto Adolf Lutz, v. 1, 2008.

Jesen B, Knudsen IMB, Andersen B, Nielsen KF, Thrane U, Jesen DF et al. Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *International Journal of Food Microbiology* 2013; 160:313-322.

Jia X, Chen X, Xu Y, Han X, Xu Z. Tracing transport of chitosan nanoparticles and molecules in Caco-2 cells by fluorescent labelling. *Carbohydrate Polymers* 2009; 78:323-329.

Jitareerat P, Paumchai S, Kanlayanarat S, Sangchote S. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*mangifera indica*) fruit. *New Zealand Journal of Crop Science and Horticulture*, 2007; 35:211-218.

Jonassen H, Kjoniksen AL, Hiorth M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules* 2012; 13:3747-3756.

Johnson CS, Gabriel DA. Laser Light Scattering – A book review. *Biophysical Journal* 1995; 69:287.

Kalia A, Parshad VR. Novel trends to revolutionize preservation and packaging of fruits/fruit Products: Microbiological and Nanotechnological perspectives. *Critical reviews in food science and nutrition* 2013, 55:159-18.

Kaewklin P, Siripatrawan U, Suwanagul A, Lee YS. Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit. *International Journal of Biomacromolecules* 2018; 112: 523-529.

Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010; 62:3–11.

Kerch G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends in Food Science & Technology* 2015; 46:159-166.

Khalifa I, Barakat H, El-Mansy HA, Soliman SA. Enhancing the keeping quality of fresh strawberry using chitosan-incorporated olive processing wastes. *Food Bioscience* 2016; 13:69-75.

Kheiri A, Moosawi Jorf SA, Malhipour A, Saremi H, Nikkhah M. Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of Fusarium head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) *in vitro* and greenhouse. International Journal of Biological Macromolecules 2016; 93:1261-1272.

Kiill CP, Barud HS, Santagneli SH, Ribeiro SJL, Silva AM, Tercjak A, Gutierrez J, Pironi AM, Gremião MPD. Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. Carbohydrate Polymers 2016; 157:1695-1702.

Kim LH, Oh YA, Lee H, Song KB, Min SC. Grape berry coatings of lemongrass oil-incorporating nanoemulsion. Food Science and Technology 2014; 58:1-10.

Kogkaki EA, Sofoulis M, Natskoulis P, Tarantilis PA, Pappas CS, Panagou EZ. Differentiation and identification of grape-associated black aspergilli using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic analysis of mycelia. International Journal of Food Microbiology 2017; 259:22-28.

Kong C, Fodjo EK, Li D, Cai Y, Huang D, Wang Y, et al. Chitosan-based adsorption and freeze deproteinization: improved extraction and purification of synthetic colorants from protein-rich food samples. Food Chemistry 2015; 188:240-247.

Kong J, Zhang Y, Ju J, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Quek SY, Yao W. Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. Food Chemistry 2019; 285:380-388.

Kong M, Chen XG, Xing, K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. International Journal of Food Microbiology 2010; 144:51-63.

Kumar S, Shukla A, Baul PP, Mitra A, Halder D. Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. Food Packaging and Shelf Life 2018; 16:178-184.

Lafarga T, Colás-Medà P, Abadías M, Aguiló-Aguayo I, Bobo G, Viñas I. Strategies to reduce microbial risk and improve quality of fresh and processed strawberries: A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies 2019; 52:197-212.

Larrauri JA, Rupérez P, Saura-Calizto F. Effect of drying Temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1997; 45:1390-1393.

Lee SM, Song LC, Lee BS. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. Journal of Chemical Engineering 2010, 27:688-692.

Lees DH, Francis FG. Standardization of pigment analysis in cranberries. Hortscience 1972; 7:83-84.

Li B, Wang W, Zong Y, Qin G, Tian S. Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. *Journal of Proteome Research* 2012; 11:4249–4260.

Liou, Guey-Yuh.; et al. Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. *Mycological Research*, 111, 196-203, 2007.

Liu C, Zheng H, Sheng K, Liu W, Zheng L. Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 2018; 139:47-55.

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* 2007; 44:300-306.

Liu H, Gao C. Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polymers Advanced Technologies* 2009; 20:613-619.

Loh JW, Saunders M, Lim L. Cytotoxicity of monodispersed chitosan nanoparticles against the Caco-2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012; 262:273-282.

Long LT, Tien NTT, Trang NH, Ha TTT, Hieu NM. Study on antifungal ability of water soluble chitosan against green mould infection in harvested oranges. *Journal of Agricultural Science* 2014; 8:205-2013.

Lopes, U.P. Podridões pós-colheita de morango: etiologia e efeito de produtos alternativos. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 2011.

López-león T, Carvalho ELS, Seijo B, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005; 283:344-351.

Lorevice MV, Moura MR, Aouada FA, Mottoso LHC. Development of novel guava puree films containing chitosan nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 2012; 12:2711-2717.

Ma Z, Garrido-Maestu A, Jeong KC. Application, mode of action, and in vitro activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. *Carbohydrate Polymers* 2017; 176:257-265.

Maas JL. *Compendium of Strawberry Diseases*, 2nd ed., APS Press, St. Paul, 1998.

Maftoonazad, N.; Ramaswamy, H. S. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT Food Sci. Technol.* 2005; 38:617–624.

Malvern. Zeta potential - An introduction in 30 minutes. Version 3, Technical Note, 2014c. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/support/resource-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.aspx>>. Acesso em: 10 jan, 2017.

Martinez-Camacho AP, Cortez-Rocha MO, Ezquerra-Brauer JM, Graciano—Erdugo AZ, Rodriguez-Félix F, Castillo-Ortega MM et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers* 2010; 82:305-315.

Massola Junior NS, Kruger TL. Fungos fitopatogênicos. (Ed.). *Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos*. 4 ed., cap. 8, p. 149-206, 2011.

Maysoun A, Mustafa AA, Manickam S, Siddiqui Y. Ultrasound-Assisted Chitosan–Surfactant Nanostructure Assemblies: Towards Maintaining Postharvest Quality of Tomatoes. *Food and Bioprocess Technology* 2014; 7: 2102–2111.

Meng X, Li B, Liu L, Tian S. Physiological responses and quality attributes of table grapes fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry* 2008; 106:501-508.

Mellegard H, Strand SP, Christensen BE, Granum PE, Hardy SP. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 148:48-54.

Melo NFCB. Bioatividade da associação de gel e nanopartículas de quitosana na conservação de uvas (*Vitis labrusca L.*). Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco: Departamento de Nutrição, 2016.

Milioli CC. Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina: Departamento de Engenharia Química, 2011.

Mihindukulasuriya, S.D.F.; Lim, L.T. Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology* 2014; 40:149-167.

Mitcham EJ, Mitchell FG. Postharvest handling systems: small fruits. In: Kader A. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, third ed., University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA, USA, 364–368, 2012.

Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini SM. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* 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* 2015; 28:73-80.

Moussa SH, Tayel AA, Alsohim AS, Abdallah RR. Botryticidal activity of nanosized silver-chitosan composite and its application for the control of gray mold in strawberry. *Journal of Food Science* 2013; 78:10.

Morris GA, Castilé J, Smith A, Adams GG, Harding SE. The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2011; 84:1430-1434.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunological Methods* 1983; 65:55–63.

Mubarakall D, Lewisoscar F, Gopinath V, Alharbi NS, Alharbi SL, Thajuddin N. An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants. *Microbial Pathogens* 2018; 114:323-327.

Mujtaba M, Morsi RE, Kerch G, Elsabee MZ, Kaya M, Labidi J, Khawar KM. Current advancements in chitosan-based film production for food technology: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 121:889-904.

Nafee N, Schneider M, Schaefer UF, Lehr CM. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 381:130-139.

Naskar S, Sharma S, Koutsu K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2019; 49:66-81.

Neeta BG, Pooja RP, Raman Rao TV. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology* 2013; 85:185-195.

Neves, A.L.P. Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina: Departamento de Engenharia Química, 2013.

No HK, Kim SH, Lee SH, Park NY, Prinyawiwatkul W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydrate Polymers* 2006; 65:174-178.

O'Callaghan KAM, Kerry JP. Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures. *Food Control* 2016; 69:256-261.

Oliveira J, Parisi MCM, Baggio JS, Silva PPM, Paviani B, Spoto MHF, Gloria EM. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. *International Journal of Food Microbiology* 2019; 292:150-158.

Oliveira KAR, Berger LRR, Araújo AS, Câmara MPS, Souza EL. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology* 2017; 66:96-103.

Oliveira SMA, Terao D, Dantas SAF, Tavares SCCH. Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Embrapa Informação Tecnológica 2006; 855.

Oregel-Zamudio E, Angoa-Pérez MV, Oyoque-Salcedo G, Aguilar-González CN, Mena-Violante HG. Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. *Scientia Horticulturae* 2014; 214:273-279.

Osherov N, May GS. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters* 2001; 199:153–160.

Palma-Guerrero J, Jansson H, Salinas J, Lopez-Llorca JV. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 104:541-553.

Palma-Guerrero J, Lopez-Jimenez JA, Perez-Berna AJ, Huang IC, Jansson HB, Salinas J, et al. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology* 2010, 75:1021-1032.

Paomephan P, Assavanig A, Chaturongakul S, Candy NC, Bergkvist M, Niamsiri N. Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetables wash disinfectant. *Food Control* 2018; 86:294-301.

Pastor C, Sánchez-González L, Marcilla A, Chiralt A, Cháfer M, González-Martínez C. Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biology and Technology* 2011; 60:64-70.

Perdones A, Sánchez-González L, Chiralt A, Vargas M. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 2012; 70:32–41.

Peretto G, Du W, Avena-Bustillos RJ, Sarreal SBL, Hua SST, Sambo P, Mchugh TH. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology* 2014; 89:11–18.

Petriccione M, Mastrobuoni F, Pasquariello MS, Zampella L, Nobis E, Capriolo G, et al. Effect of chitosan coating on the postharvest quality and antioxidant enzyme system response of strawberry fruit during cold storage. *Foods* 2015; 4:501-523.

Pilon L, Spricigo PC, Miranda M, Moura MR, Assis OBG, Mattoso LHC, et al. Chitosan nanoparticles coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attribute. *International Journal of Food Science and Technology* 2015; 50:440-448.

Pinho Neves AL, Milioli CC, Muller L, Riella HG, Kuhnen NC, Stulzer HK. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014; 445:34-39.

Pisani C, Nguyen TT, Gubler WD. A novel fungal fruiting structure formed by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in grape berries. *Fungal biology* 2015; 119:784-790.

Powelson RL. Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 1960; 50:491-494.

Qi LF, Xu ZR, Jiang X, Hu CH, Zou XF. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 2004; 339:2693-2700.

Qin, Y. The chelating properties of chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science* 1993; 49:727-731.

Qiu M, Wu C, Ren G, Liang X, Wang X, Huang J. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. *Food Chemistry* 2014; 155:105-111.

Rahaine S, Hashemi M, Shojaosadati SA, Moini S, Razavi SH. Nanoparticles based on crocin loaded chitosan-alginate biopolymers: antioxidant activities, bioavailability and anticancer properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017; 99:401-408.

Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesàro A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 455:219-228.

Rasooli I, Abyaneh M.R. Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* 2004; 15:479-483.

Rasooli I, Owlia P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* 2005; 66:2851-2856.

Rasooli, I.; Rezaei, M.B.; Allameh, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oil from thymus eriocalyx and Thymus x-parlock. *Food Control* 2006; 17:359-364.

Rinaudo M, Desbrières J, Le Dung P, Thuy Binh P, Dong NT. NMR investigation of chitosan derivatives formed by the reaction of chitosan with levulinic acid. *Carbohydrate Polymers* 2001; 46:339-348.

Rodrigues FA, Bomfim IDA S, Cavalcanti BC, Pessoa C, Gonçalves RS, Wardell JL, Wardell SM, Souza MV. Mefloquine-oxazolidine derivatives: A new class of anticancer agents. *Chemical Biology and Drug Design* 2014; 83:16-131.

Rojas-Graü MA, Oms-Oliu G, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 2009; 44:875-889.

Romanazzi G, Feliziani E, Santini M, Landi L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 2013; 75:24-27.

Romanazzi G, Smilanick J, Feliziani E, Droby, S. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology* 2016;113:69–76.

Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine* 2007; 3:20-31.

Saharan V, Mehrotra A, Khatik R, Rawal P, Sharma SS, Pal A. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013; 62:677-683.

Saharan V, Sharma G, Yadav M, Choudhary MK, Sharma SS, Pal A, et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015; 75:346-353.

Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology* 2004; 50:45-61.

Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology* 2007; 59:129–145.

Sánchez MT, Haba MJL, Benítez-López M, Fernández-Navales J, Garrido-Varo A, Rérez-Marín D. Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data. *Journal of Food Engineering* 2012; 110:102–108.

Sangsuwan J, Pongsapakworawat T, Bangmo P, Sutthasupa S. Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oil in inhibiting *Botrytis cinerea* and their application in strawberry packaging system. *LWT- Food Science and Technology* 2016; 74:14-20.

Santos JE, Soares JP, Dockal SE. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2003;13:242-249.

Santos NST, Aguiar AJAA, Oliveira CEV, Sales CV, Silva SM, Silva RS et al. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis Labrusca* L.). *Food Microbiology* 2012; 32:345-353.

Santos SD, Cahú TB, Firmino GO, Castro CCMMB, Carvalho Jr LB, Bezerra RS et al. LIMA FILHO, JL. Shrimp waster extract and astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. *J. food science* 2012; 77:7.

Sanzani SM, Schena L, De Cicco V, Ippolito A. Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 2012; 68:64-71.

Sousa LL, Andrade SCA, Athayde AJAA, Oliveira CEV, Sales CV, Madruga MS, et al. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology* 2013; 165:312-318.

Souza TGF, Ciminelli VST, Mohallem NDS. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series* 2016; 733:12039.

Scariot GN. Óleos essenciais no controle de mofo cinzento e podridão mole e seus efeitos na qualidade pós-colheita de morango. *Dissertação (Agronomia)*. Universidade Federal do Paraná: Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, 2013.

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* 2003; 26:726-737.

Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 2006; 77:279-285.

Schuster E, Dunn-Coleman D, Frisvad JC, Van Dijck PWM. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology Biotechnology* 2002; 59:426-435.

Severino P, Andreani T, Macedo AS, Fangueiro JF, Santana MH, Silva AM, et al. Current State-of-Art and new trends on lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. *Journal of Drug Delivery* 2012; 1-10.

Shao X, Cao B, Xu F, Xie S, Yu D, Wang H. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mould. *Postharvest Biology and Technology* 2015; 99:37-43.

Sharma N. *Biological Controls for Preventing Food Deterioration: Strategies for Pre- and Postharvest Management*. John Wiley & Sons 2014.

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* 2008; 163:337-344.

Shiekh RA, Malik MA, Al-Thabaiti SA, Shiekh MA. Chitosan as a novel edible coating for fresh fruits. *Food Sci. Technol. Res.* 2013; 19:139-155.

Shahbazi Y. Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 112:264-272.

Shajahan A, Shankar S, Sathiyaseelan A, Narayan KS, Narayanan V, Kaviyarasan V, et al. Comparative studies of chitosan and its nanoparticles for the adsorption efficiency of various dyes. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017; 104:1449-1458.

Shigemasa Y, Minami S. Application of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1996; 17:413-420.

Shulaev V, Korban SS, Sosinski B, Abbott AG, Aldwinckle HS, Folta KM et al. Multiple models for rosaceae genomics. *Plant Physiol* 2008; 147:985–1003.

Siripatrawan U, Harte BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 2010; 24:770-775.

Sorlier P, Denuzière A, Viton C, Domard A. A relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* 2001; 2:765-772.

Staudt G. Taxonomic studies in the genus *Fragaria*. *Canadian Journal of Botany* 1962; 40:869 – 886.

Staudt G. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Horticulturae* 1989;265, 23 – 33.

Steiling W, Bracher M, Coutellemont P, Silva O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology In Vitro* 1999; 13:375-84.

Sun Y, Gu X, Wang Z, Huang Y, Wei Y, Zhang M, et al. Growth simulation and discrimination of *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum acutatum* using hyperspectral reflectance imaging. *Plos one* 2015; 20:1-20.

Sutton TB, Aldwinckle HS, Agnello AM, Walgenbach JF. Gray mold, *Compendium of apple and pear diseases and pests*. Second ed. APS, Press, St. Paul, MN, USA, 2014; 77–78.

Taniwaki MH, Pitt JI, Magan N. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science* 2018; 23:38-43.

Taniwaki MH, Silva N. *Fungos em alimentos: ocorrência e detecção*. Campinas: ITAL, 2001.

Thandapani G, Prasad PS, Sudha PN, Anil S. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017; 104:1784-1806.

Tsai ML, Chen RH, Bai SW, Chen WY. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carbohydrate Polymers* 2011; 84:756-761.

Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. *Int. J. Food Microbiol.* 2010; 143:205-210.

Tokatli K, Demirdöven A. Effects of chitosan edible film coatings on the physicochemical and microbiological qualities of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae* 2020; 259: 108656.

Toledo AMN. Encapsulação do óleo essencial de laranja em nanopartículas de quitosana: desenvolvimento e avaliação da toxicidade in vitro do produto final. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2015.

Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, Eslamifar A, Zad SJ, Jaimand K, et al. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology* 2017; 139:127–133.

Ugolini L, Martini C, Lazzeri L, D'Avino L, Mari M. Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.:Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allyl-isothiocyanate treatments. *Postharvest Biology and Technology* 2014; 90:34-39.

Usall J, Torres R, Teixidó N. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative?. *Current Opinion in Food Science* 2016; 11:51-55.

Van De Velde F, Tarola AM, Guemes D, Pirovani ME. Bioactive compounds and antioxidant capacity of Camarosa and Selva strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch). *Foods* 2013; 2:120-131.

Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gumy R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59:1162-1176.

Vargas J, Juhász A, Kevei F, Kozakiewicz. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology* 2004; 110:627–640.

Vasconcelos de Oliveira CE, Magnani M, Veríssimo de Sales C, Pontes ALS, Campos-Takaki GM, Stamford TCM 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* 2014a; 171:54-61.

Vasconcelos de Oliveira CE, Magnani M, Veríssimo de Sales C, Pontes ALS, Campos-Takaki GM, Stamford TCM et al. Effects of post-harvest treatment using chitosan from *Mucor circinelloids* on fungal pathogenicity and quality of table grapes during storage. *Food Microbiology* 2014b; 44:211-219.

Valenzuela C, Tapia C, López L, Bungler A, Escalona V, Abugoch L. Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Electronic Journal of Biotechnology* 2015; 18:406-411.

Velickova E, Winkelhausen E, Kuzmanova S, Alves VD, Moldão-Martins M. Impact of chitosan-beeswax edible coating on the quality of fresh strawberries (*Fragaria*

ananassa cv Camarosa) under commercial storage conditions. *LWT – Food Science and Technology* 2013; 52:80-92.

Ventura-Aguilar RI, Batista-Baños S, Flores-García G, Zavaleta-Avejar L. Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food Chemistry* 2018; 262:142-149.

Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers* 2017; 164:268-283.

Vilaplana R, Guerrero K, Guevara J, Valencia-Chamorro S. Chitosan coatings to control soft mold on fresh blackberries (*Rubus glaucus Benth.*) during postharvest period. *Scientia Horticulturae* 2020; 262: 109049.

Vu KD, Hollingsworth RG, Leroux E, Salmiere S, Lacroix M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International* 2011; 44, 198-203.

Wakeham A, Langton A, Adams S, Kennedy R. Interface of the environment and occurrence of *Botrytis cinerea* in pre-symptomatic tomato crops. *Crop Protection* 2016; 90:27-33.

Wang D, Yeats TH, Uluisik S, Rose JKC, Seymour GB. Fruit Softening: Revisiting the Role of Pectin. *Trends in plant science* 2018; 23:302-310.

Wang SY, Gao H. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *LWT - Food Science and Technology* 2013; 52:71-79.

Wang Z, Cang T, Qi P, Zhao X, Xu H, Wang X et al. Dissipation of four fungicides on greenhouse strawberries and an assessment of their risks. *Food Control* 2015; 55:215-220.

Wang Y, Zeng X, Zhou Z, Xing K, Tessema A, Zeng H, et al. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism. *Food Control* 2015; 55:54-61.

Williamson B, Duncan GH, Harrison JG, Harding LA, Elad Y, Zimand G. Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 1995; 99:1303–1310.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Kan JALV. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant pathology* 2007; 5:561–580.

Xing K, Liu YF, Shen XQ, Zhu X, Li XY, Miao XM, et al. Effect of O-chitosan nanoparticles on the development and membrane permeability of *Verticillium dahliae*. *Carbohydrate Polymers* 2017; 165:334-343.

Xing K, Shen X, Zhu X, Ju X, Miao X, Tian J, et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016; 82:830-836.

Xing K, Zhu X, Peng X, Qin S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: A review. *Agronomy for Sustainable Development* 2015; 35:569-588.

Xu WT, Huang KL, Guo F, Qu W, Yang JJ, Liang ZH, Luo Y. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 2007; 46:86-94.

Yamaguchi R, Tatsumi MA, Kato K, Yoshimitsu U. Effect of metal salts and fructose on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 13, 848-850.

Yaman O, Bayoindirli L. Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. *LWT: Food and Science Technology* 2002; 35:146-150.

Yan MT, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 2008; 74:840-844.

Yang F, Li H, Li F, Xin Z, Zhao L, Zheng YH, Hu QH. Effect of nano-packing on preservation quality of fresh strawberry (*fragaria ananassa duch Cv fengxiang*) during storage at 4°C. *Journal of Food Science* 2010; 75:236-240.

Yoonkyung P, Kim MH, Park SC, Cheong H, Jang MK, Nah JW, et al. Investigation of the antifungal activity and Mechanism of action of LMWS-Chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 28:1729-1734.

Zhang, H.; Zheng, X.; Wang, L.; Li, S.; Liu, R. Effect of yeast antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot of strawberries. *Journal of Food Engineering*, 78, 281-287, 2007.

Zhou D, Wang Z, Li M, Xing M, Xian T, Tuk. Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches. *Journal of applied microbiology* 2018; 124:166-178.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Bioatividade de coberturas comestíveis a base de quitosana em gel e nanopartículas na conservação de morangos (*Fragaria ananassa*)”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Natália Ferrão Castelo Branco Melo (Av. Cons. Rosa e Silva, 327, Apt.101, Aflitos. CEP:52020220. Telefone:(81)88013648. E-mail: natalia_melo_835@hotmail.com); e está sob a orientação da professora Thayza Christina Montenegro Stamford (E-mail: thayzastamford@yahoo.com.br) e co-orientação da professora Thatiana Montenegro Stamford Arnaud (E-mail: thatianaarnaud@hotmail.com).

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esse projeto de pesquisa pretende definir qual a melhor cobertura comestível a base de quitosana para a conservação de morangos de forma a proporcionar a obtenção de um produto com uma maior durabilidade e qualidade.

O voluntário será submetido a análise sensorial de 5 amostras de morangos: com gel de quitosana, com nanopartículas de quitosana, com gel + nanopartículas, com glicerol e sem cobertura comestível (amostra controle). Será realizado os testes de aceitação, intenção de compra e ordenação preferência. Os dados deverão ser preenchidos em formulário disponibilizado pelo pesquisador. As amostras serão acompanhadas de copo com água para ser utilizado pelo provador entre cada prova das frutas para limpeza das papilas gustativas. Os atributos avaliados serão a aparência, o aroma, o sabor, a textura e impressão global.

Em relação aos riscos da pesquisa, podem ser citados os inerentes à possível contaminação da fruta que serão minimizados adotando-se procedimentos seguros para manipulação e armazenamento dos alimentos conforme recomendação da legislação sanitária (RDC nº216/2004).

Como benefício, o uso de cobertura comestível a base de quitosana projeta-se como uma alternativa para conservação da cor, aroma, textura e integridade dos

frutos, diminuindo os custos com a deterioração desses alimentos pela indústria e conseqüentemente diminuindo o preço final desse produto.

A quitosana é um nome científico dado a uma fibra natural (polissacarídeo) originada da carapaça de crustáceos ou da parede celular de fungos. Esse polissacarídeo distingue-se dos demais devido a sua capacidade de conservação dos alimentos, sem causar qualquer tipo de efeito tóxico aquele indivíduo que entra em contato com a quitosana. A quitosana pode ser aplicada em diferentes formas, como por exemplo no formato de nanopartículas, o que poderá potencializar suas características prolongando a manutenção da qualidade dos frutos.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Os dados coletados ficarão armazenados em computador, sob responsabilidade do pesquisador principal pelo período de 5 anos.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Pesquisadora: Natália Ferrão Castelo Branco Melo

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____,

RG: _____ e CPF: _____, abaixo assinado, concordo em participar do “Bioatividade de coberturas comestíveis a base de quitosana em gel e nanopartículas na conservação de morangos (*Fragaria ananassa*)”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Testemunha 1:	Testemunha 2:
---------------	---------------

APÊNDICE B - FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Nome: _____ Idade: _____ e-mail: _____

Fone: _____ Escolaridade: _____ Data: _____

Você está recebendo 5 amostras codificadas de morangos. Avalie sensorialmente as amostras e confira nota aos atributos analisados de acordo com a escala abaixo. Lembre-se de colocar os códigos das amostras acima das notas conferidas. Recomenda-se fazer uso da bolacha e da água, antes de cada avaliação.

- 9- gostei muitíssimo
- 8- gostei muito
- 7- gostei moderadamente
- 6- gostei ligeiramente
- 5- nem gostei/nem desgostei
- 4- desgostei ligeiramente
- 3- desgostei moderadamente
- 2- desgostei muito
- 1- desgostei muitíssimo

ATRIBUTOS	Código das amostras				
Aparência					
Cor					
Aroma					
Firmeza					
Sabor					
Avaliação global					

Qual seria sua intenção de compra ao encontrar esses morangos no mercado?

- 5- certamente compraria
- 4- possivelmente compraria
- 3- talvez comprasse / talvez não comprasse
- 2- possivelmente não compraria
- 1- jamais compararia

ATRIBUTOS	Código das amostras				
Intenção de compra					

Agora ordene as amostras na ordem decrescente de preferência global.

	Mais Preferida				Menos preferida
	1º	2º	3º	4º	5º
Código					

Comentários: _____

OBRIGADA!

APÊNDICE C – CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO "GLOBAL PROGRESS IN APPLIED MICROBIOLOGY: A MULTIDISCIPLINARY APPROACH".

Synthesis and *in vitro* antifungal activity of fungal chitosan nanoparticles against phytopathogenic fungi

N.F.C.B. Melo^{*1}, M. A. P. Flores², A. D. Silva¹, A. Galembeck², G.M.C. Takaki³, L. O. Franco³, M. A. B. Lima³, T. L. M. Stamford¹, T. M. Stamford-Arnaud¹ and T. C. M. Stamford¹

¹Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

²Center of Strategic Technologies of Northeast, 50740-545, Recife, Pernambuco, Brazil

³Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author: e-mail: natalia_melo_835@hotmail.com, Phone: +55 81988013648

The aim of this study was to verify the best condition for obtaining fungal chitosan nanoparticles (FCN) and determine their antifungal activity against phytopathogenic fungi. FCN were obtained by ionic gelation method using a 2⁴ factorial design varying pH, chitosan (CH) and tripolyphosphate (TPP) concentrations and CH:TPP volume ratio. It was also determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of the best FCN against *B. cinerea*, *R. stolonifer* and *A. niger*. The results indicated that only one formulation showed ZP > +30 mV, but with high average size (821 nm). As it was not possible to obtain FCN with ZP > +30 mV, new factorial design 2² was carried out varying only CH and TPP concentrations. After that, the conditions for obtaining FCN with presented DLS = 331.1 nm, PDI = 0.377, ZP = 34 mV were at pH = 4, CH:TPP = 4:1, CH = 2.0 mg/mL and TPP = 1.0 mg/mL. In addition, this FCN sample exhibited MIC values of 1.5 mg/mL for *R. stolonifer* and *B. cinerea* and 2.5 mg/mL for *A. niger*. Therefore, this FCN have potential to be used against fungal disease at field level as a crop protection.

Keywords nanotechnology; biopolymer; *Botrytis cinerea*; *Rhizopus stolonifer*; *Aspergillus niger*.

1. Introduction

Plant pathogenic fungi cause severe damages to many economically important crops worldwide and result in quantitative and qualitative losses in agriculture [1]. A common practice to prevent phytopathogenic fungi is the application of chemical fungicides. However, many pathogens show resistance to the pesticides used nowadays. Moreover, synthetic fungicides may be harmful to the environment and to human health [2].

Currently, there is a need for a novel eco-friendly technology that improve food productivity without cause any harmful effect to human health and to the environment. In this context, the advancement in nanotechnology has markedly extend the application of nanomaterials in plants due to unique physico-chemical and their size-dependent properties, as high surface to volume ratio. These properties turn the chitosan nanoparticles more effective against different microbes groups, even at lower dose [3].

The particle size and charge surface (zeta potential) play an important role in determination of nanoparticles antifungal activity. Smaller particle, in principle, will penetrate easily into microbial cell and a positive charge of chitosan nanoparticles improves the interaction between particles and negatively charged microbial cell surface. This could induce leakage of fungi intracellular material [4].

Chitosan based nanoparticles are preferably used for various applications owing to their biodegradability, high permeability toward biological membranes, non-toxicity to human, cost effectiveness and broad antifungal activities [2]. Chitosan is a polysaccharide composed of β -1,4-D-glucosamine linked to N-acetyl-glucosamine residues and is naturally present in fungi cell walls or can be extracted by the deacetylation of chitin, which is a polysaccharide present in the exoskeleton of marine invertebrates. Fungi biomass is a promising eco-friendly alternative for obtaining chitosan because it is not affected by seasonal factors and can be produced on a large scale using industry wastes as a cheap substrate and does not contain any of the proteins that induce allergic reactions to crustaceans [3,4]

There are different types of chitosan (extracted from crustaceans or fungi cell) with different deacetylation degrees and molecular weights. Thus, the need to investigate the effects of synthesis parameters on nanoparticle size and surface charge in order to prepare chitosan nanoparticles appropriate to use in agricultural field against phytopathogenic fungi [5].

Therefore, the aims of this research was to investigate the best condition for obtaining fungal chitosan nanoparticles (FCN) using a factorial design. For this study, we evaluate the effect of concentration of chitosan (CH), tripolyphosphate (TPP), pH of solution and CH:TPP volume ratio. It having as response variables: particle

size (DLS), zeta potential (ZP) polydispersity index (PDI). FCN produced with the best conditions defined in the factorial design was tested against phytopathogenic fungi viz. *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*.

2. Materials and Methods

2.1 Raw materials

Fungal chitosan from non-genetically modified *Aspergillus niger* mycelium (KiOnutrime® - deacetylation degree of 86 % and molecular weight of 4.0×10^3 g/mol) was provided by Kitozyme® Company. Sodium tripolyphosphate was purchased from Sigma-Aldrich (USA), sodium hydroxide, glacial acetic acid, sabouraud dextrose broth and sabouraud dextrose agar were obtained from Merck (Germany).

Botrytis cinerea URM 2802, *Rhizopus stolonifer* URM 3728 and *Aspergillus niger* URM 7282 were obtained from the University Recife Mycology Culture Collection (Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil).

2.2 Experimental factorial design

In this study, we investigated the synthesis of FCN nanoparticles by using a 2^4 factorial design composed of four factors each at three levels (Table 1). The FCN were prepared by ionic gelation method with modifications [6]. TPP solutions were added to the chitosan solutions dropwise (0.2 mL/min) using a peristaltic pump (Atlas Syringe Pump) under vigorous stirring at room temperature. Once the dropwise addition was completed, the nanoparticle suspension was stirred for an additional 1 h. The response variables were measured using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) and it was performed at a scattering angle of 90° at 25°C and 633 nm laser.

Table 1 Initial 2^4 factorial design, providing the lower (-1), medium level and upper level (+1) values for each variable.

Factors	Lower level (-1)	Medium level (0)	Higher level (+1)	Response variables
CH (mg/mL)	0.5	1.0	1.5	Particle size; PDI and zeta potential
TPP (mg/mL)	0.6	0.8	1.0	
CH: TPP (v/v)	2:1	4:1	6:1	
pH of CH solution	3.0	4.0	5.0	

The design required a total of 20 experiments (the medium level experiments were repeated 4 times). The data were analyzed using the STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc.) software.

2.3 Antifungal activity of FCN against phytopathogenic fungi

The best formulation of FCN was used in the broth macrodilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of FCN against *Botrytis cinerea* URM 2802, *Rhizopus stolonifer* URM 3728 and *Aspergillus niger* URM 7282. For this assay, phytopathogenic fungi stock cultures were subcultured in Sabouraud agar at $25 - 28^\circ\text{C}$ for 7 days to allow sufficient sporulation. The fungal spores were collected in a sterile saline solution (0.85 g /100 mL NaCl) in fungal growth medium, and the suspension was filtered through a sterile triple-gauze layer to retain hyphal fragments. The number of spores present in the suspension was determined with a hemocytometer. The spore concentration obtained was adjusted with sterile saline solution to provide a fungal inoculum of approximately 10^6 spores/mL [7].

In the broth macrodilution technique, initially, 0.5 mL of a suspension of the phytopathogenic fungi was inoculated, separately, into 2 mL of Sabouraud broth (with the concentration adjusted to 5 mL), and 2.5 mL of the solutions containing different chitosan nanoparticles concentration were added. The mixture was incubated at 25°C for 7 days, and at the end of the incubation period, the lowest chitosan nanoparticles concentration (highest dilution) that exhibited no visible fungal growth was considered to be the MIC [8].

3. Results and discussion

The results obtained from the factorial design performed are described in Table 2. The formulations exhibited a large size variation (182.4 – 5841) and according to Pareto chart (data not shown), all the parameters significantly influenced (p -value < 0.05) in the DLS results. The pH value was the parameter that most influenced the particle

size. The particles with micrometric size had a common variable: pH = 5.0. Lower pH values favors the protonation of the $-\text{NH}_2$ groups of the polymer chain of chitosan in $-\text{NH}_3^+$, which provides the formation of smaller particles, in other words, there are more free cationic groups to bind to the phosphates of TPP [5]. Therefore, at pH 5 the chitosan chain is less protonated and it presents more difficulties in binding to TPP. In addition, the 2^4 factorial design also indicated that high concentration of TPP increases the particle size. The “excess” of TPP could link several particles and a subsequent aggregation phenomenon could occur, resulting in the formation of larger particle [9].

The opposite behavior was found when we analyze the influence of the CH concentration and CH:TPP volume ratio on the particles size. By increasing these variables decreases the particle size, in other words, it is necessary higher concentrations of polymer to obtain small particles. It indicate that the ratio between CH and TPP is critical and this parameter controls the size distribution of the nanoparticles.

Table 2 Response values of the 2^4 factorial design.

FCN	Variable				Responses		
	pH	TPP	CH	CH:TPP	DLS (nm) \pm SD	PDI \pm SD	ZP (mV) \pm SD
01	(+) 5.0	(+) 1.0	(+) 1.5	(+) 6:1	1077 \pm 117.5	0.737 \pm 0.151	15.5 \pm 2.70
02	(+) 5.0	(+) 1.0	(+) 1.5	(-) 2:1	787.9 \pm 4.525	0.454 \pm 0.042	12.3 \pm 0.53
03	(+) 5.0	(+) 1.0	(-) 0.5	(+) 6:1	1414 \pm 89.50	0.509 \pm 0.028	18.8 \pm 1.79
04	(+) 5.0	(+) 1.0	(-) 0.5	(-) 2:1	5841 \pm 896.5	0.119 \pm 0.094	11.5 \pm 0.38
05	(+) 5.0	(-) 0.6	(+) 1.5	(+) 6:1	1404 \pm 27.62	0.785 \pm 0.129	13.7 \pm 2.57
06	(+) 5.0	(-) 0.6	(+) 1.5	(-) 2:1	492.4 \pm 11.27	0.512 \pm 0.024	14.4 \pm 0.84
07	(+) 5.0	(-) 0.6	(-) 0.5	(+) 6:1	385.9 \pm 12,73	0.402 \pm 0.045	18.7 \pm 1.78
08	(+) 5.0	(-) 0.6	(-) 0.5	(-) 2:1	431.2 \pm 149.3	0.312 \pm 0.140	22.1 \pm 2.19
09	(-) 3.0	(+) 1.0	(+) 1.5	(+) 6:1	312.4 \pm 204.2	0.580 \pm 0.016	28.5 \pm 1.60
10	(-) 3.0	(+) 1.0	(+) 1.5	(-) 2:1	313.0 \pm 5.463	0.306 \pm 0.037	21.4 \pm 0.65
11	(-) 3.0	(+) 1.0	(-) 0.5	(+) 6:1	182.4 \pm 7.637	0.615 \pm 0.000	19.9 \pm 1.01
12	(-) 3.0	(+) 1.0	(-) 0.5	(-) 2:1	229.2 \pm 72.70	0.322 \pm 0.043	20.4 \pm 0.66
13	(-) 3.0	(-) 0.6	(+) 1.5	(+) 6:1	821.0 \pm 38.54	0.866 \pm 0.040	34.0 \pm 1.01
14	(-) 3.0	(-) 0.6	(+) 1.5	(-) 2:1	236.2 \pm 2.810	0.418 \pm 0.007	23.1 \pm 0.40
15	(-) 3.0	(-) 0.6	(-) 0.5	(+) 6:1	925.0 \pm 145.6	0.902 \pm 0.087	28.2 \pm 0.47
16	(-) 3.0	(-) 0.6	(-) 0.5	(-) 2:1	153.9 \pm 32.74	0.586 \pm 0.100	16.2 \pm 0.70
17	(0) 4.0	(0) 0.8	(0) 1.0	(0) 4:1	231.3 \pm 0.084	0.502 \pm 0.007	19.5 \pm 0.84
18	(0) 4.0	(0) 0.8	(0) 1.0	(0) 4:1	263.3 \pm 4.809	0.426 \pm 0.059	20.3 \pm 1.20
19	(0) 4.0	(0) 0.8	(0) 1.0	(0) 4:1	267.8 \pm 6.270	0.341 \pm 0.008	21.5 \pm 0.99
20	(0) 4.0	(0) 0.8	(0) 1.0	(0) 4:1	228.9 \pm 8.262	0.433 \pm 0.026	20.9 \pm 1.27

PDI value is used to estimate the average size uniformity of particle solution [4], lower PDI (< 0.1) values correspond to monodisperse particle samples. According to the results of 2^4 factorial design, the PDI values was drastically affected by the CH concentration and CH:TPP volume ratio. When this variables increase, PDI values also increase. At high CH concentration and CH:TPP volume ratio, the equilibrium between the hydrogen bond

attractions and the electrostatic repulsions between some particles could be broken, and the system could collapsed into large micro-objects [9]. The formation of these large nanoparticles can be avoided by decreasing the TPP concentration. The surface response chart (data not shown) showed that TPP concentration have a higher influence on the PDI values. When the amount of TPP increases, PDI values decrease significantly (p -value < 0.05).

All FCN are positively charged which was attributed to the positive charge of the protonated CH. For ZP only CH concentration was not statistically significant (p -value > 0.05). The results also showed that increasing pH and TPP concentration, decrease ZP values. It is expected because in these cases free CH ammonium groups decrease, which explain the less cationic charge surface [9]. However, increasing the volume ratio of CH:TPP indirectly increase CH concentration and also increase de ZP. Nevertheless, in the 2^4 factorial design only one experiment presented ZP > +30 mV, but these formulation presented a high average size (821 nm).

Chitosan nanoparticles with surface charge above +30 mV are more stable and it is an important parameter to determine the nanoparticles antifungal activity. Particle size and ZP are important properties, which may influence the antifungal activity of nanoparticles. Nanoparticles with different particle size or ZP may have different mechanisms of inhibition against fungi [4]. Therefore, as it was not possible to obtain compatible results with ZP and particle size, new factorial design 2^2 was carried out varying only CH (2 – 2.5 mg/mL) and TPP (0.8 – 1.0 mg/mL) concentrations, and maintaining pH (4) and CH:TPP volume ratio (4:1) to obtain FCN with ZP > +30 mV.

The results obtained from the 2^2 factorial design performed are described in Table 3. This second factorial design exhibited smaller size variation than the 2^4 factorial design. Both CH and TPP concentration significantly influenced (p -value < 0.05) in the DLS results. By increasing these variables, the size of the FCN also increase. According to several authors, the particle size increases with the CH concentration because the CH chains approach each other (a higher CH concentration involving a higher chain number in one particle) [9, 10, 11]. Therefore, CH concentration was a decisive parameter in the synthesis of chitosan nanoparticles by the ionic gelation technique. It governs the formation of individualized nanoparticles or large nanoparticles aggregates [9].

CH and TPP concentration also significantly influenced (p -value < 0.05) in the PDI values. In this case, TPP concentration should be high to obtain FCN with lower average size dispersion, as can be seen in the Table 3. However, the opposite results were verified for CH factor.

Table 3 Response values of the 2^2 factorial design

FCN	Variable		Responses		
	CH (mg/mL)	TPP (mg/mL)	DLS (nm) ± SD	PDI ± SD	ZP (mV) ± SD
01	(+) 2.5	(-) 0.8	462.2 ± 1.92	0.550 ± 0.002	25.3 ± 1.30
02	(+) 2.5	(+) 1.0	487.3 ± 2.40	0.491 ± 0.010	25.6 ± 0.40
03	(-) 2.0	(+) 1.0	331.1 ± 5.13	0.377 ± 0.008	34.0 ± 0.83
04	(-) 2.0	(-) 0.8	298.7 ± 5.25	0.593 ± 0.003	31.0 ± 1.00
05	(0) 2.25	(0) 0.9	433.6 ± 5.05	0.554 ± 0.007	18.7 ± 0.70
06	(0) 2.25	(0) 0.9	434.1 ± 3.45	0.555 ± 0.004	18.4 ± 0.56
07	(0) 2.25	(0) 0.9	433.5 ± 2.40	0.555 ± 0.005	18.5 ± 0.70

Regarding the ZP of nanoparticles, only samples 3 and 4 of the second factorial design presented ZP > +30 mV. It is possible to observe that these samples had the same chitosan concentration (2 mg/mL). This result is in accordance with surface response chart (data not shown) which indicate that increasing the CH concentration, decreases the ZP values. Hence, the best CH concentration to produce FCN with ZP > +30 mV is 2 mg/mL. In addition, for ZP, TPP concentration was not statistically significant (p -value > 0.05). However, the FCN produced with TPP in the concentration of 1.0 mg/mL presented a higher ZP and a lower PDI values than the FCN produced with TPP in the concentration of 0.8 mg/mL.

The sample 3 and 4 also presented the smallest particle size, but sample 4 exhibited higher PDI value. So, based on the results obtained in the first and second factorial design, it was verified that the best condition for obtaining FCN with high homogeneity in size and ZP > +30 mV was in pH = 4.0 and CH : TPP = 4:1 (defined in the 2^4 factorial design), CH = 2.0 mg/mL and TPP = 1.0 mg/mL (defined in the 2^2 factorial design).

The chosen FCN presented DLS = 331.1 nm, PDI = 0.377, ZP = 34 mV and it was tested against *B. cinerea*, *R. stolonifer* and *A. niger*. The results of the broth macrodilution technique showed that the FCN exhibited MIC values of 1.5 mg/mL for *R. stolonifer* and *B. cinerea* and 2.5 mg/mL for *A. niger*. The MIC value of *A. niger* differ from the result found by Ing et al. [4], that produced chitosan nanoparticles with 2 mg/mL of low and high molecular weight chitosan. These authors showed that the chitosan nanoparticles using 2 mg/mL of chitosan, only presented antifungal activity against *A. niger* when prepared from high molecular weight chitosan. However, several authors suggested that chitosan nanoparticles, because of its small size, might be able to diffuse into fungal cell and hence disrupt the synthesis of DNA and RNA [12]. Therefore, the particle size plays an important role in

antifungal activity and the conditions of synthesis of these small size nanoparticles was only possible by factorial design.

Zeta potential has been also suggested as a key factor to antifungal effect of chitosan nanoparticles through the interaction with negatively charged microbial surface. This in turn alters fungi cell membrane permeability, which eventually induces leakage of intracellular material [13]. As said before, chitosan nanoparticles with surface charge above than +30 mV are more stable and it is an important parameter to determine the nanoparticles antifungal activity. Our FCN presented ZP = 34 mV, so this contributed to the low MIC values.

Nevertheless, previous studies showed that the effectiveness of chitosan did not depend solely on the chitosan formulation but also on the type of fungus [1, 4, 14]. Based on MIC results, *A. niger* was the most resistant phytopathogenic fungus tested. According to Allan and Hadwiger [15], fungi that have chitosan as one of the components in the cell wall are more resistant to externally chitosan. This fact could therefore explain the high resistance of *A. niger*, which contains 10% of chitin in its cell wall.

From these results, the present study shows that the application of an experimental factorial design is important to determine FCN with desirable size, PDI and ZP values, which modify the antifungal activity of FCN. The chosen FCN presented DLS = 331.1 nm, PDI = 0.377, ZP = 34 mV and MIC = 1.5 mg/mL for *R. stolonifer* and *B. cinerea* and 2.5 mg/mL for *A. niger*. Therefore, this shows that the FCN produced can be used as antifungal agent against fungal disease at field level as a crop protection.

Acknowledgements This study was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination Unit Improving Higher Education Personnel (CAPES) and Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE). The authors thank the Kitozyme company for providing the chitosan used in this research and Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology at Catholic University of Pernambuco, Brazil, for the use of laboratories.

References

- [1] Saharan V, Mehrotra A, Khatik R, Rawal P, Sharma SS, Pal A. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013; 62:677-683.
- [2] Saharan V, Sharma G, Yadav M, Choudhary MK, Sharma SS, Pal A, Raliya R, Biswas P. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015; 75:346-353.
- [3] Sathiyabama M, Parthasaeathy R. Biological preparation of chitosan nanoparticles and its in vitro antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. *Carbohydrate Polymers*. 2016; 151: 321-325.
- [4] Ing LY, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*. 2012;23:1-9.
- [5] Pinho Neves AL, Milioli CC, Müller L, Riella HG, Kuhnen NC, Stulzer HK. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014; 445:34-39.
- [6] Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1997; 63:125-132.
- [7] Rasooli I, Owlia P. Chemoprevention by thyme oils for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*. 2005; 66:2851-2856.
- [8] Oliveira CEV, Magnani M, Veríssimo de Sales C, Pontes ALS, Campos-Takaki GM, Stamford TCM, Leite de Souza E. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca L.*). *International Journal of Food Microbiology*. 2014; 171:54-61.
- [9] Bugnicourt L, Alcouffe P, Ladavière C. Elaboration of chitosan nanoparticles: favorable impact of a mild thermal treatment to obtain divided, spherical, and colloidally stable objects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014; 457:476-486.
- [10] Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*. 2012; 90:21-27.
- [11] Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesàro A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *International journal of pharmaceutics*. 2013; 455:219-228.
- [12] Galván Márquez I, Akuaku J, Cruz I, Cheetham J, Golshani A, Smith ML. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*. 2013; 164:108-112.
- [13] Chen LC, Kung SK, Chen HH, Lin SB. Evaluation of zeta potential difference as an indicator for antibacterial strength of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2010; 82:913-919.
- [14] Ma Z, Garrido-Maestu A, Jeong KC. Application, mode of action and *in vitro* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. *Carbohydrate Polymers*. 2017; 176:257-265.
- [15] Allan CR, Hadwiger LA. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*. 1979; 3:285-287.

APÊNDICE D – ARTIGO 1 - SHORT COMMUNICATION**STABILITY OF MICROBIOLOGICAL CHITOSAN NANOPARTICLES TOWARDS THE INHIBITION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI: INFLUENCE OF STORAGE TEMPERATURE**

Natália Ferrão Castelo Branco Melo^{1,2}, Fabiana de Arruda Lucchesi^{1,2}, Anderson Deodato da Silva¹, Miguel A. P. Flores³, André Galembeck³, Horacina M. M. Cavalcante⁴, Galba Maria de Campos Takaki⁵, Luciana de Oliveira Franco^{5,6}, Marcos Antônio de Barbosa Lima^{5,6}, Tânia Lucia Montenegro Stamford¹, Thatiana Montenegro Stamford –Arnaud^{1,2}, Thayza Christina Montenegro Stamford^{2*}.

¹ *Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

² *Laboratório de Biofilme, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

³ *Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Recife, Pernambuco, Brazil.*

⁴ *Faculdade Maurício de Nassau - Campus Epitácio, Paraíba, João Pessoa, Brazil.*

⁵ *Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

⁶ *Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.*

* Correspondence author:

Name: Thayza Christina Montenegro Stamford (Stamford, T.C.M.)

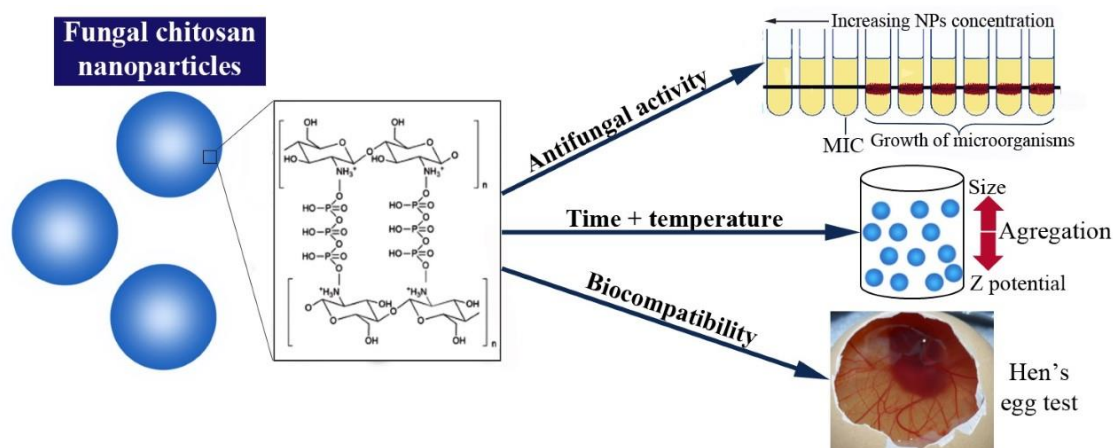
Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, Av. da Engenharia, s/nº, 2º andar, Microbiologia e Imunologia, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife, PE, Brazil

E-mail: thayzastamford29@gmail.com / thayza.stamford@pq.cnpq.br

Telephone: 55 +8121268526

Fax: 55+8121268473

GRAPH ABSTRACT



ABSTRACT

The physicochemical and antifungal stability of fungal chitosan nanoparticles (FCN) was investigated during 2 months of storage at different temperatures (5, 25 and 40°C). The FCN were characterized using dynamic light scattering, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), turbidity and pH every 2 weeks. Before and after the storage period, the FCN were tested against *B. cinerea*, *R. stolonifer* and *A. niger*. The toxicity of the FCN was analysed using the HET-CAM test. The results indicate that after the storage period, the size, PDI, pH and turbidity values increased, and the ZP decreased more intensely in the particles stored at 40°C. This temperature proved to be inadequate to maintain the original characteristics of FCN because it promotes the formation of large aggregates. Before storage, the FCN exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1.5mg/mL against *R. stolonifer* and *B. cinerea* and 2.5mg/mL against *A. niger*. After 2 months, the FCN maintained their MIC values for *R. stolonifer* and *B. cinerea*. However, antifungal activity towards *A. niger* was not detected at any storage temperature. *A. niger* contains 10% of chitin in its cell wall, and fungi that have chitosan as one of the components of their cell wall are more resistant to the FCN. The FCN did not demonstrate toxicity using the HET-CAM test. From these results, this study shows that the FCN should be stored at 5 or 25°C to maintain their storage stability, but these different storage temperatures did not affect the antifungal activity of FCN after 2 months.

Keywords: *A. niger*, *B. cinerea*, *R. stolonifera*, nanomaterials, particle size, biopolymer.

1. Introduction

The advancements in nanotechnology have markedly extended the application of nanomaterials in plants due to their size-dependent-qualities, high surface to volume ratio and unique physicochemical properties. These properties result in some types of nanoparticles being more effective against microbes at very low doses (Saharan et al., 2015).

Chitosan is utilized in the fabrication of nanoparticles due to their high permeability, non-toxicity and cost effectiveness. Chitosan is a polysaccharide present in fungal cell walls or extracted by the deacetylation of chitin. Fungal chitosan is a promising alternative because it is not affected by seasonal factors, does not contain the proteins that induce allergic reactions to crustaceans and can be produced on a large scale with standardization of its physicochemical characteristics (Ban et al., 2018).

The physicochemical stability of chitosan nanoparticles is highly relevant to their commercial uses, because it plays an important role in the function of the particles. During storage, the characteristics of chitosan nanoparticles may be altered (Jonassen et al., 2012). Therefore, it is important to understand the relationship between the storage conditions and the physicochemical and antimicrobial stability of the nanoparticles.

To date, there is no report in the literature demonstrating the physicochemical stability and antifungal activity of fungal chitosan nanoparticle (FCN) during storage at different temperatures. Therefore, the aim of this study was to evaluate the physicochemical and antifungal stability of the FCN storage at 5, 25 and 40 °C for a 2-month-period.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Fungal chitosan from non-genetically modified *Aspergillus niger* mycelia (KiOnutrime®, deacetylation degree of 86 %, molecular weight $4,0 \times 10^3$ g/mol) was provided by the Kitozyme®-Company (Herstal, Belgium). *Botrytis cinerea* URM 2802, *Rhizopus stolonifer* URM 3728 and *Aspergillus niger* URM 7282 were obtained from the URM Culture Collection (Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil).

2.2 Preparation of FCN and storage conditions

FCN were prepared using an ionotropic gelation method described by [Calvo et al. 1997](#) with modifications. The chitosan (2 mg/mL) was dissolved in 24 mL of acetate buffer solution (0.174 M) at pH 4 and stirred for 30 min. Six millilitres of tripolyphosphate (TPP) solution (1 mg/mL) was added to the chitosan solution dropwise (0.2 mL/min) using a peristaltic pump (Atlas Syringe Pump) while being vigorously stirred at room temperature. The final volume of the chitosan-to-TPP ratio was 4:1. After the TPP addition, the nanoparticles suspension was stirred for an additional 1 h and stored separately at 5, 25 and 40 °C for 2 months.

2.3 Characterization of the FCN during storage stability

FCN suspensions were characterized without any further purification or alteration using dynamic light scattering (DLS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), turbidity and pH measurements every two weeks for two months. The first measurement was made in the same week of the nanoparticle production (the week 0). Triplicate experiments were conducted.

To determine the DLS, ZP and PDI of the particles, 3 mL of FCN dispersion was placed in polystyrene cuvettes and analysed by a DLS system (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, UK) using the radiation of incident light with a wavelength of 633 nm to measure the intensity of the scattered light at an angle of 90° at 25 °C ([Tsai et al., 2011](#)).

The transmittance of the FCN suspensions was measured using a spectrophotometer at a wavelength (λ_T) of 500 nm ([Jonassen et al., 2012](#)). The turbidity (τ) of the suspensions was calculated from the transmittance using the Lambert-Beer law:

$$\tau = -\frac{1}{L} \ln \frac{I_t}{I_0}$$

where L is the light path length in the sample cell (1 cm), I_t is the intensity of the light transmitted through the sample and I_0 is the intensity of the light transmitted through the solvent.

The pH of the FCN suspensions was measured using a digital pH metre (Model: MICRONAL B474) at 25 °C.

2.4 Antifungal stability of FCN

Phytopathogenic fungi stock cultures were subcultured in Sabouraud agar at 25–28 °C for 7 days for sufficient sporulation. The spores were collected in a sterile saline solution (0.85 g/100 mL NaCl). The suspension concentration was 10⁶ spores/mL and determined using a haemocytometer (Sharma and Tripathi, 2008).

The minimum inhibitory concentration (MIC) value of the FCN was determined using the broth macrodilution technique. Initially, 0.5 mL of phytopathogenic fungi suspension was separately inoculated into 2 mL of Sabouraud broth (with the concentration adjusted to 5 mL), and 2.5 mL of the solutions containing different FCN concentration was added. The mixture was incubated at 25 °C for 7 days, and the lowest FCN concentration that exhibited no visible fungal growth was the MIC (Sharma and Tripathi, 2008). The antifungal activity was determined before and after two months of storage at 5, 25 and 40 °C.

2.5 Cytotoxicity hen's egg test using chorioallantoic membrane (HET-CAM)

The HET-CAM tests were performed as described by Freire et al. (2015) to evaluate the potential for irritation of the FCN. The chorioallantoic membrane was hydrated with sterile deionised water, and 200 µL of the FCN suspension was applied. The membrane was observed for 5 min for irritation signs of vasoconstriction, haemorrhage and coagulation. The times (in seconds) at which each sign began were substituted in Eq. (1):

$$\frac{(301 - \text{hemorrhage})5}{300} + \frac{(301 - \text{vasoconstriction})7}{300} + \frac{(301 - \text{coagulation})9}{300}$$

The irritation score can be evaluated as follows: 0.0-0.9, no irritation; 1.0-4.9, slight irritation; 5.0-8.9, moderate irritation; 9.0-21.0, severe irritation. All the assays were repeated five times.

3. Results and discussion

3.1 Storage stability

All the samples stored at different temperatures demonstrated an increase in size (Fig. 1a) as observed by Rampino et al. (2013). The size evolution during storage is ascribed to many factors, such as particle aggregation, which provides a more efficient rearrangement. The

interaction of the free polymer chains with the particle network leads to a reorganization of the intermolecular entanglements and swelling, due to the presence of TPP that generates an inflow of water by osmosis (López-León et al., 2005)

The sample stored at 40 °C had the highest increase in average size due to the formation of large aggregates. At high temperatures, the hydrogen bonding with water is gradually disrupted, the hydrophobicity of the polymer is enhanced by the packing of the hydrophobic segments, leading to progressive chain collapse. In addition, the increase in temperature decreases the viscosity of the chitosan solution, enhances the Brownian motion of the emerging particles and increases the frequency of the inter-particle collisions (Jonassen et al., 2012). All of these phenomena subsequently trigger aggregation.

The PDI value increase also reflects the aggregates formation (Fig. 1b). The sample stored at 40 °C shows the higher value at the end of period. The same behaviour can be seen in Fig. 1e for the pH values. The increases in pH indicate a transition from charged to uncharged gel and promote the aggregation of FCN. Since the pK_a value of the chitosan is close to neutral pH, particles spontaneously aggregate in slightly basic pH values, and they become completely uncharged (López-León et al., 2005).

Aggregation represents a recurrent problem. Particles agglomerate to reduce the surface area and, therefore, to reduce the free surface energy. The formation of the FCN agglomerate could occur at any storage temperature. However, at lower storage temperatures, it is expected to improve the long-term storage stability of nanoparticles (Tsai et al., 2011), as was observed in the FCN stored at 5 and 25 °C.

The turbidity of the samples is affected by the particle size, among other factors. The aggregation will lead to larger particles and therefore, higher turbidity values (Jonassen et al., 2012). Fig. 1d showed the formation of the aggregates occurred more intensely during the first 2 or 4 weeks of storage, and after that period, the aggregation continues (as seen in the results of the DLS and PDI), but less intensely, since it is not able to modify the turbidity values.

All the particles exhibited positive ZP during storage (Fig. 1c), which is consistent with the results of Sullivan et al. (2018) who reported that the mixture of chitosan and TPP spontaneously formed complexes with an overall positive surface charge. However, the ZP values decreased during the storage period at all temperatures. A more pronounced reduction was found in the sample stored at 40 °C with ZP below +30 mV early in the second week. Nanoparticles with ZP > +30 mV are more stable, which prevents aggregation of the particles (Ing et al., 2012). The low ZP values of the sample stored at 40 °C reflect the decrease in repulsive forces between the particles that affect intramolecular and intermolecular interactions.

This results in the loss of the system's colloidal stability, and thus, the uncharged nanoparticles start to aggregate (López-León et al., 2005), which can be demonstrated in the DLS graph (Fig. 1c).

In the other samples, the ZP values were lower than +30 mV only after the sixth and eighth weeks for the samples stored at 25 °C and 5 °C, respectively. These temperatures were more successful in delaying the decrease of the ZP values and consequently helped to maintain the particles stability. According to Saharan et al. (2015), particles with a positive surface charge are more stable and exhibit a higher affinity towards biological membranes in an aqueous environment and, therefore, more antifungal activity. These differences in zeta potential values between the samples stored at 5 °C, 25 °C and 40 °C will be reflected in the antifungal activity of the samples, which will be discussed in the next section.

3.2 Antifungal stability

Before the storage, the FCN exhibited an MIC = 1.5 mg/mL against *R. stolonifer* and *B. cinerea* and 2.5 mg/mL against *A. niger*. After two months of storage at different temperatures, the FCN maintained their MIC values for *R. stolonifer* and *B. cinerea*. However, no antifungal activity towards *A. niger* was detected at any storage temperature.

Particle size and ZP are the important properties that may influence the antifungal activity of nanoparticles. Particles could enter the cell wall of the microbes through carrier proteins or an ion channel. Therefore, a smaller particle size will result in a better uptake of nanoparticles into microbial cells. In addition, the positive ZP improves the interaction between the nanoparticles and the negatively charged microbial cell surface. This alters the fungal cell membrane permeability, which induces the leakage of intracellular material (Ing et al., 2012).

All the FCN stored for 2 months increased their sizes and decreased their ZP, which contributes to the loss of antifungal activity against *A. niger*. This fungus is highly resist to chitosan, because contains 10 % of chitin in the cell wall. Fungi that presented chitosan in their cell wall are more resistant to externally chitosan and consequently more resistant to FCN (Allan and Hadwiger, 1979). Therefore, FCN produced to act against *A. niger* should not be stored for long periods because the changes in their physicochemical parameters could lead to agglomerate formation resulting in the loss of antifungal activity.

3.3 HET-CAM assay

The HET-CAM test showed any changes in the chorioallantoic membrane for the FCN (Fig. 2). Similar results were found by [Rampino et al. \(2013\)](#) who worked with shrimp chitosan. It is important to conduct toxicological evaluations of nanostructured materials, due to their size and shape, which often render them able to penetrate tissues and cause cell damage ([Rampino et al., 2013](#)).

There is a relationship between the nanoparticles size and their toxicity ([Freire et al., 2015](#)). According to [Gan et al. \(2005\)](#), smaller-sized-nanoparticles (~100 nm) demonstrated more than 3-fold greater arterial uptake compared to larger nanoparticles (~275 nm). In our study, the FCN demonstrated a size > 300 nm and, thus, proved to be nontoxic according to the HET-CAM test, which allows for its use as an antifungal agent against phytopathogenic fungi in the food field.

4. Conclusion

The physicochemical parameters of FCN change during storage at all the temperatures analysed. However, the increase in size and decrease in ZP values occurred more intensely during particle storage at 40 °C. This temperature promotes the formation of large aggregates and was inadequate to maintain the FCN original characteristics.

All the FCN demonstrated antifungal activity against the phytopathogenic fungi tested. Nevertheless, after 2 months of storage at all the temperatures analysed, FCN did not inhibit the growth of *A. niger*. In addition, the particles produced in the present study did not demonstrate toxicity. So, it could be a promising strategy to use in the field level as a crop protection against phytopathogenic fungi.

Acknowledgements

The authors thank the Kitozyme-Company for providing the chitosan, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, process n° CAPES/PROEX 1734/2015, the Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, process n° APQ 0566-5.07/14, Universidade Federal de Pernambuco process PROPESQ n°04/2018, for financial support and a research grant, the Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco and the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste for the availability of infrastructure.

References

- C.R. Allan, L.A. Hadwiger. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology* 1979; 3: 285-287.[https://doi.org/10.1016/S0147-5975\(79\)80054-7](https://doi.org/10.1016/S0147-5975(79)80054-7)
- Z. Ban, B. Horev, R., Rutenberg, O. Danay, C. Bilbao, T. MacHugh, V. Rodov, E. Poverenov. Efficient production of fungal chitosan utilizing an advanced freeze-thawing method; quality and activity studies. *Food Hydrocolloids* 2018; 81: 380-388.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.010>
- P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Pol. Sci.* 1997; 63: 125-132.[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- P.L.L. Freire, T.C.M. Stamford, A.J.R. Albuquerque, F.C. Sampaio, H.M.M. Cavalcante, R.O. Macedo, A. Galembeck, M.A.P Flores, A. Rosenblatt. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015; 45: 183-187.<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.007>
- Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. Mccarron. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2005; 44: 65–73.<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.001>
- L.Y. Ing, N.M. Zin, A. Sarwar, H. Katas. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int. J. Biomat.* 2012; 23: 1-9.
[doi:10.1155/2012/632698](https://doi.org/10.1155/2012/632698)
- H. Jonassen, A.L. Kjoniksen, M. Hiorth. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 2012; 13: 3747-3756.<http://doi:10.1021/bm301207a>.
- T. López-León, E.L.S. Carvalho, B. Seijo, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Coll. Int. Sci.* 2005; 283: 344-351.<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.186>
- A. Rampino, M. Borgogna, P. Blasi, B. Bellich, A. Cesàro. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *Int. J. Pharma.* 2013; 455: 219-228.<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>

- V. Saharan, G. Sharma, M. Yadav, M.K. Choudhary, S.S. Sharma, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 75: 346-353.<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>
- N. Sharma, A. Tripathi. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiology Research* 2008; 163: 337-344.<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>
- D.J. Sullivan, M. Cruz-Romero, T., Collins, E. Cummins, J.P. Kerry, M.A Morris. Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids* 2018; 83: 355-364.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.010>
- M.L. Tsai, R.H. Chen, S.W. Bai, W.Y. Chen. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carbohydrate Polymers* 2011; 84: 756-761.<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.040>

Fig. 1. The average size (a), PDI (b), zeta potential (c), turbidity (d) and pH (e) values of FCN stored at 5 °C, 25 °C and 40 °C for 2 months. The standard deviations are equal to or smaller than the size of the symbols.

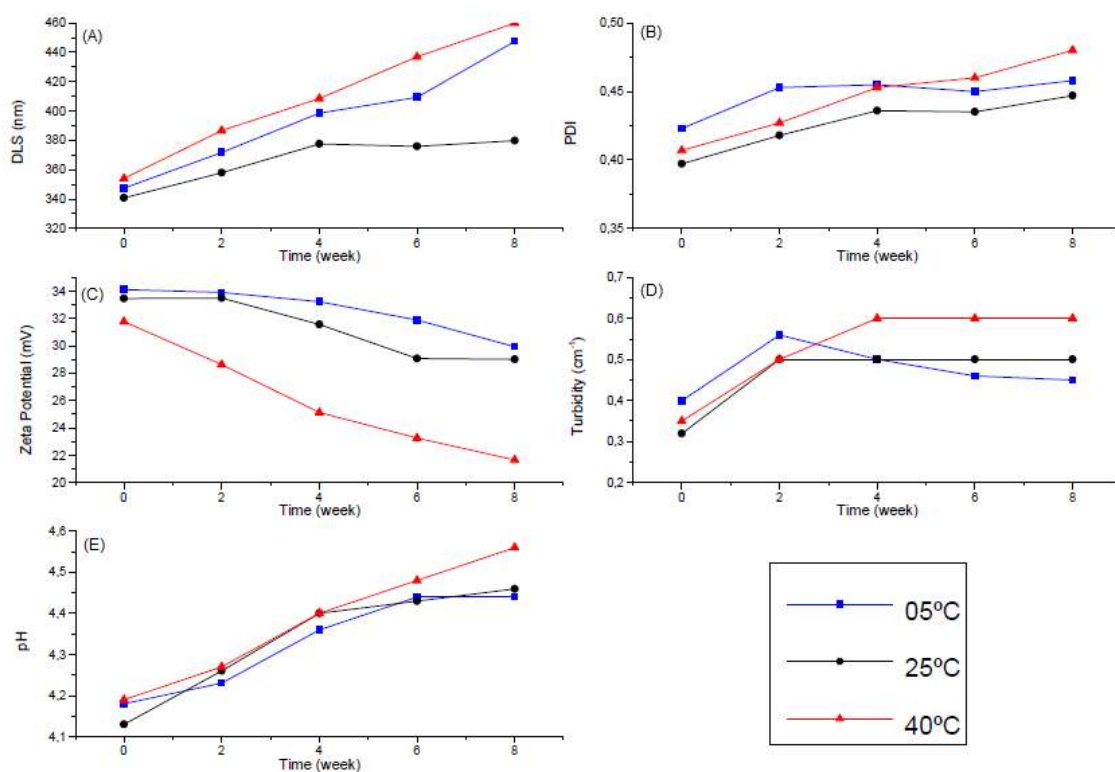
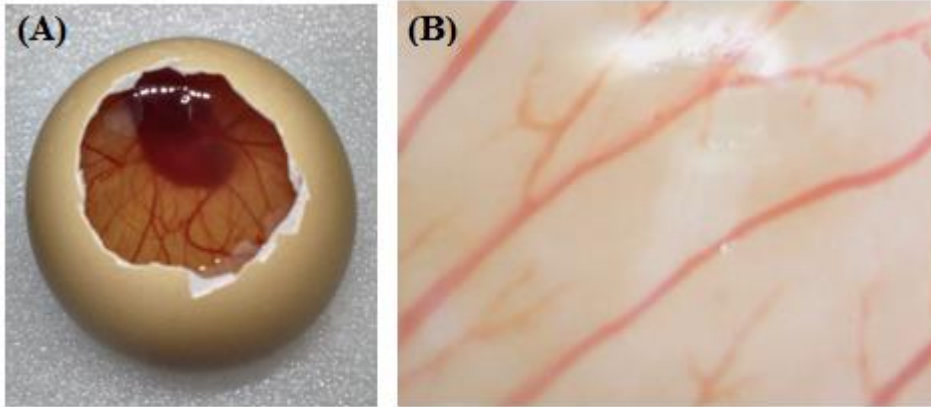


Fig. 2. Chorioallantoic membrane image taken from the top of the egg after deposition of FCN (A) and optical microscopy of the vessels of this same egg with increase of 40X (B).



APÊNDICE E – ARTIGO 2 - ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD STUDIES – QUALIS A3

Quality of postharvest strawberries: comparative effect of fungal chitosan gel, nanoparticles and gel enriched with nanoparticles edible coatings

Natália Ferrão Castelo Branco Melo^{a*}, Maria Manuela Estevez Pintado^b, José Alberto da Costa Medeiros^a, André Galembeck^c, Margarida Angélica da Silva Vasconcelos^a, Viviane Lansky Xavier^a, Marcos Antônio Barbosa de Lima^d, Tânia Lucia Montenegro Stamford^a, Thatiana Montenegro Stamford–Arnaud^a, Miguel A. P. Flores^c, Thayza Christina Montenegro Stamford^e

^aCentro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Brazil.

^bEscola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa- Porto, Rua Arquitecto Lobão Vital, 4200-375 Porto, Portugal.

^cCentro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Brazil.

^dDepartamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manuel de Medeiros, 97, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, Brazil.

^eCentro de Ciências Médicas, Departamento de Microbiologia Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, 2º andar, Microbiologia e Imunologia, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife, PE, Brazil

*Corresponding author

E-mail: natalia_melo_835@hotmail.com

Tel: +55-81-988013648

Fax: +55-81-21268473

Abstract

This study compared, for the first time, the postharvest conservative action of fungal chitosan edible coatings (gel, nanoparticles and gel-nanoparticle) on the physico-chemical, sensorial and microbiological characteristics of strawberries. The nanoparticles were prepared by ionic gelation method and characterized by dynamic light scattering and scanning electron microscopy. The antioxidant (DPPH* and ABTS*) activity of the edible coatings and the antimicrobial (macrodilution method) action against phytopathogenic fungi were verified. The nanoparticles had a size = 331.1 nm

and a zeta potential = + 34 mV. The gel, nanoparticles and gel+nanoparticles exhibited MIC values ranging from 4 to 5, 1.5 to 2.5 and 1.0 + 0.5 to 2.0 + 1.5 g.L⁻¹, respectively. All the edible coatings exhibited antifungal action. All the coatings presented a high scavenging activity, especially the gel edible coating. The coatings, especially the gel+nanoparticles, decreased the weight loss, microbiological growth, soluble solids, maturity index and moisture loss of the strawberry and preserved the pH values, anthocyanin content, titratable acidity and sensory characteristics. Therefore, the use of chitosan edible coating containing nanoparticles can be a promising strategy to improve the post-harvest quality of strawberries.

Keywords: Antifungal activity; Antioxidant activity; Biopolymer; Nanotechnology; Shelf-life.

Short title: Strawberries coated with fungal chitosan (gel, nanoparticles, gel + nanoparticles)

1. Introduction

Strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*) is a non-climateric fruit cultivated worldwide and characterized by an attractive taste, flavor and important nutritional compounds. However, due to its high respiration rate, excessive soft texture, water loss and microbiological decay, strawberries are considered highly perishable fruit (postharvest life approx. 3-4 d at 20 °C) (Shahbazi, 2018). So, various technologies have been developed for strawberry preservation in accordance with the principles of green chemistry (Dhital et al., 2017; Oregel-Zamudio et al., 2017).

The application of edible coating has been considered as an alternative method to prevent fruit postharvest decay and to extend the storage life, while retaining the overall quality of different fresh commodities (Yousuf et al., 2018). Different biological materials have been used to prepare packaging materials, especially chitosan. This polymer is traditionally obtained from crustacean shells. However, fungi biomass is a promising eco-friendly alternative for obtaining chitosan because it is not affected by seasonal factors can be produced on a large scale, without changing the physicochemical characteristics of the polymer and does not contain any of the proteins that induce allergic reactions to crustaceans (Berger et al., 2018).

Chitosan has received much interest for its application in food preservation because of its excellent film-forming ability, antimicrobial and antioxidant activities, biocompatibility, biodegradability and non-toxicity (Muzzarelli et al., 2012). Nevertheless, it is believed that the characteristics of edible coatings can be improved by incorporating nanostructures into the polymer matrix (Pilon et al., 2015).

According to Eshghi et al. (2014), nanotechnology could facilitate the development of novel packaging materials and non-polluting, cheaper, and more efficient packaging techniques.

Unique physicochemical characteristics are consequences of reduction in particle size and increasing the surface to particle size ratio in nanoparticles. The chitosan edible composite coatings, due to the interaction between nanoparticles and chitosan gel, are supposed to show enhanced antimicrobial activity and barrier properties to the internal gas atmosphere of the fruit, which reflects a better maintenance of the physicochemical and microbiological characteristics of fresh strawberry (Eshghi et al., 2014).

However, until now, any research has demonstrated that the use of chitosan nanoparticle alone in the edible coating is actually a better fruit preservative than the use of chitosan gel edible coating or coating composed with gel enriched with chitosan nanoparticles. Therefore, the aim of this research was to compare, for the first time, the preservative action of three different fungal chitosan edible coatings (gel, nanoparticles and gel enriched with nanoparticles) on the quality of postharvest strawberries during storage time.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Strawberries were purchased from Supplies and Service Company of Pernambuco (Recife, Brazil) and selected according to size and colour; they showed no signs of deterioration or mechanical damage. The chitosan (KiOnutrime®) were provided by Kitozyme® Company (Herstal, Belgium) and it is a fungal chitosan (deacetylation degree of 86 %, molecular weight of 4×10^3 Da), extracted from *Aspergillus niger* mycelium. The other substances used were obtained from commercial sources.

2.2 Preparation and characterization of chitosan nanoparticles

The fungal chitosan nanoparticles (FCN) were prepared by ionic gelation method with some modifications (Calvo et al., 1997). The chitosan (CS) solution, with concentration of 2 g.L^{-1} , was prepared by dissolving the polymer in 24 mL of pH 4 solution (1 % acetic acid + 1 % NaOH) and stirred for 30 min. The sodium polyphosphate (TPP) solution was dissolved in deionized water at concentration of 1 g.L^{-1} . Then, 6 mL of TPP solution was gradually dropped (0,2 mL/min) into 24 mL of chitosan solution using a peristaltic pump (Atlas Syringe Pump) under vigorous magnetic stirring at room temperature. The final ratio of CS:TPP was 4:1. Once the dropwise addition was completed, the nanoparticle suspension was stirred for an additional 1 h.

The morphology and particles size of the FCN were characterized by scanning electron microscopy (SEM) (SEM Quanta 200 FEI). The freeze-dried nanoparticles were mounted on specimen stub (with carbon ribbon and silver ink) (Taab, Berkshire, UK). The sample was coated with a 10 nm thick gold film using a sputter coater. The nanoparticles morphology was analysed using an electron acceleration voltage of 20 kV. The zeta potential of the nanoparticles was measured using a Malvern Zetasizer (model Nano ZS90, Malvern, UK). The analysis was performed at a scattering angle of 90° at 25 °C in 633 nm.

The size of the FCN was analyzed by Dynamic Light Scattering system (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, UK) (633 nm, 90°, 25 °C) (Tsai et al., 2011).

2.3 Determination of the antifungal activity

The three forms of fungal chitosan (nanoparticles, gel and gel enriched with nanoparticles) were used in the broth macrodilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against strawberries phytopathogenic fungi (*Botrytis cinerea* URM 2802, *Rhizopus stolonifer* URM 3728 and *Aspergillus niger* URM 7282). For this assay, phytopathogenic fungi stock cultures were subcultured in Sabouraud agar at 28 °C for 7 days to allow sufficient sporulation. The fungal spores were collected in a sterile saline solution (0.85 g /100 mL NaCl) in fungal growth medium, and the suspension was filtered through a sterile triple-gauze layer to retain hyphal fragments. The number of spores present in the suspension was determined with a hemocytometer. The spore concentration obtained was adjusted with sterile saline solution to provide a fungal inoculum of approximately 10⁶ spores/mL (Vasconcelos de Oliveira et al., 2014a).

The broth macrodilution technique was performed in triplicate. Initially, 0.5 mL of a suspension of the phytopathogenic fungi was inoculated, separately, into 2 mL of Sabouraud broth (with the concentration adjusted to 5 mL), and 2.5 mL of the solutions containing different concentrations of test substances were added. The mixture was incubated at 25 °C for 7 days, and at the end of the incubation period, the lowest concentration of test substances that exhibited no visible fungal growth was considered to be the MIC (Sharma and Tripathi, 2008). This assay was performed separately for each test substances and fungi strains.

For this assay, the freeze-dried FCN and the CS were diluted in a solution of 1 % acetic acid and pH was adjusted to 5.8 with 1 % NaOH. The solution of 1 % acetic acid with pH adjusted to 5.8 was tested, separately, as a control and exhibited no inhibitory effects against the phytopathogenic fungi.

2.4 Comparative antioxidant activity

The antioxidant activity of the fungal CS gel, FCN and CS gel enriched with FCN was evaluated using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay and ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) assay.

2.4.1 DPPH radical scavenging ability

The comparative scavenging effect of test substances on DPPH radicals was measured according to the method described by Chen et al. (2015). 2.5 mL of the test substances solution at different concentrations (MIC/2, MIC and 2xMIC) were added into 2.5 mL of freshly prepared DPPH solution in ethanol (50 g.L⁻¹). The mixture was shaken thoroughly with vortex mixer and incubated for 30 min at 33 °C. Then, the absorbance was measured at 517 nm using a UV-vis spectrophotometer (Agilent, USA). The percentage of DPPH radical scavenged was calculated as follows:

$$\text{DPPH radical scavenging ability (\%)} = [1 - (A_a - A_b / A_c)] \times 100$$

where A_a = absorbance of the sample mixed with DPPH solution, A_b = absorbance of the sample without DPPH solution and A_c = absorbance of blank control without sample.

2.4.2 ABTS radical scavenging ability

The analysis of ABTS scavenging activity was determined according to the method described by Laurrauri et al. (1997). In this method, ABTS was prepared by mixing 5 mL of ABTS solution (7.9 mM) with 88 μ L of potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) solution (140 mM). This mixture was allowed to stand for 16 h at room temperature in the dark until reaching a stable oxidative. Then, 1 mL of ABTS solution was diluted in ethanol to given an absorbance of 0.700 ± 0.05 nm at 73 nm. In a dark place, 3 mL of ABTS solution was added to 30 μ L of test substances at different concentrations (MIC/2, MIC and 2xMIC). After 6 min, the absorbance was taken at 734 nm using the spectrophotometer (Agilent, USA). The scavenging capability of test substances was calculated using following equation:

$$\text{ABTS radical scavenging ability (\%)} = [1 - (A_a - A_b / A_c)] \times 100$$

where A_c =absorbance of a control (blank) lacking any radical scavenger and A_a =absorbance of the remaining ABTS in the presence of scavenger, A_b =absorbance of the sample without ABTS.

2.5 Preparation and application of edible coatings in strawberries

The strawberries were immersed in sodium hypochlorite (1 %) for 15 min, washed with potable water and left to dry (2 h). Then, the strawberries were immersed (1 min) in the coating solutions and left to dry (30 min) on a nylon filter to drain the excess liquid (Vasconcelos de Oliveira et al., 2014a).

The strawberries were divided into five groups. One group was the negative control (without edible coating), the other group was the positive control (fruit coated with glycerol – 2.5 mL / 100 mL) and the other three groups were coated with CS gel, FCN and CS gel enriched with FCN.

For the formation of the different fungal chitosan edible coatings, we used the highest MIC value determined for the strawberries phytopathogenic fungi. The pure chitosan or lyophilized nanoparticles were diluted in 1 % acetic acid and the pH was adjusted to 5.8 (Vasconcelos de Oliveira et al., 2014a). Each treatment included 40 strawberries that were stored for 6 days at room temperature (25 ± 2 °C) and 12 days at cold temperature (10 ± 2 °C) (Shahbazi, 2018). These temperatures were chosen based on the methodologies used by Santos et al. (2012), Gol et al. (2013), Vasconcelos de Oliveira et al. (2014a), Vasconcelos de Oliveira et al. (2014b), Guerra et al. (2015), Castelo Branco Melo et al. (2018).

2.6 Physicochemical analysis on strawberries

The strawberries were evaluated every 3 days for general quality parameters such as moisture content, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), maturity index (MI), pH and anthocyanin content. The day of the application of the edible coatings was considered the time zero (day zero) in the storage period.

The total soluble solids content was determined with a refractometer (Model AUS JENA, Germany), and the results were expressed as % TSS (AOAC, 932.12). The AT was determined by titrating with 0.1 mol.L⁻¹ NaOH to pH 8.2, and the results were expressed as a percentage of citric acid (AOAC 920.149). The MI was calculated as the quotient of soluble solids and acidity. The pH of the fruit samples was assessed using a digital pHmetre (Model: Micronal B474) according to the standard method described in AOAC (2012) (AOAC 981.12). The moisture content was determined by dehydration of the fruit (70 °C / 24 h) until the dry weight was obtained, and the results are expressed in percentage (AOAC 934.06). The anthocyanin content was estimated by the method described by Lees and Francis (1972). The results are expressed in g.L⁻¹.

2.7 Weight loss percentage

The weight loss was considered the difference between the initial and final weight of coated and uncoated strawberries. The results were expressed as the percentage loss from the initial weight, according to the method described by Gol et al. (2013).

2.8 Decay rate of strawberries

The strawberries were examined for any microorganism infection during storage. The decay percentage of coated and uncoated fruit was calculated as the number of decayed fruit divided by the initial number of all strawberries multiplied by 100 (Castelo Branco Melo et al., 2018).

2.9 Sensory evaluation

The sensory analyses were performed after approval by an Ethics Research Committee - Certificate Number: 58937016.3.0000.5208. Uncoated and coated strawberries at the same concentration used in the physicochemical analysis, were stored at cold temperature. Sensory attributes of the strawberries were analysed 3 days after the coating application in a standardized testing room in the sensory laboratory of the Department of Nutrition located in Federal University of Pernambuco (Brazil).

Each sample was presented simultaneously in dishes coded with 3-digit random numbers to each panellist evaluation three days after the coating application. The panellists were asked to drink water and eat a salty biscuit between samples. In the preference test, the tasters were asked to choose the most and least appreciated samples based on their overall evaluation. The intent to purchase was assessed on a five-point structure hedonic scale ranging from one (certainly would not buy) to five (certainly would buy). For the acceptability test, a nine-point structure hedonic scale was used, ranging from one (dislike very much) to nine (like very much) (Castelo Branco Melo et al., 2018).

2.10 Statistical analysis

All data were analysed by analysis of variance (ANOVA) using Origin 8.0 software. ANOVA was followed by post hoc Tukey's test. This test was performed to determine differences ($p < 0.05$) between the obtained results.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of FCN

The Figure 1 shows that FCN presented $331.1 \text{ nm} \pm 7.21$. Based on previous studies, this particle size contributes to the performance of FCN as antifungal agent. It can be seen in the research of Saharan et al. (2015) and Xing et al. (2016), which produced particles with an average size of 374.3 nm and 296.96 nm, respectively, to use as antimicrobial agent against phytopathogenic fungi. According to Mubarakali et al. (2018), chitosan nanoparticles present antifungal activity due to their large surface

area. It allows their fixation in a large number of fungi, which contributes to their use as an edible coating.

FCN also presented a narrow size distribution with 0.377 polydispersity index. Generally, the use of low molecular weight chitosan produce small and uniform nanoparticles (Paomephan et al., 2018), as can be seen in our FCN. According to Saharan et al. (2015), this size uniformity also contributes to the antifungal activity of chitosan nanoparticles. Therefore, the particles produced in the present research exhibited an average size which contributes to its antifungal activity and consequently to the ability of these particles to preserve the quality of postharvest fruit as edible coating. Furthermore, the FCN produced, according to Severino et al. (2012), will not be absorbed by the human intestinal epithelium when people eat a fruit with an edible coating containing FCN. These authors reported that particles > 300 nm are not absorbed by the human intestinal epithelium.

The morphological characterization of FCN by the SEM confirmed the uniform spherical shape of the particles (Fig. 1). However, SEM analysis shows the formation of aggregates between the particles. Fan et al. (2012) reported that these aggregates formation is caused by the hydrogen bonds between the particles formed during the drying process of the sample for SEM analysis.

The FCN observed by SEM exhibited a smaller size than the size of FCN analyzed by dynamic light scattering. It could be occurred because the DLS technique observe the state of the sample in the presence of solvent associated with the particles, while SEM gives the size of the particles in dry form (Kiilll et al., 2017).

The zeta potential of FCN was + 34 mV, which means that these nanoparticles could be stable for a long time. This is in agreement with the results of Sullivan et al. (2018) who reported that when chitosan and TPP were mixed with each other, they spontaneously formed complexes with an overall positive surface charge. According to Ing et al. (2012), nanoparticles with a surface charge greater than + 30 mV are more stable. Furthermore, Saharan et al. (2015) reported that particles with a positive surface charge exhibit a higher affinity towards biological membranes in an aqueous environment and, therefore, more antifungal activity.

3.2 Determination of the antifungal activity

The MIC results are shown in table 1. These results are in agreement with Verlee et al. (2017) preconized, that the MIC values of chitosan against fungi ranges from 0.01 g.L⁻¹ to 7.75 g.L⁻¹. Furthermore, the MIC values found in our research are lower than the values found by Santos et al. (2012) and Guerra et al. (2015) when they analysed the MIC values of chitosan from shrimp against *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer*.

However, the different MIC values found in our research could not be related to microbiological origin of the chitosan used here. Vasconcelos de Oliveira et al. (2014a) and Vasconcelos de Oliveira (2014b) also used fungal chitosan against phytopathogenic fungi and found MIC = 15 g.L⁻¹ for *B. cinerea* and

MIC = 7.5 g.L⁻¹ for *A. niger* and *R. stolonifer*. It suggested that the difference between the chitosan MIC values against the same species of fungi could be related to the physicochemical characteristics of the polymer, such as the degree of deacetylation and molecular weight (Verlee et al., 2017).

According to Badawy and Rabea (2009), chitosan with low molecular weight presented a better antifungal activity. It occurs due to the ability of this polymer to penetrate in the fungal cell wall. This suggests that the main target of action of the chitosan with low molecular weight is the plasma membrane of the fungi (Yoonkyung et al., 2008). The fungal chitosan used in the present research has a low molecular weight, which could be contributed to the high antifungal activity and low MIC values. In addition, Kong et al. (2010) reported that the chitosan presents a polycationic structure due to the presence of amino groups in the polymer chain. These groups provide to the polymer a high density of positive charges that could be measured by the degree of deacetylation. Therefore, a chitosan with a high degree of deacetylation exhibited a better electrostatic interaction with the fungal cell wall. In general, the antifungal activity increases when the degree of deacetylation is higher and the molecular weight is lower (Verlee et al., 2017).

Despite the discrepancies between the physicochemical characteristics of chitosan, it is known that chitosan can affect the fungal cell membrane via electrostatic interactions with the negatively charged phospholipids. Once the cell membrane is disrupted, chitosan is capable of entering the cell. This could lead to inhibition of DNA/RNA synthesis and disruption of protein synthesis (Ma et al., 2017).

FCN improved the antifungal activity when compared to CS gel. According to Kheiri et al. (2016), chitosan nanoparticles exhibit higher antifungal activity than CS gel on account of the special characteristics (size and surface charge) of these particles. The negatively charged surface of the fungal cell is the target site of the polycation. Therefore, the polycationic FCN with higher surface charge density interact with the fungus to a greater degree than CS itself (Kheiri et al., 2016). Because of the larger surface area of the nanoparticles, FCN could be tightly adsorbed onto the surface of the fungal cells so as to disrupt the membrane, which would lead to the leakage of cellular contents, thus killing the fungal cells (Garcia Rincon et al., 2010). Chitosan nanoparticles penetrate into fungal cells and tightly bind nucleic acids via electrostatic interaction between cationic FCN and anionic DNA. This suggest that they may cause a variety of damages and selective inhibitions such as inactivation the synthesis of essential mRNA encoded by various genes required for important metabolic and infectious processes of the microorganism (Ing et al., 2012).

The MIC values for *A. niger* were higher than the values found for the other fungi for all test substances. Ing et al. (2012) found similar result. This fungus, in particular, was found to be highly resist to chitosan, because *A. niger* contains 10 % of chitin in the cell wall, and fungi that have chitosan as one of their cell wall components are more resistant to externally amended chitosan and consequently more resistant to chitosan nanoparticles (Allan & Hadwiger, 1979).

When the CS gel was enriched with FCN an improvement was observed in the antifungal activity. The mixture of the gel with FCN presented the best inhibitory effect against the strawberries phytopathogenic fungi. It suggests that when the gel and nanoparticles are together, they improved their individual antifungal activity. According to Lee et al. (2010), when chitosan nanoparticles are well-dispersed in the solution they are more efficiently transported to the cell wall, which causes disorders and leads to increased antimicrobial activity.

3.3 Antioxidant activity

As is shown in Figure 2a, the test substances showed strong activity to scavenge the DPPH free radicals in a dose-dependent manner. Similar results were found by Chen et al. (2015) e MubarakAli et al. (2018). The same behavior was found in the ABTS assay (Fig. 2b). DPPH radicals are less reactive than ABTS radicals; unlike the reactions with DPPH radicals, which involve H-atom transfer, the reactions with ABTS radicals involve an electron-transfer process (Chen et al., 2015).

In DPPH assay, any test substance in the concentration of MIC/2 showed scavenging effect. The scavenging effect occurred only when the test substances were used in the MIC and 2MIC concentrations. However, at a low concentration (CIM/2), the scavenging ability of the test substances on ABTS is stronger than this ability on DPPH radicals.

The scavenging ability of CS gel on DPPH and ABTS was stronger than FCN and CS gel enriched with FCN. It may be due to the presence of the amino groups in the CS chain (Siripatrawan & Harter, 2010). According to Yen et al. (2008), the scavenging mechanism of chitosan is related to the fact that free radical can react with the residual free amino (NH_2) groups to form a stable macromolecule radicals, and the NH_2 can form ammonium (NH_3^+) groups by absorbing a hydrogen ion from the solution. Therefore, chitosan with higher degree of deacetylation will probably exhibit a strong antioxidant activity.

The FCN presented the lowest antioxidant activity for both test. This could be due to the lower number of free amino groups present in the nanoparticles. During the ionic gelation method, the process of the nanoparticles synthesis, the amino groups of the chitosan chain bind to TPP to form the FCN (Bugnicourt et al., 2014). Therefore, the fungal chitosan nanoparticles have less free NH_2 group than CS gel. It contributed to the lower FCN antioxidant activity, because these free amino groups are the responsible to bind to free radicals.

It is important to note that the MIC concentrations of FCN (2.5 g.L^{-1}) is a half part of MIC concentration of CS gel (5 g.L^{-1}). It suggests that the FCN had a lower antioxidant activity than the CS gel not only due to the smaller amount of free amino groups, but also to its lower MIC value that it was used in the DPPH and ABTS assay.

However, when FCN was dispersed in the CS gel an improvement in their scavenging ability occurs. It could be seen in the ABTS assay when the CS gel and CS gel enriched with FCN was tested in 2MIC concentration. These substances exhibited similar scavenging effect at this concentration ($p > 0.05$). This result suggests that when CS gel was mixed with FCN increase not only their antifungal activity, but also improve the antioxidant activity of this mixture.

3.4 Effects on physicochemical characteristics of strawberries

The physicochemical changes in uncoated and coated strawberries were evaluated throughout storage at room temperature and under refrigeration during 6 and 12 days, respectively (Tables 2 and 3).

According to Oregel-Zamudio et al. (2017), the soluble solids content during the ripening of strawberries should range from 4.6 % to 11.9 %. In the present research, all fruit samples presented soluble solids content in the range recommended. However, at the end of the storage period at both temperatures, the control sample exhibited significantly higher soluble solids content ($p < 0.05$) than the chitosan-based edible coatings. This result suggests that the control fruit continued with its active metabolism, which contribute to the conversion of the starch to acid and sugar, increasing the soluble solids content (Cao et al., 2015).

Coated strawberries presented lower values of soluble solids at the end of storage because chitosan modifies the internal atmosphere of the fruit, reducing the O_2 and increasing CO_2 . It could be reduces the respiration rate and the metabolic activity of the fruit, which also reduces the conversion of sugars into CO_2 and water (Gasemnezhad et al., 2011). There was no significant difference ($p > 0.05$) in the soluble solids content of the samples coated with chitosan-based edible coatings. Therefore, this result suggests that the capacity of chitosan to maintain the soluble solids content of strawberries is independent of the form of the polymer was applied (gel or nanoparticles).

The titratable acidity values of the strawberries with and without edible coatings were maintained during the storage period at room temperature. According to Gol et al. (2013), the titratable acidity is directly related to the amount of organic acids present in the fruit and in the strawberry the main acids are citric and malic. A reduction in the fruit acidity could occur due to changes in fruit metabolism or the use of organic acids in the respiratory process (Hajji et al., 2018). The edible coatings reduce the fruit respiration rate that delay the use of organic acids which maintains titratable acid values during storage (Yaman & Bayoindirli, 2002).

The strawberries stored at cold temperature also maintained titratable acidity values in relation to day 0. However, on day 12, the strawberries coated with the gel+FCN differed significantly ($p < 0.05$) from the control sample and presented the lowest titratable acidity value. It could be related to the low values of titratable acidity that this strawberry sample already had since the beginning of the analysis. In this case, the edible coating only maintained these values, which shows that the gel+FCN is able to

retard the metabolism of the fruit, consequently decreases the consumption of the organic acids, maintaining the titratable acidity.

The strawberries with the edible coatings and stored at room temperature decreased their maturation index from the third day of storage. In addition, in the same temperature, the coated samples differed significantly ($p < 0.05$) at the end of the storage period when compared to the control sample.

The increase in maturity index during storage is associated with the progression of the fruit ripening process (Perdones et al., 2012). The low values of the maturity index in the coated samples show the capacity of the chitosan based edible coatings to delay the metabolic activity of the strawberries. However, at cold storage, in the end of the storage period, the maturity index of the strawberries with and without coatings did not differ significantly ($p > 0.05$). According to Valenzuela et al. (2015), this increase in the maturity index during the final storage period is a result of the fruit senescence process. Strawberries coated with FCN and gel + FCN keep the maturity index constant, which reflect the delay of fruit senescence. Otherwise, strawberries coated with glycerol and CS gel showed an increase in their maturation index.

The anthocyanin content can also reflect the delay of fruit senescence. At the end of storage, all samples showed a decrease ($p < 0.05$) in the anthocyanin content. However, on the last day of storage, at room temperature the control sample had the highest anthocyanin content ($p < 0.05$). The edible coatings form a barrier between the fruit and the environment, which modifies the concentrations of CO_2 and O_2 in the fruit affecting the synthesis and degradation of anthocyanin. The greatest accumulation of anthocyanin in the control sample may be related to its advanced maturation, which includes the synthesis of this pigment from glucose (Meng et al., 2008).

However, anthocyanin, the pigment responsible for the red color of strawberries, reflects on the sensory quality and health benefits of this fruit (Van de Velde et al., 2013). Therefore, low values of this pigment can affect the sensorial acceptability of the fruit. At cold temperature, the strawberries coated with gel+FCN maintained their anthocyanin content (first and last day of storage) and indirectly the fruit sensorial quality.

Furthermore, there was a decrease of the samples pH. According to Famiani et al. (2015), in the pulp of many fruit occurs an increase of organic acids during fruit maturation. It has been shown that the main organic acid accumulated in ripe strawberries is citric acid (Famiani et al., 2005), which may be involved in the decrease of the pH observed in the samples analyzed.

The strawberries coated with FCN and gel+FCN and stored at room temperature and at cold temperature, respectively, were the only ones that did not present significant difference ($p > 0.05$) in the pH values during all evaluated days, suggesting a delay in the senescence of these samples. It is important to note that only the coatings that had chitosan nanoparticles in their composition (alone or mixed with the gel) were able to maintain pH values and delay the senescence of fruits. Therefore,

when chitosan is in nanoparticle form, it is possible that it potentiates its protective effects contributing to the conservation of the physical-chemical parameters of the fruits (Castelo Branco Melo et al., 2018).

The percentage of strawberries moisture showed that, at the end of the storage period, at room temperature, the moisture content of the samples did not differ significantly ($p > 0.05$). The same behavior was found in the fruit stored at cold temperature. The only exception was the strawberries coated with gel+FCN, which presented on the 12th the highest moisture content that differed significantly ($p < 0.05$) from all samples. Therefore, the storage temperature did not influence in the moisture percentage of the strawberries. Castelo Branco Melo et al. (2018) suggests that the longer storage time of the fruits at refrigeration temperature (12 day) in relation to fruits stored at room temperature (6 days) may also favor an advance in fruit metabolism which contributed to a higher loss of moisture.

The gel + FCN coating applied to strawberries stored in refrigeration shows that the association of these two forms of chitosan can significantly improve the barrier properties of an edible coating. According to Amarante et al. (2001), gas exchanges between the fruit and the environment occur through open pores and the high permeability of the skin fruit. The chitosan coatings act as a barrier between the fruit and the environment, thus avoiding the loss of moisture (Guerreiro et al., 2015). When we associate this type of coating with nanoparticles, we created a double blocking effect - the barrier formed by the CS gel and FCN block the pores present in the strawberries (Castelo Branco Melo et al., 2018).

In addition, it is important to note that the concentration of the gel and the nanoparticles ($2 \text{ g.L}^{-1} + 1 \text{ g.L}^{-1}$) in the coating made by the mixture is much lower than the concentration used in the coating made only with the CS gel (5 g.L^{-1}) and only with FCN (2.5 g.L^{-1}). It shows that the two forms of chitosan present a potentiation of their barrier properties when together, even in low concentrations.

3.5 Weight loss

The samples stored at room temperature presented high weight loss and there was not statistically significant difference ($p > 0.05$) between the results of these samples (Fig. 3a). According to Garcia et al. (1998), the maximum commercially acceptable limit for strawberries weight loss is 6 %. In our research, all samples stored at room temperature exhibited weight loss percentages higher than the acceptable limit. Any edible coating was able to prevent significant weight loss at room temperature. This could be occurred due to the storage temperature, since the cold temperature decreased about 15 times the weight loss of the strawberries when compared to the room temperature. Ventura-Aguilar et al. (2018) also found a similar decrease when applied chitosan coatings and cinnamon extract on strawberries storage at cold temperature.

Fruit weight loss is associated with the fruit respiration and evaporation process. Therefore, at high temperatures, there is an increase in the respiratory rate of the fruit, associated with a loss of moisture and weight (Ali et al., 2015). So, the weight loss was more intense in samples stored at room temperature than at cold temperature. Similar result was found by Castelo Branco Melo et al. (2018), which used CS gel enriched with FCN edible coatings to preserve table grapes.

According to Khalifa et al. (2016), chitosan is able to decrease weight loss in fruit due to its filmogenic property. This polymer acts as a barrier to water vapor and the gas exchanges between the fruit and the external environment. At cold temperature, the strawberries coated with CS gel did not present statistically significant difference ($p > 0.05$) when it was compared to the fruit coated with FCN or CS gel enriched with FCN. Kaewklin et al. (2018), analyzed the weight loss of tomatoes coated with CS film and chitosan-titanium dioxide nanocomposite film and also reported that there was not statistically significant difference ($p > 0.05$) in the weight loss between the tomatoes coated with the CS nanocomposite and CS alone.

Therefore, the prevention of weight loss is more related to the formation of the external barrier produced by the edible coating than the form of the polymer present in this coating. However, all strawberries with the edible coatings produced in the present research and stored at cold temperature presented commercially acceptable weight loss according to the limit defined by Garcia et al. (1998).

3.6 Decay rate

The lowest percentage of decay was found in strawberries coated with FCN alone or FCN associated with CS gel (Fig. 3b). These strawberries samples differed statistically ($p < 0.05$) from the control samples at both temperature. Otherwise, the fruit coated with CS gel did not statistically differ ($p > 0.05$) from the control fruit at any temperature analyzed. It suggests that there is an improvement in the conservative action of chitosan when this polymer is in the nanoparticle form.

According to Hajji et al. (2018), chitosan plays a dual function by interfering directly in the fungal growth through the hydrolysis of chitin (important cellular component of the fungus) and activating many biological processes in plant tissues. Furthermore, the antimicrobial activity of this polymer is related to its ability to induce severe cellular damages to the molds and to interfere in the polygalacturonases secretion of fruit (Velickova et al., 2013).

The edible coating itself is another factor that contributes to a lower percentage of visible infection in fruits, since it acts as a barrier that prevents the contact of the strawberry with external microorganisms (Hajji et al., 2018). The edible coatings also act retarding the senescence of fruits and the resistance to fungal infections can be improved by the senescence delay (Neeta et al., 2013)

A significant decrease ($p < 0.05$) in the decay rate was observed when FCN coating was applied to the strawberries stored at cold temperature in relation to strawberries with this same type of coating, but stored at room temperature (Fig. 4). Similar to the results found in the present research, Castelo Branco Melo et al. (2018) also observed that at cold temperature the conservative action of the chitosan nanoparticles edible coating was improved. Low temperature storage slows the physiological processes in fruit and pathogens have weaker pathogenicity, and this reduces the incidence of decay compared to fruit stored at room temperature, which decay rapidly (Meng et al., 2008). Therefore, the present research confirms the idea that the use of chitosan in nanoparticle format enhances its conservative action on fruits, especially on strawberries. This action could be more effective when the fruit is stored at low temperatures.

3.7 Sensory evaluation

Changes in sensory attributes are presented in Table 4. Uncoated fruit received the highest scores for all analyzed attributes when compared to coated fruit. However, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the control, CS gel and FCN samples in relation to the strawberries colour, taste, flavor, firmness and overall evaluation. It could be suggested that the form of the chitosan polymer (gel or nanoparticles) did not influence in the sensory quality of the strawberries. According to Vargas et al. (2006), chitosan could show astringent taste due to its dissolution in an acidic medium, but this was not observed in the strawberries coated with CS gel and FCN, since the sensory analysis was performed on the third day of storage. This result is in agreement with the results reported by Velickova et al. (2013) and Castelo Branco et al. (2018).

It is important to note that the edible coating made by the mixture of CS gel and FCN differs significantly ($p < 0.05$) from the control group for all analyzed attributes, except for the firmness. As previous reported in the present research, the gel+FCN coating applied to strawberries stored in refrigeration shows that the association of these two forms of chitosan (gel and nanoparticles) can significantly improve the barrier properties of an edible coating. The strawberries coated with gel+FCN keep the maturity index and pH constant and presented the highest humidity percentage. The application of this type of coating could be delayed the ripening process, which contributed to the lower acceptance of this sample.

When asked to reported about the intent to purchase, the panelists reported differences between uncoated and coated fruit. The control strawberries did not presented significant differences ($p > 0.05$) in relation to fruit coated with FCN. These samples exhibited scores around four (control: 4.34 ± 1.03

and FCN: 4.09 ± 1.10) and were the most accepted, followed by CS gel (3.84 ± 1.10), which not differ ($p > 0.05$) from FCN.

No difference ($p > 0.05$) in preference was observed between fruit coated with glycerol (3.61 ± 1.10) and gel + FCN (3.64 ± 1.14). These groups were the least appreciated sample, which is in agreement with the acceptability test. However all samples exhibited scores around four which shows that the tasters would “possibly buy” the fruit. Same scores was found by our previous study when we applied an edible coating made by CS gel and FCN in grapes (Castelo Branco Melo et al., 2018). These scores makes the use of the edible coatings produced in the present study permissible on a commercial level based on analysis of the sensory aspects.

4. Conclusions

All chitosan based edible coatings were effective in maintaining the physicochemical, sensory and microbiological qualities of the postharvest strawberries. However, the coating made with FCN+CS gel was the most effect in maintaining these quality parameters of the strawberries and presented the best antifungal activity against the phytopathogenic fungi tested. The sensory evaluation of the strawberries showed that fruit coated with FCN received similar scores to control group, which suggest that the FCN do not modify the sensory quality of the fruit.

Based on these results, edible coatings made with different forms of chitosan, especially the mixture of FCN and CS gel, can be used to improve the post-harvest quality of strawberries. In addition, the application of nanotechnology can be a good alternative to improve the properties of chitosan, as well as increase the cost benefit of the use of edible coatings based on this polymer.

Acknowledgements

The authors thank the Kitozyme-Company for providing the chitosan, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, process nº CAPES/PROEX 1734/2015, the Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, process nº APQ 0566-5.07/14, Universidade Federal de Pernambuco process PROPESQ nº04/2018, for financial support and a research grant, the Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco and the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste for the availability of infrastructure.

References

- Ali, A., Noh, N.H., Mustafa, M.A. (2015). Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and shelf life*, 3, 56-61.
- Allan, C.R., Hadwiger, L.A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3, 285-287.
- Amarante, C., Banks, N.H., Ganesh, S., 2001. Relationship between character of skin cover of coated pears and permeance to water vapour and gases. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 291-301.
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2012. Official methods of analysis of AOAC international (19th ed.). Method 934.06, method 981.12, method 920.149, method 932.12.
- Badawy, M.E.I., Rabea, E.I. (2011). Biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-29.
- Berger, L.R.R., Stamford, T.C.M., Oliveira, K.A.R., Pessoa, A.M.P., Lima, M.A.B., Pintado, M.M.E., Câmara, M.P.S., Franco, L.O., Magnani, M., Souza, E.L. (2018). Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. *International Journal of Biological Macromolecules*. 635-641.
- Bugnicourt, L., Alcouffe, P., Ladavière, C. (2014). Elaboration of chitosan nanoparticles: favorable impact of a mild thermal treatment to obtain divided, spherical, and colloidally stable objects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457,476-486.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132.
- Cao, F., Guan, C., Dai, H., Li, X., Zhang, Z., 2015. Soluble solids content is positively correlated with phosphorus content in ripening strawberry fruits. *Scientia Horticulturae*, 195, 183-187.
- Castelo Branco Melo, N.F., Soares, B.L.M., Diniz, K.M., Leal, C.F., Canto, D., Flores, M.A.P., Tavares-Filho, J.H.C., Galembeck, A., Stamford, TLM, Stamford-Arnaud, T.M., Stamford, T.C.M., 2018. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 56-66.
- Chen, W., Li, Y., Yang, S., Yue, L., Jiang, Q., Xia, W. (2015). Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 132,574-581.
- Dhital, R., Joshi, P., Becerra-Mora, N., Umagiliyage A., Chai, T., Kohli, P., Choudhary R. (2017). Integrity of edible nano-coatings and its effects on the quality of strawberries subjected to simulated in-transit vibrations. *LWT – Food Science and Technology*, 80, 257-264.

- Eshghi, S., Hashemi, M., Mohammadi, A., Badii, F., Mohammadhoseini, Z., Ahmadi, K. (2014). Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria x ananassa Duchesce*) during storage. *Food Bioprocess and Technology*, 7, 2397-2409.
- Famiani, F., Cultreta, N.G., Battistelli, A., Casulli, V., Proietti, P., Standardi, A., Chen, Z.H., Leegood, R.C., Walker, R.P. (2005). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2959-2969.
- Famiani, F., Battistelli, A., Stefano, M., Cruz-Castillo, J.G., Walker, R.P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents-a review. *Resvista Chapingo Serie Horticultura*, 21, 97-128.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surface B: Biointerfaces*, 90, 21-27.
- Galvan Marquez, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A., Smith, M.L. (2013). Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 108-112.
- Garcia, J.M., Medina, R.J., Olías, J.M. (1998). Quality of strawberries automatically packed in different plastic films. *Journal of Food Science*, 63, 1037-1041.
- García-Rincón, J., Vega-Pérez, J., Guerra-Sánchez, M.G., Hernández-Lauzardo, N.A., Peña-Díaz, A., Velázquez-Del Valle, M.G. (2010). Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 275-278.
- Gasemnezhad, M., Nezhad, M.A., Gerailoo, S. (2011). Changes in postharvest quality of loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits influenced by chitosan. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 54,40-45.
- Gol, N.B., Patel, P.R., Rao, R. (2013). Improvement of quality and shelf life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-19.
- Guerra, I.C.D., Lima, de Oliveira, P.D., Pontes, A.L.S., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M. Nadruza, M.S., Souza, E.L. (2015). Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita L.* or *Mentha x villosa Huds* essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 168-178
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Antunes, M.D. (2015). The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 51-60.

- Hajji, S., Younes, I., Affes, S., Boufis, S., Nasri, M. (2018). Optimization of the formulation of chitosan edible coating supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocolloids*, 83, 375-392.
- Ing, L.Y., Zin, N.M., Sarwar, A., Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 23, 1-9.
- Kaewklin, P., Siripatrawan, U., Suwanagul, A., Lee, Y.S. (2018). Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit. *International Journal of Biomacromolecules*, 112, 523-529.
- Khalifa, I., Barakat, H., El-Mansy, H.A., Soliman, S.A., 2016. Enhancing the keeping quality of fresh strawberry using chitosan-incorporated olive processing wastes. *Food Bioscience*, 13, 69-75.
- Kheiri, A., Moosawi Jorf, S.A., Malhipour, A., Saremi, H., Nikkahah, M. (2016). Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of Fusarium head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) in vitro and greenhouse. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1261-1272.
- Kiill, C.P., Barud, H.S., Santagneli, S.H., Ribeiro, S.J.L., Silva, A.M., Tercjak, A., Gutierrez, J., Pironi, A.M., Gremião, M.P.D. (2017). Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1695-1702.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- Laurrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calizto F. (1997). Effect of drying Temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45,1390-1393.
- Lee, S.M., Song, L.C., Lee, B.S., 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Journal of Chemical Engineering*, 27, 688-692.
- Lees, D.H., Francis, F.G. (1972). Standardization of pigment analysis in cranberries. *Hortscience*, 7,83-84.
- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., Jeong, K.C. (2017). Application, mode of action, and in vitro activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. *Carbohydrate Polymers*, 176, 257-265.
- Meng, X., Li, B., Liu, L., Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grapes fruit to chitosan pre-harvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106, 501-508.

- Mubarakali, D., Lewisoscar, F., Gopinath, V., Alharbi, N.S., Alharbi, S.L., Thajuddin, N. (2018). An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants. *Microbial Pathogens*, 114, 323-327.
- Muzzarelli, R.A.A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., Demarchis, M., Paoletti, M.G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87, 995-1012.
- Neeta, B.G., Pooja, R.P., Raman Rao, T.V. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195.
- Paomephan, P., Assavanig, A., Chaturongakul, S., Candy, N.C., Bergkvist, M., Niamsiri, N. (2018). Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetables wash disinfectant. *Food Control*, 86, 294-301.
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32–41.
- Pilon, L., Spricigo, P.C., Miranda, M., Moura, M.R., Assis, O.B., Mattoso, H.C., Ferreira, M.D. (2015). Chitosan nanoparticles coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attributes. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 440-448.
- Oregel-Zamudio, E., Angoa-Pérez, M.V., Oyoque-Salcedo, G., Aguilar-González, C.N., Mena-Violante, H.G. (2017). Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during shelf-life. *Scientia Horticulturae*, 214, 273-279.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M.K., Sharma, S.S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346-353.
- Santos, N.S.T., Aguiar, A.J.A.A., Oliveira, C.E.V., Sales, C.V., Silva, S.M., Sousa, R.S., Stamgord T.C., Souza E.L. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare L.* essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis Labrusca L.*). *Food Microbiology*, 32, 345-353.
- Severino, P., Andreani, T., Macedo, A.S., Fangueiro, J.F., Santana, M.H., Silva, A.M., Souto, E.B. (2012). Current State-of-Art and new trends on lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. *Journal of Drug Delivery*, 1-10.
- Shahbazi, Y. (2018). Application of carboxymethyl cellulose and chitosan containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 264-272.

- Sharma, N., Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163, 337-344.
- Siripatrawan, U., Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770-775.
- Sullivan, D.J., Cruz-Romero M., Collins T., Cummins E., Kerry J.P., Morris M.A. (2018). Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 355-364.
- Tsai, M.L., Chen, R.H., Bai, S.W., Chen, W.Y. (2011). The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carbohydrate Polymers*, 84, 756-761.
- Valenzuela, C., Tapia, C., López, L., Bungler, A., Escalona, V., Abugoch, L. (2015). Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18,406-411.
- Van de Velde, F., Tarola, A.M., Guemes, D., Pirovani, M.E. (2013). Bioactive compounds and antioxidant capacity of Camarosa and Selva strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch). *Foods*, 2, 120-131.
- Vargas, M., Aalbors, A., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 164–171.
- Vasconcelos de Oliveira, C.E., Magnani, M., Veríssimo de Sales, C., Pontes, A.L.S., Campos-Takaki, G.M., Stamford T.C.M., Souza, E.L., 2014a. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 171, 54-61.
- Vasconcelos de Oliveira, C.E., Magnani, M., Veríssimo de Sales, C., Pontes, A.L.S., Campos-Takaki, G.M., Stamford T.C.M., Souza, E.L. (2014b). Effects of post-harvest treatment using chitosan from *Mucor circinelloids* on fungal pathogenicity and quality of table grapes during storage. *Food Microbiology*, 44, 211-219.
- Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V.D., Moldão-Martins, M. (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv *Camarosa*) under commercial storage conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 52, 80-92.
- Ventura-Aguilar, R.I., Batista-Baños, S., Flores-García, A.G., Zavaleta-Avejar, L. (2018). Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food Chemistry*, 262, 142-149.
- Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268-283.
- Xing, K., Shen, X., Zhu, X., Ju, X., Miao, X., Tian, J., Feng, Z., Peng, X., Jiang, J., Qin, S. (2016). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 830-836.

- Yaman, O., Bayoindirli, L. (2002). Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. *LWT: Food and Science Technology*, 35,146-150.
- Yen, M.T., Yang, J.H., Mau, J.L (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74, 840-844.
- Yoonkyung, P., Kim, M.H., Park, S.C., Cheong, H., Jang, M.K., Nah, J.W., Hahm, K.S. (2008). Investigation of the antifungal activity and Mechanism of action of LMWS-Chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28,1729-1734.
- Yousuf, B., Qadri, O.S., Srivastava, A.K (2018). Recent development in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: a review. *LWT – Food Science and Technology*, 89, 189-209.

Figures captions

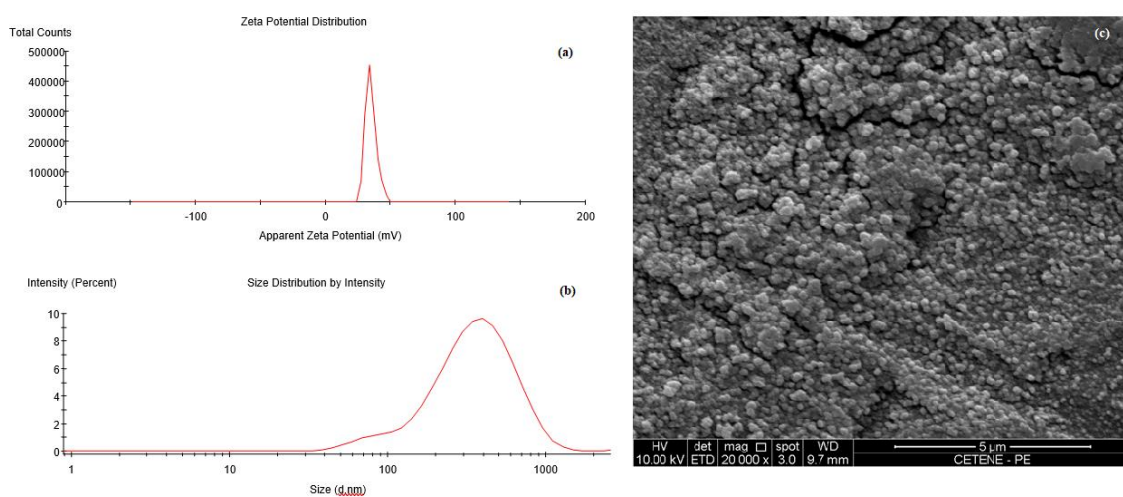


Fig. 1. Zeta potential (a), average size distribution (b) and SEM image (c) of fungal chitosan nanoparticles.

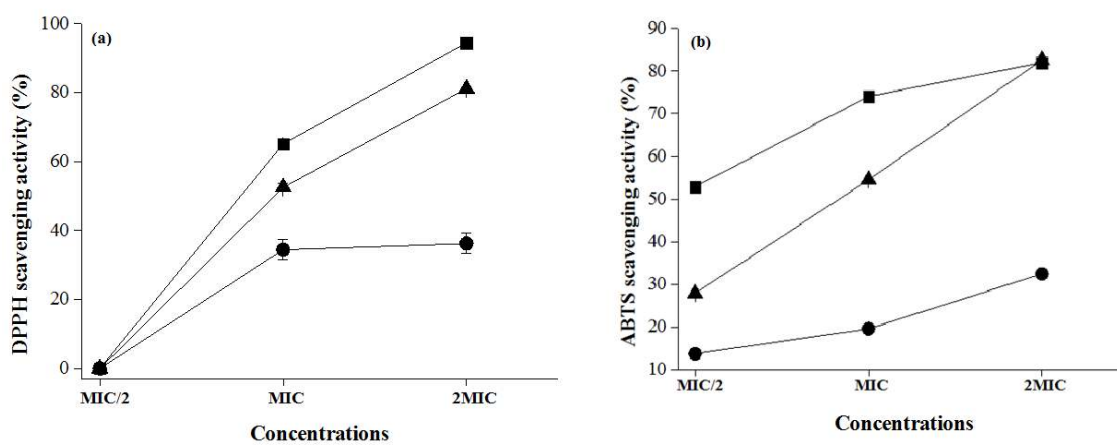
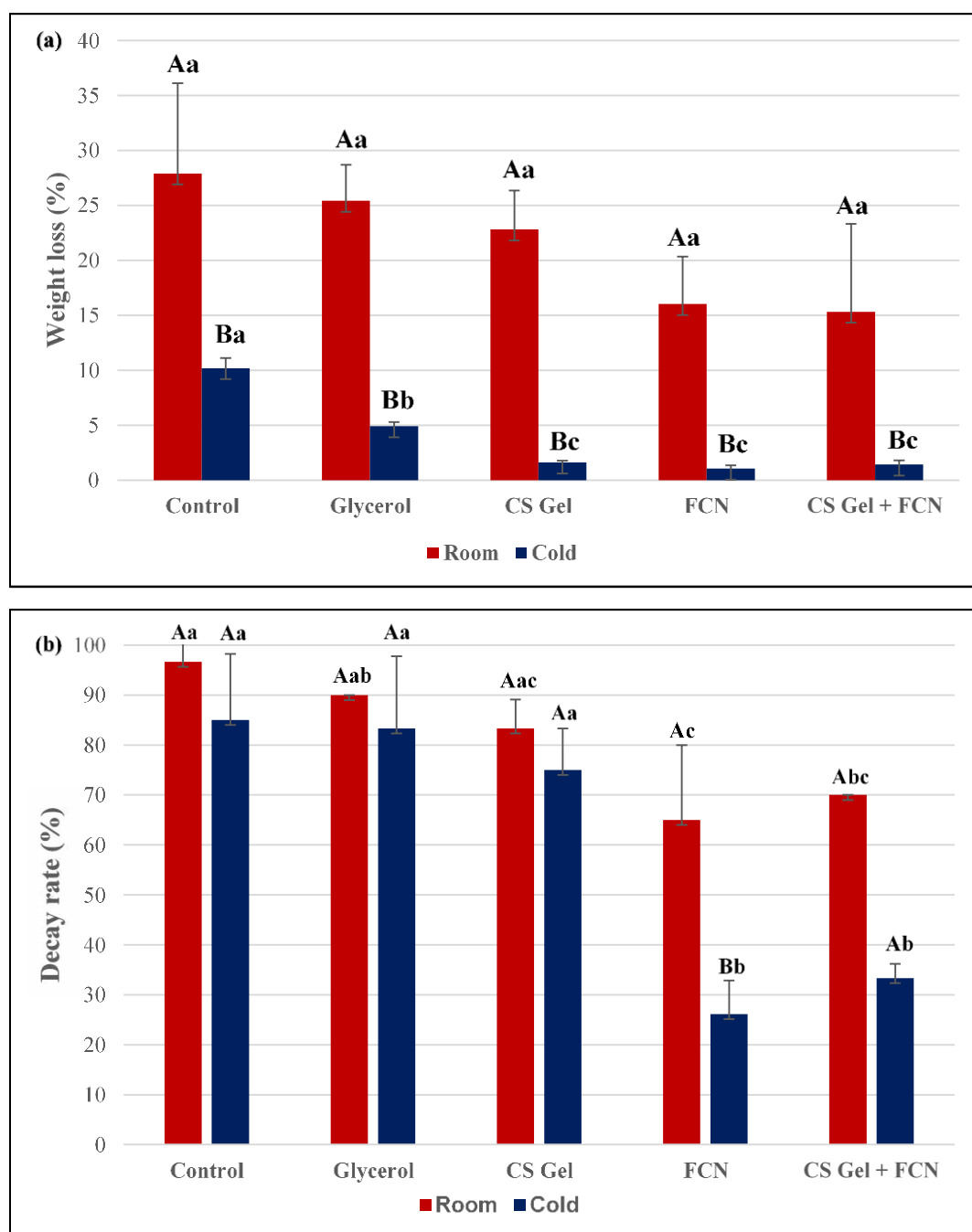


Fig. 2. Scavenging effect of CS gel (■), FCN (●) and CS gel + FCN (▲) towards DPPH (a) and ABTS (b) radicals.



Note: Values represent the mean of three replicates with their standard error (\pm SD). ^{a-c} Different superscript lowercase letters in the same temperature denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test. ^{A-B} Different superscript capital letters between the temperatures denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Fig. 3. The weight loss (a) and the decay rate (b) of strawberries after 6 and 12 days of room and cold stored temperature, respectively.

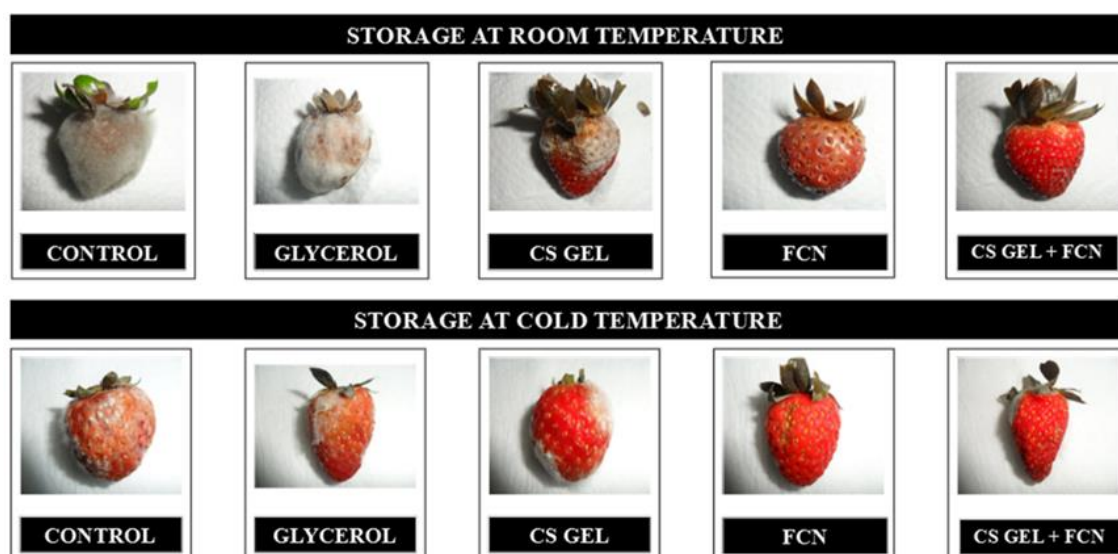


Fig. 4. The appearance of uncoated and coated strawberries after 6 and 12 days of room and cold stored temperature, respectively.

Tables captions

Table 1. Antifungal activity of chitosan gel (CS gel), fungal chitosan nanoparticles (FCN) and gel enriched with nanoparticles (CS Gel + FCN) against strawberries phytopathogenic fungi.

Test Substance	Phytopathogenic fungi		
	<i>R. stolonifer</i> (URM 3728)	<i>B. cinerea</i> (URM 2802)	<i>A. niger</i> (URM 7282)
CS gel	4,0 g.L ⁻¹	4,0 g.L ⁻¹	5,0 g.L ⁻¹
FCN	1,5 g.L ⁻¹	1,5 g.L ⁻¹	2,5 g.L ⁻¹
CS gel + FCN	1,0 + 0,5 g.L ⁻¹	1,0 + 0,5 g.L ⁻¹	2,0 + 1,5 g.L ⁻¹

Note: Values represent the mean of three replicates. The standard deviation was zero for all mean values.

Table 2. Mean values of physicochemical quality parameters in strawberries stored at room temperature for 6 days in the absence of edible coating (control) and with glycerol, chitosan gel (CS Gel), fungal chitosan nanoparticles (FCN) and chitosan gel enriched with fungal chitosan nanoparticles (Gel + FCN).

Treatments	Days of storage		
	0	3	6
Soluble solids (%)			
Control	8.00(±0.02) ^{Aa}	8.27(±0.23) ^{Aa}	8.27(±0.23) ^{Aa}
Glycerol	8.20(±0.02) ^{Aa}	7.20(±0.00) ^{Bb}	8.10(±0.00) ^{Aa}
CS Gel	8.46(±0.58) ^{Aa}	7.17(±0.06) ^{Bb}	7.20(±0.00) ^{Bb}
FCN	8.13(±0.12) ^{Aa}	7.20(±0.00) ^{Bb}	6.93(±0.46) ^{Bb}
Gel + FCN	8.03(±0.06) ^{Aa}	7.20(±0.00) ^{Bb}	7.20(±0.00) ^{Bb}
Titratable acidity (% citric acid)			
Control	1.15(±0.01) ^{Aa}	0.88(±1.13) ^{Ab}	1.04(±0.02) ^{Aa}
Glycerol	1.07(±0.08) ^{Aab}	1.16(±0.05) ^{Aa}	1.18(±0.02) ^{Aa}
CS Gel	1.00(±0.01) ^{Bab}	1.06(±0.01) ^{Aab}	1.10(±0.01) ^{Aa}
FCN	1.06(±0.00) ^{Bab}	1.18(±0.03) ^{Aa}	1.12(±0.04) ^{ABa}
Gel + FCN	0.98(±0.01) ^{Ab}	1.11(±0.03) ^{Aab}	1.18(±.11) ^{Aa}
Maturity index			
Control	7.04(±0.04) ^{Aa}	9.38(±1.04) ^{Aa}	8.12(±0.16) ^{Aa}
Glycerol	7.59(±0.74) ^{Aa}	6.24(±0.26) ^{Ab}	6.89(±0.13) ^{Aab}
CS Gel	8.29(±0.59) ^{Aa}	6.82(±0.04) ^{Bb}	6.54(±0.08) ^{Bb}
FCN	7.64(±0.13) ^{Aa}	6.10(±0.14) ^{Bb}	6.03(±0.32) ^{Bb}
Gel + FCN	8.20(±0.06) ^{Aa}	6.48(±0.16) ^{Bb}	6.12(±0.59) ^{Bb}
pH			
Control	3.58(±0.02) ^{Aa}	3.49(±0.02) ^{Bb}	3.05(±0.00) ^{Cb}
Glycerol	3.41(±0.01) ^{Ac}	3.42(±0.02) ^{Ac}	3.06(±0.08) ^{Bb}
CS Gel	3.49(±0.01) ^{Ab}	3.52(±0.02) ^{Ab}	3.45(±0.01) ^{Bab}
FCN	3.51(±0.01) ^{Ab}	3.41(±0.01) ^{Ac}	3.76(±0.57) ^{Aa}
Gel + FCN	3.50(±0.01) ^{Bb}	3.58(±0.01) ^{Aa}	3.39(±0.02) ^{Cab}
Moisture (%)			
Control	94.69(±0.42) ^{Aa}	91.69(±0.00) ^{Aa}	88.22(±4.76) ^{Aa}
Glycerol	94.34(±0.42) ^{Aa}	92.62(±0.30) ^{Ba}	91.66(±0.15) ^{Ca}
CS Gel	93.94(±0.09) ^{Aa}	92.55(±0.14) ^{Ba}	92.12(±0.08) ^{Ba}
FCN	94.58(±0.21) ^{Aa}	92.14(±0.43) ^{Ba}	90.54(±0.23) ^{Ca}
Gel + FCN	94.31(±0.13) ^{Aa}	92.00(±0.47) ^{Ba}	91.40(±0.30) ^{Ba}
Anthocyanin (g.L⁻¹)			
Control	29.13(±0.02) ^{Ac}	25.97(±0.01) ^{Cc}	26.30(±0.03) ^{Ba}
Glycerol	37.04(±0.02) ^{Aa}	27.71(±0.08) ^{Bb}	25.02(±0.04) ^{Cb}
CS Gel	28.41(±0.05) ^{Ad}	23.98(±0.06) ^{Be}	23.51(±0.01) ^{Cc}
FCN	32.49(±0.01) ^{Ab}	25.66(±0.08) ^{Bd}	21.60(±0.01) ^{Cd}
Gel + FCN	26.00(±0.04) ^{Be}	28.72(±0.17) ^{Aa}	21.14(±0.05) ^{Ce}

Note: The storage time Day 0 represents the day of edible coatings application. Values represent the mean of three replicates with their standard error (±SD). ^{A-C}For each trial, different superscript lowercase letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test. ^{a-e} Different superscript capital letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 3. Mean values of physicochemical quality parameters in strawberries stored at cold temperature for 12 days in the absence of edible coating (control) and with glycerol, chitosan gel (CS Gel), fungal chitosan nanoparticles (FCN) and chitosan gel enriched with fungal chitosan nanoparticles (Gel+FCN).

Treatments	Days of storage				
	0	3	6	9	12
Soluble solids (%)					
Control	8.07(±0.12) ^{Bb}	8.13(±0.06) ^{Ba}	8.27(±0.23) ^{Ba}	8.53(±0.46) ^{Ba}	9.60(±0.00) ^{Aa}
Glycerol	8.47(±0.23) ^{Aa}	8.03(±0.06) ^{Aab}	8.13(±0.23) ^{Aa}	8.53(±0.46) ^{Aa}	8.67(±0.23) ^{Ab}
CS Gel	8.00(±0.00) ^{Ab}	8.00(±0.00) ^{Ab}	8.00(±0.00) ^{Aa}	8.27(±0.23) ^{Aa}	8.40(±0.04) ^{Ab}
FCN	8.07(±0.12) ^{Bb}	8.03(±0.06) ^{Bab}	8.00(±0.00) ^{Ba}	8.00(±0.00) ^{Ba}	8.40(±0.00) ^{Ab}
Gel + FCN	8.00(±0.00) ^{Ab}	8.00(±0.00) ^{Ab}	8.00(±0.00) ^{Aa}	8.00(±0.00) ^{Aa}	8.27(±0.23) ^{Ab}
Titrateable acidity (% citric acid)					
Control	1.06(±0.01) ^{Aa}	1.04(±0.02) ^{Aa}	1.11(±0.08) ^{Aa}	1.06(±0.11) ^{Aa}	1.14(±0.02) ^{Aa}
Glycerol	1.18(±0.01) ^{Aa}	0.89(±0.42) ^{Ba}	1.02(±0.06) ^{ABab}	0.94(±0.01) ^{Ba}	1.14(±0.05) ^{Aa}
CS Gel	1.10(±0.01) ^{Aa}	1.00(±0.01) ^{ABa}	0.92(±0.01) ^{Bb}	0.93(±0.04) ^{Ba}	1.08(±0.02) ^{ABab}
FCN	0.97(±0.00) ^{Aa}	0.78(±0.23) ^{Aa}	1.02(±0.02) ^{Aab}	1.10(±0.06) ^{Aa}	1.08(±0.01) ^{Aab}
Gel + FCN	1.02(±0.15) ^{Aa}	1.00(±0.00) ^{Aa}	1.03(±0.00) ^{Aab}	1.05(±0.03) ^{Aa}	1.01(±0.00) ^{Ab}
Maturity index					
Control	7.58(±0.05) ^{Aa}	7.69(±0.24) ^{Aa}	7.39(±0.31) ^{Ab}	8.34(±0.89) ^{Aa}	8.38(±0.16) ^{Aa}
Glycerol	7.14(±0.20) ^{Ba}	9.00(±0.43) ^{Aa}	8.00(±0.22) ^{ABab}	8.98(±0.67) ^{Aa}	7.76(±0.34) ^{ABa}
CS Gel	7.30(±0.04) ^{Ba}	8.02(±0.57) ^{ABa}	8.74(±0.07) ^{Aa}	8.78(±0.04) ^{Aa}	7.55(±0.11) ^{Ba}
FCN	8.24(±0.00) ^{Aa}	8.08(±0.76) ^{Aa}	7.80(±0.16) ^{Ab}	7.28(±0.37) ^{Aa}	7.74(±0.05) ^{Aa}
Gel + FCN	7.96(±1.17) ^{Aa}	8.00(±0.00) ^{Aa}	7.76(±0.00) ^{Ab}	7.62(±0.20) ^{Aa}	8.12(±0.28) ^{Aa}
pH					
Control	3.45(±0.01) ^{Ab}	3.47(±0.01) ^{Ab}	3.30(±0.07) ^{Bc}	3.32(±0.00) ^{Bc}	3.33(±0.00) ^{Bd}
Glycerol	3.41(±0.01) ^{Cc}	3.50(±0.01) ^{Aa}	3.36(±0.00) ^{Bbc}	3.37(±0.01) ^{Bc}	3.37(±0.01) ^{Bcd}
CS Gel	3.46(±0.01) ^{Cb}	3.50(±0.00) ^{BCa}	3.52(±0.01) ^{Ba}	3.57(±0.00) ^{Aa}	3.54(±0.00) ^{ABa}
FCN	3.51(±0.00) ^{Aa}	3.41(±0.00) ^{Bc}	3.38(±0.00) ^{CDbc}	3.37(±0.00) ^{Dc}	3.39(±0.01) ^{Cc}
Gel + FCN	3.44(±0.01) ^{Ab}	3.46(±0.01) ^{Ab}	3.43(±0.02) ^{Aab}	3.45(±0.04) ^{Ab}	3.44(±0.01) ^{Ab}
Moisture (%)					
Control	91.46(±0.06) ^{Ba}	91.27(±0.47) ^{Ba}	91.48(±0.09) ^{Bb}	91.88(±0.13) ^{Ba}	92.86(±0.17) ^{Ab}
Glycerol	90.94(±0.85) ^{Aa}	92.38(±0.48) ^{Aa}	92.80(±0.12) ^{Aa}	91.65(±0.74) ^{Aa}	92.91(±0.11) ^{Ab}
CS Gel	91.06(±0.12) ^{Ba}	91.48(±0.11) ^{Ba}	92.65(±0.17) ^{Aa}	92.49(±0.21) ^{Aa}	92.91(±0.08) ^{Ab}
FCN	90.78(±0.18) ^{Da}	91.31(±0.08) ^{CDa}	92.13(±0.28) ^{ABab}	91.60(±0.18) ^{BCa}	92.66(±0.15) ^{Ab}
Gel + FCN	92.08(±0.01) ^{Ca}	92.44(±0.04) ^{BCa}	92.98(±0.37) ^{ABa}	92.42(±0.01) ^{BCa}	93.42(±0.11) ^{Aa}
Anthocyanin (g.L⁻¹)					
Control	28.60(±0.00) ^{Ac}	28.23(±0.03) ^{Ab}	25.98(±0.01) ^{Bab}	23.62(±0.01) ^{Cc}	22.71(±0.31) ^{Db}
Glycerol	39.88(±0.03) ^{Aa}	31.69(±0.58) ^{Ba}	24.87(±1.17) ^{Cb}	19.97(±0.04) ^{De}	21.05(±0.06) ^{Dc}
CS Gel	30.01(±0.16) ^{Ab}	24.54(±0.02) ^{Ed}	26.43(±0.02) ^{Da}	28.11(±0.03) ^{Ba}	27.64(±0.00) ^{Ca}
FCN	27.53(±0.00) ^{Ad}	26.68(±0.20) ^{Bc}	22.52(±0.00) ^{Cc}	21.89(±0.04) ^{Dd}	22.50(±0.02) ^{Cb}
Gel + FCN	22.40(±0.01) ^{De}	25.31(±0.24) ^{Bd}	25.68(±0.01) ^{Aab}	24.51(±0.01) ^{Cb}	22.51(±0.01) ^{Db}

Note: The storage time Day 0 represents the day of edible coatings application. Values represent the mean of three replicates with their standard error (±SD). ^{A-E}For each trial, different superscript lowercase letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test. ^{a-e}Different superscript capital letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 4. Mean sensory scores for uncoated (control) fruit and fruit coated with glycerol, chitosan gel (CS gel), fungal chitosan nanoparticles (FCN), and gel enriched with fungal chitosan nanoparticles (Gel + FCN) stored at cold temperature.

Attributes	Control	Glycerol	CS Gel	FCN	Gel + FCN
Appearance	7.81(±1.51) ^a	6.61(±1.79) ^c	6.94(±1.91) ^{bc}	7.52(±1.44) ^{ab}	6.94(±1.75) ^{bc}
Colour	7.87(±1.46) ^a	6.95(±1.66) ^c	7.30(±1.71) ^{abc}	7.64(±1.44) ^{ab}	7.07(±1.75) ^{bc}
Flavour	7.50(±1.55) ^a	6.95(±1.70) ^{ab}	7.22(±1.55) ^{ab}	7.20(±1.56) ^{ab}	6.78(±1.66) ^b
Firmness	8.04(±1.04) ^a	7.64(±1.43) ^a	7.52(±1.41) ^a	7.70(±1.49) ^a	7.59(±1.37) ^a
Taste	7.61(±1.80) ^a	6.86(±1.75) ^b	7.51(±1.53) ^{ab}	7.58(±1.70) ^a	6.85(±1.94) ^b
Overall evaluation	7.77(±1.46) ^a	7.02(±1.48) ^b	7.43(±1.42) ^{ab}	7.68(±1.47) ^a	6.85(±1.71) ^b

Note: Sensory attributes were evaluated by one hundred untrained tasters after 3 days of the edible coatings application. The strawberries were stored at cold temperature before sensory evaluation. Values represent the mean with their standard error (±SD). ^{a-c}For each trial, different superscript lowercase letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

APÊNDICE F – ARTIGO 3 - FUNGAL CHITOSAN NANOCOMPOSITE EDIBLE COATING AS ANTIFUNGAL AGAINST STRAWBERRY PHYTOPATHOGENIC FUNGI: *IN VITRO* AND *IN VIVO* EFFECTS ON MYCELIAL GROWTH, SPORE GERMINATION AND FUNGAL MORPHOLOGY

Natália Ferrão Castelo Branco Melo^a, Marcos Antônio de Barbosa Lima^b, Tânia Lucia Montenegro Stamford^a, André Galembeck^c, Galba Maria de Campos Takaki^d, José Alberto da Costa Medeiros^a, Miguel A. P. Flores^c, Thatiana Montenegro Stamford–Arnaud^a, Thayza Christina Montenegro Stamford^e.

^a *Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil*

^b *Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manuel de Medeiros, 97, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, Brazil.*

^c *Laboratório de Compostos Híbridos Interfaces e Colóides, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Jornalista Anibal Fernandes, s/nº, Cidade Universitária, CEP: 50740-560, Recife, PE, Brazil.*

^d *Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*⁵⁶ *Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.*

^e *Laboratório de Microbiologia Aplicada, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, 2º andar, Microbiologia e Imunologia, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife, PE, Brazil.*

* Correspondence author:

Name: Thayza Christina Montenegro Stamford (Stamford, T.C.M.)

Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, Av. da Engenharia, s/nº, 2º andar, Microbiologia e Imunologia, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife, PE, Brazil

E-mail: thayzastamford29@gmail.com / thayza.stamford@pq.cnpq.br

Telephone: 55 +8121268526

Fax: 55+8121268473

Abstract

This study compared the effectiveness of fungal chitosan nanocomposite, chitosan gel and chitosan nanoparticles against strawberry phytopathogenic fungi. Nanoparticles were prepared by ionic gelation method and characterized by dynamic light scattering and scanning electron microscopy. The influence of the edible coatings on fungal growth was analyzed in vitro and in vivo. All the three forms of edible fungal chitosan coatings inhibited mycelial growth and spore germination of the tested fungal strains. The edible coating made by the nanocomposite exhibited the lowest minimum inhibitory concentration value and presented the best effect against mycelia and spores of *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer*. This edible coating also caused important changes in fungal morphology, and the best control of the growth of the assayed fungal strains in artificially infected strawberries. The application of fungal chitosan nanocomposite edible coating may be a useful alternative for controlling strawberry phytopathogenic fungi. In this research, nanotechnology brought some benefits to the conventional chitosan gel edible coating, improving its antifungal activity and forming a new eco-friendly coating.

Keywords: *A. niger*; antimicrobial agent; *B. cinerea*; Fruit; Nanomaterials; *R. stolonifer*.

1. Introduction

Strawberry (*Fragaria ananassa*), one of the most popular fruits in the world, is highly perishable, mainly due to its susceptibility to postharvest fungal infection. *Botrytis cinerea* is one of the main fungi that attack strawberries. This pathogen causes a disease called gray mold, which reduces fruit production by 30% to 60%. *Rhizopus stolonifer* is responsible for the appearance of brown spots and softening by rotting in fruit tissue, leading to structural collapse and tissue exudation (Romanazzi et al., 2013; Romanazzi et al., 2016). *Aspergillus niger* is another important fungal pathogen that causes black mold, especially when fruit is wounded (Jesen et al., 2013).

These phytopathogens also cause severe damage to other economically important crops worldwide (grapes, tomato, kiwi, etc.) that result in quantitative and qualitative losses in agriculture. A common practice to prevent phytopathogenic fungal infections is the application of chemical fungicides. However, many pathogens show resistance to the pesticides currently used, and which also have potentially harmful effects on the environment and human health (Saharan et al., 2015; Romanazzi et al., 2016, An et al 2019).

Currently, there is a need for novel eco-friendly technologies that improve food productivity and shelf life, without causing any harmful effects to human health or the environment (Moustafa et al 2019). One of these eco-friendly technologies is the application of edible coatings to postharvest fruit. Several biopolymers have been used to prepare edible coatings and chitosan is a polysaccharide frequently used in this application (Oliveira et al., 2014, Hajji et al 2018).

The use of microbiological chitosan for bioactive packaging for fruit preservation has been reported as an eco-friendly alternative (Castelo Branco Melo et al., 2018). Chitosan from microbial source has advantages over chitosan obtained from the deacetylation of crustacean chitin, such as it is not affected by seasonal factors, does not contain any of the proteins that induce allergic reactions to crustaceans, and can be produced on a large scale with standardization of the physicochemical characteristics of the polymer (Ban et al., 2018).

The efficacy of chitosan to preserve the microbiological quality of postharvest fruit, including strawberries, has been demonstrated by a number of authors (Gol et al., 2013; Romanazzi et al., 2013; Velickova et al., 2013; Shahbazi, 2018). We hypothesized that even better results might be obtained either by using chitosan nanoparticles or chitosan gels enriched

with nanoparticles. Chitosan nanoparticles can be obtained by crosslinking of positively charged amino pending groups with tripolyphosphate in aqueous solution (Castelo Branco Melo et al., 2018).

Advancements in nanotechnology have markedly extended the application of nanomaterials in plants due to their size-dependent qualities, high surface to volume ratio and unique physicochemical properties. These characteristics result in certain types of nanoparticles being more effective against microbes at very low doses (Sathiyabama and Parthasarathy et al., 2016). Furthermore, nanotechnology could facilitate the development of new packaging materials and eco-friendly, cheaper, and more efficient packaging techniques (Eshghi et al., 2014).

In this work, it was evaluated, for the first time, the *in vitro* and *in vivo* antifungal effects on mycelial growth, spore germination and fungal morphology of fungal chitosan nanocomposite coating in comparison of fungal chitosan gel and fungal chitosan nanoparticles, separately.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Strawberries (*Fragaria ananassa.*) were obtained from CEASA (Supplies and Service Company of Pernambuco, Recife, Brazil) and selected according to size, color and shape. They presented no signs of deterioration or mechanical damage.

Fungal chitosan (KiOnutrime®) was provided by Kitozyme® Company (Herstal, Belgium) (deacetylation degree of 86 % and $M_w = 4 \times 10^3$ Da), from non-genetically modified *Aspergillus niger* mycelium. The other substances used were obtained from commercial sources.

Botrytis cinerea URM 2802, *Rhizopus stolonifer* URM 3728 and *Aspergillus niger* URM 7282 were obtained from the URM Culture Collection of Center for Biological Sciences in the Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil).

2.2 Preparation and characterization of chitosan nanoparticles

The fungal chitosan nanoparticles (FCN) were prepared by an ionic gelation method with some modifications (Calvo et al., 1997). A chitosan (CS) solution, at a concentration of 2.0 g L⁻¹, was prepared by dissolving the polymer in 24.0 mL of pH 4.0 solution (1 % acetic acid + 1 % NaOH) and stirred for 30 min. Sodium tripolyphosphate (TPP) solution was dissolved in deionized water at a concentration of 1.0 g L⁻¹. Then, 6.0 mL of TPP solution was dropped (0,2 mL/min) into 24.0 mL of the CS solution using a peristaltic pump (Atlas Syringe Pump – Royston, United Kingdom) under vigorous magnetic stirring at room temperature. The final ratio of CS:TPP was 4:1. Once the dropwise addition was completed, the nanoparticle suspension was stirred for an additional 1 h.

The morphology of the FCNs was characterized by scanning electron microscopy (SEM) (SEM Quanta 200 FEI). The dry nanoparticles were placed onto an aluminum stub covered with a double-sided carbon adhesive disc (Taab, Berkshire, UK). The sample was coated with a 10 nm gold layer by sputtering. The samples were subjected to an electron acceleration voltage of 20 kV. The mean particle size, zeta potential and polydispersity index (PDI) of the FCNs were measured using a Malvern Zetasizer (model Nano ZS90, Malvern, UK). The analysis was performed at a scattering angle of 90 ° at 25 °C at 633 nm.

2.3 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

First, strawberry phytopathogenic fungi stock cultures were subcultured in Sabouraud agar at 25 °C – 28 °C for seven days to allow for sufficient sporulation. The fungal spores were collected in a sterile saline solution (0.85 g /100 mL NaCl) in fungal growth medium, and the suspension was filtered using a sterile triple-gauze layer to retain hyphal fragments. The number of spores present in the suspension was determined with a hemocytometer and the spore concentration was adjusted with sterile saline solution to provide a fungal inoculum of approximately 10⁶ spores/mL (Oliveira et al., 2014).

The MIC value of the test substances was determined by the broth macrodilution technique, which was performed in triplicate. Initially, 0.5 mL of a suspension of *A. niger* or *B. cinerea* or *R. stolonifer* was inoculated, separately, into 2 mL of Sabouraud broth (with the concentration adjusted to 5 mL), and 2.5 mL of the solutions containing different concentrations of FNCs or CS gel, or nanocomposites (CS gel enriched with FCNs) were added. The mixture was incubated at 25 °C for seven days, and at the end of the incubation period, the lowest concentration of test substances (highest dilution) that exhibited no visible fungal growth was

considered to be the MIC (Sharma and Tripathi, 2008). This assay was performed separately for each test substance and fungal strain.

For this assay, freeze-dried FCNs and the CS were diluted in a solution of pH 5.6 (acetic acid 1 % + NaOH 1 %) to form solutions of FCN, CS gel and nanocomposite. A solution of pH 5.6 was tested, separately, as a control and exhibited no inhibitory effects against the phytopathogenic fungi. According to Oliveira et al. (2014), acetic acid solution at $\text{pH} \geq 5.6$ does not inhibit the growth of phytopathogenic fungi.

Based on the MIC results, different concentrations of CS gel, FCN and nanocomposite were chosen (CIM\ 2, CIM, $2 \times \text{CIM}$) to be used in the mycelial growth and spore germination tests.

2.4 Evaluation of the interaction of CS gel and FCN mixture

It was used the checkerboard method to evaluate the type of interaction of the mixture of CS gel and FCN. According to Schelz et al. (2006), the macrodilution checkerboard method is the technique used most frequently to assess antimicrobial combinations in vitro. The MIC values of the mixtures of CS gel enriched with FCN were used for evaluation of interactions. The type of interaction was studied on the strawberry phytopathogenic strains, separately.

The results of the combined effects of the CS gel enriched with FCNs (nanocomposite) were categorized as synergism, addition, indifference or antagonism. In order to assess the activities of combinations, fractional inhibitory concentration (FIC) indices were calculated as $\text{FIC}_A + \text{FIC}_B$, where FIC_A and FIC_B are the minimum concentrations that inhibited fungal growth for samples A (CS gel) and B (FCNs), respectively.

$$\text{FIC}_A = \frac{\text{MIC}_A \text{ combination}}{\text{MIC}_A \text{ alone}} \quad \text{FIC}_B = \frac{\text{MIC}_B \text{ combination}}{\text{MIC}_B \text{ alone}}$$

The mean FIC index was calculated by the formula: $\text{FIC}_{\text{index}} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$, and the results were interpreted as follows: synergistic (<0.5), additive ($0.5-1.0$), indifferent (>1) or antagonistic (>4.0) (Schelz et al., 2006).

2.5 Effects of test substances on mycelial growth of postharvest fungi

The effects of the FCNs, CS gel and nanocomposite (CS gel enriched with FCNs) on the radial mycelial growth of the *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer* were assessed using the poisoned substrate technique (Oliveira et al., 2017). One agar plug (5 mm diameter) with mycelia from each species was taken from a culture which grew over seven days on Potato Dextrose Agar Medium (PDA) at 25 °C. The agar plug was transferred to the center of a Petri dish containing PDA supplemented with FCNs, CS gel and nanocomposite, separately, at the desired final concentration (CIM\ 2, CIM, 2 × CIM) and incubated at 25 °C. A Petri dish containing PDA and pH 5.6 solution was tested and exhibited no inhibitory effects on radial mycelial growth. PDA with the agar plug and without test substance was also tested to represent a control Petri dish.

Mycelial growth was measured daily for seven days or when the control Petri dish was entirely covered with mycelia. The diameter (mm) of the radial mycelial growth of each phytopathogenic fungi was measured in two perpendicular directions to obtain the colony mean diameter. The test was performed in triplicate and the results were expressed as the percentage of mycelial growth inhibition (MGI%) at the end of the analysis period. The MGI% was calculated using the formula: $MGI\% = [(C - T)/C] \times 100$, where C is the diameter of the control assay and T is the diameter of the colony which grew in PDA containing the test substances (Camiletti et al., 2014; Oliveria et al., 2017).

2.6 Effects of test substances on spore germination

Solutions (0.1 mL) with FCNs or CS gel or nanocomposite at different concentrations (CIM\ 2, CIM, 2 × CIM) were combined with 0.1 mL of each fungal spore suspension (10^6 spores/mL). The spore suspension was obtained from cultures grown for seven days on PDA at 25 °C for 24 h. Then, 0.1 mL of the suspension was placed at the center of a sterile glass slide and incubated in a moist chamber at 25 °C for 24 h. After the incubation period, each glass slide was fixed with lactophenol cotton blue stain. Then, spore germination was observed by light microscopy. Approximately 200 spores were counted on each glass slide. The efficacy of the test substances was analyzed by comparing the number of germinated spores in the media containing FCNs or CS gel or nanocomposite with controls (in this case the test substances were replaced by Sabouraud broth) (Oliveira et al., 2014).

2.7 Effect of test substances on fungal morphology

Initially, 10^6 spores/ mL of the fungi were collected and inoculated in Sabouraud broth plus chitosan gel, chitosan nanoparticles and nanocomposite, separately, at the MIC/ 2 concentration and incubated at 25 °C with 150 rpm orbital shaking for three days (Oliveira et al., 2014). Control samples were grown in medium without the test substances. Samples were then collected and washed with saline solution (pH 7.2) 3 times, 10 minutes each and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 0.05% malachite green in 0.1 M phosphate buffer for 1 h at 28 °C. After fixation, the samples were again washed with 0.1 M phosphate buffer for 10 minutes. Then the samples were gradually dehydrated in 50%, 70% and 90% ethanol concentrations (5 min each) and at 100% for three times of 10 minutes. The samples were then immersed in 100% hexamethyldisilazine (HDMS) for 5 minutes for drying. After treatment with HDMS, the samples were kept in a desiccator for 24 h and then mounted on aluminum supports, metallized with gold (thickness 10nm) and observed using a JOEL LV 5600 Scanning Electron Microscope operating at 18 Kv (Battistelli et al., 2005; Tyagi; Malik, 2010).

2.8 In vivo antifungal effects of edible coating on postharvest phytopathogenic fungal infection of strawberries

First, strawberries were sanitized with sodium hypochlorite (1 % v/ v) for 15 min, washed with sterile distilled water and dried for 2 h at room temperature. Then, the fruits were immersed in the fungal spore suspension (10^6 spores/mL) of each fungal strain, separately, with magnetic stirring for 1 min (Fig. 1).

The strawberries were divided into five groups. A negative control (without edible coating), a positive control (fruit coated with glycerol – 2.5 mL / 100 mL) and the remaining three groups were coated with CS gel, FCNs and nanocomposite, respectively.

The coated strawberries were immersed in a coating solution of the test substances for 1 min. For the formation of the different fungal chitosan edible coatings, we used the MIC value determined for each strawberry phytopathogenic fungus. The pure chitosan or lyophilized nanoparticles were diluted in 1 % acetic acid and the pH was adjusted to 5.6 with 1 % NaOH.

After the edible coating application, the fruits were dried on a nylon filter to drain excess liquid and packed in a sterile polyethylene container with a lid. Each treatment group included 30 strawberries. One group of strawberries was stored for six days at room temperature (25 °C) and the other group was stored for twelve days at a reduced temperature (12 °C) (Gol et al., 2013; Oregel-Zamudio et al., 2017; Shahbazi et al., 2018).

The effects of the treatments were assessed by observing signs of fungal infection on the strawberries. The results were expressed as the percentage of fruits infected at the final period of storage (Oliveira et al., 2014).

2.9 Statistical analysis

All data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using Origin 8.0 software. Tukey's test was used to determine statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of FCN

SEM analysis confirmed the formation of FCN. Fig. 2 presents particles with a spherical shape and compact structure. Pinho Neves et al. (2014), Hashad et al. (2016) and Rampino et al. (2013) also produced chitosan nanoparticles using the ionic gelation method and obtained homogeneous and spherical nanoparticles, differing from the particles produced in our study only in size, since the chitosan and TPP concentrations used by these authors were different.

SEM images revealed the formation of particles aggregates. Particles tend to agglomerate to reduce the exposed surface area, and, therefore, to reduce the free surface energy (Tsai et al., 2011). According to Fan et al. (2012), the formation of aggregates is caused by hydrogen bonds between nanoparticles, which form during the drying process of the sample for analysis by SEM.

A similar result was also found by Hosseini et al. (2016), who produced particles with a size between 40 and 80 nm. Hence, the aggregates observed by SEM are related to the process of sample preparation (i.e. drying). Nevertheless, individual nanoparticles can be readily distinguished in Fig. 2.

When nanoparticle stability in liquid medium is considered, the zeta potential is an important parameter, according to MubarakAli et al. (2018). Ing et al. (2012) reported that nanoparticles with a surface charge greater than +30 mV or lower than -30 mV are more stable, due to the higher electrostatic repulsion which prevents aggregation. The zeta potential of FCNs prepared in this work was +34 mV, which means that they could be stable for a prolonged time.

Saharan et al. (2015) suggested that stable nanoparticles exhibit a higher affinity towards biological membranes in aqueous media and, therefore, greater antifungal activity.

Particle size is another important property that may influence the antifungal activity of nanoparticles. Particles could enter the cell wall of the microbes through carrier proteins or ion channels. Therefore, a smaller particle size will result in a better uptake of nanoparticles into microbial cells (Ing et al., 2012).

The mean particle size of the FCNs was 331.1 nm (\pm 7.21) with a narrow size distribution (PDI = 0.377). The difference between the size measured by DLS and SEM occurs due to fact that DLS measurements were performed in aqueous media while SEM provides the diameter of nanoparticles in dry form (Kiill et al., 2017). The same difference was observed by Castelo Branco Melo et al., 2018.

There is a relationship between the size of the nanoparticles and their internalization, and thus, toxicity could be related to this feature (Freire et al., 2015). According to Gan et al. (2005), smaller-sized nanoparticles (\sim 100 nm) demonstrate more than 3-fold greater arterial uptake compared to larger nanoparticles (\sim 275 nm). In our study, the FCNs demonstrated a size larger than 300 nm, which allows for their use as an antifungal agent against phytopathogenic fungi in the food field.

3.2 *In vitro* antifungal activity of test substances

3.2.1 Determination of MIC and interaction of CS gel with FCNs

The MIC results for the test substances are shown in Table 1. These results are in agreement with Verlee et al. (2017), who reported MIC values of chitosan against fungi ranging from 0.01 g L⁻¹ to 7.75 g L⁻¹. The MIC values found in the present study are lower than the values found by Santos et al. (2012) and Guerra et al. (2015), who investigated the MIC of chitosan derived from shrimp against *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer*.

However, the different MIC values found in our research could not be directly compared to the microbiological origin of the chitosan used here. Oliveira et al. (2014) also used fungal chitosan against phytopathogenic fungi and found MIC = 15 g L⁻¹ for *B. cinerea* and MIC = 7.5 g L⁻¹ for *A. niger* and *R. stolonifer*. In the present study we found MIC = 4 g L⁻¹ for *B. cinerea* and *R. stolonifer* and MIC = 5 g L⁻¹ for *A. niger*. This suggested that the difference between the chitosan MIC values against the same species of fungi could be related to the physicochemical

characteristics of the polymer, such as the degree of deacetylation and molecular weight (Verlee et al., 2017).

According to Hernandez-Lauzardo (2008) and Badawy and Rabea (2009), low molecular weight chitosan presents better antifungal activity due to the ability of this polymer to penetrate the fungal cell wall. This suggests that the main target of action of low molecular weight chitosan is the plasma membrane of the fungi. The fungal chitosan used in the present research has a low molecular weight, which could have contributed to the high antifungal activity and low MIC values.

A high degree of chitosan deacetylation is another important factor for its antimicrobial activity. Kong et al. (2010) reported that the polycationic structural features provided by the amino provide a high density of positive charge to the polymer. Chitosan with a high degree of deacetylation exhibits a more efficient electrostatic interactions with fungal cell walls that are formed by negatively charged phospholipids. Consequently, antifungal activity increases when the degree of deacetylation is higher and the molecular weight is lower (Verlee et al., 2017). Once the cell membrane is disrupted, chitosan is capable of entering the cell. This can lead to inhibition of DNA/RNA synthesis and disruption of protein synthesis (Palma-Guerrero et al., 2010; Ing et al., 2012; Kheiri et al., 2016).

In this study, FCNs were demonstrated to have higher antifungal activity in comparison to CS gel, in accordance with previous reports. The negatively charged surface of the fungal cell is the target site of the polycation. Because of the larger surface area of the nanoparticles, FCNs could be tightly adsorbed onto the surface of the fungal cells so as to disrupt the membrane, which would lead to the leakage of cellular contents, thus killing the fungal cells (Garcia Rincon et al., 2010). Chitosan nanoparticles penetrate into fungal cells and tightly bind nucleic acids via electrostatic interactions between cationic FCNs and anionic DNA. This suggest that they may cause a variety of damage and selective inhibition, such as inactivation the synthesis of essential mRNA encoded by various genes required for important metabolic and infectious processes of the microorganism (Ing et al., 2012).

The MIC values for *A. niger* were higher than the values found for the other fungi for all test substances. Ing et al. (2012) found similar results. *A. niger* contains 10 % chitin in the cell wall, and fungi that have chitosan as one of their cell wall components are more resistant to externally delivered chitosan (Beauvais et al 2014, Beauvais and Latgé, 2018).

The CS gel enriched with FCNs (nanocomposite) presented the lowest MIC amongst all the tested samples. This is consistent with the statement of Lee et al. (2010) that, when chitosan

nanoparticles are well-dispersed in solution they are more efficiently transported to the cell wall, which causes disorder and leads to increased antimicrobial activity.

The improvement of the antifungal activity by the nanocomposite can also be demonstrated by the checkerboard method. The CIF values for all fungi analyzed exhibited additive interaction between the gel and nanoparticles. [Castelo Branco Melo et al. \(2018\)](#) analyzed the antimicrobial action of gel enriched with fungal chitosan nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria. These authors also observed better antimicrobial activity when the gel and FCNs are applied together. However, to date, no research comparing the antifungal activity of CS gel, FCNs and nanocomposite against strawberry phytopathogenic fungi has been reported. Hence, this work is the first time that a research report has identified that the association between CS gel and FCNs is the better option to inhibit strawberries phytopathogenic fungi, when compared to CS gel or FCNs alone.

3.2.2 Effects on mycelial growth

The percent inhibition of mycelial growth is shown in Table 2. All samples were effective in inhibiting mycelial growth of phytopathogenic fungi on strawberries. The lowest inhibition percentages occurred in the samples exposed to CS gel at the MIC/ 2 concentration, which differed significantly ($p < 0.05$) from the other samples applied in the sub-inhibitory concentration.

Several studies have shown that the inhibition of mycelial growth by the use of chitosan (gel) is due to the interaction of this polymer with fungal cell membranes and subsequent disruption of this membrane. This could cause cellular leakage and modification in the activity of the enzymes responsible for fungal growth ([Hernández-Lauzardo et al., 2008](#); [García-Rincón et al., 2010](#); [Oliveira et al., 2014](#)). Despite this effect, in the present study was verified the highest concentration of CS gel ($2 \times \text{MIC}$) resulted in a lower percentage of inhibition than the CS gel enriched with FCNs at MIC/ 2 levels.

The FCNs presented percentages of mycelial inhibition higher than those found for the CS gel. Similar results were found by [Sathiyabama and Parthasarathy \(2016\)](#). This higher antifungal activity of nanoparticles is due to the high surface area of the particles, which facilitates their contact with fungal cells and their permeability ([Kheiri et al., 2016](#)).

The nanocomposite (CS gel + FCNs) was the most effective substance in inhibiting in vitro mycelial growth of the strawberry phytopathogenic fungi tested. This suggested that when

the gel and nanoparticles are present together, they improved their individual antifungal activity. Nanoparticles are better dispersed when dissolved in chitosan gel. In this way, the nanoparticles are more efficiently transported to the fungal cell walls, which causes disorder and leads to the increased antimicrobial activity (Lee et al., 2010).

Also, there was no significant difference ($p > 0.05$) between the MIC and $2 \times$ MIC concentration of the gel enriched with nanoparticles for all of the postharvest fungi infecting strawberries. Kheiri et al. (2016) reported that with increasing chitosan concentration there is an increase in the viscosity of the solution which restricts the contact between chitosan and the fungal cell surface. Therefore, the MIC is the maximum concentration that the gel with the nanoparticles must be used, because concentrations above the MIC will not improve the antifungal activity of this substance.

3.2.3 Effects on spore germination

The application of the test substances revealed high rates of inhibition of spore germination for all assayed fungi (Table 3). The nanocomposite presented the highest rates of spore germination inhibition. This suggested that the combination of CS gel with FCNs was the most effective substance in inhibiting not only in vitro mycelial growth, but also spore germination of the strawberry phytopathogenic fungi tested.

However, the rates of spore germination inhibition were higher than the rates found for mycelial growth inhibition. This result is similar to the described by Palma-Guerrero et al. (2008), who reported a better activity of chitosan against spores than on hyphae for other types of fungi (*Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*). Likewise, Jitareerat et al. (2007) and Qiu et al. (2014) also demonstrated that chitosan gel is more effective in inhibiting spore germination than mycelial growth.

The presence of positive charges in the chitosan chain interact with the negative charges of the fungal surfaces causing spore grouping, which restricts germ tube elongation, and, consequently the germination process (Xing et al., 2015). According to Cota-Arriola et al. (2013), the delay in the germination of spores treated with chitosan can be attributed to the ability of the polymer to chelate calcium ions that are fundamental to the germination process. This mechanism can also be applied by FCNs, which, due to the presence of phosphate groups from TPP, make unavailable some ions (Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2}) that are important for fungal growth.

In addition, nanoparticles have chitosan amino groups that interact with fungal surfaces, resulting in a similar effect to the CS gel (Cota-Arriola et al., 2013; Xing et al., 2017).

The antifungal action of the different forms of chitosan (gel, FCNs and nanocomposite) against spores is extremely important when considering the application of these substances in fruits. Spores are important survival structures and are involved in fungal spread in agricultural products, being capable of causing infections in the fruits, with consequent post-harvest loss (Sousa et al., 2013). Therefore, the substances used in the present research appear to be an alternative for the inhibition of spore germination and the conservation of post-harvest fruits.

3.2.4 Effect on fungal morphology

The effect of the edible coatings on the morphology of *R. stolonifer*, *B. cinerea* and *A. niger* can be observed in Figures 3, 4 and 5, respectively. In the control sample of *R. stolonifer* (Fig. 3A), the hyphae present a typical structure, homogeneous in size and with a smooth surface. When the hyphae of *R. stolonifer* were exposed to the fungal chitosan gel (Fig. 3B) it was observed that there was an excessive deposit of chitosan on fungal surfaces.

According to Oliveira Junior et al. (2012), chitosan gels, especially those with low molecular weights, tends to deposit on the surfaces of the hyphae, blocking ion channels, thereby hindering the entry of essential nutrients into the cell. In the present research, a low molecular weight chitosan was used, which contributed to abnormal growth of *R. stolonifer*.

Figure 3C shows the presence of shrunken hyphae and loss of cytoplasmic material (empty hyphae). This result demonstrates that the action of chitosan against *R. stolonifer* when in the nanoparticle format is much more severe than the action of chitosan when present as a gel. The nanometric size of the particles facilitates their entry into the cells of microorganisms through ion channels or protein carriers (Sharma et al., 2010). In addition, the high surface charge density of the chitosan nanoparticles interacts easily with the negative charges on the cell surfaces of the fungi. This interaction causes changes in the permeability of the fungal membrane and, eventually, induces cell disruption and leakage of intracellular material (Ing et al., 2012), causing the formation of empty hyphae as observed in the present research.

When *R. stolonifer* is exposed to the nanocomposite, there is an interaction of both forms of the chitosan making it possible to observe the presence of both the gel effect alone and the effect of the nanoparticles alone (Fig. 3D). This result is in agreement with what was found in

the checkerboard method, confirming that the mixture of the two forms of chitosan analyzed has an additive effect, that is, a better effect when the gel and the nanoparticles are combined.

With respect to the effect of test substances on *B. cinerea*, we observed that the gel also deposited on the surface of the hyphae which led to its aggregation, showing an effect similar to that found for *R. stolonifer*, which was not observed in the *B. cinerea* control sample (Fig. 4A). However, the gel was also able to form "empty hyphae", suggesting that *B. cinerea* would be a more sensitive fungus to the action of the chitosan gel when compared to *R. stolonifer* in that the gel only deposited on the surface of the hyphae (Fig. 4B). This ability of the gel to form empty hyphae is not so common, but has already been reported by [Kong et al. \(2010\)](#) and [Ma et al. \(2017\)](#). According to these authors, the positive charges of chitosan interact with the negative charges of the phospholipid components of the cell membrane of the fungi, causing an increase in membrane permeability, with leakage of intracellular components and, therefore, formation of empty hyphae.

Similarly, chitosan nanoparticles also caused the formation of "empty hyphae", the same effect found in *R. stolonifer*. However, in addition to this effect it is possible to observe in Figure 4C that there is a wrinkling on the surface of *B. cinerea*. According to [Kheiri et al. \(2016\)](#), because of the high surface area of the particles, nanoparticles can be well absorbed on the surface of fungal cells, altering their cellular permeability.

In the sample of *B. cinerea* exposed to the nanocomposite, there was a predominance of the effects of the chitosan gel with the formation of larger and aggregated hyphae (Fig. 4D). However, there was a potentiation of the effect of both substances since it is possible to observe the formation of hyphae with aberrant morphology ("abnormal shapes").

With respect to *A. niger*, it was observed that chitosan-based substances had the same effect on *A. niger* as those observed in other fungi tested, but less severe (Fig. 5A – D). This result was already expected, as it was observed in the other in vitro antifungal tests, *A. niger* was the most resistant to the action of all of the substances used in the present research. This higher resistance is due, as previously mentioned, to the higher content of chitosan in the cell wall of *A. niger*, which according to [Ing et al. \(2012\)](#), makes this fungus more resistant to the action of externally-administered chitosan.

However, despite this increased resistance, all of the substances induced morphological alterations to the hyphae of *A. niger*. Also, nanocomposite again presented as the chitosan-based

substance that caused a more pronounced modifications to the fungal structure. This suggested that the nanocomposite is capable of potentiating morphological modifications to the fungi, thus becoming a promising alternative in the fight against post-harvest fungi.

3.3 *In vivo* antifungal effects

The effects of the CS gel, FCNs and nanocomposite coatings on strawberries previously infected with phytopathogenic fungi and stored for 6 and 12 d at 25 °C and 12 °C are shown in Tables 4 and 5, respectively. Statistical analysis revealed that in all groups of fungi tested, strawberries without the edible coating (control) did not differ significantly ($p > 0.05$) from strawberries coated with glycerol. Therefore, the use of glycerol in the FCN edible coating does not interfere with the antifungal action of the nanoparticles, acting only as an inert dispersion medium for the nanoparticles during production of the coating.

At both temperatures, the edible coating produced with nanocomposite yielded the lowest percentage of *B. cinerea* infection. This *in vivo* result is similar to the *in vitro* results of the percentage of mycelial inhibition and spore germination. As previously reported in this research, the combination of the two forms of chitosan, gel and nanoparticles, had an additive effect which means that when added together, a potentiation of its antifungal effect occurs.

The CS gel presented the lowest ability to inhibit the growth of *B. cinerea*. However, the CS gel contributed greatly to reduce progression and spread of the infection during the storage period (Fig. 6). [Awad \(2017\)](#) also found a similar result.

At cold temperatures, the percentage of strawberries infected with *B. cinerea* and coated with CS gel was similar ($p > 0.05$) to the percentage exhibited by the control, the glycerol and FCN samples. According to [Meng et al. \(2008\)](#) and [Oliveira et al. \(2014\)](#), during the storage of fruits at a low temperatures, a decrease in the physiological processes of the fruit occurs, and a weakening of the pathogenicity of the fungi. Therefore, as a result of this weakening, strawberries stored at cold temperature presented a lower percentage of *B. cinerea* infection, which is reflected in the statistical analysis of this group that did not identify significant differences between the control, glycerol, gel and nanoparticle groups.

Regarding the percentage of infections caused by *R. stolonifer*, the CS gel was, again, the sample that had the least ability to inhibit the growth of the strawberry phytopathogenic

fungi. However, at room temperature, the effect of the CS gel was statistically superior ($p < 0.05$) to the effect observed in the control and glycerol samples. [Hernández-Lauzardo et al. \(2010\)](#) also demonstrated that CS gel was able to retard the growth of *R. stolonifer* in other types of fruits such as papaya, pear and tomato. [Pastor et al. \(2011\)](#) suggests that the effect of chitosan on inhibiting fungal growth in fruits is also related to the ability of this polymer to increase the production of defense enzymes (e.g., chitinases) and to antioxidant activities of the fruit (e.g., polyphenol oxidase, peroxidase).

At low temperatures, no significant difference was observed between the strawberries coated with CS gel and the control and glycerol samples. According to [Romanazzi et al. \(2013\)](#), the soft rot caused by *R. stolonifer* is able to spread at temperatures above 4 - 6 ° C. Therefore, during storage at cold temperatures there was a lower capacity of dissemination of this fungus that was reflected in the lower percentage of infection for the control fruits and for the fruits coated with glycerol, when compared with the same type of treatment for the strawberries stored at room temperature (Fig. 7).

Similar to the results found for *B. cinerea*, the edible coating made with the nanocomposite was, again, the most effective chitosan based substance in inhibiting the growth of *R. stolonifer* in strawberries. However, at room temperature, the edible coating made with only FCNs presented no significant difference ($p > 0.05$) in relation to the edible coating made with the nanocomposite. A similar result was found for *A. niger* at both temperatures. This suggested that the enhanced antifungal action of these coatings is mainly due to the presence of nanoparticles, as previously reported by [Castelo Branco Melo et al. \(2018\)](#) for pathogenic food-borne bacteria.

A. niger was the fungus that presented the greatest visual changes in the fruit, as shown in Figure 8. According to [Wang et al. \(2015\)](#) and [Lichter et al. \(2002\)](#), infection of this pathogen in fruits is characterized by softening of the infected site followed by the development of a dark mold that corresponds to the fructification structures of the fungi. These changes were more intense in uncoated and in strawberries coated with glycerol, which confirmed the importance of chitosan-based edible coatings in retarding fungal growth.

According to [Kim et al. \(2014\)](#), the application of a fungal inoculum to the fruit before the edible coating produces an environment with a low concentration of oxygen for the microorganisms and the coating acts as a barrier. However, the presence of nanoparticles in the edible coatings not only intensified the antimicrobial action of the CS gel, but also contributed

to the formation of a modified atmosphere, suppressing the supply of oxygen to the microorganisms present (Castelo Branco Melo et al., 2018).

Therefore, in the present research the most effective chitosan-based edible coating to inhibit phytopathogenic fungi previously used to infect strawberries was the CS gel enriched with FCNs (nanocomposite). Nanotechnology, in this case, proved to be an alternative means of enhancing the action of the conventional CS gel, which together with FCNs, as nanocomposite, even at low concentrations, was able to inhibit the growth of strawberry phytopathogenic fungi, which are, according to Usall et al. (2016), the main factor for postharvest losses of this fruit.

4. Conclusions

The results obtained in this study demonstrated that the application of chitosan as a gel, or nanoparticles individually or in nanocomposite (CS gel + FCN), can control the growth and the viability of the strawberry phytopathogenic fungi. In addition, the combination of the 2 forms of chitosan, gel and nanoparticles, presented additive effects against the three types of fungi tested. The application of the nanocomposite edible coating on strawberries artificially contaminated with postharvest fungi decreased the infection severity caused by these fungi during fruit storage, which is an alternative to extend the shelf life of this fruit.

These findings revealed the potential of the chitosan nanocomposite to control the growth of *B. cinerea*, *A. niger* and *R. stolonifer* in vitro and on strawberries. Therefore, the application of such nanotechnology in conventional CS gel edible coatings may improve the properties of the CS gel and bring additional benefits, such as decreased amounts of chitosan capable of inhibiting fungal growth.

Acknowledgements

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination Unit Improving Higher Education Personnel (CAPES) and Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for the financial support. The authors thank the Kitozyme company for providing

the chitosan used in this research and Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology at Catholic University of Pernambuco, Brazil, for the use of laboratories.

References

- An, P., Yang, X., Yu, J., Qi, J., Ren, X., Kong, Q., 2019. α -terpineol and terpinene-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities in vitro and in vivo against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. *Food Control*, 98, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.013>
- Awad, H.M., 2017. Antifungal potentialities of chitosan and *Trichoderma* in controlling *Botrytis cinerea*, causing strawberry gray mold disease. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 8, 371-378.
- Badawy, M.E.I, Rabea, E.I., 2011. Biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-29. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/460381>
- Ban, Z., Horev, B., Rutenberg, R., Danay, O., Bilbao, C., MacHugh, T., Rodov, V., Poverenov, E., 2018. Efficient production of fungal chitosan utilizing an advanced freeze-thawing method; quality and activity studies. *Food Hydrocolloids*, 81, 380-388. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.010>
- Battistelli, M.R., De Sanctis, R., De Bellis, L., Cucchiari, M., Golbi, P., 2005. *Rhodiola rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behavior. *Eur. J. Histochem*, 49, 243-254. DOI: 10.4081/951
- Beauvais, A., Fontaine, T., Aïmanianda, V., Latgé, J.P., 2014. *Aspergillus* Cell Wall and Biofilm. *Mycopathologia*, 178, 371-377. DOI 10.1007/s11046-014-9766-0
- Beauvais, A., Latgé J.P., 2018. Fungal Cell Wall. *Journal of fungi*, 4, 91 – 99. <https://doi.org/10.3390/jof4030091>
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Camiletti, B.X., Asensio, C.M., Pecci, M.D.L.P.G., Lucini, E.L., 2014. Natural control of corn postharvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium sp.* using essential oils from plants

- grown in Argentina. *Journal of Food Science*, 79, 2499 – 2506. doi: [10.1111/1750-3841.12700](https://doi.org/10.1111/1750-3841.12700).
- Castelo Branco Melo, N.F., Soares, B.L.M., Diniz, K.M., Leal, C.F., Canto, D., Flores, M.A.P., Tavares-Filho, J.H.C., Galembeck, A., Stamford, TLM, Stamford-Arnaud, T.M., Stamford, T.C.M., 2018. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.014>
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerra-Brauer, J.M., Lizardi-Mendonza, J., Burgos-Hernández, A., Robles-Sánchez, R.M., Plascencia-Jatomea, M., 2013. Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *Journal of Polymers and the Environmental*, 21, 971-980. DOI [10.1007/s10924-013-0583-1](https://doi.org/10.1007/s10924-013-0583-1)
- Eshghi, S., Hashemi, M., Mohammadi, A., Badii, F., Mohammadhoseini, Z., Ahmadi, K., 2014. Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria x ananassa Duchesce*) during storage. *Food Bioprocess and Technology*, 7, 2397-2409. DOI [10.1007/s11947-014-12810-2](https://doi.org/10.1007/s11947-014-12810-2).
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., Ni, H., 2012. Formation mechanism of monodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surface B: Biointerfaces*, 90, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>
- Freire, P.L.L., Stamford, T.C.M., Albuquerque, A.J.R., Sampaio, F.C., Cavalcante, H.M.M., Macedo, R.O., Galembeck, A., Flores, M.A.P., Rosenblatt, A., 2015. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45, 183-187. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.007>
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., Mccarron, P., 2005. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.001>
- García-Rincón, J., Vega-Pérez, J., Guerra-Sánchez, M.G., Hernández-Lauzardo, N.A., Peña-Díaz, A., Velázquez-Del Valle, M.G., 2010. Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 275-278. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.03.008>

- Guerra, I.C.D., Lima, de Oliveira, P.D., Pontes, A.L.S., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M. Nadruga, M.S., Souza, E.L., 2015. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 168-178. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.009.
- Gol, N.B., Patel, P.R., Rao, R., 2013. Improvement of quality and shelf life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.008>.
- Hajji, S., Younes, I., Affes, S., Boufi, S., Nasri, M. 2018. Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocolloids*, 83, 375-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.013>
- Hashad, R.A., Ishak, R.A.H, Fahmy, S., Mansour, S., Geneidi, A.S., 2016. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: optimization of formulation parameters for improving process yield at a novel pH using artificial neural networks. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.042>
- Hernández-Lauzardo, A.N., Batista-Baños, S., Velásquez-Del Valle, M.G, Méndez-Montealvo, M.G., Sánchez-Rivera, M.M., Bello-Pérez, L.A., 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73, 541-7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.020>
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F., 2016. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 194, 1266-1274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.004>
- Ing, L.Y., Zin, N.M., Sarwar, A., Katas, H., 2012. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 23, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/632698>
- Jitareerat, P., Paumchai, S., Kanlayanarat, S., Sangchote, S., 2007. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*mangifera indica*) fruit. *New Zealand Journal of Crop Science and Horticulture*, 35,211-218. <https://doi.org/10.1080/01140670709510187>
- Jesen, B., Knudsen, I.M.B., Andersen, B., Nielsen, K.F., Thrane, U., Jesen, D.F., Larsen, J., 2013. Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 313-322. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.005.

- Oliveira Junior, E.N., Melo, I.S., Franco, T.T.. 2012. Changes in hyphal morphology due to chitosan treatment in some fungal species. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55:637-646. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000500001>
- Kheiri, A., Moosawi Jorf, S.A., Malhipour, A., Saremi, H., Nikkahah, M., 2016. Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of *Fusarium* head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) *in vitro* and greenhouse. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1261-1272. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.072.
- Kim, L.H., Oh, Y.A., Lee, H., Song, K.B., Min, S.C., 2014. Grape berry coatings of lemongrass oil-incorporating nanoemulsion. *Food Science and Technology*, 58, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.018>
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
- Lichter, A., Zutkhy, Y., Sonogo, L., Dvir, O., Kaplunov, T., Sarig, P., Ben-Arie, R., 2002. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 301-308. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00141-7)
- Lee, S.M., Song, L.C., Lee, B.S., 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Journal of Chemical Engineering*, 27, 688-692. DOI: 10.1007/s11814-010-0067-0
- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., Jeong, K.C., 2017. Application, mode of action, and *in vitro* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. *Carbohydrate Polymers*, 176:257-265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>
- Meng, X., Li, B., Liu, L., Tian, S., 2008. Physiological responses and quality attributes of table grapes fruit to chitosan pre-harvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106, 501-508. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.012>
- Moustafa, H., Youssef, A.M., Darwish, N.A., Abou-Kandil, A.I., 2019. Eco-friendly polymer composites for green packaging: Future vision and challenges. *Composites Part B*, 172, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.05.048>
- Mubarakali, D., Lewisoscar, F., Gopinath, V., Alharbi, N.S., Alharbi, S.L., Thajuddin, N., 2018. An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants. *Microbial Pathogens*, 114, 323-327. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.043.
- Oliveira, C.E.V., Magnani, M., Veríssimo de Sales, C., Pontes, A.L.S.; Campos-Takaki, G.M., Stamford, T.C.M., Leite de Souza, E., 2014. Effects of chitosan from *Cunninghamella*

- elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). International Journal of Food Microbiology, 171, 54–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.006>.
- Oliveira K.A.R., Berger, L.R.R., Araújo. A.S., Câmara, M.P.S., Souza, E.L., 2017. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. Food Microbiology, 66,96-103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>
- Oregel-Zamudio, E., Angoa-Pérez, M.V., Oyoque-Salcedo, G., Aguilar-González, C.N., Mena-Violante, H.G., 2017. Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during shelf-life. Scientia Horticulturae, 214, 273-279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.038>
- Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J.A., Perez-Berna, A.J., Huang, I.C., Jansson, H.B., Salinas, J., Villalaín, J., Read, N.D., Lopez-Llorca, L.V., 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. Molecular Microbiology, 75, 1021-1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039>.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Marcilla, A., Chiralt, A., Cháfer, M., González-Martínez, C., 2011. Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. Postharvest Biology and Technology, 60, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.11.003>
- Pinho Neves, A.L., Milioli, C.C., Müller, L., Riella, H.G., Kuhnen, N.C., Stulzer, H.K., 2014. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects, 445, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.058>
- Qiu, M., Wu, C., Ren, G., Liang, X., Wang, X., Huang, J., 2014. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. Food Chemistry, 155,105-111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.026>
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., Cesàro, A., 2013. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. International Journal of Pharmaceutics, 455, 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., Landi, L., 2013. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 75, 24-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.07.007>.

- Romanazzi, G., Smilanick, J., Feliziani, E., Droby, S., 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.003>
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M.K., Sharma, S.S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., 2015. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>
- Santos, N.S.T., Aguiar, A.J.A.A., Oliveira, C.E.V., Sales, C.V., Silva, S.M., Sousa, R.S., Stangord T.C., Souza E.L., 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare L.* essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis Labrusca L.*). *Food Microbiology*, 32, 345-353. DOI:10.1016/j.fm.2012.07.014
- Sathiyabama, M., Parthasaeathy, R., 2016. Biological preparation of chitosan nanoparticles and its in vitro antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. *Carbohydrate Polymers*, 151, 321-325. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.033>
- Shahbazi, Y., 2018. Application of carboxymethyl cellulose and chitosan containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 264-272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.186>.
- Sharma, N., Tripathi, A., 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163, 337-344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>
- Sharma, D., Rajput, J., Kaith, B.S., Kaurm, Sharma S., 2010. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Thin Solid Films* 519:1224-1229. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.08.073>
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77, 279-285. Doi:10.1016/j.fitote.2006.03.013
- Sousa, L.L., Andrade, S.C.A., Athayde, A.J.A.A., Oliveira, C.E.V., Sales, C.V., Madruga, M.S., Leite de Sousa, E., 2013. Efficacy of *Origanum vulgare L.* and *Rosmarinus officinalis L.* essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca L.* (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165, 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.001>
- Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., 2016. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative?. *Current Opinion in Food Science*, 11, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.002>

- Tsai, M.L., Chen, R.H., Bai, S.W., Chen, W.Y., 2011. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carbohydrate Polymers*, 84, 756-761. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.040>
- Tyagi, A.K., Malik, A., 2010. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. *Int. J. Food Microbiol.*, 143, 205-210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.023>
- Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V.D., Moldão-Martins, M., 2013. Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa cv Camarosa*) under commercial storage conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 52, 80-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.004>.
- Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V., 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268-283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
- Wang, S.Y., Gao, H., 2013. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *LWT - Food Science and Technology*, 52, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.003>
- Xing, K., Liu, Y.F., Shen, X.Q., Zhu, X., Li, X.Y., Miao, X., Feng, Z., Peng, X., Qin, S., 2017. Effect of O-chitosan nanoparticles on the development and membrane permeability of *Verticillium dahliae*. *Carbohydrate Polymers*, 165, 334-343. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.063>
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X., Qin, S., 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 569-588. DOI: [10.1007/s13593-014-0252-3](https://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3)

Fig 1. Schematics of chitosan gel (CS gel), fungal chitosan nanoparticles (FCN) and chitosan gel enriched with fungal chitosan nanoparticles (CS gel + FCN) edible coatings applied on strawberries previously infected with *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer*, separately.

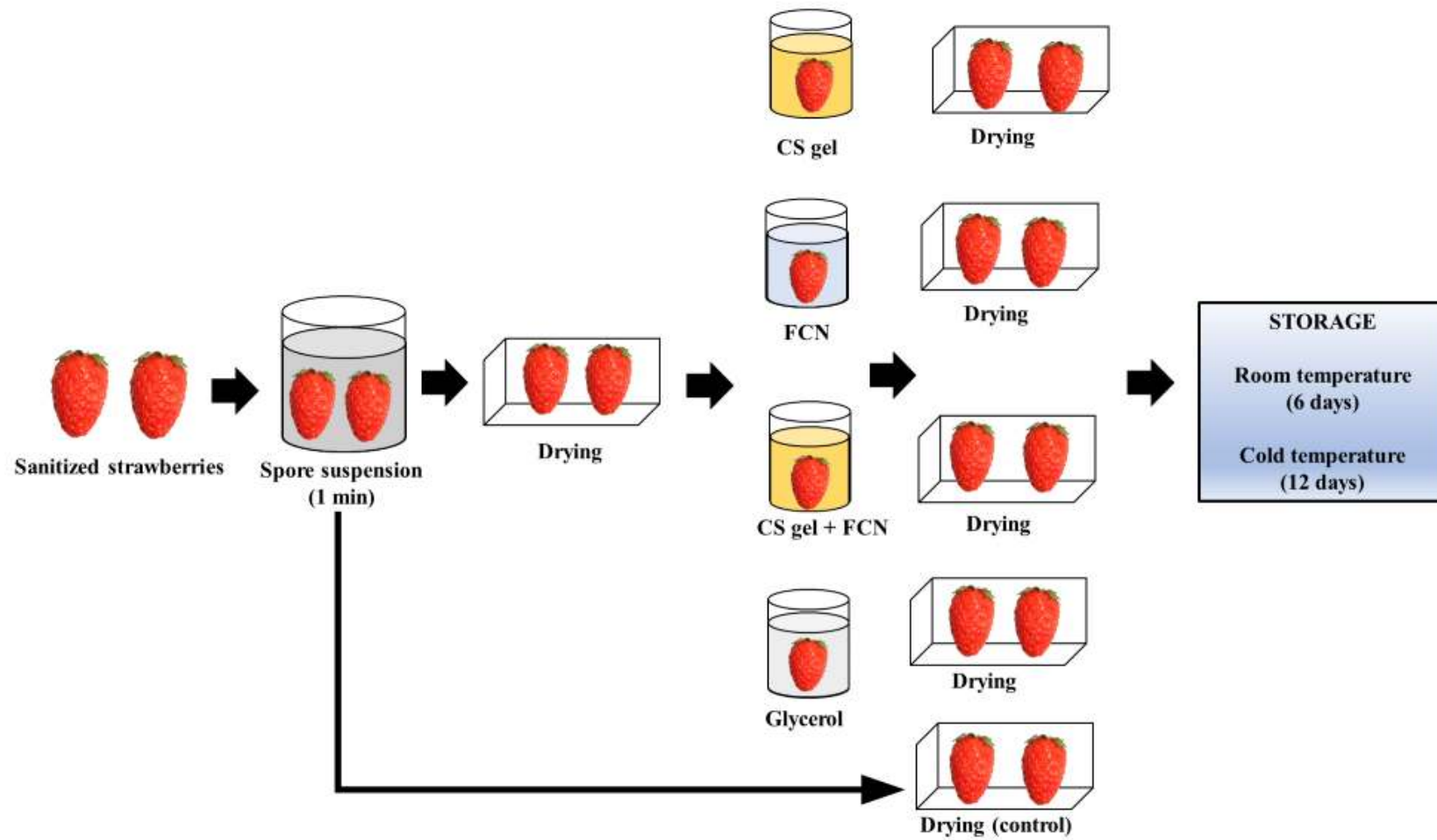


Fig 2. Scanning electron microscopy image of fungal chitosan nanoparticles.

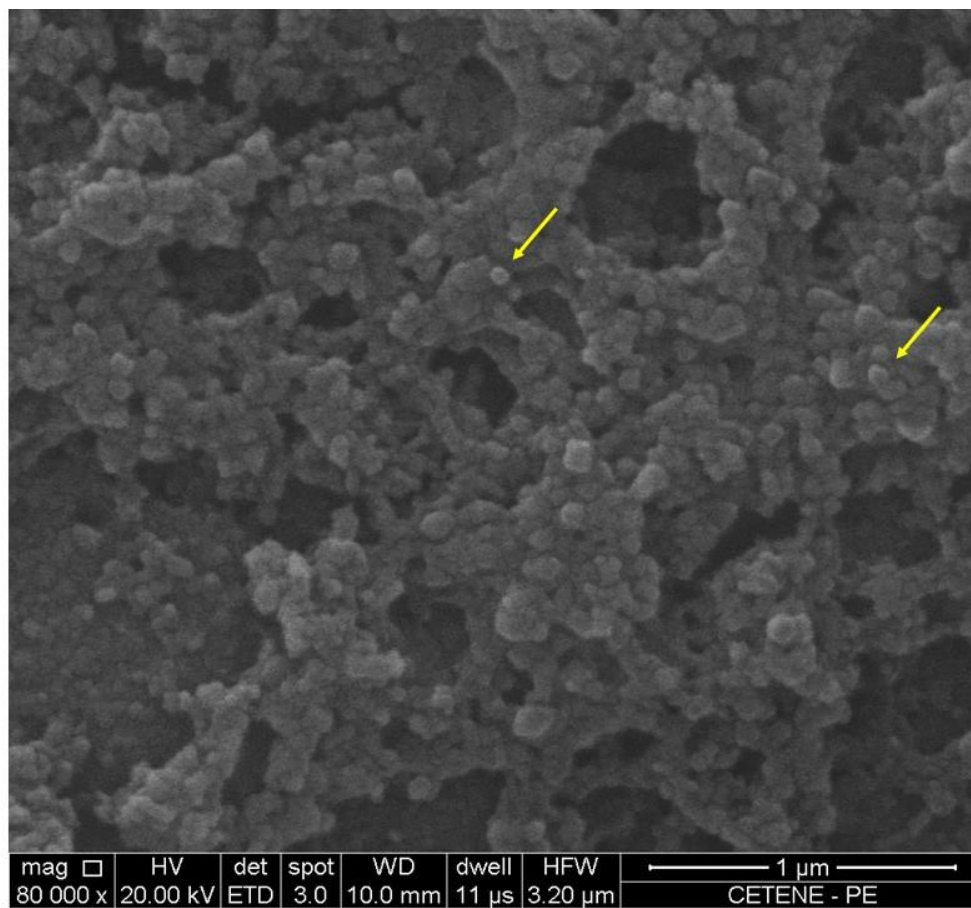


Fig 3. SEM image of *R. stolonifer* mycelium control (A) and after exposure to chitosan gel (B), nanoparticles of fungal chitosan (C) and fungal nanocomposite (D).

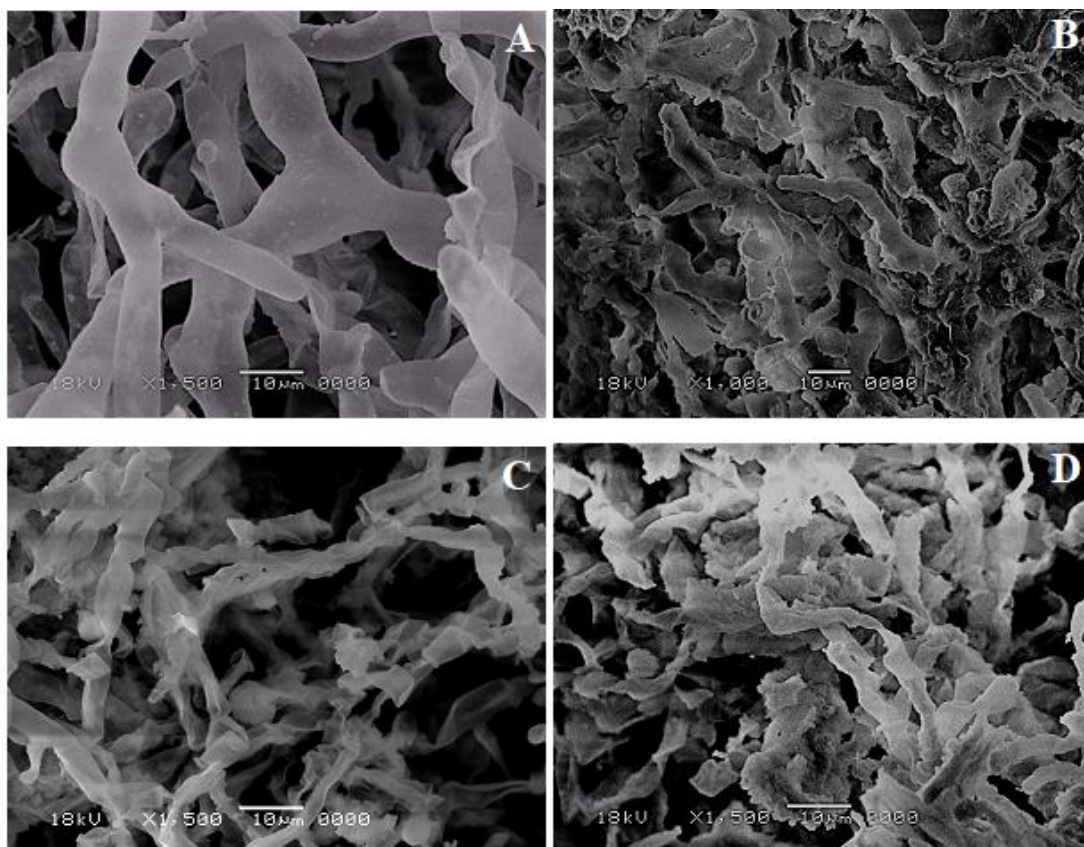


Fig 4. SEM image of *B. cinerea* mycelium control (A) and after exposure to chitosan gel (B), nanoparticles of fungal chitosan (C) and fungal nanocomposite (D).

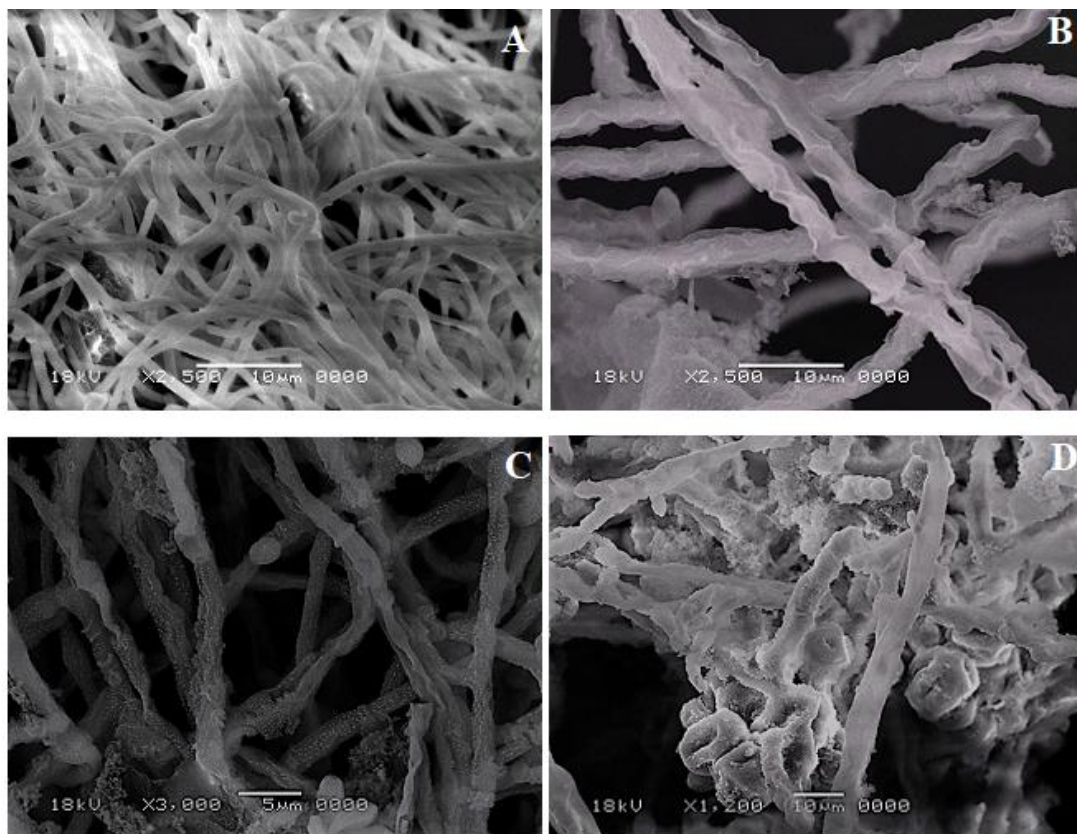


Fig 5. SEM image of *A. niger* mycelium control (A) and after exposure to chitosan gel (B), nanoparticles of fungal chitosan (C) and fungal nanocomposite (D).

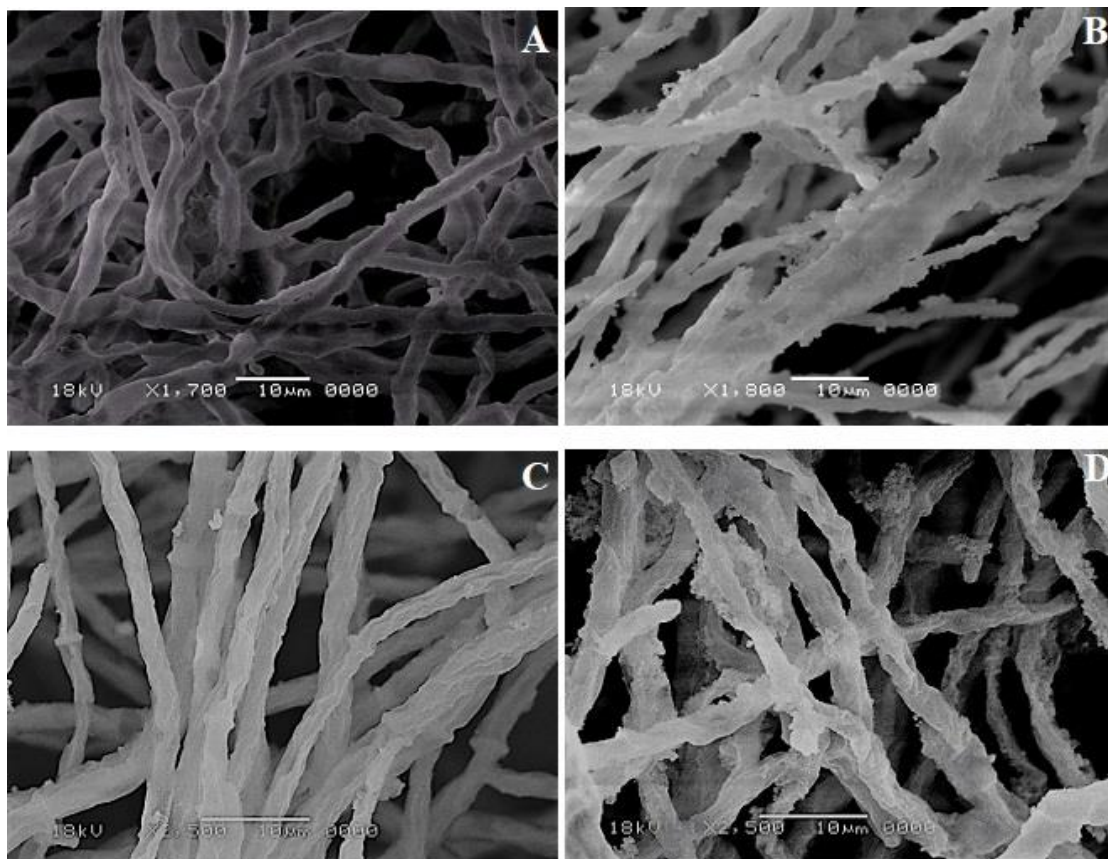


Fig 6. Appearance of strawberries coated with chitosan gel (CS gel), fungal chitosan nanoparticles (FCNs) and nanocomposite (CS gel + FCNs) at minimum inhibitory concentration (MIC) and uncoated (control) previously infected with *B. cinerea* after 6 and 12 days of storage at room (24°C) and low temperatures (12°C).

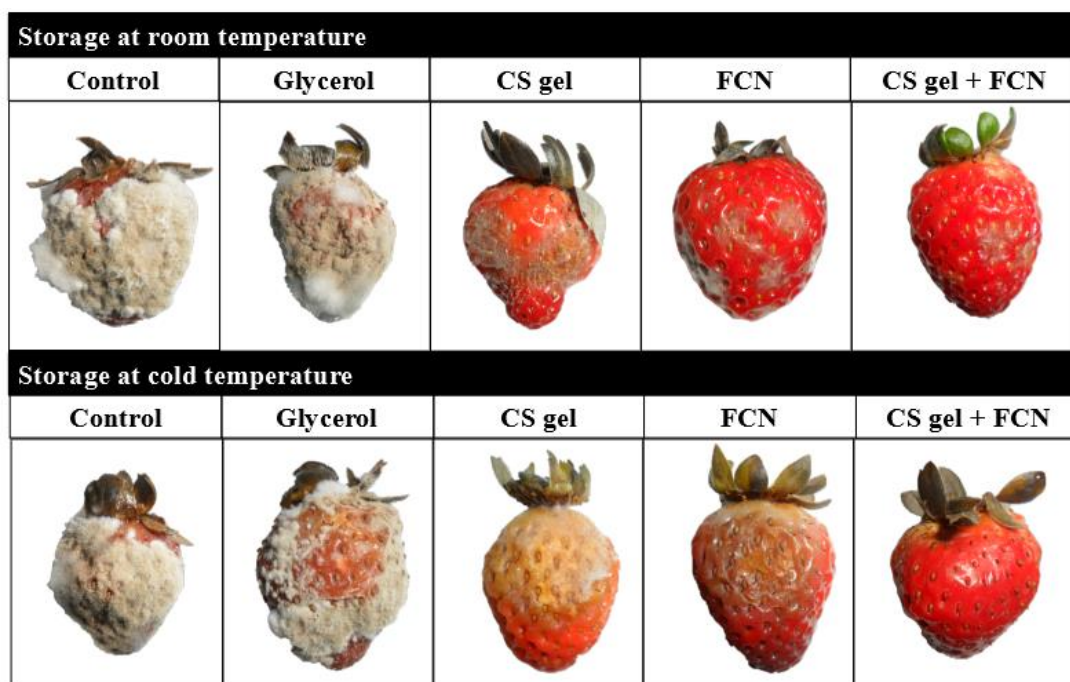


Fig 7. Appearance of strawberries coated with chitosan gel (CS gel), fungal chitosan nanoparticles (FCNs) and nanocomposite (CS gel + FCNs) at minimum inhibitory concentration (MIC) and uncoated (control) previously infected with *R. stolonifer* after 6 and 12 d of storage at room and (24°C) and low temperatures (12°C).

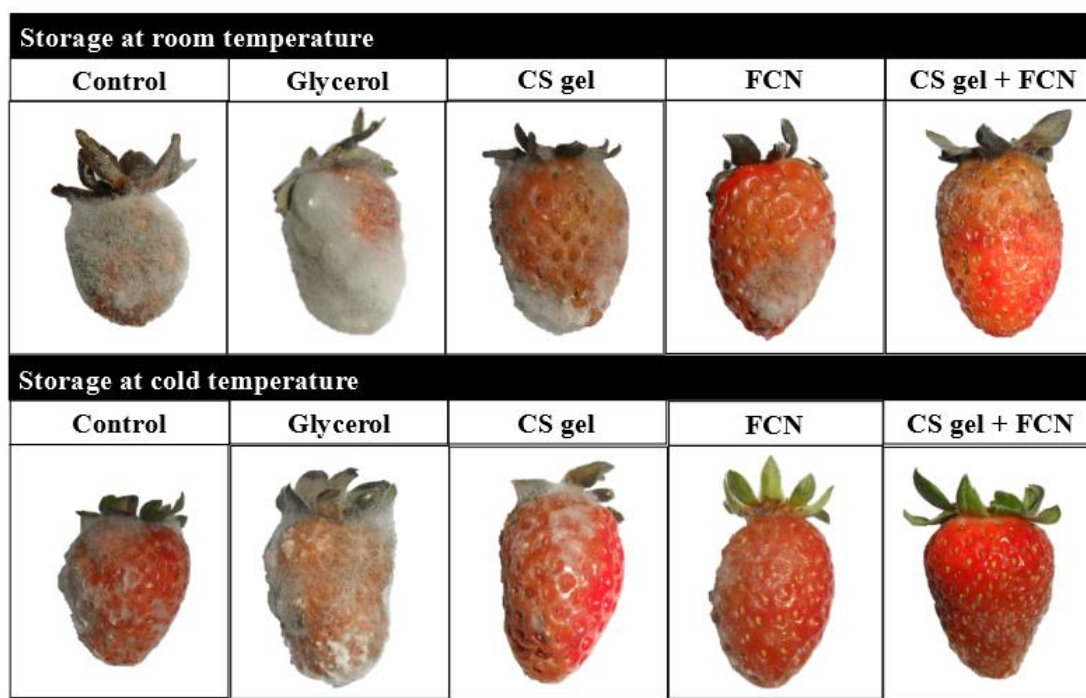


Fig 8. Appearance of strawberries coated with chitosan gel (CS gel), fungal chitosan nanoparticles (FCNs) and nanocomposite (CS gel + FCNs) at minimum inhibitory concentration (MIC) and uncoated (control) previously infected with *A. niger* after 6 and 12 days of storage at room (24°C) and low temperatures (12°C).

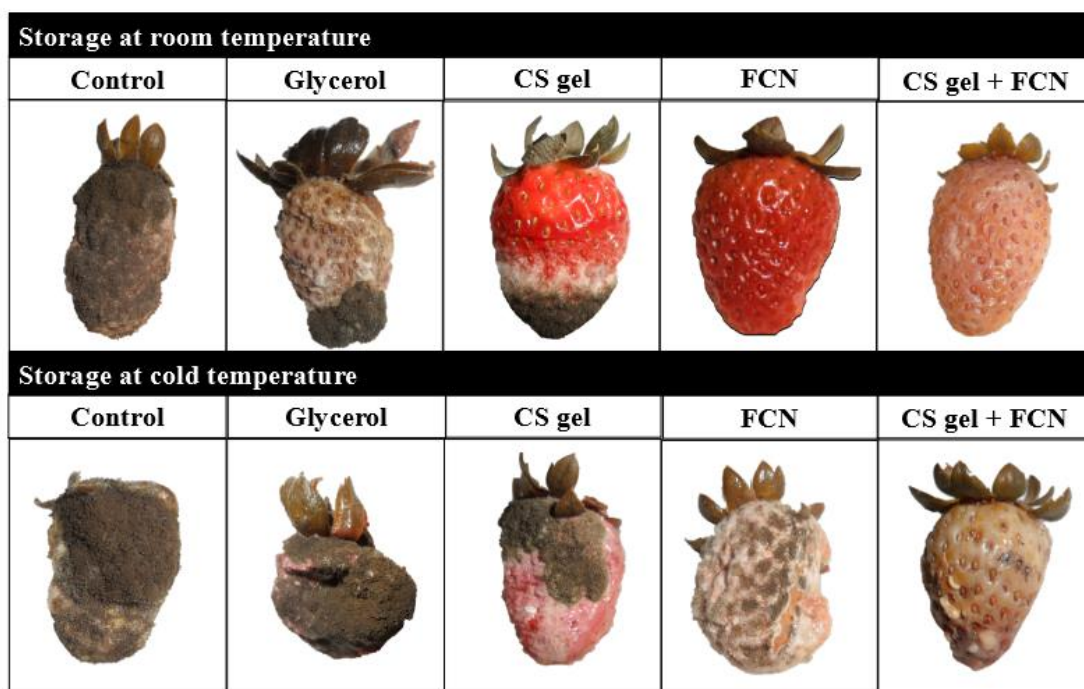


Table 1. Antifungal activity of chitosan gel (CS gel), fungal chitosan nanoparticles (FCN) and gel enriched with nanoparticles (Gel + FCN) against strawberries phytopathogenic fungi.

Note: Values represent the mean of three replicates. The standard deviation was zero for all mean values.

Test Substance	Phytopathogenic fungi		
	<i>R. stolonifer</i> (URM 3728)	<i>B. cinerea</i> (URM 2802)	<i>A. niger</i> (URM 7282)
CS gel	4,0	4,0	5,0
FCN	1,5	1,5	2,5
Gel + FCN	1,0 + 0,5	1,0 + 0,5	2,0 + 1,5

Table 2. Inhibition percent of mycelial growth of *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer* after exposure to CS gel, FCN and CS gel enriched with FCN.

Concentrations	Mycelial growth inhibition (%)		
	CS gel	FCN	CS gel + FCN
	<i>B. cinerea</i> URM 2802		
MIC / 2	30,47% ($\pm 0,82$) ^{Cc}	52,38% ($\pm 4,12$) ^{Bc}	74,28% ($\pm 3,78$) ^{Ab}
MIC	43,80% ($\pm 0,82$) ^{Cb}	68,57% ($\pm 2,85$) ^{Bb}	83,33% ($\pm 2,18$) ^{Aa}
2 x MIC	60,00% ($\pm 0,00$) ^{Ba}	82,38% ($\pm 3,59$) ^{Aa}	82,85% ($\pm 1,43$) ^{Aa}
	<i>R. stolonifer</i> URM 3728		
MIC / 2	53,67% ($\pm 3,18$) ^{Bb}	51,90% ($\pm 2,18$) ^{Bb}	77,14% ($\pm 2,48$) ^{Ab}
MIC	59,93% ($\pm 5,77$) ^{Bab}	69,04% ($\pm 4,12$) ^{Ba}	85,23% ($\pm 3,60$) ^{Aa}
2 x MIC	64,77% ($\pm 3,18$) ^{Ca}	76,19% ($\pm 4,13$) ^{Ba}	85,71% ($\pm 1,43$) ^{Aa}
	<i>A. niger</i> URM 7282		
MIC / 2	30,00% ($\pm 2,47$) ^{Cc}	57,62% ($\pm 0,82$) ^{Bb}	64,28% ($\pm 0,00$) ^{Ab}
MIC	42,85% ($\pm 0,00$) ^{Bb}	63,80% ($\pm 0,82$) ^{Aa}	67,14% ($\pm 4,95$) ^{Aab}
2 x MIC	60,00% ($\pm 0,00$) ^{Ca}	65,71% ($\pm 1,43$) ^{Ba}	72,85% ($\pm 1,43$) ^{Aa}

^{a-c} Different superscript lowercase letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

^{A-C} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 3. Inhibition percent of spore germination of *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer* after exposure to CS gel, FCN and CS gel enriched with FCN.

Concentrations	Spore germination inhibition (%)		
	CS gel	FCN	CS gel + FCN
<i>B. cinerea</i> URM 2802			
MIC / 2	72,36% ($\pm 1,41$) ^{Bb}	91,05% ($\pm 2,82$) ^{Aa}	93,49% ($\pm 1,41$) ^{Ab}
MIC	82,92% ($\pm 2,44$) ^{Ca}	91,87% ($\pm 1,41$) ^{Ba}	96,75% ($\pm 1,41$) ^{Aab}
2 x MIC	86,99% ($\pm 1,41$) ^{Ca}	94,31% ($\pm 1,41$) ^{Ba}	98,37% ($\pm 1,41$) ^{Aa}
<i>R. stolonifer</i> URM 3728			
MIC / 2	58,20% ($\pm 2,42$) ^{Bb}	60,31% ($\pm 1,58$) ^{Bc}	91,53% ($\pm 0,92$) ^{Ac}
MIC	75,13% ($\pm 0,92$) ^{Ba}	77,77% ($\pm 1,58$) ^{Bb}	94,18% ($\pm 0,91$) ^{Ab}
2 x MIC	76,69% ($\pm 2,43$) ^{Ca}	85,18% ($\pm 2,43$) ^{Ba}	97,35% ($\pm 0,92$) ^{Aa}
<i>A. niger</i> URM 7282			
MIC / 2	63,76% ($\pm 1,81$) ^{Cb}	73,91% ($\pm 0,87$) ^{Bc}	84,05% ($\pm 1,33$) ^{Ab}
MIC	65,79% ($\pm 1,00$) ^{Cb}	81,15% ($\pm 1,32$) ^{Bb}	91,01% ($\pm 1,33$) ^{Aa}
2 x MIC	81,15% ($\pm 1,32$) ^{Ca}	84,05% ($\pm 0,50$) ^{Ba}	93,33% ($\pm 0,50$) ^{Aa}

^{a-c} Different superscript lowercase letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

^{A-C} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 4. Percentage of coated and uncoated strawberries artificially infected with *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer* and stored at room temperature.

Treatments	Percentage of strawberries infected (%)		
	<i>B. cinerea</i> URM 2802	<i>R. stolonifer</i> URM 3728	<i>A. niger</i> URM 7282
CS gel	90,00% ($\pm 0,00$) ^b	75,55% ($\pm 13,46$) ^b	18,00% ($\pm 8,00$) ^b
FCN	70,00% ($\pm 0,00$) ^c	30,00% ($\pm 0,00$) ^c	13,33% ($\pm 5,77$) ^b
CS gel + FCN	60,00% ($\pm 0,00$) ^d	25,00% ($\pm 0,00$) ^c	15,33% ($\pm 2,52$) ^b
Glycerol	96,67% ($\pm 2,89$) ^a	100,0% ($\pm 0,00$) ^a	70,00% ($\pm 0,00$) ^a
Control	100,0% ($\pm 0,00$) ^a	100,0% ($\pm 0,00$) ^a	70,00% ($\pm 1,00$) ^a

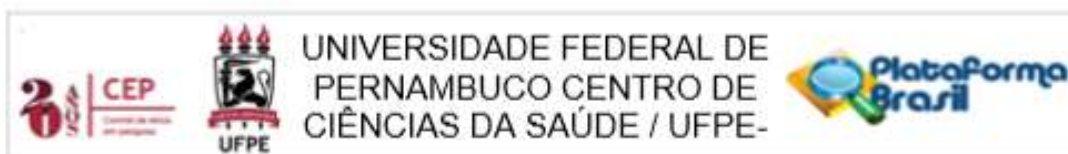
^{a-d} Different superscript capital letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

Table 5. Percentage of coated and uncoated strawberries artificially infected with *A. niger*, *B. cinerea* and *R. stolonifer* and stored at cold temperature.

Treatments	Percentage of strawberries infected (%)		
	<i>B. cinerea</i> URM 2802	<i>R. stolonifer</i> URM 3728	<i>A. niger</i> URM 7282
CS gel	70,00% ($\pm 17,32$) ^{ab}	75,00% ($\pm 0,00$) ^a	75.00% ($\pm 15,00$) ^b
FCN	66,67% ($\pm 5,77$) ^{ab}	40,00% ($\pm 5,00$) ^b	50.00% ($\pm 0,00$) ^c
CS gel + FCN	63,33% ($\pm 15,28$) ^{bc}	10,00% ($\pm 0,00$) ^c	40.00% ($\pm 0,00$) ^c
Glycerol	95.00% ($\pm 5,00$) ^a	81,10% ($\pm 18,28$) ^a	95.00% ($\pm 5,00$) ^a
Control	96,67% ($\pm 5,77$) ^a	85,00% ($\pm 8,66$) ^a	100.0% ($\pm 0,00$) ^a

^{a-c} Different superscript capital letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the mean values according to Tukey's test.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOATIVIDADE DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE QUITOSANA EM GEL E NANOPARTÍCULAS NA CONSERVAÇÃO DE MORANGO (*Fragaria ananassa*)

Pesquisador: Natália Ferrão Castelo Branco Melo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 58937016.3.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: As análises da respectiva pesquisa já foram realizadas. A pesquisa encontra-se,

Data do Envio: 10/09/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.888.899

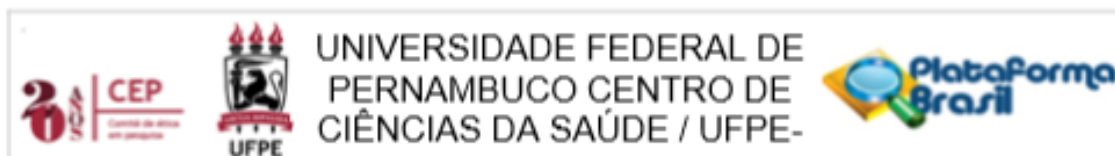
Apresentação da Notificação:

Trata-se de relatório final de pesquisa da doutoranda NATÁLIA FERRÃO CASTELO BRANCO MELO, do Programa de Pós-Graduação Em Nutrição, tendo como orientadora a Profª. Thayza C. Montenegro Stamford, da UFPE. O mesmo teve como objetivo geral avaliar, de forma comparativa, a ação antifúngica, antioxidante, conservadora e a toxicidade de cobertura comestível de quitosana na forma de nanopartículas, gel e gel enriquecido com nanopartículas na preservação de morangos (*Fragaria ananassa*).

Objetivo da Notificação:

Apresentar relatório final da pesquisa "BIOATIVIDADE DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE QUITOSANA EM GEL E NANOPARTÍCULAS NA CONSERVAÇÃO DE MORANGO (*Fragaria ananassa*)".

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.888.899

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram apresentados no projeto inicial e estão em consonância com o que foi desenvolvido no estudo.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O relatório está bem escrito, segue o que foi determinado no projeto e discute os pontos principais e resultados do estudo em questão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O relatório apresentado segue o modelo do CEP/UFPE, apresentando dados gerais dos voluntários, metodologia desenvolvida e conclusões do estudo.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Relatório Final foi analisado e APROVADO pelo colegiado do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio_final.pdf	10/09/2018 12:04:05	Natália Ferrão Castelo Branco Melo	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 12 de Setembro de 2018

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepcos@ufpe.br