

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Exatas**

**Departamento de Química**

FERNANDA JORGE GONÇALVES

**ESTUDOS PARA A EXTRAÇÃO DE QUITINA, OBTENÇÃO E MODIFICAÇÃO  
QUÍMICA DE QUITOSANA VIA REAÇÃO DE ZINCKE E PREPARAÇÃO DE  
FILMES À BASE DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS DE  
ALIMENTOS**

Belo Horizonte

2022

UFMG/ICEX/DQ. 1.495

T. 680<sup>a</sup>

Fernanda Jorge Gonçalves

**ESTUDOS PARA A EXTRAÇÃO DE QUITINA, OBTENÇÃO E MODIFICAÇÃO  
QUÍMICA DE QUITOSANA VIA REAÇÃO DE ZINCKE E PREPARAÇÃO DE  
FILMES À BASE DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS DE  
ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do  
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do  
grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Rossimiriam Pereira de Freitas

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

G635e  
2022  
T  
Gonçalves, Fernanda Jorge.  
Estudos para a extração de quitina, obtenção e modificação química de quitosana via reação de Zincke e preparação de filmes à base de quitosana para aplicação em embalagens de alimentos [manuscrito] / Fernanda Jorge Gonçalves. 2022.  
142 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Rossimiriam Pereira de Freitas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses. 2. Quitosana - Teses. 3. Quitina - Teses. 4. Alimentos - Embalagens - Teses. 5. Espectroscopia de infravermelho - Teses. 6. Termogravimetria - Teses. 7. Ressonância magnética nuclear - Teses. I. Freitas, Rossimiriam Pereira de, Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**"Estudos Para A Extração de Quitina, Obtenção e Modificação Química de Quitosana Via Reação de Zincke e Preparação de Filmes À Base de Quitosana Para Aplicação Em Embalagens de Alimentos"**

**Fernanda Jorge Gonçalves**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Rossimiriam Pereira de Freitas - Orientadora  
UFMG

Profa. Bárbara Elisabeth Teixeira Costa  
UFAM

Prof. Laurent Frédéric Gil  
UFOP

Prof. Fabiano Vargas Pereira  
UFMG

Profa. Lucienir Pains Duarte  
UFMG

---

Belo Horizonte, 28 de abril de 2022.

Documento assinado eletronicamente por **Rossimiriam Pereira de Freitas, Professora do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucienir Pains Duarte, Professora do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Vargas Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 30/04/2022, às 18:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bárbara Elisabeth Teixeira Costa, Usuário Externo**, em 03/05/2022, às 20:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LAURENT FREDERIC GIL, Usuário Externo**, em 03/05/2022, às 21:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1418740** e o código CRC **2620D581**.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus.

Aos meus pais Cláudia e Fernando, pela dedicação, amor e incentivo sempre.

Aos meus irmãos, Patrícia, Vanessa e Kadu, e toda minha família, pelo apoio e carinho.

Ao meu marido Guilherme, pelo companheirismo, amor e amizade.

À minha orientadora Prof. Dra. Rossimiriam, a quem agradeço imensamente pela orientação, dedicação e por não medir esforços para a construção desse trabalho.

À prof. Dra. Rosemeire, pela disponibilidade e importante contribuição ao longo dessa jornada.

Aos colegas do laboratório, Talita, Lucas, Wallace, Natália, Ruth e Gabriele, e demais colegas do Departamento de Química, pelo companheirismo, convivência e por todo conhecimento compartilhado.

A todos os colaboradores deste trabalho, em especial à professora Jacqueline Takahashi, pela disponibilidade e auxílio nos testes de extração de quitina e à professora Hallen Calado e doutora Luiza De Lazari, pela realização dos testes mecânicos.

À banca examinadora pelo aceite do convite.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPq pela bolsa concedida e financiamento da pesquisa.

## Resumo

A crescente preocupação com o meio ambiente e o interesse dos consumidores por produtos mais sustentáveis e não poluentes impulsionou estudos para a utilização de biopolímeros em diversas áreas. A quitosana tem se destacado devido às suas características de biocompatibilidade, não toxicidade e degradabilidade, além de apresentar propriedades antimicrobianas, que está relacionada à sua estrutura catiônica. O primeiro capítulo desse trabalho descreve os estudos realizados para obtenção de quitina, polissacarídeo encontrado em abundância na natureza e precursor da quitosana, a partir de resíduo de indústria pesqueira brasileira, a casca de camarão rosa, por método biológico utilizando o fungo *Aspergillus niger*. São apresentadas também as tentativas para obtenção de quitosana a partir da desacetilação, pelo método químico, do material extraído da casca de camarão. O segundo capítulo trata da síntese de um derivado inédito de quitosana, **Q1**, contendo um anel piridínico diretamente ligado à unidade monomérica glicosamina da quitosana, a partir da quaternização do grupo amina primária com um sal de Zincke, em uma estratégia inédita na literatura. A caracterização do novo material foi feita utilizando espectroscopia na região do IV, RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido e análise termogravimétrica (TG). Devido à presença de uma carga positiva permanente na estrutura de **Q1**, esse derivado possui potencial aplicação como agente antimicrobiano. Devido à não toxicidade e biodegradabilidade, a quitosana tem sido utilizada como base para a preparação de filmes para embalagens de alimentos, a fim de substituir os polímeros sintéticos que causam danos ao meio ambiente devido à lenta degradação. Assim, no terceiro capítulo desse trabalho, foram obtidos filmes à base de quitosana para aplicação como embalagem e revestimento de alimentos, suas propriedades mecânicas foram analisadas e a capacidade desses filmes em manter a qualidade de frutas foi avaliada. Os resultados mostraram que as propriedades mecânicas dos filmes melhoram com a adição do agente plastificante glicerol. Quando aplicados como revestimento, os filmes contendo cloreto de didecil-dimetilamônio, agente antimicrobiano, foram mais eficazes para estender a vida útil de morangos e bananas. No entanto, quando aplicados como filmes nas embalagens, observou-se que a adição dos agentes plastificante e antimicrobiano aumentou a absorção de água pelo filme, o que prejudicou a qualidade do fruto embalado.

**Palavras-chave:** Quitina, Quitosana, Reação de Zincke, Filmes biodegradáveis.

## Abstract

The growing concern for the environment increased the look for biodegradable polymers-based that is eco-friendly and can be applied in many areas. Chitosan stands out due to its properties, such as biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, and antimicrobial activity, which is attributed to its polycationic nature. The first chapter of this work describes the studies carried out regarding the acquisition of chitin from the residue of the Brazilian fishing industry, the pink shrimp shell, through biological method using the fungus *Aspergillus niger*. The attempts made to obtain chitosan from the chemical deacetylation of the material extracted from the shrimp shell were also described. In chapter 2, an unprecedented chitosan derivative, **Q1**, containing a pyridine ring directly linked to the chitosan monomeric glycosamine unit was synthesized from the quaternization of the primary amino group with a Zincke salt in a never-before-seen strategy in literature. The characterization of the new material was carried out through IR spectroscopy, <sup>13</sup>C solid-state NMR and thermogravimetric analysis (TGA). Due to the permanent positive charge on nitrogen atoms in the **Q1** structure, this derivative has potential application as antimicrobial agent. Due to its inherent properties, such as biocompatibility, biodegradability, chitosan has been explored for the preparation of films for use as food packaging to substitute for the packaging petrochemical-based that causes environmental damage. Thus, in the third chapter of this work, chitosan-based films were obtained for application as food packaging and coating, their mechanical properties were analyzed and the ability of these films to maintain fruit quality was evaluated. The results showed that the mechanical properties of the films improve with the addition of the glycerol plasticizer. When applied as a coating, films containing didecyl-dimethylammonium chloride, an antimicrobial agent, were more effective in extending the shelf life of strawberries and bananas. However, when applied as films in packaging, was observed that the addition of plasticizer and antimicrobial agents increased water absorption by the film, which affected the quality of packaged strawberries.

**Keywords:** Chitin, Chitosan, Zincke reaction, Biodegradable films.



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Teores de quitina encontrados em diferentes espécies de crustáceos.....	24
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre os métodos químico e biológico de extração da quitina.....	26
<b>Tabela 3.</b> Exemplos de micro-organismos usados para extração de quitina pelo método biológico.....	28
<b>Tabela 4.</b> Valores de teor de desproteínização encontrado em outros estudos, utilizando o método biológico para extração da quitina.....	41
<b>Tabela 5.</b> Estudos de desacetilação para os diferentes materiais obtidos na extração da quitina.....	42
<b>Tabela 6.</b> Condições usadas nos meios de fermentação e massa dos materiais obtidos em cada experimento.....	43
<b>Tabela 7.</b> Exemplos de modificações químicas da quitosana, estrutura e aplicação dos derivados sintetizados.....	54
<b>Tabela 8.</b> Exemplos de derivados quaternizados de quitosana.....	58
<b>Tabela 9.</b> Condições de reação utilizadas para a síntese de <b>Q1</b> usando a reação de Zincke..	70
<b>Tabela 10.</b> Natureza e estrutura química, tempo de degradação e aplicações dos principais plásticos comercializados mundialmente.....	81
<b>Tabela 11.</b> Exemplos de embalagens ativas e inteligentes, suas principais aplicações e os reagentes ou indicadores usados em suas preparações.....	82
<b>Tabela 12.</b> Principais características de um bom filme para embalagens e as vantagens dos filmes formados por biopolímeros.....	84
<b>Tabela 13.</b> Valores de concentração inibitória mínima (CIM) para quitosana contra diferentes fungos e bactérias.....	88
<b>Tabela 14.</b> Propriedades mecânicas de filmes à base de quitosana contendo diferentes plastificantes.....	90
<b>Tabela 15.</b> Composição e propriedades de filmes à base de quitosana com potencial aplicação como embalagens e revestimento de alimentos.....	93
<b>Tabela 16.</b> Exemplos de frutas climatéricas e não-climatéricas.....	96
<b>Tabela 17.</b> Composição dos filmes à base de quitosana preparados nesse estudo.....	106

<b>Tabela 18.</b> Propriedades mecânicas dos filmes à base de quitosana .....	109
<b>Tabela 19.</b> Propriedades mecânicas de filmes de quitosana pura.....	110
<b>Tabela 20.</b> Valores de porcentagem de solubilidade dos filmes à base de quitosana.....	113
<b>Tabela 21.</b> Porcentagem de perda de peso dos morangos armazenados por cinco dias .....	120

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos polissacarídeos (a) quitina e (b) quitosana.....	20
<b>Figura 2.</b> Etapas de extração da quitina e quitosana pelos métodos químico e biológico.....	30
<b>Figura 3.</b> Espectro de FTIR do material extraído da casca de camarão pelo método biológico usando o fungo <i>A. niger</i> .....	38
<b>Figura 4.</b> Espectro de FTIR de quitina obtido no estudo de Negrea e colaboradores .....	39
<b>Figura 5.</b> Espectro de FTIR dos materiais obtidos nas diferentes condições de fermentação com <i>A. niger</i> .....	45
<b>Figura 6.</b> Espectro de FTIR de quitina comercial.....	46
<b>Figura 7.</b> Espectros de FTIR dos materiais obtidos pelas condições de fermentação 6, 7 e 8 (Tabela 6 – Entradas 6, 7 e 8, respectivamente).....	47
<b>Figura 8.</b> Exemplo de reação de N-alquilação da quitosana a partir da síntese da base de Schiff e posterior redução com $\text{NaBH}_4^{68}$ .....	52
<b>Figura 9.</b> Curva potenciométrica obtida na titulação da quitosana com solução de NaOH 0,1 mol/L .....	67
<b>Figura 10.</b> Reação de Zincke entre quitosana e sal de Zincke em diferentes tempos de reação: (a) tempo inicial; (b) após 30 min e (c) após 48 horas de reação .....	72
<b>Figura 11.</b> Espectros de FTIR da quitosana comercial e de <b>Q1</b> .....	73
<b>Figura 12.</b> Espectros RMN de $^{13}\text{C}$ em estado sólido da quitosana e de <b>Q1</b> .....	74
<b>Figura 13.</b> Curvas termogravimétricas (a) TG e (b) primeira derivada de TG (DTG) para a decomposição térmica da quitosana e <b>Q1</b> .....	76
<b>Figura 14.</b> Gráfico mostrando a participação de diferentes tipos de plástico no mercado global no ano de 2016.....	80
<b>Figura 15.</b> Principais técnicas usadas para formação de filmes de quitosana para embalagem e revestimento de alimentos, (i) técnica <i>casting</i> ; (ii) revestimento por <i>spray</i> e (iii) revestimento por imersão .....	86
<b>Figura 16.</b> Imagens de filmes de quitosana (a) formados por quitosana pura; (b) formado por quitosana e glicerol (30 % m/m).....	91

<b>Figura 17.</b> Embalagens à base de (a) filmes de quitosana pura e (b) filmes de quitosana contendo glicerol e ácido cítrico.....	94
<b>Figura 18.</b> Morangos após armazenamento por 1, 3 e 5 dias (a) sem o revestimento com filme, (b) com revestimento de HTMC 1 % m/v, (c) com revestimento de HTMC 2 % m/v, (d) com revestimento de HTMC 3 % m/v.....	95
<b>Figura 19.</b> Estruturas dos sais de amônio quaternários CBZ, CDDA, Q1 e do ácido salicílico (AS) .....	104
<b>Figura 20.</b> Preparação dos filmes de quitosana pelo método <i>casting</i> . (a) Solução filmogênica de quitosana (1 % m/v) em ácido acético (1 % v/v), (b) transferência da solução para a placa de Petri, (c) secagem e evaporação do solvente, (d) retirada do filme do suporte, e (e) filme de quitosana.....	106
<b>Figura 21.</b> (a) Folha de filme usada para a obtenção dos corpos de prova e corpos de prova (b) antes e (c) depois dos ensaios mecânicos. ....	108
<b>Figura 22.</b> Aparência física das bananas revestidas por filmes à base de quitosana e do grupo controle armazenadas à temperatura ambiente, nos dias 0, 3 e 6. ....	115
<b>Figura 23.</b> Características físicas de bananas totalmente revestidas por filmes à base de quitosana e grupo controle, bananas sem revestimento.....	118
<b>Figura 24.</b> Revestimento do morango com filmes à base de quitosana através da (a) imersão na solução filmogênica e (b) secagem do solvente .....	119
<b>Figura 25.</b> Aparência física dos morangos revestidos com filmes à base de quitosana e morangos sem revestimento .....	121
<b>Figura 26.</b> Morangos armazenados em embalagens contendo filmes à base de quitosana e grupo controle .....	123
<b>Figura 27.</b> Fotos dos morangos armazenados no dia 2 (a) na embalagem controle e (b) na embalagem contendo o filme GCDDA 5% .....	124
<b>Figura 28.</b> Morangos em embalagens contendo filmes à base de quitosana e CDDA 5% ...	126
<b>Figura 29.</b> Morangos embalados com filmes à base de quitosana e frutose.....	128

## Lista de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Síntese do derivado quaternizado da quitosana <i>N,N,N</i> -trimetilquitosana.....	56
<b>Esquema 2.</b> Síntese do derivado quaternizado HTMC via (a) reação entre quitosana e epóxido e (b) reação entre quitosana e haleto de alquila.....	57
<b>Esquema 3.</b> Método clássico para alquilação/acilação de piridinas (a) com haletos de alquila ou acila e (b) com haleto de alquila contendo carbono assimétrico .....	60
<b>Esquema 4.</b> Reação de Zincke.....	60
<b>Esquema 5.</b> Síntese do sal de Zincke <b>2</b> a partir de piridina e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.....	62
<b>Esquema 6.</b> Reação de Zincke entre quitosana e sal de Zincke <b>2</b> para síntese de <b>Q1</b> .....	63
<b>Esquema 7.</b> Mecanismo da síntese do sal de Zincke cloreto de 1-(2,4-dinitrofenil)piridínio ( <b>2</b> ) .....	68
<b>Esquema 8.</b> Mecanismo da reação de Zincke entre quitosana e cloreto de 1-(2,4-dinitrofenil)piridínio ( <b>2</b> ) para obtenção de <b>Q1</b> .....	69

## Lista de abreviatura

AS	Ácido salicílico
CBZ	Cloreto de <i>N</i> -alquil-dimetil-benzilamônio
CDDA	Cloreto de didecil-dimetilamônio
CIM	Concentração inibitória mínima
DM	Desmineralização
DP	Desproteíntização
%E	Porcentagem de alongamento
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho
GD	Grau de desacetilação
GM	Ganho de massa
HTMC	<i>N</i> -(2-hidroxi-3-trimetilamônio)propilquitosana
PM	Peso molecular
QACs	Compostos de amônio quaternários
RMN	Ressonância magnética nuclear
TG	Análise termogravimétrica
TMC	<i>N,N,N</i> -trimetilquitosana
T <sub>r</sub>	Ressistência à tração

## Sumário

Introdução geral .....	19
<b>Capítulo I. Extração de quitina via método biológico e estudos para obtenção de quitosana</b> .....	<b>22</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Extração de quitina .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Métodos biológicos para extração da quitina usando micro-organismos .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3 Métodos para obtenção de quitosana .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Objetivos gerais .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Parte experimental .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Extração da quitina de resíduo pesqueiro pelo método biológico.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Planejamento para otimização das condições de fermentação para extração de quitina .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Descoloração.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Estudos para desacetilação da quitina.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6 Caracterização .....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.1 Determinação de proteínas – método de Kjeldahl.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) .....</b>	<b>36</b>
<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Extração da quitina de resíduo pesqueiro por método biológico .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Determinação da porcentagem de desproteinização (% DP) .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Tentativas para desacetilação do material obtido após extração biológica usando <i>A. niger</i> .....</b>	<b>42</b>

4.4	Otimização das condições de fermentação para extração da quitina .....	43
5.	Conclusões .....	48
<b>Capítulo II. Obtenção e caracterização de derivado quaternizado de quitosana via reação de Zincke .....</b>		
<b>49</b>		
1.	Introdução .....	50
1.1	Modificações química da quitosana .....	50
1.2	Derivados quaternizados de quitosana .....	56
1.3	Sais de piridínio .....	59
2.	Objetivos.....	61
2.2	Objetivo geral.....	61
2.3	Objetivos específicos.....	61
3.	Parte experimental .....	62
3.1	Materiais.....	62
3.2	Síntese do sal de piridínio Q1 .....	62
3.3	Caracterização .....	63
3.3.1	Grau de desacetilação (GD) e grupo amino livre da quitosana .....	63
3.3.2	Determinação do ganho de massa (GM).....	64
3.3.3	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) .....	64
3.3.4	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	65
3.3.5	Análise termogravimétrica (TG) .....	65
4.	Resultados e discussão.....	66
4.1	Grau de desacetilação (GD) e grupo amino livre da quitosana comercial .....	66
4.2	Modificação química da quitosana via reação de Zincke, para obtenção do sal de piridínio Q1 .....	67
4.3	Caracterização .....	73
4.3.1	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	73
4.3.2	Ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C (RMN de <sup>13</sup> C).....	74



4.3.3	Análise termogravimétrica (TG)	75
5	Conclusão	77
<b>Capítulo III. Desenvolvimento e caracterização de filmes à base de quitosana</b>		<b>78</b>
1.	Introdução	79
1.1	Embalagens de alimentos	79
1.2	Filmes de quitosana	85
1.3	Propriedades e aplicações de filmes de quitosana na indústria de alimentos	87
1.4	Amadurecimento de frutas	95
2	Objetivos	98
2.1	Objetivos gerais	98
2.2	Objetivos específicos	98
3	Parte experimental	99
3.1	Materiais	99
3.2	Preparação dos filmes	99
3.3	Teste de conservação de frutas pelo método de revestimento	100
3.3.1	Teste com bananas pelo método de imersão	100
3.3.2	Teste com bananas pelo método de revestimento usando pincel	101
3.3.3	Teste com morangos pelo método de imersão	101
3.4	Teste de conservação de morangos embalados com filmes à base de quitosana	101
3.5	Caracterização	102
3.5.1	Espessura do filme	102
3.5.2	Ensaio mecânicos	102
3.5.3	Solubilidade em água	103
3.6	Porcentagem de perda de massa de morangos	103
4	Resultados e discussão	104
4.1	Preparação dos filmes de quitosana	104

<b>4.2 Propriedades mecânicas.....</b>	<b>108</b>
<b>4.3 Solubilidade dos filmes.....</b>	<b>112</b>
<b>4.4 Teste com banana – revestimento por imersão.....</b>	<b>113</b>
<b>4.5 Teste com banana - revestimento com pincel.....</b>	<b>117</b>
<b>4.6 Testes com morango - revestimento por imersão .....</b>	<b>119</b>
<b>4.7 Testes de morango embalados com filmes à base de quitosana .....</b>	<b>122</b>
<b>5 Conclusão .....</b>	<b>129</b>
<b>Conclusões gerais.....</b>	<b>130</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>131</b>

## Introdução geral

A intensa produção e utilização de polímeros sintéticos nas últimas décadas resultou em um sério problema ambiental devido, principalmente, à não degradabilidade desses polímeros. Como consequência, uma ampla gama de materiais naturais e seus derivados vem sendo utilizados para substituir aqueles obtidos a partir da petroquímica, diminuindo, assim, a dependência e os problemas relacionados aos polímeros sintéticos.<sup>1</sup> Dentre os materiais naturais, os polissacarídeos são os mais amplamente empregados.

Os polissacarídeos possuem importantes propriedades como biodegradabilidade, não toxicidade, maior disponibilidade, são obtidos por fontes renováveis abundantes na natureza e, por isso, também apresentam baixo custo.<sup>2</sup> Além dessas propriedades, os polissacarídeos podem ser encontrados com estruturas químicas variadas, as quais podem apresentar grupos funcionais como amino, hidroxila e carboxila, que facilitam sua modificação química.<sup>3</sup> Essas características os tornam uma excelente matriz para diferentes modificações químicas e diversas aplicações.<sup>4</sup>

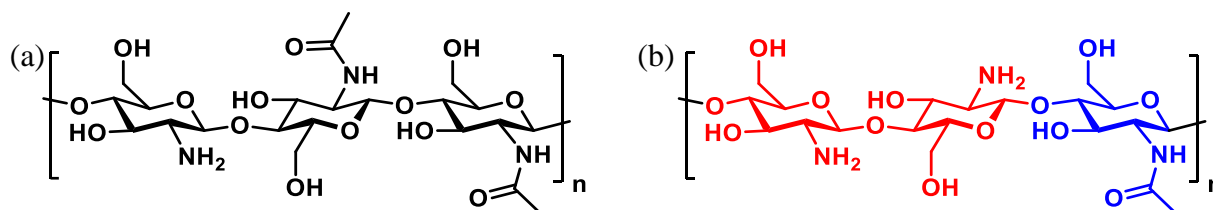
A quitina, Figura 1a, página 20, é o polissacarídeo mais abundante no ecossistema marinho e o segundo mais disponível na natureza depois da celulose.<sup>5, 6</sup> É produzida por diversos organismos e está presente, principalmente, em: paredes celulares de fungos e algas, exoesqueletos de insetos, moluscos e crustáceos.<sup>7</sup> A extração de quitina, a partir de resíduos de frutos do mar, por métodos químicos, utilizando soluções básicas e ácidas, é a mais comumente empregada em escala industrial,<sup>5</sup> embora métodos microbiológicos de extração venham sendo muito estudados nos últimos anos.<sup>8,9</sup>

A desacetilação parcial da quitina dá origem ao seu derivado mais importante, a quitosana, Figura 1b, página 20.<sup>1</sup> A quitosana é um polissacarídeo linear composto por unidades de glicosamina (em vermelho) e *N*-acetil-glicosamina (em azul) unidas por meio de uma ligação glicosídica  $\beta$  (1-4).<sup>10</sup> A relação entre estas duas unidades corresponde ao grau de desacetilação (GD), o qual é utilizado para diferenciar a quitina e a quitosana, de forma que o polissacarídeo chamado de quitosana é obtido quando o GD é superior a 50%.<sup>6, 11</sup>

A maior quantidade de unidades de glicosamina na cadeia polimérica da quitosana faz com que esse polímero tenha propriedades físico-químicas e biológicas características.<sup>10</sup> Essas propriedades estão relacionadas com alguns parâmetros como peso molecular, grau de

desacetilação e distribuição do grupo acetila ao longo da cadeia.<sup>12</sup> O GD é o fator que mais influencia as propriedades químicas como solubilidade, cristalinidade e viscosidade e as propriedades biológicas, por exemplo, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e antioxidante da quitosana.<sup>13</sup>

**Figura 1.** Estrutura química dos polissacarídeos (a) quitina e (b) quitosana



Uma importante propriedade da quitosana e que também a diferencia da quitina, é sua solubilidade em meio ácido. Essa propriedade possibilita sua utilização em diferentes formas como hidrogéis, filmes, fibras e nanopartículas.<sup>6</sup> Além disso, a maior solubilidade deixa a quitosana mais acessível para modificações químicas, o que facilita a síntese de derivados que podem ser usados em diversas áreas como química fina, biotecnologia, medicina, indústria alimentar, entre outras.<sup>14,15</sup>

Por ser biodegradável, biocompatível e não tóxica ao organismo humano, bem como possuir atividade biológica intrínseca, a quitosana tem sido utilizada em aplicações farmacêuticas e biomédicas,<sup>12</sup> como na liberação controlada de fármacos, em implantes de tecidos vivos e em curativos de feridas.<sup>11</sup> Na área de tecnologias ambientais, a quitosana e seus derivados são intensamente estudados como adsorventes de poluentes orgânicos e inorgânicos, como metais pesados e corantes têxteis em efluentes contaminados.<sup>16</sup>

Na agricultura, a quitosana tem sido utilizada para aplicação de fertilizantes no solo, por meio da imobilização e lançamento controlado dos mesmos.<sup>16</sup> Na área da alimentação, a quitosana e seus derivados quimicamente modificados são empregados para a conservação de alimentos, de forma a evitar o uso de conservantes ditos “químicos” e, na biotecnologia, tem sido estudados para a confecção de embalagens biodegradáveis.<sup>17-19</sup>

A crescente utilização da quitosana nas áreas de tratamento de água e farmacêutica de cosméticos é um dos principais fatores que impulsionam o mercado deste biopolímero.<sup>20</sup> Em 2018 o mercado global de quitosana foi avaliado em 5,71 bilhões de dólares e de acordo com a

taxa de crescimento anual composta (CAGR) estima-se um crescimento de 20,8% entre 2019 a 2025.<sup>20</sup> Em relação ao volume produzido espera-se que seja mais de 155 milhões de toneladas de quitina e quitosana até o ano de 2022.<sup>21</sup>

Dessa forma, esse trabalho visa a extração de quitina por um método biológico e ecologicamente favorável, usando o fungo *Aspergillus niger* para extração desse biopolímero a partir de cascas de camarão. Tendo em vista a importância da quitosana, principal derivado da quitina, e seus derivados, esse trabalho também descreve um método inédito de modificação química da quitosana via reação de Zincke para obtenção de um novo derivado quaternizado com potencial propriedades antimicrobianas. Além disso, o desenvolvimento de filmes à base de quitosana para aplicação em embalagens de alimentos e avaliação da capacidade de conservação de frutas revestidas ou embaladas por esses filmes foram estudados nesse trabalho.

**Capítulo I. Extração de quitina via método biológico e estudos para obtenção de quitosana**

## 1. Introdução

Os resíduos da indústria pesqueira são uma importante fonte de compostos de alto valor agregado como proteínas, polissacarídeos, ácidos graxos, peptídeos, carotenóides e minerais.<sup>22</sup> Com o grande consumo de frutos do mar, várias toneladas desses resíduos são produzidos todos os anos e sua não utilização tornou-se um problema ambiental devido, principalmente, ao descarte de compostos com alta demanda biológica e química de oxigênio.<sup>10</sup>

Assim, diferentes técnicas de extração estão sendo utilizadas para a obtenção de biomoléculas a partir de resíduos de frutos do mar, de modo a converter esses resíduos em compostos de alto valor e, conseqüentemente, solucionar os problemas ambientais relacionados ao descarte dos mesmos.<sup>22</sup>

A quitina é um exemplo de polissacarídeo encontrado em resíduos marinhos e que, junto com seu derivado desacetilado, a quitosana, possui interesse comercial devido à possibilidade de aplicação em diversas áreas.<sup>23</sup> De acordo com uma estimativa, cerca de  $10^{13}$  toneladas de quitina são produzidas anualmente na biosfera, grande parte nos oceanos, sendo a produção anual total de quitina em ambientes aquáticos estimada em  $2,8 \times 10^7$  e  $1,3 \times 10^9$  toneladas de quitina por ano para ecossistemas de água doce e marinhos, respectivamente.<sup>24, 25</sup>

Os processos tradicionais de extração de quitina empregam produtos químicos agressivos e temperaturas altas, o que pode prejudicar as propriedades físico-químicas do polímero, além de causar danos ao meio ambiente.<sup>23, 25</sup> Dessa forma, os métodos de extração verde estão ganhando cada vez mais atenção por serem ambientalmente seguros, entretanto, ainda não são utilizados comercialmente.<sup>23, 25</sup>

### 1.1 Extração de quitina

Os resíduos abundantes e renováveis do processamento marinho tem sido explorados comercialmente para a extração de quitina, um polissacarídeo comumente encontrado em exoesqueletos de crustáceos, sendo o processamento de cascas de camarão e caranguejo a principal fonte industrial deste biopolímero.<sup>23,11</sup>

A porcentagem de quitina nos exoesqueletos de crustáceos pode variar de acordo com a espécie e o meio de cultivo e, em geral, os exoesqueletos são constituídos de, aproximadamente,

30-40% de proteínas, 30-50% de carbonato de cálcio e 20-30% de quitina.<sup>26</sup> A Tabela 1 mostra os teores de quitina encontrados em algumas espécies de crustáceos.

**Tabela 1.** Teores de quitina encontrados em diferentes espécies de crustáceos

<b>Crustáceo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Teor de quitina</b>
Lagosta	<i>Palinurus vulgaris</i>	32%
Camarão	<i>Palaemon fabricius</i>	22%
Caranguejo	<i>Maia squinado</i>	16%
	<i>Portunus puber</i>	10%
Lagostim	<i>Astacus fluviatilis</i>	36%

Fonte: Adaptado de Tolaimate, 2003.<sup>27</sup>

A extração da quitina a partir de resíduos pesqueiros envolve, geralmente, três etapas: i) desproteínização; ii) desmineralização; e iii) descoloração; que podem ser realizadas por métodos químicos e/ou biológicos.<sup>7</sup> O método químico, chamado de método convencional, utiliza soluções de bases e ácidos fortes para a extração e tem sido tradicionalmente empregado na obtenção de quitina em escala industrial.<sup>16</sup>

A etapa de desproteínização ocorre em meio básico, em que são utilizadas soluções de NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub> e KOH, e na desmineralização são usadas soluções diluídas de ácidos, como HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCOOH.<sup>11</sup> E, por fim, a remoção de pigmentos pode ser feita com a utilização de um solvente orgânico, como acetona e etanol, ou por meio de um tratamento oxidativo, usando KMnO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaOCl.<sup>28</sup>

As desvantagens relacionadas ao método de extração convencional, como produção de águas residuais contendo produtos químicos, alteração das propriedades físico-químicas da quitina e aumento do custo de purificação, tem estimulado o interesse em técnicas de extração verde.<sup>23</sup> Dessa forma, várias técnicas mais seguras, adequadas ambientalmente e eficientes tem sido relatadas como alternativas na extração de quitina.<sup>22</sup>



Dentre essas técnicas, encontram-se: extração assistida por reator micro-ondas,<sup>29</sup> assistida por ultrassom,<sup>30</sup> utilizando água subcrítica,<sup>31</sup> e, principalmente, extração por processos biológicos, como os fermentativos, pelo tratamento com micro-organismos, e enzimáticos, utilizando extratos brutos e/ou enzimas isoladas.<sup>32</sup>

No processo biológico, a fonte de carbono, o tipo de micro-organismo, o tempo e o tipo de fermentação (autofermentação, fermentação em um único passo, fermentações sucessivas e co-fermentação) influenciam nas porcentagens de desproteínização e desmineralização.<sup>33</sup>

Quando a extração de quitina é realizada pelo método químico, a ordem das etapas de desproteínização e desmineralização não influencia, significativamente, a qualidade e o rendimento da quitina final.<sup>11</sup> Na extração pelo método biológico a sequência das etapas pode ou não influenciar a qualidade da quitina. Quando a fermentação microbiana é empregada, a desmineralização e desproteínização ocorrem, geralmente, de forma simultânea e, por isso, a ordem das etapas não tem importância.<sup>11</sup> Entretanto, na extração enzimática a etapa de desmineralização é realizada, geralmente, em primeiro lugar, pois os minerais presentes nas cascas dos crustáceos podem dificultar a acessibilidade das enzimas proteases e, dessa forma, afetar a eficiência da etapa de desproteínização.<sup>11</sup>

A qualidade e as características físico-químicas da quitina como massa molecular e grau de acetilação podem variar de acordo com a metodologia utilizada em sua extração.<sup>28</sup> A utilização de soluções muito concentradas de NaOH ou altas temperaturas na etapa de desproteínização podem causar desacetilação e despolimerização indesejáveis da quitina. Além disso, o tratamento com ácidos fortes pode causar hidrólise e desacetilação do polímero.<sup>28</sup> No entanto, esses problemas são menos comuns ao utilizar o método biológico, que é capaz de preservar a estrutura polimérica da quitina.<sup>11</sup> A Tabela 2, página 26, mostra as principais vantagens e desvantagens inerentes aos métodos químico e biológico.

**Tabela 2.** Comparação entre os métodos químico e biológico de extração da quitina

<b>Método</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Químico</b>	Desproteínização: tratamento básico, usando NaOH ou KOH.  Desmineralização: tratamento ácido, usando HCl, HNO <sub>3</sub> ou HCOOH.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capaz de remover completamente os sais orgânicos;</li> <li>- Utilizado em escala industrial.</li> <li>- Tempo curto de processamento;</li> <li>- Alta porcentagem de desmineralização;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ambientalmente inadequado;</li> <li>- As características do produto variam com as condições de reações utilizadas;</li> <li>- Podem ocorrer reações de despolimerização e desacetilação da quitina.</li> </ul>
<b>Biológico</b>	Desproteínização: tratamento com proteases secretadas no meio fermentativo.  Desmineralização: tratamento com ácido lático produzido por bactérias.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ambientalmente correto;</li> <li>- Produto com alta qualidade;</li> <li>- Método com boa reprodutibilidade.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Longo tempo de processamento;</li> <li>- Atualmente limitado à escala laboratorial.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Knidri, 2018.<sup>10</sup>

## 1.2 Métodos biológicos para extração da quitina usando micro-organismos

Como alternativa ao processo químico, a utilização de micro-organismos capazes de realizar desmineralização e desproteínização de resíduos de crustáceos tem sido avaliada para a extração de quitina.<sup>23</sup> Bactérias ácido lácticas, que produzem ácidos orgânicos (lático e acético) *in situ* durante o processo de fermentação, e bactérias produtoras de enzimas proteases tem sido estudadas para as etapas de desmineralização e desproteínização, respectivamente.<sup>34</sup>

As bactérias ácido lácticas mais usadas são as cepas *Lactobacillus sp*, especialmente, *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. helveticus*.<sup>35, 36</sup> No meio de fermentação, o ácido lático é obtido

pela conversão da glicose e reage com carbonato de cálcio, produzindo lactato de cálcio.<sup>11, 35</sup> Devido à solubilidade do lactato, a desmineralização ocorre com a separação da quitina, que fica na fração sólida, do mineral, solúvel na fração líquida.<sup>35</sup>

As bactérias produtoras de enzimas proteases, tais como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp* e *Serratia marcescens*, são as cepas mais frequentemente utilizadas na produção de quitina pelo método biológico.<sup>13, 37, 38</sup> Isso porque as enzimas proteolíticas catalisam a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e algumas proteases, por exemplo a alcalase, a pepsina e a tripsina, são capazes de hidrolisar e remover proteínas das cascas de camarão, atuando, assim, no processo de desproteínização.<sup>11</sup>

Além das bactérias, a utilização do fungo *Aspergillus niger*, produtor de enzimas proteolíticas extracelulares, para extração de quitina a partir de cascas de camarão foi estudada por Teng *et al.*,<sup>33</sup> e apresentou ótimos resultados, com o teor de desproteínização sendo maior que 95%. De acordo com os autores, as enzimas proteolíticas liberadas pelo fungo *A. niger* são capazes de desproteínizar as cascas de camarão, liberando proteínas hidrolisadas no meio. Estas proteínas são utilizadas como fonte de nitrogênio para o crescimento do fungo, o que leva à diminuição do pH do meio de fermentação e, conseqüentemente, favorece a etapa de desmineralização.<sup>33</sup>

A Tabela 3, página 28, mostra exemplos de micro-organismos usados para extração de quitina, bem como as porcentagens de desproteínização (% DP) e desmineralização (% DM) obtidos.

**Tabela 3.** Exemplos de micro-organismos usados para extração de quitina pelo método biológico

Fonte de quitina	Micro-organismo	% DP	% DM	Ref.
Camarão	<i>Lactobacillus plantarum</i>	91	80	Pacheco <i>et al.</i> <sup>36</sup>
Camarão	<i>Pediococcus acidolactici</i>	97,9	72,5	Bhaskar <i>et al.</i> <sup>8</sup>
Camarão	<i>Bacillus cereus</i>	97,1	95	Sorokulova <i>et al.</i> <sup>37</sup>
Camarão	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	92,8	92	Sorokulova <i>et al.</i> <sup>37</sup>
Caranguejo	<i>Serratia marcescens</i>	47	84	Jo <i>et al.</i> <sup>38</sup>
Caranguejo	<i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Serratia marcescens</i>	52	97	Jung <i>et al.</i> <sup>34</sup>
Camarão	<i>Lactobacillus brevis</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>	96	66	Aranday-Garcia <i>et al.</i> <sup>39</sup>
Camarão	<i>Aspergillus niger</i>	97	ND	Teng, <i>et al.</i> <sup>33</sup>

ND = não determinado

### 1.3 Métodos para obtenção de quitosana

A quitosana pode ser encontrada naturalmente na parede celular de alguns fungos, como *Mucorales strains*,<sup>40</sup> mas a principal forma para sua obtenção ocorre, como citado anteriormente, pela desacetilação da quitina, por métodos químicos ou biológicos.<sup>10</sup> Assim como na extração da quitina, o método químico é o mais empregado no nível industrial, devido ao baixo custo e maior eficiência na produção em larga escala.<sup>11</sup>

A desacetilação pelo método químico pode ser feita utilizando tratamento ácido ou básico, entretanto, as ligações glicosídicas presentes na quitina são altamente sensíveis ao meio ácido e, por isso, a desacetilação alcalina é a mais frequentemente empregada.<sup>11</sup> Os parâmetros usados no processo de desacetilação podem interferir nas características físico-químicas da quitosana, como grau de desacetilação, viscosidade, distribuição dos grupos acetila ao longo da

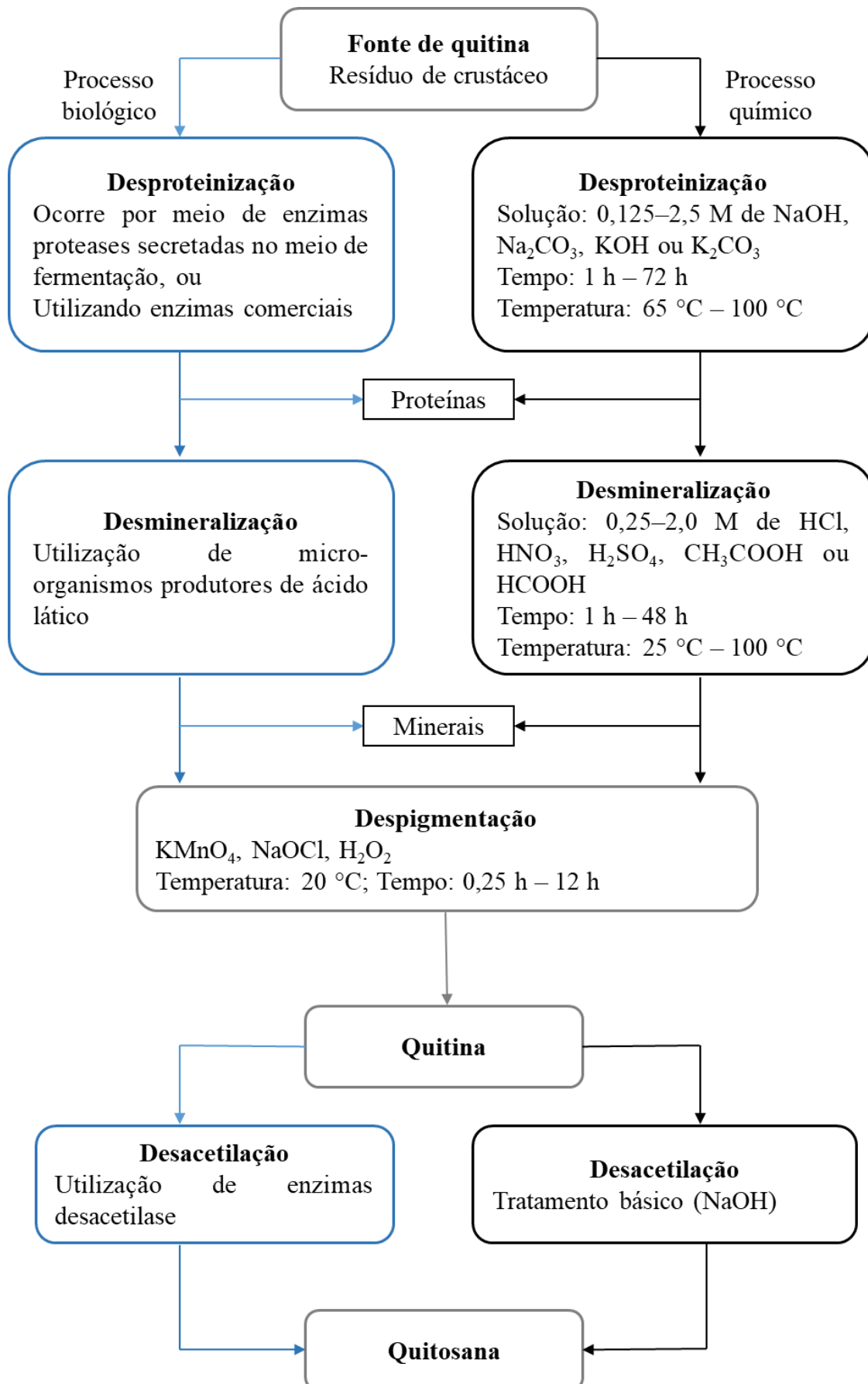
cadeia polimérica e peso molecular.<sup>11</sup> Dentre os diversos procedimentos já testados, o uso de solução concentrada de NaOH em meio aquoso ou alcoólico e a altas temperaturas é o mais comum para obtenção da quitosana.<sup>10</sup>

O uso de soluções alcalinas fortes e o consumo de energia necessários no processo químico se tornaram uma grande preocupação econômica e ambiental,<sup>11</sup> e, como alternativa para superar esses problemas, os métodos enzimáticos tem atraído o interesse de pesquisadores por serem ecologicamente corretos.<sup>10</sup>

A quitina desacetilase é uma enzima produzida por diversos insetos e fungos, como *Muco rouxxi*, *Absidia coerulea* e *Aspergillus nidulans*. É altamente específica para polímeros formados por *N*-acetil-glicosamina, unidos por ligações do tipo  $\beta$ -(1-4), e atua catalisando a hidrólise de ligações *N*-acetamida. Dessa forma, esta enzima tem sido utilizada na conversão de quitina em quitosana, especialmente para obtenção de oligômeros de quitosana.<sup>11</sup>

A desacetilação pelo método enzimático ocorre por um processo controlado e não degradável, entretanto, necessita de um longo tempo e ainda é limitado a estudos em escala laboratorial.<sup>10</sup> A Figura 2, página 30, apresenta um esquema de todas as etapas envolvidas na obtenção da quitina e da quitosana, a partir de resíduos de crustáceos, pelos métodos químico e biológico.

**Figura 2.** Etapas de extração da quitina e quitosana pelos métodos químico e biológico



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Devido às características e à gama de aplicações da quitosana, aliada ao interesse de se obter esse biopolímero a partir de novos processos ecologicamente favoráveis e que possam ser utilizados em escala industrial, o trabalho descrito nesse capítulo teve como objetivo a obtenção do biopolímero quitina por um método de química verde. Para tanto, processos de fermentação utilizando micro-organismo foram estudados para a extração de quitina a partir de resíduos da indústria pesqueira.

### 2.2 Objetivos específicos

- Extração da quitina a partir de resíduos da indústria pesqueira, casca de camarão, pelo método biológico usando o fungo *Aspergillus niger*;
- Otimização das condições de extração de quitina pelo o fungo *A. niger*;
- Caracterização do material obtido na extração biológica por FTIR e cálculo de porcentagem de proteínas;
- Estudos para obtenção de quitosana a partir da desacetilação da quitina pelo método químico, usando tratamento com solução básica de NaOH.

### 3. Parte experimental

#### 3.1 Materiais

Sulfato de potássio (Anidrol), sulfato de cobre (Synth), óxido de selênio (Oakwood Chemical), sulfato de magnésio heptahidratado (Synth), cloreto de potássio (Synth), fosfato de potássio (Synth), sulfato de ferro (II) heptahidratado (Synth), sulfato de zinco heptahidratado (Fmaia), hipoclorito de sódio, glicose (Neon), ácido sulfúrico (Química Moderna), hidróxido de sódio, ácido bórico (Quimex). As cascas de camarão da espécie *Penaeus brasiliensis* utilizadas no processo de extração da quitina foram fornecidas pela loja Cia do Camarão, Belo Horizonte.

#### 3.2 Extração da quitina de resíduo pesqueiro pelo método biológico

Cascas de camarão da espécie *Penaeus brasiliensis*, conhecido como camarão rosa, fornecidas pela loja Cia do Camarão – Belo Horizonte, foram utilizadas para a extração de quitina. Para tanto, as cascas foram lavadas em água corrente e separadas dos demais resíduos, como vísceras e outras partes indesejáveis; em seguida, as cascas foram secas a temperatura ambiente por 48 horas. As cascas secas foram, então, trituradas utilizando um processador doméstico e separadas de acordo com seus diâmetros, para tanto, foram utilizadas peneiras granulométricas de 0,240 mm, 0,150 mm e 0,075 mm de abertura de malha.

O tratamento da casca de camarão foi feito de acordo com o método descrito por Teng *et al.*,<sup>33</sup> com algumas alterações, o qual utilizou fermentação fúngica por via aeróbica para os processos de desproteinização e desmineralização da casca do camarão. O fungo da espécie *Aspergillus niger*, obtido da coleção pertencente ao Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios – sob coordenação da Profa. Jacqueline Takahashi, Departamento de Química da UFMG, foi usado no processo fermentativo.

A repicagem do fungo foi feita em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose, os quais foram transferidos para geladeira, onde permaneceram armazenados à temperatura de 4 °C até o momento de sua utilização.



Para o meio de cultura utilizou-se uma solução de minerais, a qual foi preparada misturando  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,52 g/L),  $\text{KCl}$  (0,52 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,52 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L) e  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L), e, por fim, o pH da solução foi ajustado para 6,5 usando solução de  $\text{NaOH}$  1 mol/L.

Em um Erlenmeyer de 500,0 mL adicionaram-se 200,0 mL de água destilada, 40,0  $\mu\text{L}$  da solução de minerais e 2 g de glicose. Em seguida, o Erlenmeyer foi esterilizado em autoclave vertical (marca Phoenix) por 15 minutos. Uma alíquota de 10,0 mL de água destilada, previamente esterilizada, foi transferida para um tubo de ensaio contendo o fungo *A. niger* crescido em ágar batata dextrose. Com uma alça de platina, flambada em bico de Bunsen, foi feita a raspagem da superfície do ágar, a fim de liberar os esporos fúngicos e, em seguida, 1,0 mL da suspensão de esporos foi transferida em condições assépticas para o frasco de Erlenmeyer.

O Erlenmeyer foi colocado em uma mesa agitadora com agitação de 120 rpm, à temperatura ambiente por 7 dias. Após o crescimento do fungo, observado visualmente, 1,2 g da casca de camarão, diâmetro menor que 0,075 mm, foram adicionados ao Erlenmeyer e deixou-se agitando por mais 5 dias, à temperatura ambiente e rotação de 120 rpm. Ao término da fermentação as amostras foram filtradas com o auxílio de um sistema a vácuo, usando papel de filtro quantitativo. O fungo ficou retido no papel de filtro e o fino material sólido obtido na fermentação passou pelo papel, ficando suspenso na fase líquida. O material fúngico retido no papel foi lavado com água destilada (3 x 30 mL). A fase líquida foi, então, liofilizada (liofilizador Liobras, modelo L108) e obteve-se 1,002 g do material após o processo fermentativo.

A porcentagem de desproteínização do material obtido foi calculada pela diferença entre o teor de nitrogênio contido na casca de camarão usado como material de partida e no material obtido após fermentação com o fungo, pelo método de Kjeldahl. Além disso, o material obtido foi analisado usando a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

### 3.3 Planejamento para otimização das condições de fermentação para extração de quitina

Um estudo de otimização das condições de fermentação foi realizado a fim de avaliar a influência do meio de fermentação no crescimento do fungo *A. niger* e na obtenção da quitina extraída dos resíduos de camarão. Para tanto, o meio de cultura foi preparado usando diferentes concentrações de glicose (1 e 5 g) e o pH foi ajustado em diferentes valores (2,0 e 6,0), usando soluções de NaOH (1 mol/L) e HCl (1mo/L). Além disso, a adição das cascas de camarão trituradas ao meio de cultura foi feita em dias diferentes, após 3 e 7 dias de fermentação.

Em um Erlenmeyer de 500,0 mL adicionaram-se 200,0 mL de água destilada, 40,0 µL da solução de minerais e glicose (1 e 5 g). Em seguida, o Erlenmeyer foi esterilizado em autoclave vertical (marca Phoenix) por 15 minutos. Uma alíquota de 10,0 mL de água destilada, previamente esterilizada, foi transferida para um tubo de ensaio contendo o fungo *A. niger* crescido em ágar batata dextrose. Com uma alça de platina, flambada em bico de Bunsen, foi feita a raspagem da superfície do ágar, a fim de liberar os esporos fúngicos e, em seguida, 1,0 mL da suspensão de esporos foi transferida em condições assépticas para o frasco de Erlenmeyer.

O Erlenmeyer foi colocado em uma mesa agitadora com agitação de 120 rpm, à temperatura ambiente para o crescimento do fungo. 1,2 g da casca de camarão, diâmetro menor que 0,075 mm, foram adicionados ao Erlenmeyer, após 3 ou 7 dias. Os meios de cultura contendo as cascas ficaram em agitação por 5 dias, à temperatura ambiente e rotação de 120 rpm. Ao término da fermentação as amostras foram filtradas com o auxílio de um sistema a vácuo, e o material obtido na extração foi separado do fungo e da fase líquida. Nesse caso, o material ficou retido no papel de filtro.

Após a secagem, os materiais obtidos na extração foram pesados e caracterizados através da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

### 3.4 Descoloração

O processo de descoloração do material obtido na fermentação foi feito de acordo com o método descrito por Ocloo *et al.*<sup>44</sup> Este processo se divide em duas etapas sendo que na primeira 500 mg do material foi colocado em um balão de fundo redondo, no qual adicionaram-se 10,0 mL de acetona, deixando-se a mistura sob agitação magnética por 10 minutos, a temperatura ambiente. Após este tempo, a mistura foi filtrada a vácuo e o sólido foi seco em estufa a 70 °C por 2 horas. Depois de seco, o material foi colocado, novamente, em um balão de fundo redondo, no qual adicionou-se solução de NaOCl 0,315 % v/v, com uma razão sólido/líquido igual a 1:10 (w/v). A mistura ficou sob agitação por 5 minutos, a temperatura ambiente. Por fim, o material foi filtrado à vácuo e seco em estufa (70 °C, 2 horas).

### 3.5 Estudos para desacetilação da quitina

A desacetilação da quitina foi feita pelo método químico convencionalmente empregado, o qual utiliza solução básica e aquecimento.<sup>11</sup> O material extraído da casca de camarão, foi adicionado a um balão contendo solução de NaOH 50 %, com proporção de sólido/líquido igual a 1:15. A mistura ficou sob agitação magnética por 5 horas, a 100 °C. Ao fim da reação, a mistura foi filtrada à vácuo, o sólido foi lavado com água quente por 5 vezes (5 x 50 mL), e com acetona (50 mL). Após as lavagens, o material foi seco em estufa a 70 °C por 2 horas.

### 3.6 Caracterização

#### 3.6.1 Determinação de proteínas – método de Kjeldahl

A determinação do teor de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl clássico e realizada no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Para tanto, 0,25 g de cada amostra e 0,3 g de mistura catalítica, composta por K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10,0 g), CuSO<sub>4</sub> (1,0 g) e SeO (1,0 g), foram pesados em papel de seda (6 cm x 6 cm). Os papéis contendo os reagentes foram colocados em tubos de vidros, aos quais foram adicionados 5,0

mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados em um bloco digestor de proteínas (Tecnal, TE 040/25), e a digestão ocorreu a 350 °C, por 12 horas.

Após a digestão, a destilação foi feita utilizando um destilador de nitrogênio (Tecnal, TE 0363). Os tubos contendo as amostras digeridas foram acoplados no destilador e, em seguida, 25,0 mL de solução de NaOH 40% foram adicionados aos tubos, dando início à destilação. Um Erlenmeyer de 125,0 mL, contendo 10,0 mL de solução de ácido bórico 2% e indicador vermelho de metila, foi acoplado no destilador e nele foi coletada a amônia despreendida no processo de destilação. Por fim, a solução contida no Erlenmeyer é titulada com ácido clorídrico 0,1 mol/L, e os teores de nitrogênio e proteínas em cada amostra foram calculados pelas Equações 1<sup>41</sup> e 2<sup>42</sup>, respectivamente:

$$T (\%) = \frac{FC_{HCl} \times V_{HCl} \times 0,14}{m_{amostra}} \quad (1)$$

$$P (\%) = T(\%) \times 6,25 \quad (2)$$

Em que,  $T$  é o teor de nitrogênio em porcentagem;  $FC_{HCl}$  é o fator de conversão do ácido clorídrico;  $V_{HCl}$  (mL) é o volume do ácido clorídrico gasto na titulação;  $m_{amostra}$  (mg) é a massa da amostra;  $P$  é o teor de proteína em porcentagem e o valor 6,25 corresponde ao fator de conversão de nitrogênio para proteína em produtos marinhos.<sup>43</sup>

### 3.6.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram registrados no espectrômetro Shimadzu IR-408 (ICEX-DQ, UFMG, Brasil). As amostras foram secas em estufa a 70 °C por 1 hora, em seguida 1,0 mg de cada material foi misturado com 100,0 mg de KBr, e prensados para a preparação da pastilha. As análises foram feitas na faixa de números de ondas entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras por amostra.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Extração da quitina de resíduo pesqueiro por método biológico

Considerando as vantagens de utilização do fungo *A. niger*, como discutido na introdução desse capítulo, e a disponibilidade de cepas do mesmo, decidiu-se utilizá-lo no primeiro experimento de extração de quitina, a fim de otimizar as condições do processo fermentativo. O primeiro experimento foi feito de acordo com o método descrito por Teng *et al.*<sup>33</sup>

No processo fermentativo foram usadas as cascas de camarão previamente lavadas, secas e trituradas, sem passar por nenhum pré-tratamento. De acordo com o estudo de Teng *et al.*,<sup>33</sup> o crescimento do fungo *A. niger* é melhor ao utilizar cascas sem tratamento que cascas previamente desmineralizadas. Isto pode ser explicado pela presença de nutrientes e minerais, importantes para o crescimento do fungo, nas cascas de camarão, mas que são removidos quando esta casca passa pelo processo de desmineralização.

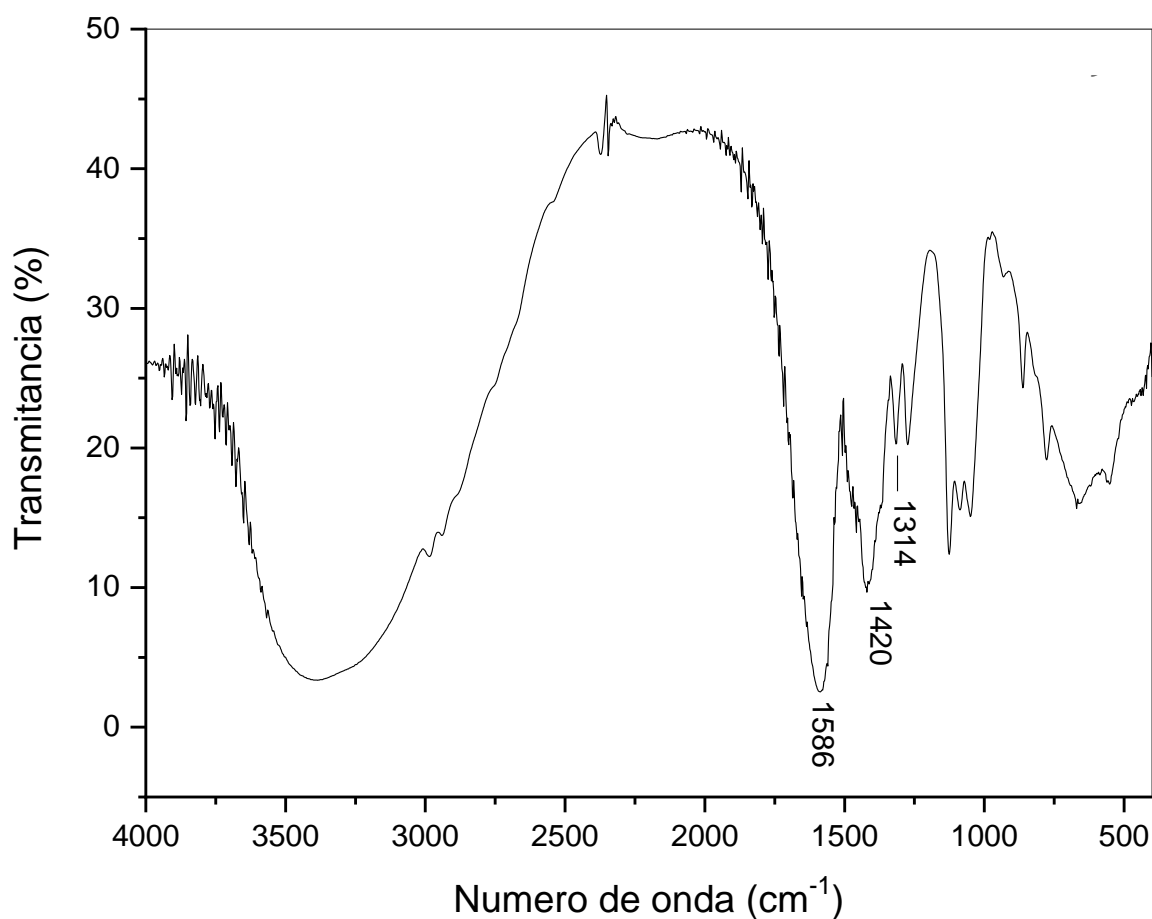
O fungo foi cultivado em um meio contendo glicose, fonte de carbono, e solução de minerais e, após 7 dias de cultivo, foi possível perceber visualmente o crescimento do fungo, o qual possui coloração acinzentada, e nenhum sinal de contaminação por outros microorganismos. Dessa forma, a casca de camarão (1,33 g) foi adicionada no meio e após o tempo de fermentação (página 33) obteve-se 1,002 g de material extraído da casca de camarão, o qual possui coloração amarelada. Por ser o primeiro experimento, optou-se por se fazer apenas um estudo qualitativo e, por isso, não foi feita a contagem de esporos do fungo antes de se adicionar a casca de camarão. Entretanto, aumentou-se o tempo de crescimento do fungo em três dias, em relação ao artigo de referência, a fim de garantir seu crescimento. O tempo de contato entre o fungo e as cascas de camarão também foi maior, neste estudo foram utilizados 5 dias e no artigo de referência foram utilizados apenas 4 dias.

A Figura 3, página 38, mostra o espectro de FTIR do material extraído da casca de camarão. Neste espectro é possível observar bandas características da cadeia polimérica da quitina, sendo elas: banda larga na região entre 3500 - 3300  $\text{cm}^{-1}$ , associada aos estiramentos característicos dos grupos O-H e N-H; em 1586  $\text{cm}^{-1}$ , banda referente à deformação angular da ligação N-H de amida; em 1420  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a deformação assimétrica de  $\text{CH}_3$  do grupo *N*-acetil; em 1314  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao alongamento vibracional da ligação C-N. Devido ao carácter

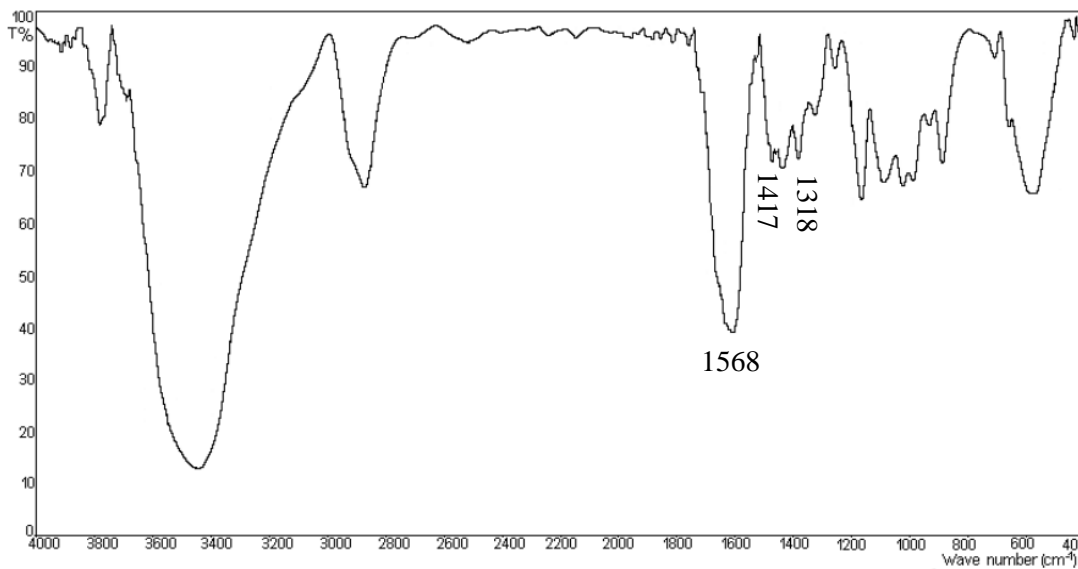
macromolecular e às numerosas ligações de hidrogênio intermoleculares na quitina, que ocorrem mesmo quando este polímero se encontra em estado sólido, os espectros geralmente possuem bandas alargadas.<sup>45</sup>

Negrea e colaboradores estudaram os espectros de FTIR de diversas amostras de quitina e quitosana e, ao comparar o espectro da quitina apresentado no estudo destes autores (Figura 4, página 39),<sup>45</sup> é possível perceber a semelhança com o espectro do material obtido após a extração com o *Aspergillus niger* no estudo aqui apresentado.

**Figura 3.** Espectro de FTIR do material extraído da casca de camarão pelo método biológico usando o fungo *A. niger*



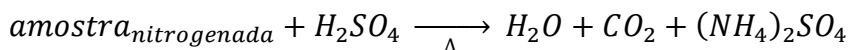
**Figura 4.** Espectro de FTIR de quitina obtido no estudo de Negrea e colaboradores



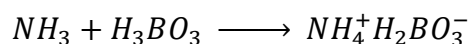
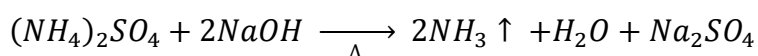
Fonte: Negrea, 2015.<sup>45</sup>

#### 4.2 Determinação da porcentagem de desproteínização (% DP)

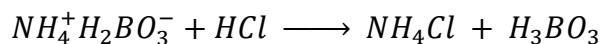
Os teores de proteína encontrados na casca de camarão usada como material de partida e na quitina extraída após tratamento com o fungo *A. niger* foram determinados pelo método de Kjeldahl. Na primeira etapa deste método ocorre a digestão da amostra em  $H_2SO_4$  concentrado, cujo princípio é a redução e conversão do nitrogênio em sulfato de amônio, de acordo com a reação abaixo:



Após a conversão do nitrogênio em sulfato de amônio, a amostra reage com solução concentrada de NaOH, em aquecimento, liberando amônia que é separada da mistura por destilação. Ao ser destilada, a amônia é absorvida pelo ácido bórico, formando borato de amônio, como mostram as reações abaixo:



A etapa final consiste na titulação do borato de amônio, formado na etapa anterior, com ácido clorídrico, previamente padronizado, utilizando indicador misto de verde de bromocresol e alaranjado de metila para determinar o ponto de viragem, de acordo com a reação:



O teor de nitrogênio e proteína nas amostras foram calculados usando as Equações 1 e 2 (página 36), respectivamente. A porcentagem de desproteínização da quitina obtida na extração foi calculada pela diferença entre as porcentagens de proteína da casca do camarão e da quitina extraída. Para a casca de camarão o teor de proteínas foi igual a 27,44%, e para o material obtido após tratamento com o fungo, igual a 5,02%, portanto, a porcentagem de desproteínização foi igual a 81,70%.

Apesar de ser um valor alto, o teor de desproteínização obtido neste trabalho é inferior a outros resultados encontrados na literatura, pois em alguns estudos o teor é superior a 90%, como mostra a Tabela 4, página 41. Portanto, a otimização das condições do processo fermentativo poderá ser estudada a fim de encontrar as condições ideais para a extração da quitina a partir de cascas de crustáceos.



**Tabela 4.** Valores de teor de desproteínização encontrado em outros estudos, utilizando o método biológico para extração da quitina

<b>Entrada</b>	<b>Micro-organismo utilizado</b>	<b>Teor de Desproteínização (%)</b>	<b>Referência</b>
1	<i>Lactobacillus helveticus</i>	78	Arbia <i>et al.</i> <sup>46</sup>
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	81	Haddar <i>et al.</i> <sup>47</sup>
3	<i>Serratia marcescens</i>	91,4	Zhang <i>et al.</i> <sup>48</sup>
4	<i>Bacillus pumilus</i>	94	Ghorbel-Bellaaj <i>et al.</i> <sup>49</sup>
5	<i>Aspergillus niger</i>	97	Teng <i>et al.</i> <sup>33</sup>
6	<i>Aspergillus niger</i>	81,7	Neste trabalho

Após obtenção do material com reduzido teor de proteínas, o processo de descoloração, usado para retirar os pigmentos presentes nas cascas de camarão, foi feito de acordo com o método descrito por Ocloo *et al.*,<sup>44</sup> o qual utiliza tratamento com acetona e solução de NaOCl 0,315% v/v, em duas etapas diferentes. A acetona é utilizada como um pré-tratamento para a etapa de branqueamento com NaOCl, e tem como objetivo diminuir o tempo desta última etapa.<sup>50</sup> A descoloração foi feita usando-se 500,0 mg do material obtido na extração e, após o tratamento com acetona, obteve-se 404,0 mg de material, o qual foi tratado com solução de NaOCl e, no final desta etapa, a massa obtida foi igual a 90,0 mg.

A grande perda de massa na etapa de descoloração pode estar relacionada à presença de impurezas, como minerais e pigmentos, no material obtido na extração da casca de camarão. A perda de massa do material após a fermentação fúngica foi pequena, igual a 23%, e de acordo com Kumari *et al.*<sup>26</sup> a porcentagem de carbonato presente em cascas de crustáceos varia entre 30 a 50%, portanto, o processo fermentativo com *Aspergillus niger* não foi suficiente para remover os minerais da casca de camarão, sendo eficiente apenas para a desproteínização.

### 4.3 Tentativas para desacetilação do material obtido após extração biológica usando *A. niger*

Tentou-se também a etapa de desacetilação do material obtido, a qual foi realizada de acordo com o método clássico usando solução de NaOH 50%. Três estudos de desacetilação foram feitos: (i) usando o material obtido após a etapa de descoloração; (ii) usando o material tratado apenas com acetona, na etapa de descoloração, e (iii) usando o material obtido na extração, sem passar pela etapa de descoloração. A Tabela 5 mostra as massas dos materiais desacetilados obtidas após cada estudo.

**Tabela 5.** Estudos de desacetilação para os diferentes materiais obtidos na extração da quitina

<b>Entrada</b>	<b>Material de partida</b>	<b>Massa inicial (mg)</b>	<b>Massa final (mg)</b>
<b>1</b>	Material obtido após etapa de descoloração	90,0	32,0
<b>2</b>	Material tratado apenas com acetona	500,0	41,0
<b>3</b>	Material obtido na extração, sem tratamento de descoloração	500,0	48,0

Em todos os testes houve uma grande perda de massa após a etapa de desacetilação, o que pode estar relacionado à porcentagem de quitina presente na casca do camarão usado neste estudo ou à solubilização do material nas condições de desacetilação empregadas.

#### 4.4 Otimização das condições de fermentação para extração da quitina

Diferentes condições de fermentação, quantidade de glicose e pH do meio de cultura e o tempo de adição das cascas de camarão, foram usadas para avaliar a influência no crescimento e obtenção de quitina no processo de extração. A Tabela 6 mostra as condições usadas, as massas dos materiais obtidos após a fermentação e a porcentagem da massa obtida em relação à massa de casca de crustáceo usada inicialmente (1,2 g).

As massas dos materiais obtidos no processo de extração variaram de 0,4363 a 0,9752 g (Tabela 6 – Entradas 3 e 8), mostrando que as condições do meio de cultura e o tempo de crescimento do fungo, antes de adicionar a casca de camarão, influenciaram no processo de extração.

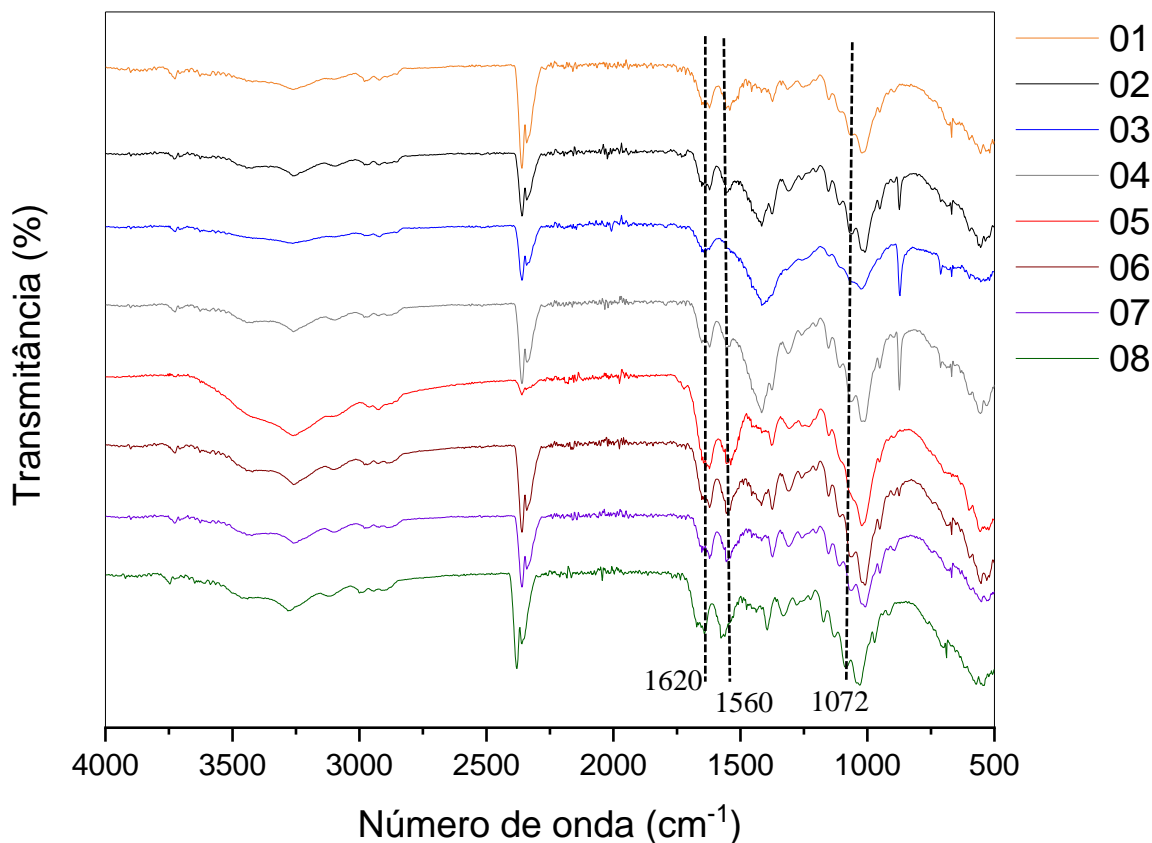
**Tabela 6.** Condições usadas nos meios de fermentação e massa dos materiais obtidos em cada experimento

<b>Entrada</b>	<b>Massa de glicose (g)</b>	<b>pH</b>	<b>Adição da casca de camarão (dia)</b>	<b>Massa do material obtido (g)</b>	<b>Porcentagem do material obtido (%)</b>
<b>1</b>	1,0	2,0	3	0,7208	60,0%
<b>2</b>	1,0	2,0	7	0,6093	50,8%
<b>3</b>	1,0	6,0	3	0,9752	81,3%
<b>4</b>	1,0	6,0	7	0,6344	52,9%
<b>5</b>	5,0	2,0	3	0,7389	61,6%
<b>6</b>	5,0	2,0	7	0,4558	37,9%
<b>7</b>	5,0	6,0	3	0,4648	38,7%
<b>8</b>	5,0	6,0	7	0,4363	36,3%

Ao comparar as massas obtidas, observa-se que alterando o dia de adição das cascas de camarão no meio de fermentação, do terceiro para o sétimo dia, e mantendo as outras condições, as massas diminuíram (Tabela 6 – Entrada 1 e 2; Entrada 5 e 6, por exemplo). Além disso, a variação da quantidade de glicose também influenciou os valores das massas obtidas, de forma que, em praticamente todos os experimentos, a maior quantidade de glicose (5,0 g), resultou em menor massa obtida (Tabela 6 – Entradas 2 e 5; Entradas 3 e 7; Entradas 4 e 8). Os dados permitem concluir que para se obter maior massa deve-se usar as condições descritas na Entrada 3 (Tabela 6, página 43), 1,0 g de glicose, pH 6,0 e adição das cascas de camarão no dia 3 de fermentação. Além disso, a menor massa foi obtida usando 5,0 g de glicose, pH 6,0 e adição das cascas no dia 7 de fermentação (Entrada 8 – Tabela 6, página 43).

Os espectros de FTIR dos materiais obtidos estão apresentados na Figura 5, página 45. Observa-se que os espectros apresentam semelhanças e que, em todos, é possível notar bandas em regiões características da quitina, como as bandas relacionadas ao grupo acetamida que aparecem em  $1620\text{ cm}^{-1}$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento da ligação C=O e à deformação da ligação N-H da amida, respectivamente, além da banda em  $1072\text{ cm}^{-1}$ , associada ao estiramento da ligação O-C-O.<sup>51, 52</sup>

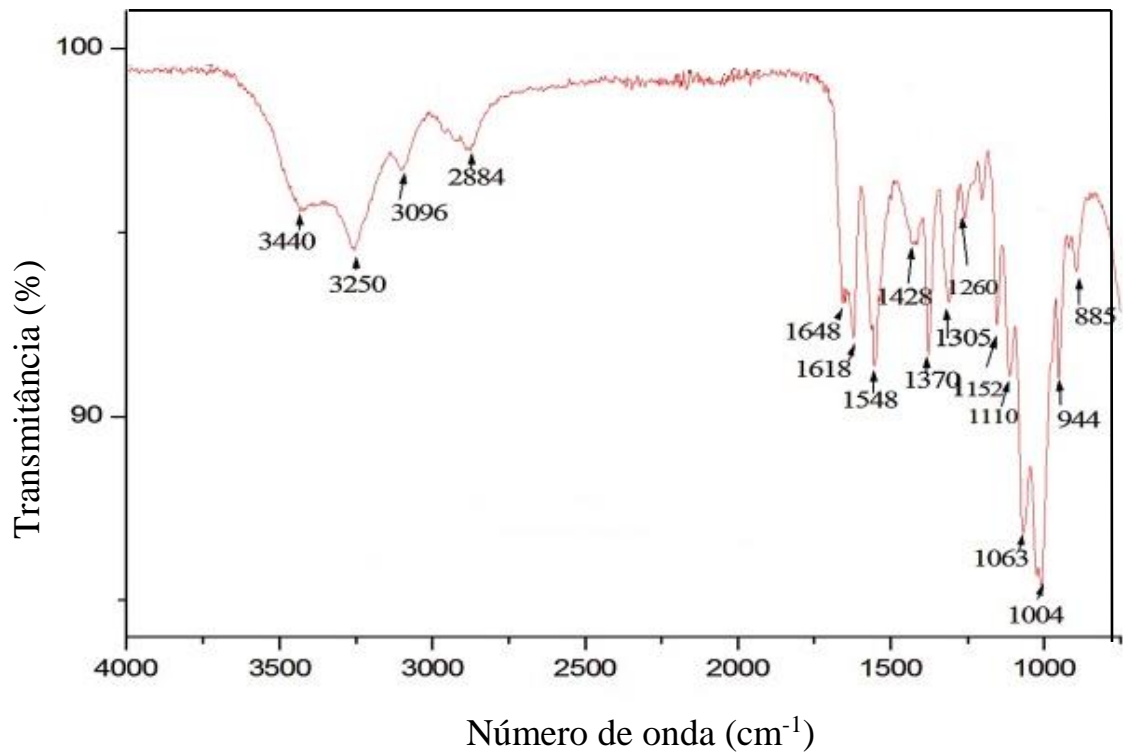
**Figura 5.** Espectro de FTIR dos materiais obtidos nas diferentes condições de fermentação com *A. niger*



Ao comparar o espectro de FTIR da quitina comercial, Figura 6 (página 46), com os espectros dos materiais deste estudo, percebe-se que aqueles obtidos pelas condições descritas nas Entradas 6, 7 e 8 da Tabela 6 (Figura 7, página 47) apresentam maior semelhança com a quitina comercial. Esses resultados reforçam a influência das condições de fermentação na extração da quitina. Portanto, as melhores condições encontradas foram aquelas em que se usou 5 g de glicose, pH 2,0 ou 6,0 e adição das cascas de camarão nos dias 3 e 7 de fermentação, mas que, no entanto, não foram as condições em que se obteve as maiores massas de material.

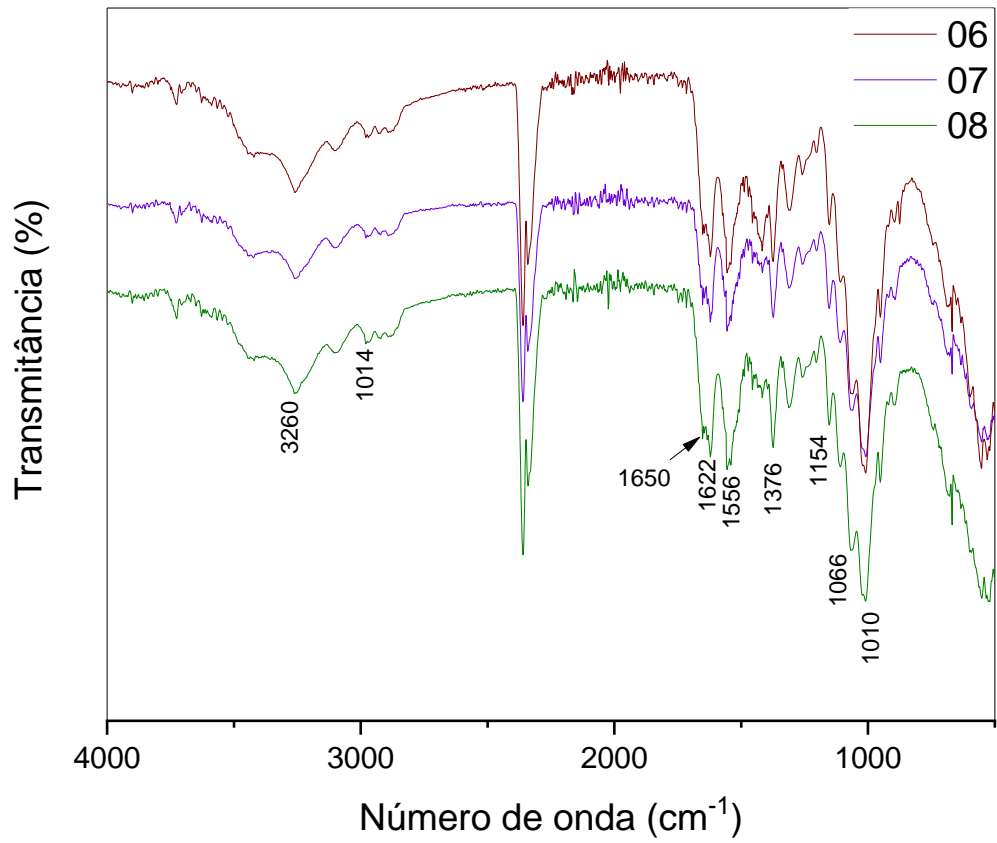
Devido à pandemia de COVID-19, a determinação da porcentagem de desproteínização desses materiais não foi realizada. Além disso, os estudos de extração de quitina e obtenção de quitosana não puderam ser finalizados.

Figura 6. Espectro de FTIR de quitina comercial



Fonte: Mhamdi *et al.*, 2017.<sup>51</sup>

**Figura 7.** Espectros de FTIR dos materiais obtidos pelas condições de fermentação 6, 7 e 8 (Tabela 6 – Entradas 6, 7 e 8, respectivamente)



## 5. Conclusões

A extração de quitina pelo método biológico vem sendo estudada para a substituição dos métodos químicos e, apesar de muitos trabalhos usarem a fermentação com microorganismos para essa extração, esse método ainda não é usado em grande escala. Nesse capítulo, então, foi analisada a extração de quitina usando o fungo *Aspergillus niger*. Na literatura existe apenas um relato que utiliza esse fungo para a extração de quitina, no entanto, no estudo aqui apresentado foram realizadas tentativas de otimização das condições de fermentação do fungo e concluiu-se que essas condições interferem na extração de quitina. Os materiais obtidos em todos os processos de fermentação apresentaram espectros de FTIR com bandas características de quitina, no entanto, os materiais que mais se assemelharam à quitina comercial foram aqueles obtidos usando 5,0 g de glicose, pH 2,0 ou 6,0 e adição das cascas de camarão nos dias 3 e 7 de fermentação. Devido à pandemia de Covid-19, os estudos para a extração de quitina e obtenção de quitosana foram interrompidos e, dessa forma, os materiais obtidos nesse capítulo não foram utilizados nos estudos dos capítulos subsequentes.



**Capítulo II. Obtenção e caracterização de derivado quaternizado de quitosana via  
reação de Zincke**

## 1. Introdução

Como citado anteriormente, a quitosana é um polissacarídeo que apresenta propriedades importantes como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, além disso, possui grande potencial de modificação química, proporcionando uma plataforma interessante para o desenvolvimento de diferentes materiais com diversas propriedades físico-químicas.<sup>6</sup>

A atividade antimicrobiana da quitosana pode ser atribuída à natureza catiônica em meio ácido e, embora o mecanismo exato ainda não seja completamente conhecido, o mais aceito é que, em meio ácido, o átomo de N da cadeia polimérica carregado positivamente interage com os componentes, predominantemente aniônicos, das membranas celulares, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana, e, conseqüentemente, na morte celular do micro-organismo.<sup>17,53</sup>

Dessa forma, a introdução de uma carga positiva permanente na estrutura da quitosana pode ser responsável por melhorar sua atividade antimicrobiana.<sup>54,55</sup> A quaternização do grupo amino é um método muito utilizado para a síntese de derivados catiônicos, e pode ser feita através da introdução de grupos quaternários na estrutura da quitosana ou pela modificação dos átomos de nitrogênio do grupo amino.<sup>55,56</sup>

Sais de piridínio são uma classe importante de compostos químicos heterocíclicos que apresentam alta atividade antimicrobiana.<sup>57</sup> Aminas primárias podem ser convertidas em sais de piridínio através da reação de Zincke, um método muito antigo e utilizado principalmente para a obtenção de sais de piridínio quirais. Nessa reação, as aminas primárias reagem com espécies altamente eletrofílicas, os chamados sais de Zincke (sais do tipo *N*-2,4-dinitrofenil-piridínio), dando origem a um novo derivado piridínico.<sup>58</sup> Durante o processo, o nitrogênio da amina primária é incorporado no núcleo piridínico, como será apresentado mais adiante neste trabalho (Esquema 4, página 58).

### 1.1 Modificações química da quitosana

Derivados da quitosana são amplamente sintetizados e estudados pois podem melhorar suas propriedades, como solubilidade e atividade antimicrobiana, e/ou adquirir novas propriedades.<sup>12</sup> As modificações químicas na quitosana ocorrem, geralmente, sem alterar sua

estrutura principal, assim, novos materiais são obtidos mantendo as propriedades intrínsecas deste biopolímero.<sup>59</sup>

Devido à presença de grupos funcionais reativos em sua estrutura, grupos hidroxila (em C-3 e C-6) e amino livre (C-2), vários tipos de reações já foram propostos e estudados para a quitosana, como reações de acilação, reticulação, quaternização, alquilação e carboximetilação, resultando em diferentes derivados que podem ser utilizados em uma ampla gama de aplicações.<sup>60, 61</sup>

As modificações mais empregadas ocorrem nos grupos amino e são conhecidas como *N*-substituição; as reações de *O*-substituição são menos usadas e, geralmente, requerem a proteção do grupo amino, devido à maior reatividade deste grupo quando comparado à hidroxila.<sup>62</sup> A Tabela 7, página 54, apresenta alguns exemplos de derivados modificados de quitosana, bem como suas aplicações.

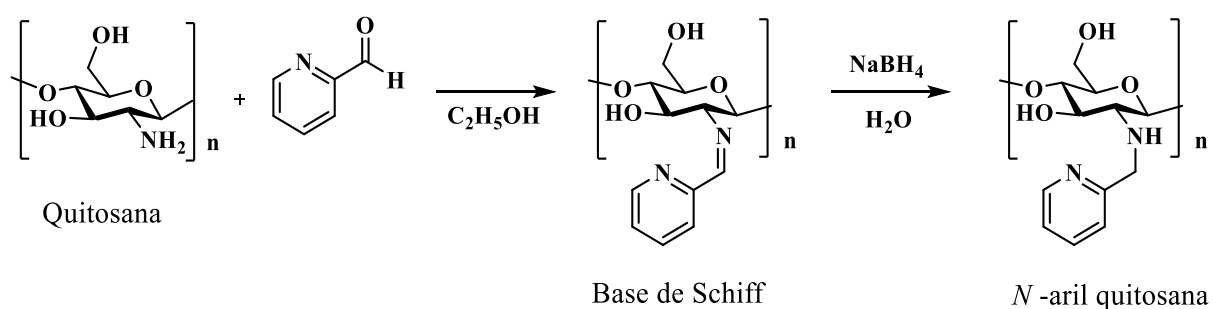
Muitos estudos têm focado na produção de derivados de quitosana com carga positiva permanente, que aumentam a solubilidade em meio aquoso e geralmente melhoram a atividade antimicrobiana em relação à própria quitosana, uma vez que, como citado anteriormente, a interação eletrostática entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa das membranas celulares é considerada o fator chave de sua atividade antimicrobiana.<sup>63, 64</sup> Dentre esses derivados, os sais de amônio quaternário de quitosana são os derivados hidrofílicos mais importantes e muito utilizados em estudos biológicos (Tabela 7 – Entrada 1).<sup>60, 65</sup>

A reação de reticulação é um tipo de modificação química da quitosana que promove o entrecruzamento entre suas cadeias ou com outras cadeias poliméricas gerando, neste último caso, redes poliméricas híbridas.<sup>66</sup> Esta modificação é a abordagem mais estudada e tornou-se promissora na síntese de derivados com uma ampla variedade de estruturas moleculares.<sup>10</sup> A reticulação da quitosana modifica sua hidrofobia e a torna mais estável em baixos valores de pH, logo a principal vantagem dos derivados reticulados é o aumento da resistência mecânica, a estabilidade química em soluções ácidas e a diminuição da solubilidade em meio aquoso, já que a estrutura de rede tridimensional desses derivados faz com que possam “inchar” em meio aquoso, sem ocorrer dissolução.<sup>67</sup> Os agentes de reticulação mais comuns são: glutaraldeído, epícloridrina, etilenoglicol e poliacrilamidas (Tabela 7– Entrada 2).<sup>60</sup>

Reações seletivas de *N*-monoalquilação e *N*-monoarilação ocorrem via reação de aminação redutiva entre quitosana e aldeídos ou cetonas, dando origem às iminas intermediárias conhecidas como bases de Schiff, as quais são reduzidas usando boro-hidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>)

ou cianoboro-hidreto de sódio ( $\text{NaCNBH}_3$ ), obtendo-se as aminas correspondentes.<sup>12</sup> Moreira *et al.*<sup>68</sup> sintetizaram um derivado de *N*-aril-quitosana por meio do método descrito acima (Figura 8).

**Figura 8.** Exemplo de reação de *N*-alquilação da quitosana a partir da síntese da base de Schiff e posterior redução com  $\text{NaBH}_4$ <sup>68</sup>



A carboximetilação da quitosana (Tabela 7– Entrada 3) envolve a introdução de grupos ácidos carboxílicos na cadeia polimérica, o que faz com que esses derivados sejam mais solúveis em uma maior faixa de pH e, por isso, possuem diversas aplicações na área de biomedicina.<sup>12</sup> Essa modificação pode ocorrer em ambos os grupos, *O*- e *N*-carboximetilação, ou de forma seletiva, sendo as condições de reação, como tempo, temperatura e utilização de base catalítica, os principais fatores que afetam o resultado/tipo de reação.<sup>10</sup>

Reações de sulfatação (Tabela 7– Entrada 4) são empregadas para sintetizar derivados de quitosana com novas propriedades biológicas, como antioxidante e anticoagulante.<sup>60</sup> Vários reagentes sulfonados tem sido utilizados nessa reação, por exemplo: ácido sulfúrico concentrado, trióxido de enxofre e ácido clorossulfônico, sendo o último o mais comumente empregado.<sup>10</sup> A aplicação mais importante desses derivados é como análogos de um anticoagulante natural do sangue, a heparina.<sup>10</sup>

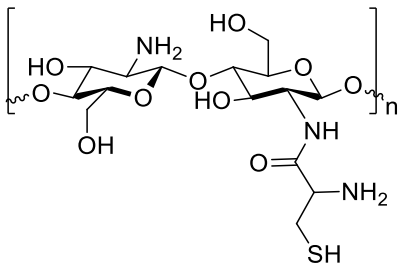
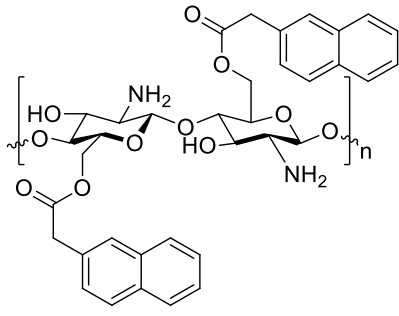
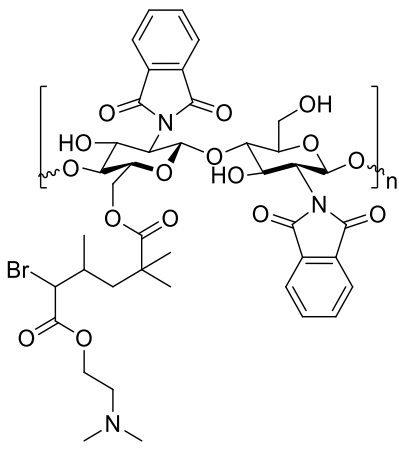
Alguns estudos propuseram novos derivados de quitosana a partir da introdução de aminoácidos em sua cadeia polimérica (Tabela 7– Entrada 5). Esta reação ocorre, principalmente, no grupo amino da quitosana e tem como resultado a introdução de grupos carboxílicos e aminos adicionais em sua estrutura que, por consequência, melhoram a solubilidade do derivado em valores de pH neutro e básicos.<sup>69</sup> Quitosanas modificadas com

aminoácidos são aplicadas na adsorção de metais, como organocatalisadores, para imobilização de enzimas e na transferência de fármacos.<sup>70</sup>

Reações de *O*-substituição seletivas podem ser feitas por meio da proteção e desproteção do grupo amino, sendo o método mais empregado aquele que utiliza anidrido ftálico como agente protetor para obter o intermediário *N*-ftálico usado nas reações de *O*-substituição.<sup>62</sup> Em seguida, uma solução de hidrato de hidrazina é utilizada como agente de desproteção, o qual promove a hidrólise do grupo ftálico e restauração do grupo amino.<sup>60</sup> Na Tabela 7- Entrada 6, encontra-se um exemplo de reação de *O*-acilação na qual foi empregada este método.

**Tabela 7.** Exemplos de modificações químicas da quitosana, estrutura e aplicação dos derivados sintetizados

Entrada	Tipo de reação	Estrutura	Aplicação	Referência
1	Quaternização com cloreto de glicidil trimetilamônio		Transferência genética	Xiao <i>et al.</i> <sup>65</sup>
2	Reticulação com poliácridamida		Adsorção	Molatlhegi <i>et al.</i> <sup>71</sup>
3	<i>O</i> -carboximetilação		Transporte de fármacos	Du <i>et al.</i> <sup>72</sup>
4	Sulfatação		Atividade antibacteriana	Pires <i>et al.</i> <sup>73</sup>

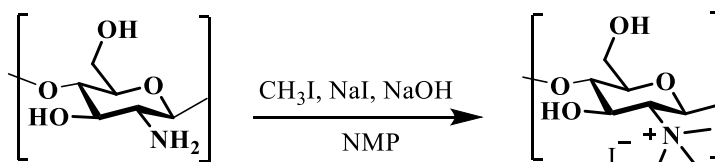
Entrada	Tipo de reação	Estrutura	Aplicação	Referência
5	Modificação com aminoácidos	 <p>The structure shows a repeating unit of a chitosan chain, represented by two glucose units in their cyclic pyranose form linked by a 1,4-glycosidic bond. The amino group of the second glucose unit is substituted with a cysteine derivative, specifically a 2-mercaptoethylamino group (-NH-CH2-CH2-SH).</p>	Engenharia de tecido de cartilagem	Borsagli <i>et al.</i> <sup>69</sup>
6	O-acilação	 <p>The structure shows a repeating unit of a chitosan chain with two naphthalene-2-ylmethyl ester groups attached to the amino groups of the glucose units via O-acetylation.</p>	Atividade biológica	Tao <i>et al.</i> <sup>74</sup>
7	N,O-substituição	 <p>The structure shows a repeating unit of a chitosan chain with a complex N,O-substituted group attached to a glucose unit. The group includes a brominated alkyl chain, a tertiary amine, and a phthalimide moiety.</p>	Biocatálise	Yuan <i>et al.</i> <sup>75</sup>

## 1.2 Derivados quaternizados de quitosana

A quaternização da quitosana é frequentemente empregada para a síntese de derivados contendo carga positiva permanente e pode ser feita através de duas estratégias, pela quaternização direta do átomo de N do grupo amino ou pela introdução de sais quaternários já formados, como sais de amônio, piridínio e piperazínio, em algum grupo reativo da quitosana.<sup>60, 76</sup> A Tabela 8, página 56, mostra alguns exemplos desses derivados quaternizados de quitosana.

A principal forma de quaternização direta da quitosana ocorre através da metilação do grupo amino presente em sua estrutura, dando origem ao seu derivado quaternário mais estudado denominado *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC).<sup>77</sup> O método mais empregado para a obtenção de TMC é a reação entre quitosana e iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) sob condições fortemente alcalinas, usando *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) e iodeto de sódio (NaI) como solvente e catalisador, respectivamente (Esquema 1).<sup>78</sup>

**Esquema 1.** Síntese do derivado quaternizado da quitosana *N,N,N*-trimetilquitosana



Derivados catiônicos também podem ser obtidos pela incorporação de grupos quaternários fora da cadeia principal de quitosana.<sup>55</sup> Os métodos mais usuais para a síntese desses derivados são as reações de alquilação entre quitosana e haletos de alquila ou epóxidos, via abertura do epóxido e introdução do grupo quaternário no grupo amino da quitosana.<sup>76, 79</sup> O principal derivado obtido por este método é o cloreto de *N*-(2-hidroxi-3-trimetilamônio)propilquitosana (HTMC), obtido pela reação entre quitosana e cloreto de glicidil trimetilamônio ou cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropiltrimetilamônio, como mostra o Esquema 2, página 57.<sup>80</sup>

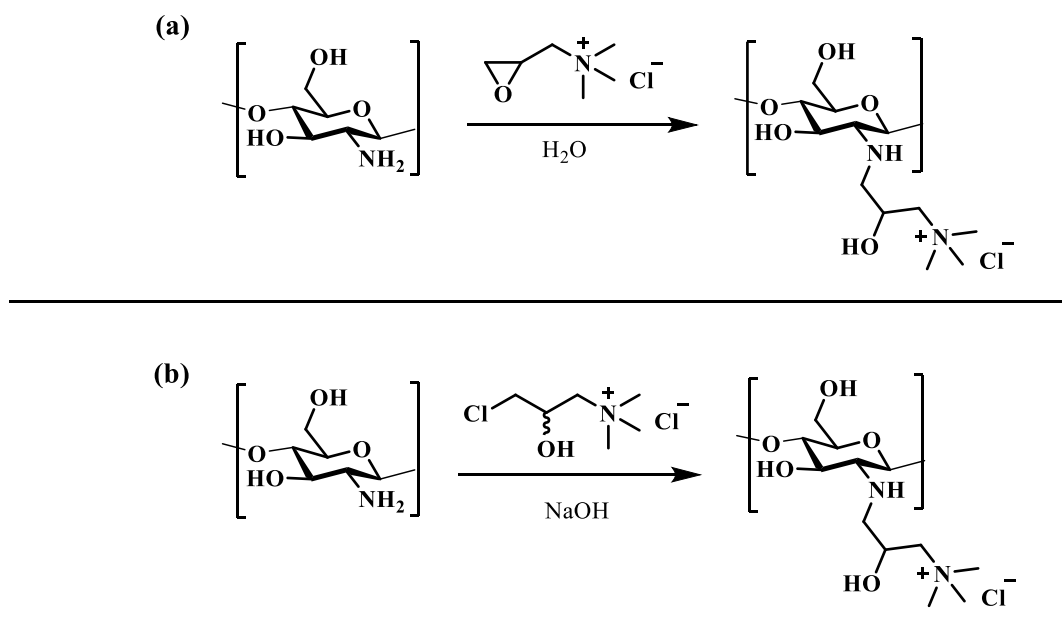
As atividades antibacterianas e antifúngicas desse derivado foram extensamente estudadas e o HTMC foi usado para diversas aplicações nas áreas farmacêutica e biomédica, além disso, também tem sido estudado para aplicações na indústria alimentícia, na formação de



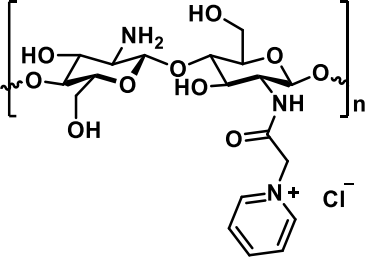
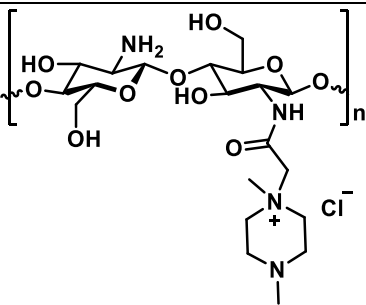
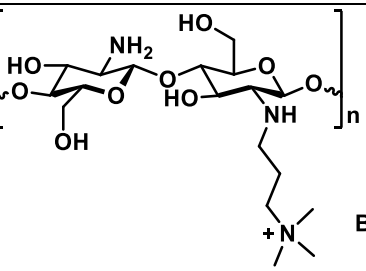
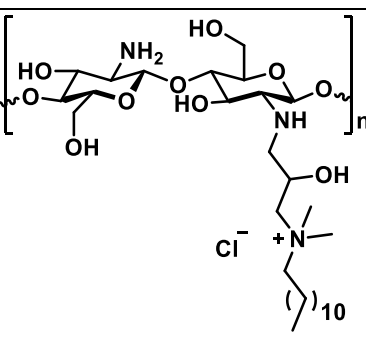
filmes para embalagens de alimentos capazes de manter e prolongar a qualidade dos mesmos.<sup>63, 81, 82</sup>

Outros epóxidos e haletos de alquila foram usados para a síntese de derivados quaternizados de quitosana por alquilação dos grupos amino desse polímero, como brometo de (3-bromopropil) trimetilamônio,<sup>83</sup> brometo de (5-bromopentil) trimetilamônio<sup>84</sup> e cloreto de *N,N*-dimetil-*N*-dodecil-*N*-(1,2-epoxipropil)amônio,<sup>85</sup> mostrados na Tabela 8, página 58.

**Esquema 2.** Síntese do derivado quaternizado HTMC via (a) reação entre quitosana e epóxido e (b) reação entre quitosana e haleto de alquila.



**Tabela 8.** Exemplos de derivados quaternizados de quitosana

Entrada	Modificação	Estrutura	Aplicação	Referência
1	Quaternização via introdução de grupo piridínio		Potencial agente antimicrobiano	Sahariah <i>et al.</i> <sup>86</sup>
2	Quaternização via introdução de grupo piperazínio		Aplicações farmacêuticas	Holappa <i>et al.</i> <sup>87</sup>
3	Quaternização com brometo de (3-bromopropil) trimetilamônio		Potencial agente antifúngico	Pedro <i>et al.</i> <sup>83</sup>
4	Quaternização com cloreto de <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -(1,2-epoxipropil)amônio		Potencial auxiliar para tingimento têxtil.	Pan <i>et al.</i> <sup>85</sup>

### 1.3 Sais de piridínio

Os sais de piridínio representam uma classe versátil de heterociclos encontrados em muitos compostos bioativos naturais e sintéticos, que possuem um amplo espectro de atividades biológicas e flexibilidade em transformações químicas.<sup>57, 88</sup> Esses compostos catiônicos tem sido utilizados em diversas aplicações, por exemplo, como inibidores de enzimas, na entrega controlada de fármacos e como agentes antimicrobianos, além disso, são comumente usados como intermediários importantes em síntese orgânica para a preparação de substâncias nitrogenadas altamente complexas, incluindo di-hidropiridinas *N*-substituídas, tetra-hidropiridinas e hexa-hidropiridinas.<sup>89</sup>

O método clássico para a síntese de sais de piridínio ocorre por *N*-alquilação ou *N*-acilação, pela reação entre piridina, que age como nucleófilo, e haletos de alquila ou acila, substratos eletrofílicos, via reação  $S_N2$  e de substituição nucleofílica acílica, respectivamente, como apresentado no Esquema 3, página 60.<sup>90</sup> Em alguns casos esta rota sintética pode apresentar problemas, por exemplo, ao se utilizar haletos de alquila secundários ou principalmente terciários pois, neste caso, a reação  $E2$  pode ocorrer preferencialmente em relação a  $S_N2$ ; ou, ao utilizar haletos de alquila contendo carbono assimétrico, o que pode levar à racemização durante o processo de alquilação - Esquema 3.<sup>91</sup>

Para esses casos, uma boa alternativa é a utilização da reação de Zincke, a qual fornece um meio eficiente para a preparação de sais de *N*-aril ou *N*-alquilpiridínios nos quais os grupos alquila podem ser primários, secundários ou terciários.<sup>58</sup>

A reação de Zincke (Esquema 4, página 60) ocorre entre aminas primárias e uma espécie altamente eletrofílica, como o cloreto de *N*-(2,4-dinitrofenil)piridínio. Nesta reação, os sais piridínicos eletrofílicos de partida (sal de Zincke), sofrem abertura do anel na presença de aminas primárias nucleofílicas e, em seguida sofrem reciclagem, levando à síntese de um novo sal de piridínio e liberação de 2,4-dinitroanilina.<sup>58</sup> Resumidamente, o átomo de nitrogênio da amina primária é incorporado ao ciclo de piridina sem a clivagem da ligação C-N da amina.<sup>91</sup>



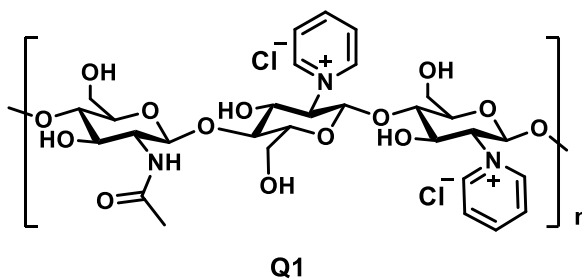
## 2. Objetivos

### 2.2 Objetivo geral

Como citado, derivados catiônicos de quitosana são conhecidos por suas atividades antimicrobianas e antifúngicas e, por isso, são amplamente sintetizados e utilizados em diversas aplicações. No entanto, a quaternização direta da quitosana por meio da reação com sal de Zincke ainda não foi explorada e, dessa forma, essa parte do trabalho visa a modificação química da quitosana via reação de Zincke para obtenção de um novo derivado quaternizado com potencial propriedades antimicrobianas.

### 2.3 Objetivos específicos

- Estudos para a modificação química da quitosana por meio da quaternização com sal de Zincke, para obtenção do derivado **Q1**;
- Caracterização do novo derivado quaternizado **Q1** por FTIR, RMN de  $^{13}\text{C}$  e TG;
- Estudos para a aplicação do novo derivado **Q1** como agente antimicrobiano.



### 3. Parte experimental

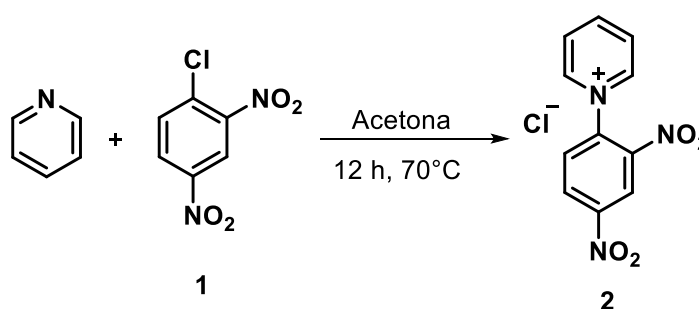
#### 3.1 Materiais

Quitosana médio peso molecular (75 – 85 % desacetilada, Sigma Aldrich) ácido clorídrico (Nox), hidróxido de sódio (Vetec), piridina (Vetec), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (Sigma Aldrich), trietilamina (Et<sub>3</sub>N) (Dinâmica), acetona (CRQ), álcool etílico (95%, Labsynth).

#### 3.2 Síntese do sal de piridínio Q1

O sal de Zincke **2**, utilizado como reagente nessa reação, foi preparado de acordo com o método descrito por Viana e colaboradores (Esquema 5).<sup>57</sup> Assim, piridina (2,0 mL, 0,025 mol), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (**1**) (5,0 g, 0,025 mol) e acetona (40,0 mL) foram adicionados a um balão de fundo redondo, e essa mistura foi mantida sob agitação magnética por 12 horas, a 70 °C. Ao fim da reação, a mistura foi filtrada à vácuo, o sólido foi lavado com acetona e, posteriormente, seco em estufa a 60 °C por 1 hora, obtendo-se o sal de Zincke (80% de rendimento).

**Esquema 5.** Síntese do sal de Zincke **2** a partir de piridina e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

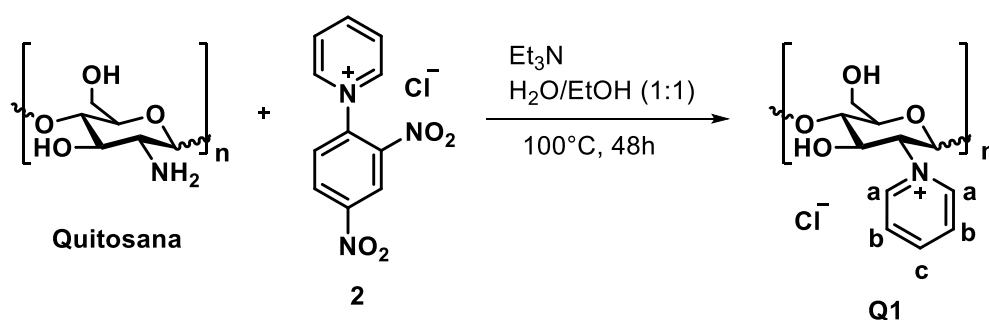


Para a síntese do sal de piridínio **Q1** (Esquema 6 - página 63), 0,5 g de quitosana de médio peso molecular (2,5 mmol de NH<sub>2</sub>), 1,125 g de sal de Zincke (4,0 mmol, 1,6 equiv.) e 20,0 mL de etanol/ água destilada (1:1) foram adicionados em um balão de 250,0 mL, e em seguida adicionou-se 0,56 mL de trietilamina (4,0 mmol, 1,6 equiv.). A mistura ficou sob agitação magnética e refluxo a 100 °C, por 48 horas. Após o tempo reacional, a mistura foi

separada por filtração à vácuo, usando um funil de Büchner, e a quitosana modificada **Q1** foi lavada com etanol, diclorometano, água destilada e acetona, sequencial e exaustivamente. Por fim, **Q1** (0,76 g) foi seco em estufa a 70 °C por 1 hora.

A caracterização de **Q1** foi feita pelos métodos de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e análise termogravimétrica (TG).

**Esquema 6.** Reação de Zincke entre quitosana e sal de Zincke **2** para síntese de **Q1**



Aspecto: sólido de coloração vermelha

IV (Figura 11, página 73) (pastilha KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1604 e 1560 (C=C), 1490 e 1432 (C=N).

RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (Figura 12, página 74) ( $\delta$  ppm): 147,0 (Cc), 142,0 (Ca), 129,0 (Cb).

### 3.3 Caracterização

#### 3.3.1 Grau de desacetilação (GD) e grupo amino livre da quitosana

Titulação potenciométrica foi utilizada para determinar o GD (%) e a quantidade de grupos amino livres (mmol/g) da quitosana comercial utilizada. Uma amostra de 25,0 mg de quitosana foi inicialmente dissolvida em solução padronizada de HCl (0,1 mol/L). Após a completa dissolução, essa solução foi titulada usando solução padronizada de NaOH (0,1 mol/L). A determinação dos valores de pH foi feita por meio de um pHmêtro (PHS-3BW, Aprolab, Brasil), sendo o experimento feito em triplicata. O grau de desacetilação e a quantidade de grupos amino livres foram calculados pelas Equações 3<sup>92</sup>, 93 e 4<sup>94</sup>, respectivamente.

$$GD (\%) = \frac{V_{NaOH} \times C_{NaOH} \times 0,016}{0,0994 \times m_{amostra}} \quad (3)$$

$$n_{NH_2} (mmol/g) = \frac{C_{NaOH} \times V_{NaOH}}{m_{amostra}} \quad (4)$$

Em que  $V_{NaOH}$  (mL) é o volume de solução de NaOH gasto na titulação,  $C_{NaOH}$  (mol/L) é a concentração da solução de NaOH,  $m_{amostra}$  (mg) é a massa da amostra de quitosana, 0,016 é a massa molar do grupo  $NH_2$  em 1,0 mol de quitosana (kg/mol), 0,0994 é a porcentagem teórica de grupos  $NH_2$  na quitosana.<sup>95</sup>

### 3.3.2 Determinação do ganho de massa (GM)

O ganho de massa (%), obtido após as modificações químicas da quitosana, foi determinado pela seguinte equação:

$$GM (\%) = \left( \frac{m_f - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (5)$$

Em que  $m_i$  (g) e  $m_f$  (g) são as massas da quitosana antes e após modificação química, respectivamente.

### 3.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram registrados no espectrômetro Shimadzu IR-408 (ICEX-DQ, UFMG, Brasil). As amostras foram secas em estufa a 70 °C por 1 hora, em seguida 1,0 mg de cada material foi misturado com 100,0 mg de KBr, e prensados para a preparação da pastilha. As análises foram feitas na faixa de números de ondas entre 4000 e 500  $cm^{-1}$ , com resolução de 4  $cm^{-1}$  e 32 varreduras por amostra.



### **3.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido foi obtido utilizando um espectrômetro Varian-Agilent 400 MHz (NCQP, UFES, Brasil), em uma frequência de 100 MHz, tempo de aquisição de 20,48 ms, e acumulação de 1232 varreduras.

### **3.3.5 Análise termogravimétrica (TG)**

As análises termogravimétricas das amostras foram feitas usando um equipamento TGA Shimadzu 50 WS (Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Bioaplicações, CDTN, Brasil). As amostras foram analisadas de 25 a 700°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ).

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Grau de desacetilação (GD) e grupo amino livre da quitosana comercial

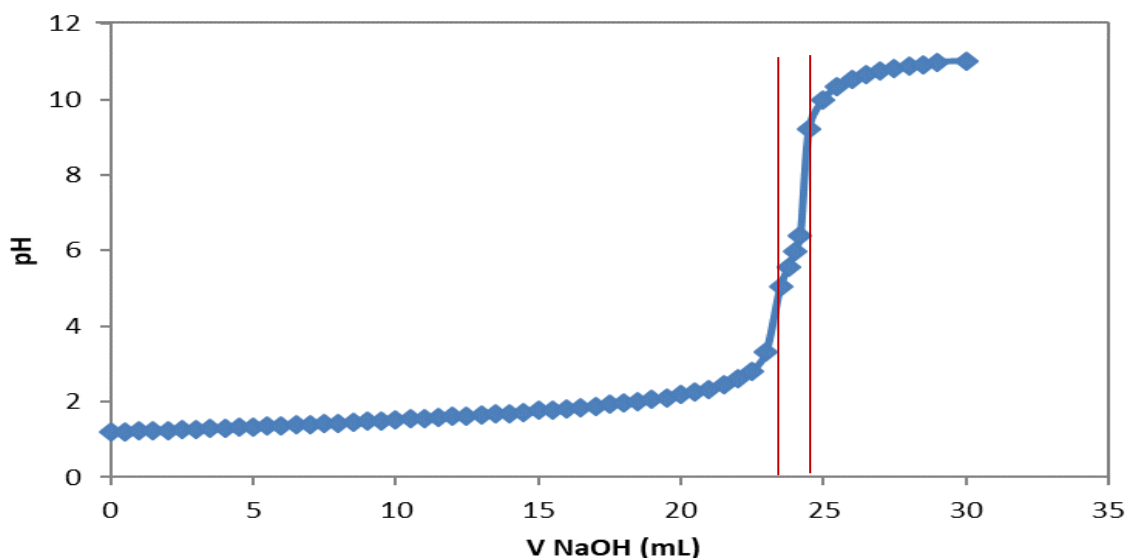
A quitosana comercial de médio peso molecular, utilizada neste estudo, possui grau de desacetilação (GD) na faixa entre 75 a 85%, conforme informação do fabricante. Muitas propriedades deste polissacarídeo estão intimamente relacionadas a este parâmetro e, deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos *N*-desacetilados (GD), bem como a quantidade de grupos NH<sub>2</sub> na cadeia polimérica, são importantes tanto para caracterizar a quitosana, quanto para sua modificação química.<sup>96</sup>

Vários métodos foram desenvolvidos para a determinação do GD, incluindo espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia por ressonância nuclear magnética, titulação coloidal e titulação potenciométrica. Este último, proposto em 1968, é o mais empregado devido à sua simplicidade e por não necessitar de equipamentos caros.<sup>93</sup> O método de titulação potenciométrica foi, então, utilizado para a determinação do grau de desacetilação e do número de grupos amino livres da quitosana.

A curva potenciométrica obtida na titulação da quitosana com solução de NaOH, Figura 9 (página 67), apresenta dois pontos de inflexão, os quais estão indicados na figura. O primeiro ponto representa o ponto de equivalência do excesso do ácido clorídrico, usado para solubilizar a quitosana, e o segundo representa o ponto de equivalência do ácido usado para protonar a quitosana. Dessa forma, a diferença entre os volumes de NaOH nos dois pontos da inflexão corresponde ao volume da solução básica necessária para neutralizar o ácido gasto na protonação dos grupos amino livre presentes na quitosana.

Sabendo o volume de ácido usado para protonar a quitosana,  $V_{\text{HCl}} = 0,7 \text{ mL}$ , foi possível determinar o grau de desacetilação e a quantidade de grupos amino livres, usando as Equações 3 e 4 (Página 64), respectivamente. Os valores encontrados foram: GD igual a 80,2% e 5,0 mmol de NH<sub>2</sub> em 1 g de quitosana.

**Figura 9.** Curva potenciométrica obtida na titulação da quitosana com solução de NaOH 0,1 mol/L

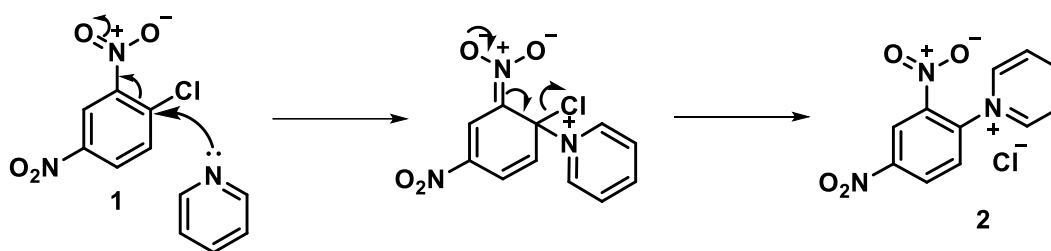


#### 4.2 Modificação química da quitosana via reação de Zincke, para obtenção do sal de piridínio Q1

Uma grande variedade de derivados de quitosana já foram sintetizados e descritos na literatura usando, principalmente, a modificação dos grupos amino em reações de carboxilação, acilação, alquilação e quaternização como citado anteriormente. A utilização de diversas aminas primárias como materiais de partida em reações de Zincke já foi intensamente relatada. Apesar disso, a síntese de derivados de quitosana em que seu grupamento funcional amina primária é utilizado para incorporar sais de piridínio em sua cadeia polimérica por meio da reação de Zincke, ainda não havia sido descrita na literatura.<sup>97</sup>

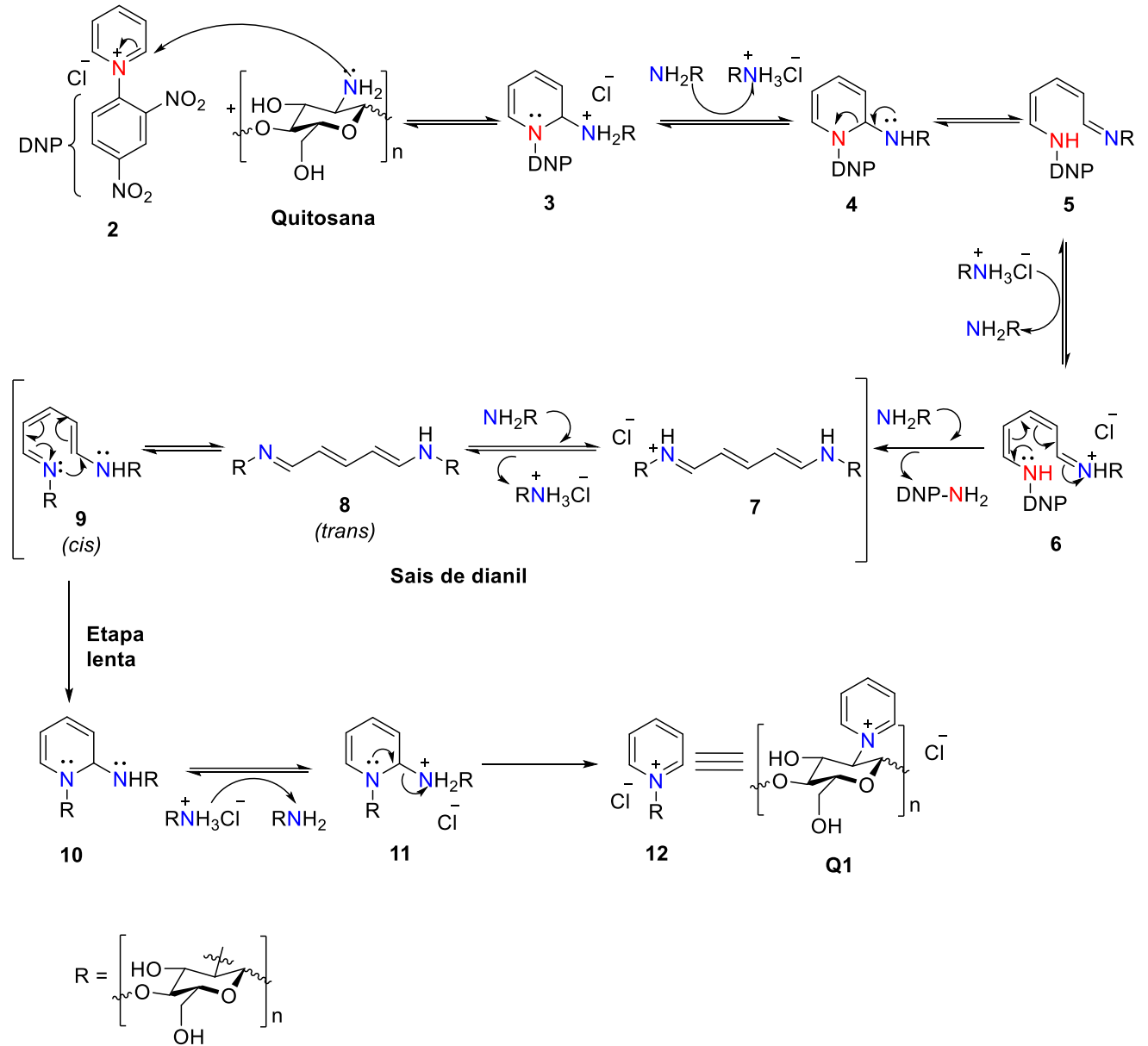
O sal de Zincke usado como substrato neste estudo foi o cloreto de 1-(2,4-dinitrofenil)piridínio (**2**), o qual foi sintetizado pela reação entre piridina e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (**1**), via substituição nucleofílica aromática ( $S_NAR$ ). Nesta reação, ocorre um ataque nucleofílico da piridina ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e, em seguida, a aromaticidade do sistema é reestabelecida com a saída do grupo abandonador cloreto, obtendo-se o sal de Zincke **2**, como mostra o Esquema 7, página 68.

**Esquema 7.** Mecanismo da síntese do sal de Zincke cloreto de 1-(2,4-dinitrofenil)piridínio (**2**)



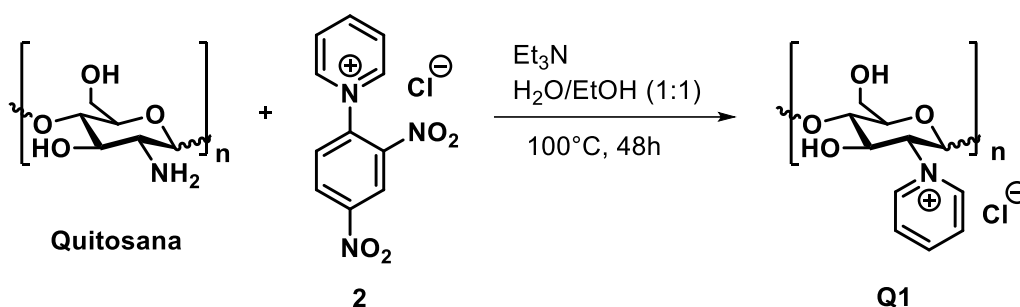
A reação de Zincke ocorre via mecanismo  $S_N$ (ANRORC), com três etapas principais: i) adição nucleofílica, ii) abertura de anel e, iii) fechamento de anel com interconversão *cis-trans*,<sup>89</sup> como mostra o Esquema 8, página 69. O ataque nucleofílico da amina primária leva à abertura do anel piridínico (intermediário **5**); em seguida, outro equivalente de amina primária, presente no meio, realiza um ataque nucleofílico no intermediário **6**, causando o deslocamento da 2,4-dinitroanilina e a formação dos sais de dianil, de coloração vermelha intensa, que estão em equilíbrio (intermediários **7**, **8** e **9**).<sup>98</sup> O processo de interconversão do isômero **8** *trans* para o **9** *cis* é um passo fundamental para a etapa de fechamento do anel.<sup>99</sup> Embora a conformação *trans* do intermediário **8** seja mais estável, o equilíbrio *cis* e *trans* ocorre rapidamente, por meio de uma série de reações ácido-base (protonações, isomerização e desprotonações).<sup>99</sup> O isômero **9** do sal de dianil pode reagir por adição nucleofílica ou rearranjo sigmatrópico de um intermediário zwitteriônico para produzir o intermediário ciclizado **10**.<sup>99</sup> A etapa de fechamento do anel, parece ser a etapa determinante da velocidade da reação. Por fim, ocorre o reestabelecimento da aromaticidade com a saída do grupo amino, no intermediário **11**, formando-se, então, o novo sal de piridínio **Q1**.

**Esquema 8.** Mecanismo da reação de Zincke entre quitosana e cloreto de 1-(2,4-dinitrofenil)piridínio (2) para obtenção de Q1



Os estudos para obtenção do novo material **Q1** a partir da reação da quitosana com o sal de Zincke **2** demandaram um grande número de condições de reação a fim de se otimizar o processo (Tabela 9).

**Tabela 9.** Condições de reação utilizadas para a síntese de **Q1** usando a reação de Zincke



Reação	Solvente	Tempo/ Temperatura (°C)	Et <sub>3</sub> N	Sal de Zincke	Aquecimento	GM (%)
1	n-butanol	15h/115	---	1,6 eq.	Convencional	0
2	n-butanol	36h/115	---	1,6 eq.	Convencional	2,3
3	n-butanol	48h/115	1,6 eq.	1,6 eq.	Convencional	0
4	H <sub>2</sub> O	48h/100	1,6 eq.	1,6 eq.	Convencional	35,5
5	H <sub>2</sub> O	15min/100	---	1,6 eq.	Micro-ondas	0
6	H <sub>2</sub> O/EtOH (20:80)	1h/100	1,6 eq.	3 eq.	Ultrassom	2
7	H <sub>2</sub> O/EtOH (20:80)	48h/100	1,6 eq.	1,6 eq.	Convencional	18,4
8	H <sub>2</sub> O/EtOH (20:80)	48h/100	1,6 eq.	3 eq.	Convencional	30
9	H <sub>2</sub> O/EtOH (50:50)	48h/100	1,6 eq.	3 eq.	Micro-ondas	17
10	H <sub>2</sub> O/EtOH (50:50)	48h/100	1,6 eq.	1,6 eq.	Convencional	52
11	H <sub>2</sub> O/EtOH (50:50) 1 % AcOH	48h/100	1,6 eq.	1,6 eq.	Convencional *	25
12	AcOH – AcO <sup>-</sup> /EtOH (50:50) (tampão pH 4,5)	48h/100	---	1,6 eq.	Convencional *	28
13	AcOH-AcO <sup>-</sup> /EtOH (50:50) (tampão pH 4,5)	48h/100	1,6 eq.	1,6 eq.	Convencional *	34

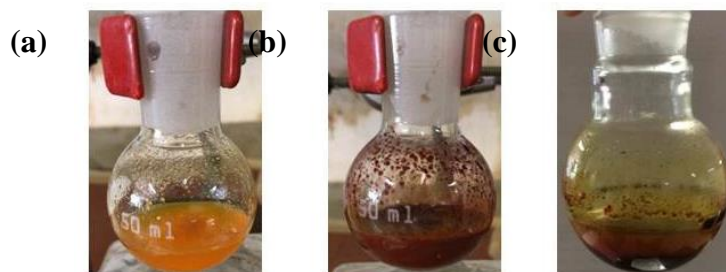
\* Reação em meio homogêneo. GM = ganho de massa

A princípio a reação foi feita de acordo com o método descrito por Marazano *et al.*,<sup>100</sup> o qual utilizou 1,6 equivalentes de sal de Zincke, em refluxo de 1-butanol por 15 horas. Nessas condições, a reação ocorreu em meio heterogêneo e, ao fim da reação, não foi possível observar nenhuma modificação da quitosana de partida, como diferença na coloração e na massa final. Esse mesmo resultado foi obtido após aumentar o tempo da reação para 48 horas e adicionar a base Et<sub>3</sub>N, a fim de modificar as propriedades nucleofílicas do grupo amino (Tabela 9– reações 1 a 3).

Devido ao insucesso das tentativas anteriores e à ausência de estudos na literatura sobre a utilização de amins primárias ligadas a ciclo ou derivadas de carboidratos como materiais de partida para a reação de Zincke, resolveu-se utilizar a *D*-glicosamina, a principal unidade monomérica da quitosana, como reagente na reação de Zincke, em uma reação modelo, a fim de verificar se a reação ocorreria mais facilmente no monômero em vez do polímero. Entretanto, em nenhuma das condições de reação utilizadas neste estudo foi possível obter o sal de piridínio desejado, indicando que o grupo amino da glicosamina é um nucleófilo fraco para este tipo de reação, possivelmente, devido a efeitos estéricos. Franconetti e colaboradores obtiveram resultados semelhantes no estudo de modificação das amins primárias presentes na quitosana e no monômero *D*-glicosamina usando sais de pirílio como sais eletrofílicos.<sup>101</sup>

De acordo com Rivard *et al.*,<sup>90</sup> a reação entre amins fracamente nucleofílicas e sais de Zincke é favorecida ao utilizar água como solvente. Sendo assim, fez-se a reação entre o sal de Zincke e a quitosana, em água (Tabela 9 – reação 4) e observou-se uma imediata mudança na coloração da mistura reacional, de laranja para vermelho intenso. Esta mudança de cor indica a formação dos sais de dianil (representados no Esquema 8, página 69), intermediários importantes da reação de Zincke. Após 48 horas de reação, a coloração da reação mudou novamente, ficando marrom escuro, como mostra a Figura 10, página 72.

**Figura 10.** Reação de Zincke entre quitosana e sal de Zincke em diferentes tempos de reação: (a) tempo inicial; (b) após 30 min e (c) após 48 horas de reação



Após o tempo reacional, a mistura foi filtrada e lavada diversas vezes com diferentes solventes, a fim de remover o sal de Zincke que não reagiu e o subproduto da reação, a 2,4-dinitroanilina. O produto da reação, um sólido de coloração avermelhada, apresentou ganho de massa igual a 35,5 %, o que indica uma boa taxa de modificação química da quitosana de partida.

Outras condições de reação foram testadas com o objetivo de melhorar a porcentagem de ganho de massa, ou seja, aumentar o grau de modificação da quitosana. Dentre estas condições encontram-se o uso de micro-ondas, ultrassom, reação em meio homogêneo e a utilização de mistura de solventes, como mostra a Tabela 9, página 70. Na reação assistida por micro-ondas, observou-se uma rápida formação dos sais de dianil de coloração avermelhada, e esta coloração permaneceu ao longo do tempo reacional, indicando que a etapa de fechamento do anel não aconteceu.

A maior porcentagem de ganho de massa ( $GM = 52\%$ ) foi obtida ao se utilizar a mistura de água e etanol como solvente, tempo reacional de 48 horas e  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tabela 9 – reação 10). O produto obtido nesta reação (**Q1**) foi caracterizado por FTIR, RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido e TG. **Q1** apresentou baixa solubilidade em solventes orgânicos e em soluções aquosas, com pH entre 1 a 12, sendo solúvel apenas em ácido nítrico concentrado, a temperatura ambiente.

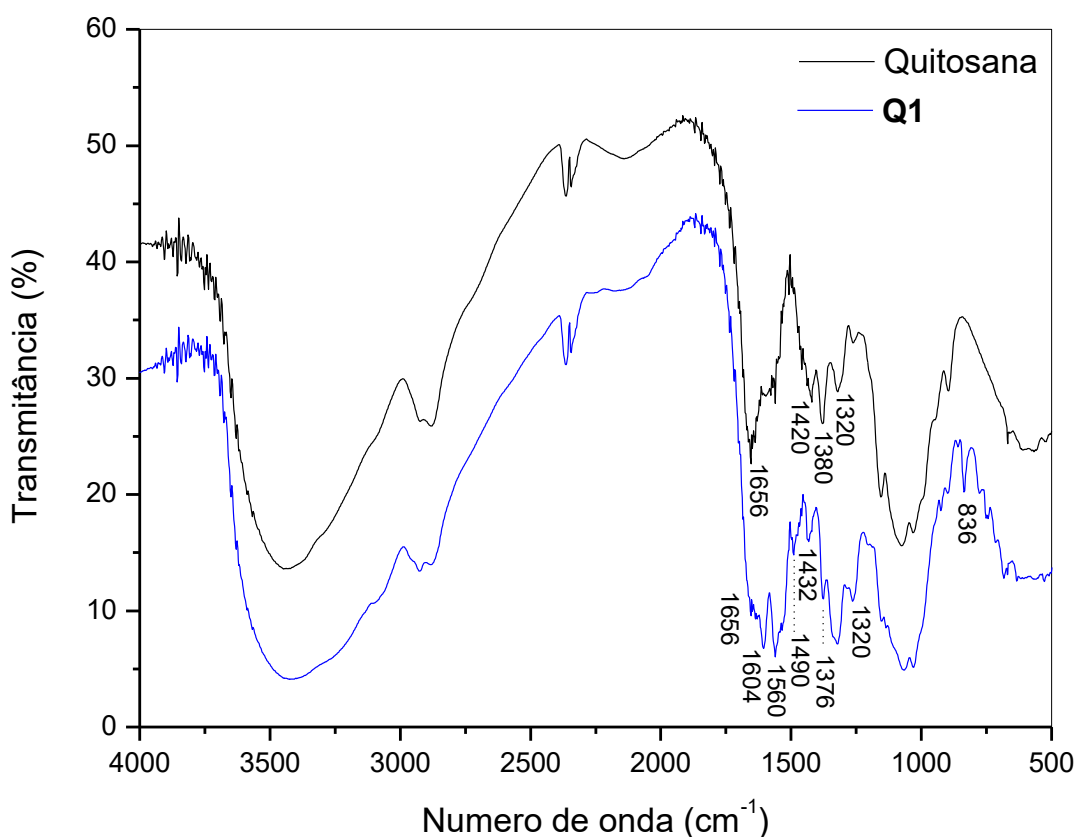


### 4.3 Caracterização

#### 4.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A Figura 11 apresenta os espectros de FTIR da quitosana comercial e de **Q1**. As principais bandas que diferenciam o espectro de **Q1** do espectro de quitosana são: (i) as bandas em 1604 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ , as quais são atribuídas ao estiramento da ligação C=C; (ii) o aparecimento das bandas em 1490 e 1432  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas ao estiramento da ligação C=N; (iii) a presença da banda em 836  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde à flexão do anel piridina fora do plano.<sup>97</sup> Essas mudanças indicam a introdução do anel piridínico na estrutura da quitosana. Além disso, a ausência de banda na região entre 1540 e 1340  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento vibracional simétrico do grupo  $\text{NO}_2$ ,<sup>102</sup> no espectro de **Q1**, indica a ausência de 1,2-dinitroanilina, subproduto da reação de Zincke.

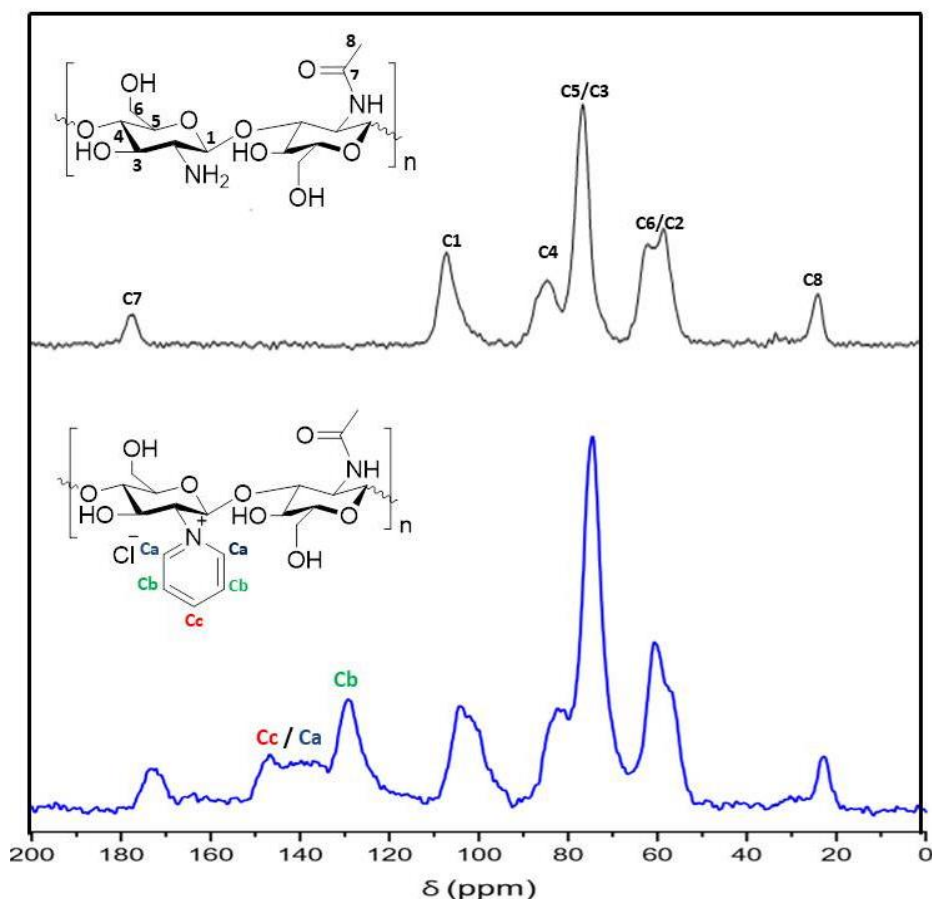
**Figura 11.** Espectros de FTIR da quitosana comercial e de **Q1**



### 4.3.2 Ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN de $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido da quitosana e de **Q1** estão apresentados na Figura 12. O espectro da quitosana apresenta sinais característicos com valores de deslocamentos químicos iguais a: 179,2 ppm, referente ao carbono do grupo carbonila C7; 105,4 ppm, referente ao carbono anomérico; 57,3 ppm, 60,9 ppm e 81,8 ppm, atribuídos aos carbonos C2, C6 e C4, respectivamente, do anel piranosídico; 75,9 ppm, que corresponde à sobreposição dos sinais referentes à C3 e C5; e 22,5 ppm, atribuído ao carbono metílico, C8, do grupo acetamido.<sup>103</sup> A introdução do anel piridínico na estrutura da quitosana pode ser comprovada pelo aparecimento dos sinais com deslocamentos químicos acima de 120 ppm, região dos aromáticos, no espectro de **Q1**. O sinal em 147,0 ppm está relacionado ao C<sub>c</sub>, carbono aromático mais desprotegido dos sais de piridínio;<sup>89</sup> e os sinais em 129,0 e 142,0 ppm correspondem aos carbonos C<sub>b</sub> e C<sub>a</sub>, respectivamente.

**Figura 12.** Espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido da quitosana e de **Q1**

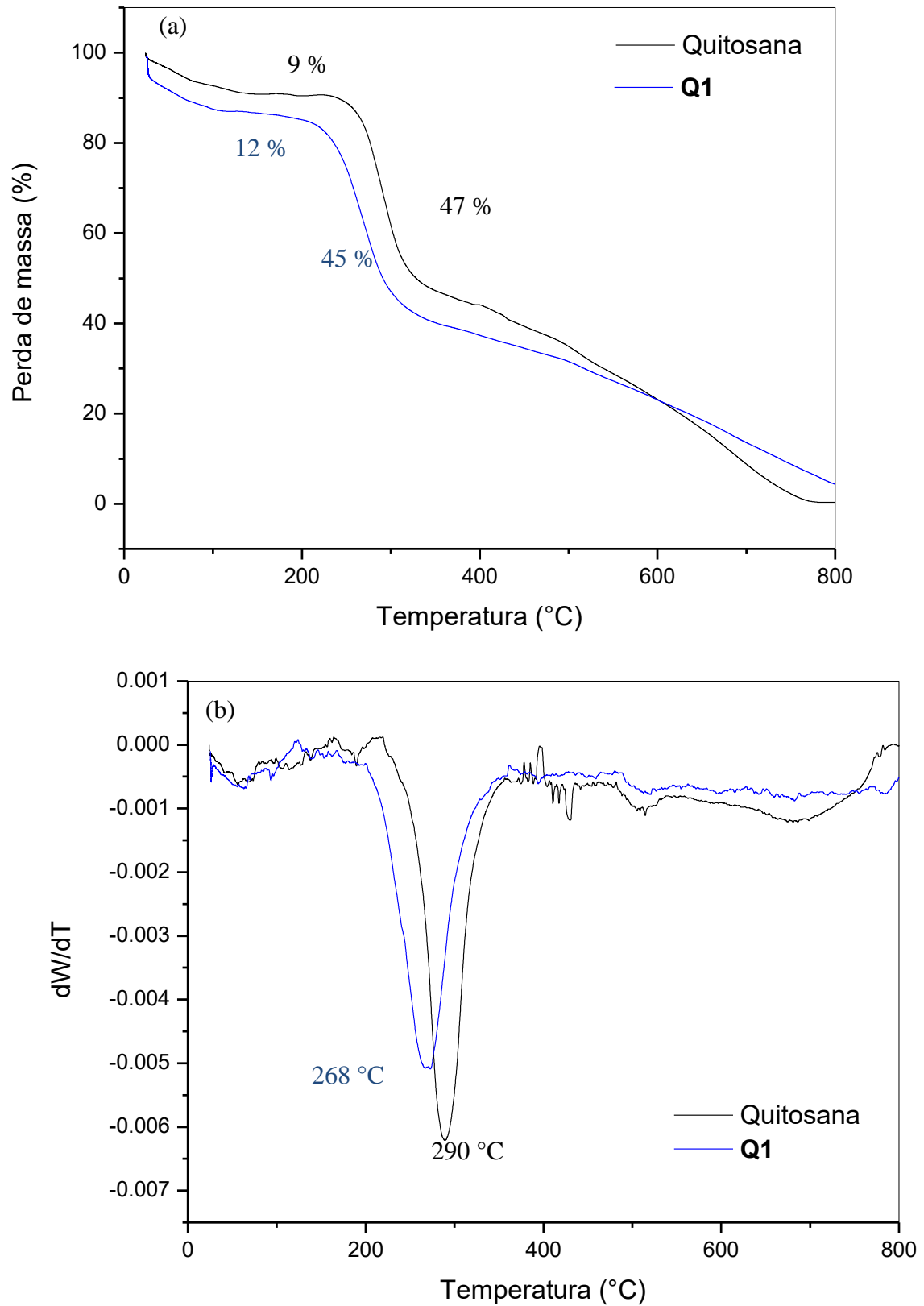


### 4.3.3 Análise termogravimétrica (TG)

A Figura 13, página 76, apresenta as curvas termogravimétricas que mostram as decomposições térmicas da quitosana e de **Q1**. Os picos de temperatura das curvas de DTG (Figura 13b) correspondem às temperaturas em que a taxa de decomposição atinge o valor máximo. Observa-se nas curvas TG (Figura 13a) que há duas regiões com perdas de massa bem definidas, para ambos materiais. Na decomposição da quitosana, a primeira região (9,0 %) está relacionada à umidade presente na amostra, e a segunda perda (47,0 %) ocorre entre 230 e 370 °C, e está relacionada com o principal processo de decomposição térmica e oxidativa do polímero.<sup>104</sup> Neste intervalo de temperatura, a curva DTG (Figura 13b) indica um pico com temperatura máxima de decomposição em 290 °C. A decomposição de **Q1** inicia-se em temperaturas mais baixas, o primeiro estágio está relacionado à perda de água (12 %), e o segundo estágio, em que ocorre a maior perda de massa do material (45 %), ocorre entre 203 a 344 °C, de acordo com a curva de TG (Figura 13a). A curva de DTG de **Q1** (Figura 13b) mostra um pico com temperatura máxima igual a 268 °C, referente ao segundo estágio de decomposição.

A diminuição da temperatura de decomposição em **Q1** pode estar relacionada à diferença de cristalinidade entre os dois materiais. Nos polímeros cristalinos, as ligações de hidrogênio intermoleculares entre cadeias são mais fortes que as encontradas em polímeros não cristalinos, e, por isso, necessitam de mais energia para serem quebradas durante o processo de decomposição.<sup>105</sup> Portanto, as curvas de DTG indicam que a diminuição da estabilidade térmica de **Q1** pode estar relacionada à menor cristalinidade quando comparado à quitosana.

**Figura 13.** Curvas termogravimétricas (a) TG e (b) primeira derivada de TG (DTG) para a decomposição térmica da quitosana e **Q1**



## 5 Conclusão

Nesta parte do trabalho foi proposta a obtenção de um novo derivado da quitosana, **Q1**, a partir da funcionalização deste polímero com o sal de piridínio **3**, via reação de Zincke, método não antes relatado na literatura. O derivado **Q1**, contendo uma carga positiva permanente em sua estrutura e com potencial aplicação como agente antimicrobiano, foi sintetizado com sucesso, o ganho de massa obtido foi igual a 52 % e sua caracterização foi feita por espectroscopia na região do IV, espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido e TG. A síntese e caracterização de **Q1** foram publicadas em um artigo na revista Journal of the Brazilian Chemical Society (JBACS).<sup>88</sup>

### **Capítulo III. Desenvolvimento e caracterização de filmes à base de quitosana**

## 1. Introdução

Os problemas ambientais relacionados ao acúmulo de plásticos sintéticos, proveniente principalmente de embalagens de alimentos, associados à demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis e seguros, tem impulsionado a pesquisa por embalagens biodegradáveis.<sup>106, 107</sup>

Novos materiais para embalagens estão sendo desenvolvidos a partir de biopolímeros provenientes de fontes renováveis, que são abundantes na natureza e de baixo custo, como polissacarídeos, lipídios e proteínas.<sup>108</sup> Dentre eles, os polissacarídeos possuem grande potencial para serem usados como matérias-primas de filmes e revestimentos comestíveis para conservação de alimentos.<sup>106, 109</sup>

A quitosana é um polissacarídeo não tóxico, possui boa capacidade de formação de filme e sua estrutura linear torna seus filmes resistentes, flexíveis e transparentes; além disso, tem atraído atenção como um conservante de alimentos devido à sua atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de fungos, leveduras e bactérias.<sup>108, 110</sup>

Como consequência, filmes à base de quitosana têm sido amplamente estudados para aplicação como embalagens e revestimentos de alimentos de origem natural, no entanto, suas propriedades mecânicas e permeabilidade ao gás e ao vapor de água limitam seu uso para essa aplicação.<sup>111</sup> Assim, diversas estratégias têm sido utilizadas para melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de quitosana, como adição de agentes plastificantes, agentes reticulantes e incorporação de outros biopolímeros.<sup>106, 107, 109</sup>

### 1.1 Embalagens de alimentos

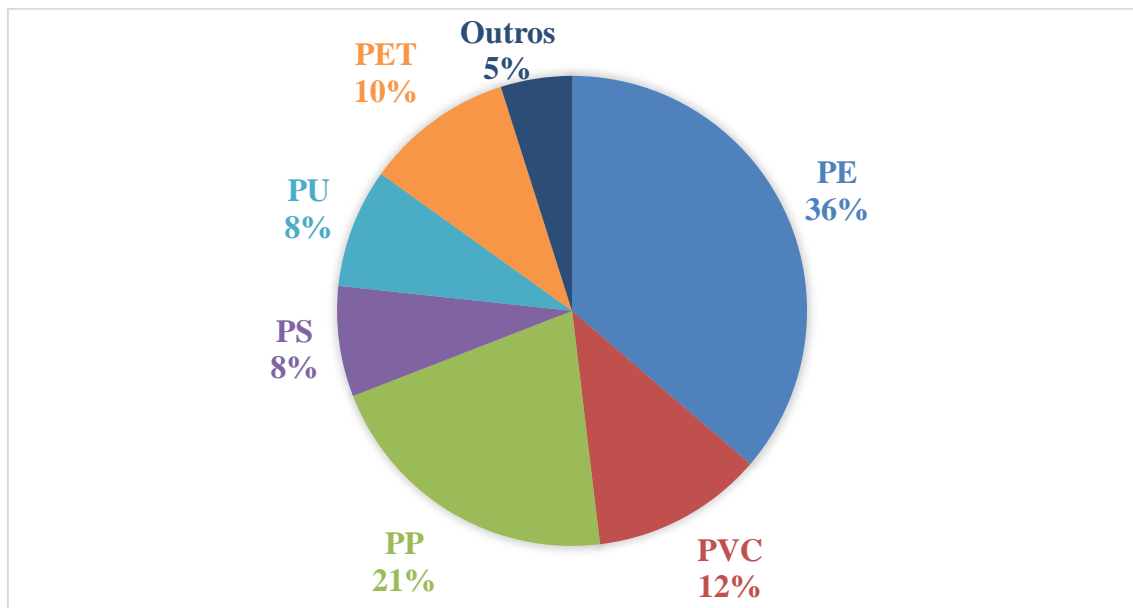
A principal função das embalagens de alimentos é fornecer proteção física contra influências externas e criar condições adequadas para preservar a qualidade dos produtos durante o armazenamento, comercialização e consumo.<sup>112, 113</sup> Os materiais tradicionalmente utilizados nas embalagens são vidros, plásticos e alumínio.<sup>112</sup>

Os plásticos de base petroquímica têm dominado as indústrias de embalagens de alimentos devido às suas diversas vantagens, como baixo custo, peso mais leve, boas propriedades mecânicas e de barreira de O<sub>2</sub>, versatilidade de formato e capacidade para selagem

por calor.<sup>110</sup> No entanto, esses plásticos representam um sério problema ambiental pois demoram centenas de anos para se degradarem e, na maioria das vezes, sua reciclagem é impraticável e economicamente inviável.<sup>114</sup>

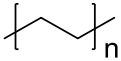
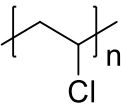
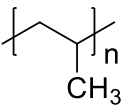
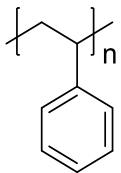
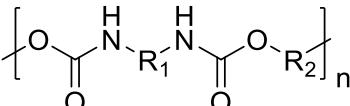
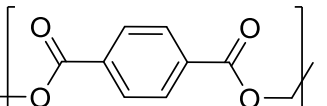
Polietileno (PE), policloreto de vinila (PVC), polipropileno (PP), poliestireno (PS), politereftalato de etileno (PET) e poliuretano (PU) são os plásticos sintéticos mais utilizados, representando praticamente 100 % dos plásticos usados no mercado global, como mostra o gráfico da Figura 14.<sup>115, 116</sup> Algumas características desses plásticos, como estrutura, natureza química e tempo de degradação, estão apresentadas na Tabela 10, página 81.<sup>116, 117</sup>

**Figura 14.** Gráfico mostrando a participação de diferentes tipos de plástico no mercado global no ano de 2016





**Tabela 10.** Natureza e estrutura química, tempo de degradação e aplicações dos principais plásticos comercializados mundialmente

Natureza química	Plástico /Estrutura	Tempo de degradação (anos)	Principais aplicações
Polímeros com ligações C-C na cadeia principal		10 – 600	Sacolas, sacos de lixo, filmes para embalar alimentos
	<b>PE</b>		
		50 – 150	Tubulações de água e esgoto, brinquedos, mangueiras
	<b>PVC</b>		
		100 – 600	Canudos, carpetes, peças automotivas, seringas descartáveis
	<b>PP</b>		
		50 – 80	Potes para iogurtes e sorvetes, aparelhos de barbear
	<b>PS</b>		
Polímeros heteroatômicos		Indeterminado	Pneus, isolamento em frigoríficos, esponjas
	<b>PU</b>		
		450	Garrafas, embalagens de cosméticos e alimentos, fibras têxteis
	<b>PET</b>		

A crescente preocupação com o meio ambiente aliada à demanda dos consumidores por alimentos minimamente processados e de boa qualidade, tem aumentado o interesse por embalagens baseadas em materiais biodegradáveis, mais tecnológicas e modernas.<sup>118, 119</sup> Ao contrário das embalagens tradicionais, que atuam apenas como uma barreira inerte para proteger os alimentos de danos externos, as embalagens modernas desempenham um papel mais significativo na garantia da preservação e da qualidade desses produtos, podendo ser classificadas como ativas ou inteligentes.<sup>118, 120</sup>

As embalagens ativas possuem aditivos que, por meio de interações físicas, químicas ou biológicas, alteram a condição do alimento embalado para estender sua vida útil e melhorar suas propriedades sensoriais.<sup>121, 122</sup> Já as embalagens inteligentes são capazes de monitorar a condição dos alimentos embalados, detectando suas propriedades e fornecendo informações sobre sua qualidade durante o transporte e armazenamento.<sup>120, 122</sup> A Tabela 11 mostra alguns exemplos de sistemas de embalagens ativas e inteligentes usadas para preservar, melhorar ou controlar a qualidade dos alimentos.

**Tabela 11.** Exemplos de embalagens ativas e inteligentes, suas principais aplicações e os reagentes ou indicadores usados em suas preparações

<b>Tipo</b>	<b>Sistema da embalagem</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Reagentes/ indicadores</b>	<b>Exemplo de aplicações</b>
<b>Embalagens inteligentes</b>	Indicadores de oxigênio	Fornecer indicações sobre condições de armazenamento	Indicador redox, indicador de pH, enzimas	Alimentos refrigerados ou congelados
	Indicadores de temperatura	Fornecer indicações sobre condições de armazenamento	Reagentes químicos ou enzimáticos	Alimentos armazenados em concentração reduzida de O <sub>2</sub>
	Indicadores de crescimento de micro-organismos	Fornecer indicações sobre a qualidade do alimento	Indicador de pH, indicador que reage com metabólitos	Carnes, peixes e aves

<b>Tipo</b>	<b>Sistema da embalagem</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Reagentes/ indicadores</b>	<b>Exemplo de aplicações</b>
<b>Embalagens ativas</b>	Absorção de oxigênio	Reduzir o crescimento de micro-organismos aeróbicos e prevenir a oxidação inadequada	Compostos de ferro, ácido ascórbico, sais metálicos	Queijos, produtos à base de carne, café, chá e biscoitos
	Absorção de etileno	Prevenir o amadurecimento de frutas e legumes	Permanganato de potássio e óxido de alumínio, argila	Banana, manga, tomate, batata e cenoura
	Absorção de umidade	Reduzir a atividade de água na superfície dos alimentos para evitar o crescimento de micro-organismos	Poliacrilatos, polietilenoglicol, sílica gel	Peixes, carnes, aves, frutas e legumes
	Emissão de dióxido de carbono	Reduzir a taxa de respiração e o crescimento de micro-organismos	Ácido ascórbico, hidrogenocarbonato de sódio	Peixes, carnes, produtos de panificação e café
	Embalagem antimicrobiana	Inibir o crescimento de micro-organismos	Zeólita de prata, ácido sórbico	Frutas e legumes frescos, queijos, carnes

Fonte: Adaptado de Wyrwa e Barska, 2017 e Ahvenainen, 2003.<sup>121, 122</sup>

Outra forma de embalagem é conhecida como revestimento, é feito pela aplicação direta de filmes biodegradáveis na superfície dos alimentos.<sup>123</sup> Essa técnica tem sido muito utilizada para preservar a qualidade e prolongar o tempo de prateleira de frutas e vegetais, já que os revestimentos atuam como uma barreira entre o alimento e o ambiente externo, evitando trocas gasosas (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) e as perdas de água e componentes voláteis.<sup>124-126</sup>

Como já citado, polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos derivados de recursos vegetais e animais, são exemplos de biopolímeros que estão sendo explorados para o desenvolvimento de novas embalagens modernas, com o objetivo de reduzir o impacto ambiental e garantir a qualidade dos alimentos.<sup>127</sup> Dentre eles, os polissacarídeos apresentam inúmeras vantagens, como grande abundância na natureza, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, além disso, podem ser usados na forma de revestimentos e filmes comestíveis.<sup>113, 119</sup>

A Tabela 12 mostra as principais características de um filme para embalagem de alimentos e as principais vantagens dos filmes obtidos por polímeros naturais em relação aos filmes de materiais plásticos tradicionais.<sup>110, 113</sup>

**Tabela 12.** Principais características de um bom filme para embalagens e as vantagens dos filmes formados por biopolímeros

<b>Principais características de um filme</b>	Permitir respiração controlada do produto
	Permitir uma barreira seletiva para gases e vapor de água
	Manter a integridade estrutural e facilitar o manuseio
	Servir como um veículo para incorporar aditivos alimentares
	Prevenir a deterioração microbiana durante o armazenamento
<b>Vantagens dos filmes formados por polímeros naturais</b>	Biodegradável
	Comestível
	Baixo custo, abundante e renovável
	Menor impacto ambiental
	Controle da migração de gases e umidade
	Agentes antioxidantes e antimicrobianos incorporados
Aumento da vida útil dos alimentos	

Apesar das vantagens, a baixa barreira ao vapor de água e as baixas propriedades mecânicas dos filmes à base de polissacarídeos causam uma limitação para seu uso industrial.<sup>113, 128</sup> Dessa forma, modificações estruturais desses biopolímeros são estudadas para alterar suas propriedades e obter filmes com características mais favoráveis para uso em embalagens de alimentos.<sup>129</sup>

Diversos tipos de modificações já foram propostas, dentre elas, a combinação de dois ou mais biopolímeros; adição de substâncias com propriedades plastificantes e incorporação de diferentes aditivos, por exemplo, antioxidantes, agentes antifúngicos, antimicrobianos, cores e outros nutrientes.<sup>119, 128, 130</sup>

## 1.2 Filmes de quitosana

A quitosana é um biopolímero que além de possuir as propriedades físicas dos polissacarídeos, também apresenta atividade biológica de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de atividade contra fungos filamentosos e leveduras.<sup>111, 128</sup>

Além disso, a quitosana é solúvel em soluções de ácidos diluídos, como ácido acético e ácido clorídrico, dando origem a uma solução viscosa com boa capacidade de formação de filme.<sup>128, 131</sup> Assim, sua atividade antimicrobiana e capacidade filmogênica, a tornam um potencial conservante alimentício para aplicações em embalagens de alimentos.<sup>54, 132</sup>

A quitosana não é termoplástica e, ao contrário dos polímeros termoplásticos convencionais, não pode ser moldada após ser submetida a um aumento de temperatura pois se degrada antes de fundir.<sup>16</sup> Assim, a formação do filme de quitosana ocorre, como citado anteriormente, devido à preservação de emaranhados de cadeia e interações intermoleculares, como ligações eletrostáticas e de hidrogênio, formadas durante o processo de secagem do solvente.<sup>16</sup>

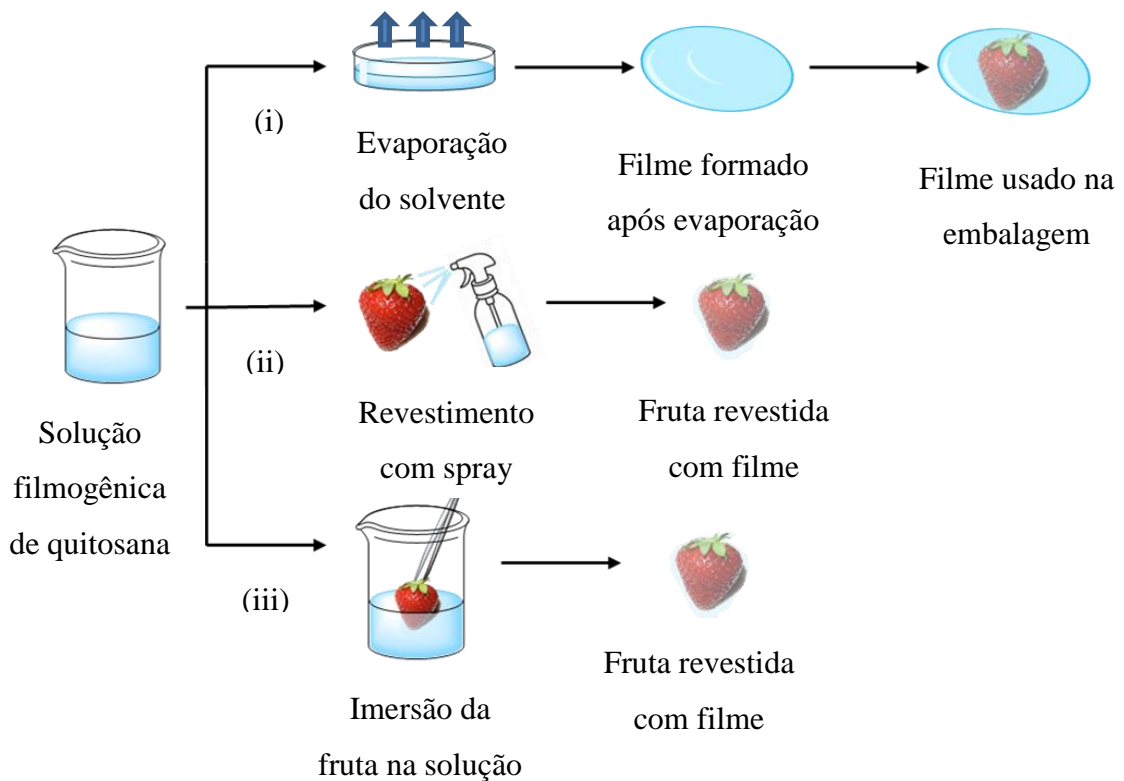
A quitosana pode ser empregada em embalagens de alimentos de duas formas diferentes, como filmes de embalagem ou revestimentos naturais usados diretamente nos alimentos, como mostra a Figura 15, página 86.<sup>133</sup> Os filmes à base de quitosana podem ser preparados por diferentes técnicas como *casting*, revestimento, extrusão e *layer by layer*, sendo as duas primeiras as mais utilizadas.<sup>131</sup>

A técnica de *casting* é uma técnica simples e muito empregada, na qual a quitosana é solubilizada em uma solução ácida diluída, se necessário, aditivos podem ser adicionados à essa solução, que é agitada até completa homogeneização.<sup>108</sup> A solução filmogênica é vertida sobre uma superfície adequada, como placas de Petri, placas de plástico e suportes de silicone, em seguida ocorre a evaporação do solvente e formação do filme.<sup>108, 131</sup>

É conhecido que as condições de secagem do solvente influenciam as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de quitosana, no entanto essas condições não são consideradas otimizadas e, na literatura, diferentes formas de secagem já foram empregadas, por exemplo secagem à temperatura ambiente, à vácuo e em fornos com temperatura e/ou umidade relativa controlados.<sup>134-136</sup>

Os revestimentos são formados pela imobilização de filmes finos à base de quitosana diretamente na superfície do alimento, o que pode ser feito de diferentes métodos, os comumente usados são revestimento por *spray* e revestimento por imersão.<sup>131, 137</sup> Ambos os métodos envolvem o preparo da solução filmogênica de quitosana, seguida da aplicação dessa solução diretamente no alimento, por meio de pulverizador (revestimento por *spray*); ou por imersão direta do alimento na solução (revestimento por imersão), e, após a secagem, uma película fina do filme é formada nessa superfície.<sup>133, 137</sup>

**Figura 15.** Principais técnicas usadas para formação de filmes de quitosana para embalagem e revestimento de alimentos, (i) técnica *casting*; (ii) revestimento por *spray* e (iii) revestimento por imersão



### 1.3 Propriedades e aplicações de filmes de quitosana na indústria de alimentos

O potencial da quitosana para atuar como conservante de alimentos de origem natural tem sido amplamente relatado e empregado no desenvolvimento de novos sistemas de embalagens capazes de controlar a qualidade dos alimentos, além de reduzir os problemas ambientais associados às embalagens tradicionais.<sup>108, 109</sup>

A conservação de alimentos, como frutas, vegetais e carnes, embalados por filmes e revestimentos à base de quitosana já foi estudada e comprovou-se que esses filmes são capazes de retardar mudanças nas características qualitativas dos alimentos, prevenir o crescimento microbiano e prolongar a vida útil do mesmo.<sup>131, 138, 139</sup>

A capacidade de conservação de alimentos dos filmes à base de quitosana ocorre devido à atividade antimicrobiana desse biopolímero.<sup>108</sup> Apesar de não ter o mecanismo de ação totalmente elucidado, a hipótese mais aceita atribui sua atividade antimicrobiana às interações eletrostáticas entre as moléculas catiônicas da quitosana, devido aos grupos amino protonados em  $\text{pH} < 6,3$ , e as membranas celulares dos micro-organismos carregadas negativamente.<sup>111, 139,</sup>  
<sup>140</sup> Essas interações resultam na mudança da permeabilidade celular e, como consequência, no vazamento de constituintes intracelulares.<sup>139</sup>

A atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada por diversos fatores, por exemplo, fatores intrínsecos, como peso molecular e grau de desacetilação, pela forma como o polímero é usado, em solução ou em suspensão, e pelo tipo de micro-organismo<sup>139</sup>. Muitos estudos relatam a concentração inibitória mínima (CIM) da quitosana para diversos tipos de fungos e bactérias e, devido às características do polímero e não padronização dos procedimentos, diferentes valores de CIM podem ser encontrados para o mesmo micro-organismo.<sup>141</sup> A Tabela 13, página 88, mostra valores de CIM para quitosana contra alguns tipos de bactérias e fungos.

**Tabela 13.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) para quitosana contra diferentes fungos e bactérias

<b>Tipo de micro-organismo</b>	<b>Micro-organismo</b>	<b>CIM (ppm)</b>	<b>Referência</b>
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	20	Liu <i>et al.</i> <sup>142</sup>
		100	Tsai <i>et al.</i> <sup>143</sup>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	250	Devlieghere <i>et al.</i> <sup>19</sup>
		500	Liu <i>et al.</i> <sup>142</sup>
	<i>Salmonella enterica</i>	300	Roller <i>et al.</i> <sup>144</sup>
Bactérias Gram-positivas	<i>Bacillus cereus</i>	1000	Liu <i>et al.</i> <sup>142</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	Liu <i>et al.</i> <sup>142</sup>
		100	Devlieghere <i>et al.</i> <sup>19</sup>
Fungos	<i>Candida lambica</i>	250	Devlieghere <i>et al.</i> <sup>19</sup>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	>2000	Tsai <i>et al.</i> <sup>143</sup>
	<i>Candida albicans</i>	500	Tsai <i>et al.</i> <sup>143</sup>
	<i>Botrytis cinerea</i>	10	Liu <i>et al.</i> <sup>142</sup>
	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	Liu <i>et al.</i> <sup>142</sup>

Fonte: Adaptado de Goy, 2009.<sup>141</sup>

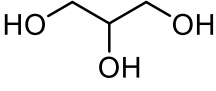
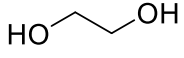
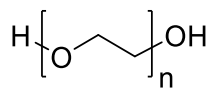
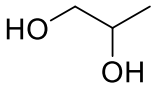
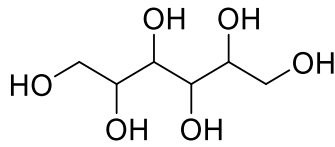
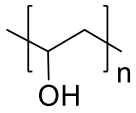


No entanto, os filmes de quitosana apresentam baixa permeabilidade seletiva a gases e a rigidez na estrutura desses filmes fazem com que tenham propriedades mecânicas fracas.<sup>135</sup> Resistência à tração e alongamento na ruptura são propriedades mecânicas que devem ser avaliadas no preparo de filmes com potencial aplicação em embalagens de alimentos, pois a flexibilidade e resistência à ruptura são características importantes para garantir a integridade do produto.<sup>108, 145</sup>

Dessa forma, agentes plastificantes capazes de reduzir as forças de atrito entre as cadeias poliméricas, como ligações de hidrogênio ou forças iônicas, são adicionados aos filmes para facilitar o espaçamento e deslizamento entre elas e, assim, melhorar suas propriedades mecânicas.<sup>135, 146</sup>

Os plastificantes frequentemente usados em filmes de biopolímeros são polióis, como glicerol, sorbitol e polietilenoglicol, sendo o glicerol o mais empregado devido principalmente à sua propriedade de biocompatibilidade; além deles, ácido graxos e açúcares também já foram testados.<sup>109, 147</sup> A frutose, por exemplo, melhorou as propriedades mecânicas de filmes à base de polissacarídeos e, de acordo com Olivas e Barbosa-Cánovas, filmes de alginato contendo frutose apresentaram baixos valores de permeabilidade ao vapor de água, quando comparados à filmes contendo glicerol.<sup>148, 149</sup> A Tabela 14, página 90, mostra as propriedades mecânicas, resistência à tração e porcentagem de alongamento, de filmes à base de quitosana com os plastificantes comumente usados.

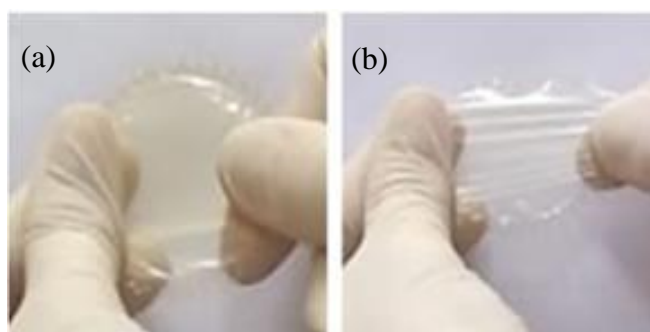
**Tabela 14.** Propriedades mecânicas de filmes à base de quitosana contendo diferentes plastificantes

Entrada	Plastificante / Estrutura	Propriedades mecânicas		Referência
		Tensão de ruptura (P <sub>Ma</sub> )	Alongamento na ruptura (%)	
1	 Glicerol	$31,8 \pm 2,0$	$45,7 \pm 304$	Suyatma <i>et al.</i> <sup>150</sup>
2	 Etilenoglicol	$34,0 \pm 1,4$	$38,1 \pm 3,6$	Suyatma <i>et al.</i> <sup>150</sup>
3	 Polietilenoglicol	$40,6 \pm 3,8$	$42,2 \pm 2,9$	Suyatma <i>et al.</i> <sup>150</sup>
4	 Propilenoglicol	$44,6 \pm 1,9$	$36,6 \pm 3,9$	Suyatma <i>et al.</i> <sup>150</sup>
5	 Sorbitol	$74,2 \pm 8,6$	$2,7 \pm 0,22$	Rodriguez-Nunez <i>et al.</i> <sup>151</sup>
6	 Álcool polivinílico	$46,99 \pm 3,85$	$26,84 \pm 7,87$	Srinivasa <i>et al.</i> <sup>152</sup>

Muitos estudos discutem as mudanças das propriedades mecânicas dos filmes de quitosana com a adição de plastificantes, Suyatma *et al.*<sup>150</sup> compararam a influência de quatro plastificantes hidrofílicos, em diferentes concentrações, nas propriedades de filmes de quitosana, são eles: glicerol (GL), etilenoglicol (EG), polietilenoglicol (PEG) e propilenoglicol (PG). Os resultados, Tabela 14 – Entrada 1 - 4, mostraram que todos os plastificantes apresentaram os efeitos esperados, mas GL e PEG, na concentração de 20 % m/m, mostram uma melhor eficiência e estabilidade de plastificação durante 5 meses de armazenamento do filme.<sup>150</sup>

Pavinatto *et al.*<sup>153</sup> utilizaram diferentes quantidades de glicerol (10, 30 e 50 % m/m em relação à massa de quitosana) e observaram o aumento da elasticidade dos filmes comparados ao filme de quitosana pura, como pode ser observado na Figura 16.

**Figura 16.** Imagens de filmes de quitosana (a) formados por quitosana pura; (b) formado por quitosana e glicerol (30 % m/m)



Fonte: Adaptado de Pavinatto, 2020.<sup>153</sup>

As propriedades dos filmes de quitosana também dependem do tipo de ácido utilizado na preparação das soluções filmogênicas. Recentemente, Melro e colaboradores utilizaram três ácidos diferentes, acético, láctico e cítrico, e compararam as propriedades das soluções filmogênicas e dos filmes formados.<sup>154</sup> Foi observado que as soluções com ácido acético apresentam a maior atividade antimicrobiana e maior viscosidade, em comparação com as misturas com ácido láctico e cítrico; além disso, os filmes de quitosana-ácido acético também apresentaram melhores propriedades mecânicas.<sup>154</sup>

Kerch e Korkhov sintetizaram filmes de quitosana usando soluções ácidas de ácido láctico e ácido acético e, de acordo com ensaios mecânicos, os filmes formados com ácido

acético apresentaram maior resistência à tração.<sup>155</sup> O estudo também avaliou a influência da concentração de glicerol nos filmes e concluiu que as melhores propriedades mecânicas foram obtidas para filmes de quitosana produzidos com ácido acético com adição de 20 % de glicerol.<sup>155</sup>

Filmes à base de quitosana são altamente permeáveis ao vapor de água, uma desvantagem que limita seu uso em produtos alimentícios, uma vez que o controle eficaz da transferência de umidade é uma propriedade importante para a conservação da qualidade dos alimentos, especialmente em ambientes de alta umidade.<sup>109, 140</sup>

Várias estratégias têm sido utilizadas para melhorar as propriedades de barreira da quitosana, como a incorporação de nanomateriais, agentes reticulantes e outros biopolímeros, por exemplo, polissacarídeos, proteínas e lipídios.<sup>107, 119</sup> Nesse sentido, filmes formados por misturas de quitosana e outros polissacarídeos, como alginatos, amido, celulose e seus derivados, já foram fabricados e estudados com objetivo de melhorar a funcionalidade como materiais de embalagens.<sup>107</sup>

Lan e colaboradores propuseram a síntese de filmes compostos por quitosana, carboximetilcelulose e alginato de sódio através do método de *casting*, e obtiveram filmes com boas características físicas, incluindo resistência à tração e transmissão de vapor de água, e boas propriedades antibacterianas e, por isso, são promissores para aplicação em embalagens antibacterianas de alimentos - Tabela 15 - Entrada 2, página 93.<sup>156</sup>

A incorporação de nanopartículas metálicas também é uma estratégia amplamente utilizada, pois além de melhorar as propriedades de barreira aos gases e controlar a resistência à umidade, esta modificação pode ajudar a aumentar a atividade antimicrobiana dos filmes de quitosana.<sup>157, 158</sup>

Nanopartículas de prata (AgNP) são as mais usadas para aplicação em embalagens de alimentos, Salari *et al.* estudaram a incorporação de AgNP em filmes de quitosana e constataram a diminuição da solubilidade e permeabilidade ao vapor de água e o aumento do módulo de elasticidade e tensão de ruptura do filme - Tabela 15 - Entrada 5.<sup>159</sup>

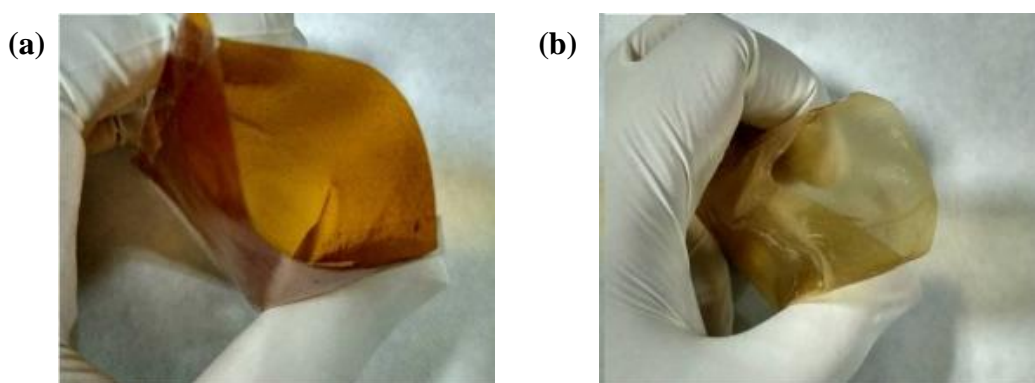
Dessa forma, a adição de novos componentes na matriz dos filmes de quitosana resulta em novas propriedades físico-químicas e adequação dos filmes para a aplicação desejada. A Tabela 15 mostra exemplos de filmes à base de quitosana contendo diferentes aditivos e suas propriedades mecânicas.

**Tabela 15.** Composição e propriedades de filmes à base de quitosana com potencial aplicação como embalagens e revestimento de alimentos

Ent.	Composição do filme à base de quitosana			Propriedades		Ref.
	Plastificante	Agente antimicrobiano	Outros aditivos	Tensão de ruptura (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	
1	–	–	–	63,1 ± 4,4	7,2 ± 1,4	150
2	Glicerol	–	Carboximetil-celulose; Alginato de sódio	65,32 ± 14,31	17,85 ± 3,86	156
3	–	ZnO Ácido gálico	–	54,83 ± 0,14	52,17 ± 0,22	157
4	–	TiO <sub>2</sub>	–	46,33 ± 1,88	25,77 ± 2,91	158
5	Glicerol	AgNP	–	24,35 ± 1,96	32,98 ± 1,96	159
6	Glicerol	–	Ácido cítrico	9,48 ± 2,62	26,43 ± 2,62	160
7	Glicerol	–	Gelatina	6,25 ± 1,17	85,4 ± 14,5	161
8	–	–	Óleo de girassol; Proteína de quinoa	0,78 ± 0,2	97,3 ± 8,1	162
9	–	–	Ácido oleico Tween 80	7,4 ± 1,9	11,0 ± 5,0	163

Priyadarshi e colaboradores preparam filmes de quitosana usando ácido cítrico e glicerol como agentes reticulante e plastificante, respectivamente.<sup>160</sup> A reticulação entre as cadeias poliméricas conferiu maior estabilidade aos filmes, além disso, os filmes ficaram mais flexíveis após a incorporação dos aditivos. No entanto, foi observada uma diminuição substancial da resistência à tração, como pode ser observado na Tabela 15 – entrada 6. A Figura 17 mostra as embalagens formadas pelos filmes de quitosana sem e com incorporação dos aditivos, as quais foram usadas para embalar pimentas verdes e observou-se que o filme contendo glicerol e ácido cítrico foi capaz de aumentar a vida útil da pimenta.

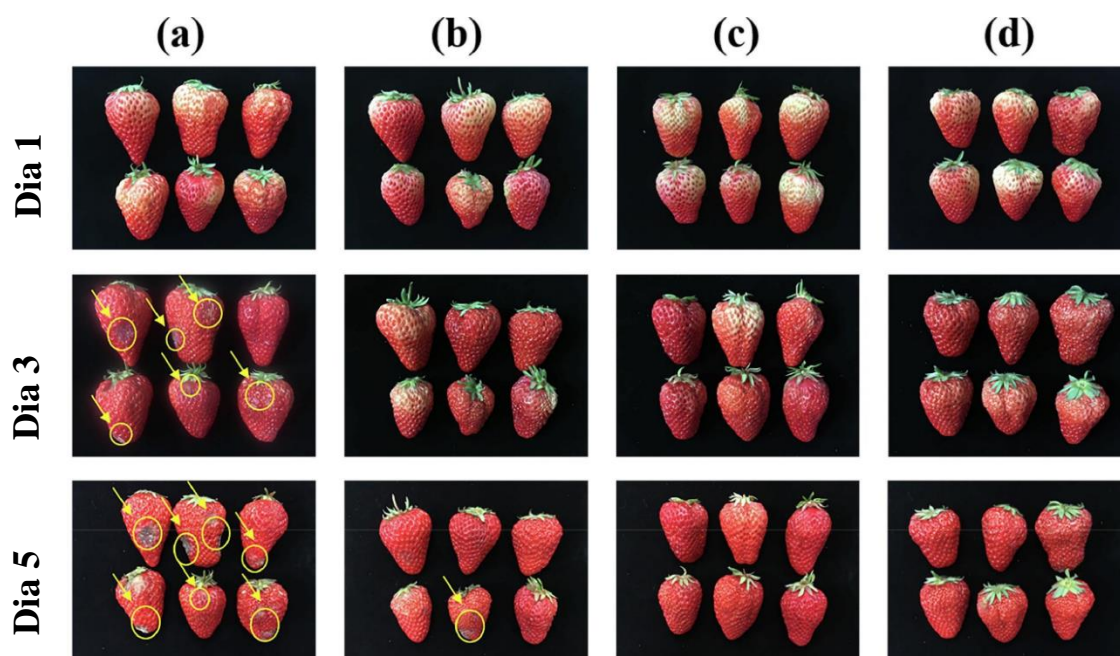
**Figura 17.** Embalagens à base de (a) filmes de quitosana pura e (b) filmes de quitosana contendo glicerol e ácido cítrico



Fonte: Adaptado de Priyadarshi, 2018.<sup>160</sup>

O uso de derivados quimicamente modificados de quitosana para obtenção de filmes biodegradáveis também tem sido amplamente estudado, e uma grande variedade de filmes à base de quitosana catiônica foi documentada para aplicações na indústria alimentícia.<sup>164</sup> Min *et al.* sintetizaram filmes à base de um derivado quaternizado da quitosana (cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana - HTMC) e álcool polivinílico, e avaliaram a capacidade desses filmes em retardar a deterioração de frutas e vegetais.<sup>82</sup> Os resultados foram satisfatórios e mostraram que a vida útil dos morangos revestidos pelo filme foi estendida, como pode ser observado na Figura 18, página 95.<sup>82</sup>

**Figura 18.** Morangos após armazenamento por 1, 3 e 5 dias (a) sem o revestimento com filme, (b) com revestimento de HTMC 1 % m/v, (c) com revestimento de HTMC 2 % m/v, (d) com revestimento de HTMC 3 % m/v



Fonte: Min, 2020.<sup>82</sup>

#### 1.4 Amadurecimento de frutas

A maturação de frutas está relacionada a uma ampla gama de processos metabólicos que ocorrem antes, durante e após sua colheita. A fisiologia pós-colheita, a vida de prateleira e as perdas por apodrecimento dos frutos são processos interligados que estão relacionados, principalmente, com a última fase de maturação da fruta, chamada amadurecimento.<sup>165</sup>

As frutas apresentam dois padrões de respiração diferentes durante o processo de amadurecimento e, com base nisso, podem ser classificadas como climatéricas ou não climatéricas.<sup>165</sup> Os frutos climatéricos são aqueles cujo amadurecimento é acompanhado por um aumento na atividade respiratória e um pico de produção de etileno após colheita, ou seja, esses frutos amadurecem mesmo depois de colhidos.<sup>166</sup>

Por outro lado, os frutos não-climatéricos não apresentam aumento na taxa de respiração e na produção de etileno após a colheita, logo, o processo de amadurecimento não continua quando o fruto é separado da planta mãe e, por isso, devem ser colhidos quando reúnem

características adequadas ao consumo.<sup>166</sup> A Tabela 16 mostra exemplos de frutas climatéricas e não climatéricas.

**Tabela 16.** Exemplos de frutas climatéricas e não-climatéricas

<b>Frutas climatéricas</b>	<b>Frutas não climatéricas</b>
Banana	Morango
Kiwi	Abacaxi
Maçã	Cereja
Ameixa	Melão
Manga	Tangerina
Mamão	Uva

Fonte: Adaptado de Paul *et al.*<sup>165</sup>

O amadurecimento e a senescência de frutas climatéricas são influenciados pelo aumento da produção de etileno à medida que a fruta atinge a maturidade, portanto, a principal forma de retardar o amadurecimento é através da prevenção, remoção ou inibição da biossíntese do etileno.<sup>167</sup> Nesse sentido, a utilização de 1-metilciclopropeno (MCP), um bloqueador da ação do etileno, é o método mais comumente empregado, entretanto, sua utilização pode afetar a qualidade da fruta, como amadurecimento com coloração irregular, amolecimento e inibição da produção de compostos voláteis e aroma da fruta.<sup>167, 168</sup>

A banana é um exemplo típico de fruta climatérica, ou seja, é uma fruta que continua a amadurecer mesmo depois de ser colhida e, como resultado, ocorrem alterações que impactam negativamente na aceitabilidade do consumidor, como mudanças de cor e perda de peso, teor de açúcar, amolecimento da polpa.<sup>124, 125</sup> Portanto, a deterioração física e biológica após a colheita faz com que a banana seja altamente perecível e possua vida de prateleira relativamente curta de 10 a 15 dias à temperatura ambiente.<sup>125, 169</sup>

O morango é uma fruta não climatérica, e apesar de não continuar a amadurecer após a colheita, são frutos altamente perecíveis e com vida de prateleira curta devido à alta



suscetibilidade a lesões mecânicas, ao amolecimento excessivo, à distúrbios fisiológicos e à infecção por diversos patógenos durante o transporte, armazenamento e processamento.<sup>170</sup>

Assim, o revestimento com filmes biodegradáveis tem sido estudado como um método pós colheita capaz de retardar o amadurecimento e aumentar o tempo de prateleira sem prejudicar a qualidade das frutas.<sup>124</sup>

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Tendo em vista as vantagens dos filmes à base de biopolímeros para aplicação em embalagens de alimentos, esse capítulo tem como objetivos o desenvolvimento e caracterização de filmes à base de quitosana para estudos de sua utilização como revestimento e embalagens de alimentos. Além disso, os filmes foram avaliados em relação à sua capacidade de conservação de alimentos por meio do armazenamento de frutas revestidas ou embaladas por eles.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de filmes de quitosana a partir do método *casting*;
- Obtenção de filmes à base de quitosana contendo aditivos, como plastificante e agentes antimicrobianos;
- Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes, tensão de ruptura, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade;
- Aplicação dos filmes como revestimento de frutas, morango e banana, e avaliação de sua capacidade na conservação desses alimentos;
- Aplicação dos filmes em embalagens de morangos e avaliação da capacidade de conservação dessa fruta.

### 3 Parte experimental

#### 3.1 Materiais

Quitosana médio peso molecular (75 – 85 % desacetilada, Sigma Aldrich), ácido acético glacial (Nox), glicerol (Synth), nitrato de prata (Avi-cenna), frutose (Neon), ácido salicílico (AS) (Vetec), cloreto de didecil-dimetilamônio 80 % (CDDA) e cloreto de *N*-alquil-dimetilbenzilamônio 50 % (CBZ), ambos obtidos pela Chemax, e quitosana quaternizada **Q1**, sintetizada nesse trabalho. Bananas do tipo prata, colhidas diretamente no produtor ou compradas em hortifruti na cidade de Belo Horizonte, e morangos, comprados em hortifruti na cidade de Belo Horizonte, foram utilizados nos testes para avaliar a capacidade de conservação de alimentos pelos filmes.

#### 3.2 Preparação dos filmes

Os filmes de quitosana foram preparados através do método *casting*. Em um balão de fundo redondo contendo 32,0 mL de solução de ácido acético glacial (1 % v/v), adicionou-se 0,32 g de quitosana (1 % m/v) e a mistura ficou sob agitação magnética por 24 horas, à temperatura ambiente. Após esse tempo, obteve-se uma solução homogênea, a qual foi vertida em uma placa de Petri de 150 mm de diâmetro. Em seguida, o solvente foi evaporado à temperatura ambiente por 7 dias, formando-se o filme de quitosana pura (QUI).

Os filmes à base de quitosana contendo glicerol como agente plastificante foram preparados de maneira semelhante. Nesse caso, o glicerol (10, 20 e 30 % m/m em relação à massa de quitosana) foi adicionado à solução homogênea de quitosana e a solução ficou sob agitação magnética por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as soluções filmogênicas foram vertidas em placas de Petri para a evaporação do solvente e formação dos filmes. Os filmes de quitosana contendo 10, 20 e 30 % m/m foram nomeados de GQUI 10%, GQUI 20% e GQUI 30%, respectivamente.

Filmes contendo outros aditivos foram preparados através da incorporação do aditivo na solução filmogênica de quitosana e glicerol 30% m/m, e após a homogeneização da mistura (30 minutos à temperatura ambiente), os filmes foram formados nas mesmas condições de

secagem de solvente descritas anteriormente. Os filmes foram preparados usando nitrato de prata 1, 3 e 5 % m/m de  $\text{AgNO}_3$  em relação à massa de quitosana (GAg 1%, GAg 3% e GAg 5%), cloreto de didecil-dimetilamônio 3, 5 e 10 % m/m (GCDDA 3%, GCDDA 5% e GCDDA 10%), cloreto de *N*-alquil-dimetil-benzilamônio 3, 5 e 10 % m/m (GCBZ 3%, GCBZ 5% e GCBZ 10%), ácido salicílico 1, 3 e 5 % m/m (GAS 1%, GAS 3% e GAS 5%).

Filmes de quitosana e CDDA 5 % m/m sem plastificante (CDDA 5%) foram preparados de acordo com o método descrito anteriormente, mas, nesse caso, o CDDA foi adicionado à solução filmogênica de quitosana pura.

Filmes contendo frutose como plastificantes foram preparados pela adição de frutose 5 % m/m (F 5%) e 10 % m/m (F 10%) na solução filmogênica de quitosana, seguindo as mesmas condições de secagem e formação de filme. Filme contendo o agente antimicrobiano Q1 (FQ1 1%) foi preparado pela adição de Q1 (1 % m/m) na solução filmogênica de quitosana e frutose (5 % m/m), a solução ficou agitando por 30 minutos à temperatura ambiente e o filme foi formado após a secagem do solvente (7 dias, temperatura ambiente).

### **3.3 Teste de conservação de frutas pelo método de revestimento**

Os testes foram realizados utilizando bananas do tipo prata e morangos. Os experimentos foram feitos usando frutas revestidas com filmes à base de quitosana e glicerol (30 %), com ou sem adição de agentes antimicrobianos, e frutas sem revestimento, grupo controle. Todos os testes foram feitos em triplicata.

#### **3.3.1 Teste com bananas pelo método de imersão**

As bananas utilizadas nesse teste foram colhidas com os frutos ainda verdes em uma residência na cidade de Belo Horizonte - MG. As bananas foram separadas em cachos contendo duas frutas. O revestimento foi feito através da imersão da parte superior desses cachos, chamado de pedúnculo, nas soluções filmogênicas à base de quitosana por 2 minutos. Em seguida, os cachos foram colocados em uma bancada para secagem do solvente, à temperatura ambiente. Após 24 horas, o solvente evaporou e um filme fino foi formado sobre a superfície da fruta que foi imersa na solução. O nível de maturidade das frutas foi registrado durante o armazenamento por 6 dias, à temperatura ambiente.

### **3.3.2 Teste com bananas pelo método de revestimento usando pincel**

As bananas utilizadas nesse teste foram adquiridas em um hortifruti da cidade de Belo Horizonte – MG. O teste foi feito usando as frutas individualmente, as bananas com boa uniformidade foram selecionadas e retiradas do mesmo cacho. O revestimento das bananas foi feito com o auxílio de um pincel, ou seja, as bananas foram pinceladas com as soluções filmogênicas à base de quitosana e, neste caso, toda a fruta foi coberta com a solução. Após a evaporação do solvente (24 horas, temperatura ambiente), formou-se um filme fino sobre a superfície das bananas. O nível de maturidade das frutas foi registrado durante o armazenamento por 6 dias, à temperatura ambiente.

### **3.3.3 Teste com morangos pelo método de imersão**

Os morangos foram adquiridos em um hortifruti da cidade de Belo Horizonte – MG. O revestimento dos morangos foi feito pelo método de imersão, para tanto, as frutas foram totalmente imersas nas soluções filmogênicas por 2 minutos e, em seguida, foram colocadas em uma grade para a secagem do solvente, à temperatura ambiente. Após a secagem, formou-se um filme fino sobre a superfície dos morangos. A conservação das frutas foi registrada durante o armazenamento por 5 dias, à temperatura ambiente.

## **3.4 Teste de conservação de morangos embalados com filmes à base de quitosana**

Para esse teste, soluções filmogênicas à base de quitosana contendo ou não plastificante e agentes antimicrobianos foram preparadas e, em seguida, essas soluções foram vertidas em embalagens plásticas de polietileno. Após a secagem do solvente (7 dias, temperatura ambiente), os filmes foram formados aderidos à superfície das embalagens. Os morangos foram, então, armazenados nas embalagens contendo os filmes de quitosana e a capacidade de conservação das frutas foi avaliada durante o armazenamento, à temperatura ambiente.

### 3.5 Caracterização

#### 3.5.1 Espessura do filme

A análise da espessura foi realizada utilizando um medidor analógico (Mitutoyo - modelo 7301), os valores informados são uma média de seis localizações aleatórias das folhas de filme.

#### 3.5.2 Ensaio mecânicos

As propriedades mecânicas foram determinadas utilizando uma máquina universal de ensaios mecânicos (EMIC 100 kN - modelo DL 10000). Amostras retangulares com dimensões de 1 x 5 cm foram cortadas utilizando uma prensa hidráulica (Specac GS15011). As medidas foram realizadas com a distância inicial de separação das garras fixada em 30 mm e velocidade de realização do teste igual a 5,0 mm/s. Foram utilizadas três folhas de cada tipo de filme, com dois corpos de prova cortados de cada folha, portanto, os resultados obtidos correspondem a uma média do ensaio de 6 medidas para cada filme estudado. As análises foram realizadas em colaboração com a Frente de caracterização do CTnano/UFG.

A resistência à tração ( $T_r$ ) foi calculada dividindo a carga máxima ( $F_m$ ) para quebrar o filme pela área da seção transversal do filme ( $A$ ), e a porcentagem de deformação (%E) calculada dividindo o alongamento do filme na ruptura pelo comprimento inicial, de acordo com as Equações 6 e 7, respectivamente.<sup>106, 145</sup>

$$T_r (MPa) = \frac{F_m(N)}{A (m^2)} \quad (6)$$

$$E (\%) = \frac{c_r - c_i}{c_i} \times 100 \quad (7)$$

Onde,  $c_i$  e  $c_r$  (cm) são os comprimentos do filme no início e no momento da ruptura, respectivamente.

### 3.5.3 Solubilidade em água

Para a determinação da solubilidade em água, os filmes à base de quitosana foram recortados em quadrados de 2x2 cm. Essas amostras foram colocadas em estufa a 110 °C por 2 horas e, em seguida, foram pesadas ( $P_1$ ). Então, as amostras foram imersas em recipientes contendo 30 mL de água destilada, e agitadas lenta e periodicamente por 24 horas à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram secas (110 °C por 2 horas) e pesadas ( $P_2$ ), para determinar a massa da matéria seca que não se dissolveu em água. O percentual de solubilidade, obtido pela Equação 8, é considerado como a porcentagem de massa seca do filme solubilizado após 24 horas de imersão em água.<sup>171, 172</sup> A solubilidade dos filmes foi determinada em duplicata.

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100 \quad (8)$$

### 3.6 Porcentagem de perda de massa de morangos

A perda de massa dos morangos revestidos com filmes à base de quitosana foi calculada. Para tanto, as frutas foram pesadas no início do experimento (Dia 0) e no último dia de armazenamento (Dia 5). A diferença entre o peso inicial ( $P_i$ ) e peso final ( $P_f$ ) foi considerada para os cálculos, de acordo com a Equação 9.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (9)$$

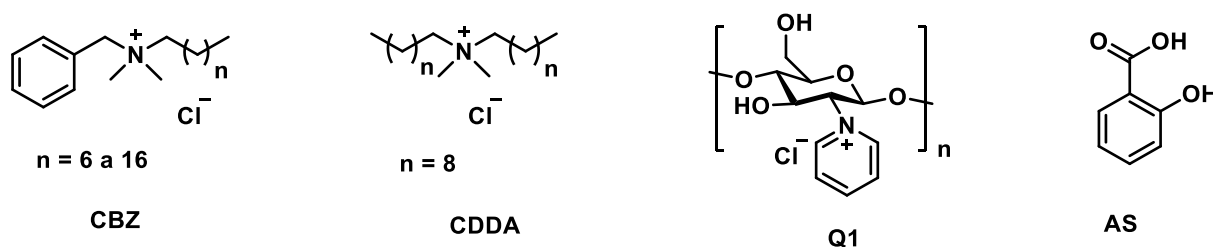
## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Preparação dos filmes de quitosana

Tendo em vista as vantagens da utilização do ácido acético na preparação das soluções filmogênicas de quitosana, e a eficiência do glicerol e frutose em melhorar as propriedades mecânicas e de barreira de filmes à base de polissacarídeos, como citado na introdução desse trabalho, esses compostos foram escolhidos para a síntese dos filmes de quitosana.

A fim de desenvolver um filme com alta atividade antimicrobiana para aplicação como embalagem ou revestimento de alimentos, a utilização de diferentes agentes antimicrobianos foi proposta. Os aditivos escolhidos foram cloreto de didecil-dimetilamônio (CDDA), cloreto de *N*-alquil-dimetilbenzilamônio ou cloreto de benzalcônio (CBZ), ácido salicílico (AS), nitrato de prata e o derivado de quitosana quaternizada Q1, sintetizado nesse trabalho, cujas estruturas estão representadas na Figura 19.

**Figura 19.** Estruturas dos sais de amônio quaternários CBZ, CDDA, Q1 e do ácido salicílico (AS)



Os compostos de amônio quaternários (QACs) são agentes antimicrobianos amplamente utilizados como desinfetantes/antissépticos e podem ser encontrados em medicamentos, cosméticos e produtos de limpeza em geral.<sup>173</sup> Esses compostos também tem sido aplicados na indústria alimentícia devido à sua baixa toxicidade para humanos e animais e por apresentarem bons resultados quando usados como sanitizantes de frutas e hortaliças.<sup>174</sup>

Derivados quaternizados de quitosana, como Q1, tem sido extensamente utilizados na preparação de filmes para aplicação em embalagens e revestimentos de alimentos e, devido à presença de uma carga positiva permanente na estrutura desses derivados, tem-se uma melhora das propriedades antimicrobianas desse polímero.<sup>82, 175</sup>

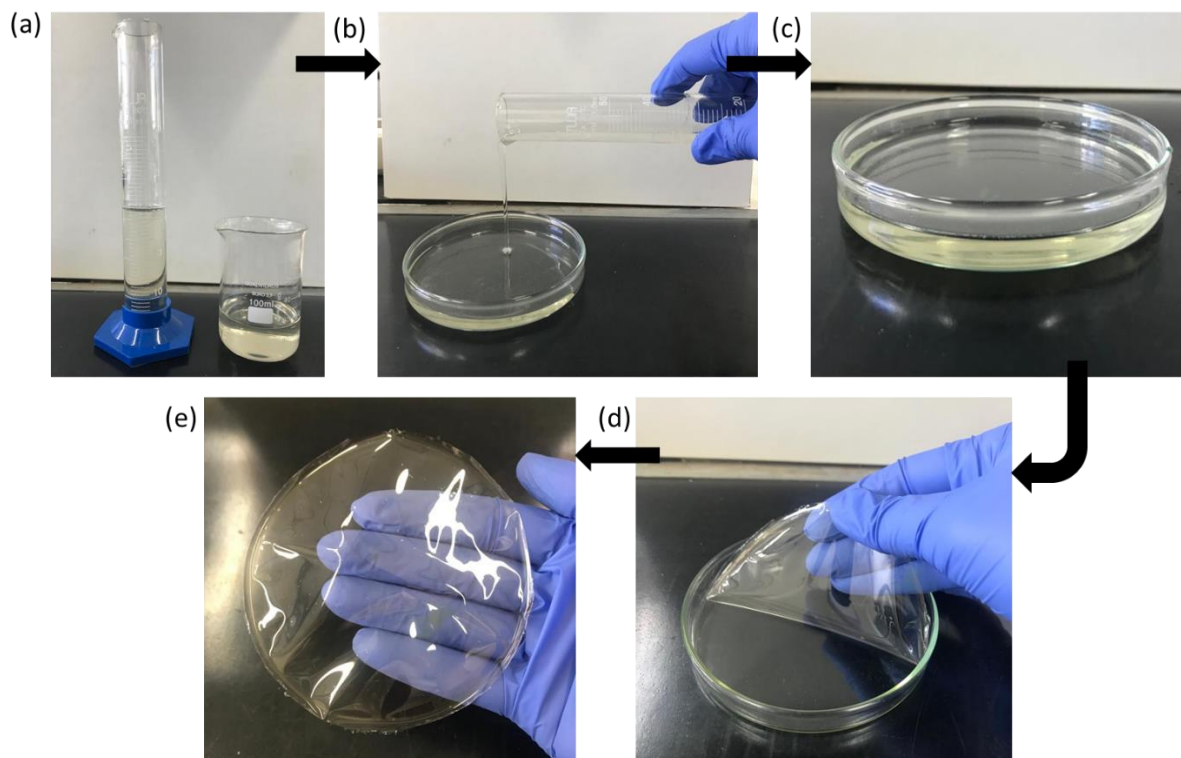


A prata é um dos metais mais utilizados como agente antimicrobiano e já é encontrada em diversas aplicações comerciais. Em filmes biodegradáveis tem sido aplicada na forma de nanopartículas e é capaz de melhorar as atividades antimicrobianas e propriedades mecânicas dos mesmos.<sup>159, 176</sup>

O ácido salicílico, por sua vez, é capaz de interferir na biossíntese e ação do etileno, hormônio relacionado ao amadurecimento de frutas, atuando como um inibidor desse hormônio,<sup>177</sup> e seus efeitos já foram demonstrados em estudos utilizando peras, cultura de células de cenoura, maçãs e bananas.<sup>178, 179</sup> Srivastava e Dwivedi verificaram que o tratamento com ácido salicílico retardou o amadurecimento dos frutos de banana, de forma que o amolecimento da fruta, o teor de açúcar redutor e a taxa de respiração diminuiram nas frutas tratadas com ácido salicílico em comparação com as não tratadas, o que pode ser explicado devido à inibição da biossíntese e/ou ação do etileno pelo ácido.<sup>178</sup>

Neste trabalho empregou-se o método *casting* para a produção dos filmes, cujo processo de produção está apresentado na Figura 20, página 106. A Tabela 17, página 106, mostra a composição de cada filme preparado nesse estudo.

**Figura 20.** Preparação dos filmes de quitosana pelo método *casting*. (a) Solução filmogênica de quitosana (1 % m/v) em ácido acético (1 % v/v), (b) transferência da solução para a placa de Petri, (c) secagem e evaporação do solvente, (d) retirada do filme do suporte, e (e) filme de quitosana



**Tabela 17.** Composição dos filmes à base de quitosana preparados nesse estudo

Nome	Composição do filme à base de quitosana (1 % m/v)	
	Aditivo	Concentração (% m/m)
QUI	–	–
GQUI 10%	Glicerol	10
GQUI 20%	Glicerol	20
GQUI 30%	Glicerol	30
GAg 1%	Glicerol	30
	AgNO <sub>3</sub>	1

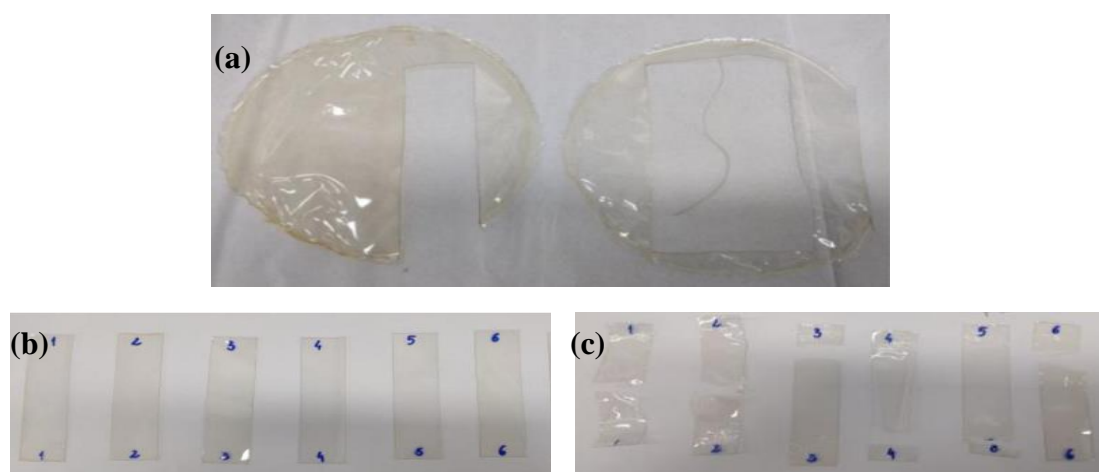
<b>Nome</b>	<b>Aditivo</b>	<b>Concentração (% m/m)</b>
GAg 3%	Glicerol	30
	AgNO <sub>3</sub>	3
GAg 5%	Glicerol	30
	AgNO <sub>3</sub>	5
GAS 1%	Glicerol	30
	AS	1
GAS 3%	Glicerol	30
	AS	3
GAS 5%	Glicerol	30
	AS	5
GCBZ 3%	Glicerol	30
	CBZ	3
GCBZ 5%	Glicerol	30
	CBZ	5
GCBZ 10%	Glicerol	30
	CBZ	10
GCDDA 3%	Glicerol	30
	CDDA	3
GCDDA 5%	Glicerol	30
	CDDA	5
GCDDA 10%	Glicerol	30
	CDA A	10
CDDA 5%	CDDA	5
F 5%	Frutose	5
F 10%	Frutose	10

Nome	Aditivo	Concentração
FQUI 1	Frutose	5
	Q1	1

#### 4.2 Propriedades mecânicas

Os ensaios mecânicos foram realizados de forma dinâmica, com aplicação de carga de tração uniaxial nas extremidades do corpo de prova, em temperatura e velocidade de deformação constantes, até atingir o ponto de ruptura do material. Assim, os parâmetros de tensão e deformação foram determinados no limite da resistência destrutiva do filme.<sup>145</sup> A Figura 21 mostra as folhas dos filmes e os corpos de prova antes e depois dos ensaios mecânicos.

**Figura 21.** (a) Folha de filme usada para a obtenção dos corpos de prova e corpos de prova (b) antes e (c) depois dos ensaios mecânicos.



Fonte: próprio autor.

As propriedades mecânicas dos filmes foram obtidas através das medidas de tensão de ruptura ( $T_r$ ) e porcentagem de alongamento (% E). A tensão de ruptura consiste no máximo de força que o filme pode suportar antes de sua ruptura, o alongamento representa o aumento do

comprimento inicial da amostra no momento de quebra do filme, ou seja, a capacidade do filme de se esticar.<sup>145</sup>

Para fins de comparação, os filmes foram preparados com diferentes concentrações de glicerol, 0, 10, 20 e 30 % m/m em relação à massa de quitosana, e do sal de amônio quaternário CDDA, 0, 3, 5 e 10 % m/m. Os valores de  $T_r$  e % E para cada filme estão descritos na Tabela 18.

**Tabela 18.** Propriedades mecânicas dos filmes à base de quitosana

Entrada	Filme	Espessura (mm)	Propriedades mecânicas <sup>a</sup>	
			Tensão de ruptura ( $T_r$ ) (MPa)	Alongamento na ruptura (E%)
1	QUI	0,035 ± 0,005	50,33 ± 6,37	15,72 ± 7,01
2	GQUI 10%	0,05 ± 0,00	24,00 ± 4,00	30,20 ± 9,32
3	GQUI 20%	0,05 ± 0,00	21,00 ± 1,78	48,84 ± 3,38
4	GQUI 30%	0,05 ± 0,00	21,33 ± 2,50	54,76 ± 8,37
5	GCDDA 3%	0,05 ± 0,00	13,00 ± 3,28	69,19 ± 9,73
6	GCDDA 5%	0,05 ± 0,00	16,33 ± 2,33	76,21 ± 6,12
7	GCDDA 10%	0,05 ± 0,00	17,33 ± 4,27	66,02 ± 10,18

<sup>a</sup> Determinado pela média das medidas realizadas em seis corpos de prova.

As propriedades mecânicas de filmes de quitosana variam de acordo com as suas características, como pureza, grau de desacetilação (GD) e peso molecular (PM), que estão associadas ao processo de fabricação do polímero.<sup>146</sup> Nunthanid et al. estudaram a influência do peso molecular e do GD nos filmes de quitosana preparados com ácido acético, e mostraram que a resistência à tração e alongamento dos filmes aumentam com um aumento do peso molecular da quitosana, enquanto o alongamento diminui com um aumento do GD.<sup>180</sup> A Tabela

19 mostra diferentes valores de propriedades mecânicas para filmes de quitosana pura relatados na literatura.

**Tabela 19.** Propriedades mecânicas de filmes de quitosana pura

<b>Composição do filme (% m/m)</b>	<b>Propriedades</b>	<b>Tensão de ruptura (<math>T_r</math>) (MPa)</b>	<b>Alongamento na ruptura (E%)</b>	<b>Ref.</b>
Quitosana 1 %	GD 82 % ; PM baixo	$45,07 \pm 3,10$	$9,34 \pm 1,13$	Nunthanid <i>et al.</i> <sup>180</sup>
	GD 100 %; PM baixo	$36,77 \pm 2,48$	$4,79 \pm 1,17$	
	GD 100 %; PM alto	$61,76 \pm 5,14$	$18,25 \pm 6,08$	
Quitosana 2 %	GD 95 %; PM baixo	$50,2 \pm 15,8$	$7,6 \pm 2,6$	Park <i>et al.</i> <sup>181</sup>
Quitosana 2 %	GD 80 %; PM médio	$59,38 \pm 4,48$	$8,35 \pm 1,48$	Srinivasa <i>et al.</i> <sup>136</sup>
Quitosana 1 %	GD 78 %; PM médio	39,10	10,84	Srinivasa <i>et al.</i> <sup>182</sup>
Quitosana 1 %	GD 80,2 %; PM médio	$50,33 \pm 6,37$	$15,72 \pm 7,01$	Presente estudo

Nesse estudo, o filme de quitosana sem incorporação de aditivo apresentou o maior valor de  $T_r$  ( $50,33 \pm 6,37$  MPa) e o menor valor de alongamento ( $15,72 \pm 7,01$  %). Alguns estudos analisaram as propriedades mecânicas de filmes formados por plásticos sintéticos e, de acordo com Su *et al.* e Rhim *et al.*, filmes de polietileno de alta densidade e propileno de baixa densidade apresentaram valores de  $T_r$  iguais a 29,3 MPa e 20,0 MPa, e % E iguais a 859 e 633, respectivamente.<sup>183</sup> Dessa forma, o valor de  $T_r$  do filme de quitosana é superior ao  $T_r$  de alguns polímeros sintéticos, diferente do valor de % E, que é bem menor para o filme de quitosana.

A adição de glicerol causou mudanças nas propriedades mecânicas dos filmes de quitosana preparados nesse estudo. O glicerol, assim como os demais plastificantes, é uma

molécula não volátil com baixo peso molecular capaz de ocupar espaços intermoleculares entre as cadeias poliméricas afastando-as umas das outras, como consequência, ocorre uma diminuição das interações intermoleculares polímero-polímero e um aumento do volume livre entre as cadeias e da mobilidade das mesmas.<sup>151, 184</sup>

Os filmes contendo glicerol tornaram-se mais flexíveis, observou-se um aumento dos valores de % E - Tabela 18 – Entrada 2- 4, esses resultados estão de acordo com estudos reportados na literatura.<sup>146, 151</sup> O efeito do glicerol nos filmes de quitosana pode ser explicado devido à substituição das ligações entre as cadeias do polímero por ligações de hidrogênio entre os grupos OH do glicerol e os grupos hidroxila e amino da quitosana, o que aumenta a mobilidade do polímero e facilita o alongamento do filme.<sup>153</sup>

Por outro lado, a adição de glicerol resultou na diminuição dos valores de  $T_r$  - Tabela 18 – Entrada 2 – 4, o que pode ser explicado pela capacidade do glicerol em reduzir as interações entre as cadeias poliméricas da quitosana, o que aumenta a mobilidade e flexibilidade do filme, e diminui sua resistência.<sup>185</sup>

Os valores de tensão de ruptura e alongamento dos filmes variaram com a quantidade de glicerol, observa-se que a  $T_r$  não obteve variação significativa ao aumentar a quantidade de glicerol de 10 % para 30 % m/m em relação à massa de quitosana. A porcentagem de alongamento na ruptura obteve maior variação, e o filme contendo glicerol na proporção de 30 % m/m foi o filme com maior flexibilidade. Portanto, a proporção de 30 % de glicerol mostrou ter o melhor efeito plastificante.

A adição de CDDA aos filmes à base de quitosana e glicerol resultou em uma diminuição dos valores de  $T_r$  e aumento de % E, um efeito semelhante ao dos agentes plastificantes. Os sais de amônio quaternário, além de suas propriedades antimicrobianas, são importantes surfactantes. A utilização de agentes surfactantes na preparação de filmes de quitosana e outros polissacarídeos já foi relatada e os resultados foram semelhantes aos obtidos nesse estudo.<sup>146, 186</sup>

Ziani *et al.* e Rodríguez *et al.*, por exemplo, avaliaram a influência de surfactantes em filmes de quitosana e amido, respectivamente, e mostraram que há um efeito sinérgico entre o glicerol e os surfactantes, de forma que, filmes contendo glicerol e tensoativos se comportaram como filmes com maior quantidade de plastificante.<sup>146, 186</sup>

### 4.3 Solubilidade dos filmes

Filmes à base de quitosana possuem alta sensibilidade à umidade, podendo até ser solúveis em água, logo, a solubilidade é um fator importante que pode limitar a aplicação desses filmes em embalagens.<sup>108</sup> A porcentagem de solubilidade dos filmes em água foi determinada e os valores estão apresentados na Tabela 20, página 113.

A solubilidade do filme de quitosana pura foi de 21,2 % após 24 horas de imersão em água. Ojagh *et al.*<sup>171</sup> e Priyadarshi *et al.*<sup>160</sup> reportaram resultados semelhantes de solubilidade, iguais a 23,2 % e 23,91 %, respectivamente. A adição do glicerol (30 % m/m) ao filme resultou em um pequeno aumento na solubilidade, nesse caso, o valor foi igual a 24,9 %. O aumento da solubilidade dos filmes após a adição de glicerol foi relatado em outros estudos, e pode ser atribuído ao comportamento hidrofílico do glicerol e ao aumento de grupos hidroxila, que possuem alta afinidade com moléculas de água, na matriz dos filmes.<sup>172, 187</sup>

Apesar da adição do agente antimicrobiano CDDA aos filmes de quitosana contendo glicerol (30 % m/m) causar uma pequena diminuição na porcentagem de solubilidade, não há uma grande diferença desses valores. Além disso, o aumento da concentração de CDDA não ocasionou maiores alterações na porcentagem de solubilidade. Ao adicionar o CDDA (10 % m/m) ao filme de quitosana sem o plastificante, a porcentagem de solubilidade teve uma pequena diminuição em relação à porcentagem do filme de quitosana pura.

Para avaliar a influência do plastificante na solubilidade, filmes de quitosana plastificados com frutose (10 % m/m) foram preparados e observou-se que esses filmes apresentaram a menor solubilidade em água, igual a 9,7 %.



**Tabela 20.** Valores de porcentagem de solubilidade dos filmes à base de quitosana

<b>Entrada</b>	<b>Filme</b>	<b>Solubilidade (%)<sup>a</sup></b>
1	QUI	21,20 ± 0,40
2	GQUI 30%	24,85 ± 0,75
3	GCDDA 3%	22,70 ± 0,60
4	GCDDA 5%	23,90 ± 0,40
5	GCDDA 10 %	23,25 ± 0,45
6	CDDA 5 %	20,25 ± 0,65
7	F 10%	9,69 ± 0,60

<sup>a</sup> Resultados reportados como média da porcentagem de solubilidade ± desvio padrão.

#### 4.4 Teste com banana – revestimento por imersão

A capacidade dos filmes em retardar o amadurecimento de bananas foi analisada utilizando bananas verdes recém colhidas, ou seja, que não passaram por nenhum tipo de tratamento pós colheita.

O primeiro teste foi feito utilizando filmes à base de quitosana sem aditivos (GQUI) ou com aditivos em diferentes concentrações, a fim de avaliar a influência na capacidade de conservação da banana pelos dos filmes. Os aditivos utilizados foram ácido salicílico (AS) (1, 3 e 5 % m/m), nitrato de prata (1, 3 e 5 % m/m), CDDA (3, 5 e 10 % m/m) e CBZ (3 ,5, 10 % m/m).

A Figura 22, página 115, mostra a aparência das bananas que tiveram a parte superior (pedúnculo) revestida pelos filmes à base de quitosana e o grupo controle, que são as bananas que não foram revestidas. Observando a Figura 22, grupo controle, é possível notar que as bananas que não foram revestidas apresentaram mudança na coloração no terceiro dia de armazenamento, essas bananas amarelaram completamente e apareceram manchas escuras em suas cascas.

Ao comparar apenas as bananas revestidas, observa-se que os filmes contendo ácido salicílico em concentração baixa, 1 % m/m (GAS 1%), foi o menos eficiente na prevenção do amadurecimento da banana, visto que o amarelamento também ocorreu no terceiro dia de armazenamento, assim como nas bananas não revestidas. Nota-se também que a capacidade de conservação das frutas aumentou com o aumento da concentração de AS nos filmes, e a concentração de 5 % m/m (GAS 5%) foi a que obteve melhor resultado, mantendo algumas bananas ainda verdes no sexto dia de armazenamento.

Nas bananas revestidas com filmes contendo  $\text{AgNO}_3$  (GAg 1%, GAg 3% e GAg 5%), o amadurecimento também foi menor quanto maior a concentração desse aditivo. Observando esse grupo, é possível notar que todas as concentrações usadas, 1, 3 e 5 % m/m, preservaram bananas verdes no terceiro dia de armazenamento, o que não aconteceu usando AS. No sexto dia, as bananas revestidas com GAg 1% e GAg 3% apresentaram as maiores modificações físicas comparadas às revestidas com GAg 5%.

Ao analisar as bananas revestidas com filmes contendo sais de amônio quaternários, CBZ e CDDA, notamos que o aumento da concentração dos sais influencia de forma negativa no amadurecimento das bananas, o contrário do que foi observado para Ag e AS. No sexto dia de armazenamento, as bananas que ficaram mais amareladas e apresentaram o aparecimento de manchas escuras em sua casca, foram as bananas revestidas por GCBZ 10% e GCDDA 10%.

Os revestimentos contendo CBZ foram capazes de controlar o amadurecimento das bananas até o terceiro dia de armazenamento, já no sexto dia, as bananas ficaram todas amareladas independente da concentração usada, portanto, esse foi o aditivo que apresentou menor eficiência na conservação da fruta.

Ao contrário, os revestimentos contendo CDDA foram os que apresentaram a melhor capacidade de controlar o amadurecimento das bananas, e quando usado em concentrações mais baixas, 3 e 5 % (GCDDA 3% e GCDDA 5%), conseguiu manter as bananas verdes por mais tempo.

As bananas revestidas com filmes de quitosana sem aditivo (GQUI 30%) também conservaram as características da fruta verde por mais tempo que as bananas sem revestimento, no entanto, a adição de  $\text{AgNO}_3$  e CDDA melhorou a capacidade do filme na conservação das frutas.

Portanto, praticamente todos os filmes à base de quitosana foram capazes de retardar o amadurecimento das bananas, já que, em todos os casos, exceto para GAS 1%, o

amadurecimento foi mais lento que o das bananas armazenadas sem revestimento. Além disso, os filmes que apresentaram melhores resultados foram aqueles contendo Ag, em maiores concentrações, e CDDA, em menores concentrações.

**Figura 22.** Aparência física das bananas revestidas por filmes à base de quitosana e do grupo controle armazenadas à temperatura ambiente, nos dias 0, 3 e 6.



GAS 1%



GAS 3%



GAS 5%



GCBZ 3%



GCBZ 5%



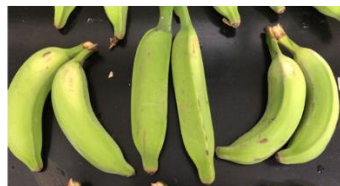
GCBZ 10%



GCCDA 3%



GCCDA 5%



GCCDA 10%



#### 4.5 Teste com banana - revestimento com pincel

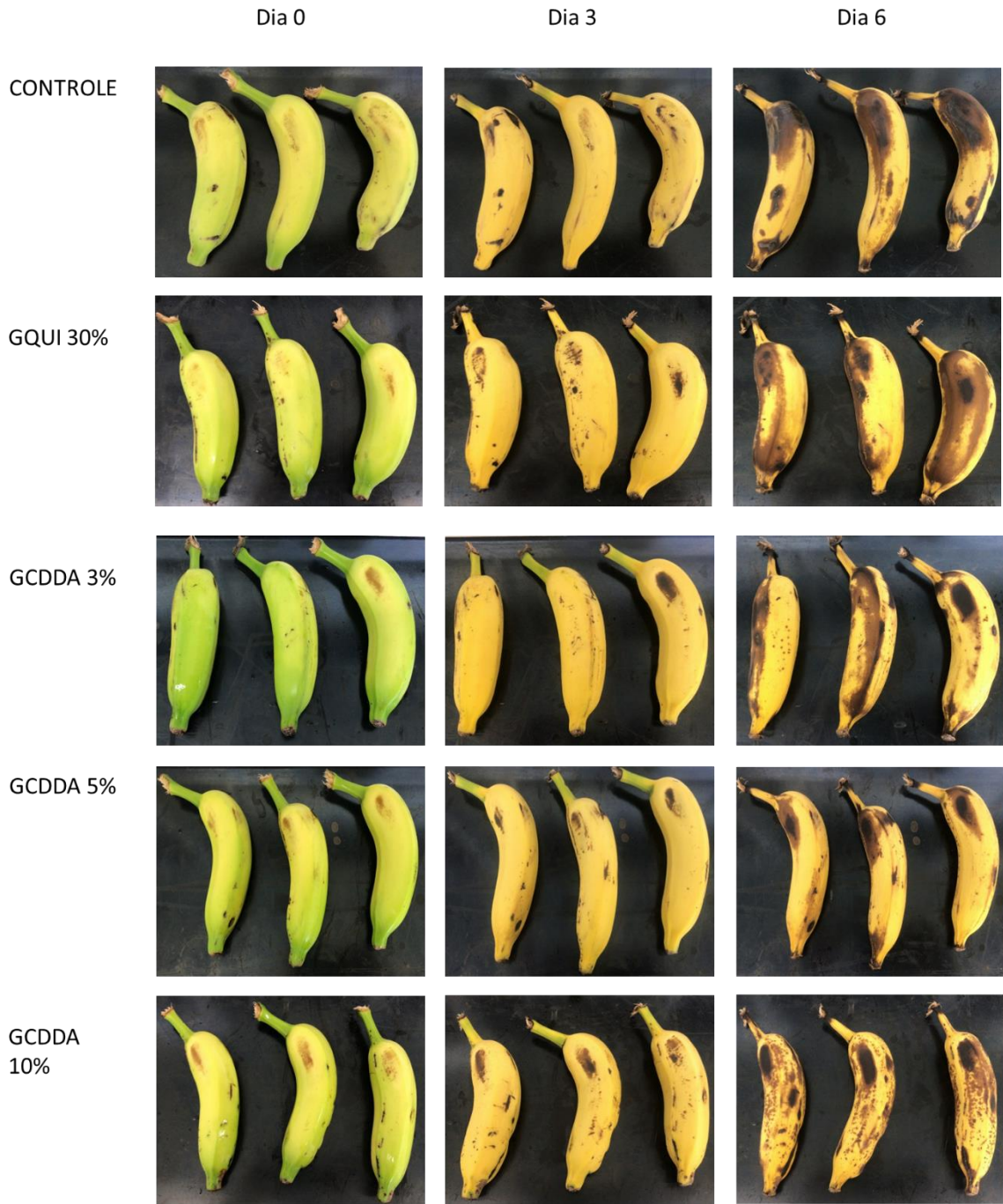
O segundo teste utilizando os filmes para revestimento de bananas foi feito com bananas adquiridas em um hortifruti e em um nível de amadurecimento mais avançado que as bananas utilizadas no teste anterior. Além disso, o método de revestimento foi modificado, nesse caso, as bananas foram totalmente revestidas com os filmes de quitosana com a utilização de um pincel.

As bananas foram revestidas com filmes à base de quitosana e glicerol 30 % (GQUI) e com adição de CDDA nas concentrações de 3, 5 e 10 % (GCDDA 3%, GCDDA 5% e GCDDA 10%, respectivamente), e o grupo controle é formado por bananas sem revestimento. A Figura 23, página 118, mostra a aparência das frutas no dia zero, no terceiro e sexto dia de armazenamento.

No sexto dia de armazenamento, todas as frutas apresentaram manchas escuras em suas cascas, no entanto, as frutas revestidas por filmes de quitosana pura apresentaram manchas por quase toda a casca, assim como as bananas não revestidas. As bananas revestidas com filmes contendo CDDA apresentaram manchas menores, e, nesse caso, a melhor concentração do sal de amônio foi de 5 % m/m. Portanto, assim como no estudo anterior, a adição do sal de amônio quaternário CDDA melhorou a capacidade de conservação das bananas pelos filmes à base de quitosana.

Ao comparar os dois testes usando bananas, podemos afirmar que o controle do amadurecimento dessas frutas é mais efetivo quando elas são revestidas pelos filmes logo após a colheita, já que, nesse caso o aparecimento de manchas escuras na casca foi muito menor ao longo dos seis dias de armazenamento. Além disso, o recobrimento apenas do pedúnculo já foi suficiente para a manter a qualidade e prolongar a vida útil das bananas.

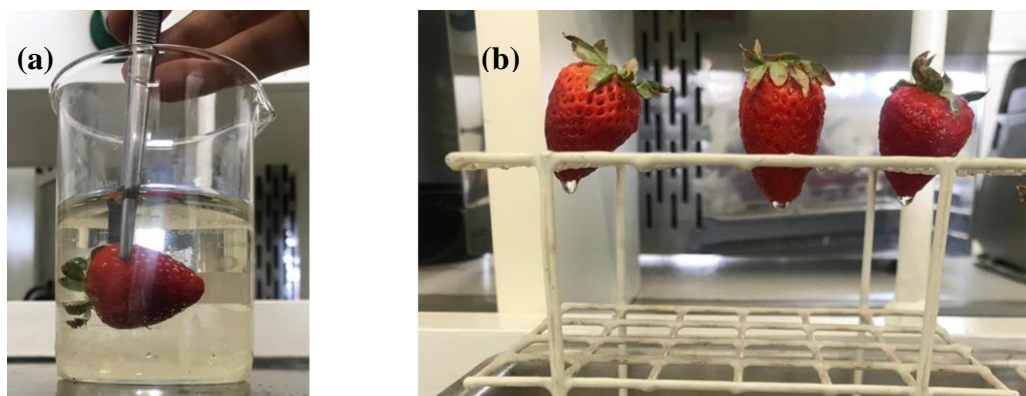
**Figura 23.** Características físicas de bananas totalmente revestidas por filmes à base de quitosana e grupo controle, bananas sem revestimento



#### 4.6 Testes com morango - revestimento por imersão

Levando em consideração os resultados obtidos nos testes utilizando banana, o revestimento dos morangos foi feito usando os filmes à base de quitosana pura (GQUI 30%) e com adição do sal de amônio quaternário CDDA nas concentrações de 3, 5 e 10 % m/m (GCDDA 3%, GCDDA 5% e GCDDA 10%, respectivamente). Nesse teste, os morangos foram totalmente imersos nas soluções filmogênicas, Figura 24, e, após a secagem do solvente, formou-se um filme fino revestindo toda a fruta.

**Figura 24.** Revestimento do morango com filmes à base de quitosana através da (a) imersão na solução filmogênica e (b) secagem do solvente



Os morangos foram armazenados durante cinco dias e as mudanças físicas dessas frutas foram registradas, Figura 25, página 121. No terceiro dia de armazenamento, os morangos sem revestimento e revestidos com GQUI 30% e GCDDA 5% apresentaram manchas escuras, conforme mostrado pelas setas azuis. Os morangos revestidos com GCDDA 3% e GCDDA 10% apresentaram menos manchas no terceiro dia, no entanto, no quinto dia de armazenamento, as frutas ficaram com coloração mais desigual e escura.

A perda de peso dos morangos também foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 21, página 120. Os morangos não revestidos foram os que apresentaram a maior porcentagem de perda de peso no quinto dia de armazenamento (Tabela 21 – Entrada 1). Os morangos revestidos com os filmes GCDDA 3% e GCDDA 10% foram os que melhor preservaram o peso das frutas durante o armazenamento (Tabela 21 – Entradas 3 e 5).

Esses resultados mostram que a eficiência da conservação de morangos aumentou com a adição de CDDA nos filmes de quitosana, o que está de acordo com os resultados obtidos nos testes com bananas.

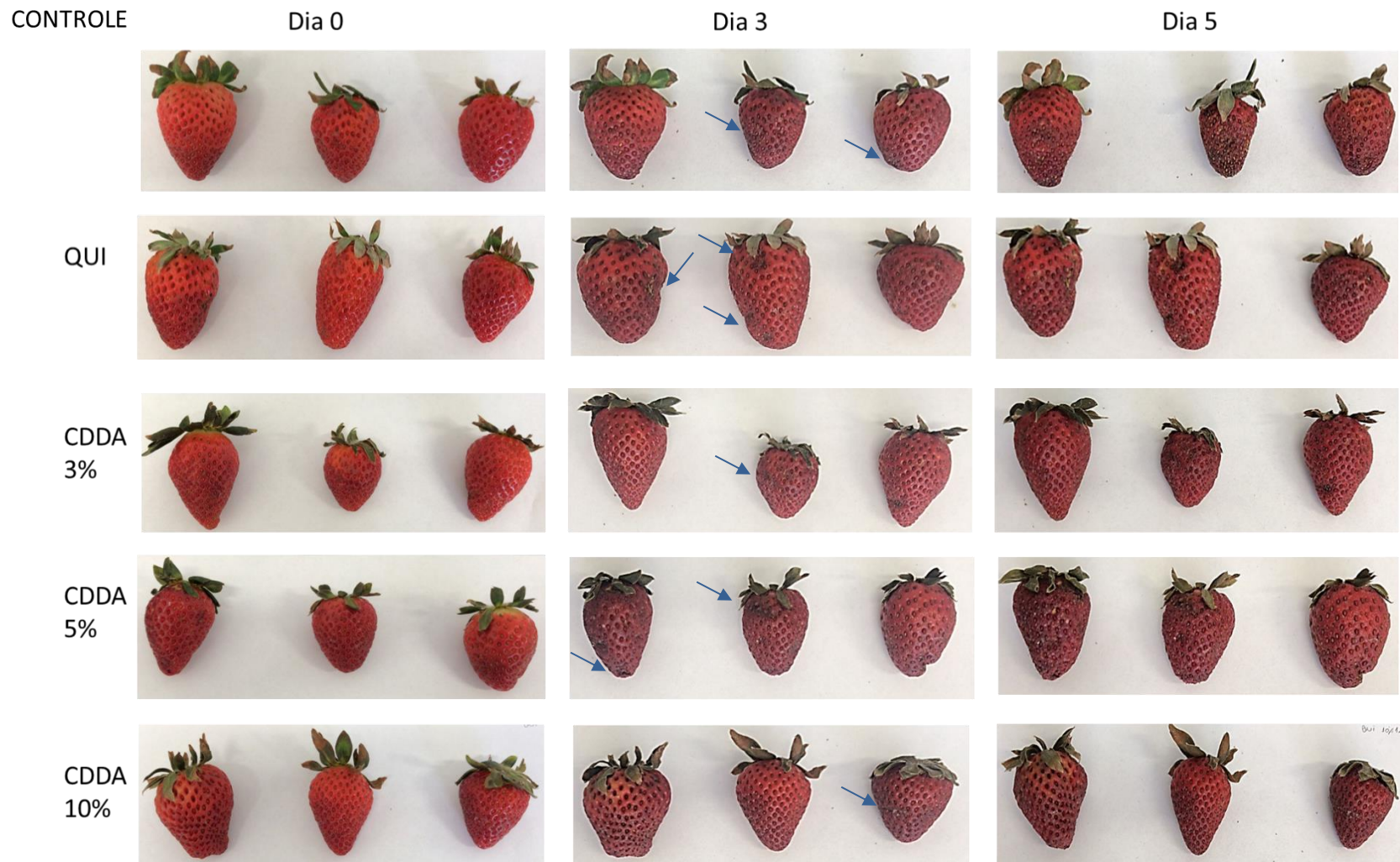
**Tabela 21.** Porcentagem de perda de peso dos morangos armazenados por cinco dias

<b>Entrada</b>	<b>Revestimento</b>	<b>Porcentagem de perda de peso (%) <sup>a</sup></b>
<b>1</b>	Sem revestimento (grupo controle)	37,84 ± 3,60
<b>2</b>	GQUI	20,28 ± 3,37
<b>3</b>	GCDDA 3%	15,95 ± 3,14
<b>4</b>	GCDDA 5%	24,52 ± 3,68
<b>5</b>	GCDDA 10%	17,83 ± 3,00

<sup>a</sup> Resultados reportados como média da porcentagem de perda de peso ± desvio padrão.



**Figura 25.** Aparência física dos morangos revestidos com filmes à base de quitosana e morangos sem revestimento



#### 4.7 Testes de morango embalados com filmes à base de quitosana

A aplicação dos filmes como embalagens de frutas também foi avaliada nesse estudo. Para tanto, embalagens comerciais de polietileno foram usadas como suporte na preparação dos filmes, os quais foram então formados na parte inferior e na tampa de cada embalagem.

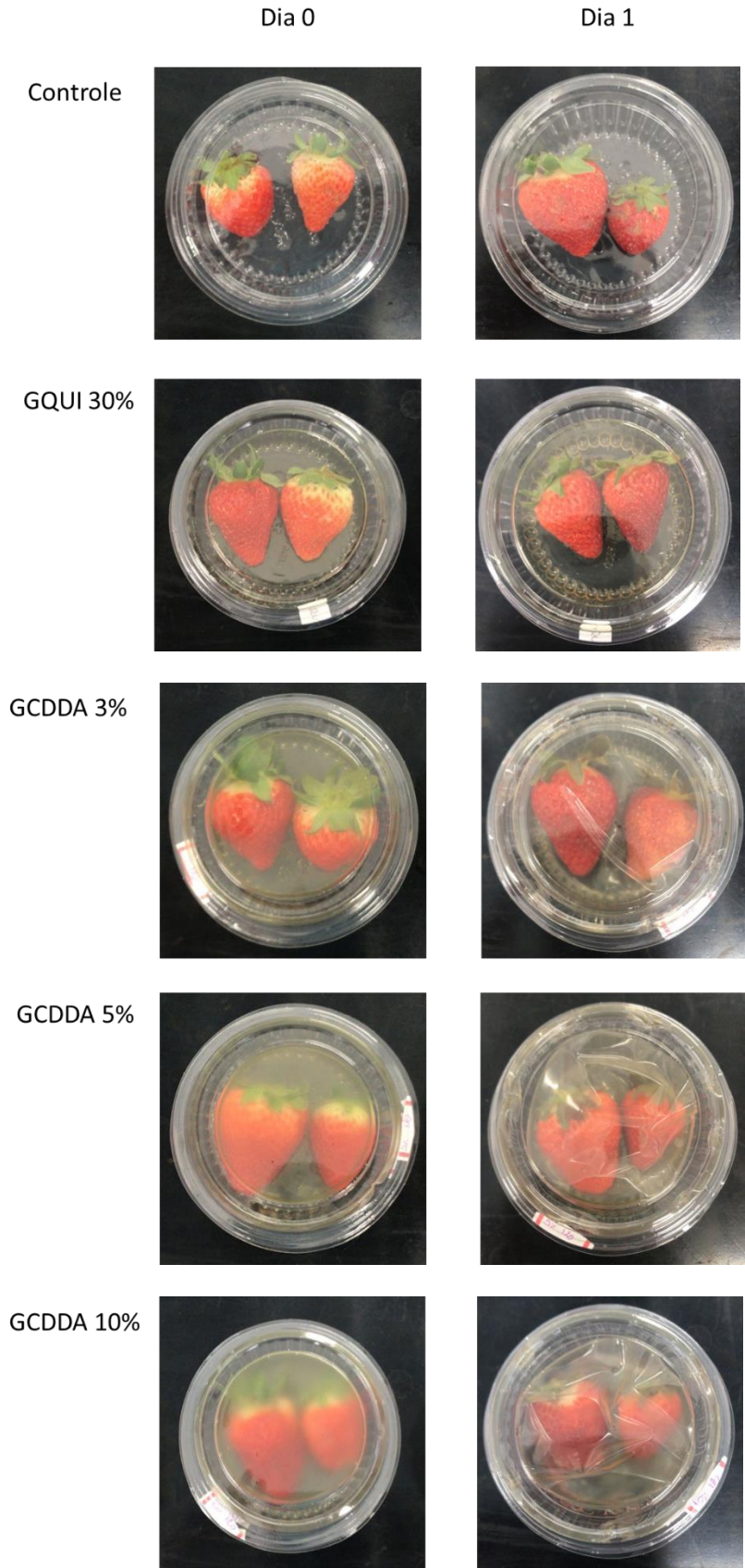
Nesse teste foram usados os filmes GQUI 30%, GCDDA 3%, GCDDA 5% e GCDDA 10%. A Figura 26, página 123, mostra os morangos armazenados nas embalagens contendo os filmes e na embalagem sem filme, controle, nos dias 0 e 1 de armazenamento.

Ao comparar essas embalagens, observa-se que o filme GQUI 30% é o mais transparente, sendo possível visualizar os morangos nitidamente dentro da embalagem. A adição do agente antimicrobiano CDDA diminui a transparência do filme e, quanto maior a concentração de CDDA, menor é a transparência.

No dia 1 do armazenamento, os filmes contendo CDDA apresentaram uma textura gelatinosa e começaram a se desprender da embalagem, na qual estavam aderidos, como é possível observar na Figura 26. Observou-se também que as mudanças na textura dos filmes foram mais evidentes com o aumento da concentração de CDDA.

No segundo dia de armazenamento, observou a presença de água no interior de todas embalagens, no entanto, a quantidade de líquido nas embalagens contendo os filmes foi maior em comparação à embalagem controle, o que resultou no intumescimento e aumento do aspecto gelatinoso dos filmes. A presença de líquido nas embalagens de alimentos não é interessante pois o ambiente úmido favorece o crescimento de micro-organismos, como aconteceu com os morangos usados nesse teste.

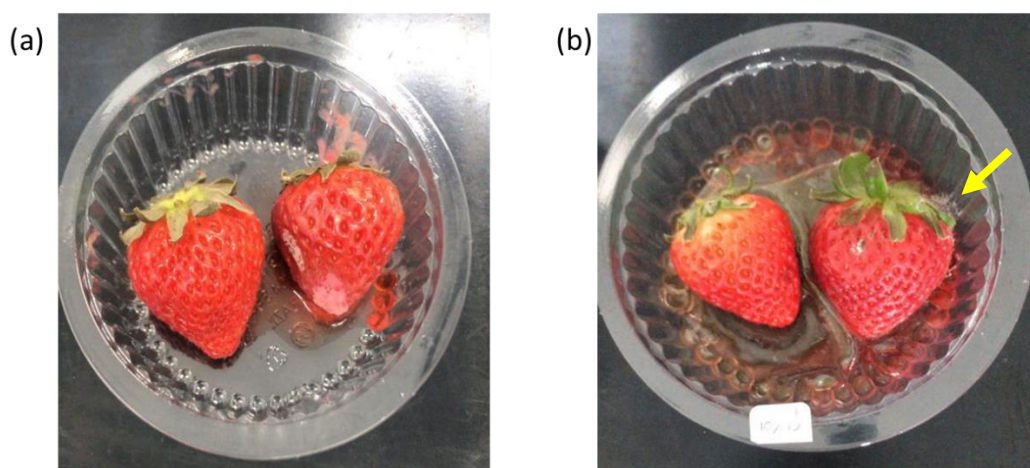
**Figura 26.** Morangos armazenados em embalagens contendo filmes à base de quitosana e grupo controle



A Figura 27 mostra o interior das embalagens contendo GCDDA 5% e do controle. Nela, é possível observar a presença de água no interior dessas embalagens e o desenvolvimento de micro-organismos no morango armazenado na embalagem com CDDA, apontado na imagem pela seta amarela.

De acordo com Ibrahim *et al.*, a adição de plastificantes em filmes de biopolímeros reduz as interações entre as moléculas do polímero e aumenta o espaço livre entre as cadeias poliméricas, permitindo, assim, a penetração de moléculas de água na matriz do filme e, conseqüentemente, aumenta sua solubilidade.<sup>149</sup> Além disso, a natureza hidrofílica do glicerol também influencia a solubilidade dos filmes em água. Suyatma e colaboradores analisaram as propriedades da superfície de filmes de quitosana com e sem adição de glicerol e revelaram que a plastificação aumenta a hidrofiliabilidade dos filmes.<sup>150</sup> Como discutimos anteriormente, os surfactantes produzem um efeito plastificante quando são adicionados a filmes contendo glicerol, portanto, os resultados encontrados nesse teste podem ser explicados pelo fato da adição de CDDA aumentar o efeito plastificante e, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água, o que resulta no intumescimento e aspecto gelatinoso do filme.

**Figura 27.** Fotos dos morangos armazenados no dia 2 (a) na embalagem controle e (b) na embalagem contendo o filme GCDDA 5%



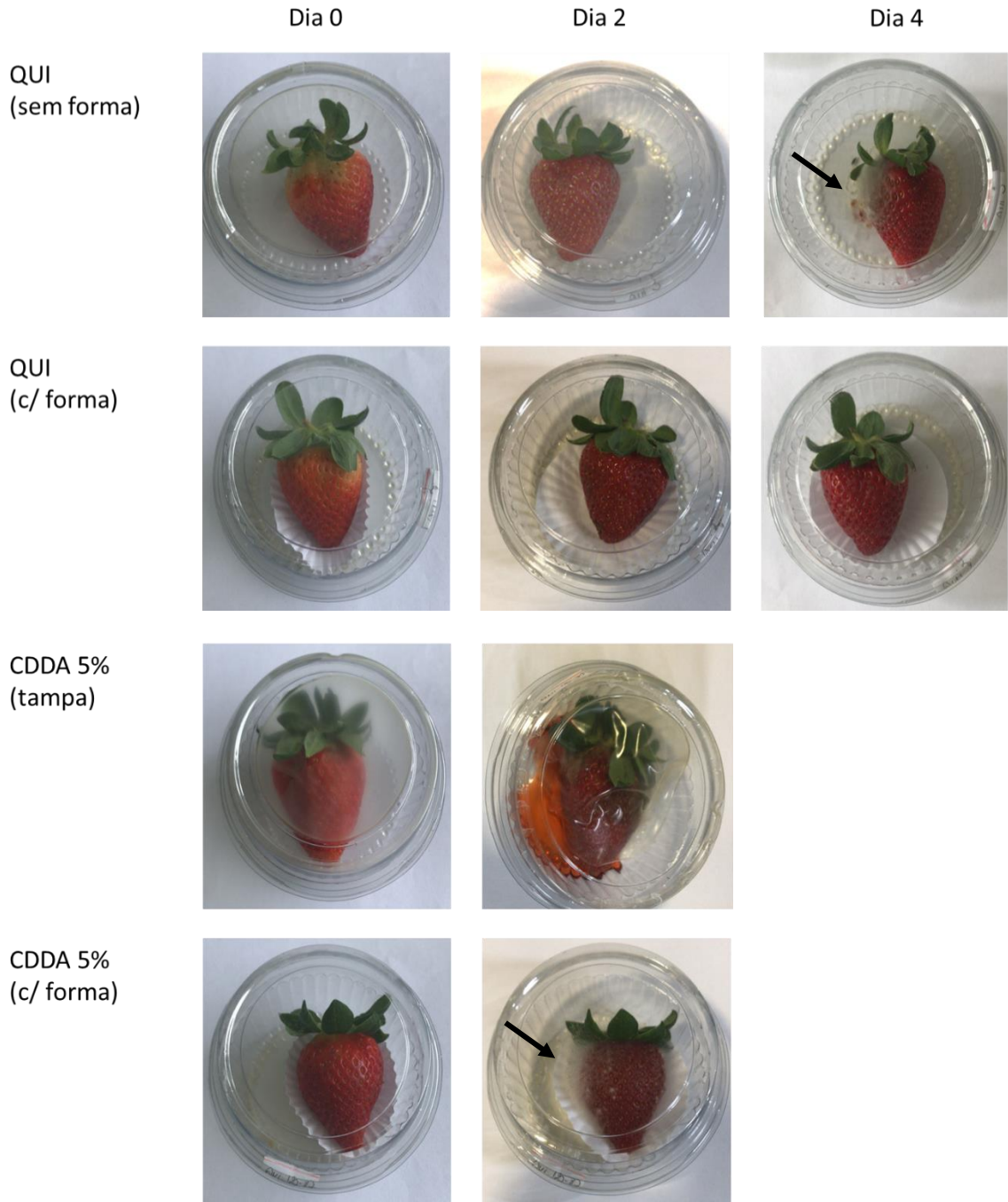
Dessa forma, outros testes foram feitos para analisar o efeito do glicerol e do CDDA na absorção de água dos filmes à base de quitosana. Utilizou-se, então, filme de quitosana sem glicerol (QUI) e filme com CDDA sem glicerol (CDDA 5%). A Figura 28, página 126, mostra a imagem dos morangos embalados durante 4 dias de armazenamento.

Os filmes contendo CDDA foram colocados na parte inferior ou na tampa da embalagem, a fim de analisar se a absorção de água pelo filme seria influenciada pela sua posição na embalagem. Min e colaboradores estudaram a aplicação de filmes à base de um derivado de quitosana na embalagem de morangos e colocaram essas frutas em uma forma, logo, o mesmo foi feito nesse teste, com o objetivo que avaliar a influência do contato direto do filme com a fruta.<sup>82</sup>

Os resultados mostraram que as embalagens contendo CDDA não foram capazes de preservar os morangos por mais de 3 dias de armazenamento. Quando o filme foi colocado na tampa da embalagem, observou-se resultados semelhantes aos obtidos usando glicerol (GCDDA 5%), como a presença de água na embalagem e intumescimento do filme pela absorção de água. Ao usar o filme na parte inferior e colocar o morango em uma forma de papel, não observou-se a presença de água na embalagem, mas ocorreu o crescimento de micro-organismos na fruta, destacado pela seta preta na imagem.

Os morangos embalados apenas com quitosana foram preservados por mais tempo, e a utilização da forma de papel ajudou na preservação da qualidade da fruta. Quando o morango foi armazenado em contato direto com o filme, observou-se que o filme ficou úmido, devido à absorção de água, o que favoreceu o crescimento de fungos na frutas, destacado pela seta. Utilizando a forma, não houve contato entre o morango e o filme, dessa forma, a absorção de água foi menor e o filme foi capaz de criar um ambiente adequado para manter a qualidade da fruta por mais tempo, até o dia 4 de armazenamento.

**Figura 28.** Morangos em embalagens contendo filmes à base de quitosana e CDDA 5%



Filmes com outro plastificante, a frutose, e outro potencial agente antimicrobiano, Q1, também foram testados para aplicação de embalagens. A Figura 29, página 128, mostra os morangos armazenados em embalagens contendo filme de quitosana e frutose F 10% e F 5% e filme de quitosana e Q1 (1 % m/m), usando frutose (5% m/m) como plastificante (FQ1 1%).

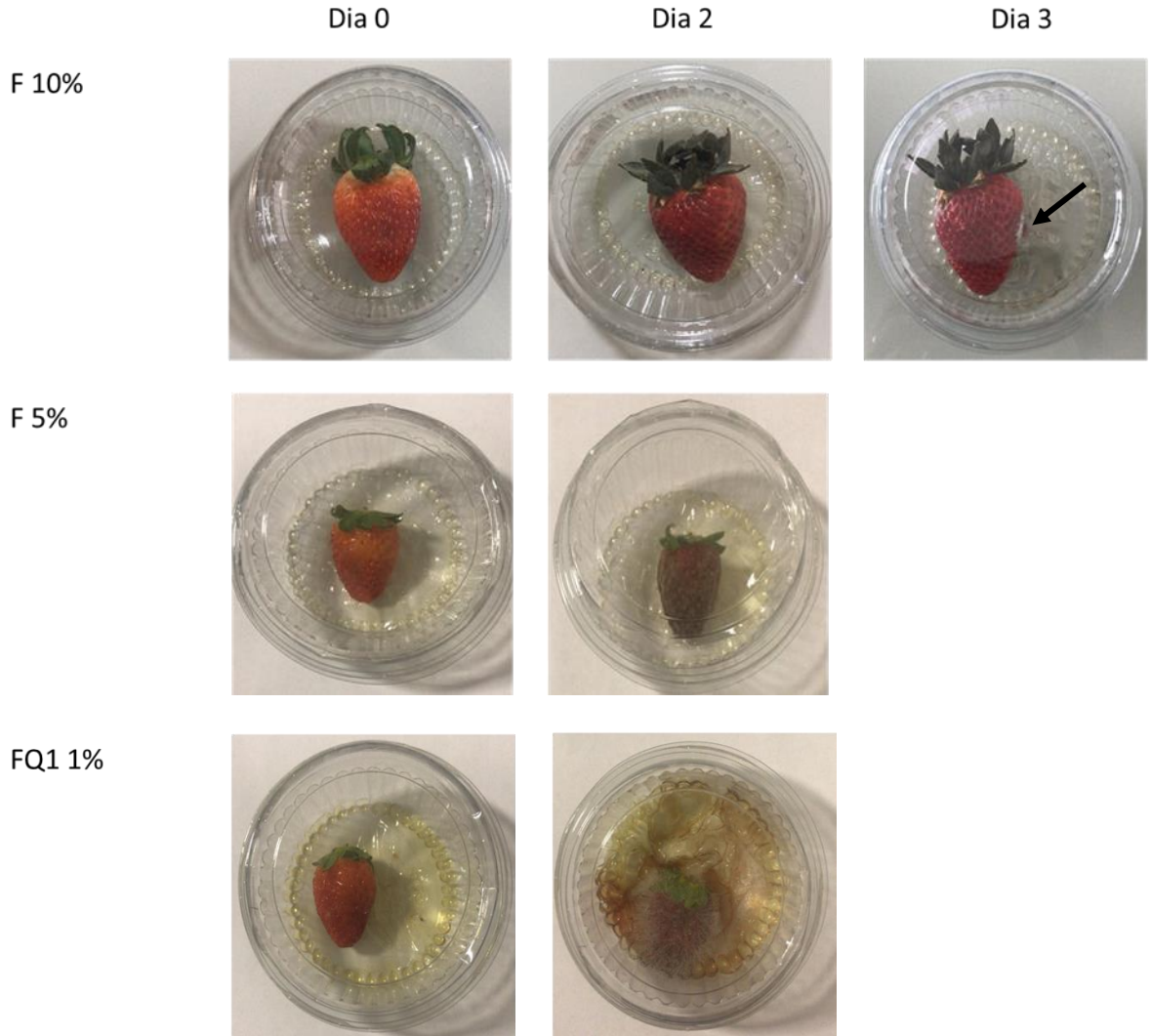
A concentração de Q1 usada para obtenção dos filmes foi de 1 % m/m em relação à massa de quitosana, essa baixa concentração se deve à dificuldade de solubilização de Q1 na solução filmogênica.

Os resultados mostraram que os filmes contendo frutose como plastificante, na concentração de 10 %, foram capazes de manter a qualidade da fruta por mais tempo, quando comparado aos filmes contendo glicerol (30 % m/m), já que, usando o filme F 10% o aparecimento de micro-organismos ocorreu no dia 3 do armazenamento e com o filme GQUI 30%, no dia 2 de armazenamento. Além disso, quanto maior a concentração de frutose, melhor a capacidade do filme em manter a qualidade do morango.

A adição de Q1 no filme de quitosana e frutose aumentou a absorção de água e, como pode ser visto na Figura 29, no dia 2 de armazenamento o filme ficou gelatinoso e úmido, além disso, foi observado o aparecimento de micro-organismos por toda a fruta, resultados parecido aos encontrados usado glicerol e CDDA.

Dessa forma, o filme de quitosana pura (QUI) foi o que preservou a qualidade dos morangos por mais tempo, e a utilização de uma forma de papel sob os morangos aumentou o tempo de conservação da fruta, até o dia 4 de armazenamento. Os agentes plastificantes e antimicrobianos usados aumentaram a absorção de água pelo filme, interferindo de maneira negativa na preservação da fruta.

**Figura 29.** Morangos embalados com filmes à base de quitosana e frutose





## 5 Conclusão

Filmes à base de quitosana (1 % m/v) foram preparados pelo método de *casting* usando solução de ácido acético (1 % v/v) como solvente, e a incorporação de agentes plastificantes e antimicrobianos foi estudada a fim de se obter filmes flexíveis, com boas propriedades mecânicas e que sejam capazes de manter a qualidade e estender a vida de prateleira de frutas. Os ensaios mecânicos mostraram que a adição de glicerol como agente plastificante aumenta a elasticidade (%E) e diminui a tensão de ruptura do filme. A quantidade de glicerol que resultou nas melhores propriedades mecânicas foi 30% m/m. Os filmes sem e com aditivos, AgNO<sub>3</sub>, CDDA, CBZ e AS, foram, então, usados como revestimento de bananas e morangos para avaliar a capacidade de conservação dessas frutas, e observou-se que a adição de CDDA, na concentração de 3 % m/m, melhorou a conservação das frutas. No entanto, os filmes contendo glicerol e CDDA não foram eficazes para serem usados como embalagens de morangos, devido à alta absorção de água desses filmes. Outro plastificante, a frutose, e agente antimicrobiano, Q1, foram usados na preparação de filmes de quitosana para embalagens de morangos, e os resultados encontrados foram semelhantes aos encontrados nos filmes com glicerol e CDDA. No entanto, o filme de quitosana pura apresentou menor absorção de água e foi o mais eficiente na preservação da qualidade dos morangos, visto que, os morangos embalados no filme QUI mantiveram sua qualidade até o dia 4 de armazenamento. Dessa forma, novos estudos devem ser feitos a fim de encontrar um agente plastificante capaz de melhorar as propriedades mecânicas dos filmes de quitosana, sem aumentar a absorção de água pelos filmes.

## Conclusões gerais

A extração de quitina a partir de um resíduo da indústria pesqueira, a casca de camarão da espécie *Penaeus brasiliensis*, por um método biológico foi avaliada nesse trabalho. Para tanto, as condições de fermentação do fungo *A. Niger* foram otimizadas a fim de avaliar a influência do meio de fermentação no crescimento do fungo e na extração de quitina. Observou-se que, a utilização de 5,0 g de glicose, pH 2,0 e 6,0, e adição das cascas de camarão nos dias 3 e 7 de fermentação, foram as melhores condições para a extração de quitina. No segunda capítulo desse trabalho, a quitosana, principal derivado da quitina, foi modificada via reação de Zincke para obtenção de um derivado quaternizado **Q1**, com potencial aplicação como agente antimicrobiano. A caracterização de **Q1** foi feita por FTIR, RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido e TG, e mostrou que esse derivado foi sintetizado com sucesso, e o ganho de massa obtido após a modificação foi igual a 52 %. Por fim, filmes à base de quitosana foram preparados para utilização como embalagens e revestimentos de frutas capazes de aumentar o tempo de vida útil das mesmas. Os resultados mostraram que a utilização do plastificante glicerol melhorou as propriedades mecânicas dos filmes de quitosana, além disso, o filme à base de quitosana contendo agente antimicrobiano CDDA (3 % m/m) foi capaz de conservar e manter a qualidade de morangos e bananas por mais tempo, quando usados como revestimento nessas frutas.

## Referências bibliográficas

- (1) El Kadib, A. Chitosan as a Sustainable Organocatalyst: A Concise Overview. *Chemsuschem* **2015**, *8* (2), 217-244.
- (2) Yang, J. S.; Han, S. Y.; Zheng, H. C.; Dong, H. B.; Liu, J. B. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *123*, 53-66.
- (3) Silva, A. K. A.; Juenet, M.; Meddahi-Pelle, A.; Letourneur, D. Polysaccharide-based strategies for heart tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *116*, 267-277.
- (4) Khalil, H.; Chong, E. W. N.; Owolabi, F. A. T.; Asniza, M.; Tye, Y. Y.; Rizal, S.; Fazita, M. R. N.; Haafiz, M. K. M.; Nurmiati, Z.; Paridah, M. T. Enhancement of basic properties of polysaccharide-based composites with organic and inorganic fillers: A review. *Journal of Applied Polymer Science* **2019**, *136* (12), 21.
- (5) Yadav, M.; Goswami, P.; Paritosh, K.; Kumar, M.; Pareek, N.; Vivekanand, V. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresources and Bioprocessing* **2019**, *6*, 20.
- (6) Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **2006**, *31* (7), 603-632.
- (7) Hamed, I.; Ozogul, F.; Regenstein, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *48*, 40-50.
- (8) Bhaskar, N.; Suresh, P. V.; Sakhare, P. Z.; Sachindra, N. M. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, *40* (5), 1427-1434.
- (9) Ghorbel-Bellaaj, O.; Younes, I.; Maalej, H.; Hajji, S.; Nasri, M. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *51* (5), 1196-1201.
- (10) El Knidri, H.; Belaabed, R.; Addaou, A.; Laajeb, A.; Lahsini, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *120*, 1181-1189.
- (11) Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs* **2015**, *13* (3), 1133-1174.
- (12) Zargar, V.; Asghari, M.; Dashti, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioeng Reviews* **2015**, *2* (3), 204-226.
- (13) Philibert, T.; Lee, B. H.; Fabien, N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2017**, *181* (4), 1314-1337.
- (14) Khor, E.; Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **2003**, *24* (13), 2339-2349.
- (15) Kyzas, G. Z.; Bikiaris, D. N. Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review. *Marine Drugs* **2015**, *13* (1), 312-337.
- (16) Muxika, A.; Etxabide, A.; Uranga, J.; Guerrero, P.; de la Caba, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *105*, 1358-1368.
- (17) Kalantari, K.; Afifi, A. M.; Jahangirian, H.; Webster, T. J. Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer - Review. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *207*, 588-600.

- (18) Helander, I. M.; Nurmiäho-Lassila, E. L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **2001**, *71* (2-3), 235-244.
- (19) 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* (6), 703-714.
- (20) *Global chitosan market size - Industry analysis report*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/global-chitosan-market>, 2019. Acesso em julho de 2019.
- (21) Jardine, A.; Sayed, S. Valorisation of chitinous biomass for antimicrobial applications. *Pure and Applied Chemistry* **2018**, *90* (2), 293-304.
- (22) Bruno, S. F.; Ekorong, F.; Karkal, S. S.; Cathrine, M. S. B.; Kudre, T. G. Green and innovative techniques for recovery of valuable compounds from seafood by-products and discards: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2019**, *85*, 10-22.
- (23) Kaur, S.; Dhillon, G. S. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* **2015**, *35* (1), 44-61.
- (24) Cauchie, H. M. Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Hydrobiologia* **2002**, *470* (1-3), 63-96.
- (25) Kaur, S.; Dhillon, G. S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Critical Reviews in Microbiology* **2014**, *40* (2), 155-175.
- (26) Kumari, S.; Rath, P.; Kumar, A. S. H.; Tiwari, T. N. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation* **2015**, *3*, 77-85.
- (27) Tolaimate, A.; Desbrieres, J.; Rhazi, M.; Alagui, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer* **2003**, *44* (26), 7939-7952.
- (28) Arbia, W.; Arbia, L.; Adour, L.; Amrane, A. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods - A Review. *Food Technology and Biotechnology* **2013**, *51* (1), 12-25.
- (29) Nouri, M.; Khodaiyan, F.; Razavi, S. H.; Mousavi, M. Improvement of chitosan production from Persian Gulf shrimp waste by response surface methodology. *Food Hydrocolloids* **2016**, *59*, 50-58.
- (30) Kjartansson, G. T.; Zivanovic, S.; Kristbergsson, K.; Weiss, J. Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (9), 3317-3323.
- (31) Espindola-Cortes, A.; Moreno-Tovar, R.; Bucio, L.; Gimeno, M.; Ruvalcaba-Sil, J. L.; Shirai, K. Hydroxyapatite crystallization in shrimp cephalothorax wastes during subcritical water treatment for chitin extraction. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *172*, 332-341.
- (32) Lopes, C.; Antelo, L. T.; Franco-Uria, A.; Alonso, A. A.; Perez-Martin, R. Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. *Journal of Cleaner Production* **2018**, *172*, 4140-4151.
- (33) Teng, W. L.; Khor, E.; Tan, T. K.; Lim, L. Y.; Tan, S. C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research* **2001**, *332* (3), 305-316.
- (34) Jung, W. J.; Jo, G. H.; Kuk, J. H.; Kim, K. Y.; Park, R. D. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *71* (2), 234-237.

- (35) Casadidio, C.; Peregrina, D. V.; Gigliobianco, M. R.; Deng, S.; Censi, R.; Di Martino, P. Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science. *Marine Drugs* **2019**, *17* (6), 30.
- (36) Pacheco, N.; Garnica-Gonzalez, M.; Ramirez-Hernandez, J. Y.; Flores-Albino, B.; Gimeno, M.; Barzana, E.; Shirai, K. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology* **2009**, *100* (11), 2849-2854.
- (37) Sorokulova, I.; Krumnow, A.; Globa, L.; Vodyanoy, V. Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2009**, *36* (8), 1123-1126.
- (38) Jo, G. H.; Jung, W. J.; Kuk, J. H.; Oh, K. T.; Kim, Y. J.; Park, R. D. Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *74* (3), 504-508.
- (39) Aranday-Garcia, R.; Guerrero, A. R.; Ifuku, S.; Shirai, K. Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products. *Process Biochemistry* **2017**, *58*, 17-24.
- (40) Wu, F. C.; Tseng, R. L.; Juang, R. S. A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals. *Journal of Environmental Management* **2010**, *91* (4), 798-806.
- (41) Woyewoda, A. D.; Shaw, S. J.; Ke, P. J.; Burns, B. G. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, N° 1448. Halifax: Department of Fisheries and Oceans, **1986**.
- (42) Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (5), 1380-1385.
- (43) Chang, K. L. B.; Tsai, G. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45* (5), 1900-1904.
- (44) Ocloo, F. C. K.; Quayson, E. T.; Adu-Gyamfi, A.; Quarcoo, E. A.; Asare, D.; Serfor-Armah, Y.; Woode, B. K. Physicochemical and functional characteristics of radiation-processed shrimp chitosan. *Radiation Physics and Chemistry* **2011**, *80* (7), 837-841.
- (45) Negrea, P.; Caunii, A.; Sarac, I.; Butnariu, M. The study of infrared spectrum of chitin and chitosan extract as potential sources of biomass. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2015**, *10* (4), 1129-1138.
- (46) Arbia, W.; Adour, L.; Amrane, A.; Lounici, H. Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology. *Food Hydrocolloids* **2013**, *31* (2), 392-403.
- (47) Haddar, A.; Hmidet, N.; Ghorbel-Bellaaj, O.; Fakhfakh-Zouari, N.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M. Alkaline Proteases Produced by *Bacillus licheniformis* RP1 Grown on Shrimp Wastes: Application in Chitin Extraction, Chicken Feather-degradation and as a Dehairing Agent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2011**, *16* (4), 669-678.
- (48) Zhang, H. C.; Yang, S. F.; Fang, J. Y.; Deng, Y.; Wang, D. F.; Zhao, Y. Y. Optimization of the fermentation conditions of *Rhizopus japonicus* M193 for the production of chitin deacetylase and chitosan. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *101*, 57-67.
- (49) Ghorbel-Bellaaj, O.; Hajji, S.; Younes, I.; Chaabouni, M.; Nasri, M.; Jellouli, K. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *61*, 243-250.

- (50) No, H. K.; Meyers, S. P.; Lee, K. S. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1989**, *37* (3), 575-579.
- (51) Mhamdi, S.; Ktari, N.; Hajji, S.; Nasri, M.; Kamoun, A. S. Alkaline proteases from a newly isolated *Micromonospora chaiyaphumensis* S103: Characterization and application as a detergent additive and for chitin extraction from shrimp shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *94*, 415-422.
- (52) Dominic, C. D. M.; Joseph, R.; Begum, P. M. S.; Raghunandan, A.; Vackkachan, N. T.; Padmanabhan, D.; Formela, K. Chitin nanowhiskers from shrimp shell waste as green filler in acrylonitrile-butadiene rubber: Processing and performance properties. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *245*, 11.
- (53) Munoz-Bonilla, A.; Echeverria, C.; Sonseca, A.; Arrieta, M. P.; Fernandez-Garcia, M. Bio-Based Polymers with Antimicrobial Properties towards Sustainable Development. *Materials* **2019**, *12* (4), 52.
- (54) Verlee, A.; Mincke, S.; Stevens, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *164*, 268-283.
- (55) Martins, A. F.; Facchi, S. P.; Follmann, H. D. M.; Pereira, A. G. B.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives Containing N-Quaternized Moieties in Its Backbone: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15* (11), 20800-20832.
- (56) Freitas, E. D.; Moura, C. F.; Kerwald, J.; Beppu, M. M. An Overview of Current Knowledge on the Properties, Synthesis and Applications of Quaternary Chitosan Derivatives. *Polymers* **2020**, *12* (12), 41.
- (57) Vianna, G. H. R.; dos Santos, I. C.; de Freitas, R. P.; Gil, L. F.; Alves, R. B. Rapid microwave-promoted solvent-free synthesis of Zincke's salts and their conversion into chiral pyridinium salts in water. *Letters in Organic Chemistry* **2008**, *5*, 396-398.
- (58) Kost, A. N.; Gromov, S. P.; Sagitullin, R. S. Pyridine ring nucleophilic cyclizations. *Tetrahedron* **1981**, *37* (20), 3423-3454.
- (59) Qin, Y. K.; Li, P. C.; Guo, Z. Y. Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: A review of structural optimization and applications. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *236*, 17.
- (60) Madera-Santana, T. J.; Herrera-Mendez, C. H.; Rodriguez-Nunez, J. R. An overview of the chemical modifications of chitosan and their advantages. *Green Materials* **2018**, *6* (4), 131-142.
- (61) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers* **2008**, *68* (6), 1013-1051.
- (62) Wang, J. H.; Wang, L.; Yu, H. J.; Zain ul, A.; Chen, Y. S.; Chen, Q.; Zhou, W. D.; Zhang, H. T.; Chen, X. Recent progress on synthesis, property and application of modified chitosan: An overview. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *88*, 333-344.
- (63) Sajomsang, W.; Gonil, P.; Saesoo, S.; Ovatlarnporn, C. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50* (1), 263-269.
- (64) Jia, Z. S.; Shen, D. F.; Xu, W. L. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research* **2001**, *333* (1), 1-6.
- (65) Xiao, B.; Wan, Y.; Wang, X. Y.; Zha, Q. C.; Liu, H. M.; Qiu, Z. Y.; Zhang, S. M. Synthesis and characterization of N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride for potential application in gene delivery. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2012**, *91*, 168-174.
- (66) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *57* (1), 19-34.

- (67) Crini, G.; Badot, P. M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in Polymer Science* **2008**, *33* (4), 399-447.
- (68) Moreira, A.; Pereira, A. D. S.; Speziali, M. G.; Novack, K. M.; Gurgel, L. V. A.; Gil, L. F. Bifunctionalized chitosan: A versatile adsorbent for removal of Cu(II) and Cr(VI) from aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *201*, 218-227.
- (69) Borsagli, F.; Carvalho, I. C.; Mansur, H. S. Amino acid-grafted and N-acylated chitosan thiomers: Construction of 3D bio-scaffolds for potential cartilage repair applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *114*, 270-282.
- (70) Motiei, M.; Kashanian, S.; Taherpour, A. Hydrophobic amino acids grafted onto chitosan: a novel amphiphilic chitosan nanocarrier for hydrophobic drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2017**, *43* (1), 1-11.
- (71) Molatlhegi, O.; Alagha, L. Adsorption characteristics of chitosan grafted copolymer on kaolin. *Applied Clay Science* **2017**, *150*, 342-353.
- (72) Du, H. L.; Liu, M. R.; Yang, X. Y.; Zhai, G. X. The role of glycyrrhetic acid modification on preparation and evaluation of quercetin-loaded chitosan-based self-aggregates. *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, *460*, 87-96.
- (73) Pires, N. R.; Cunha, P. L. R.; Maciel, J. S.; Angelim, A. L.; Melo, V. M. M.; de Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A. Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *91* (1), 92-99.
- (74) Tao, S. M.; Pang, R.; Chen, C.; Ren, X. Q.; Hu, S. W. Synthesis, characterization and slow release properties of O-naphthylacetyl chitosan. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *88* (4), 1189-1194.
- (75) Yuan, W. Z.; Zhao, Z. D.; Yuan, J. Y.; Gu, S. Y.; Zhang, F. B.; Xie, X. M.; Ren, J. Synthesis of pH- and temperature-responsive chitosan-graft-poly 2-(N,N-dimethylamino) ethyl methacrylate copolymer and gold nanoparticle stabilization by its micelles. *Polymer International* **2011**, *60* (2), 194-201.
- (76) Sahariah, P.; Masson, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (11), 3846-3868.
- (77) Zhao, J.; Li, J. Q.; Jiang, Z. L.; Tong, R. S.; Duan, X. M.; Bai, L.; Shi, J. Y. Chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) and 2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan (HTCC): The potential immune adjuvants and nano carriers. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *154*, 339-348.
- (78) Domard, A.; Rinaudo, M.; Terrassin, C. NEW METHOD FOR THE QUATERNIZATION OF CHITOSAN. *International Journal of Biological Macromolecules* **1986**, *8* (2), 105-107.
- (79) Yin, M. L.; Wang, Y. F.; Zhang, Y.; Ren, X. H.; Qiu, Y. Y.; Huang, T. S. Novel quaternarized N-halamine chitosan and polyvinyl alcohol nanofibrous membranes as hemostatic materials with excellent antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *232*, 10.
- (80) Wan, A. J.; Xu, Q.; Sun, Y.; Li, H. L. Antioxidant Activity of High Molecular Weight Chitosan and N,O-Quaternized Chitosans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61* (28), 6921-6928.
- (81) Peng, Z. X.; Wang, L.; Du, L.; Guo, S. R.; Wang, X. Q.; Tang, T. T. Adjustment of the antibacterial activity and biocompatibility of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan by varying the degree of substitution of quaternary ammonium. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *81* (2), 275-283.
- (82) Min, T. T.; Zhu, Z.; Sun, X. L.; Yuan, Z. P.; Zha, J. W.; Wen, Y. Q. Highly efficient antifogging and antibacterial food packaging film fabricated by novel quaternary ammonium chitosan composite. *Food Chemistry* **2020**, *308*, 8.

- (83) Pedro, R. D.; Takaki, M.; Goraye, T. C. C.; Del Bianchi, V. L.; Thomeo, J. C.; Tiera, M. J.; Tiera, V. A. D. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research* **2013**, *168* (1), 50-55.
- (84) Pedro, R. D.; Schmitt, C. C.; Neumann, M. G. Syntheses and characterization of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *147*, 97-103.
- (85) Pan, H.; Zhao, T.; Xu, L. H.; Shen, Y.; Wang, L. M.; Ding, Y. Preparation of novel chitosan derivatives and applications in functional finishing of textiles. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *153*, 971-976.
- (86) Sahariah, P.; Gaware, V. S.; Lieder, R.; Jonsdottir, S.; Hjalmarsdottir, M. A.; Sigurjonsson, O. E.; Masson, M. The Effect of Substituent, Degree of Acetylation and Positioning of the Cationic Charge on the Antibacterial Activity of Quaternary Chitosan Derivatives. *Marine Drugs* **2014**, *12* (8), 4635-4658.
- (87) Holappa, J.; Nevalainen, T.; Safin, R.; Soininen, P.; Asplund, T.; Luttikhedde, T.; Masson, M.; Jarvinen, T. Novel water-soluble quaternary piperazine derivatives of chitosan: Synthesis and characterization. *Macromolecular Bioscience* **2006**, *6* (2), 139-144.
- (88) Goncalves, F. J.; Freitas, R. P. Modification of Chitosan by Zincke Reaction: Synthesis of a Novel Polycationic Chitosan-Pyridinium Derivative. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2019**, *30* (11), 2318-2323.
- (89) Cheng, W. C.; Kurth, M. J. The Zincke reaction. A review. *Organic Preparations and Procedures International* **2002**, *34* (6), 585.
- (90) Zeghib, N.; Thelliere, P.; Rivard, M.; Martens, T. Microwaves and Aqueous Solvents Promote the Reaction of Poorly Nucleophilic Anilines with a Zincke Salt. *Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81* (8), 3256-3262.
- (91) Baharloo, F.; Moslemin, M. H.; Nadri, H.; Asadipour, A.; Mahdavi, M.; Emami, S.; Firoozpour, L.; Mohebat, R.; Shafiee, A.; Foroumadi, A. Benzofuran-derived benzylpyridinium bromides as potent acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *93*, 196-201.
- (92) Pang, K.; Ding, B. B.; Liu, X. T.; Wu, H.; Duan, Y. X.; Zhang, J. M. High-yield preparation of a zwitterionically charged chitin nanofiber and its application in a doubly pH-responsive Pickering emulsion. *Green Chemistry* **2017**, *19* (15), 3665-3670.
- (93) Jiang, X. A.; Chen, L. R.; Zhong, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *54* (4), 457-463.
- (94) Raymond, L.; Morin, F. G.; Marchessault, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research* **1993**, *246*, 331-336.
- (95) Yuan, Y. L.; Chesnutt, B. M.; Haggard, W. O.; Bumgardner, J. D. Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials* **2011**, *4* (8), 1399-1416.
- (96) Khor, E. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2002**, *6* (4), 313-317.
- (97) Goncalves, F. J.; Kamal, F.; Gaucher, A.; Gil, R.; Bourdreux, F.; Martineau-Corcos, C.; Gurgel, L. V. A.; Gil, L. F.; Prim, D. Synthesis, characterisation and application of pyridine-modified chitosan derivatives for the first non-racemic Cu-catalysed Henry reaction. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *181*, 1206-1212.
- (98) Das, G.; Skorjanc, T.; Sharma, S. K.; Gandara, F.; Lusi, M.; Rao, D. S. S.; Vimala, S.; Prasad, S. K.; Raya, J.; Han, D. S.; et al. Viologen-Based Conjugated Covalent Organic Networks via Zincke Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (28), 9558-9565.



- (99) Marvell, E. N.; Caple, G.; Shahidi, T. Formation of phenylpyridinium chloride from 5-anilino-N-phenyl-2,4-pentadienylideneiminium chloride - kinetics in basic media. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92* (19), 5641.
- (100) Genisson, Y.; Marazano, C.; Mehmandoust, M.; Gnecco, D.; Das, B. C. Zincke reaction with chiral primary amines - A practical entry to pyridinium salts of interest in asymmetric-synthesis *Synlett* **1992**, (5), 431-434.
- (101) Franconetti, A.; Contreras-Bernal, L.; Cabrera-Escribano, F. From Pyrylium to Pyridinium Salts: Understanding Physicochemical Features. In *Proceedings of The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, **2013**.
- (102) Shankar, R. M.; Roy, T. K.; Jana, T. Terminal Functionalized Hydroxyl-Terminated Polybutadiene: An Energetic Binder for Propellant. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *114* (2), 732-741.
- (103) de Almeida, F. T. R.; Ferreira, B. C. S.; Moreira, A.; de Freitas, R. P.; Gil, L. F.; Gurgel, L. V. A. Application of a new bifunctionalized chitosan derivative with zwitterionic characteristics for the adsorption of Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, and oxyanions of Cr<sup>6+</sup> from aqueous solutions: Kinetic and equilibrium aspects. *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, *466*, 297-309.
- (104) Neto, C. G. T.; Giacometti, J. A.; Job, A. E.; Ferreira, F. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R. Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers* **2005**, *62* (2), 97-103.
- (105) Morgado, D. L.; Frollini, E. Thermal Decomposition of Mercerized Linter Cellulose and its Acetates Obtained from a Homogeneous Reaction. *Polimeros-Ciencia E Tecnologia* **2011**, *21* (2), 111-117.
- (106) Siripatrawan, U.; Harte, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* **2010**, *24* (8), 770-775.
- (107) Kumar, S.; Mukherjee, A.; Dutta, J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology* **2020**, *97*, 196-209.
- (108) Cazon, P.; Velazquez, G.; Ramirez, J. A.; Vazquez, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids* **2017**, *68*, 136-148.
- (109) Elsabee, M. Z.; Abdou, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2013**, *33* (4), 1819-1841.
- (110) Tharanathan, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology* **2003**, *14* (3), 71-78.
- (111) Dutta, P. K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* **2009**, *114* (4), 1173-1182.
- (112) Marsh, K.; Bugusu, B. Food packaging - Roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science* **2007**, *72* (3), R39-R55.
- (113) Rhim, J. W.; Ng, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2007**, *47* (4), 411-433.
- (114) Siracusa, V.; Rocculi, P.; Romani, S.; Dalla Rosa, M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* **2008**, *19* (12), 634-643. Kale, G.; Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S. E.; Singh, S. P. Compostability of bioplastic packaging materials: An overview. *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7* (3), 255-277.
- (115) Danso, D.; Chow, J.; Streit, W. R. Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **2019**, *85* (19), 14. Plakunov, V. K.; Gannesen, A. V.; Mart'yanov, S. V.; Zhurina, M. V. Biocorrosion of Synthetic Plastics: Degradation Mechanisms and Methods of Protection. *Microbiology* **2020**, *89* (6), 647-659. Ragaert, K.; Delva, L.;

- Van Geem, K. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. *Waste Management* **2017**, *69*, 24-58.
- (116) Ali, S. S.; Elsamahy, T.; Koutra, E.; Kornaros, M.; El-Sheekh, M.; Abdelkarim, E. A.; Zhu, D. C.; Sun, J. Z. Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *Science of the Total Environment* **2021**, *771*, 22.
- (117) Shah, A. A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* **2008**, *26* (3), 246-265. Wei, R.; Zimmermann, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial Biotechnology* **2017**, *10* (6), 1308-1322.
- (118) Yam, K. L.; Takhistov, P. T.; Miltz, J. Intelligent packaging: Concepts and applications. *Journal of Food Science* **2005**, *70* (1), R1-R10.
- (119) Nestic, A.; Cabrera-Barjas, G.; Dimitrijevic-Brankovic, S.; Davidovic, S.; Radovanovic, N.; Delattre, C. Prospect of Polysaccharide-Based Materials as Advanced Food Packaging. *Molecules* **2020**, *25* (1), 35.
- (120) Kerry, J. P.; O'Grady, M. N.; Hogan, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science* **2006**, *74* (1), 113-130.
- (121) Wyrwa, J.; Barska, A. Innovations in the food packaging market: active packaging. *European Food Research and Technology* **2017**, *243* (10), 1681-1692.
- (122) Ahvenainen, R. Active and intelligent packaging: An introduction In *Novel Food Packaging Techniques*; Ahvenainen, R., Ed.; Woodhead Publishing, **2003**, 5-21.
- (123) Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J. A.; Voilley, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1998**, *38* (4), 299-313.
- (124) Thakur, R.; Pristijono, P.; Bowyer, M.; Singha, S. P.; Scarlett, C. J.; Stathopoulos, C. E.; Vuong, Q. V. A starch edible surface coating delays banana fruit ripening. *Lwt-Food Science and Technology* **2019**, *100*, 341-347.
- (125) Nguyen, T. T.; Nguyen, T. T. H.; Pham, B. T. T.; Tran, T. V.; Bach, L. G.; Thi, P. Q. B.; Thuc, C. N. H. Development of poly (vinyl alcohol)/agar/maltodextrin coating containing silver nanoparticles for banana (*Musa acuminata*) preservation. *Food Packaging and Shelf Life* **2021**, *29*, 11.
- (126) Kerch, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2015**, *46* (2), 159-166.
- (127) Song, J. H.; Murphy, R. J.; Narayan, R.; Davies, G. B. H. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **2009**, *364* (1526), 2127-2139.
- (128) Campos, C. A.; Gerschenson, L. N.; Flores, S. K. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology* **2011**, *4* (6), 849-875.
- (129) Kumar, N.; Kaur, P.; Bhatia, S. Advances in bio-nanocomposite materials for food packaging: a review. *Nutrition & Food Science* **2017**, *47* (4), 591-606.
- (130) Rhim, J. W.; Park, H. M.; Ha, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science* **2013**, *38* (10-11), 1629-1652.
- (131) Wang, H. X.; Qan, J.; Ding, F. Y. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66* (2), 395-413.

- (132) Zou, P.; Yang, X.; Wang, J.; Li, Y. F.; Yu, H. L.; Zhang, Y. X.; Liu, G. Y. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry* **2016**, *190*, 1174-1181.
- (133) Priyadarshi, R.; Rhim, J. W. Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2020**, *62*, 20.
- (134) Fernandez-Pan, I.; Ziani, K.; Pedroza-Islas, R.; Mate, J. I. Effect of Drying Conditions on the Mechanical and Barrier Properties of Films Based on Chitosan. *Drying Technology* **2010**, *28* (12), 1350-1358. Mayachiew, P.; Devahastin, S. Comparative evaluation of physical properties of edible chitosan films prepared by different drying methods. *Drying Technology* **2008**, *26* (2), 176-185.
- (135) Leceta, I.; Guerrero, P.; Ibarburu, I.; Duenas, M. T.; de la Caba, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering* **2013**, *116* (4), 889-899.
- (136) Srinivasa, P. C.; Ramesh, M. N.; Kumar, K. R.; Tharanathan, R. N. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering* **2004**, *63* (1), 79-85.
- (137) Otoni, C. G.; Avena-Bustillos, R. J.; Azeredo, H. M. C.; Lorevice, M. V.; Moura, M. R.; Mattoso, L. H. C.; McHugh, T. H. Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables-A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2017**, *16* (5).
- (138) Gol, N. B.; Patel, P. R.; Rao, T. V. R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology* **2013**, *85*, 185-195.
- (139) Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *144* (1), 51-63.
- (140) Aider, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Lwt-Food Science and Technology* **2010**, *43* (6), 837-842.
- (141) Goy, R. C.; de Britto, D.; Assis, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polimeros-Ciencia E Tecnologia* **2009**, *19* (3), 241-247.
- (142) Liu, X. F.; Guan, Y. L.; Yang, D. Z.; Li, Z.; De Yao, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* **2001**, *79* (7), 1324-1335.
- (143) Tsai, G. J.; Su, W. H.; Chen, H. C.; Pan, C. L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science* **2002**, *68* (1), 170-177.
- (144) Roller, S.; Covill, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* **1999**, *47* (1-2), 67-77.
- (145) Canevarolo, S. V. *Ciência dos polímeros*. Editora Artliber, **2006**. Disponível em: [http://www.ifba.edu.br/professores/iarasantos/QUI%20541\\_Qu%C3%ADmica%20de%20pol%C3%A9meros/Livros/Cie%C3%A7ncia%20dos%20polimeros%20-%20Canevarolo%20Jr.,%20Sebastia%C3%83o%20V..pdf](http://www.ifba.edu.br/professores/iarasantos/QUI%20541_Qu%C3%ADmica%20de%20pol%C3%A9meros/Livros/Cie%C3%A7ncia%20dos%20polimeros%20-%20Canevarolo%20Jr.,%20Sebastia%C3%83o%20V..pdf). Acesso em novembro de 2021.
- (146) Ziani, K.; Osés, J.; Coma, V.; Mate, J. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *Lwt-Food Science and Technology* **2008**, *41* (10), 2159-2165.
- (147) Vlacha, M.; Giannakas, A.; Katapodis, P.; Stamatias, H.; Ladavos, A.; Barkoula, N. M. On the efficiency of oleic acid as plasticizer of chitosan/clay nanocomposites and its role on thermo-mechanical, barrier and antimicrobial properties - Comparison with glycerol. *Food Hydrocolloids* **2016**, *57*, 10-19.

- (148) Olivas, G. I.; Barbosa-Canovas, G. V. Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *Lwt-Food Science and Technology* **2008**, *41* (2), 359-366.
- (149) Ibrahim, M. I. J.; Sapuan, S. M.; Zainudin, E. S.; Zuhri, M. Y. M. Physical, thermal, morphological, and tensile properties of cornstarch-based films as affected by different plasticizers. *International Journal of Food Properties* **2019**, *22* (1), 925-941.
- (150) Suyatma, N. E.; Tighzert, L.; Copinet, A. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (10), 3950-3957.
- (151) Rodriguez-Nunez, J. R.; Madera-Santana, T. J.; Sanchez-Machado, D. I.; Lopez-Cervantes, J.; Valdez, H. S. Chitosan/Hydrophilic Plasticizer-Based Films: Preparation, Physicochemical and Antimicrobial Properties. *Journal of Polymers and the Environment* **2014**, *22* (1), 41-51.
- (152) Srinivasa, P. C.; Ramesh, M. N.; Kumar, K. R.; Tharanathan, R. N. Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *53* (4), 431-438.
- (153) Pavinatto, A.; Mattos, A. V. D.; Malpass, A. C. G.; Okura, M. H.; Balogh, D. T.; Sanfelice, R. C. Coating with chitosan-based edible films for mechanical/biological protection of strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *151*, 1004-1011.
- (154) Melro, E.; Antunes, F. E.; da Silva, G. J.; Cruz, I.; Ramos, P. E.; Carvalho, F.; Alves, L. Chitosan Films in Food Applications. Tuning Film Properties by Changing Acidic Dissolution Conditions. *Polymers* **2021**, *13* (1), 12.
- (155) Kerch, G.; Korkhov, V. Effect of storage time and temperature on structure, mechanical and barrier properties of chitosan-based films. *European Food Research and Technology* **2011**, *232* (1), 17-22.
- (156) Lan, W. T.; He, L.; Liu, Y. W. Preparation and Properties of Sodium Carboxymethyl Cellulose/Sodium Alginate/Chitosan Composite Film. *Coatings* **2018**, *8* (8), 17.
- (157) Yadav, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, P. K. Chitosan based ZnO nanoparticles loaded gallic-acid films for active food packaging. *Food Chemistry* **2021**, *334*, 9.
- (158) Zhang, X. D.; Xiao, G.; Wang, Y. Q.; Zhao, Y.; Su, H. J.; Tan, T. W. Preparation of chitosan-TiO<sub>2</sub> composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *169*, 101-107.
- (159) Salari, M.; Khiabani, M. S.; Mokarram, R. R.; Ghanbarzadeh, B.; Kafil, H. S. Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids* **2018**, *84*, 414-423.
- (160) Priyadarshi, R.; Sauraj; Kumar, B.; Negi, Y. S. Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *195*, 329-338.
- (161) Pereda, M.; Ponce, A. G.; Marcovich, N. E.; Ruseckaite, R. A.; Martucci, J. F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* **2011**, *25* (5), 1372-1381.
- (162) Valenzuela, C.; Abugoch, L.; Tapia, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. *Lwt-Food Science and Technology* **2013**, *50* (2).
- (163) Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; Gonzalez-Martinez, C. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23* (2), 536-547.

- (164) Hu, H. X.; Yao, X. Y.; Qin, Y.; Yong, H. M.; Liu, J. Development of multifunctional food packaging by incorporating betalains from vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) into quaternary ammonium chitosan/fish gelatin blend films. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *159*, 675-684. Belalia, R.; Grelier, S.; Benaissa, M.; Coma, V. New bioactive biomaterials based on quaternized chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (5), 1582-1588. Hassan, M. M. Enhanced antimicrobial activity and reduced water absorption of chitosan films graft copolymerized with poly(acryloyloxy) ethyltrimethylammonium chloride. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *118*, 1685-1695.
- (165) Paul, V.; Pandey, R.; Srivastava, G. C. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene-An overview. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **2012**, *49* (1), 1-21.
- (166) Bron, I. U.; Jacomino, A. P. Classificação de frutos por climatério é conceito em extinção? <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va07-fisiologia01.pdf>, 2007.
- (167) Zhu, X. Y.; Shen, L.; Fu, D. W.; Si, Z. W.; Wu, B.; Chen, W. X.; Li, X. P. Effects of the combination treatment of 1-MCP and ethylene on the ripening of harvested banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* **2015**, *107*, 23-32.
- (168) Harris, D. R.; Seberry, J. A.; Wills, R. B. H.; Spohr, L. J. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. *Postharvest Biology and Technology* **2000**, *20* (3), 303-308.
- (169) Zhang, H. Y.; Yang, S. Y.; Joyce, D. C.; Jiang, Y. M.; Qu, H. X.; Duan, X. W. Physiology and quality response of harvested banana fruit to cold shock. *Postharvest Biology and Technology* **2010**, *55* (3), 154-159.
- (170) Vu, K. D.; Hollingsworth, R. G.; Leroux, E.; Salmieri, S.; Lacroix, M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International* **2011**, *44* (1), 198-203.
- (171) Ojagh, S. M.; Rezaei, M.; Razavi, S. H.; Hosseini, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry* **2010**, *122* (1), 161-166.
- (172) Nordin, N.; Othman, S. H.; Rashid, S. A.; Basha, R. K. Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids* **2020**, *106*, 8.
- (173) Jennings, M. C.; Minbiole, K. P. C.; Wuest, W. M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *Acs Infectious Diseases* **2015**, *1* (7), 288-303.
- (174) Nel, B.; Steinberg, C.; Labuschagne, N.; Viljoen, A. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana. *Crop Protection* **2007**, *26* (4), 697-705. Cao, H. W.; Kang, M. Q.; Chen, Z.; Li, L.; Cui, M. H.; Chen, M. Y.; Zhang, H. Q.; Wang, Y. H. Determination of five quaternary ammonium compounds in foodstuffs using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* **2014**, *6* (13), 4790-4796.
- (175) Hu, D. Y.; Wang, H. X.; Wang, L. J. Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. *Lwt-Food Science and Technology* **2016**, *65*, 398-405.
- (176) Rhim, J. W.; Hong, S. I.; Park, H. M.; Ng, P. K. W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (16), 5814-5822.
- (177) Brat, P.; Bugaud, C.; Guillermet, C.; Salmon, F. Review of banana green life throughout the food chain: From auto-catalytic induction to the optimisation of shipping and storage conditions. *Scientia Horticulturae* **2020**, *262*, 13.

- (178) Srivastava, M. K.; Dwivedi, U. N. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science* **2000**, *158* (1-2), 87-96.
- (179) Leslie, C. A.; Romani, R. J. INHIBITION OF ETHYLENE BIOSYNTHESIS BY SALICYLIC-ACID. *Plant Physiology* **1988**, *88* (3), 833-837. Roustan, J. P.; Latche, A.; Fallot, J. INHIBITION OF ETHYLENE PRODUCTION AND STIMULATION OF CARROT SOMATIC EMBRYOGENESIS BY SALICYLIC-ACID. *Biologia Plantarum* **1990**, *32* (4), 273-276. Romani, R. J.; Hess, B. M.; Leslie, C. A. SALICYLIC-ACID INHIBITION OF ETHYLENE PRODUCTION BY APPLE DISKS AND OTHER PLANT-TISSUES. *Journal of Plant Growth Regulation* **1989**, *8* (1), 63-69.
- (180) Nunthanid, J.; Puttipatkhachorn, S.; Yamamoto, K.; Peck, G. E. Physical properties and molecular behavior of chitosan films. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2001**, *27*, 143-157.
- (181) Park, S. Y.; Marsh, K. S.; Rhim, J. W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science* **2002**, *67* (1), 194-197.
- (182) Srinivasa, P. C.; Ramesh, M. N.; Tharanathan, R. N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21* (7), 1113-1122.
- (183) Su, J.; Zhang, J. Comparison of rheological, mechanical, electrical properties of HDPE filled with BaTiO<sub>3</sub> with different polar surface tension. *Applied Surface Science* **2016**, *388*, 531-538.
- (184) Vieira, M. G. A.; da Silva, M. A.; dos Santos, L. O.; Beppu, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal* **2011**, *47* (3), 254-263.
- (185) Farias, M. G.; Fakhouri, F. M.; de Carvalho, C. W. P.; Ascheri, J. L. R. PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF EDIBLE STARCH FILMS WITH BARBADOS CHERRY (*Malpighia emarginata* DC). *Quimica Nova* **2012**, *35* (3), 546-552.
- (186) Rodriguez, M.; Oses, J.; Ziani, K.; Mate, J. I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International* **2006**, *39* (8), 840-846.
- (187) Cerqueira, M. A.; Souza, B. W. S.; Teixeira, J. A.; Vicente, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. *Food Hydrocolloids* **2012**, *27* (1), 175-184.