

# 14

# CAPÍTULO

## **PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DA QUITOSANA NA AGRICULTURA E EM ALIMENTOS**

Thatiana Montenegro Stamford Arnaud  
Thayza Christina Montenegro Stamford  
Tânia Lúcia Montenegro Stamford  
Newton Pereira Stamford

### **14.1 INTRODUÇÃO**

A quitosana é um heteropolímero natural, amino catiônico, composto por unidades  $\beta$ -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina, derivado da N-desacetilação da quitina, denominação usual para o polímero  $\beta$ -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina). A quitina e a celulose são semelhantes em sua natureza funcional (baixa solubilidade e baixa reatividade química), e tal analogia está refletida nas funções similares desses polímeros na natureza, já que ambos atuam como material estrutural (Figura 14.1). A quitina difere da celulose na sua estrutura polimérica pela substituição da hidroxila por um grupo acetamina no carbono de posição 2,

sendo, provavelmente, a mais abundante fibra de ocorrência natural depois da celulose<sup>17</sup>.

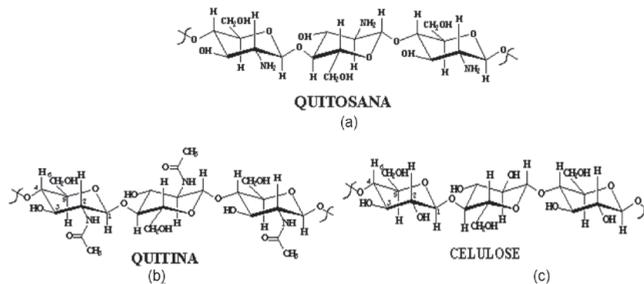


Figura 14.1 (a) Estrutura da quitosana; (b) quitina; e (c) celulose.<sup>21</sup>

A quitosana industrial é, na maioria das vezes, extraída do exoesqueleto de crustáceos, sendo obtida pela desacetilação da quitina por meio da utilização de NaOH 50% e temperatura em torno de 110 °C. A quitina e a quitosana podem ser extraídas da parede celular de algumas espécies de fungos, mais particularmente da classe *Zygomycetes* e, em geral, da ordem *Mucorales*, que apresentam maior quantidade de quitina e quitosana. A quitosana também pode ser produzida artificialmente, a partir da abertura do anel do grupo exazolina de um derivado glicosídico ou a partir da biossíntese da própria glicose, a qual é convertida inicialmente em aminoácidos, sendo, em seguida, acetilada e finalmente polimerizada por atuação enzimática<sup>2,18,37,22,31</sup>.

A quitosana é, portanto, proveniente da N-desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando diversos derivados da quitosana. Nesse sentido, a quitosana não é uma entidade química uniforme, mas um grupo de polímeros parcialmente desacetilados. Quando os produtos obtidos apresentam grau de desacetilação acima de 60%, já podem ser considerados como quitosana, sendo que as aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia<sup>22</sup>.

Na área agrícola, sabe-se que a produtividade das plantas normalmente é garantida pela utilização de fertilizantes minerais solúveis, principalmente para fornecimento de nitrogênio, fósforo e potássio. Todavia, a aplicação desses fertilizantes solúveis, na maioria das vezes, pode promover substancial aumento nos custos de produção, além de riscos de contaminação

ambiental<sup>44</sup>. Os fertilizantes potássicos encontram-se entre os mais utilizados na agricultura brasileira e são quase que inteiramente atendidos por importações, que chegam a mais de 6 milhões de toneladas por ano, uma vez que a produção nacional limita-se a apenas 650 mil toneladas ao ano<sup>41</sup>.

A utilização direta de rochas moídas na fertilização seria viável, porém seu emprego é restrito devido à sua baixa solubilidade, fazendo com que seja necessária a adição de grandes quantidades de rochas moídas<sup>46</sup>. Uma alternativa viável para a substituição de fertilizantes solúveis é a produção de biofertilizantes naturais obtidos a partir de rochas moídas inoculadas com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus* (do gênero *Proteobacteria* e gram-negativa), que tem a habilidade de produzir ácido sulfúrico por via metabólica, possibilitando a solubilização de minerais contidos nas rochas moídas. O biofertilizante de rochas obtido dessa forma origina-se de um processo prático que reduz o consumo de energia com aumento da disponibilidade de nutrientes para as plantas, e que minimiza os impactos ambientais tendo em vista que a liberação é realizada de forma mais lenta, comparada com fertilizantes minerais solúveis. Assim, verifica-se a utilização normal pelas plantas, com redução da possibilidade de arraste para as camadas mais profundas do solo e mesmo para o lençol freático, com redução da ocorrência de problemas ambientais<sup>44</sup>.

Atualmente, faz-se totalmente necessária a conservação dos alimentos, especialmente de frutos e seus subprodutos mantidos em prateleira, e nesse sentido tem sido observado sensível impacto sobre a disponibilidade de alimentos ao longo do tempo, quando em seu estado de produtos minimamente processados. A presença de fungos e, conseqüentemente, a atividade metabólica desses agentes, é reconhecida como uma das principais causas biológicas primárias de perdas de produtos perecíveis de origem vegetal, principalmente de frutas e de seus subprodutos.

O controle químico permanece sendo o principal mecanismo de controle da redução da incidência de doenças pós-colheita causadas por fungos em frutos e em seus derivados, conduzindo a uma considerável perda desses produtos antes da sua comercialização. O amplo uso de fungicidas sintéticos nesses alimentos apresenta significativas desvantagens, incluindo o aumento do custo da produção, perigos para os manipuladores, preocupação acerca de resíduos em alimentos, ameaça à saúde pública e ao meio ambiente.

Na indústria alimentícia, a quitosana também oferece um amplo espectro de possíveis aplicações, como a formação de filmes biodegradáveis, a recuperação de subprodutos, a purificação de água, a clarificação de sucos de frutas, a encapsulação de aromas, a atuação como agente antioxidante,

emulsificante e estabilizante, destacando-se sua eficácia quanto à preservação da qualidade microbiológica do alimento<sup>14,15,27</sup>.

O presente capítulo tem por objetivos a caracterização, a produção e a utilização da quitosana de crustáceos e de fungos da ordem *Mucorales*, assim como a avaliação da efetividade do biopolímero na inibição de micro-organismos toxigênicos, a fim de mostrar seu potencial de utilização na agricultura, em alimentos e no ambiente.

## 14.2 HISTÓRICO

Agências internacionais de monitoramento dos recursos alimentares no mundo reconhecem que a opção mais viável para alcançar a futura necessidade de alimentos seria a redução de perdas pós-colheita. A literatura atual é vasta em materiais sobre quitina e quitosana, e várias revisões abordando diferentes aspectos desses polímeros e seus derivados, que encontram aplicação na área industrial, tecnológica, agrícola, ambiental, na conservação de alimentos e na medicina, podem ser encontradas. As características físico-químicas derivadas da formação de complexos polieletrólíticos, com propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, justificam a razão pela qual a obtenção e produção desses polissacarídeos têm sido extensivamente estudadas na atualidade<sup>25,52,11</sup>.

Apesar de serem propostas alternativas às industriais para obtenção e produção de quitosana proveniente de crustáceos, recentes avanços na tecnologia das fermentações sugerem que o cultivo em larga escala de micro-organismos que contenham quitina e quitosana é um artifício promissor em relação à fonte tradicional de quitosana, por razões como: extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala, padronização do produto a partir do controle do processo fermentativo, além de ser uma técnica simples, de baixo custo e que não gera resíduos poluentes<sup>36,1</sup>.

Assim, tem sido investigada a habilidade da produção desses biopolímeros por diversos gêneros e espécies de fungos, tais como *Cunninghamella elegans*<sup>22,23</sup>, *C. bertholletige*<sup>1</sup>, *Mucor circinelloides*, *M. racemosus*, *M. rouxii*, *M. javanicus*, *Aspergillus niger*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida albicans*<sup>37</sup>, *Rhizopus oryzae*, *R. oligosporus*, *R. stolonifer* e *Absidia coerulea*<sup>35</sup>, relatando-se rendimentos iguais ou superiores aos obtidos por meio da utilização de fontes tradicionais<sup>3,1</sup>.

Nas últimas décadas, visando ao aproveitamento de novas tecnologias para obtenção de fertilizantes naturais biológicos, aqui denominados de biofertilizantes, intensificaram-se as pesquisas para utilização de minerais de rochas. A produção e uso de biofertilizantes fosfatados e potássicos produzidos a partir de rochas, com eficiência comprovada, tem sido relatada em diversos trabalhos<sup>44,45,30,34,39,46,47,4</sup>.

A produção de fertilizantes de rochas moídas vem sendo realizada com o uso de enxofre elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus*, produto aqui denominado de biofertilizante de rochas. O micro-organismo a partir da produção metabólica de ácido sulfúrico participa na disponibilização dos minerais contidos nas rochas, principalmente fosfatos naturais (apatitas), que possuem ampla quantidade de fósforo e cálcio (apatita), e as biotitas com potássio e magnésio. O enxofre elementar, ao ser oxidado pela bactéria *Acidithiobacillus*, produz ácido sulfúrico metabolicamente, sendo o próton H<sup>+</sup> responsável pela liberação de nutrientes contidos nos minerais. Observa-se também a produção de enxofre elementar na forma de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> solúvel, que pode ser absorvido pelas plantas.

O nitrogênio é o nutriente que mais limita a produtividade, e normalmente ocorre no solo em níveis abaixo do necessário para o desenvolvimento adequado das culturas. Em função de suas inúmeras transformações e pela sua alta solubilidade, pode sofrer lixiviação para as camadas mais profundas do solo, e mesmo para o lençol freático, possibilitando a contaminação ambiental.

Resíduos orgânicos que não apresentam possibilidades de promover problemas ambientais são denominados de matéria orgânica de nova geração. Podem ser considerados materiais orgânicos de nova geração: restos culturais, torta de mamona, torta de cana-de-açúcar, húmus de minhoca, resíduos diversos provenientes da agroindústria como resíduos da produção de bebidas, entre outros, os quais podem ser utilizados para aporte de nitrogênio e produção de biofertilizante orgânico. A incorporação de resíduos orgânicos, além de melhorar as condições físicas do solo, contribui para o aumento da atividade biológica e o fornecimento de nutrientes para a planta. Entretanto, de uma maneira geral, os resíduos empregados na agricultura apresentam baixa concentração de nitrogênio<sup>47</sup>.

As bactérias diazotróficas de vida livre são as que apresentam maior potencial de utilização como alternativa para o enriquecimento dos resíduos orgânicos em nitrogênio disponível. Tais bactérias abrangem micro-organismos que podem ser encontrados no solo e em ambientes aquáticos e que, necessariamente, não fazem parte de estruturas mutualísticas ou

associativas<sup>47,29</sup>. As bactérias diazotróficas de vida livre podem enriquecer em nitrogênio materiais orgânicos com baixo teor do nutriente, com aumento superior a 100%. Sem dúvida esse processo promove amplas e importantes possibilidades de aplicação para a produção de biofertilizante orgânico em mistura com os biofertilizantes de rochas, o que torna possível a aplicação dos nutrientes mais importantes para as culturas em forma disponível.

Por outro lado, pesquisas demonstram a liberação de quitosana por fungos da ordem *Mucorales*, como, por exemplo, *Cunninghamella elegans*, *Mucor rouxii*, *Mucor circinelloides*, entre outros, e o biopolímero tem mostrado elevado potencial na liberação de polifosfato inorgânico<sup>22,23</sup>, além de também poder atuar como bioprotetor contra doenças de plantas. Portanto, a adição de quitosana de fungos ainda poderá contribuir para a produção de um bioprotetor, com aumento considerável na disponibilização de nutrientes e também com potencial para promover resistência das plantas a fitopatógenos<sup>23,13</sup>.

A quitosana presente na parede celular de fungos (*Mucorales*) tem demonstrado grandes vantagens, tais como extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade e produção em larga escala. A quantidade desses polissacarídeos extraída da biomassa varia segundo a espécie de fungo e as condições de cultivo. Geralmente, fungos da classe *Zygomycetes* apresentam maior quantidade de quitina e quitosana em sua parede celular<sup>22,1,45</sup>.

### 14.3 APLICAÇÃO DE QUITOSANA NA AGRICULTURA

Inicialmente é realizada a produção do biofertilizante misto (BNPK) com nitrogênio, fósforo e potássio, a partir da mistura de biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas por meio da adição de enxofre elementar com a bactéria *Acidithiobacillus*, em mistura com materiais orgânicos inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre. Após a obtenção do BNPK, realiza-se a inoculação com fungo produtor de quitosana a fim de se produzir o bioprotetor<sup>44,13</sup>.

As espécies de bactérias diazotróficas atualmente selecionadas incrementam em mais de 100% o teor de nitrogênio da matéria orgânica, sendo mais utilizado o húmus de minhoca. É importante observar que, para a produção do BNPK enriquecido em nitrogênio, deve ser adicionado um componente orgânico energético, tal como resíduo de sorvete, vinhaça, resíduos de frutas, entre outros, para fornecimento de carbono e energia. A adição do resíduo

visa incrementar o desenvolvimento das bactérias diazotróficas de vida livre, que irão incorporar nitrogênio atmosférico ao biofertilizante através do processo da fixação biológica do  $N_2$ .

Em seguida, na fase de produção do bioprotetor, é promovida a atuação de fungos da ordem *Mucorales*, especialmente *Cunninghamella elegans* e/ou *Mucor circinelloides*, que apresentam quitina e quitosana na parede celular. O biopolímero quitosana comprovadamente atua na proteção das plantas contra doenças, e, como também produzem polifosfato inorgânico, aumenta a concentração de fósforo disponível no produto<sup>23</sup>.

Assim, pode ser observada a possibilidade de seu emprego na produção de um protetor e biofertilizante com ação direta no produto, através da incorporação da quitosana fúngica que ocorre na parede celular de alguns fungos, o que é uma característica de singular aplicabilidade. Vale salientar que os produtos obtidos são passíveis de aproveitamento por pequenos, médios e grandes produtores, como também, de modo especial, por indústrias de fertilizantes (Figura 14.2).

Por outro lado, também merece atenção especial a aplicação da quitosana elaborada em laboratório, principalmente na forma de nanopartículas, visando à atuação contra fitopatógenos por aplicação via foliar.



Figura 14.2 Produção do biofertilizante de rochas e orgânico (húmus de minhoca) inoculado com bactéria diazotrófica de vida livre.

## 14.4 PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE E BIOPROTETOR

### 14.4.1 Produção de biofertilizante misto (BNPK)

A eficiência agronômica dos biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas, obtidos a partir de diferentes rochas, já foi comprovada em experimentação com várias culturas econômicas e em diferentes solos<sup>44,45,46,47</sup>.

Bactérias de vida livre dotadas da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico podem ser isoladas de amostras de diferentes solos (profundidade de 0 a 20 cm), colocadas para secar, destorroadas e, em seguida, passadas em peneira (malha 50). Transferem-se 0,25 g de cada amostra de solo diretamente para placas de Petri contendo meio sílica-gel, incubadas à temperatura ambiente ( $\pm 28$  °C), por 15 dias, em câmara de crescimento tipo B.O.D., e realizam-se observações diárias.

As colônias crescidas devem ser transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura sólido LG<sup>29,12</sup>. O meio LG contém por litro:

- 20 g de sacarose ou açúcar cristal;
- 0,05 g de  $K_2HPO_4$ ;
- 0,15 g de  $KH_2PO_4$ ;
- 0,02 g de  $CaCl_2$ ;
- 0,20 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ;
- 0,002 g de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ;
- 0,01 g de  $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ ;
- 5 mL de azul de bromotimol (solução 0,5 % em etanol); e
- 1 g de  $CaCO_3$ .

Além disso, o pH é ajustado para 7,0 e ocorre a adição de 15 g de ágar (P.A.). Os novos isolados deverão ser purificados com adição de 10 mL de água destilada e esterilizada nas placas de Petri e, em seguida, realizada raspagem das colônias crescidas, utilizando câmara de fluxo laminar. As concentrações das suspensões bacterianas devem ser ajustadas para densidade ótica ( $DO_{560nm}$ ) de 0,4 em espectrofotômetro e, em seguida, deve-se transferir alíquota de 1 mL para Erlenmeyers contendo 1 L de meio de cultura líquido LG. Após a purificação, os isolados deverão ser mantidos em tubos com meio LG e então conservados em óleo mineral. Posteriormente, deve-se realizar a manutenção definitiva por liofilização. É interessante realizar a caracterização morfológica e genotípica de novos isolados. Normalmente

as amostras resultantes da PCR devem ser enviadas para laboratórios especializados em sequenciamento, e, posteriormente, as sequências devem ser comparadas com as existentes em bancos de dados on-line e com amostras da Embrapa (Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia – CNPAB, no Rio de Janeiro).

#### 14.4.2 Produção de bioprotetor com quitosana

Para a produção de bioprotetor, podem ser utilizados fungos da ordem *Mucorales*, como *Cunninghamella elegans*, *Mucor circinelloides* e *Mucor rouxii*, entre outros, cujas amostras devem ser estocadas em meio BDA sob refrigeração (5 °C). Esporângios produzidos pelos fungos devem ser coletados em água destilada, contados em hematocítômetro com padronização de inóculo em  $10^7$  (esporângios  $\text{mL}^{-1}$ ), e as células devem ser crescidas em meio sintético para *Mucorales* (SMM), constituído de:

- 40 g  $\text{L}^{-1}$  de glicose;
- 2 g  $\text{L}^{-1}$  de asparagina;
- 0,005 g  $\text{L}^{-1}$  de tiamina;
- 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  de fosfato de potássio; e
- 0,25 de g  $\text{L}^{-1}$  sulfato de magnésio<sup>26</sup>.

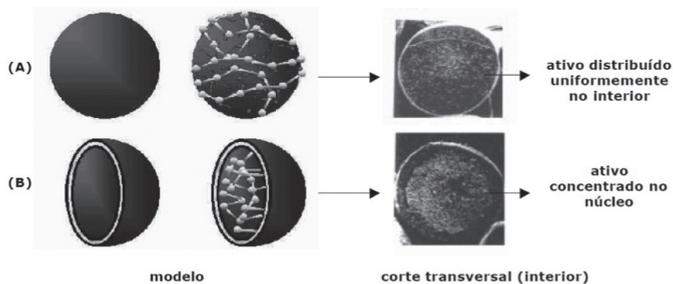
Deve-se transferir cerca de 1 mL de inóculo para frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio. Os frascos devem ser incubados durante sete dias sob agitação orbital de 5.000 g. Ao final do crescimento, a massa micelial deverá ser coletada em membrana de *nylon* (120 F), lavada duas vezes com água destilada e, posteriormente, submetida a liofilização para determinação da matéria seca da biomassa<sup>22</sup>. A aplicação do fungo produtor de quitosana deve ser realizada de uma só vez, no início do ensaio. É **preciso coletar** amostras em vários períodos (exemplo: 5, 10, 15, 20 e 30 dias após a inoculação), para determinação de: quitina e quitosana, pH, condutividade elétrica (C.E.), carbono, nitrogênio e enxofre total, N-proteico,  $\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_4^+$ ; fósforo disponível; potássio disponível; magnésio e cálcio trocáveis e  $\text{S-SO}_4^{2-}$  solúvel. Também poderão ser analisadas algumas enzimas importantes, como nitrogenase, quitinase e catalase.

## 14.5 BIOPROTETOR COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

O termo nanopartículas é genérico, sendo os materiais nanoestruturados geralmente definidos como os que apresentam ao menos uma dimensão na faixa de tamanho nanométrico, abaixo do tamanho crítico do material capaz de alterar alguma de suas propriedades. Dessa forma, considera-se um nanomaterial aquele que possui pelo menos uma propriedade que se manifeste exclusivamente devido à escala nano. Esta propriedade deve ser diferente do material massivo ("bulk").

As nanopartículas podem ser preparadas a partir de uma variedade de materiais, tais como proteínas e polímeros. A seleção desse material depende de muitos fatores, incluindo (a) o tamanho das nanopartículas; (b) as propriedades intrínsecas; (c) as características da superfície, como a carga e a permeabilidade; (d) o grau de biodegradabilidade, biocompatibilidade e toxicidade, dentre outros. As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, como a quitosana, incluem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural (Figura 14.3).

Denominam-se esferas os sistemas em que o material está homogênea-mente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Dessa forma, obtém-se um sistema monolítico em que não é possível identificar um



**Figura 14.3** Diferentes nanopartículas com aplicação farmacêutica: (A) nanoesfera (sistema matricial) e (B) nanocápsula (sistema reservatório). Modificada de Azevedo (2007)<sup>7</sup>.

núcleo diferenciado. A nanocápsula constitui o sistema do tipo reservatório, em que é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Nesse caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana polimérica que isola o núcleo do meio externo.

Os métodos de obtenção de nanoesferas e nanocápsulas são semelhantes, porém há diferença nos mecanismos de polimerização, os quais são classificados da seguinte forma: (a) dispersão ou precipitação de polímeros pré-formados; (b) polimerização de monômeros dispersos *in situ*; (c) copolimerização interfacial, que forma nanocápsula pelo contato entre os monômeros na interface (Figura 14.4); e (d) coacervação dos polímeros hidrofílicos ou gelificação iônica.

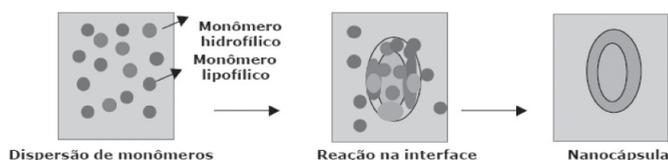


Figura 14.4 Método de copolimerização interfacial para preparar nanocápsulas. Modificada de Mohanraj e Chen (2006)<sup>33</sup>.

A coacervação dos polímeros hidrofílicos ou gelificação iônica é o método que foi empregado pelo grupo de pesquisa. Na preparação de nanopartículas de quitosana, também existem na literatura outros métodos, como: (a) emulsão “*cross-linking*”; (b) coalescência de gotas de emulsão; (c) micela reversa; e (d) modificação química da quitosana<sup>24,28</sup>.

### 14.5.1 Método de gelificação iônica

A gelificação iônica é um método físico-químico de preparação de nanopartículas que consiste, de modo geral, na dissolução de um fármaco juntamente com um polímero em determinado solvente, seguida da adição, sob agitação constante, de um não solvente à mistura. O não solvente pode causar a precipitação do polímero ou a separação de fases (muitas vezes chamadas de processo de coacervação). Esses processos de coacervação podem ser divididos em: (a) simples (por mudança no pH, força iônica, temperatura); ou (b) complexos (complexação entre dois polieletrólitos de carga oposta)<sup>7,8</sup>. Nesse último caso, ocorre entre a estrutura da quitosana (polieletrólito positivo) e a estrutura do agente surfactante, como o tripolifosfato de pentasódio (TPP) (Figura 14.5).

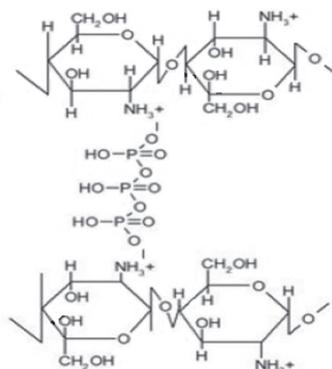


Figura 14.5 Interação iônica entre a quitosana e o tripolifosfato de pentasódio (TPP). Modificada de Azevedo et al. (2010)<sup>8</sup>.

O tripolifosfato de pentasódio (TPP) é usado para preparar nanopartículas de quitosana por ser um polieletrólito atóxico, capaz de formar géis com a interação de suas cargas negativas e as dos grupos amínicos da quitosana. Essa interação pode ser controlada pela densidade de carga da quitosana e do TPP, que depende, principalmente, do pH da solução<sup>11</sup>. Na literatura, estão disponíveis trabalhos visando à preparação de nanopartículas biodegradáveis com polímeros hidrofílicos, como a quitosana, a gelatina e o alginato de sódio. Um método para preparar nanopartículas de quitosana por gelificação iônica foi desenvolvido por Calvo<sup>16</sup>, e é descrito a seguir. Nesse método, o grupo amínico da quitosana é carregado positivamente interagindo com o TPP de carga negativa para formar coacervados com um tamanho na faixa de nanômetros. Coacervados são formados como resultado de interação eletrostática entre duas fases aquosas, que, por gelificação iônica, envolvem o material em fase de transição do estado líquido para o gel<sup>24,51</sup>.

### 14.5.2 Produção de nanopartícula de quitosana pelo método de gelificação iônica

Dissolver 0,5 g das quitosanas em 50 mL de ácido acético 2% e agitar por 30 minutos. Adicionar lentamente a cada grupo 20 mL de TPP 1%, mantidos sob agitação durante 2 horas. Centrifugar a 13.400 g por 10 minutos e acrescentar mais soluções ao mesmo microtubo (*ependorf*). Na última alíquota da solução, retirar o sobrenadante, acrescentar água destilada e

homogeneizar as amostras, com lavagens repetidas por 5 vezes, sempre intercalando com a centrifugação a 13.400 g por 5 minutos. Após a última lavagem, retirar os sobrenadantes e liofilizar os precipitados.

## **14.6 APLICAÇÃO DA QUITOSANA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

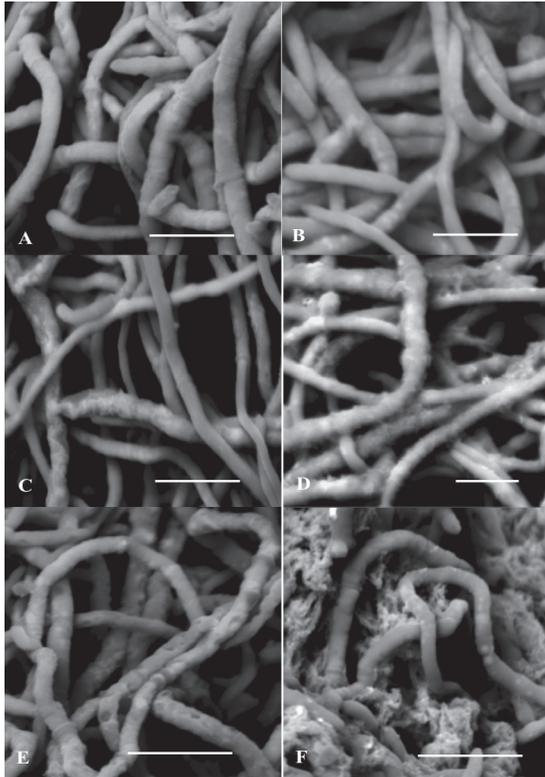
Na indústria alimentícia, a quitosana oferece um amplo espectro de possíveis aplicações como agente antimicrobiano, estabilizante, antioxidante, emulsificante, na formulação de biofilmes, redução da respiração de frutos, barreira à perda de umidade, redução da produção de etileno e poligalacturonase em frutos, encapsulação de aromas e recuperação de subprodutos<sup>27</sup>. A quitosana em concentrações muito baixas tem apresentado propriedade protetora de vegetais, podendo ativar mecanismos de defesa nestes contra o ataque de patógenos (Figura 14.6).

As perspectivas de aplicações são ainda aumentadas pela possibilidade de a quitosana ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes, microesferas e nanopartículas<sup>19,28,33,8</sup>.

### **14.6.1 Mecanismos de ação da quitosana**

Na indústria alimentícia, a quitosana oferece um amplo espectro de possíveis aplicações, como formação de revestimentos biodegradáveis, recuperação de subprodutos, purificação de água, clarificação de sucos, ação emulsificante de aromas e agente antioxidante e estabilizante, destacando-se a sua eficácia na preservação da qualidade microbiológica do alimento. Industrialmente, no Brasil, a desacetilação da quitosana ainda não está padronizada, acarretando a obtenção de quitosana heterogênea em relação ao grau de desacetilação e peso molar, o que dificulta a uniformização no processo de obtenção dos géis e revestimentos<sup>15</sup>.

A ação antimicrobiana da quitosana se dá em relação a uma grande variedade de micro-organismos, como bactérias, fungos e algas, sendo que o mecanismo dessa ação ainda não foi totalmente elucidado<sup>49</sup>. Na literatura são encontrados vários mecanismos de ação, e alguns autores defendem a protonação dos grupos amínicos da quitosana quando em contato com fluidos fisiológicos, com ligação aos grupos aniônicos dos micro-organismos e posterior aglutinação das células microbianas e efeito inibitório no



**Figura 14.6** Microscopia eletrônica mostrando o efeito de diferentes doses de quitosana de alto e baixo peso molar nas hifas do fungo patogênico *Botrytis cinerea* causador da podridão cinzenta de frutos, em comparação com o tratamento sem adição de quitosana (A) em diferentes períodos de crescimento, em função do tempo (0 a 96 horas) de avaliação (B, C, D, E, F). Material cedido pelo prof. Marcos Antonio Lima (2014).

crescimento. Paralelamente, há relatos sobre a interação entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa da parede celular do micro-organismo, ocasionando a ruptura da parede celular e a perda de importantes constituintes intracelulares, o que inviabiliza a vida microbiana<sup>6,48</sup>.

Podem ocorrer diferentes mecanismos de ação, de acordo com o peso molar do polímero, uma vez que a quitosana de baixo peso molar é capaz de penetrar nas células e se ligar ao DNA microbiano, inibindo a transcrição e a tradução. Por outro lado, a quitosana de alto peso molar apresenta ação de quelação, com ligação de metais essenciais na produção de toxinas e crescimento do micro-organismo<sup>38</sup>.

Essa ação é decorrente da habilidade da quitosana de produzir quelados com íons metálicos, os quais agem como catalisador na reação da oxidação lipídica. Por outro lado, devido à capacidade de quelação com íons metálicos, a quitosana pode agir controlando o escurecimento enzimático em produtos vegetais, por quelação com o íon cobre presente no centro ativo da polifenoxidase, enzima responsável por esse processo<sup>9,21</sup>.

#### **14.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)**

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) da quitosana podem ser determinadas através da técnica de macrodiluição em caldo Sabouraud (10 g de peptona, 20 g de dextrose, 1 L de água destilada, pH 5,6).

Inicialmente deve ser realizada a padronização da suspensão dos esporos fúngicos (fungos filamentosos) em câmara Neubauer. Primeiramente, o fungo é crescido em placa de Petri contendo meio ágar Sabouraud a 28 °C, por 96 horas. Após o período de incubação, os esporos são coletados com *swab* e suspensos em solução salina 0,9%. A quantificação dos esporos por mililitro da solução salina é determinada por contagem direta em câmara de Neubauer. A câmara e a lamínula devem ser limpas previamente com etanol (70%). Na sequência, com o auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 100 µL da suspensão de esporos é transferida para a câmara. A seguir, a câmara é colocada sob o microscópio (objetiva de 40×) com o qual será realizada a contagem dos esporos. São contados todos os esporos que estão dentro da área do quadrado grande central, incluindo aqueles que estão sobre as linhas superiores e direitas do perímetro externo do quadrado médio (Figura 14.7). Os esporos sobre as linhas inferiores e esquerdas desse quadrado não são incluídos na contagem. Após a contagem, a lamínula é retirada e, juntamente com a câmara, devem ser limpas com etanol (70%), sendo esse protocolo realizado em duplicata e repetido para as outras suspensões.

Deve ser inoculada nos tubos de ensaio contendo meio de cultura e substância teste uma suspensão fúngica na concentração final de 10<sup>6</sup> esporos/mL, passando por uma incubação a 28°C e realizada por 96 horas. No final do período de incubação, verifica-se qual tubo não apresentou crescimento fúngico visível, o qual deve ser considerado como a CIM. A seguir, alíquotas dos tubos com ausência de crescimento, assim como do tubo controle (contendo

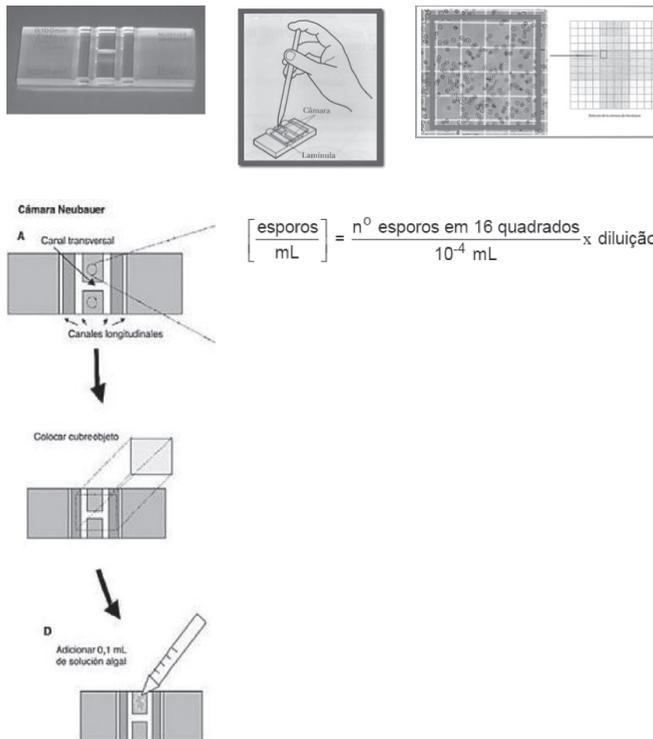
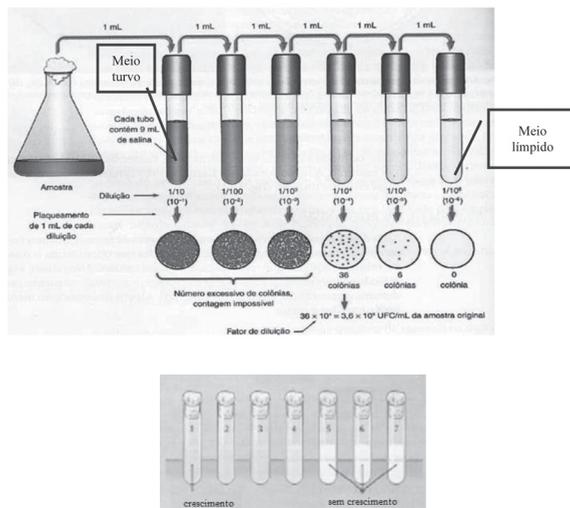


Figura 14.7 Padronização de suspensão esporíca fúngica por contagem direta em câmara de Neubauer.

só meio de cultura e o micro-organismo), devem ser inoculadas em placas de Petri com meio ágar Sabouraud (10 g de peptona, 20 g de dextrose, 15 g de ágar, 1 L de água destilada, pH 5,6) sem quitosana e posteriormente incubadas a 28 °C, por 96 horas, para ser determinada como CFM a menor concentração que não viabilizou o crescimento da cepa teste em meio ágar Sabouraud sem quitosana, como exibido na Figura 14.8<sup>45</sup>.

### 14.6.3 Interferência da quitosana no crescimento micelial radial fúngico

A inibição do crescimento micelial radial do patógeno deve ser determinada usando a técnica do envenenamento do substrato de crescimento (diluição em meio sólido). Uma alíquota (5 mm de diâmetro da cultura com 10 dias de crescimento em ágar Sabouraud a 28 °C deve ser colocada no

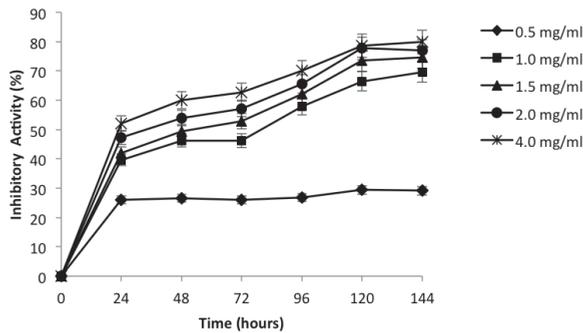


**Figura 14.8** Sequência de atividade de diluição e plaqueamento utilizando o método de macrodiluição em série para determinação das concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM).

centro de placas estéreis com meio ágar Sabouraud mais quitosana em diferentes concentrações (exemplo: 2,5 mg/mL; 5,0 mg/mL e 10,0 mg/mL), com base nos resultados da CIM e da CFM.

O sistema deve ser incubado em estufa até que o controle atinja a borda da placa de Petri. Em intervalos de incubação (horas, geralmente 12/12 h ou 24/24 h) são feitas medições do crescimento radial da colônia fúngica (Figura 14.9). O controle mede o crescimento micelial radial sem adição de quitosana<sup>20</sup>.

Em trabalho realizado em projeto bilateral Brasil-Portugal (financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES), na Universidade Católica do Porto (no Porto, em Portugal), foi avaliada a inibição do crescimento micelial radial do fungo patogênico *Botrytis cinerea* em função do tempo de crescimento com aplicação de diferentes doses de quitosana de alto e baixo peso molar. Houve efeito significativo das doses aplicadas, e a taxa inibitória mostrou-se diretamente relacionada com a concentração de quitosana, sendo a inibição do crescimento do fungo patogênico mais elevada nas maiores concentrações de quitosana durante o período avaliado. A quitosana pode induzir marcantes alterações morfológicas em hifas durante os diferentes estágios de desenvolvimento, o que



**Figura 14.9** Avaliação do efeito da quitosana no crescimento de *Botrytis cinerea* em diferentes concentrações e intervalos de tempo (horas). Ensaio em laboratório realizado na Universidade Católica do Porto (projeto bilateral Brasil–Portugal com financiamento da CAPES). O trabalho foi apresentado na 12<sup>th</sup> International Conference of Chitin and Chitosan, realizado em Fortaleza em 2012. Em ensaio conduzido para avaliar o crescimento radial do fungo filamentosso *C. gloeosporioides* foi observado que a quitosana na concentração 2,5 mg/mL inibiu o crescimento do fungo em 44% após 2 dias de crescimento, seguida por taxa inibitória de 32%, 29% e 27%, após 3, 4 e 5 dias de crescimento, respectivamente. A concentração 5,0 mg/mL retardou o início do crescimento do fungo em 3 dias com inibição de 87%; após o quinto dia a taxa foi reduzida para 84%; e, na concentração de 10 mg/mL, o polímero inviabilizou o crescimento do fungo por até 19 dias.

permite a sua utilização tanto para prevenir a contaminação de alimentos como no controle de infecções já instaladas.

#### 14.6.4 Prolongamento da vida de prateleira de alimentos

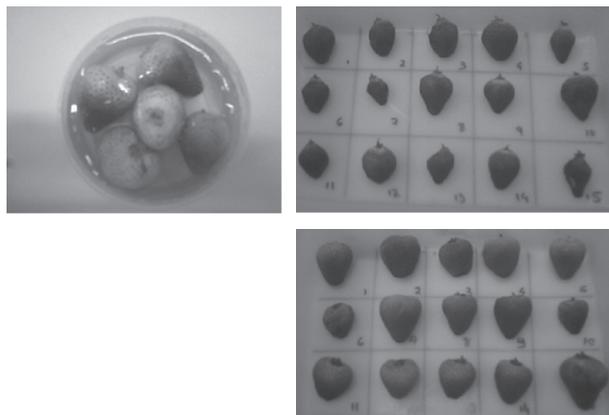
A utilização de revestimento com quitosana pode ampliar a vida de prateleira de frutos ao promover uma atmosfera modificada que altera o ar circulante e interno, reduzindo os níveis de O<sub>2</sub>, aumentando os níveis de CO<sub>2</sub>, retardando a perda de água e retardando o aumento da atividade das polifenoloxidase (PPO), com conseqüente redução do metabolismo vegetal e retardo da senescência ao longo do armazenamento. O aumento da vida útil das frutas em temperaturas superiores às de refrigeração é desejável, uma vez que a quase totalidade dos frutos comercializados no Brasil, tanto no atacado quanto no varejo, não são submetidos a temperaturas adequadas. A conservação nessas condições pode facilitar o transporte a longas distâncias e ampliar o período de comercialização<sup>10,5</sup>.

### 14.6.5 Preparo do gel de quitosana

Para uso em testes em alimentos a quitosana deve ser diluída em ácido acético 1%, ou também pode ser diluída no próprio suco da fruta a ser avaliada se este for ácido, por exemplo, suco de acerola.

As diluições devem ser procedidas para obtenção de solução inicial de quitosana na concentração de 20 mg/mL (diluir 2 g de quitosana em 100 mL do ácido). As soluções de quitosana devem ter o pH ajustado para 5,5, com hidróxido de sódio a 4%, sob constante agitação.

A quitosana pode ser utilizada para revestimento de frutos, como cobertura comestível. Após preparo da solução de quitosana, que, dependendo do peso molar do polímero, pode ficar como gel, o fruto é imerso ou a quitosana é aspergida no fruto. A Figura 14.10 mostra o gel de quitosana e a imersão de morangos no gel. Depois da imersão, o fruto é retirado do gel ou solução de quitosana e posto para secar. Esse procedimento pode ser realizado mais de uma vez no mesmo fruto para proporcionar um recobrimento mais espesso e uniforme.



**Figura 14.10** Morangos imersos no gel de quitosana a 10 mg/mL (quitosana solubilizada em ácido acético 1%), por 3 minutos, secos e verificada a perda de massa após 15 dias de vida de prateleira sem quitosana (A) e recobertos com quitosana (B).

Em frutos armazenados em temperatura ambiente (25-28 °C), foi verificado que o revestimento com quitosana no oitavo dia de armazenamento apresentou percentual de incidência de podridões dez vezes menor do que sem revestimento, comprovando a ação antimicrobiana desse polímero. Já

em relação à cor da casca e polpa, esse mesmo revestimento é capaz de manter a cor inicial dos frutos e a polpa mais firme que os demais tratamentos<sup>32</sup>. Redução na mancha preta em laranja tratada com quitosana foi verificada por Rappussi e colaboradores<sup>40</sup> e Sharma e colaboradores<sup>42</sup>. Essa ocorrência provavelmente é devida ao efeito germicida do polímero sobre o patógeno, bem como à indução de resistência no tecido vegetal<sup>53</sup>.

## 14.7 CONCLUSÕES

A quitosana possui características químicas que possibilitam seu emprego em várias áreas de atuação, tais como agricultura, conservação de alimentos, saúde e proteção ambiental. Para a utilização eficaz da quitosana, são necessários conhecimentos básicos e, principalmente, a realização de análises para a real caracterização das diferentes formas de quitosana, que podem apresentar vários graus de utilização de maneira efetiva, principalmente com relação à forma de desacetilação e à forma de apresentação (baixo, médio e alto peso molar).

Com referência ao uso da quitosana na agricultura, o trabalho do nosso grupo de pesquisa em Ciências dos Solos mostra uma forma bastante interessante para a produção de fertilizante efetivo e de bioprotetor contra doenças de plantas. O bioprotetor (PNPK) produzido com biofertilizante de rochas mais *Acidithiobacillus* e material orgânico enriquecido com nitrogênio por inoculação com bactéria diazotrófica e com quitosana fúngica pode ser usado como fonte de nutrientes para incrementar o crescimento e produtividade das plantas, e, de forma direta, pode ser utilizado para proteção contra fitopatógenos. Também é interessante observar que a quitosana na forma nano apresenta grande potencial para uso como bioprotetor por aplicação via foliar. O biofertilizante e bioprotetor com quitosana é alternativa viável para substituir fertilizantes solúveis que promovem contaminação ambiental, além de poder ser utilizado como alternativa a uso de produtos químicos contra doenças fitopatogênicas.

## 14.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente capítulo, demonstramos a importância da caracterização e da análise química das diferentes quitosanas para a sua eficiente utilização nas diferentes áreas do conhecimento.

Fica evidenciada a utilização da quitosana fúngica na produção de bioprotetor pela participação direta, sem o uso de processo químico, já que o fungo possui quitosana na sua parede celular. A quitosana é então adicionada ao biofertilizante produzido a partir de rochas e matéria orgânica enriquecida em N por ação de bactéria diazotrófica.

O bioprotetor tem participação direta na nutrição das plantas, por sua atuação com liberação gradual, que também pode promover proteção ambiental, tendo em vista que reduz a possibilidade de percolação de elementos nocivos para as camadas mais profundas do solo e para o lençol freático.

Também é interessante observar a possibilidade da utilização da quitosana na forma de nanopartículas, que tem potencial para aplicação via foliar, visando à defesa da planta contra patógenos.

Na indústria de alimentos, a utilização de gel de quitosana pode promover a inibição de patógeno pós-colheita através da redução do crescimento micelial radial e de alterações ultraestruturais nas hifas e esporos. A aplicação de cobertura com quitosana em frutos minimamente processados promove a ocorrência de parâmetros físico-químicos e microbiológicos mais uniformes ao longo da vida de prateleira.

Observa-se diferença significativa em função da temperatura de armazenamento e do peso molar da quitosana, que podem atuar de formas diferentes em virtude do menor e maior peso molar do biopolímero. Portanto, é demonstrado o potencial da quitosana como tecnologia alternativa de conservação de alimentos em virtude da redução de alterações fisiológicas, resultando em expansão da vida de prateleira de frutos minimamente processados.

A aplicação da quitosana como agente natural pode surgir como alternativa na minimização dos danos decorrentes da resistência fúngica aos agentes classicamente empregados no controle do crescimento de fungos patogênicos em frutas e sucos. Esses fatos repercutem no nível de abastecimento do mercado nacional e internacional, no custo de produção, bem como na qualidade e segurança dos produtos da agroindústria.

A condução de pesquisa com quitosana subsidiará a disponibilidade de informações científicas correntemente escassas na área do estudo da potencialidade antimicrobiana de produtos naturais de possível uso em frutos e sucos, com repercussão na garantia da sanidade e qualidade da cadeia produtiva, inserida entre as necessidades do setor agropecuário, para viabilizar o incremento da sua competitividade nos mercados nacional e internacional. Os estudos com quitosana também podem contribuir para a proteção do

meio ambiente, para a segurança alimentar, para a saúde pública e para o desenvolvimento econômico e social.

## 14.9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora seja difícil determinar a total magnitude da economia com a utilização de biofertilizantes naturais, estes são amplamente reconhecidos na agricultura, bem como nas significativas perdas pós-colheita devido à deterioração microbiana. As perdas pós-colheita variam bastante, mas é conhecido que até 25% da produção mundial de vegetais está sujeita ao ataque de micro-organismos em países industrializados, enquanto em países em desenvolvimento esse dano é mais alto, podendo atingir até 50% da produção.

O uso de fertilizantes minerais solúveis e de antimicrobianos no mundo varia, embora estimativas apontem que anualmente milhões de quilos desses compostos sejam aplicados a frutas e vegetais, sendo geralmente aceitos e difundidos pelos produtores. Contudo, os aspectos de poluição ambiental, efeitos sobre alimentos e efeitos colaterais em humanos são os principais fatores que têm restringido o uso de antimicrobianos químicos no controle de patógenos pré e pós-colheita.

Os métodos biológicos constituem alternativas viáveis em relação aos métodos químicos tradicionais para produção de fertilizantes e antimicrobianos, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos, sendo ecologicamente viáveis, normalmente seguros e poderem prover proteção por um longo prazo para a cultura, com redução substancial na contaminação ambiental.

Espera-se que a aplicação da quitosana como protetor de doenças de plantas e antifúngico natural promova aumento na qualidade dos frutos e dos sucos e venha a atender à atual demanda do mercado consumidor por alimentos submetidos a um mínimo de processamento e livres da incorporação de agentes químicos.

Assim, podemos considerar a ampla importância e real viabilidade do uso da quitosana, assim como as perspectivas para produção e utilização dos resultados dos trabalhos de pesquisa, que, com certeza, serão usados de forma direta pelas indústrias relacionadas com a produção e comercialização dos produtos agrícolas. Esse fato deverá ser de grande importância para a sociedade brasileira, inclusive em função das patentes que já foram apresentadas atualmente pela Universidade Federal de Pernambuco e pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

## REFERÊNCIAS

1. Amorim RVS, Campos-Takaki GM, Ledingham WM, et al. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005;1:19-23.
2. Amorim RVS, Souza W, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Braz J Microb*. 2001;32: 20-3.
3. Andrade VS, Neto BB, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – A factorial study. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:149-53.
4. Andrade MMM, Stamford NP, Freitas ADS, Santos CERS, Sousa CA, Lira Junior MA. Effects of biofertilizer with diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungi on the soil attribute, cowpea nodulation, yield and nutrient uptake in field conditions. *Sci Horticult*. 2013;161:374-9.
5. Apail W, Sardud V, Boonprasom P, et al. Effects of chitosan and citric acid on pericarp browning and polyphenol oxidase activity of longan fruit. *Songklanakarin J Sci and Technol*. 2009;31:621-8.
6. Avadi MR, Sadeghi AMM, Tahzibi A, Bayati KH, Pouladzadeh M, Zohuriaan-Mehr MJ, Rafiee-Tehrani M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *European Polymer J*. 2004;40:1355-61.
7. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: Aplicações como biomateriais. *Rev. Eletron Mater Proces*. 2007;2:27-34
8. Azevedo JR, Sizilio RH, Brito MB, Costa AMB, Serafini MR, Araújo AAS, Santos MRV, Lira AAM, Nunes RS. Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana-TPP contendo insulina. VII Congresso Brasileiro de análise Térmica e Calorimetria. São Paulo; 2010.
9. Barreteau H, Delattre C, Michud P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol*. 2006;44:323-33.
10. Basseto E., Jacomino AP, Pinheiro AL. Conservation of “Pedro Sato” guavas under treatment with 1-methylcyclopropene. *Pesq Agropec Brasileira*. 2005;40:433-40.
11. Berger J, et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur J Pharmaceut Biopharmaceut*. 2004;57:35-52.
12. Berger LRR, Stamford TCM, Stamford NP. Perspectivas para uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2011;2:195-215.
13. Berger LRR, Stamford NP, Santos CERS, Santiago AD, Franco LO, Stamford, TCM. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter

inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. *J Soil Sci Plant Nutr.* 2013;13:592-693.

14. Borderías AJ, Sánchez-Alonzo I, Pérez-Mateos M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16:458-65.

15. Borgognoni CF, Polakiewicz B, Pitombo RNM. Estabilidade de emulsões de D-limoneno em quitosana modificada. *Ci Tecnol Aliment.* 2006;26:502-8.

16. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res.* 1997;14:1431-6.

17. Campos-Takaki GM. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: Dutta PK, editor. *Chitin and chitosan opportunities and challenges.* India: International Publication; 2005.

18. Canella KMNC, Garcia RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova.* 2001;24:13-7.

19. Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Salin F, Deschamps A. Edible antimicrobial films base don chitosan matrix. *J Food Sci.* 2004;67:1162-9.

20. Daferera JD, Ziogas NB, Polissiou GM. GC-MS analysis of essential oils from some Greeks aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicilliumdigitatum*. *J Agric Food Chem.* 2000;48:2576-81.

21. Fai AEC, Stamford TCM, Stamford TLM. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2008;9:435-51.

22. Franco LO, Maia RCC, Porto ALF, Messias AS, Fukushima K, Takaki GMC. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Braz J Microbiol.* 2005;35:243-7.

23. Franco LO, Albuquerque CDC, Stamford NP, Lima MAB, Takaki CGM. Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorganico em amostras de *Cunninghamella elegans*. *Analytica.* 2011;54:70-8.

24. Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2007;59:24-34.

25. Harish Prashanth KV; Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Sci Technol.* 2006.

26. Hesseltine CW, Anderson RF. Macrobiological production of carotenoides I. Zygospore and Carotene produced by intraspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. *Mycol.* 1957;149:449-52.

27. Li Y, Chen XG, Liu N, Liu CS, Liu CG, Meng XH, Yu LJ, Kenedy JF. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydr Polym.* 2007;67:227-32.
28. Liu G, Shao L, Ge F, Chen J. Preparation of ultrafine chitosan particles by reverse microemulsion. *China Partic.* 2007;5:384-30.
29. Lima IS, Ribeiro ES, Airoidi C. O emprego de quitosana modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. *Química Nova.* 2006;29:501-6.
30. Lima RCM, Stamford NP, Santos ERS, Dias SHL. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. *Braz J Horticult.* 2007;25:224-9.
31. Lima FS, Stamford NP, Sousa CS, Lira Junior MA, Malheiros SMM, Van Straaten P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26:1769-77.
32. Liu J, Tian S, Meng X, Xu Y. Effects of chitosan on control of postharvest disease and physiological responses of tomato fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 2007;4:300-6.
33. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles: A review. *Trop. J. Pharmaceut Res.* 2006;5:561-73.
34. Moura PM, Stamford NP, Duenhas LH, Santos CERS, Nunes GHAS. Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão, no vale do São Francisco. *Braz J Soil Sci.* 2007;2:1-7.
35. Nadarajah K, Kader J, Mohd M, Paul DC. Production of chitosan by fungi, J. *Biological Sci.* 2001;4:263-5.
36. Nemtesev SV, Zueva OIU, Khismatulin MR, AL'Bulov AL, Varlamov VP. Isolation of chitin and chitosan from honeys bees. *Priki Biokhim Mikrobiol.* 2004;40:46-50.
37. Pochanavanich P, Suntornsuuk W. Fungal chitosan production and its characterization. *Let Appl Microbiol.* 2002;35:17-21.
38. Pedro AS, et al. Chitosan: an option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydr Polym.* 2009;76:501-8.
39. Rabea EI, Badawi MEI, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromol.* 2003;4:1457-65.
40. Rappussi MCC, Pascholati SF, Benato EA, Patricia CIA. Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* postharvest "Valencia" oranges. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2009;52:513-21.
41. Roberts T. Reservas de minerais potássios e a produção de fertilizantes potássicos no mundo. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba. *Informações Agronômicas.* 2004;107:2-3.
42. Sharma N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis*(L) Isbeckepicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microbiological Research.* 2008;163:337-44.

43. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. 2003;26:726-37.
44. Stamford NP, Moura AMMF, Santos KSR, Santos PR. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizuserosus*). *Braz J Soil Sci*. 2004;28:75-83.
45. Stamford NP, Lima RA, Santos CERS, Dias SHL. Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. *Geomicrobiol J*. 2006;23:261-5.
46. Stamford NP, Santos PR, Santos CERS, Freitas ADS, Dias SHL, Lira Junior, MA. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. *Bioresour Technol*. 2007;98:1311-8.
47. Stamford NP, Andrade IP, Santos CERS, Lira Junior MA, Silva Junior S, Freitas ADS, Van Straaten P. Soil properties and grape yield affected by rock biofertilizers with earthworm compound. *J. Soil Sci Plant Nutr*. 2011;11:79-88.
48. Tsai GJ, Hwang SP. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisher Scientific*. 2004;70:675-81.
49. Xia W, et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloides*. 2011;25:170-9.
50. Yadav AV, Bhise B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. *Current Sci*. 2004;87:1176-8.
51. Yang HC, Wang WH, Huang KS, Hon MH. Preparation and application of nanochitosan to finishing treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties. *Carbohydr Polym*. 2010;79:176-9.
52. Yen NM-T, Mau J-L. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT*. 2007;40:472-9.
53. Zhu X, Wang Q, Cao J, Jiang W. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *J Food Proces Preservation*. 2008;32:770-84.