



AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO DA QUITOSANA E DE SEU DERIVADO QUATERNIZADO NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO *PENICILLIUM EXPANSUM*

L. D. Mendes¹, J. D. Bresolin², O. B. G. Assis^{2*}, D. de Britto³

¹ USP – Univ de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

² EMBRAPA Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil

³ EMBRAPA Semiárido, Petrolina, PE, Brasil

Article history: Received 29 January 2016; Received in revised form 11 March 2016; Accepted 14 March 2016; Available online 21 March 2016.

RESUMO

Quitosana comercial de média massa molar ($400.000 \text{ gmol}^{-1}$) e seu derivado quaternizado hidrossolúvel *N,N,N*-trimetilquitosana foram avaliados em condições laboratoriais, em análises *in vitro*, como agentes inibidores do crescimento de *Penicillium expansum*. Formulações nas concentrações de 0,1; 1,0; 5,0 e $10,0 \text{ gL}^{-1}$ de cada polímero foram preparadas e adicionados em meio de cultura BDA sólido e aquoso. O fungo foi isolado de frutas contaminadas, cultivado e inoculado nos meios contendo os polímeros. Análises conduzidas por medida do crescimento de colônias em meio sólido e por contagem de esporos germinados em meio líquido (em câmara de Neubauer) indicaram eficiência na redução da infestação por ambos os polímeros, porém em condições distintas. A quitosana apresentou elevada eficiência em meio líquido enquanto seu derivado foi eficaz na redução do crescimento em meio de cultura sólido, ambos em baixas concentrações ($0,1$ e $1,0 \text{ gL}^{-1}$). Os resultados são discutidos com base nos mecanismos aceitos de ação antimicrobiana da quitosana, objetivando potenciais aplicações tópicas em frutos na condição pós-colheita.

Palavras-chave: quitosana, antifúngico natural, bolor azul, biopolímeros, *P. expansum*

***IN VITRO* EVALUATION OF CHITOSAN AND ITS QUATERNIZED DERIVATIVE ON THE INHIBITION OF *PENICILLIUM EXPANSUM* GROWTH**

ABSTRACT

Chitosan of medium molar weight ($400,000 \text{ gmol}^{-1}$) from commercial origin and its quaternized water-soluble derivative *N,N,N*-trimethylchitosan were evaluated in laboratorial scale, in *in vitro* analyses, as inhibitors agents of *Penicillium expansum* growth. Formulations with polymer concentrations of 0.1; 1.0; 5.0 and 10.0 gL^{-1} were prepared and added to PDA solid and aqueous culture medium. The fungus strain was collected from decay fruits, harvested and inoculated in the medium with the polymers. Measurement of colony size growth (in solid medium) and germinated spore's counting (in liquid medium using a Neubauer cell) indicated that both polymers act efficiently in reducing fungal infestation, nevertheless in distinct ways. The chitosan showed high efficiency in liquid medium while the derivative was more effective in solid medium,

* odilio.assis@embrapa.br

both at low concentrations (0.1 e 1.0 gL⁻¹). The results were discussed based on chitosan accepted antimicrobial mechanisms, aiming potential topic applications on fruits in postharvest conditions.

Keywords: chitosan, natural antifungal, blue mold, biopolymers, *P. expansum*

INTRODUÇÃO

O bolor azul (blue mold) está entre as doenças de origem patógenas mais comuns em todo o mundo, de ocorrência preferencial entre frutas de clima temperado, principalmente em maçãs, peras e pêssegos. Este bolor é o responsável por perdas ocasionadas por podridão não somente na condição pós-colheita como também de incidência comum na indústria de processamento de sucos (SALOMÃO et al., 2014). O agente responsável pelo aparecimento do bolor azul é o fungo *Penicillium expansum*, patógeno necrotrófico bastante agressivo que infecciona pontos de ferimentos, lesões ou pequenas fissuras na epiderme ou na região do pedúnculo, encontrando assim condições adequadas para a germinação de seus esporos. As perdas de maçãs decorrentes da ação do *P. expansum* são da ordem de 90% com respeito as ocorrências totais de podridão (BLUM et al., 2004), e estimada como superior a 40% na incidência em peras e pêssegos (NARAYANASAMY, 2005).

A presença de infecção fúngica pode ser inicialmente identificada pela visualização de manchas azuladas que vão evoluindo para tons amarronzados ao longo do tempo. A contaminação também altera o odor e/ou sabor considerando que o *P. expansum* é um fungo produtor da micotoxina patulin que promove alterações das características organolépticas. A micotoxina patulin também é considerado de ação tóxica ao ser humano para valores acima de 50µgL⁻¹, com potenciais efeitos carcinogênicos e mutagênicos (WELKE et al., 2009).

Diversos compostos antifúngicos alternativos aos comerciais (usualmente

tiabendazol, benomil e iprodione) têm sido avaliados no controle do bolor azul, como fosfitos (BLUM et al., 2007), ácidos fenólicos (ROCHA NETO & DI PIERO, 2013), ácido acético e benzaldeídos (OSÓRIO et al., 2013), com variáveis graus de eficiência.

A quitosana, um polissacarídeo obtido pela desacetilação parcial da quitina e seus derivados, têm sido também indicados como antimicrobiano natural com atividade satisfatória na inibição de uma série de patógenos de ocorrência pós-colheita (YU et al., 2007, SATTOLO et al., 2010). A atividade antifúngica da quitosana é bem documentada na literatura sendo o modelo mais aceito o relacionado à natureza policatiônica que estabelece interação com sítios aniônicos presentes nas paredes celulares dos microrganismos. Tal interação ocorre preferencialmente entre os grupos NH₂ protonados da quitosana e os resíduos negativos das lipoproteínas que constituem a parede celular, causando danos estruturais que geram alterações na permeabilidade das membranas e levando conseqüentemente a uma instabilidade osmótica (GOY et al., 2009).

A quitosana é um polímero atóxico, considerado seguro ao consumo humano, sendo classificado como GRAS (generally recognized as safe) pelo FDA (American Food and Drug Administration) (FDA, 2001). Neste trabalho avaliamos o potencial da quitosana comercial e de seu derivado quaternizado *N,N,N*-trimetilquitosana como agentes inibidores do crescimento de *Penicillium expansum* em ensaios *in*

in vitro, objetivando potencial aplicação como antifúngico tópico no controle do

bolor azul.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções inibidoras

As soluções de quitosana comercial de média massa molar ($400.000 \text{ g mol}^{-1}$) e com grau de acetilação médio entre 68-75%, segundo informações do fornecedor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), e seu derivado quaternizado foram preparados por dissolução em solvente ácido acético a 1% (pH 2,8) e água destilada (pH 6,7) respectivamente, nas concentrações 0,1; 1,0; 5,0 e $10,0 \text{ gL}^{-1}$ para cada polímero. O derivado quaternizado, identificado como TMQ

(*N,N,N*-trimetilquitosana), é um sal hidrossolúvel obtido a partir de reações específicas da quitosana comercial com dimetilsulfato e NaOH conforme processo desenvolvido pela Embrapa e descrito com detalhes em Britto & Assis, (2007). O derivado diferencia do polímero precursor por apresentar radicais metil na posição C-2 dos grupos aminos originais da quitosana. As estruturas químicas de ambos os materiais estão apresentadas na Figura 1.

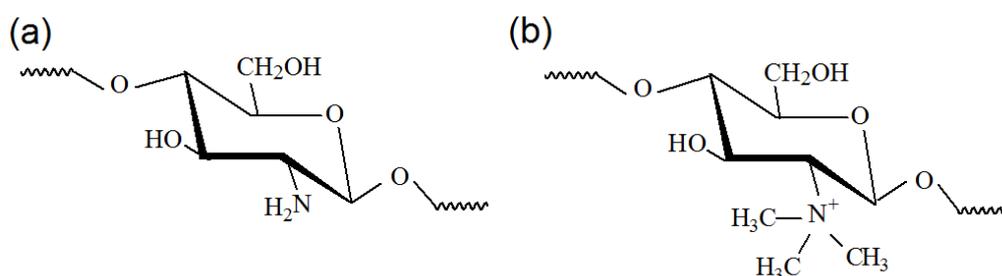


Figura 1. Estrutura química idealizada da (a) quitosana e de seu derivado quaternizado (b) TMQ (*N,N,N*-trimetilquitosana), de acordo com Britto & Assis, (2007).

Suspensões do fungo *Penicillium expansum*

O fungo *P. expansum* foi isolado de frutas contaminadas e replicado em placa de Petri com o meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) (HIMEDIA, Biosystems, Curitiba, PR). Os esporos foram incubados a 26°C até o crescimento visual do microrganismo. A partir desta cultura foram preparadas as suspensões em soluções esterilizadas de Tween 80 (0,1% v/v) na qual foram adicionados os fungos já crescidos. Na presença de Tween os esporos se isolam

no meio facilitando a contagem individual. A concentração dos esporos foi determinada em câmara de Neubauer seguindo procedimento proposto por Lucarini et al., 2004. Para o teste utilizou-se uma concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1} segundo determinação prévia por densidade ótica por espectroscopia UV no comprimento de onda de 530 nm (UV-vis Spectrum series SP-2000UV, Shanghai, China).

Crescimento radial em placas de Petri e testes de germinação de esporos

Para a avaliação do crescimento radial em meio sólido, meio de cultura BDA foi preparado em placas de Petri adicionados a 15,0 mL de solução

inibidora. Três poços de 6 mm foram puncionados em cada placa e preenchidos com 10 μL da solução de esporos. O crescimento dos fungos se

deu na temperatura ambiente e registrado ao longo de uma semana com auxílio do programa de edição de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). O mesmo procedimento foi repetido nas amostras controle, embora sem a adição dos polímeros. O crescimento foi registrado fotograficamente, diariamente ao longo de 6 dias e o diâmetro medido diretamente sobre as placas. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Para a análise de germinação em meio líquido, foram preparadas suspensões em tubos de ensaio vedados, adicionando-se 0,012 g de BDA + 0,30 mL da solução de esporos + 0,20 mL da solução do inibidor (polímeros). A incubação se deu por 26 h na temperatura de 25°C sob agitação

orbital de 120 RPM fazendo uso de uma incubadora modelo TE-4200 (Tecnal, Piracicaba, SP). A suspensão de esporos foi observada em um microscópio ótico (Nova 107) em câmera de Neubauer e imagens registradas por câmera CCD - Nova FMA 050. A contagem dos fungos germinados foi realizada diretamente nas imagens e expressas em porcentagem em relação aos não germinados. As amostras controle foram preparadas de forma similar, substituindo o inibidor por 0,2 mL de água destilada esterilizada ou ácido acético a 1%. O experimento foi realizado em duplicata e para cada medida foram obtidas imagens em 5 pontos diferentes. As análises foram consideradas para nível de significância de $p < 0,05$ (Tukey) fazendo uso do programa Bioestat 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento em meio sólido

Na montagem ilustrativa das Figuras 2 e 3 temos dispostas imagens típicas do crescimento das colônias de *P. expansum* registradas no meio de cultura DBA sólido, para as soluções controle e para os meios contendo diversas concentrações de quitosana (Fig. 2) e de TMQ (Fig. 3), sendo possível um acompanhamento visual do crescimento fúngico com o tempo. Fica evidente, através da comparação entre

as placas que o derivado TMQ apresenta uma maior atividade antifúngica que a quitosana, principalmente para adições em baixas concentrações.

Esse resultado pode ser melhor depreendido através da comparação da evolução dos valores numéricos do crescimento radial, plotados para a quitosana na Figura 4 e para a TMQ na Figura 5.

Quitosana

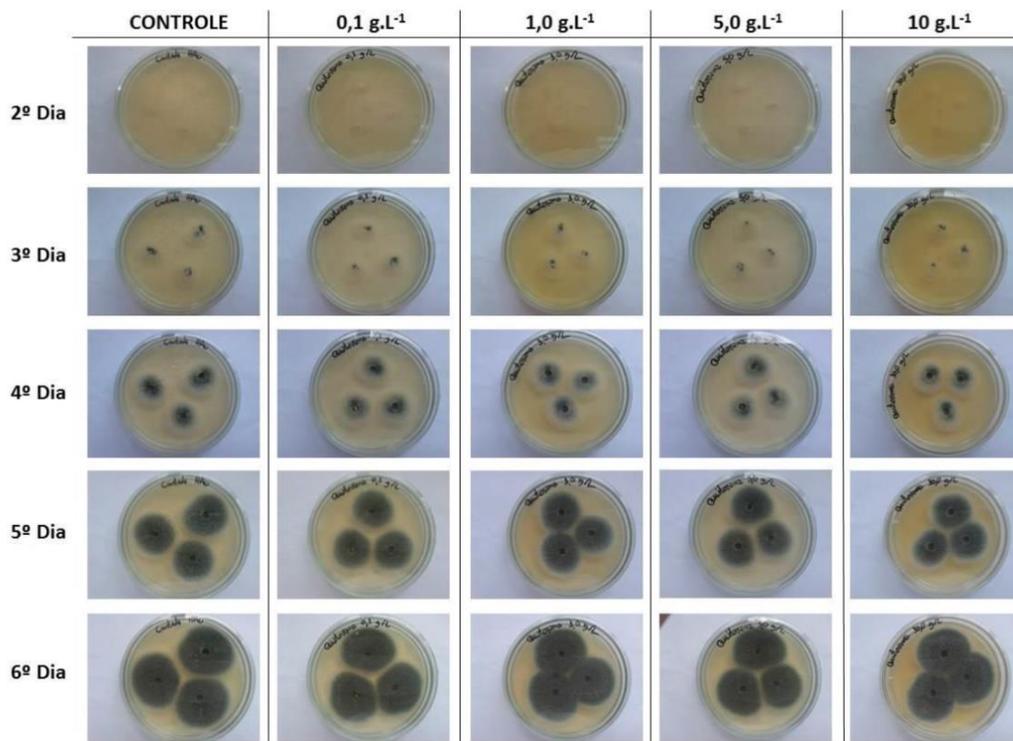


Figura 2. Montagem fotográfica representativa do crescimento radial das colônias de fungo *P. expansum* em meio sólido BDA, sem (controle) e com adições de quitosana.

TMQ

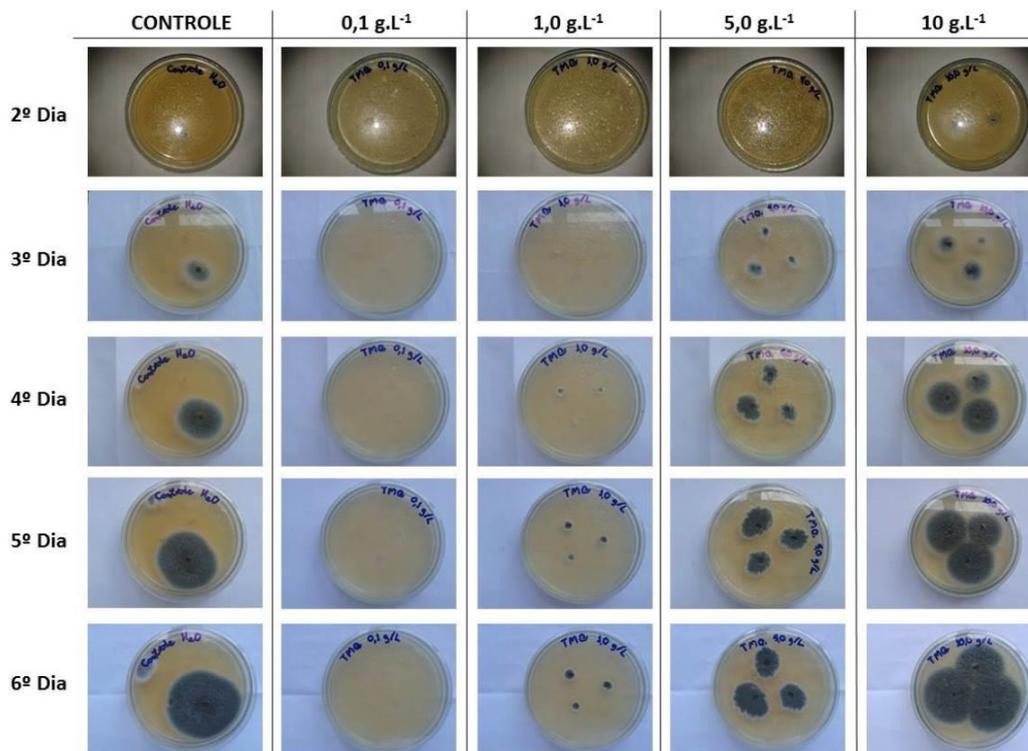


Figura 3. Montagem fotográfica representativa do crescimento radial das colônias de fungo *P. expansum* em meio sólido DBA, sem (controle) e com adições de TMQ.

Observa-se na Figura 4 que a quitosana não apresentou atividade antifúngica muito expressiva quando diluída em meio sólido. A diferença entre as medidas do crescimento radial das colônias no meio controle e com quitosana, embora ligeiramente menor, não evidencia um ação intensa. O aumento da concentração de polímero no meio também não resultou em um aumento da atividade. Contudo, deve-se levar em consideração que a atividade

antifúngica da quitosana é fortemente influenciada por diversos fatores físico-químicos, como a massa molar polimérica (HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008), pH do meio (ALBURQUENQUE et al., 2010), grau de acetilação (BRITTO et al., 2012), e composição do meio de cultura e da temperatura em que as interações ocorrem (SZYMAŃSKA & WINNICKA, 2015).

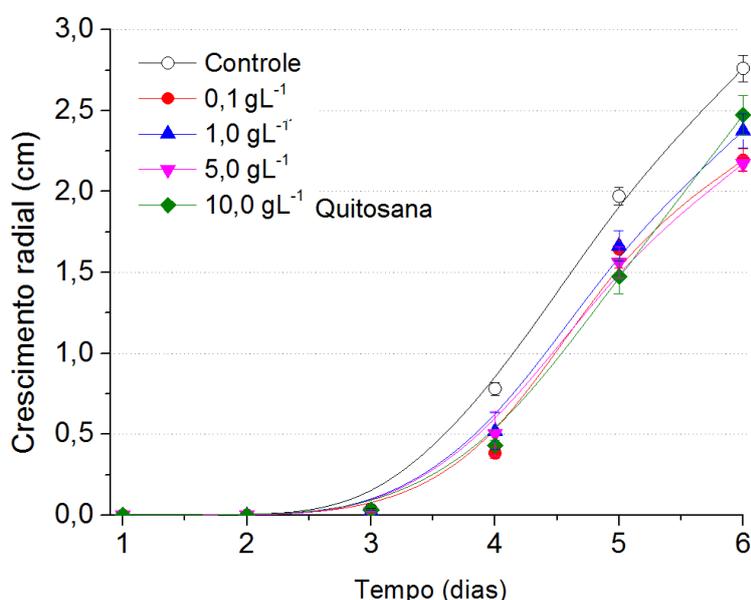


Figura 4. Crescimento radial das colônias do fungo *P. expansum* para ensaios realizados com adição de quitosana (diversas concentrações) ao longo do tempo.

Nos ensaios realizados com a TMQ, as medidas do crescimento das colônias em meio sólido indicam que este derivado apresenta atividade antifúngica consideravelmente superior a da quitosana comercial, principalmente para as diluições em baixas concentrações (0,1 e 1,0 gL⁻¹) (Figura 5). Nestas concentrações o efeito inibidor foi máximo, não sendo possível visualizar crescimento ao longo dos dias observados.

Os mecanismos responsáveis pela atividade antifúngica da quitosana e de seus derivados ainda são incertos, mas como citado, as cargas presentes na estrutura polimérica desempenham papel fundamental e isto confere a TMQ

uma maior reatividade. Não há certeza, contudo, se esta ação tem caráter fungistático ou fungicida e, segundo Qiu e colaboradores (2014), a capacidade da quitosana de matar ou de inibir o crescimento fúngico depende de diversos fatores e principalmente da espécie de fungo interagido. Encontra-se contudo, na literatura, fortes evidências de que a atividade da quitosana e seus derivados ocorre predominantemente de forma fungistática contra a maioria dos microrganismos testados em condições de laboratório (EL GHAOUTH et al., 1992; MUZZARELLI et al., 2001; BARKA et al., 2004).

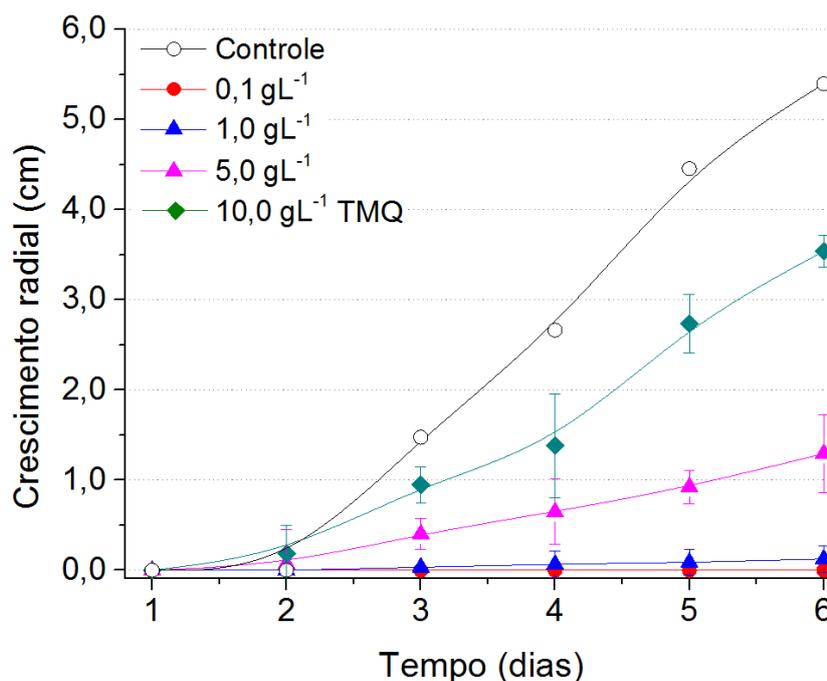


Figura 5. Crescimento radial das colônias do fungo *P. expansum* para ensaios realizados com adição do derivado TMQ (diversas concentrações) ao longo do tempo.

O efeito da concentração de quitosana e TMQ na inibição do crescimento do *P. expansum* tem comportamento similar aos registrados em testes conduzidos para bactérias gram-positivas e gram-negativas, em ensaios com os polímeros na forma de gel nos quais menores concentrações proporcionaram uma maior atividade antibacteriana (GOY et al., 2016). Este fenômeno tem sido interpretado em termos do arranjo espacial que as cadeias poliméricas assumem em solução: em baixas concentrações de polímeros menor o número de interações intercadeias, o que facilita os acoplamentos dos grupos funcionais laterais com os fosfolipídeos da parede celular dos fungos (PALERMO & KURODA, 2010).

Com o aumento da concentração, há um aumento proporcional do volume hidrodinâmico por unidade de massa molar. Isto implica em uma elevação no número de cadeias poliméricas por volume o que favorecendo as trocas iônicas entre os grupos carregados, levando a uma configuração espacial de densa estrutura sobreposta (denominada conformação enovelada) (FREITAS et al., 2010). Nestas condições as interações intercadeias tendem a predominar obliterando o acesso aos sítios ativos internos segundo estudo apresentado por Gabriel et al., (2009). Esse efeito tem papel relevante na atividade da quitosana e derivados conforme comprovado em estudos anteriores realizados com bactérias (GOY & ASSIS, 2014; GOY et al., 2016).

Teste de germinação de esporos do fungo P. expansum em meio líquido

Para confirmar a atividade antifúngica dos polímeros, foram também conduzidos testes de supressão de germinação dos esporos em suspensão por medida em câmara de Neubauer. As imagens foram captadas

digitalmente e contagem realizada pontualmente através da identificação visual dos esporos germinados no quadrante da central da câmara, designado como "C" (LUCARINI et al., 2004). As imagens da Figura 6 são

exemplos típicos da visualização da inoculação de *P. expansum* em câmara de Neubauer, com identificação no primeiro quadro de esporos germinados

e não-germinados. Os resultados dos cálculos percentuais são mostrados na Figura 7 em função da concentração dos polímeros diluídos.

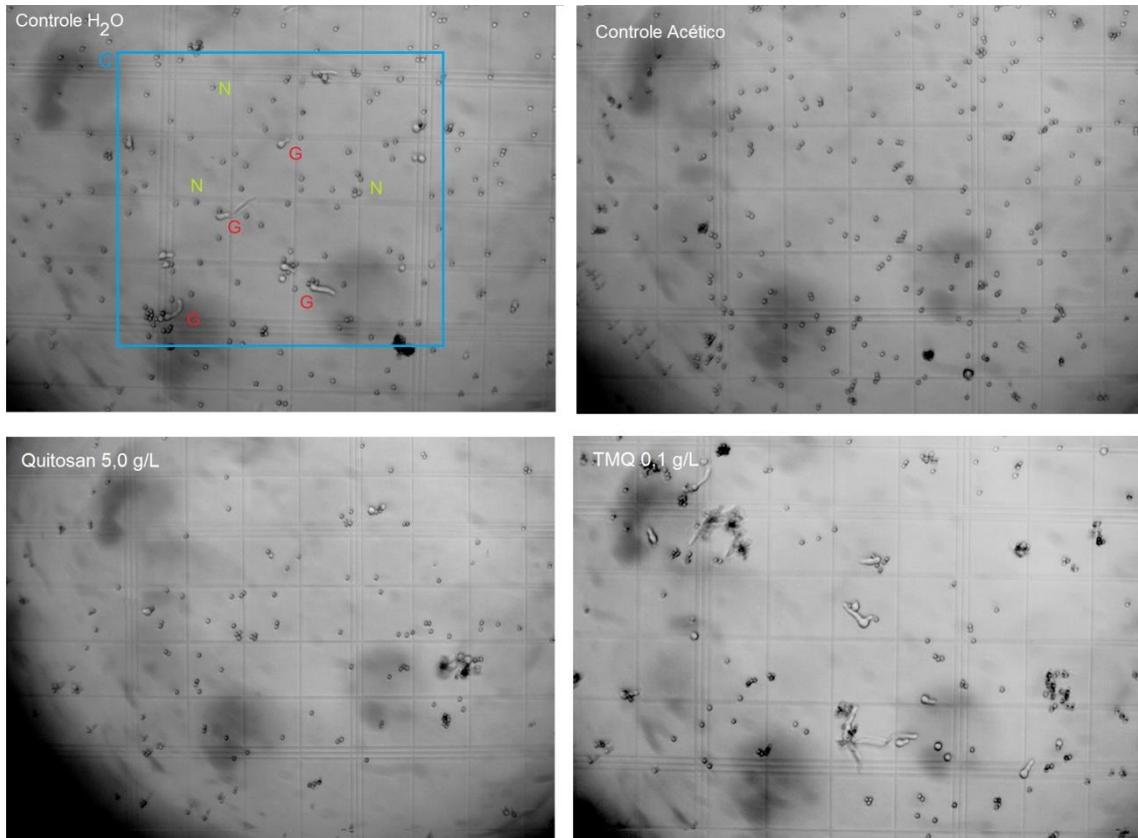


Figura 6. Imagens digitais ilustrativas dos esporos germinados e não germinados de *P. expansum* inoculados em câmara de Neubauer.

As medidas em líquido apresentaram resultados distintos daqueles obtidos em meio sólido. Quando disperso em solvente aquoso a quitosana comercial resultou em uma melhor atividade inibindo em sua totalidade a germinação dos esporos ao longo das 26 horas de observação. Resultados estes confirmados para todas as concentrações de quitosana avaliadas. No controle (H₂O) a

germinação dos esporos foi de $9,3 \pm 4,0$ % no período não foram observados esporos germinados no meio com ácido acético a 1%. A presença de TMQ em meio aquoso, nas diversas concentrações favoreceu o crescimento fúngico, com flutuação estatística não significativa a 5% e, considerando os desvios, possibilita um ajuste linear a $R^2 = 0,6$ para melhor visualização do efeito da concentração (Figura 7).

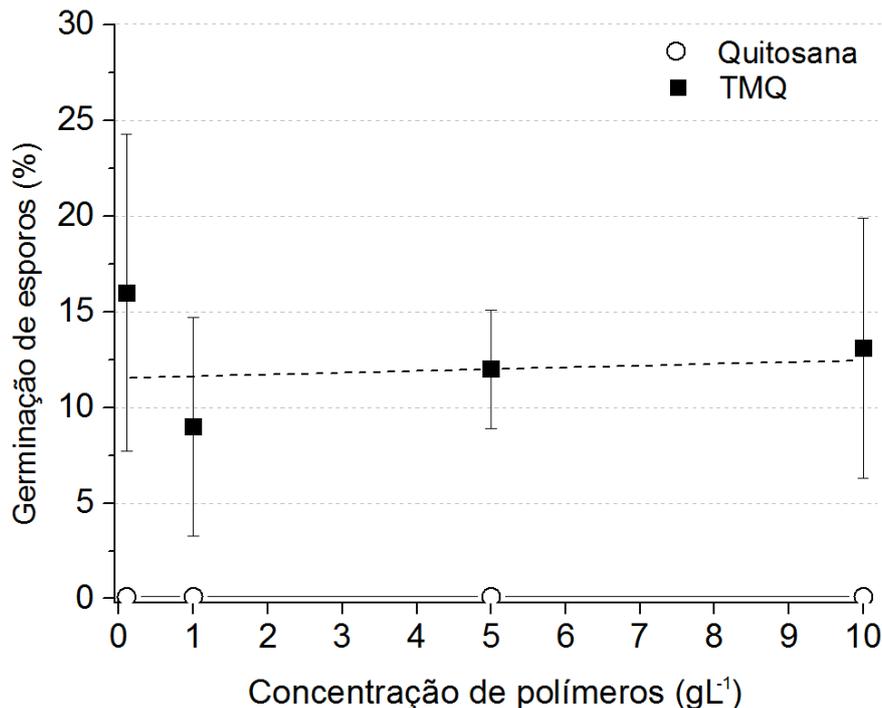


Figura 7. Variação da porcentagem de germinação de esporos do fungo *P. expansum* para quitosana e TMQ em quatro concentrações diferentes (gL⁻¹).

Um aspecto a ser observado é a ausência de germinação no meio referência com 1% de ácido acético (pH 2,8). O ácido acético tem sido avaliado com sucesso, seja em análises *in vitro* (OSÓRIO et al., 2013) como *in vivo* (YU & ZHENG, 2007), com redução significativa na incidência e severidade do bolor azul. Na presença de ácido acético, há um abaixamento do pH no meio estabelecendo um gradiente osmótico, entre o interior e o exterior do organismo em função da hidrofobicidade do ácido. Esta condição força uma difusão que leva a ruptura da parede celular e acumulação de ânions tóxicos internos (HASSAN et al., 2015).

O ácido acético é também empregado como solvente da quitosana comercial (esta é solúvel somente em pHs abaixo de seu $pK_a = 6,4$), embora o pH do gel aumente com o acréscimo do teor de polímero, a ausência de esporos no meio contendo quitosana indica uma ação sinérgica entre os dois compostos na inibição total do crescimento do *P. expansum*. Cabe ressaltar que esses

ensaios são realizados em meio líquido, e as aplicações correntes de quitosana se dão pela formação de filmes ou coberturas protetoras o que ocorre com a volatilização do solvente. Ou seja, após a evaporação do ácido acético a película formada pela quitosana tende a se estabilizar no estado sólido em pH próximo ao neutro.

Com respeito à ação da quitosana e de seus derivados, diversos trabalhos na literatura têm discutido os diferentes graus de atividade quando em solução ou no formato sólido na supressão de esporos germinados no crescimento (RABEA et al., 2003; OLIVEIRA JR et al., 2012). Embora com algumas divergências entre os resultados, nota-se uma concordância de que a quitosana e seus derivados hidrossolúveis atuam potencialmente nos primeiros estágios de incubação (fase de progressão).

A menor eficiência do derivado TMQ em meio líquido (Figura 7) decorre essencialmente de sua característica hidrossolúvel e da

quantidade de água disponível para o acoplamento e solvatação dos sítios carregados, o que reduz a capacidade de interação iônica com a membrana micelar.

De uma modo geral os derivados *N*-metilados de quitosana atuam no retardamento do desenvolvimento fúngico principalmente nos primeiros 4 a 6 dias (BENHAMOU et al., 1994), após este período tem-se observado que, dependendo da cepa, a presença de material remanescente no meio favorece o crescimento em vez de reduzi-lo (MUZZARELLI et al., 2001; BADAWT & RABEA, 2011; MANIVASAGAN et al., 2014), similar ao medido neste trabalho.

Não há uma explicação clara para este fenômeno, mas segundo RABEA et al., 2003, os derivados de quitosana têm a capacidade de induzir a segregação de quitanases e enzimas hidrolisantes em alguns fungos. A quitanase degrada o derivado gerando

uma redução de sua atividade. O aumento de enzimas hidrolisantes favorece a quebra de carboidratos simples como D-glicose e sais minerais no meio, aumentando a disponibilidade de nutrientes assimiláveis que favorecem o crescimento micelial.

Na quitosana, por apresentar menor densidade de cargas e consequentemente ser mais hidrofóbica que a TMQ, esse fenômeno é minimizado. De um modo geral, temos que a quitosana ou mesmo sua combinação com derivados, podem ser considerados como materiais adequados ao controle do crescimento de colônias de patógenos fúngicos necrotróficos, típicos de incidência pós-colheita, como o *P. expansum* testado neste trabalho. Critérios de aplicação como concentração e pH do meio solvente devem ser considerados e avaliados caso a caso para definir aplicações *in vivo*.

CONCLUSÕES

Quitosana de média massa molar e seu derivado quaternizado *N,N,N*-trimetilquitosana apresentaram atividade satisfatória na inibição do crescimento de colônias do fungo *P. expansum* em testes realizados *in vitro*. A quitosana apresentou um melhor desempenho quando dispersa em meio aquoso, reduzindo totalmente a germinação dos esporos ao longo de 6 dias em observações realizadas em câmara de Neubauer. Efeito semelhante foi observado para o ácido acético, aqui tomado como referencia considerando que este foi empregado como solvente da quitosana. Independente da concentração adicionada, o derivado quaternizado não foi efetivo na redução do crescimento em meio aquoso, apresentando efeito contrario: o de

favorecer o crescimento fúngico ao longo tempo, em concordância com dados da literatura. Em meio de cultura sólido, a TMQ tem boa atividade e apresenta uma melhor eficiência quando adicionado em baixas concentrações (0,1 e 1,0 gL⁻¹). Os dados foram discutidos considerando os mecanismos aceitos de ação antimicrobiana da quitosana e de seu derivado em meio sólido e aquoso. Dos resultados gerais depreende-se que ambos os polímeros apresentam ações inibidoras conta *P. expansum*, necessitando serem definidos critérios mais específicos, como concentração, tempo de interação, acidez e meio de solubilização para a definição de aplicação tópica *in vivo* que resulte em boa eficiência na redução do crescimento fúngico.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao apoio financeiro do CNPq e da Rede AgroNano (Embrapa).

REFERÊNCIAS

- ALBURQUENQUE, C.; BUCAREY, S.A.; NEIRA-CARRILLO, A., URZÚA, B.; HERMOSILLA, G.; TAPIA C.V. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. **Medical Mycology**, v.48(8), p.1018-1023, 2010.
- BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.2011(Article ID 460381), 29p., 2011.
- BARKA, E.A.; EULLAFFROY, P.; CLÉMENT, C.; VERNET, G. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Reports**, v.22(8), p.608-614, 2004.
- BENHAMOU, H.; LAFONTAINE, P.J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance to Fusarium crown and root rot tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, v.84(12), p.1432-1444, 1994.
- BLUM, L.E.B; AMARANTE, C.V.T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, v.29(4), p. 433-436, 2004.
- BLUM, L.E.B.; AMARANTE, C.V.T.; DEZANET, A.; LIMA, E.B.; NETO, P.H.; ÁVILA, R.D.; SIEGA, V. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29(2), p. 265-268, 2007.
- BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A new method for obtaining of quaternary salt of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.69(2), p.305-310, 2007.
- BRITTO, D.; SANTOS, M.F.; ASSIS, O.B.G. Evaluation of chitosans with different degrees of acetylation as fungicide coating on cut apples. **Alimentos e Nutrição**, v.23(1), p. 16-21, 2012.
- EL GHAOUTH, A.; PONNAMPALAM, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Chitosan Coating to Extend the Storage Life of Tomatoes. **HortScience**, v.27(9), p.1016-1018, 1992.
- FDA - US Food and Drug Administration. Center for food safety and applied Nutrition. GRAS notification 2001. Available at: <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm266601.pdf>. Acesso em 29.Jan.2016.
- FREITAS, R.A.; DRENSKI, M.F.; ALB, A.M.; REED, W.F. Characterization of stability, aggregation, and equilibrium properties of modified natural products; The case of carboxymethylated chitosans. **Materials Science and Engineering C**, v.30(1), p.34-41, 2010.
- GABRIEL, G.J., MAEGERLEIN, J.A., NELSON, C.F., DABKOWSKI, J.M., EREN, T., NÜSSLEIN, K.;TEW, G.N. Comparison of facially amphiphilic versus segregated monomers in the design of antibacterial copolymers. **Chemistry – A European Journal**, v.15(2), p.433-439, 2009.

- GOY, R.C.; BRITTO D.; ASSIS O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.19(3), p.241-247. 2009.
- GOY, R.C.; ASSIS, O.B.G. Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and n,n,n-trimethylchitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.31(3), p.643-648, 2014.
- GOY, R.C.; MORAIS, C.T.B.; ASSIS, O.B.G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26(1), p. 122-127, 2016.
- HASSAN, R.; EL-KADI, S.; SAND, M. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. **International Journal of Advances in Biology**, v.2(1), p.1-11, 2015.
- HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; BELLO-PÉREZ, L.A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**. v.73(4), p.541-547, 2008.
- LUCARINI, A.C.; SILVA, L.A. da; BIANCHI, R.A.C. Um sistema para contagem semiautomática de microorganismos. **Revista Pesquisa e Tecnologia FEI**, n.26, p.36-40, 2004.
- MANIVASAGAN, P.; SENTHILKUMAR, K.; VENKATESON, J., KIM, S-E. **Biological applications of chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives**. In: Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments. Se-Kwon Kim Editor, CRP Press, Boca Raton, FL., Capítulo 13, pp. 243-260. 2014.
- MUZZARELLI, R.A.A.; MUZZARELLI, C.; TARSÌ, R.; MILIANI, M.; GABBANELLI, F.; CARTOLARI, M. Fungistatic Activity of Modified Chitosans against *Saprolegnia* parasítica. **Biomacromolecules**, v.2(1), p.165-169, 2001.
- NARAYANASAMY, P. **Postharvest Pathogens and Disease Management**. Wiley-Interscience Inc. Hoboken, N. Jersey. 1st ed. 2005 , 592p.
- OLIVEIRA JR, E.N.; EL GUEDDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M.; FRANCO, T.T. Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43(2), p.800-809, 2012.
- OSÓRIO, G.T.; OLIVEIRA, B.S.; DI PIERO, R.M. Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e o mofo cinzento em frutos de maçã. **Tropical Plant Pathology**, v.38(1), p.63-67, 2013.
- PALERMO, E.F.; KURODA, K. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.87(6), p.1605-1615, 2010.
- QIU, M.; WU, C.; REN, G.; LIANG, X.; WANG, X.; HUANG, J. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. **Food Chemistry**, v.155, p.105-111, 2014.
- RABEA, E.I.; BADAWY, M.E.-T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, v.4(6), p.1457-1465, 2003.

ROCHA NETO, A.C.; DI PIERO, R.M. Controle do bolor azul em frutos de maçã imersos em solução de ácido salicílico. **Bioscience Journal**, v.29(4), p.884-891, 2013.

SALOMÃO, B.C.M.; MULLER, C.; AMPARO, H.C.; ARAGÃO, G.M.F. Survey of molds, yeast and *Alicyclobacillus* spp. from a concentrated apple juice productive. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45(1), p.49-58, 2014.

SATTOLO, N.M.S.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. Quitosana como fungicida em madeiras *Pinus* sp. Empregadas na confecção de caixas “K”. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.13(2), p.128-132, 2010.

SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A Challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v.13(4), p.1819-1846, 2015.

WELKE, J.E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H.A.; NOLL, I.B. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. **Ciência Rural**, v.39(1), p. 300-308, 2009.

YU, T.; ZHENG, X.D. Indole-3-acetic acid enhances the biocontrol of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear fruit by *Cryptococcus laurentii*. **FEMS**, v.7(3), p.459-464, 2007.

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