

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE QUITOSANAS E SEUS DERIVADOS: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

Juliana B. Macedo^a, Rafaela C. Sanfelice^b, Luiza A. Mercante^c, Danilo Martins dos Santos^d, Filipe Habitzreuter^e, Sérgio Paulo Campana-Filho^e e Adriana Pavinatto^{a,*}

^aInstituto Científico e Tecnológico, Universidade Brasil, 08230-030 São Paulo – SP, Brasil

^bInstituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, 37715-400 Poços de Caldas – MG, Brasil

^cInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador – BA, Brasil

^dEmbrapa Instrumentação, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

^eInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 25/10/2021; aceito em 09/12/2021; publicado na web em 16/02/2022

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES: INFLUENCE OF ITS STRUCTURAL CHARACTERISTICS. In recent years, there has been an increasing interest in the development of antimicrobial materials for different applications, especially in the biomedical field. In this context, chitosan is one of the most employed materials due to its highly attractive properties, such as biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, and antimicrobial activity against gram-negative and gram-positive bacteria and fungi. In this review, we discuss the different methods used to obtain chitosan and point out how they affect the structural and chemical properties of this material, followed by a detailed discussion on how these properties influence its antimicrobial activities. Additionally, we summarize the most accepted antimicrobial mechanisms of action for chitosans. Specifically, we aim to provide a comprehensive overview on the last findings and progress reported in the literature on the factors that influence the antimicrobial activity of chitosan, e.g., polymeric average molecular weight ($\overline{M\overline{W}}$), average degree of acetylation (\overline{DA}), water-soluble derivatization and sample degree of purity. The data available in the literature indicate that in addition to the structural properties, the effectiveness of such antimicrobial activity of chitosan is also dependent on the target microorganisms. This review will help researchers to better understand the mechanism of action of chitosan against microorganisms based on its structural characteristics.

Keywords: chitosan; antimicrobial mechanisms; source; average acetylation degree; molecular weight.

INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo de cadeias lineares encontrado na natureza em pequenas quantidades que atua em funções estruturais de membranas celulares de alguns fungos e leveduras. Apesar de estar disponível na natureza, sua principal forma de obtenção é através da reação de desacetilação parcial (ou total, o que é raramente conseguido) da quitina, um polissacarídeo que também tem função estrutural e é encontrado como principal constituinte do exoesqueleto de invertebrados, tais como crustáceos, moluscos, anelídeos e celenterados, podendo ainda estar presente em insetos e na composição da parede celular de fungos e leveduras.¹⁻⁴ Embora ambos os polissacarídeos sejam constituídos por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcNAc), unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (Figura 1), na quitosana há a predominância de grupos GlcN, enquanto que na quitina os grupos GlcNAc prevalecem.

De modo geral, a presença de vários grupos acetilamina (-NHCOCH₃) faz com que a quitina seja insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos comuns devido ao alto grau de empacotamento das cadeias poliméricas, o que acaba por limitar seu uso. Por outro lado, a conversão de grupos acetamida em grupos amina (-NH₂) confere à quitosana solubilidade em solução aquosa diluída de ácidos (por exemplo, ácidos acético e clorídrico) por conta da protonação do grupo amina, o que leva à formação de um íon amônio (-NH₃⁺).^{1,5,6}

A extração da quitina e posterior derivatização em quitosana podem ser realizadas através de vários processos químicos ou

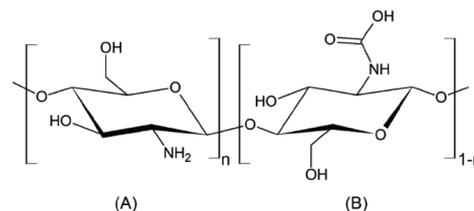


Figura 1. Representação esquemática da estrutura química das unidades repetitivas de quitina e quitosana, (A) GlcN e (B) GlcNAc

biológicos, os quais serão abordados nesta revisão. A fonte de matéria-prima, bem como os processos empregados na obtenção da quitosana, exercem forte influência nas características estruturais que regem as propriedades físico-químicas e biológicas desse polímero, a saber, massa molar média ($\overline{M\overline{M}}$), índice de polidispersão (PDI), grau médio de acetilação (\overline{GA}), o qual é correspondente ao número médio de unidades GlcNAc na cadeia polimérica, e parâmetro de acetilação, o qual indica a sequência de distribuição dos grupos GlcNAc e GlcN nas cadeias de quitosana. O termo “quitosanas” é frequentemente utilizado e refere-se às diferentes características estruturais que o polissacarídeo pode apresentar, uma vez que o polímero não possui uma estrutura única e definida. Tais características dependem, principalmente, da fonte de obtenção e do processo de extração e acarretam diferentes propriedades físico-químicas e biológicas, permitindo vasta aplicação nas mais diversas áreas.⁷

Propriedades como baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, assim como atividade antioxidante e antimicrobiana, fazem das quitosanas promissoras polímeros para aplicações em diversas áreas, incluindo as áreas de biotecnologia,⁸

*e-mail: adrianapavinatto@gmail.com

medicina,^{9,10} cosmética^{11,12} e agricultura.¹³⁻¹⁶ Dentre essas propriedades, é descrito na literatura um largo espectro de ação antimicrobiana das quitosanas, tais como forte atividade bactericida, atividade bacteriostática contra bactérias gram-positivas (G+) e gram-negativas (G-) e ação frente a fungos e leveduras.^{17,18} Apesar do mecanismo real de inibição ainda não ser totalmente compreendido, sabe-se que as características estruturais das quitosanas podem influenciar no mecanismo de ação de grupos de micro-organismos específicos, demandando, assim, o controle desses parâmetros para que haja potencialização em suas diversas formas de ação.^{13,19,20}

Apesar de diferentes trabalhos na literatura abordarem a atividade antimicrobiana das quitosanas com base em suas características estruturais e propriedades físico-químicas,^{17,20-24} ainda são escassos os estudos que reúnem e comparam tais resultados, relacionando-os com as diversas características estruturais das quitosanas utilizadas. Sendo assim, além de abordar as diferentes formas de obtenção de quitosanas e sua influência nas características estruturais do polissacarídeo, nesta revisão discutiremos evidências científicas sobre a influência dessas características em sua atividade antimicrobiana. Durante a revisão, serão abordados os principais mecanismos de ação propostos para a atividade antimicrobiana das quitosanas e como as variações das principais características estruturais do polímero podem levar a variações do efeito antimicrobiano, de forma a explorar os mecanismos possivelmente associados.

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA QUITOSANA E SUA INFLUÊNCIA NAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO POLISSACARÍDEO

Processos físico-químicos utilizados na produção de quitosanas

Quitosanas são preparadas em escala industrial, principalmente a partir da quitina extraída de carapaças de caranguejo e cascas de camarão oriundas do processamento de frutos do mar.²⁵ Fontes alternativas para a produção industrial da quitina, incluindo insetos²⁶ e moluscos,²⁷ também têm sido amplamente investigadas. Diferentes organismos apresentam diversas proporções mássicas de quitina. Por exemplo, resíduos da casca de crustáceos são, em média, compostos de 30% a 50% de massa de carbonato de cálcio e de 20% a 30%^{4,25} de massa de quitina, ao passo que os gládios de lulas (*Doryteuthis spp.*)

contêm 35% a 40% de quitina, 60% a 65% de proteínas e traços de sais inorgânicos.²⁸

O processo de extração de quitina envolve uma série de tratamentos químicos sequenciais, como desmineralização, desproteínização e despigmentação, destinados a remover diversos componentes, incluindo minerais, proteínas e pigmentos associados ao polímero, conforme mostrado na Figura 2.^{25,29} Dependendo da fonte de matéria-prima, como, por exemplo, os gládios de lulas, as etapas de desmineralização e despigmentação se tornam desnecessárias devido ao baixo teor de minerais e pigmentos.²⁸ Nos casos de carapaças de caranguejos e cascas de camarões, a etapa inicial de extração geralmente consiste na desmineralização, sendo a matéria-prima submetida a tratamento com soluções aquosas de diferentes ácidos, tais como HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH e HCOOH, para a remoção de minerais, incluindo carbonatos e fosfatos de cálcio.^{30,31} Os parâmetros que influenciam esse processo são: (i) teor de minerais na matéria-prima; (ii) força do ácido e concentração da solução ácida; (iii) concentração de matéria-prima; e (iv) tempo e temperatura de reação.^{25,30,32} Esses parâmetros devem ser ajustados de modo a proporcionar a máxima remoção de minerais e minimizar a despolimerização da quitina. Nesse sentido, a desmineralização é comumente realizada empregando soluções aquosas de HCl (1% - 10%) à temperatura ambiente por períodos de 1 a 3 h.^{25,33}

A etapa de desproteínização consiste na remoção de proteínas e de outros componentes orgânicos associados à quitina por meio de tratamentos com soluções aquosas de diferentes bases, incluindo NaOH, KOH, Ca(OH)₂, K₂CO₃, Na₂CO₃ e NaHCO₃. Soluções de NaOH (1% - 10%) são as mais utilizadas, e o processo de desproteínização é geralmente realizado a temperaturas variando entre 20 e 100 °C por períodos de 2 a 72 h.^{25,27,29} A concentração da solução alcalina, o tempo e a temperatura da reação devem ser controlados de modo a minimizar a despolimerização e a ocorrência de desacetilação da quitina. Dependendo da biomassa a partir da qual a quitina é extraída, uma etapa adicional posterior à despigmentação se faz necessária por meio de processos de extração com solventes, como etanol³⁴ e acetona,³⁵ ou por processo de branqueamento utilizando KMnO₄,³⁶ NaOCl³⁷ ou H₂O₂.³⁸ Dentre os extratos do processo de despigmentação por solventes está a astaxantina, um pigmento encontrado no exoesqueleto de crustáceos amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.³⁹

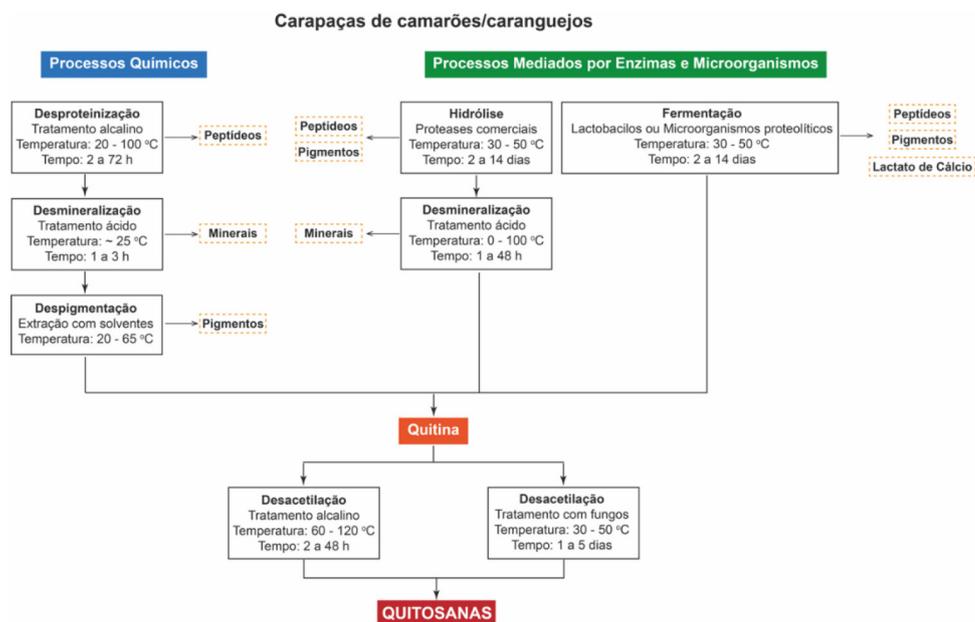


Figura 2. Processos químicos e mediados por enzimas e micro-organismos para a produção de quitina e quitosana

A conversão de quitina em quitosana ocorre através da reação de *N*-desacetilação, na qual os grupos acetamida nas unidades GlcNAc de quitina são hidrolisados, resultando na formação de uma cadeia polimérica predominantemente constituída de unidades GlcN,²⁷ conforme ilustrado na Figura 1. O produto obtido dessa reação é denominado quitosana quando o conteúdo médio de unidades GlcN é superior a 50% e apresenta solubilidade em soluções aquosas diluídas de ácidos, tais como os ácidos clorídrico e acético.¹⁴ A reação de *N*-desacetilação em escala laboratorial e industrial é frequentemente realizada através do tratamento alcalino da quitina com soluções concentradas de hidróxido de sódio (40% – 50%) a temperaturas elevadas (60 – 120 °C).^{25,29} Os principais parâmetros que influenciam esse processo são: (i) a concentração da solução alcalina; (ii) a razão mássica de quitina/solução alcalina; (iii) o tamanho médio das partículas; (iv) a cristalinidade da quitina; (v) o tempo; e (vi) as temperatura reacionais.^{27,29,40} Embora esse processo seja o mais utilizado, a reação ocorre em meio heterogêneo e leva à formação de produtos não uniformes em termos de características estruturais e propriedades físico-químicas.^{4,33} Ademais, apesar do tratamento alcalino resultar na hidrólise parcial dos grupos acetamido das unidades GlcNAc, a tentativa de melhorar a eficiência da reação através do prolongamento do tempo e do aumento da temperatura leva à despolimerização e, conseqüentemente, à formação de polímeros de baixa massa molar e a um elevado índice de dispersividade.^{14,27,41}

Nesse sentido, nas últimas duas décadas diversas estratégias têm sido propostas para minimizar a ocorrência de despolimerização e aumentar a eficiência da reação de *N*-desacetilação da quitina. Dentre os principais métodos desenvolvidos pode-se citar a explosão a vapor,⁴² a irradiação de ultrassom de alta intensidade²⁷ e de micro-ondas³⁷ e os tratamentos sucessivos de desacetilação.^{27,43} Independentemente do método utilizado para a desacetilação, os parâmetros reacionais devem ser cuidadosamente controlados, uma vez que afetam as características das quitosanas, incluindo o grau médio de acetilação (*GA*), a massa molecular média (*MM*) e a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc nas cadeias.^{25,27} Essas características, por sua vez, exercem grande influência sobre as propriedades físico-químicas (solubilidade e viscosidade), as atividades biológicas (biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana) e, conseqüentemente, as aplicações das quitosanas.^{13,44}

Processos mediados por enzimas e micro-organismos

Os métodos químicos utilizados industrialmente para a extração de quitina possuem algumas desvantagens, notadamente: alto consumo de energia, tempos longos de processamento e elevada geração de resíduos.^{45,46} Essa última ainda apresenta o agravante de os principais resíduos (pigmentos e proteínas) serem de difícil reaproveitamento.^{35,47} Com isso, métodos de extração de quitina mediados por enzimas e micro-organismos vêm sendo propostos como alternativas mais ambientalmente amigáveis (sustentáveis) para efetuar as etapas de desproteínização, desmineralização e despigmentação, conforme ilustrado na Figura 2.⁴⁸ Além disso, quitosanas também podem ser obtidas via desacetilação enzimática da quitina.⁴⁹

Nos processos mediados por enzimas, para a etapa de desproteínização, é comum o uso de proteases, tais como pepsina⁵⁰ e tripsina.⁵¹ Embora a obtenção de enzimas purificadas seja um processo de alto custo e com baixa eficiência, é possível utilizar proteases derivadas de bactérias⁵² e vísceras de peixes.⁵³ Por mais que o tratamento enzimático seja menos eficiente e apresente maiores custos quando comparado ao processo termoquímico realizado em meio fortemente alcalino, ele gera hidrolisado proteico com grande potencial de uso na indústria alimentícia.^{39,47}

A extração de quitina da biomassa também pode ser mediada por micro-organismos *via* processos fermentativos empregando bactérias (*Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*) e fungos (*Aspergillus sp.*).⁵⁴ Os lactobacilos são responsáveis pela fermentação da biomassa e subseqüente produção *in situ* de ácidos orgânicos (por exemplo, ácidos láctico e acético), o que acarreta a diminuição do pH e ativação das proteases presentes no meio.⁵⁵ Como nos processos mediados por enzimas, o uso de lactobacilos leva à formação de uma fase líquida rica em proteínas e pigmentos e uma fase sólida rica em quitina, que pode ser facilmente separada por filtração. É interessante destacar que a desmineralização também ocorre durante este processo, visto que os carbonatos e fosfatos são removidos na presença dos ácidos utilizados.⁵⁶ De modo alternativo, outros micro-organismos capazes de produzir grandes quantidades de proteases podem ser selecionados para a desproteínização.⁴⁶

Tais métodos de extração de quitina, sejam eles mediados por enzimas ou micro-organismos, caracterizam-se pelas condições brandas empregadas, já que as soluções de ácidos e bases utilizadas não são fortes e as temperaturas de processamento estão tipicamente entre 30 e 50 °C. No entanto, as reações podem levar de 7 a 14 dias.⁵⁷ Tais condições tendem a extrair quitinas de elevada massa molecular e com menor grau de dispersividade, além de prevenir a ocorrência de desacetilação.⁵⁷ Embora ainda sejam processos de maior custo quando comparados aos termoquímicos, seu desenvolvimento tem evoluído a partir de estudos que visam avaliar os efeitos de diferentes fatores, principalmente aqueles ligados ao processo de fermentação, tais como pH inicial, fonte de carbono e sua concentração, temperatura, tempo, tamanho das partículas do substrato e tipo de micro-organismo e das diferentes fontes de biomassa.^{46,57} Portanto, em alguns casos, a eficiência na obtenção de quitina pode ser superior a 90%.^{58,59} O uso de consórcios de micro-organismos, que combina as diferentes atividades biológicas das culturas associadas, também pode ser adequado conforme a natureza, vegetal ou animal, da biomassa. Dessa forma, resíduos comuns da indústria alimentícia (por exemplo, soro de leite e melaço) podem ser utilizados como fontes de carbono para que a fermentação ocorra.⁴⁶ Como resultado, a quitina pode ser produzida inteiramente a partir de rejeitos das indústrias pesqueira e alimentícia.

Processos biotecnológicos para a produção de quitosanas

Os processos descritos anteriormente envolvem a extração de quitina e sua posterior conversão em quitosanas a partir de biomassa de procedência marinha, os quais podem ser afetados pela sazonalidade dos animais, bem como pelos elevados custos de produção e controle limitado das propriedades físico-químicas dos produtos.⁶⁰ Dessa forma, processos biotecnológicos de produção de quitosanas a partir do cultivo de fungos vêm sendo estudados com intuito de contornar tais desvantagens.

Fungos dos gêneros *Mucor*, *Aspergillus* e *Absidia*, além da classe dos *Zigomicetos*, produzem quitina e quitosanas em suas paredes celulares,⁶⁰ cujos teores em massa de quitina variam entre 2% e 42%.^{61,62} O cultivo contínuo, independentemente de quaisquer fatores sazonais, e o rigoroso controle das condições de cultivo, juntamente com o emprego de fontes de carbono abundantes e de cepas selecionadas ou geneticamente modificadas para apresentar elevada taxa de crescimento são as principais características dos processos biotecnológicos de produção de quitina e quitosanas. Além disso, os processos de isolamento e separação de quitina e quitosanas são simples, a pureza dos produtos é elevada⁶³ e as características estruturais e físico-químicas são controladas,⁶⁴ garantindo reprodutibilidade das propriedades e superando, assim, as mais importantes limitações das aplicações na indústria, sobretudo a alimentícia, a farmacêutica e a biomédica.⁶²

O baixo impacto ambiental dos processos biotecnológicos

também é relevante, uma vez que eles não demandam grandes quantidades de insumos, tais como água, ácidos e bases fortes, além de não dependerem dos descartes da pesca predatória de animais marinhos.⁶⁴ Ademais, as fontes de carbono utilizadas para o cultivo dos fungos podem ter origem de descartes agroindustriais, como milhocina e manipueira,^{63,65} ampliando o caráter ecologicamente amigável deste tipo de processo.

A desacetilação da quitina para a produção de quitosana ocorre através de enzimas denominadas quitina desacetilases, presentes em fungos como *Mucor rouxii*⁶⁶ e *Aspergillus nidulans*.⁶⁷ As quitosanas produzidas tendem a apresentar elevada massa molecular e *GA* bem definido devido à regiosseletividade das enzimas.⁶⁸ Outras enzimas, como quitinases e quitosanasases, são responsáveis pela formação de oligômeros de quitosanas com propriedades físico-químicas bem conhecidas, além do controle dos parâmetros de acetilação.⁶⁹ O isolamento da quitosana a partir dos micélios de fungos ocorre por processos de separação, conforme mostrado na Figura 3.^{61,64}

O principal desafio dos métodos biotecnológicos está relacionado à quantidade de quitosanas produzidas. As pesquisas mais recentes têm focado na seleção de espécies de fungos e na otimização das condições de cultivo para viabilizar a produção de quitosana em escala industrial, a fim de competir com os métodos convencionais. Diferentes fontes de carbono e suas concentrações, assim como temperatura e tempo de fermentação, são variáveis comumente estudadas.^{60,61,63,65} Além do cultivo de fungos, os pesquisadores também têm buscado reutilizar os fungos descartados pelas indústrias cervejeiras e de panificação⁶² e discutir o uso de micro-organismos geneticamente modificados.⁷⁰

MECANISMOS DE AÇÃO DA QUITOSANA NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Principais hipóteses do mecanismo de ação da quitosana contra micro-organismos

A conhecida atividade antimicrobiana das quitosanas contra bactérias G+, G- e fungos é dependente de fatores que incluem o tipo

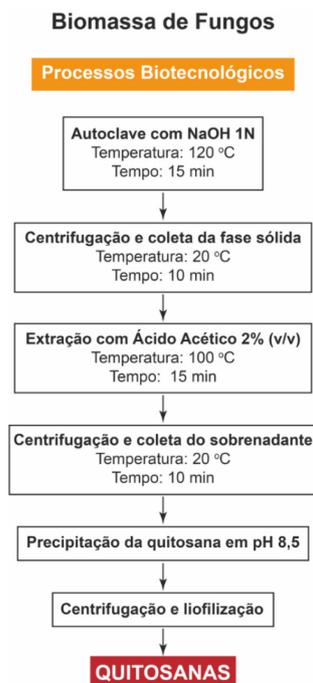


Figura 3. Processo de isolamento de quitosanas obtidas por métodos biotecnológicos

de micro-organismo, o pH do meio, as características estruturais do polímero (massa molecular e grau de acetilação), a fonte de obtenção da quitosana e a concentração de quitosana.²⁰ Dentre esses fatores, o pH do meio é um parâmetro crucial para a atividade antimicrobiana desses polissacarídeos por estar intimamente relacionado com a sua solubilidade, uma vez que o grupamento amina ($-NH_2$) torna-se carregado positivamente ($-NH_3^+$) em pH levemente ácidos fazendo com que a quitosana seja mais solúveis e tenham uma melhor atividade antimicrobiana que a quitina.^{17,18,20,23,44,71-73} Nesse sentido, o *GA* das quitosanas infere na determinação da quantidade de cargas positivas presente nas cadeias e, conseqüentemente, na atividade antimicrobiana do polímero. Além de apresentar carga positiva em soluções aquosas levemente ácidas (acidez muito elevada pode danificar estruturalmente a cadeia polimérica), a quitosana é uma macromolécula, e sua elevada massa molecular média também influencia a atividade microbiológica.⁴⁴ A quitosana é capaz de inibir o crescimento de uma ampla variedade de fungos e bactérias,^{23,44,74,75} porém, de forma geral, a sua atividade antifúngica apresenta menor eficiência quando comparada com a atividade antibacteriana.

Diferentes mecanismos vêm sendo propostos para explicar a ação das quitosanas e seus derivados frente aos diferentes micro-organismos. De acordo com a literatura, os mecanismos de ação mais aceitos são: (i) alteração da permeabilidade da membrana ou parede celular do micro-organismo, causando seu rompimento;⁷⁶⁻⁷⁸ (ii) interação das quitosanas com o DNA do micro-organismo, afetando a síntese de proteínas devido à inibição do mRNA;⁷⁹⁻⁸³ (iii) quelação de nutrientes (íons metálicos) pelas quitosanas, os quais são essenciais para o crescimento microbiano;⁸⁴⁻⁸⁶ ou (iv) formação de um filme polimérico espesso sobre a superfície celular do micro-organismo, impedindo trocas gasosas e de nutrientes com o meio externo, levando à morte celular.^{87,88} Além disso, é possível que mais de um desses mecanismos ocorra concomitantemente durante a ação antimicrobiana da quitosana.

Dentre essas hipóteses de mecanismo, o rompimento da membrana celular e a quelação com nutrientes são frequentemente relacionados à interação entre as cargas positivas dos grupos $-NH_3^+$ das cadeias de quitosanas e às cargas negativas presentes na membrana/parede celular dos micro-organismos, em que, geralmente, o menor grau de acetilação implica maior atividade das quitosanas contra os micro-organismos.⁷⁶ Já a interação com o DNA do micro-organismo é associada à capacidade de quitosanas com baixa massa molecular em permear para o interior das células.⁷⁹ Por outro lado, a formação de filme polimérico sob a superfície das células, englobando-a e impedindo trocas gasosas e de nutrientes, é frequentemente atribuída ao uso de quitosanas com alta massa molecular.⁸⁸ Além disso, a dependência da *MM* com a atividade das quitosanas pode estar relacionada à estrutura da membrana/parede celular do micro-organismo.^{44,73} A Figura 4 representa os diferentes mecanismos de ação das quitosanas e seus derivados frente a micro-organismos.

Atividade antifúngica

As quitosanas apresentam atividade contra fungos e leveduras, como aqueles dos gêneros *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Candida lambica*. Fungos são micro-organismos que apresentam unidades celulares conhecidas como hifas e que, além da membrana celular, possuem uma camada extra de proteção: a parede celular. A presença da parede celular pode ser um fator determinante para a maior resistência desses micro-organismos à ação de quitosanas, pois para promover o rompimento da célula e a possível entrada do polímero no meio intracelular, as duas barreiras devem ser transpostas.⁸⁹ A parede celular é composta, em sua maioria, por polissacarídeos, e sua composição é específica para cada gênero de fungo.⁸⁹ O mecanismo de

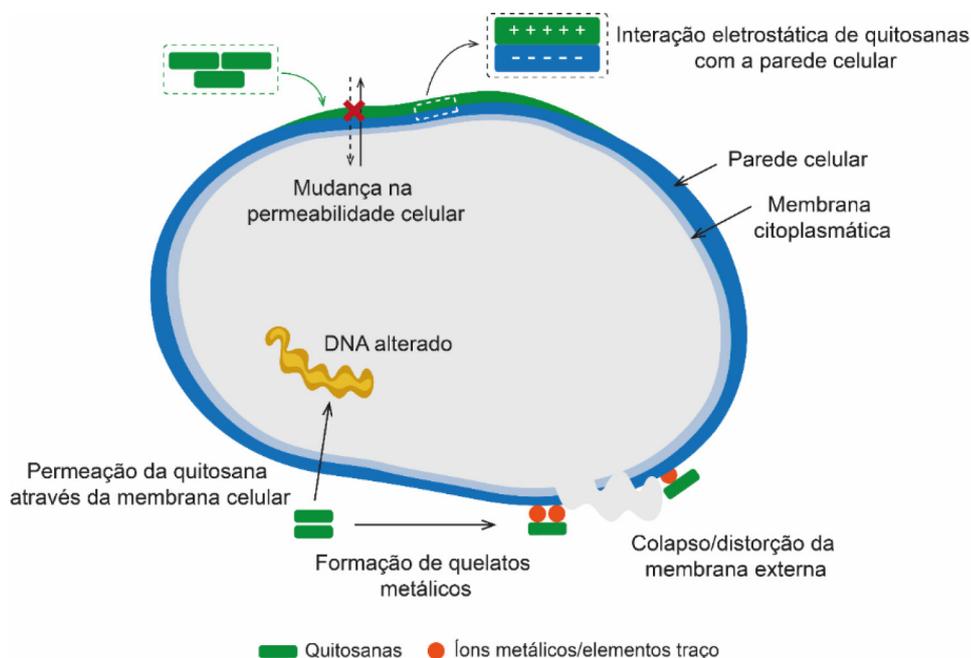


Figura 4. Representação esquemática dos principais mecanismos de ação das quitosanas frente a micro-organismos

ação frente a esses micro-organismos depende da estrutura da parede celular dos mesmos, que irá interferir diretamente no seu crescimento. O mecanismo que melhor descreve a ação de materiais à base de quitosanas contra o crescimento de certos tipos de fungos envolve a interação do polímero com a parede celular dos micro-organismos, afetando diretamente o seu crescimento.²³ Em sinergia, oligômeros de quitosana podem, então, se difundir nas hifas dos fungos, interferindo na atividade das enzimas responsáveis pelo seu crescimento.⁷² Além disso, a intensidade da degradação da parede celular é dependente do pH do meio, do *GA* das quitosanas e de sua concentração.^{23,72}

O trabalho de Pavinatto *et al.*⁷⁴ descreve a utilização de filmes à base de quitosana como barreira de proteção física e microbiológica de morangos *in natura*. Observou-se ausência de fungos no fruto recoberto com filmes de quitosana contendo glicerol após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Já o fruto usado como controle (sem recobrimento) ficou totalmente recoberto por fungos ao longo desse período. O principal fungo que ataca frutos como o morango é chamado fungo cinza, provocado pelo micro-organismo *Botrytis cinerea*, um fungo filamentososo da família *Sclerotiniaceae*. Quando o fruto é exposto a esse micro-organismo, rapidamente ocorre sua colonização, e em pouco tempo todo o fruto é completamente contaminado. Segundo os trabalhos de Hadwiger,⁹⁰ Lee *et al.*⁹¹ e Lopes-Moya *et al.*,⁹² a natureza policatiônica das quitosanas, quando em contato com a parede celular dos fungos, provoca o vazamento de eletrólitos dentro da célula, retardando ou inibindo sua síntese proteica (Figura 5). Resultados similares foram relatados recentemente por Limon *et al.*,⁹³ Grande-Tovar *et al.*⁹⁴ e Al-Najada *et al.*⁹⁵

Meng *et al.*⁹⁶ reportaram a ação antifúngica de quitosanas frente ao micro-organismo *Aspergillus ochraceus*. Os autores verificaram uma significativa inibição da germinação de esporos e o crescimento do fungo através de mudanças na morfologia externa e na microestrutura interna do *A. ochraceus*. Os resultados indicaram que o tratamento com quitosana promoveu a degradação celular através da perturbação da integridade da membrana celular, além da consequente inibição da biogênese do ribossomo, o que poderia explicar a possível ação antifúngica das quitosanas.

Tal ação contra o micro-organismo *Alteraria alternata* foi reportada no trabalho de Guo *et al.*⁹⁷ Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram aos autores concluir que a quitosana age atacando

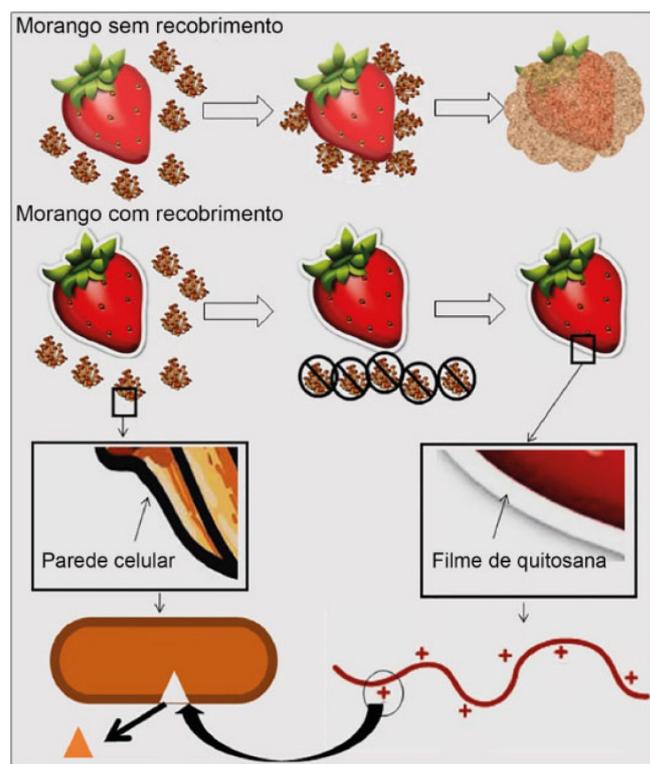


Figura 5. Ilustração esquemática do processo de proteção contra micro-organismos em morangos revestidos com filmes de quitosana. Adaptada com permissão da ref. 74. Copyright 2020 ELSEVIER

a parede celular do fungo através da ação das cargas positivas da cadeia polimérica (atração eletrostática), como já foi relatado em outros trabalhos.^{18,92,95,96,98} Os autores utilizaram frutos de jujuba com e sem a inoculação de uma suspensão de quitosana, e a qualidade dos frutos foi acompanhada durante um período de quatro dias. Através dos resultados foi possível observar que o tamanho das lesões nos frutos foi mais pronunciado naqueles que não foram inoculados com a suspensão de quitosana, o que evidenciou a eficácia do polissacarídeo no combate à degradação do fruto por fungos.

Atividade bactericida

Estudos recentes relatam que a quitosana apresenta atividade bactericida contra bactérias G+, como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e bactérias G-, como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*.^{20,71,99} Do mesmo modo que ocorre com a atividade fungicida, um dos fatores que mais influencia a atividade bactericida de quitosanas é o seu \overline{GA} . Diferentes estudos demonstram que quanto menor o \overline{GA} , maior é a densidade de carga positiva proporcionada pelo grupo amino protonado nas cadeias e, com isso, maior é a atividade antibacteriana do polímero.¹⁰⁰⁻¹⁰² Apesar de a maioria dos estudos relatar essa hipótese em relação ao \overline{GA} , outros mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade bactericida e bacteriostática da quitosana, dependendo não só das características estruturais do polissacarídeo, mas também da composição estrutural do micro-organismo, uma vez que as bactérias G+ e G- diferem quanto à constituição de suas membranas celulares, conforme mostrado na Figura 6A. As membranas das bactérias G+ são formadas por várias camadas de peptidoglicano e ácidos teicóicos, ao passo que as membranas das bactérias G- são compostas por duas camadas de peptidoglicano e lipoproteínas, além de uma camada externa formada por uma membrana caracterizada pela presença de lipopolissacarídeos e proteínas.^{103,104} Por esse motivo, as bactérias G- são mais seletivas à penetração de componentes na célula em comparação às bactérias G+. O tipo de mecanismo de ação antibacteriano da quitosana difere para cada tipo de célula, mas acredita-se que a principal interação das quitosanas seja com as moléculas de peptidoglicano (Figura 6B) e lipopolissacarídeos (Figura 6C).^{82,101,105-107}

Machado *et al.* analisaram filmes à base de quitosana com relação à sua resposta de inibição do crescimento de *E. coli*, uma bactéria G- associada à contaminação e intoxicação alimentar.¹⁰⁷

Os autores relataram que a atividade bactericida estava relacionada à interação do grupo amino da quitosana com o fosfolipídio dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), componente principal das membranas celulares de bactérias G-. Essa interação provoca a saída de componentes intracelulares, como ácidos nucleicos e glicose, e impede o transporte de nutrientes para as células microbianas, causando a morte celular. Resultados semelhantes foram reportados nos trabalhos de Moeini *et al.*¹⁰⁵ e Martins *et al.*¹⁰⁶

Madureira *et al.*¹⁰⁸ descreveram a ação antimicrobiana de nanopartículas de quitosana contra patógenos alimentares (*B. cereus* e *S. aureus* (G+), *E. coli* e *S. typhimurium* (G-)). Os autores afirmaram que a quitosana pode agir contra essas bactérias através do rompimento da membrana celular ou pela inibição da replicação de DNA e mRNA. De forma similar, no trabalho de Caroni *et al.*¹⁰⁹ os autores estudaram o comportamento de filmes de quitosana e glicerol frente a bactérias G- (*E. coli*) e G+ (*S. aureus* e *B. cereus*). O estudo foi realizado através do método de crescimento bacteriano em placa de petri e análise da formação do halo de inibição. Os resultados mostraram que os filmes tiveram respostas positivas quanto à inibição tanto de bactérias G+ como de bactérias G-.

INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS QUITOSANAS NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Conforme mencionado anteriormente, as características estruturais das quitosanas influenciam em suas propriedades funcionais, impactando diretamente sua solubilidade, viscosidade, biodegradabilidade, cristalinidade, biocompatibilidade e bioatividade.^{24,110} Dentre as características físico-químicas do polissacarídeo, o \overline{GA} , a \overline{MM} , as derivatizações que acarretam hidrossolubilidade e o grau de pureza da amostra interferem de

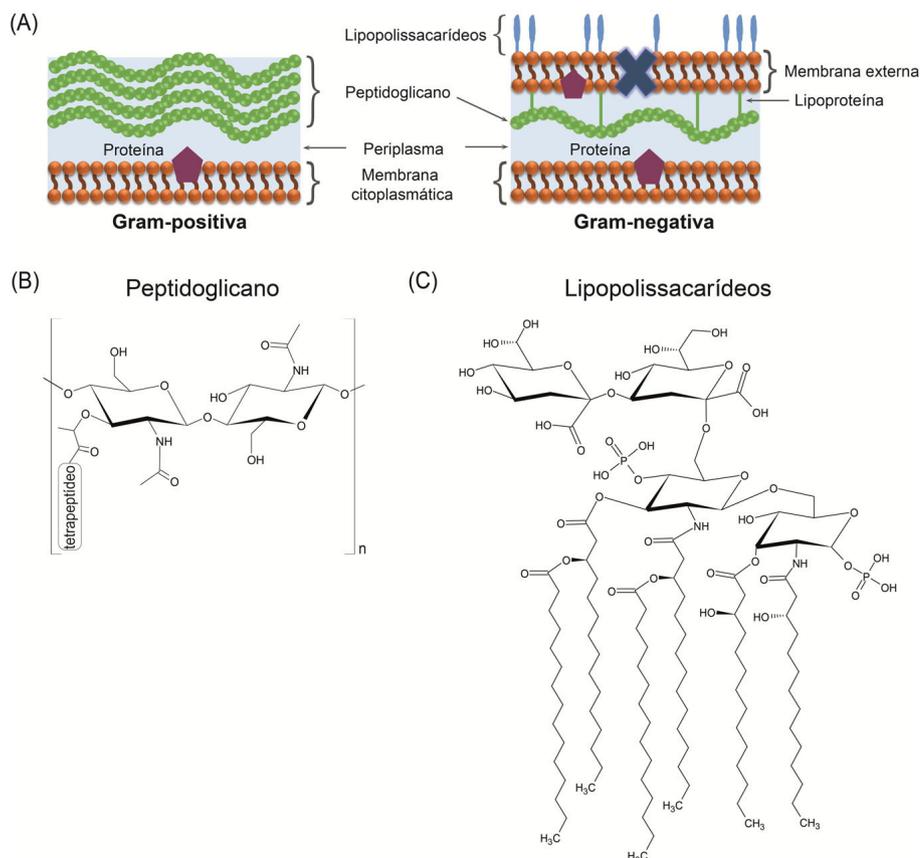


Figura 6. (A) Ilustração esquemática das membranas celulares de bactérias gram-positivas e gram-negativas e estruturas químicas das moléculas de (B) peptidoglicano e (C) lipopolissacarídeos (LPS)

forma independente em sua atividade antimicrobiana. Além disso, já sabemos que quitosanas com características semelhantes podem ter atividades diferentes a depender dos micro-organismos. Sendo assim, é de extrema importância que essas características sejam previamente definidas a fim de se determinar a composição química/estrutural mais adequada para a ação antimicrobiana contra cepas específicas.^{17,19,21,111} Conforme já discutido em seções anteriores, essas características podem ser determinadas durante o processo de obtenção de quitina e quitosanas, as quais podem ser moduladas de acordo com as condições reacionais utilizadas.¹¹²⁻¹¹⁴

Grau médio de acetilação (\overline{GA})

O grau médio de acetilação (\overline{GA}) é uma das características químicas das quitosanas mais importantes que influencia diretamente seu desempenho em muitas aplicações.^{112,116} Esse grau é expresso como uma porcentagem média de grupos de acetilados ($GA\%$) ou como fração molar de unidades *N*-acetiladas (F_A) e determina o teor de grupos *N*-acetilados. De modo complementar, o grau médio de desacetilação (\overline{GD}) indica a porcentagem média de grupos *N*-desacetilados e, conseqüentemente, de grupos $-NH_2$ presentes na cadeia polimérica das amostras de quitosana.^{20,116,117} Por ser variável, esse parâmetro interfere nas características físico-químicas do polímero, tais como solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólito, reatividade e estabilidade, afetando diretamente sua aplicabilidade.^{110,115,118,119} Portanto, quitosanas com diferentes \overline{GA} diferem com relação à quantidade média de cargas positivas, podendo ter comportamento variável em suas propriedades biológicas, como, por exemplo, ação antimicrobiana, analgésica, antioxidante, hemostática e mucoadesiva.^{120,121} Além do \overline{GA} , o parâmetro de acetilação, que indica como os grupos acetilados estão dispostos na cadeia polimérica da quitosana (podendo ser encontrados distribuídos em bloco, randomicamente ou de maneira alternada), é um fator que influencia suas propriedades físico-químicas e, por conseqüência, sua atividade antimicrobiana.¹¹¹

Em estudos realizados por Younes *et al.*, em 2014,¹⁹ quinze amostras de quitosanas com diferentes graus de acetilação e homogeneidade em relação à distribuição dos grupos acetilados nas cadeias foram utilizadas para investigar a eficácia antimicrobiana contra bactérias G- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi*), G+ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Micrococcus luteus*) e fungos (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Alternaria solani*). Os autores observaram maior eficiência no efeito inibitório com a diminuição do \overline{GA} e, de modo geral, as amostras apresentaram maior efeito bactericida contra bactérias G-. Em relação à atividade antifúngica, o efeito inibitório testado frente aos fungos *A. niger* e *F. oxysporum* não apresentou dependência com o \overline{GA} das quitosanas utilizadas. No entanto, para o fungo *A. solani*, os resultados mostraram que seu crescimento foi reduzido com a diminuição do \overline{GA} da quitosana empregada.

Mellegård *et al.*¹²² utilizaram amostras de quitosana solúveis em água com fração de acetilação (F_A) de 0,16 e 0,48 ($\overline{GA} = 16\%$ e 48% , respectivamente) em testes de inibição do crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* e três amostras mutantes de LPS de *E. coli* e *S. Typhimurium*. Os autores reportaram que quitosanas com $F_A = 0,16$ exerceram maior atividade antibacteriana do que as amostras com $F_A = 0,48$. Ademais, os resultados deste estudo estão de acordo com os obtidos por Younes *et al.*,¹⁹ uma vez que as diferentes quitosanas empregadas exibiram atividade bactericida maior contra *E. coli* (G-) do que contra *B. cereus* (G+).

Em outro estudo comparativo, Yuan *et al.*¹²³ avaliaram o efeito de quitosanas com quatro valores diferentes de \overline{GA} e verificaram

que quanto menor o \overline{GA} , maior a atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A ordem de classificação do \overline{GA} de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) foi $17,9\% < 25,9\% < 24,1\% < 26,5\%$ para *E. coli* e $17,9\% < 25,9\% \approx 24,1 < 26,5\%$ para *S. Aureus*. Como se pode observar, a amostra com \overline{GD} de 82,1% (menor \overline{GA}) apresentou maior efeito inibitório para os dois tipos de bactérias. Além disso, foi verificado que a atividade antibacteriana da quitosana foi maior contra *Escherichia coli* (G-) do que contra *Staphylococcus aureus* (G+).

Byun *et al.*¹²⁴ avaliaram o efeito inibitório de quitosanas com \overline{GA} de 18,4% e 37,3% no crescimento de diferentes bactérias G- (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*) e G+ (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*). Os resultados demonstraram que ambas as amostras inibiram o crescimento dos microrganismos testados, sendo que a quitosana com menor \overline{GA} (18,4%) exibiu atividade superior. O estudo também evidenciou que ambas as quitosanas apresentaram menor atividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli* em comparação com as outras três bactérias testadas.

Já os estudos realizados por Jung *et al.*¹²⁵ compararam as atividades antibacterianas de seis quitosanas solúveis em soluções aquosas ácidas e duas amostras de quitosanas solúveis em água com diferentes \overline{GA} frente a oito bactérias G- (*P. fluorescens*, *P. vulgaris*, *E. carotovora*, *S. marcescens*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. Typhimurium*) e seis bactérias G+ (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *L. curvatus* e *L. plantarum*). As atividades antibacterianas das quitosanas solúveis em soluções aquosas ácidas foram superiores às das solúveis em água. Além disso, a atividade diferiu dependendo dos tipos de quitosana e das bactérias testadas. De acordo com o que foi discutido anteriormente, as quitosanas com menor \overline{GA} demonstraram maior atividade antimicrobiana.

A Tabela 1 apresenta os trabalhos científicos que correlacionam a atividade antimicrobiana das quitosanas ao \overline{GA} .

Massa molecular média (\overline{MM})

Muitas propriedades físico-químicas e estruturais de uma cadeia polimérica são definidas pela sua massa molecular média (\overline{MM}). Uma propriedade bastante influenciada por essa característica é a solubilidade,^{114,115} a qual está diretamente relacionada à atividade antimicrobiana do polímero.¹¹⁴ De modo geral, quanto menor a \overline{MM} , menor o empacotamento das cadeias e, conseqüentemente, maior a sua solubilidade.⁶

Conforme discutido nas seções anteriores, é possível obter amostras de quitosanas com \overline{MM} bastante variável, frequentemente classificadas em alta, média e baixa. Alguns autores ainda utilizam o termo oligoquitosana para definir quitosanas de cadeia curta (geralmente abaixo de 10.000 g/mol).¹²¹ No entanto, os parâmetros (faixas de \overline{MM}) que determinam essa classificação são, muitas vezes, encontrados de forma divergente na literatura.^{23,128,129} Diferentes estudos sugerem uma relação entre a \overline{MM} da quitosana e seu mecanismo de ação frente a grupos de micro-organismos específicos.^{122,123,130} Como exemplo, podemos citar os estudos realizados por Younes *et al.*,¹⁹ os quais mostraram que o uso de quitosanas com diferentes \overline{MM} levou a diferentes efeitos em bactérias G+, G- e fungos. Independente da \overline{MM} , os maiores efeitos inibitórios foram observados em bactérias G- em comparação às G+, sendo que em bactérias G- o efeito foi mais pronunciado conforme diminuiu a massa molecular da quitosana utilizada. Já para as bactérias G+, o maior efeito inibitório foi observado na utilização de quitosanas com alta massa molecular. No caso dos fungos, verificou-se que o efeito inibitório depende fortemente do tipo de fungo estudado.

Garcia e colaboradores¹³¹ mostraram alterações na atividade antifúngica utilizando três quitosanas com \overline{MM} distintas, ou

Tabela 1. Exemplos de estudos que correlacionam o grau médio de acetilação com a atividade antimicrobiana das quitosanas

Amostra	Micro-organismo testado	Principais descobertas	Ref.
	G- (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. typhi</i>)	Para as bactérias: maior eficiência no efeito inibitório conforme o \overline{GA} diminui	
Quinze amostras de quitosanas com \overline{GA} variando de 2% a 61%	G+ (<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>M. luteus</i>)	Para os fungos <i>A. niger</i> e <i>F. oxysporum</i> : não houve dependência do efeito inibitório com o \overline{GA}	19
	Fungos (<i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> e <i>A. solani</i>)	Para os fungos <i>A. solani</i> : aumento no efeito inibitório com a diminuição do \overline{GA}	
Quitosanas com \overline{GA} variando entre 16% e 48%	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> Três amostras mutantes de LPS de <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> .	Quitosanas com menor \overline{GA} foram mais efetivas na inibição do que as mais acetiladas	122
Quitosanas com \overline{GA} de 26,5%, 25,9%, 24,1% e 17,9 %	G- (<i>E. coli</i>) G+ (<i>S. aureus</i>)	Quanto menor o \overline{GA} , menor é a concentração inibitória mínima	123
Quitosanas com \overline{GA} de 16%, 14%, 12% e 6%	Cepas de <i>C. albicans</i>	Todas as amostras inibiram efetivamente o crescimento de cepas de <i>C. Albicans</i> . As amostras com \overline{GA} menores foram as mais eficazes	126
Quitosanas com \overline{GA} de 37,3% e 18,4 %	G- (<i>S. Enteritidis</i> e <i>E. coli</i>) G+ (<i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>)	A quitosana com \overline{GA} de 18,4% apresentou atividade antibacteriana superior	124
Quitosanas a partir de fungos com \overline{GA} de 14,5%, 9,7%, 13,7% e 9,8%	G+ (<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>)	As amostras a partir de fungos com \overline{GA} = 9,7% e 9,8 % e de caranguejo com \overline{GA} = 6,7% e 12,2 % (baixos graus de <i>N</i> - acetilação) exibiram melhores atividades antimicrobianas, independentemente de suas fontes de obtenção	127
Quitosanas a partir de caranguejo com \overline{GA} de 11,6%, 6,7%, 12,2% e 14,8%	G- (<i>E. coli</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> e <i>V. parahaemolyticus</i>)		
Quitosanas com \overline{GA} de 18,4% e 37,3%	G- (<i>S. Enteritidis</i> e <i>E. coli</i>) G+ (<i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>)	Ambas as quitosanas inibiram o crescimento das cepas, sendo a quitosana com menor \overline{GA} a que exibiu atividade superior A atividade antibacteriana foi menor frente a <i>E. coli</i> em comparação com os outros tipos de bactérias	124
Quitosanas solúveis em solução ácida com \overline{GA} variando entre 0,8% e 10,7%	G- (<i>P. fluorescens</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> e <i>S. Typhimurium</i>)	Quitosanas solúveis em soluções aquosas ácidas apresentaram maior atividade bactericida do que as solúveis em água	125
Quitosanas solúveis em água com \overline{GA} de 20% e 36,8%	G+ (<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. curvatus</i> e <i>L. plantarum</i>)	Quitosanas com menor \overline{GA} demonstraram maior atividade antimicrobiana	

seja, alta (248.000 g/mol), média (140.000 g/mol) e baixa (76.000 g/mol). Nos testes realizados com fungos do gênero *Candida* ssp, observou-se a redução do crescimento fúngico com o aumento da \overline{MM} da quitosana para as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Já para a espécie *C. albicans*, não foi observada nenhuma correlação entre a \overline{MM} e o crescimento fúngico. Em experimentos realizados com fungos da espécie *Sporothrix brasiliensis*, três quitosanas com \overline{MM} distintas (alta = 984.000,00 g/mol, média = 467.000,00 g/mol e baixa = 206.000,00 g/mol) demonstraram atividade microbiana. Entretanto, a quitosana que apresentou maior efeito inibitório foi aquela com baixa \overline{MM} .¹³² Essas diferenças encontradas na ação antimicrobiana da quitosana para as diferentes espécies podem estar associadas à composição e à densidade de cargas negativas da parede celular do micro-organismo.^{76,133,134}

Outros resultados também sugerem relação na redução do crescimento e multiplicação dos micro-organismos de acordo com a \overline{MM} e o micro-organismo testado.^{19,121} Por exemplo, Kaya et al.¹³⁵ compararam a atividade antimicrobiana de quitosanas de baixa e média \overline{MM} frente a nove micro-organismos patogênicos (sete bactérias e duas leveduras). Os estudos revelaram que os efeitos antimicrobianos de ambas as quitosanas diferiram de acordo com os micro-organismos empregados, sendo que os resultados não puderam ser analisados (reunidos) em função dos grupos de bactérias G+ ou

G- e leveduras estudadas. No entanto, os resultados para a bactéria *Listeria monocytogenes* e para a levedura *Candida albicans* indicaram que as quitosanas de baixa \overline{MM} apresentaram maior efeito inibitório, ao passo que para a bactéria *B. subtilis* a quitosana de média \overline{MM} foi a que apresentou atividade antimicrobiana mais pronunciada. Dentro da mesma espécie, diferenças significativas foram encontradas entre os valores de inibição para as quitosanas de diferentes \overline{MM} utilizadas.

Bano e colaboradores¹³⁶ conduziram um estudo investigando a atividade bacteriana de quitosanas com \overline{MM} variável contra os patógenos *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *S. aureus*. Segundo os autores, a quitosana de alta \overline{MM} (220.000 g/mol) não apresentou nenhuma atividade bacteriana, enquanto aquelas de baixa \overline{MM} (801, 473 e 259 g/mol) exibiram atividade contra todas as cepas bacterianas sob investigação. Foi observado que os micro-organismos *P. aeruginosa* e *E. coli* foram mais sensíveis frente às quitosanas de baixa \overline{MM} . Dentre as amostras de baixa \overline{MM} utilizadas, verificou-se que quanto menor a \overline{MM} da quitosana, maior o efeito inibitório observado.

Os diferentes comportamentos observados em função da variação da \overline{MM} das quitosanas estão relacionados aos tipos de interação com a célula (ou parede celular), levando a distintos mecanismos de ação. Uma hipótese é a de que quitosanas de alta \overline{MM} apresentam maior dificuldade para penetrar através da membrana celular,

formando, portanto, películas (barreiras físicas) ao redor da célula que bloqueiam o transporte de nutrientes, resultando em morte celular.^{76,137,138} Quitosanas de alta \overline{MM} podem, ainda, interagir ou ligar-se à membrana celular para modificar sua permeabilidade, causando perturbações na célula e fuga do material intracelular.¹³² Já as quitosanas com cadeias poliméricas de baixa \overline{MM} conseguem

penetrar mais facilmente nas células microbianas, inibindo várias enzimas, interrompendo a síntese de proteínas e ligando-se ao DNA; como consequência, elas acabam por inibir a síntese de mRNA, causando distúrbios no metabolismo desses micro-organismos.^{17,139,140}

A Tabela 2 apresenta os estudos que correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana com a sua \overline{MM} .

Tabela 2. Exemplos de estudos que correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana com sua massa molecular

Amostra	Micro-organismo testado	Principais descobertas	Ref.
Quitosanas com alta (~247.800 g/mol), média (~140.500 g/mol) e baixa (~75.600 g/mol) massas moleculares	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i>	Para <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> , o crescimento fúngico diminuiu com o aumento da massa molecular da quitosana Para <i>C. albicans</i> , a massa molecular da quitosana não modulou o efeito inibitório	131
Quitosanas com alta (984.000 g/mol), média (467.000 g/mol) e baixa (206.400 g/mol) massas moleculares	<i>S. brasiliensis</i>	Amostras de alta, média e baixa massas moleculares foram capazes de inibir <i>S. brasiliensis</i> em até 60%, 69% e 88%, respectivamente Na atividade metabólica, quitosanas de alta, média e baixa massas moleculares apresentaram valores de inibição de 61%, 70% e 89%, respectivamente	132
Oligômero de quitosana (3.220 g/mol) e quitosana comercial de média massa molecular (massa molecular não informada)	Bactérias G+ (<i>L. garvieae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>L. monocytogenes</i>) Bactérias G- (<i>V. alginolyticus</i> , <i>Y. enterocolitica</i> e <i>S. enteritidis</i>) Leveduras (<i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>)	Para a bactéria <i>L. monocytogenes</i> e a levedura <i>C. albicans</i> , a quitosana de baixa massa molecular apresentou maior efeito inibidor Para a bactéria <i>B. subtilis</i> , a quitosana de média massa molecular apresentou maior atividade antimicrobiana	135
Quitosanas de alta massa molecular (220.000 g/mol) e oligômeros de quitosana (801, 473 e 259 g/mol)	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i>	A amostra com alta massa molecular não apresentou atividade bacteriana, enquanto que as de baixa massa molecular exibiram atividade antibacteriana <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> foram sensíveis a todos os tipos de quitosana. Quanto menor a massa molecular, maior foi o efeito inibitório	136
Quinze amostras de quitosanas com \overline{MW} variando entre 42.500 e 135.000 g/mol	G- (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. typhi</i>) G+ (<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>M. luteus</i>) Fungos (<i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> e <i>A. solani</i>)	Para as bactérias G-, a atividade antibacteriana aumentou com a diminuição da \overline{MW} , enquanto que o efeito oposto foi observado para as G+ Para os fungos <i>A. niger</i> e <i>A. solani</i> , não houve dependência do efeito inibitório com a \overline{MW} Para os fungos <i>F. oxysporum</i> , houve aumento no efeito inibitório com o aumento da \overline{MW}	19
Quitosanas com \overline{MW} de 32.000, 38.000, 138.000 e 184.000 g/mol	Cepas de <i>C. albicans</i>	As amostras inibiram efetivamente o crescimento de cepas de <i>C. Albicans</i> As amostras com menor \overline{MW} foram as mais eficazes	126
Quitosanas extraídas da casca do camarão com \overline{MW} de 41.000, 180.000 e 400.000 g/mol	<i>P. fragi</i> <i>S. Putrefaciens</i> <i>A. hidrófila</i>	<i>P. fragi</i> foi a cepa mais resistente ao efeito antimicrobiano, enquanto que <i>S. putrefaciens</i> foi a mais sensível Quanto maior a \overline{MW} , maior foi o efeito inibitório nas cepas estudadas	141
Quitosana comercial com \overline{MW} de 194.000 g/mol; quitooligossacarídeos derivados da quitosana comercial com \overline{MW} de 5.100, 14.300 e 41.100 g/mol	G- (<i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> e <i>S. enteritidis</i>) G+ (<i>E. coli</i>)	A quitosana comercial inibiu <i>S. aureus</i> mais eficientemente As bactérias G- foram mais suscetíveis à inibição quanto menor a \overline{MW}	142
Quitosanas com \overline{MW} variando entre 150.000 e 300.000 g/mol	Bactéria mesofílica Leveduras Bolores	A amostra com menor \overline{MW} apresentou melhor efeito microbiológico	143
Quitosanas com \overline{MW} de 3.300, 7.100, 29.200, 72.100, 156.000 e 300.000 g/mol	<i>E. coli</i> <i>E. aureus</i>	Em condições de pH ácido, a atividade aumentou com o aumento da \overline{MW} Em pH neutro, a atividade aumentou à medida que a \overline{MW} diminuiu	144

Derivados hidrossolúveis

Uma importante vantagem de se trabalhar com quitosanas é a possibilidade de se preparar uma grande variedade de derivados. Nos últimos anos, diferentes estratégias de derivatização vêm sendo predominantemente realizadas com o objetivo de melhorar certas propriedades das quitosanas.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ O pH levemente ácido geralmente necessário para solubilização de quitosanas ($pK_a \sim 6,3$), por exemplo, pode resultar em limitações para certas aplicações.^{44,148} A solubilidade dependente do pH é atribuída à presença dos grupamentos amina, os quais se tornam protonados após dissolução em $pH < 6$.⁷⁵ Para aumentar a solubilidade e possibilitar a utilização das quitosanas em uma faixa mais ampla de pH, vários derivados hidrossolúveis vêm sendo desenvolvidos.¹⁴⁹ Vale ressaltar que modificações químicas nas quitosanas podem ser dificultadas em razão de sua cristalinidade e da presença de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares em suas cadeias.¹⁵⁰ No entanto, com o passar dos anos, diferentes grupos de pesquisa vêm relatando a obtenção de derivados hidrossolúveis através da modificação química, realizada principalmente nos três grupamentos funcionais nucleofílicos: amina no carbono C2 (C2-NH₂), hidroxila secundária no carbono C3 (C3-OH) e hidroxila primária no carbono C6 (C6-OH),^{102,151} conforme ilustrado na Figura 7A. Esses grupamentos podem ser prontamente submetidos à derivatização química em condições reacionais brandas, permitindo a modulação das propriedades antimicrobianas da quitosana.^{22,148} O maior impedimento estérico associado à hidroxila secundária no carbono C3 faz com que a formação de derivados através da substituição nessa posição seja dificultada, e poucos são os relatos

de derivados sintetizados seguindo essa estratégia.¹⁴⁵ Os grupos funcionais mais comumente presentes em derivados antimicrobianos de quitosana são: amônio quaternário, fosfônio, guanidínil, carboxialquil, hidroxialquil e grupos contendo tiol.²² É importante destacar que as rotas de síntese convencionais empregadas geralmente resultam em produtos que podem ser substituídos em todos os três centros reativos das quitosanas, o que leva à formação de um produto sem especificidade no grupo substituído ou com um baixo grau de substituição. Para que esses problemas sejam superados, diferentes tipos de grupos protetores são empregados a fim de se bloquear o grupo C2-NH₂ ou os grupos C3-OH e C6-OH.^{44,152}

Levando em consideração os mecanismos de ação das quitosanas discutidos anteriormente, é razoável pensar que uma das estratégias para aumentar sua atividade antimicrobiana seja a preparação de derivados hidrossolúveis através da introdução de cargas positivas nas cadeias poliméricas.²⁰ Por esse motivo, grande parte dos trabalhos que avaliam a influência do processo de derivatização nas propriedades antimicrobiana das quitosanas reportam a síntese de derivados catiônicos.^{22,23,152,154} Nesse sentido, diversos estudos reportam a introdução de substituintes ao grupamento amina no C2 para a formação de sais de amônio quaternário e derivados de quitosanas solúveis em uma faixa de pH maior (incluindo o pH neutro) e com maior ação antimicrobiana em comparação às quitosanas não modificadas.^{44,155} Um estudo comparativo conduzido por Rúnarsson *et al.* revelou que apenas o derivado quaternário *N,N,N*-trimetil quitosana (TMQ), carregado positivamente, apresentou atividade contra a bactéria *S. aureus*, enquanto que os derivados neutros mono- e dimetilados e a quitosana não substituída não apresentaram

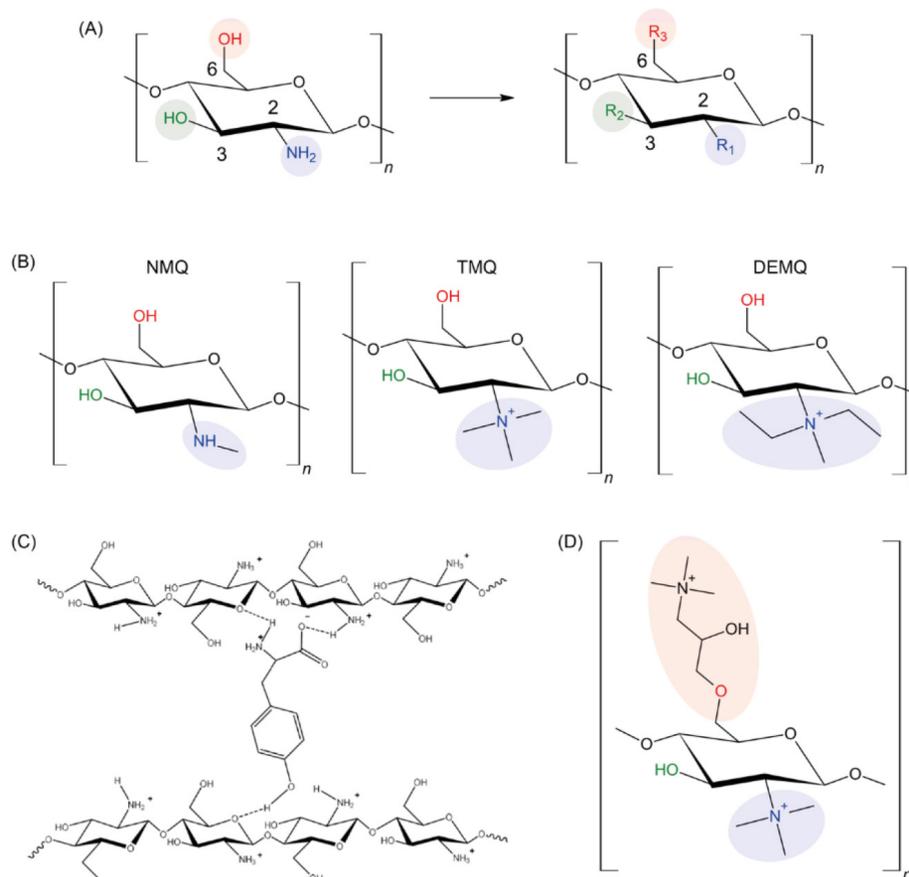


Figura 7. (A) Esquema sintético ilustrando os grupos funcionais da estrutura química das quitosanas que possibilitam a obtenção de derivados hidrossolúveis. (B) Estruturas químicas dos derivados NMQ, TMQ e DEMQ. (C) Representação esquemática da formação do conjugado quitosana-tirosina através de ligações de hidrogênio. Reproduzido da ref. 154. Copyright 2020 MDPI sob uma licença Creative Commons 4.0 (CC BY) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). (D) Estrutura química do derivado *N,N,N*-trimetil-O-(2-hidroxi-3-trimetilamônio propil)

atividade antimicrobiana em $\text{pH} = 7,2$.¹⁵⁶ Em outro trabalho, Bakshi e colaboradores avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes derivados *N*-alquilados frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.¹⁵⁷ Por meio da substituição eletrofílica no grupamento C2-NH_2 , três derivados foram sintetizados: *N*-metil quitosana (NMQ), TMQ e *N,N*-dietil-*N*-metil quitosana (DEMQ), conforme ilustrado na Figura 7B. Observou-se que a atividade antimicrobiana seguiu a ordem: DEMQ < quitosana < NMQ < TMQ. O derivado quaternário TMQ induziu a maior resposta antibactericida em virtude da presença das cargas positivas permanentes na estrutura das quitosanas. Apesar de também apresentar carga, o derivado DEMQ não apresentou a atividade antimicrobiana esperada, possivelmente devido ao impedimento estérico do substituinte mais volumoso. A presença de cargas positivas na estrutura das quitosanas é acompanhada da presença de um contra-íon. A fim de se avaliar a influência do contra-íon na atividade bactericida frente a *S. aureus* e *E. coli*, Follmann *et al.* sintetizaram o derivado TMQ contendo os seguintes contra-íons: sulfato, acetato, cloreto, brometo e iodeto.¹⁵⁸ A maior atividade foi observada para os derivados contendo os íons acetato e sulfato, possivelmente devido à maior deslocalização eletrônica.

Estudos recentes têm reportado a obtenção de derivados hidrossolúveis a partir do acoplamento de quitosanas com peptídeos/aminoácidos.^{22,152,153} Seguindo essa abordagem, Buzón-Durán e colaboradores demonstraram que a associação via ligações de hidrogênio dos aminoácidos glicina, prolina e tirosina à quitosana resultou em uma melhor atividade antifúngica contra *Fusarium culmorum*, um fungo patógeno responsável por várias doenças em cereais.¹⁵³ Testes *in vitro* mostraram um aumento da inibição do crescimento micelial, com valores de concentração efetiva que induz 50% (EC_{50}) e 90% (EC_{90}) do efeito máximo variando de 320 a 948 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 1107 a 1407 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente – valores esses bem inferiores aos apresentados pela quitosana e pelos aminoácidos isolados. A melhor resposta foi obtida pelo conjugado quitosana-tirosina (Figura 7C), o que os autores atribuíram à redução da cristalinidade da quitosana em função ao rearranjo das cadeias poliméricas e ao aumento de carga catiônica superficial com a formação do conjugado. Ensaio com plantas e experimentos de campo em pequena escala mostraram que a melhor formulação não apresentou efeitos fitotóxicos e reduziu significativamente a severidade do desenvolvimento dos sintomas do fungo. A síntese de derivados de quitosanas-guanidilados também desperta grande interesse, fazendo com que eles sejam investigados como materiais antimicrobianos em virtude de sua alta solubilidade em água, rápida resposta e baixa toxicidade.^{22,102,148,152,159} A guanidina, considerada uma das bases orgânicas mais fortes, confere às quitosanas um grande caráter catiônico em pH fisiológico, permitindo a formação de fortes interações não covalentes com alguns componentes carregados negativamente, como, por exemplo, grupos fosfatos da superfície celular da célula microbiana.¹⁵²

Derivados catiônicos também podem ser obtidos através de reações de substituição nas hidroxilas. Rahimi e colaboradores relataram a síntese de derivados de quitosanas através da inserção de um grupo imidazol carregado ao C6-OH .¹⁶⁰ As atividades antibacteriana e antifúngica do derivado frente às bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (cepa de bactéria resistente a drogas) foram superiores às da quitosana, sendo que o melhor desempenho foi atribuído aos grupos imidazóis protonados. Recentemente, Li *et al.* reportaram a síntese do cloreto de 2'-*O*-hidroxipropiltrimetilamônio quitosana e avaliaram sua atividade frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.¹⁶¹ O elevado efeito antibacteriano do derivado, quando comparado aos materiais de partida, foi atribuído à presença dos grupamentos C2-NH_2 e do substituinte $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Diversos estudos também relatam a influência de mais de um substituinte na cadeia polimérica. Por exemplo, o grupo amino no C2 e o grupo hidroxila primário no C6 das quitosanas podem ser modificados, ao mesmo tempo em que levam à obtenção de derivados hidrossolúveis com alta atividade antimicrobiana.¹⁵¹ Xu *et al.* demonstraram que o derivado *N,N,N*-trimetil-*O*-(2-hidroxi-3-trimetilamônio propil) (Figura 7D) quitosana apresentou atividade antibacteriana aumentada em comparação com o derivado *N,N,N*-trimetil quitosana e quitosana.¹⁶² O maior grau de substituição no derivado *N,O*-carboximetilquitosana também resultou em maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* do que a ação do derivado *O*-carboximetilquitosana e da quitosana.¹⁵¹ Li e colaboradores avaliaram a influência da inserção do grupo funcional acil tiourea ao grupamento C2-NH_2 em um derivado *O*-substituído da quitosana (*O*-quaternário de amônio).¹³⁴ A introdução dos grupos acil tiourea aumentaram a eletropositividade do derivado dissubstituído, acarretando maior supressão ao crescimento de bactérias G+ e G- em comparação ao derivado *O*-substituído e à quitosana.¹³⁴ Em outro estudo, Fan *et al.* relataram a obtenção de derivados hidrossolúveis através da inserção de grupos poliaminoetil e dietoxiforforil aos grupamentos C6-OH e C2-NH_2 , respectivamente, para aumentar a atividade antifúngica da quitosana frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici* e *Fusarium solani*.¹⁵²

O grau médio de substituição (\overline{GS}) ou a proporção dos grupos funcionais inseridos à estrutura das quitosanas também tem efeito nas propriedades antimicrobianas da quitosana frente a várias cepas de bactérias e fungos. Sahariah e Másson publicaram um artigo de revisão fazendo uma comparação entre diferentes derivados de quitosanas hidrossolúveis e demonstraram que para derivados catiônicos a eficácia antibacteriana geralmente aumenta com o aumento da proporção dos grupos funcionais ligados à cadeia polimérica.²²

INFLUÊNCIA DO GRAU DE PUREZA DA AMOSTRA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Além das características estruturais discutidas anteriormente, as propriedades das quitosanas também são afetadas pelo seu grau de pureza.¹⁶² De fato, no contexto de aplicações biomédicas, por exemplo, requer-se um grau de pureza elevado. Estudos relatam que a pureza das quitosanas influencia seu perfil toxicológico.¹⁶³ As diferenças na pureza do polissacarídeo podem estar relacionadas às condições de tratamento químico durante a obtenção da quitina e à transformação da quitina em quitosanas, incluindo a sequência de desmineralização, desproteinização, despigmentação e desacetilação, a concentração dos produtos químicos empregados e o tempo de reação.^{150,164} Sendo assim, a etapa de purificação das quitosanas se dá por meio de processos químicos visando a remoção de minerais, proteínas e pigmentos. Ardila e colaboradores reportaram que a presença de proteínas residuais pode levar a uma diminuição da propriedade antibactericida da quitosana.¹⁶⁴ Segundo os autores, essas impurezas podem representar uma fonte de nutrientes para as bactérias e, portanto, serem responsáveis pela diminuição da atividade antimicrobiana acima de uma concentração crítica. Após a etapa de desproteinização utilizando a enzima proteinase K, uma concentração mais baixa de quitosana foi suficiente para erradicar as bactérias *E. coli*, *L. innocua* e *S. aureus*.

Outro tipo de contaminação frequente em amostras de quitosanas, especialmente as que possuem como fonte de matéria-prima organismos marinhos, é a contaminação por metais pesados.^{111,165} Contaminações por cádmio e arsênio são as mais tipicamente testadas por serem esses os metais mais citotóxicos. Entretanto, outros metais como crômio, níquel, cobre e zinco também podem ser detectados em amostras comerciais. Além de serem provenientes da

fonte de matéria-prima, esses contaminantes podem ser associados às quitosanas nas etapas de produção das amostras devido à sua capacidade de complexação com metais pesados. Diferentes autores reportam que a presença de resíduos de metais pesados pode acarretar uma acentuada redução da atividade bactericida das quitosanas.¹⁶⁵ No entanto, é importante destacar que também existem trabalhos na literatura que demonstram uma melhora da propriedade antimicrobiana após a incorporação de íons metálicos, tais como Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , às quitosanas.¹⁶⁶

Apesar da importância desse parâmetro, principalmente no cenário de aplicações biomédicas, poucos são os trabalhos na literatura que avaliam a influência da pureza na atividade antimicrobiana das quitosanas. O grande interesse pelo uso de quitosanas e seus derivados faz com que seja importante padronizar os aspectos relacionados a esses compostos, uma vez que isso permitirá eliminar a ambiguidade persistente sobre seu grau de pureza e demais características estruturais, incluindo o grau de acetilação/desacetilação, a massa molecular e outras importantes propriedades encontradas na literatura científica para este biopolímero.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Quitosanas são polímeros versáteis, de vasta aplicação e com comprovada atividade antimicrobiana. O processo de obtenção desse polissacarídeo pode ser realizado através de reações de desacetilação da quitina, em que processos físico-químicos ou mediados por enzimas e micro-organismos são utilizados, ou através da extração direta da natureza, utilizando-se processos biotecnológicos. Ambos os processos de obtenção devem ter suas etapas muito controladas, pois têm influência direta nas características estruturais das quitosanas e, conseqüentemente, em suas propriedades, como, por exemplo, sua atividade antimicrobiana. Algumas hipóteses são citadas na literatura sobre a ação de quitosanas frente a micro-organismos, dentre elas a alteração da permeabilidade da membrana celular do micro-organismo que impede as trocas gasosas entre o interior e o exterior da célula. Tal alteração leva à ruptura da membrana celular de bactérias ou da parede celular fúngica, à inibição da síntese de mRNA e proteínas e/ou à formação de barreira externa, conseqüentemente impedindo a entrada de nutrientes e o crescimento microbiano. De fato, todas as hipóteses de ação das quitosanas estão principalmente relacionadas com a interação entre as cargas positivas dos grupos amino protonados das quitosanas e as cargas negativas presentes na membrana/parede celular de bactérias e fungos. Sendo assim, tanto o \overline{GA} como a \overline{MM} do polímero são características importantes na determinação de sua ação. De maneira geral, quanto menor o \overline{GA} , maior é a atividade das quitosanas frente aos micro-organismos. Já com relação à \overline{MM} , a atividade das quitosanas depende muito mais da espécie do micro-organismo (sua composição/estrutura), sendo que cadeias poliméricas maiores parecem inibir as células através do envolvimento das mesmas, enquanto cadeias poliméricas menores podem penetrar o interior das células. Derivados hidrossolúveis de quitosanas são geralmente sintetizados através da inserção de grupos que desenvolvem carga positiva em sua cadeia polimérica, favorecendo a ação antimicrobiana em ampla faixa de pH. Em relação à pureza das quitosanas, poucos trabalhos na literatura citam essa importante característica em relação à atividade bactericida, porém, alguns trabalhos mostram que sua associação com resíduos proteicos diminui sua atividade. É importante destacar que apesar de importantes informações poderem ser obtidas através da compilação dos dados presentes na literatura acerca da estrutura/atividade de quitosanas frente a micro-organismos, ainda há muito que se estudar sobre o tópico devido ao grande número de parâmetros que possam influenciar e estar envolvidos no processo. Além disso, a obtenção

de quitosanas com características estruturais controladas e através de processos que apresentem produto reprodutível configura adicional dificuldade. Por fim, ainda existem vários desafios que precisam ser enfrentados a fim de delinear o mecanismo de ação da quitosana visando aplicações práticas, como, por exemplo, a preparação de nanoestruturas utilizadas no desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana que possam ser futuramente utilizadas em escala industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos nº 17/19470-8 e 17/20973-4), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo nº APQ-00373-18).

REFERÊNCIAS

- Synowiecki, J.; Al-khateeb, N. A.; Synowiecki, J.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *43*, 145.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E.; *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 981.
- Kaur, S.; Dhillon, G. S.; *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40*, 155.
- El Knidri, H.; Belaabed, R.; Addaou, A.; Laajeb, A.; Lahsini, A.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 1181.
- Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P.; *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 641.
- Zargar, V.; Asghari, M.; Dashti, A.; *ChemBioEng Rev.* **2015**, *2*, 204.
- Kumar, M. N. V. R.; *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1.
- De Britto, D.; Pinola, F. G.; Mattoso, L. H. C.; Assis, O. B. G.; *Quim. Nova* **2016**, *39*, 1126.
- Lins, L. C.; Bazzo, G. C.; Barreto, P. L. M.; Pires, A. T. N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 1462.
- Ungureanu, C.; Ioniță, D.; Berteau, E.; Tcacenco, L.; Zuav, A.; Demetrescu, I.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 458.
- Aranaz, I.; Acosta, N.; Civera, C.; Elorza, B.; Mingo, J.; Castro, C.; Gandía, M. de los L.; Caballero, A. H.; *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*.
- Rinaudo, M.; *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603.
- Muxika, A.; Etxabide, A.; Uranga, J.; Guerrero, P.; de la Caba, K.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *105*, 1358.
- Campana-Filho, S. P.; De Britto, D.; Curti, E.; Abreu, F. R.; Cardoso, M. B.; Battisti, M. V.; Sim, P. C.; Goy, R. C.; Signini, R.; Lavall, R. L.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 644.
- Younes, I.; Rinaudo, M.; *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1133.
- Messa, L. L.; Froes, J. D.; Souza, C. F.; Faez, R.; *Quim. Nova* **2016**, *39*, 1215.
- Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J.; *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144*, 51.
- Rabea, E. I.; Badawy, M. E.-T.; Stevens, C. V.; Smaghe, G.; Steurbaut, W.; *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1457.
- Younes, I.; Sellimi, S.; Rinaudo, M.; Jellouli, K.; Nasri, M.; *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *185*, 57.
- Hosseinnejad, M.; Jafari, S. M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *85*, 467.
- Lizardi-Mendoza, J.; Argüelles Monal, W. M.; Goycoolea Valencia, F. M.; *Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan*; Elsevier Inc.: Amsterdam, 2016.
- Sahariah, P.; Måsson, M.; *Biomacromolecules* **2017**, acs.biomac.7b01058.
- Goy, R. C.; De Britto, D.; Assis, O. B. G.; *Polímeros* **2009**, *19*, 241.
- Marques, C.; Som, C.; Schmutz, M.; Borges, O.; Borchard, G.; *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 165.

25. Kou, S. (Gabriel); Peters, L. M.; Mucalo, M. R.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *169*, 85.
26. Mohan, K.; Ganesan, A. R.; Muralisankar, T.; Jayakumar, R.; Sathishkumar, P.; Uthayakumar, V.; Chandirasekar, R.; Revathi, N.; *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *105*, 17.
27. Fiamingo, A.; Delezuk, J. A. D. M.; Trombotto, S.; David, L.; Campana-Filho, S. P.; *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *32*, 79.
28. Lavall, R. L.; Assis, O. B. G.; Campana-Filho, S. P.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 2465.
29. Joseph, S. M.; Krishnamoorthy, S.; Paranthaman, R.; Moses, J. A.; Anandharamakrishnan, C.; *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2021**, *2*, 100036.
30. Said Al Hoqani, H. A.; AL-Shaqsi, N.; Hossain, M. A.; Al Sibani, M. A.; *Carbohydr. Res.* **2020**, *492*, 108001.
31. Percot, A.; Viton, C.; Domard, A.; *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 12.
32. Al Shaqsi, N. H. K.; Al Hoqani, H. A. S.; Hossain, M. A.; Al Sibani, M. A.; *Biochem. Biophys. Reports* **2020**, *23*, 100779.
33. Roberts, G. A. F.; Roberts, G. A. F.; *Chitin Chemistry*; Macmillan Education: UK, 1992; pp. 54.
34. Hu, J.; Lu, W.; Lv, M.; Wang, Y.; Ding, R.; Wang, L.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2019**, *29*, 24.
35. Dave, D.; Liu, Y.; Pohling, J.; Trenholm, S.; Murphy, W.; *Bioresour. Technol. Reports* **2020**, *11*, 100535.
36. Hahn, T.; Tafi, E.; Paul, A.; Salvia, R.; Falabella, P.; Zibek, S.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2020**, *95*, 2775.
37. Nguyen, T. T.; Barber, A. R.; Smith, P.; Luo, X.; Zhang, W.; *Food Bioprod. Process.* **2017**, *102*, 367.
38. Khayrova, A.; Lopatin, S.; Varlamov, V.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *167*, 1319.
39. Deng, J. J.; Mao, H. H.; Fang, W.; Li, Z. Q.; Shi, D.; Li, Z. W.; Zhou, T.; Luo, X. C.; *J. Clean. Prod.* **2020**, *271*, 122655.
40. Delezuk, J. A. de M.; Pavinatto, A.; Campana-Filho, S. P.; *Mater. Today Proc.* **2019**, *14*, 722.
41. Delezuk, J. A. de M.; Cardoso, M. B.; Domard, A.; Campana-Filho, S. P.; *Polym. Int.* **2011**, *60*, 903.
42. Tan, T. S.; Chin, H. Y.; Tsai, M. L.; Liu, C. L.; *Carbohydr. Polym.* **2015**, *122*, 321.
43. Yaghobi, N.; Hormozi, F.; *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81*, 892.
44. Abd El-Hack, M. E.; El-Saadony, M. T.; Shafi, M. E.; Zabermaawi, N. M.; Arif, M.; Batiha, G. E.; Khafaga, A. F.; Abd El-Hakim, Y. M.; Al-Sagheer, A. A.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 2726.
45. Manni, L.; Ghorbel-Bellaaj, O.; Jellouli, K.; Younes, I.; Nasri, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 345.
46. Kaur, S.; Dhillon, G. S.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **2015**, *35*, 44.
47. Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N. A. A. Q.; *Food Chem.* **2000**, *68*, 147.
48. Mao, X.; Guo, N.; Sun, J.; Xue, C.; *J. Clean. Prod.* **2017**, *143*, 814.
49. Hembach, L.; Cord-Landwehr, S.; Moerschbacher, B. M.; *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1.
50. Duong, N. T. H.; Nghia, N. D.; *J. Chitin Chitosan Sci.* **2014**, *2*, 21.
51. Valdez-Peña, A. U.; Espinoza-Perez, J. D.; Sandoval-Fabian, G. C.; Balagurusamy, N.; Hernandez-Rivera, A.; de-la-Garza-Rodriguez, I. M.; Contreras-Esquivel, J. C.; *Sci. Biotechnol.* **2010**, *19*, 553.
52. Haddar, A.; Hmidet, N.; Ghorbel-Bellaaj, O.; Fakhfakh-Zouari, N.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M.; *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2011**, *16*, 669.
53. Sila, A.; Nasri, R.; Bougatef, A.; Nasri, M.; *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **2012**, *21*, 118.
54. Casadidio, C.; Peregrina, D. V.; Gigliobianco, M. R.; Deng, S.; Censi, R.; Di Martino, P.; *Mar. Drugs* **2019**, *17*.
55. Shirai, K.; Guerrero, I.; Huerta, S.; Saucedo, G.; Castillo, A.; Obdulia Gonzalez, R.; Hall, G. M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 446.
56. Gortari, M. C.; Hours, R. A.; *Electron. J. Biotechnol.* **2013**, *16*.
57. Arbia, W.; Arbia, L.; Adour, L.; Amrane, A.; *Chitin Recover. Using Biol. Methods, Food Technol. Biotechnol.* **2013**, *51*, 12.
58. Cremades, O.; Ponce, E.; Corpas, R.; Gutiérrez, J. F.; Jover, M.; Alvarez-Ossorio, M. C.; Parrado, J.; Bautista, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5468.
59. Bautista, J.; Jover, M.; Gutierrez, J. F.; Corpas, R.; Cremades, O.; Fontiveros, E.; Iglesias, F.; Vega, J.; *Process Biochem.* **2001**, *37*, 229.
60. Hoover, D. G.; *Food Biotechnol.* **1993**, *7*, 11.
61. Muslim, S. N.; AL-Kadmy, I. M.; Ali, A. N. M.; Dwaish, A. S.; Khazaal, S. S.; Muslim, S. N.; Aziz, S. N.; *Adv. Biotechnol.* **2018**, *1*.
62. Ghormade, V.; Pathan, E. K.; Deshpande, M. V.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1415.
63. de Souza, A. F.; Galindo, H. M.; de Lima, M. A. B.; Ribeaux, D. R.; Rodríguez, D. M.; Andrade, R. F. da S.; Gusmão, N. B.; de Campos-Takaki, G. M.; *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1.
64. Sebastian, J.; Rouissi, T.; Brar, S. K.; In *Handbook of Chitin and Chitosan v.1*; Gopi, S., Thomas, S., Pius, A., eds, Elsevier: Amsterdam 2020.
65. Berger, L. R. R.; Stamford, T. C. M.; Stamford-Arnaud, T. M.; De Oliveira Franco, L.; Do Nascimento, A. E.; Horacina, H. M.; Macedo, R. O.; De Campos-Takaki, G. M.; *Molecules* **2014**, *19*, 2771.
66. Martinou, A.; Kafetzopoulos, D.; Bouriotis, V.; *Carbohydr. Res.* **1995**, *273*, 235.
67. Alfonso, C.; Nuro, O. M.; Santamaría, F.; Reyes, F.; *Curr. Microbiol.* **1995**, *30*, 49.
68. Tsigos, I.; Martinou, A.; Kafetzopoulos, D.; Bouriotis, V.; *TibTech* **2000**, *18*, 129.
69. Kaczmarek, M. B.; Struszczyk-Swita, K.; Li, X.; Szczesna-Antczak, M.; Daroch, M.; *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*.
70. Smets, G.; Rüdelsheim, P.; *N. Biotechnol.* **2018**, *42*, 42.
71. Sahariah, P.; Hjálmarsdóttir, M. Á.; Másson, M. In *Marine Glycobiology*; Kim, S.-K., ed; CRC Press: Boca Raton, 2016; pp. 345.
72. Wei, L.; Tan, W.; Wang, G.; Li, Q.; Dong, F.; Guo, Z.; *Carbohydr. Polym.* **2019**, *226*, 115256.
73. Qin, Y.; Li, P.; *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 499.
74. Pavinatto, A.; de Almeida Mattos, A. V.; Malpass, A. C. G.; Okura, M. H.; Balogh, D. T.; Sanfelice, R. C.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *151*, 1004.
75. Raafat, D.; Sahl, H. G.; *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 186.
76. Li, X. fang; Feng, X. qiang; Yang, S.; Fu, G. qing; Wang, T. pu; Su, Z. xing; *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 493.
77. Xing, K.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Cha, D. S.; Park, H. J.; *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 127.
78. Lee, D. S.; Je, J. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 6574.
79. Park, S. C.; Nah, J. W.; Park, Y.; *Macromol. Res.* **2011**, *19*, 853.
80. Galván Márquez, I.; Akuaku, J.; Cruz, I.; Cheetham, J.; Golshani, A.; Smith, M. A.; *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *164*, 108.
81. Mansilla, A. Y.; Albertengo, L.; Rodríguez, M. S.; Debbaut, A.; Zúñiga, A.; Casalongué, C. A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 6957.
82. Goy, R. C.; Morais, S. T. B.; Assis, O. B. G.; *Braz. J. Pharmacogn.* **2016**, *26*, 122.
83. Elsabee, M. Z.; Abdou, E. S.; *Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 1819.
84. Kakaei, S.; Shahbazi, Y.; *LWT – Food Sci. Technol.* **2016**, *72*, 432.
85. Mohan, C. O.; Ravishankar, C. N.; Lalitha, K. V.; Srinivasa Gopal, T. K.; *Food Hydrocolloids* **2012**, *26*, 167.
86. Nowzari, F.; Shábanpour, B.; Ojagh, S. M.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 1667.
87. Tayel, A. A.; Moussa, S.; Opwis, K.; Knittel, D.; Schollmeyer, E.; Nickisch-Hartfiel, A.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 10.
88. Champer, J.; Patel, J.; Fernando, N.; Salehi, E.; Wong, V.; Kim, J.; *AMB Express* **2013**, *3*, 1.
89. Raven, P. H.; Evert, R. E.; Eichhorn, S. E.; *Biologia Vegetal*; Guanabara: Rio de Janeiro, RJ, 2014.
90. Hadwiger, L. A.; *Plant Sci.* **2013**, *208*, 42.
91. Lee, C. G.; Koo, J. C.; Park, J. K.; *Plant Pathol. J.* **2016**, *32*, 242.

92. Lopez-Moya, F.; Suarez-Fernandez, M.; Lopez-Llorca, L. V.; *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
93. Limon, T.; Birke, A.; Monribot-Villanueva, J. L.; Guerrero-Analco, J. A.; Altúzar-Molina, A.; Carrión, G.; Goycoolea, F. M.; Moerschbacher, B. M.; Aluja, M.; *J. Sci. Food Agric.* **2020**, jsfa. 10903.
94. Grande-Tovar, C. D.; Chaves-Lopez, C.; Serio, A.; Rossi, C.; Paparella, A.; *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *78*, 61.
95. Al-Najada, A. R.; Gherbawy, Y. A.; *Food Biotechnol.* **2015**, *29*, 166.
96. Meng, D.; Garba, B.; Ren, Y.; Yao, M.; Xia, X.; Li, M.; Wang, Y.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *158*, 1063.
97. Guo, H.; Qiao, B.; Ji, X.; Wang, X.; Zhu, E.; *Postharvest Biol. Technol.* **2020**, *161*, 110883.
98. Liu, Y.; Sun, Z.; Xiu, L.; Huang, J.; Zhou, F.; *J. Food Biochem.* **2018**, *42*, 1.
99. Li, Y.; Chi, Y.-Q.; Yu, C.-H.; Xie, Y.; Xia, M.-Y.; Zhang, C.-L.; Han, X.; Peng, Q.; *Carbohydr. Polym.* **2020**, *241*, 116386.
100. Tsai, G.-J.; Zhang, S.-L.; Shieh, P.-L.; *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 396.
101. Andres, Y.; Giraud, L.; Gerente, C.; Le Cloirec, P.; *Environ. Technol.* **2007**, *28*, 1357.
102. Martins, A.; Facchi, S.; Follmann, H.; Pereira, A.; Rubira, A.; Muniz, E.; *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 20800.
103. Sizar, O.; Unakal, C. G.; *Gram Positive Bacteria*, StatPearls Publishing LLC, 2021.
104. Tsai, T.; Chien, H. F.; Wang, T. H.; Huang, C. T.; Ker, Y. B.; Chen, C. T.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1883.
105. Moeini, A.; Pedram, P.; Makvandi, P.; Malinconico, M.; Gomez d' Ayala, G.; *Carbohydr. Polym.* **2020**, *233*, 115839.
106. Martins, A. F.; Vlcek, J.; Wigmosta, T.; Hedayati, M.; Reynolds, M. M.; Popat, K. C.; Kipper, M. J.; *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *502*, 144282.
107. Machado, B. R.; Facchi, S. P.; de Oliveira, A. C.; Nunes, C. S.; Souza, P. R.; Vilsinski, B. H.; Popat, K. C.; Kipper, M. J.; Muniz, E. C.; Martins, A. F.; *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1.
108. Madureira, A. R.; Pereira, A.; Castro, P. M.; Pintado, M.; *J. Food Eng.* **2015**, *167*, 210.
109. Caroni, J. G.; de Almeida Mattos, A. V.; Fernandes, K. R.; Balogh, D. T.; Renno, A. C. M.; Okura, M. H.; Malpass, A. C. G.; Ferraresi, C.; Garcia, L. A.; Sanfelice, R. C.; Pavinatto, A.; *Polym. Bull.* **2020**.
110. Shepherd, R.; Reader, S.; Falshaw, A.; *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 535.
111. Weinhold, M. X.; Sauvageau, J. C. M.; Keddig, N.; Matzke, M.; Tartsch, B.; Grunwald, I.; Christian, K. **2009**, 498.
112. Teng, D. In *Chitosan-Based Hydrogels*; Yao, K., Li, J., Yao, F., Yin, Y., eds.; CRC Press: Boca Raton, 2011; p. 38.
113. Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Haggard, W. O.; Bumgardner, J. D.; *Materials (Basel)*. **2011**, *4*, 1399.
114. Cardoso, M. B.; Signini, R.; Campana-Filho, S. P.; *Polym. Bull.* **2001**, *47*, 183.
115. Matica, M. A.; Aachmann, F. L.; Tøndervik, A.; Sletta, H.; Ostafe, V.; *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1.
116. Agnihotri, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M.; *J. Control. Release* **2004**, *100*, 5.
117. Ravi Kumar, M. N. .; *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1.
118. Facchinatto, W. M.; dos Santos, D. M.; Fiamingo, A.; Bernardes-Filho, R.; Campana-Filho, S. P.; de Azevedo, E. R.; Colnago, L. A.; *Carbohydr. Polym.* **2020**, *250*, 116891.
119. Shigemasa, Y.; Matsuura, H.; Sashiwa, H.; Saimoto, H.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *18*, 237.
120. Kumirska, J.; X., M.; Czerwicka, M.; Kaczyski, Z.; Bychowska, A.; Brzozowski, K.; Thming, J.; Stepnowski, P.; *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1567.
121. Kulikov, S. N.; Lisovskaya, S. A.; Zelenikhin, P. V.; Bezrodnykh, E. A.; Shakirova, D. R.; Blagodatskikh, I. V.; Tikhonov, V. E.; *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 169.
122. Mellegård, H.; Strand, S. P.; Christensen, B. E.; Granum, P. E.; Hardy, S. P.; *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *148*, 48.
123. Yuan, Y.; Chen, L.; Shi, W.; Wang, Z.; Zhang, H.; *Molecules* **2020**, *25*, 4074.
124. Byun, S. M.; No, H. K.; Hong, J. H.; Lee, S. Il; Prinyawiwatkul, W.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 136.
125. Jung, E. J.; Youn, D. K.; Lee, S. H.; No, H. K.; Ha, J. G.; Prinyawiwatkul, W.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 676.
126. Tayel, A. A.; Moussa, S.; El-Tras, W. F.; Knittel, D.; Opwis, K.; Schollmeyer, E.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 454.
127. Chien, R. C.; Yen, M. T.; Mau, J. L.; *Carbohydr. Polym.* **2016**, *138*, 259.
128. Grobler, S. R.; *Mater. Sci. Eng. Adv. Res.* **2018**, *2*, 27.
129. Mehrabi, M.; Montazeri, H.; Dounighi, M. N.; Rashti, A.; Vakili-Ghartavol, R.; *Arch. Razi Inst.* **2018**, *73*, 165.
130. Zheng, L. Y.; Zhu, J. F.; *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 527.
131. Garcia, L. G. S.; Guedes, G. M. de M.; da Silva, M. L. Q.; Castelo-Branco, D. S. C. M.; Sidrim, J. J. C.; Cordeiro, R. de A.; Rocha, M. F. G.; Vieira, R. S.; Brilhante, R. S. N.; *Carbohydr. Polym.* **2018**, *195*, 662.
132. Garcia, L. G. S.; de Melo Guedes, G. M.; Fonseca, X. M. Q. C.; Pereira-Neto, W. A.; Castelo-Branco, D. S. C. M.; Sidrim, J. J. C.; de Aguiar Cordeiro, R.; Rocha, M. F. G.; Vieira, R. S.; Brilhante, R. S. N.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *143*, 341.
133. Severino, R.; Ferrari, G.; Vu, K. D.; Donsì, F.; Salmieri, S.; Lacroix, M.; *Food Control* **2015**, *50*, 215.
134. Li, Z.; Yang, F.; Yang, R.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *75*, 378.
135. Kaya, M.; Asan-Ozusaglam, M.; Erdogan, S.; *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *121*, 678.
136. Bano, I.; Ghauri, M. A.; Arshad, M.; Yasin, T.; Younus, M.; *Microb. Drug Resist.* **2017**, *23*, 958.
137. Tokura, S.; Ueno, K.; Miyazaki, S.; Nishi, N.; *New Macromolecular Architecture and Functions, 2nd ed.*, Springer: Berlin, Heidelberg, 1996.
138. Kong, M.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Liu, C. G.; Meng, X. H.; Yu, L. J.; *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *65*, 197.
139. Kulikov, S. N.; Tikhonov, V. E.; Bezrodnykh, E. A.; Lopatin, S. A.; Varlamov, V. P.; *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2015**, *41*, 57.
140. Kim, S.; Rajapakse, N.; *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62*, 357.
141. Fernández-Pan, I.; Maté, J. I.; Gardrat, C.; Coma, V.; *Food Hydrocoll.* **2015**, *51*, 60.
142. Laokuldilok, T.; Potivas, T.; Kanha, N.; Surawang, S.; Seesuriyachan, P.; Wangtueai, S.; Phimolsiripol, Y.; Regenstein, J. M.; *Food Biosci.* **2017**, *18*, 28.
143. Dotto, G. L.; Vieira, M. L. G.; Pinto, L. A. A.; *LWT – Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 126.
144. Chang, S. H.; Lin, H. T. V.; Wu, G. J.; Tsai, G. J.; *Carbohydr. Polym.* **2015**, *134*, 74.
145. Wang, W.; Meng, Q.; Li, Q.; Liu, J.; Zhou, M.; Jin, Z.; Zhao, K.; *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 487.
146. Verlee, A.; Mincke, S.; Stevens, C. V.; *Carbohydr. Polym.* **2017**, *164*, 268.
147. Pavinatto, A.; Fiamingo, A.; Bukzem, A. D. L.; Silva, D. S.; Santos, D. M.; Senra, T. A. D.; Facchinatto, W. M.; Campana Filho, S. P. In *Frontiers in Biomaterials*; Pavinatto, A., Fiamingo, A., Bukzem, A. de L., de Souza e Silva, D., dos Santos, D. M., Senra, T. A. D., Facchinatto, W. M., Campana-Filho, S. P., eds.; Bentham Science Publishers: Al Sharjah, 2017; Vol. 3, pp. 107.
148. Freitas, E. D.; Moura, C. F.; Kerwald, J.; Beppu, M. M.; *Polymers (Basel)* **2020**, *12*, 1.
149. Campana Filho, S. P.; Signini, R.; Cardoso, M. B.; *Processos Químicos* **2007**, *1*, 9.
150. Silva, H. S. R. C.; Santos, K. S. C. R. dos; Ferreira, E. I.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 776.
151. Li, J.; Zhuang, S.; *Eur. Polym. J.* **2020**, *138*, 109984.
152. Qin, Y.; Li, P.; Guo, Z.; *Carbohydr. Polym.* **2020**, *236*, 116002.
153. Buzón-Durán, L.; Martín-Gil, J.; Marcos-Robles, J. L.; Fombellida-Villafruela, Á.; Pérez-Lebeña, E.; Martín-Ramos, P.; *Agronomy* **2020**, *10*.

154. dos Santos, D. M.; de Lacerda Bukzem, A.; Campana-Filho, S. P.; *Carbohydr. Polym.* **2016**, *138*, 317.
155. Xu, Y.; Zhang, H.; Liu, X. W.; *J. Org. Chem.* **2021**, *85*, 15827.
156. Rúnarsson, Ö. V.; Holappa, J.; Nevalainen, T.; Hjálmsdóttir, M.; Järvinen, T.; Loftsson, T.; Einarsson, J. M.; Jónsdóttir, S.; Valdimarsdóttir, M.; Másson, M.; *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 2660.
157. Bakshi, P. S.; Selvakumar, D.; Kadirvelu, K.; Kumar, N. S.; *React. Funct. Polym.* **2018**, *124*, 149.
158. Follmann, H. D. M.; Martins, A. F.; Nobre, T. M.; Bresolin, J. D.; Cellet, T. S. P.; Valderrama, P.; Correa, D. S.; Muniz, E. C.; Oliveira, O. N.; *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 418.
159. Fan, Z.; Qin, Y.; Liu, S.; Xing, R.; Yu, H.; Chen, X.; Li, K.; Li, P.; *Carbohydr. Polym.* **2018**, *190*, 1.
160. Rahimi, M.; Ahmadi, R.; Samadi Kafil, H.; Shafiei-Irannejad, V.; *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *101*, 360.
161. Li, J.; Zhao, L.; Wu, Y.; Rajoka, M. S. R.; *Colloids Surf., B* **2019**, *173*, 429.
162. Signini, R.; Filho, S. P. C.; *Polímeros* **1998**, *8*, 63.
163. Dodane, V.; Vilivalam, V. D.; *Pharm. Sci. Technol. Today* **1998**, *1*, 246.
164. Ardila, N.; Daigle, F.; Heuzey, M. C.; Ajjji, A.; *Molecules* **2017**, *22*, 1.
165. Tsai, G. J.; Su, W. H.; *J. Food Prot.* **1999**, *62*, 239.
166. Ma, Z.; Garrido-Maestu, A.; Jeong, K. C.; *Carbohydr. Polym.* **2017**, *176*, 257.