



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DE RECURSOS NATURAIS

FRANCISCO SÉRVULO DE OLIVEIRA CARVALHO

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME
DA QUITOSANA DE *Ucides cordatus* CONTRA BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

FORTALEZA

2025

FRANCISCO SÉRVULO DE OLIVEIRA CARVALHO

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
QUITOSANA DE *Ucides cordatus* CONTRA BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de Concentração: Aplicação Biotecnológica de Moléculas Biologicamente Ativas.

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

Coorientação: Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires.

FORTALEZA

2025

FRANCISCO SÉRVULO DE OLIVEIRA CARVALHO

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
QUITOSANA DE *Ucides cordatus* CONTRA BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de Concentração: Aplicação Biotecnológica de Moléculas Biologicamente Ativas.

Aprovada em: 29 / 05 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires (Coorientador)
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Prof. Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Dedico aos meus pais e irmão que comigo estiveram durante toda essa jornada.

Dedico ao meu eterno irmão, Rodrigo Aderson Vasconcelos de Oliveira (In memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força e cuidado que teve por mim durante toda a caminhada; pela proteção durante as idas e vindas nas estradas entre os estados do Rio Grande do Norte e Ceará.

Aos meus pais, Maria da Saúde e Fabiano Wagner, e ao meu Irmão Antônio Eduardo por todo apoio e incentivo nessa jornada.

Aos meus orientadores Dr. Bartolomeu Warlene, por aceitar esse desafio; e ao Dr. Caio Aires, por dizer sim a mais uma das minhas propostas.

Aos meus colegas e amigos do apartamento 304B (Denise e Gabriel).

Aos meus colegas de turma que tive a honra de conhecer e aprender junto deles e com eles, por todo o conhecimento compartilhado dentro e fora das salas de aulas e laboratórios.

A professora Claudia Miranda Martins, pelo acompanhamento e cuidado comigo, e por toda a orientação durante meu estágio docente.

Aos professores do Programa da Biotecnologia (UFC), e aos meus professores da Graduação da Biotecnologia (UFERSA).

A coordenação da Pós, ao Coordenador Dr. Bartolomeu Warlene; e ao secretário Iuri Saraiva. Por todo tempo e paciência que tiveram comigo.

As Universidade Federal do Ceará (UFC) e Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa (EMBRAPA) sob a atenção do Pesquisador Men de Sá Moreira Souza Filho; ao Laboratório de Pesquisa em Biomateriais e Bioprodutos sob a atenção da Dra. Fábila Karine e Dr. Francisco Fábio também parceiros nessa jornada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro.

“Ter FÉ não significa estar livre de momentos difíceis, mas ter a FORÇA para os enfrentar sabendo que não estamos sozinhos.” – Papa Francisco

RESUMO

A quitosana derivada da desacetilação da quitina tem se destacado por seu amplo potencial de aplicação nas áreas biomédicas e ao desenvolvimento de tecnologias na indústria de alimentos, especialmente devido à sua atividade antimicrobiana. Tradicionalmente extraída do exoesqueleto de crustáceos, a crescente demanda por esse biopolímero tem impulsionado a exploração do caranguejo *Ucides cordatus*, encontrado nos manguezais ao longo da costa atlântica. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos da quitosana *Ucides cordatus* em bactérias gram-negativas resistentes, e formular a composição adequada de revestimento a ser aplicado em queijo coalho. A atividade antibacteriana foi determinada através da avaliação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima em concentrações de 5 a 0,009 mg/mL. A atividade antibiofilme foi avaliada pelo método de inibição e erradicação, por meio da quantificação com cristal violeta. Para determinar a formulação do revestimento adequado em queijo coalho, foi utilizada a técnica de molhabilidade por meio do ângulo de contato em superfície. E avaliações de toxicidade foram realizadas com os extratos e soluções de revestimentos em modelos celulares. Com grau de desacetilação em 92%, a quitosana *Ucides cordatus* demonstrou boas propriedades antimicrobianas com inibição em cepas Gram-negativas em concentrações bactericidas de 0,625 mg/mL e de igual modo inibição no crescimento de biofilme em aproximadamente 98% em *Pseudomonas aeruginosa* e de 86% em *Escherichia coli* resistentes isolados de queijo coalho. Essas concentrações se mostraram não tóxicas. Em relação ao potencial de revestimento, pela técnica de molhabilidade em superfícies de queijo coalho, a composição de 2,0 % de *Ucides cordatus* com 0,2% de glicerol é a indicada para emprego de revestimento. Os resultados encontrados são semelhantes a quitosana em escala comercial, assim, evidenciando o potencial biotecnológico da quitosana *Ucides cordatus* na área biomédica e na indústria de alimentos como agente antimicrobiano.

Palavras-chaves: biopolímero; caranguejo de mangue; resistência antimicrobiana; ângulo de contato.

ABSTRACT

Chitosan, derived from the deacetylation of chitin, has gained prominence due to its broad potential for applications in biomedical fields and the development of technologies in the food industry, particularly because of its antimicrobial activity. Traditionally extracted from the exoskeleton of crustaceans, the growing demand for this biopolymer has driven the exploration of the crab *Ucides cordatus*, found in mangrove ecosystems along the Atlantic coast. Thus, the present study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activities of *Ucides cordatus* chitosan extracts against antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria and to formulate an appropriate coating composition for application on coalho cheese. Antibacterial activity was determined by assessing the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration at concentrations ranging from 5 to 0.009 mg/mL. Antibiofilm activity was evaluated using inhibition and eradication assays, quantified by the crystal violet staining method. To determine the appropriate coating formulation for coalho cheese, the wettability technique was employed through contact angle measurements on the surface. Toxicity assessments were conducted using the extracts and coating solutions in cellular models. With a degree of deacetylation of 92%, *Ucides cordatus* chitosan demonstrated good antimicrobial properties, showing inhibition of Gram-negative strains at bactericidal concentrations of 0.625 mg/mL, as well as inhibition of biofilm formation by approximately 98% in *Pseudomonas aeruginosa* and 86% in *Escherichia coli* resistant strains isolated from coalho cheese. These concentrations were found to be non-toxic. Regarding coating potential, based on the wettability technique on coalho cheese surfaces, the composition containing 2.0% *Ucides cordatus* chitosan with 0.2% glycerol was identified as the most suitable for coating application. The results obtained were comparable to those of commercially available chitosan, thus highlighting the biotechnological potential of *Ucides cordatus* chitosan as an antimicrobial agent in the biomedical field and the food industry.

Keywords: biopolymer; mangrove crab; antimicrobial resistance; contact angle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processo de obtenção de quitosana.....	18
Figura 2 -	Crustáceo <i>Ucides cordatus</i>	19
Figura 3 -	Mecanismo de ação antibacteriana das partículas de quitosana na parede celular bacteriana.....	20
Figura 4 -	GBX <i>Instrumentation Scientific</i>	37
Figura 5 -	Resultados do ensaio de microdiluição para CIM da quitosana <i>Ucides cordatus</i>	45
Figura 6 -	Resultados do ensaio de microdiluição para CIM da quitosana comercial...	46
Figura 7 -	Resultados do efeito inibitório dos extratos de quitosana <i>U. cordatus</i> na formação de biofilme.....	49
Figura 8 -	Resultados do efeito inibitório dos extratos de quitosana comercial na formação de biofilme.....	50
Figura 9 -	Resultados do efeito dos extratos de quitosana <i>U. cordatus</i> sobre biofilmes pré-formados.....	51
Figura 10 -	Resultados do efeito dos extratos de quitosana comercial sobre biofilmes pré-formados.....	52
Figura 11 -	Extrapolação do gráfico de Zisman para a superfície do queijo coalho (intervalo de confiança de 95%).....	55
Figura 12 -	Análise de citotoxicidade <i>in vitro</i> para extratos de <i>Ucides cordatus</i> e quitosana comercial.....	58
Figura 13 -	Análise de citotoxicidade <i>in vitro</i> para as soluções de <i>Ucides cordatus</i> e quitosana comercial que avaliou as propriedades de revestimento - capacidade de molhabilidade.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades biológicas da quitosana.....	16
Tabela 2 -	Quitosanas com análise antimicrobiana.....	21
Tabela 3 -	Quitosanas com aplicação biotecnológica em alimentos.....	26
Tabela 4 -	Histórico de análises de resistência em isolados de queijo para <i>Escherichia coli</i>	32
Tabela 5 -	Teor de quitosana e plastificante utilizado no preparado das soluções de revestimentos.....	36
Tabela 6 -	Atividade antimicrobiana em teste de difusão direta em ágar.....	42
Tabela 7 -	Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) dos extratos de quitosanas contra bactérias Gram-negativas.....	43
Tabela 8 -	Classificação produção de biofilme.....	48
Tabela 9 -	Componentes da tensão superficial dos líquidos usados para caracterizar a superfície dos queijos coalhos.....	54
Tabela 10 -	Composição química do queijo coalho.....	56
Tabela 11 -	Média e desvio padrão dos valores de Adesão (W_a), Coesão (W_c) e Coeficiente de espalhamento (W_s) dos revestimentos de quitosana e glicerol nos queijos coalhos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BrCast	Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CV	Cristal Violeta
LABMIC	Laboratório de Microbiologia Clínica - UFERSA
LATEPE	Laboratório de Tecnologia do Pescado – UFC
OMS	Organização Mundial de Saúde
RAM	Resistência Antimicrobiana
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CARACTERÍSTICAS DA QUITOSANA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	16
2.2	Quitosanas extraídas de caranguejos	17
2.3	Quitosana do <i>Ucides cordatus</i> (Caranguejo-Uçá)	19
2.4	Quitosana como potencial atividade antibacteriana	20
2.5	Bactérias Gram-negativas	22
2.6	Resistência Bacteriana	23
2.7	Contaminação bacteriana na cadeia produtora de laticínios	24
2.8	Uso da quitosana nos alimentos	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivos gerais	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Material Biológico	30
4.2	Obtenção dos extratos contendo as biomoléculas marinhas	30
4.2.1	<i>Preparo do extrato da quitosana <i>Ucides cordatus</i> e quitosana comercial</i>	30
4.2.2	<i>Análise microbiológica para avaliação da pureza dos extratos das quitosanas (<i>Ucides cordatus</i> e comercial)</i>	30
4.3	Bactérias-teste	31
4.3.1	<i>Bactérias Resistentes</i>	31
4.4	Preparo e análise dos inóculos bacterianos	33
4.5	Teste de Difusão direta em Ágar	33
4.6	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	33
4.7	Determinação da produção de biofilme por isolados bacterianos	34
4.7.1	<i>Avaliação da inibição da formação de biofilme</i>	35
4.7.2	<i>Avaliação da erradicação do biofilme</i>	35
4.8	Propriedades dos revestimentos: capacidade molhante	36
4.8.1	<i>Preparação dos Revestimentos de Quitosana <i>Ucides cordatus</i></i>	36

4.8.2	<i>Medidas de ângulo de contato</i>	37
4.8.3	<i>Tensão Crítica Superficial</i>	38
4.8.4	<i>Capacidade Molhante</i>	39
4.9	Ensaio de Citotoxicidade dos extratos de <i>Ucides cordatus</i>	40
4.10	Análises de Estatísticas	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de quitosana <i>in vitro</i>	42
5.2	Determinação das CIMs e CBMs	43
5.3	Análise de Biofilme	47
5.3.1	<i>Avaliação da atividade das quitosanas sobre a formação de biofilmes</i>	48
5.3.2	<i>Avaliação da atividade das quitosanas sobre biofilmes pré-formados</i>	51
5.4	Capacidade molhante do revestimento em queijo coalho	54
5.4.1	<i>Tensão Crítica Superficial</i>	54
5.4.2	<i>Molhabilidade dos Revestimentos de Quitosana no Queijo Coalho</i>	56
5.5	Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos Extratos de <i>Ucides cordatus</i> e Quitosana Comercial	58
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A – FOTOS DOS RESULTADOS DO TESTE FURO EM ÁGAR EM SOLUÇÃO MÃE DE UCIDES CORDATUS E QUITOSANA COMERCIAL NA CONCENTRAÇÃO DE 5 MG/ML SOB AS CEPAS ESCHERICHIA COLI ATCC 25922, ACINETOBACTER BAUMANNII ATCC 19606, KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC 13883 E PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853	73
	ANEXO B – FOTOS DOS RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM), RESULTANTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS DE UCIDES CORDATUS E QUITOSANA COMERCIAL NAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES SOB AS CEPAS ESCHERICHIA COLI ATCC 25922, ACINETOBACTER BAUMANNII ATCC 19606, KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC 13883 E PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853	74

ANEXO C – FOTOS DOS RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM), RESULTANTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS DE <i>UCIDES CORDATUS</i> E QUITOSANA COMERCIAL NAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES SOB AS CEPAS <i>ESCHERICHIA COLI</i> MULTIRRESISTENTES	75
ANEXO D – INTERVALO DE CONFIANÇA DO TESTE DUNNETT (95%)	76
ANEXO E – FOTOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE MOLHABILIDADE SOBRE A SUPERFÍCIE DO QUEIJO COALHO .	86
ANEXO F – FOTOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE 24H, RESULTANTE DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>UCIDES CORDATUS</i> E QUITOSANA COMERCIAL NA CÉLULA DE FIBROBLASTO DE CAMUNDONGOS (L929) E QUERATINÓCITOS DA PELE HUMANA (HACAT)	87

1 INTRODUÇÃO

O caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), pertencente à ordem Decapoda e à família Ocypodidae, é uma espécie amplamente distribuída nos manguezais da costa atlântica das Américas, com destaque para o litoral brasileiro. Este crustáceo exerce funções ecológicas essenciais, como a aeração do solo e a decomposição da matéria orgânica, contribuindo diretamente para a manutenção da biodiversidade e do equilíbrio nos ecossistemas estuarinos (SEREJO *et al.*, 2006). Além de sua relevância ambiental, o *U. cordatus* possui importância socioeconômica significativa, sendo alvo de pesca artesanal e fonte de renda para diversas comunidades ribeirinhas. No entanto, o processamento e consumo do caranguejo geram grandes volumes de resíduos sólidos, principalmente carapaças, que geralmente são descartados sem critérios adequados, resultando em impactos ambientais e sanitários (GÍJIU *et al.*, 2022; MUTHU *et al.*, 2021; ALENCAR *et al.*, 2014).

Essas carapaças, no entanto, representam uma fonte abundante e pouco explorada de quitina, um polissacarídeo estrutural presente no exoesqueleto de crustáceos, insetos e fungos (MUTHU *et al.*, 2021). A desacetilação da quitina dá origem à quitosana, um biopolímero de grande interesse biotecnológico devido às suas propriedades funcionais, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, além da capacidade de formar géis, filmes e esferas (HUANG *et al.*, 2020). A extração da quitosana a partir de resíduos crustáceos, como os provenientes do caranguejo-uçá, configura-se como uma alternativa sustentável para o aproveitamento de subprodutos da pesca, alinhando-se aos princípios da economia circular e da valorização de resíduos biomateriais (HASSAN *et al.*, 2022).

A quitosana tem sido amplamente investigada em diversas áreas do conhecimento, destacando-se seu uso no tratamento de águas residuais, e na agricultura, como agente bioestimulante e controlador de fitopatógenos (KESHVARDOOSTCHOKAMI *et al.*, 2021; EL-HACK *et al.*, 2020); na medicina, os sistemas de liberação controlada de fármacos, curativos e engenharia de tecidos (PUROHIT *et al.*, 2024); e na indústria de alimentos, esse biopolímero tem sido empregado como aditivo funcional e na formulação de revestimentos comestíveis, com o objetivo de estender a vida útil de frutas, hortaliças, carnes e outros produtos perecíveis (CHICEA; NICOLAE-MARANCIUC, 2024). Sua capacidade de formar filmes com propriedades mecânicas e barreiras satisfatórias, aliada à possibilidade de incorporar substâncias bioativas, como antioxidantes e antimicrobianos naturais, confere à quitosana um papel estratégico no

desenvolvimento de embalagens biodegradáveis e inteligentes (SALGADO-CRUZ *et al.*, 2021).

Dentre as propriedades mais relevantes da quitosana, destaca-se sua atividade antimicrobiana, cuja eficácia tem sido demonstrada contra diversas bactérias e fungos, incluindo microrganismos patogênicos envolvidos em surtos alimentares e infecções hospitalares (ARAUJO *et al.*, 2025; ROZMAN *et al.*, 2019). Estudos recentes têm explorado o potencial da quitosana no enfrentamento de bactérias resistentes, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* resistentes, evidenciando sua capacidade de atuar por mecanismos não convencionais, como a alteração da permeabilidade da membrana celular e a quelatação de metais essenciais à sobrevivência microbiana (MACEDO *et al.*, 2022). Esses achados colocam a quitosana como uma candidata promissora no desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas, especialmente em um cenário global de crescente resistência aos antibióticos convencionais (NAGHAVI *et al.*, 2024). Além da atividade bactericida e bacteriostática, a quitosana tem demonstrado ação promissora na inibição da formação de biofilmes (REMESH *et al.*, 2025).

No setor alimentício, o uso da quitosana como revestimento comestível tem ganhado destaque, tanto pela sua eficácia na conservação microbiológica quanto por sua contribuição para a qualidade sensorial dos alimentos. Aplicações como o recobrimento de frutas minimamente processadas, carnes e queijos têm mostrado resultados positivos na redução da carga microbiana, na manutenção da umidade e na prevenção da oxidação lipídica, promovendo segurança alimentar e reduzindo perdas pós-colheita e desperdícios ao longo da cadeia produtiva (MEINDRAWAN *et al.*, 2020; BARROS *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019;).

Dessa forma, a exploração da quitosana, especialmente a obtida a partir de resíduos de crustáceos como o caranguejo-uçá, justifica-se não apenas por seu elevado potencial biotecnológico e funcional, mas também por sua relevância ambiental e econômica. O aproveitamento racional desse biopolímero contribui para a mitigação de impactos ambientais, agrega valor a cadeias produtivas locais e promove inovação sustentável em diversos setores industriais, com destaque para a indústria de alimentos (VALE *et al.*, 2020b). Assim, esse trabalho objetivou realizar uma avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antibiofilme da quitosana de *Ucides Cordatus* contra bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos, isoladas de queijo coalho, com o intuito de potencializar suas aplicações e fortalecer seu protagonismo como recurso natural.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características da Quitosana e Potencial Biotecnológico

A quitosana é um derivado da quitina, segundo biopolímero orgânico mais abundante no mundo, depois da celulose (MATICA *et al.*, 2019). Um polissacarídeo natural encontrado na carapaça de crustáceos, exoesqueleto de insetos e paredes celulares de fungos (KHAYROVA *et al.*, 2022; MAWAZI *et al.*, 2024).

Com cargas positivas e classificada como um carboidrato, mais especificamente um heteropolissacarídeo devido à presença de diferentes unidades monoméricas (KHAYROVA *et al.*, 2022). Sua natureza polimérica e a presença de grupos funcionais amina (-NH₂) e hidroxila (-OH), conectadas por ligações β (1→4) que lhe conferem características químicas únicas. Em solução aquosa, a quitosana pode adquirir caráter ácido devido à protonação dos grupos amina primários em meio com pH abaixo de seu pKa (geralmente abaixo de 6,5). Quando protonada, a molécula passa a apresentar carga positiva, tornando-se solúvel em soluções levemente ácidas, como ácido acético diluído (GUARNIERI *et al.*, 2022).

O comportamento da quitosana em relação ao pH é essencial para suas propriedades biológicas e aplicações. Em pH neutro ou alcalino, a quitosana tende a ser insolúvel, enquanto em pH ácido, sua solubilidade aumenta devido à ionização dos grupos amina. Essa característica influencia sua capacidade de formar complexos, interagir com biomoléculas e atuar como agente antimicrobiano, entre outras aplicações (LIN *et al.*, 2023; MATICA *et al.*, 2019).

Com excelentes propriedades biológicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, solubilidade, capacidade de formação de filmes e géis, atividade antimicrobiana, capacidade de adsorção, propriedades mecânicas, bioadesão, capacidade de cicatrização, ação anti-inflamatória e antioxidante, a quitosana tem sido bastante utilizada em pesquisas médicas (HUANG *et al.*, 2020). Na Tabela 1, podemos visualizar estudos que mostram essas propriedades detalhadamente.

Tabela 1 - Propriedades Biológicas da Quitosana

Propriedade	Aplicabilidade	Referência
-------------	----------------	------------

Biocompatibilidade	Utilizada em curativos para cicatrização de feridas e engenharia de tecidos.	(LIU, 2025); (QIN <i>et al.</i> , 2020).
Formação de filmes e géis	Utilizada em revestimentos comestíveis para aumentar a vida útil de alimentos.	(CHICEA; NICOLAE-MARANCIUC, 2024).
Atividade antimicrobiana	Aplicada em embalagens antimicrobianas para conservação de produtos alimentícios.	(SALGADO-CRUZ <i>et al.</i> , 2021).
	Atividade antimicrobiana associada a nanopartículas e/ou antibióticos.	(ARAUJO <i>et al.</i> , 2025); (ROZMAN <i>et al.</i> , 2019).
Propriedades mecânicas	Incorporada em biomateriais para conferir resistência e flexibilidade - Fibras eletrofiadas à base de quitosana para engenharia de tecido ósseo.	(PUROHIT <i>et al.</i> , 2024).
Capacidade de adsorção	Utilizada no tratamento de águas para remoção de metais pesados e corantes.	(KESHVARDOOSTCHOKAMI <i>et al.</i> , 2021); (EL-HACK <i>et al.</i> , 2020).
Ação anti-inflamatória	Como veículo transportador funcional para sistemas anti-inflamatórios de administração local.	(PACZKOWSKA-WALENDOWSKA <i>et al.</i> , 2022); (YAN <i>et al.</i> , 2021).

Fonte: Autor (2025).

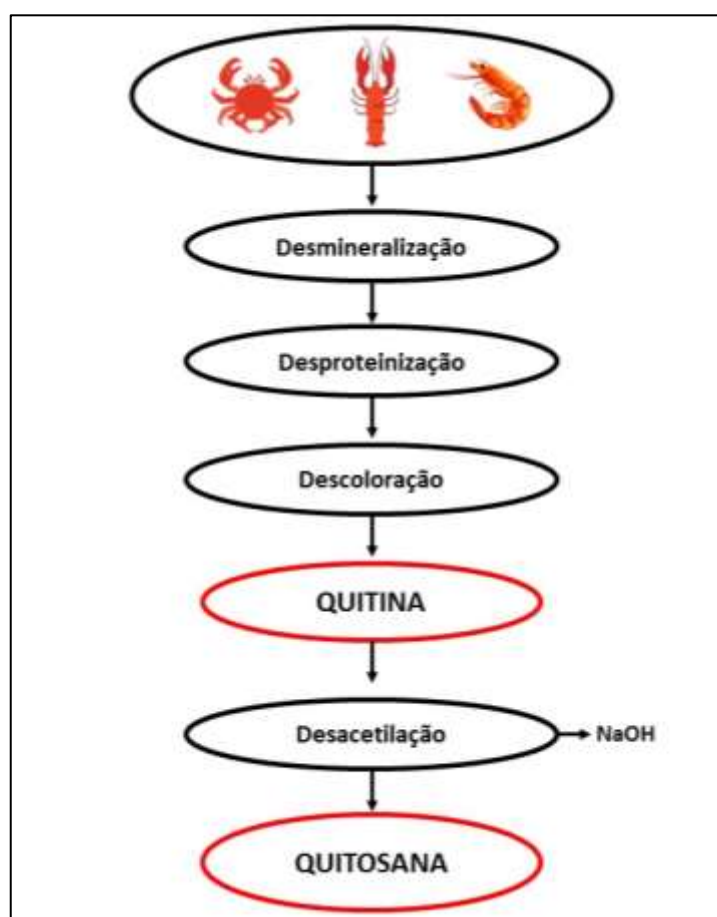
2.2 Quitosanas extraídas de caranguejos

Presente nos exoesqueletos de artrópodes marinhos como crustáceos (caranguejo, camarão, lagosta, krill, lagostim, cracas), sépias e lulas; a quitina é um biopolímero abundante como mencionado anteriormente, e que possui uma produção anual estimada em 10 bilhões de toneladas, e sua principal fonte industrial são os resíduos da indústria alimentícia marinha, especialmente cascas que contêm de 13% a 42% de quitina, além de proteínas e sais minerais. No processamento de camarões, cerca de 40 a 50% da massa torna-se resíduo, sendo que 40% desse total é quitina, facilmente extraída por métodos

simples e amplamente utilizada devido à sua disponibilidade (GÍJIU *et al.*, 2022; MUTHU *et al.*, 2021), como demonstrado na Figura 1.

As cascas dos crustáceos tem representado uma fonte promissora para a matéria-prima de extração de quitosana, sendo um composto natural, considerado seguro ambientalmente e amigável quando comparado a produtos de origem sintéticas, que podem representar riscos à saúde humana, e mesmo assim tem sido aplicados, como por exemplo, no tratamento de águas residuais (HASSAN *et al.*, 2022).

Figura 1 – Processo de obtenção de quitosana



Fonte: Adaptado de MUTHU *et al.*, (2021).

A quitina, quitosana ou cascas de caranguejo residuais têm sido explorados em diversas aplicações, incluindo agentes antimicrobianos, aditivos, antioxidantes, filmes comestíveis e no encapsulamento de nutracêuticos por meio da imobilização enzimática. Embora a literatura existente foque principalmente na extração de polissacarídeos a partir de resíduos, ainda são escassos os estudos que abordam especificamente a extração de quitina

e quitosana de resíduos de crustáceos e suas aplicações direcionadas (SARAVANAN *et al.*, 2023).

2.3 Quitosana do *Ucides cordatus* (Caranguejo-Uçá)

O crustáceo *Ucides cordatus*, de nome popular Caranguejo-Uçá (Figura 2), é um caranguejo semi-terrestre de grande importância econômica no Nordeste do Brasil, sendo considerado uma espécie sub explorada. Encontrado nos manguezais ao longo da costa atlântica, desde a Flórida (Estados Unidos da América), até Santa Catarina (Brasil), e é um eficiente bioindicador de poluição ambiental. Curiosamente, apesar de ser explorado há séculos, muitos aspectos de sua biologia ainda são pouco conhecidos (ALENCAR *et al.*, 2014).

Figura 2 - Crustáceo *Ucides cordatus*



Fonte: CASTILHO-WESTPHAL *et al.* (2008).

Os resíduos do caranguejo-uçá podem ser aproveitados para gerar matéria-prima de valor comercial, já que a quitina presente em sua composição pode ser convertida em quitosana por meio de processos de desacetilação. Com pouca exploração no mercado, sua quitosana já foi produzida por meio de técnicas usando radiação de microondas, com grau de desacetilação que variou entre 65-81% (ABREU *et al.*, 2013).

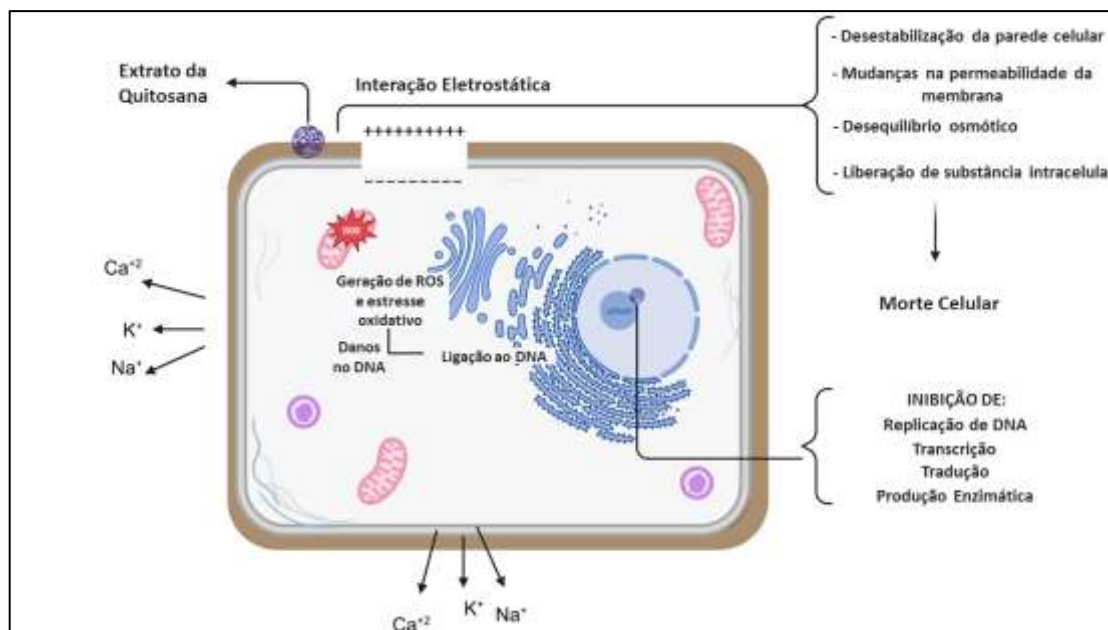
No entanto, os únicos estudos que apresentaram aplicabilidade com o uso do caranguejo-uçá, foi na área de tecnologia de alimentos; onde a quitosana foi utilizada na produção de filmes, revestimentos comestíveis e embalagens biodegradáveis, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, que mostraram auxiliar na conservação e prolongamento da vida útil dos alimentos (VALE *et al.*, 2020b). Com natureza bactericida, controlando eficazmente o crescimento de microrganismos em alimentos. A forma utilizada para avaliar as propriedades destes revestimentos foi por meio da técnica de molhabilidade (capacidade molhante), que pela avaliação de tensão superficial pode dizer se a aderência pode promover plasticidade e consequente atividade antimicrobiana dos alimentos (ZISMAN, 1964).

2.4 Quitosana como potencial atividade antibacteriana

Alguns estudos já correlacionam a atividade antibacteriana como uma habilidade intrínseca as quitosanas (HUANG *et al.*, 2020). Rozman e colaboradores (2019), avaliaram potenciais aplicações antimicrobianas de nanopartículas de quitosana, com o método de encapsulamento, vendo que o polímero aumenta ainda mais a eficiência e a estabilidade do agente antimicrobiano. El-Hack e seu grupo de pesquisa (2020), realizaram um levantamento, avaliando as propriedades antimicrobianas e antioxidantes da quitosana e seus derivados, por meio de uma revisão, onde concluíram que a quitosana possui propriedades seguras, podendo ser aplicado na farmacologia e desenvolvimentos biomédicos.

Estudos, como o de Yan e colaboradores (2021) e Mawazi e colaboradores (2024), relatam as propriedades antimicrobianas da quitosana e derivados da quitosana no tratamento de infecções entéricas, concluindo o estudo dizendo que a quitosana pode atuar como prebiótico, promovendo o crescimento de bactérias benéficas na mucosa e reduzindo as bactérias pró-inflamatórias, ajudando a equilibrar a microbiota intestinal e a reduzir a inflamação da mucosa. O grupo ainda afirma em suas considerações que a quitosana e seus derivados podem matar microrganismos patogênicos neutralizando cargas negativas na superfície microbiana; assim como é mostrado na figura 3, no estudo de Akdaşi e colaboradores (2025).

Figura 3 - Mecanismo de ação antibacteriana das partículas de quitosana na parede celular bacteriana



Fonte: Adaptado de Akdaşci *et al.* (2025).

Na Tabela 2, podemos visualizar mais estudos que mostram a aplicação de diferentes extratos de quitosanas em diferentes cepas bacterianas.

Tabela 2 - Quitosanas com análise antimicrobiana

Origem da Quitosana	Grau de Desacetilação	Ácido	Bactérias Analisadas	Referência
<i>Cherax quadricarinatus</i> (Crustáceo)	67,93%	Acético - 1%	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positivo) <i>Escherichia coli</i> (Gram-negativa)	(RANI <i>et al.</i> , 2022)
Quitosana Comercial (+ heterocíclico)	89%	Acético - 1%	Antibacteriana e Antibiofilme: <i>E. coli</i> (ATCC 25922) <i>S. aureus</i> (CMCC(B) 26003)	(WANG <i>et al.</i> , 2024a)
Quitosana Comercial (+ sais de amônio quaternário)	89%	Acético - 1%	Antibacteriana e Antibiofilme: <i>E. coli</i> (ATCC 25922) <i>S. aureus</i> (CMCC(B) 26003)	(WANG <i>et al.</i> , 2024b)

Quitosana da Casca de caranguejo (Comercial), modificada com anidrido ftálico e etilenodiamina	95%	Acético – 2%	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	(SOUSA <i>et al.</i> , 2024)
Três diferentes tipos de quitosanas comerciais.	Entre o intervalo de 75 – 85%	Lático* em 2/3 quitosanas; Succínico* em 1/3 quitosana	**	(STEGLÍNSKA <i>et al.</i> , 2024)
<i>Hermetia illucens</i> (Mosca soldado-negro)	***	Acético – 1%	<i>Escherichia coli</i> (Gram-negativo) <i>Micrococcus flavus</i> (Gram-positivo)	(GUARNIERI <i>et al.</i> , 2022)
<i>Zophobas morio</i> (besouro cascudo)	96,24%	Acético – 0,5%	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883), <i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 29906), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	(KEERTHIKA <i>et al.</i> , 2024)

Fonte: Autor (2025). Legenda: (*) autor não descreve o valor do ácido usado na solubilização; (**) autor não realizou a identificação das bactérias em gênero e espécie; (***) autor não descreve o grau de desacetilação da quitosana usada.

2.5 Bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas representam um grupo vasto e diversificado de microrganismos com significativa importância clínica, é grupo de microrganismos que apresentam uma estrutura celular complexa com duas membranas, sendo a membrana externa uma barreira eficaz para muitas moléculas pequenas, incluindo alguns fármacos e fitoterápicos (QIAO *et al.*, 2022). Isso porque a membrana externa dessas bactérias é composta por lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídios, o que dificulta a penetração de substâncias no interior da célula bacteriana. Este fenômeno contribui para a resistência de bactérias Gram-negativas a certos tratamentos (IMPEY *et al.*, 2020).

Do ponto de vista clínico, esse grupo inclui importantes patógenos humanos, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente associados a infecções do trato urinário, respiratório, gastrointestinal e infecções nosocomiais (DETTORI *et al.*, 2023). A relevância dessas bactérias está diretamente relacionada à presença de múltiplos fatores de virulência, como a produção de LPS, a capacidade de adesão a superfícies e tecidos, a formação de biofilmes e a expressão de sistemas de secreção especializados, que permitem a injeção direta de efetores na célula hospedeira, modulando a resposta imune e favorecendo a sobrevivência bacteriana (BASSETTI *et al.*, 2020). O que tem proporcionado uma resistência antimicrobiana crescente nesse grupo nas últimas décadas, e que tem tornado extremamente difícil a escolha de uma terapia antimicrobiana. Isso resulta em um aumento significativo na morbidade e mortalidade entre pacientes afetados por essas infecções (BASSETTI *et al.*, 2021; VENA *et al.*, 2020).

2.6 Resistência Bacteriana

A introdução dos antibióticos contribuiu significativamente com o aumento da expectativa de vida humana em mais de duas décadas (MANCUSO *et al.*, 2023). Entretanto, com o passar dos anos, os microrganismos se adaptam, adquirindo resistência, surgindo a necessidade de novos antibióticos. Estima-se que até 2050, a resistência antimicrobiana será responsável por mais de 39 milhões de mortes em todo o mundo (NAGHAVI *et al.*, 2024).

A resistência antimicrobiana (RAM) é um fenômeno complexo e dinâmico, resultante de uma interação problemática entre fatores diretos, como o uso inadequado de antibióticos por seres humanos, e em animais; e fatores indiretos, como a poluição ambiental e as más condições de saneamento; além das características inatas das próprias bactérias (SYED *et al.*, 2021).

Pesquisadores da Organização Mundial de Saúde (OMS) já afirmam que a exposição prévia aos antibióticos, doenças subjacentes e procedimentos invasivos, também estão associados à resistência. No entanto, os fatores de risco para a disseminação da resistência podem variar; a RAM em países em desenvolvimento tende a se espalhar mais facilmente devido à falta de saneamento adequado e água potável, enquanto em países desenvolvidos, uma em cada cinco infecções resistentes é causada pela exposição a alimentos ou animais contaminados (BASSETTI *et al.*, 2021; BREIJYEH *et al.*, 2021).

Em 2017, a OMS publicou uma lista de patógenos resistentes aos antibióticos, destacando aqueles que representam uma ameaça significativa à saúde humana e para os quais novos antibióticos são urgentemente necessários. Essa lista é categorizada em níveis de prioridade para orientar e impulsionar a pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos (BREIJYEH *et al.*, 2021). Devido à sua estrutura, as bactérias Gram-negativas apresentam um maior número de incidência a resistência que as bactérias Gram-positivas, assim o documento elaborado detém uma atenção maior a esse grupo de bactérias.

As bactérias do grupo são capazes de desenvolver mecanismos como a produção de β -lactamases, e outros mecanismos como, bombas de efluxo, impermeabilidade seletiva da membrana externa, aquisição de genes de resistência por transferência horizontal. Esse cenário tem implicações diretas no aumento da morbidade, mortalidade e nos custos relacionados ao tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (SANDS *et al.*, 2021).

Outra condição que as bactérias se especializaram e que dificultam o processo de tratamento por meio de antibióticos conhecidos, é a formação de biofilmes; já que os biofilmes são uma estratégia de sobrevivência e proteção para patógenos (SONG *et al.*, 2019). As células do biofilme adquirem alta tolerância a antibióticos através de diversos mecanismos, sendo um deles, a matriz polimérica, que protege as células bloqueando ou retardando a penetração de certas moléculas antibióticas (BHOWMIK *et al.*, 2022; GU *et al.*, 2019).

2.7 Contaminação bacteriana na cadeia produtora de laticínios

A cadeia produtora do leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil, com grande impacto na geração de empregos e renda. No ano de 2019, o valor bruto da produção primária alcançou quase R\$ 35 bilhões, sendo o sétimo maior entre os produtos agropecuários do país (BRASIL, 2019a). Na indústria alimentícia, esse valor mais que dobra,

com o faturamento líquido dos laticínios chegando a R\$ 70,9 bilhões, ficando atrás apenas dos setores de derivados de carne e produtos de café, chá e cereais (ABIA, 2019).

Como matéria prima para uma longa cadeia de alimentos, o leite tem como seu principal derivado produzido no Brasil o queijo artesanal ou industrializado. São cerca de 36 tipos de diferentes queijos produzidos no território brasileiro (ARAÚJO *et al.*, 2020; KAMIMURA *et al.*, 2019). Que o censo agropecuário realizado em 2017, apontou como estimativa uma produção de 222.652 toneladas de queijo em cerca de 175.000 estabelecimentos espalhados pelo Brasil (IBGE, 2017).

Para os devidos cuidados na produção dos queijos foi instituída a Instrução Normativa nº 73 de 2019, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (Brasil, 2019b), que estabelece regulamentos técnicos de Boas Práticas Agropecuárias (BPA), com foco na saúde dos rebanhos de produtores de queijo. BPAs que não se limitam apenas à saúde aos rebanhos leiteiros, mas também abordam a gestão da propriedade, o bem-estar animal, a higiene pessoal, a saúde das famílias e colaboradores, e a sustentabilidade ambiental (MAPA, 2021).

A implementação das BPAs relacionadas aos aspectos sanitários garante que a produção de leite e seus derivados atenda às mais elevadas expectativas dos consumidores em termos de qualidade e segurança do queijo. Os aspectos sanitários da Instrução Normativa nº 73 (Brasil, 2019b) são direcionados ao controle de doenças que afetam tanto a produção quanto a saúde dos consumidores, como brucelose, tuberculose e mastite bovina.

Isso, porque a carga de doenças transmitidas por alimentos em humanos ainda é amplamente desconhecida. Nos últimos dez anos, a incidência de doenças microbianas de origem alimentar aumentou significativamente na maioria dos países (AHMADI *et al.*, 2020). Leite e laticínios, por serem alimentos comuns em diversas regiões, oferecem um ambiente propício ao crescimento de muitos microrganismos devido à sua composição nutricional (HASSANI *et al.*, 2022). *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* são os patógenos Gram-negativos mais comuns em fazendas leiteiras, podendo causar mastite ao infectar as glândulas mamárias de vacas através do teto (TARTOR *et al.*, 2021). O uso inadequado de antibióticos na produção de laticínios levanta preocupações sobre a eficácia do tratamento, segurança alimentar, e exposição ocupacional, além de representar um risco à saúde pública pela seleção de bactérias multirresistentes e resíduos de antibióticos no leite do tanque a granel (AHMADI *et al.*, 2020; TARTOR *et al.*, 2021).

A resistência por esses microrganismos, estão associadas a prática de tratamento ou prevenção coletiva do rebanho leiteiro, onde o antibiótico é administrado, possibilitando

alteração genética nas cepas, adquirindo resistência (SOUZA *et al.*, 2023). Já são notificados a incidência de genes como *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, a família *bla*_{CTX-M} (associados a resistência as beta-lactamases de espectro estendido - ESBL), mas, também Genes de resistências, como alguns grupos OXA, MCR, Stx1, Stx2, *eae*, *mec A* e *bla*_Z (AHMADI *et al.*, 2020; FERGESTAD *et al.*, 2021; HASSANI *et al.*, 2022; TARTOR *et al.*, 2021). Havendo a necessidade de se buscar novos tratamentos a serem aplicados nessas bactérias resistentes.

2.8 Uso da quitosana nos alimentos

O aparecimento de bactérias resistentes torna difícil encontrar um tratamento eficaz para tratar certas doenças infecciosas (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2020). Portanto, há uma necessidade urgente de encontrar novas abordagens terapêuticas para obter melhor sucesso no tratamento de infecções ou contaminações bacterianas. Além dos antimicrobianos tradicionais, como antibacterianos, com suas diferentes formulações associadas, compostos químicos e naturais tem despertado grande interesse, tanto na comunidade científica quanto no público em geral, especialmente diante da ameaça global da resistência antimicrobiana (MATICA *et al.*, 2019).

Atualmente, diversas estratégias estão sendo estudadas para enfrentar a resistência bacteriana, incluindo o desenvolvimento de novos compostos antibacterianos, o aprimoramento de técnicas de diagnóstico rápido para orientar o uso adequado de antibióticos e a busca por agentes terapêuticos alternativos, como bacteriófagos e terapias baseadas em componentes naturais (BREIJYEH *et al.*, 2021).

Na agroindústria, a tecnologia associada a manutenção de alimentos, contra bactérias, tem desenvolvido filmes comestíveis e revestimentos que funcionam de maneira semelhante às embalagens convencionais, atuando como barreira contravapor de água e gases, o que melhora as propriedades e a integridade dos alimentos processados (VALE *et al.*, 2020a). A tabela 3 apresentam estudos que descrevem a aplicação da quitosana em frutos, frutas e demais alimentos.

Tabela 3 - Quitosanas com aplicação biotecnológica em alimentos

Título do Estudo	Referência
Polissacarídeos Funcionais como Revestimentos Comestíveis para Queijo	(CERQUEIRA <i>et al.</i> , 2009)

Eficácia antimicrobiana de materiais de embalagem bioativos feitos de polímeros comestíveis de quitosana e caseína: avaliação em cenoura, queijo e salame	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2010)
Efeito de revestimentos de quitosana nas características físico-químicas do fruto de mamão Eksotika II (<i>Carica papaya</i> L.) durante o armazenamento refrigerado	(ALI <i>et al.</i> , 2011)
Efeito de revestimentos de hidroxipropilmetilcelulose e quitosana com e sem óleo essencial de bergamota na qualidade e segurança de uvas armazenadas a frio	(SÁNCHEZ-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2011)
Desenvolvimento de revestimento bioativo comestível à base de quitosana modificada para aumentar a vida útil de morangos	(VU <i>et al.</i> , 2011)
Efeitos do revestimento de quitosana na vida pós-colheita e na qualidade de frutos de goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.) durante o armazenamento refrigerado	(HONG <i>et al.</i> , 2012)
Efeito do revestimento comestível de quitosana na qualidade de sardinha indiana em filé duplo (<i>Sardinella longiceps</i>) durante armazenamento refrigerado	(MOHAN <i>et al.</i> , 2012)
Efeito do revestimento comestível à base de quitosana sobre antioxidantes, sistema enzimático antioxidante e qualidade pós-colheita de morangos (<i>Fragaria × arnassa</i> Duch.)	(WANG <i>et al.</i> , 2013)
Atividade antimicrobiana de quitosana, ácidos orgânicos e solubilizados nanométricos para uso potencial em embalagens antimicrobianas inteligentes para potenciais aplicações em alimentos	(CRUZ-ROMERO <i>et al.</i> , 2013)
Comparação do efeito do compósito de quitosana-gelatina e do revestimento e filme bicamada na qualidade da truta arco-íris refrigerada	(NOWZARI <i>et al.</i> , 2013)
Efeitos do revestimento comestível de bicamada de carboximetilcelulose e quitosana na qualidade pós-colheita de frutas cítricas	(ARNON <i>et al.</i> , 2014)
Efeito do revestimento de quitosana e aloe vera na qualidade pós-colheita de frutos de mirtilo (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2016)
Filme comestível incorporado com nanolipossomas de quitosana e óleo de <i>Artemisia annua</i> para inativação de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em tomate cereja	(CUI <i>et al.</i> , 2016)
Embalagens com Ativos Antimicrobianos, incluindo Filmes de Quitosana com Óleo Essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. para Carnes Prontas para Consumo	(QUESADA <i>et al.</i> , 2016)
Caracterização Física e Aplicação em Embalagens de Filmes de Quitosana Incorporados com Óleos Essenciais Combinados de Canela e Gengibre para Carne Suína	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
Nanoformulação de óleo essencial de quitosana e canela: aplicação como um novo aditivo para liberação controlada e extensão da vida útil de hambúrgueres bovinos	(GHADERI-GHAHFAROKHI <i>et al.</i> , 2017)

Efeito do filme comestível de quitosana enriquecido com óleo essencial de erva-doce (<i>Pimpinella anisum</i> L.) na vida útil e na qualidade do hambúrguer de frango	(MAHDAVI <i>et al.</i> , 2017)
Filmes ativos de quitosana contendo extratos de resíduos agroindustriais para extensão da vida útil de produtos reestruturados de frango	(SERRANO-LEÓN <i>et al.</i> , 2018)
Efeitos de revestimentos de quitosana incorporados com óleo essencial de planta <i>Satureja</i> livre ou nanoencapsulado nas características de qualidade da carne de cordeiro	(PABAST <i>et al.</i> , 2018)
Preparação de quitosana enxertada com ácido ferúlico utilizando lacase bacteriana recombinante e sua aplicação na conservação de manga	(YANG <i>et al.</i> , 2018)
Preparação e caracterização de filme biocompósito à base de quitosana e chá de kombucha como embalagem ativa para alimentos	(ASHRAFI <i>et al.</i> , 2018)
Queijo de coalho com quitosana incorporada e como revestimento: efeito na viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> e aceitação sensorial	(BARROS <i>et al.</i> , 2019)
Atividade de bionanocompósitos de quitosana-montmorilonita incorporados com óleo essencial de alecrim: de ensaios <i>in vitro</i> à aplicação em carne fresca de aves	(SOUZA <i>et al.</i> , 2019)
Revestimentos de quitosana incorporados com óleo essencial de <i>Paulownia tomentosa</i> livre ou nanoencapsulado para melhorar a vida útil de costeletas de porco prontas para cozinhar	(ZHANG <i>et al.</i> , 2019)
Revestimento comestível antimicrobiano de glucomanano-cera de abelha-quitosana para manter a qualidade de armazenamento da fruta Salak (<i>Salacca zalacca</i>)	(MEINDRAWAN <i>et al.</i> , 2020)
Filmes Comestíveis à Base de Quitosana Produzidos a Partir de Resíduos de Caranguejo-Uçá (<i>Ucides cordatus</i>): Propriedades Físico-Químicas, Mecânicas e Antimicrobianas	(VALE <i>et al.</i> , 2020b)
Efeitos de nanopartículas antibacterianas de ZnO no desempenho de um revestimento comestível de quitosana/goma arábica para preservação pós-colheita de banana	(LA <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: Autor (2025).

A quitosana extraída de cascas de caranguejo representa uma alternativa sustentável e funcional para aplicações na indústria de alimentos, promovendo o aproveitamento de resíduos da cadeia pesqueira. Com reconhecida atividade antimicrobiana, a quitosana atua contra diversos microrganismos, sendo uma opção natural aos conservantes sintéticos. Além disso, suas propriedades filmogênicas permitem sua aplicação em revestimentos comestíveis, contribuindo para a conservação, segurança e prolongamento da vida útil dos alimentos, unindo inovação biotecnológica e sustentabilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme dos extratos da quitosana *Ucides cordatus* em bactérias gram-negativas resistentes.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir extratos do polímero *Ucides cordatus*;
- Avaliar o potencial de atividade antimicrobiana dos extratos contra bactérias Gram-negativas;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos extratos em bactérias Gram-negativas;
- Avaliar a atividade antibiofilme dos extratos sobre biofilmes pré-formados de bactérias Gram-negativas;
- Formular a composição adequada de revestimento de *Ucides cordatus* a ser aplicado em queijo coalho;
- Avaliar o potencial citotóxico em modelos celulares;
- Comparar os resultados apresentados do polímero *Ucides cordatus* com uma quitosana em escala comercial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

A quitosana *Ucides cordatus* foi produzida e caracterizada no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE) no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC), com grau de desacetilação de 92%. As carapaças dos caranguejos foram obtidas no comércio local da cidade de Fortaleza, CE. A espécie é registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o registro A058F53. Uma outra quitosana (comercial), também foi avaliada, para terem seus resultados comparados.

4.2 Obtenção dos extratos contendo as biomoléculas marinhas

A quitosana *Ucides cordatus* caracterizada no LATEPE, juntamente com a quitosana comercial foram transportados até o Laboratório de Microbiologia Clínica (Nível de biossegurança II) da UFERSA onde as análises microbiológicas ocorreram.

4.2.1 Preparo do extrato da quitosana *Ucides cordatus* e quitosana comercial

Ambas as quitosanas foram dissolvidas em solução de ácido acético 1% nas concentrações mães (5 mg/mL cada) para realização da atividade antimicrobiana. Cada extrato foi homogeneizado usando um agitador magnético a 300 rpm por 12 h em temperatura (± 28 °C). Após a produção, o extrato de quitosana foi armazenado a 4 °C, para posterior avaliação.

4.2.2 Análise microbiológica para avaliação da pureza dos extratos das quitosanas (*Ucides cordatus* e comercial)

Os dois extratos contendo a concentração mãe (5 mg/mL cada) foram testadas em Ágar Nutriente, pela técnica do *spread plate*. Inicialmente, adicionou 100 μ L na placa duplicata para cada um dos extratos. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em

estufa a 35-37 °C por 24 h. Não foram observados crescimentos bacterianos. Assim foram realizados os testes antimicrobianos.

4.3 Bactérias-teste

As avaliações de atividade antimicrobiana para os extratos na concentração mãe e suas diluições, tanto para a quitosana *Ucides cordatus* e quitosana comercial foram realizadas inicialmente para quatro cepas padrões Gram-negativas, sendo elas, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. As cepas foram crescidas em Ágar Macconkey. As cepas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35-37 °C por 24 h.

4.3.1 Bactérias Resistentes

Quando positivo os resultados da atividade antimicrobiana pelo teste do furo em Ágar (item 4.5) nas cepas padrões, especialmente na *Escherichia coli* ATCC 25922, os testes de avaliações mencionados nos demais itens metodológicos foram realizados nos isolados de *Escherichia coli* (10 bactérias), originadas de produtos lácteos (Queijos), coletados e analisados no Laboratório de Microbiologia Clínica (LABMIC) da UFERSA, onde foram isolados, identificados quanto ao gênero por meio de provas bioquímicas convencionais.

Os isolados foram avaliados quanto a resistência aos antibióticos por meio do teste antibiograma, com diferentes classes, como Cefalosporinas, Carbapenêmicos, Monobactâmico, Aminoglicosídeo, Fluoroquinolona e Polimixina B. Os resultados encontrados mostraram resistência em pelo menos três antibióticos dentro das diferentes classes citadas. Com exceção para Cefalosporina (Cefoxitina), Aminoglicosídeo (Amicacina), para o Carbapenêmico (Meropenem) e a Polimixina B, onde todos os isolados mostraram sensibilidade.

Genes associados ao mecanismo de resistência também foram encontrados nos isolados, sendo testado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para os genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*. Onde 70% dos isolados apresentaram pelo menos um gene dos três analisados. Todos os resultados de forma individualizada são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Histórico de análises de Resistência em Isolados de Queijo para *Escherichia coli*

Identificação dos Isolados		Resistência (BrCast 2024)			Genes de Resistência (PCR)
		Cefalosporinas	Diversos	Classificação Intermediária	
AQ1	<i>E.coli</i>	Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidima	-	Aztreonam	-
AQ2	<i>E.coli</i>	Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefepime	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}
AQ3	<i>E.coli</i>	Ceftriaxona, Cefepime	-	Cefotaxima	-
AQ4	<i>E.coli</i>	Ceftriaxona, Cefepime	Imipenem	Cefotaxima, Aztreonam	<i>bla</i> _{CTX-M}
AQ8	<i>E.coli</i>	Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidima	Aztreonam	-	<i>bla</i> _{CTX-M}
CA4	<i>E.coli</i>	Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidima	Ciprofloxacina, Sulfazotrin	-	<i>bla</i> _{CTX-M}
CA7	<i>E.coli</i>	Ceftriaxona, Cefepime	Sulfazotrin	Cefotaxima, Aztreonam	-
CA8	<i>E.coli</i>	Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidima	Aztreonam, Sulfazotrin	-	<i>bla</i> _{CTX-M}
CA11	<i>E.coli</i>	Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidima	Aztreonam, Gentamicina	Sulfazotrin	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}
CA14	<i>E.coli</i>	Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidima	Aztreonam, Sulfazotrin	Cefotaxima	<i>bla</i> _{CTX-M}

Fonte: Autor, 2025. Legenda: As referências usadas para avaliação do teste de sensibilidade foi adotada do BrCast (2024).

4.4 Preparo e análise dos inóculos bacterianos

Das culturas crescidas em Ágar Nutriente a 35-37 °C por 24 h, foi retirada uma porção do inóculo e homogeneizada em 9mL de solução salina 0,85% de cloreto de sódio (m/v) para os isolados até se obter uma turvação equivalente à turbidez 0,5 na escala de McFarland. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro (Leitora de Microplacas ELISA Tela 5.7 polegadas Colorida DR-200BS-NM da Kasuaki), sendo considerado o intervalo entre 0,08 e 0,10 em um comprimento de onda de 630 nm. A turbidez óptica comparável à solução padrão 0,5 de McFarland equivale a uma suspensão contendo, aproximadamente, 1×10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) (CLSI, 2021).

4.5 Teste de Difusão direta em Ágar

Cada cepa da bactéria, com concentração do inóculo ajustada, foi inoculada, em triplicata, em placas (150 x 20 mm) contendo ágar Mueller-Hinton (66 mL), com auxílio de um swab de algodão estéril (CLSI, 2021).

Em cada placa com o meio de cultura inoculado com a bactérias, foram perfurados poços de 6 mm de diâmetro e aproximadamente 4 mm de profundidade, com o auxílio de um perfurador (canudo esterilizado). Sendo distribuído nos poços 50µL para cada molécula em sua concentração mãe (5 mg/mL cada), um para o controle negativo (diluyente ácido acético), e por fim, um para o controle positivo, Polimixina B na concentração de 0,016 mg/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35-37 °C por 24 h, feito uma leitura, e por mais 24 h, totalizando 48 h, verificando se houve diferença na formação dos halos.

Decorrido o período de incubação (24/48 h), cada placa foi conferida para avaliação da atividade antimicrobiana. A presença de um halo transparente ao redor dos poços confirmou o resultado positivo da ação antimicrobiana dos extratos.

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os potenciais de inibição dos extratos foram avaliados a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), com adaptações do método descrito por Bona *et al.* (2014).

As amostras foram recuperadas em Caldo BHI a 35-37 °C por 18-24 h, e ajustada a turbidez 0,5 na escala de McFarland e absorvância (como descrito anteriormente). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL de Caldo *Mueller Hinton* ajustado, na sequência foram realizadas diluições seriadas dos polímeros, partindo da concentração de 50% da solução mãe, resultando nas concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; e 0,009 mg/mL. Somados a 10 µL do inoculo bacteriano correspondente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35-37 °C por 24 h. Todas as placas avaliaram o Controle de Esterilidade do Caldo *Mueller Hinton* ajustado, Controle Positivo (Polimixina B na concentração de 0,016 mg/mL), e Controle Negativo.

Decorrido o tempo de incubação, as placas forma submetidas a leitura no leitor de placas para registros de absorvância, visando coletar dados quantitativos do comportamento microbiano frente a cada concentração testada. Todos os testes foram feitos em duplicata.

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada microrganismo foi determinada com base na metodologia de Santurio *et al.* (2007). A partir dos poços nos quais não houve crescimento bacteriano visível no teste da CIM, foram semeadas uma alíquota de 10 µL do conteúdo do poço em Placa de Petri contendo Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). As placas foram incubadas a 35-37° C por 24 h; a placa que apresentar ausência ou menor presença de crescimento bacteriano determina a CBM do polímero sobre a bactéria testada.

4.7 Determinação da produção de biofilme por isolados bacterianos

Para a Avaliação de Atividade Antibiofilme dos extratos de *Ucides cordatus* foram realizados o protocolo de testes adaptados de Campos *et al.* (2024).

Onde os isolados bacterianos produtores de biofilme foram identificados usando o método do cristal violeta. Inicialmente, caldo de soja triptona (TSB) + glicose (1%) foi dispensado em cada poço das placas de microdiluição. Em seguida, suspensões bacterianas (10⁸ UFC/mL) dos isolados de bactérias Gram-negativas ATCCs *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e cepas de *E. coli* resistentes foram adicionadas e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado com

tampão fosfato pH 7,4. As placas foram secas e, em seguida, as bactérias aderidas foram fixadas com metanol 99%. Após a fixação, o metanol foi removido e as placas foram colocadas para secar novamente. Em seguida, as bactérias aderidas às placas foram coradas com cristal violeta 1%. O excesso de corante foi removido e 30% de ácido acético glacial foi adicionado a cada poço. Na sequência, foi realizada uma análise do resultado por espectrofotometria a 630 nm (Leitora de Microplacas ELISA Tela 5.7 polegadas Colorida DR-200BS-NM da Kasuaki). Os poços contendo apenas meio de cultura foram usados como controles negativos. As cepas foram classificadas em quatro categorias com base nos valores de OD (densidades ópticas) dos biofilmes bacterianos em comparação com o valor de Odc (densidade óptica do controle), da seguinte forma: não aderente se $OD \leq Odc$; produção fraca de biofilme se $Odc < OD \leq 2 \times Odc$; produção moderada de biofilme se $2 \times Odc < OD \leq 4 \times Odc$; ou produção forte de biofilme se $4 \times Odc < OD$. Experimentos independentes foram realizados em triplicata em dias diferentes.

4.7.1 Avaliação da inibição da formação de biofilme

Os ensaios utilizados para avaliar a inibição da formação de biofilme foram realizados nas cepas que se mostraram moderadas ou fortes produtoras de biofilme. Inicialmente, TSB + glicose (1%) foi distribuído em cada poço das placas de microdiluição. *Ucides cordatus* e a Quitosana Comercial foram adicionados nas concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; e 0,009 mg/mL e, em seguida, suspensões bacterianas (10^8 UFC/mL) dos isolados de bactérias Gram-negativas ATCCs *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e cepas de *E. coli* resistentes foram adicionadas. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. TSB sem inóculo foi usado como controle de esterilidade (controle negativo), TSB com inóculo foi usado como controle de crescimento microbiano (controle positivo). Após a incubação, a inibição da produção de biofilme foi quantificada usando o método do cristal violeta, e os resultados foram expressos como concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) e uma porcentagem de inibição. Experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição em dias diferentes.

4.7.2 Avaliação da erradicação do biofilme

Os ensaios utilizados para avaliar a erradicação do biofilme foram realizados com as mesmas cepas estudadas anteriormente. Inicialmente, o inóculo bacteriano dos isolados de bactérias Gram-negativas ATCCs *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e cepas de *E. coli* resistentes foram ajustados para uma densidade de 0,5 da escala de McFarland em TSB + glicose (1%) e distribuído em placas de microdiluição. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h para permitir a formação do biofilme. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e o meio foi repostado. *Ucides cordatus* e a Qitosana Comercial foram dispensados em microplacas em concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; e 0,009 mg/mL, que foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. TSB sem inóculo foi usado como controle de esterilidade (controle negativo) e TSB com inóculo foi usado como controle de crescimento microbiano (controle positivo). Após a incubação, a erradicação do biofilme foi quantificada usando o método do cristal violeta, e os resultados foram expressos como a concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC) e uma porcentagem de inibição. Experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

4.8 Propriedades dos revestimentos: capacidade molhante

4.8.1 Preparação dos Revestimentos de *Qitosana Ucides cordatus*

A metodologia utilizada é uma adaptação da que é descrita por Alcântara *et al.* (2019). As soluções de revestimento a base de quitosana (quitosana diluída em ácido acético) foram preparadas em diferentes concentrações de plastificante (Glicerol, Marca VETEC, 99,5%).

As soluções de revestimentos foram preparadas dissolvendo a quitosana em uma solução 1% (v/v) de ácido acético, adicionando em seguida o plastificante. As soluções previamente preparadas foram submetidas à agitação, utilizando um agitador magnético durante um período de 12 h em temperatura (± 28 °C). Os revestimentos de quitosana preparados diferiram no teor de plastificante conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Teor de quitosana e plastificante utilizado no preparado das soluções de revestimentos

Solução	% (m/v)	
	Quitosana	Glicerol

1 – <i>Q. Ucides cordatus</i>	2,0	0,0
2 – <i>Q. Ucides cordatus</i> ¹	2,0	0,1
3 – <i>Q. Ucides cordatus</i> ²	2,0	0,2
4 – Q. Comercial	2,0	0,0
5 – Q. Comercial ¹	2,0	0,1
6 – Q. Comercial ²	2,0	0,2

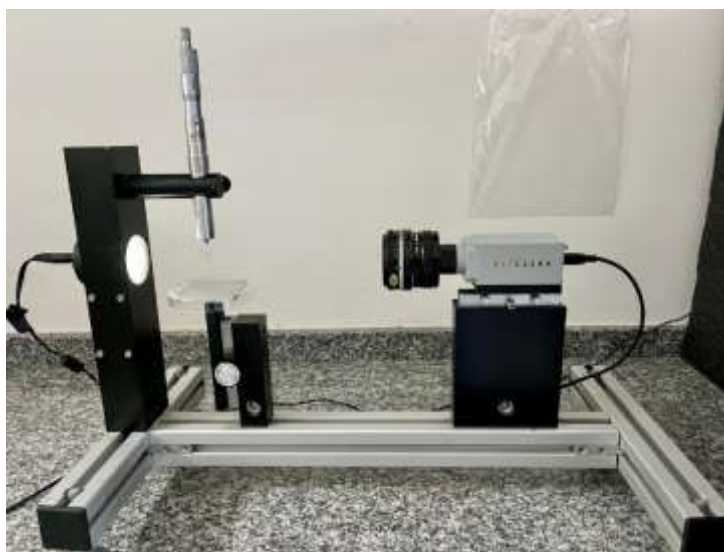
Fonte: Autor, 2025.

4.8.2 Medidas de ângulo de contato

Na determinação do ângulo de contato utilizou-se como amostras tiras de queijo coalho. Para cada amostra foram retiradas seções retangulares, os quais eram fixados a uma placa de Petri. Após a fixação das amostras, era realizada a gravação de vídeos do gotejamento de cada solução na superfície do queijo coalho.

O ângulo de contato das soluções de quitosana com a superfície do queijo foram determinados de acordo com ASTM D-5725-99, conforme descrito por Alcântara *et al.* (2022). Empregando medições usando o software GBX Instrumentation Specificque, combinado com uma câmera pixeLink Nikon (Figura 6). As amostras do revestimento foram retiradas com uma seringa de vidro de 1 mL (Fortuna® Optima) sendo o diâmetro da agulha (0,815 mm) determinado com um micrômetro digital 0-25 mm (Mitutoyo, Japan) com precisão de 0,001 mm.

Figura 4 - GBX Instrumentation Scientific.



Fonte: Autor, 2025.

A medição dos ângulos de contatos foram efetuadas no próprio equipamento GBX Instrumentation Scientific por intermédio do software Visiodrop deste equipamento, utilizando o método polinomial como forma de medição.

Compostos puros, como Formamida (Marca VETEC, 99,5%) PA e Tolueno (Toluol – Marca VETEC, 99,5%) e água ultrapura (*Milli-Q*) foram testados, onde foi pingada na superfície de queijos coalhos e o valor do ângulo de contato foi medido. As medições eram realizadas de modo a evitar alterações na superfície testada, ocasionadas pela desidratação do produto. Por isso, eram feitas o mais rapidamente possível, sendo este procedimento repetido dez vezes e calculadas a média para cada solução testada.

4.8.3 Tensão Crítica Superficial

Antes de avaliar a capacidade de molhabilidade dos revestimentos de quitosana em tiras de queijo coalho, é necessário determinar a tensão superficial com base no método desenvolvido por Zisman (1964). Esse método prático permite caracterizar a molhabilidade de superfícies sólidas por meio da relação entre o ângulo de contato de um líquido e sua tensão superficial.

O sistema baseia-se na observação de superfícies com tensão superficial inferior a 100 mN/m, classificadas como superfícies de baixa energia. Como a molhabilidade de um líquido sobre um sólido depende diretamente da energia superficial deste último, é essencial determinar essa propriedade nas tiras de queijo coalho.

Segundo Zisman, em superfícies de baixa energia ($\gamma < 100$ mN/m), o ângulo de contato de uma gota líquida sobre o sólido segue uma relação linear com a tensão superficial do líquido.

Para um líquido puro, quando suas interações polares (γ_{pL}) e dispersivas (γ_{dL}) são conhecidas, e o ângulo de contato (θ) entre o líquido e o sólido é determinado, essas interações podem ser descritas pelo trabalho reversível de adesão (W_a) conforme a equação de Zisman:

$$W_a = W_a^d + W_a^p \Leftrightarrow W_a = 2 \left(\sqrt{\gamma_d S \cdot \gamma_d L} + \sqrt{\gamma_p S \cdot \gamma_p L} \right)$$

Eq. (1)

A Equação 2 representa um rearranjo da Equação 1, expressando as contribuições polares (γ_{pS}) e dispersivas (γ_{dS}) da superfície sólida em estudo:

$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \times \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_d L}} = \frac{\sqrt{\gamma_p S} \times \sqrt{\gamma_p L}}{\sqrt{\gamma_d L}} + \sqrt{\gamma_d S} \quad \text{Eq. (2)}$$

Para a estimativa da energia superficial das tiras de queijo, foi calculado o ângulo de contato de três líquidos puros: formamida (VETEC, 95%), tolueno (VETEC, 99,5%) e água ultrapura. A partir das componentes polares e dispersivas desses líquidos, foi possível determinar as variáveis dependente (Equação 2) e independente (Equação 4), conforme a Equação 3:

$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \times \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_d L}} \quad \frac{\sqrt{\gamma_p L}}{\sqrt{\gamma_d L}} \quad \text{Eq. (3)} \quad \text{Eq. (4)}$$

A estimativa da tensão superficial crítica (γ_c) foi realizada por meio da extrapolação gráfica proposta por Zisman. A tensão superficial crítica é definida como:

$$\gamma_c = \lim_{\theta \rightarrow 0} \gamma_L \quad \text{Eq. (5)}$$

4.8.4 Capacidade Molhante

A capacidade molhante das soluções de revestimento de quitosana foi determinada por meio do coeficiente de espalhamento (W_s), do coeficiente de adesão (W_a) e do coeficiente de coesão (W_c). O ângulo de contato (θ) de uma gota de líquido sobre a superfície sólida é influenciado pelo equilíbrio mecânico da gota sob a ação de três tensões interfaciais: a tensão sólido-vapor (γ_{SV}), a tensão sólido-líquido (γ_{SL}) e a tensão líquido-vapor (γ_{LV}).

O coeficiente de espalhamento (W_s) foi calculado conforme a equação abaixo, podendo assumir apenas valores negativos ou zero:

$$WS = W_a - W_c = \gamma_{LV} - \gamma_L \quad \text{Eq.(6)}$$

Os coeficientes de adesão (W_a) e coesão (W_c) foram determinados pelas seguintes equações:

$$W_a = \gamma_{LV} + \gamma_{SV} - \gamma_{LV} \quad \text{Eq.(7)}$$

$$W_c = 2\gamma_{LV} \quad \text{Eq.(8)}$$

A solução que apresentou um valor de W_s mais próximo de zero, é a que representa em melhor condição como opção para o revestimento do queijo coalho.

4.9 Ensaio de Citotoxicidade dos extratos de *Ucides cordatus*

O efeito citotóxico dos extratos de *Ucides cordatus* e quitosana comercial, foram avaliados conforme orienta a norma ISO 10993-5 (ISSO, 2009). Seguindo o modelo experimental com adaptações de Pontes *et al.* (2024), que utilizou de células de fibroblastos do tecido isolado de camundongo (L929) e queratinócitos da pele humana (HaCaT).

Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 6×10^4 células/poço para fibroblastos e 10×10^4 células/poço para queratinócitos. As células foram mantidas a 5% de CO_2 e 37 °C por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi substituído pelos extratos de quitosanas (100 μL) e as células foram incubadas por 24 h ou 48 h. Como controle negativo (C-) utilizou-se células cultivadas em DMEM completo.

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico com MTT, que na presença de células metabolicamente viáveis é convertido em cristais de formazan, um composto de coloração roxa com densidade ótica em 570 nanômetro. Após 24/48h de tratamento foi retirado o conteúdo dos poços e feita a lavagem com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4.

Em seguida, foram adicionados 100 μL da solução de MTT 10% (o MTT foi diluído em DMEM completo). As placas foram mantidas sob condições de cultivo padrão

por 4h. Em seguida, o conteúdo dos poços foi descartado e foram adicionados 100 microlitros de DMSO ~98%/poço para dissolução dos cristais de formazan oriundos da redução do MTT por enzimas desidrogenases mitocondriais. Em seguida, as placas foram lidas em leitora de microplacas em comprimento de 570 nm (espectrofotômetro de microplacas SpectraMax i3x (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). A porcentagem de viabilidade celular (VC) foi calculado usando a equação Eq. (9).

$$\text{Células viáveis (\%)} = (F_{\text{amostra}} / F_{\text{Controle Negativo}}) \times 100 \quad \text{Eq. (9)}.$$

O percentual de viabilidade celular igual ou superior a 70% indicam não-citotoxicidade (ISO 10993-5). Logo, todas as amostras com percentual de viabilidade celular igual ou superior a 70% são consideradas não-citotóxicas. Percentual de viabilidade celular superior ao controle negativo (acima de 100%) indicam provável modulação positiva da proliferação celular. Significa que a amostra, além de não-tóxica, induziu maior proliferação celular em relação ao controle.

4.10 Análises de Estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicata com pelo menos 3 repetições independentes. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o aplicativo GraphPad Prism® versão 6.01 para Microsoft Windows. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), identificada diferença significativa, as médias foram submetidas ao teste de comparação múltipla de Dunnett, onde apenas um tratamento (controle negativo) serve de referência. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, são apresentados e discutidos os resultados obtidos, com ênfase no potencial antimicrobiano, antibiofilme e seu potencial revestimento evidenciado ao longo da pesquisa.

5.1 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de quitosana *in vitro*.

O resultado para a capacidade de inibição do crescimento das cepas padrões para os extratos de quitosana na concentração de 5 mg/mL (concentração mãe) por meio do teste de difusão direta em ágar. No presente estudo houve confirmação para a atividade antimicrobiana para os dois extratos analisados em relação às quatro cepas testadas. Resultado descrito na Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana em teste de difusão direta em ágar

Extratos	Quitosana <i>Ucides cordatus</i>		Quitosana Comercial	Controle Negativo
	Halo de inibição em mm			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	16	25	-
	2	18	20	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1	14	18	-
	2	14	18	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	12	20	-
	2	12	20	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	19	28	-
	2	20	28	-

Legenda: Para a atividade positiva foi calculada o halo em mm, símbolo (-) indica ausência de atividade. Fotos das análises disponíveis no ANEXO A. Fonte: Autor (2025).

Os halos de inibição encontrados nas quatro cepas ATCCs evidenciam a atividade antimicrobiana da quitosana *U. cordatus*, característica essa intrínseca ao polímero desacetilado dos exoesqueletos de crustáceos, insetos e fungos (MUTHU *et al.*, 2021). Essa condição é associada ao alto índice de contato desses organismos com os mais variados resíduos encontrados na natureza, o que pode vir a fazer parte da composição da estrutura do exoesqueleto, somadas a composição da quitina que predomina a constituição dessa estrutura, e no caso dos crustáceos é somada a desassociação ao carbonato de cálcio (HUANG *et al.*, 2020).

Poucos estudos analisaram o efeito antimicrobiano da quitosana isolada que é extraída da quitina dos animais pertencentes a ordem Decapoda, e esse número é ainda menor quando determinada a família, nesse caso, o caranguejo, já que comercialmente as quitosanas são vendidas sem a descrição em rótulo comercial quais crustáceos fazem parte da composição do produto. Entretanto, foi encontrado um estudo que avaliou a atividade antimicrobiana da lagosta *Cherax quadricarinatus*, que demonstrou resultados nos halos de inibição que variaram de 8,7 a 9,9 mm em *E. coli* e 9,4 a 10,16 mm em *Staphylococcus aureus* (RANI *et al.*, 2022). Demonstrando que mesmo isolada a ordem Decapoda e a quitosana extraída de sua carapaça tem potencial biotecnológico.

5.2 Determinação das CIMs e CBMs

Para determinar a concentração inibitória mínima, foi avaliado a atividade antibacteriana no ensaio de microdiluição em caldo nas cepas ATCCs de *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e 10 cepas de *E. coli* clinicamente resistentes, isoladas de queijo coalho. Em ambos os extratos as cepas demonstraram comportamentos de inibição diferente tanto na avaliação inibitória (CIM), quanto bactericida (CBM), mas os valores de CIM e CBM foram concentrações menores na quitosana comercial, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs) dos extratos de quitosanas contra bactérias gram-negativas

Extratos	Quitosana <i>Ucides cordatus</i> (mg/mL)		Quitosana Comercial (mg/mL)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,156	0,312	0,078	0,312
<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> ATCC 19606	0,078	0,156	0,039	0,078
<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	0,156	0,312	0,078	0,156
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	0,156	0,312	0,039	0,078

<i>E.coli</i> - AQ1	0,156	0,625	0,039	0,156
<i>E.coli</i> - AQ2	0,156	0,625	0,039	0,156
<i>E.coli</i> - AQ3	0,156	0,625	0,039	0,156
<i>E.coli</i> - AQ4	0,156	1,25	0,039	0,312
<i>E.coli</i> - AQ8	0,156	0,625	0,078	0,312
<i>E.coli</i> - CA4	0,156	1,25	0,078	0,625
<i>E.coli</i> - CA7	0,156	0,625	0,078	0,625
<i>E.coli</i> - CA8	0,156	1,25	0,078	0,312
<i>E.coli</i> - CA11	0,156	0,625	0,078	0,312
<i>E.coli</i> - CA14	0,156	0,625	0,078	0,312
Determinação da Concentração Modal	0,156	0,625	0,078	0,312

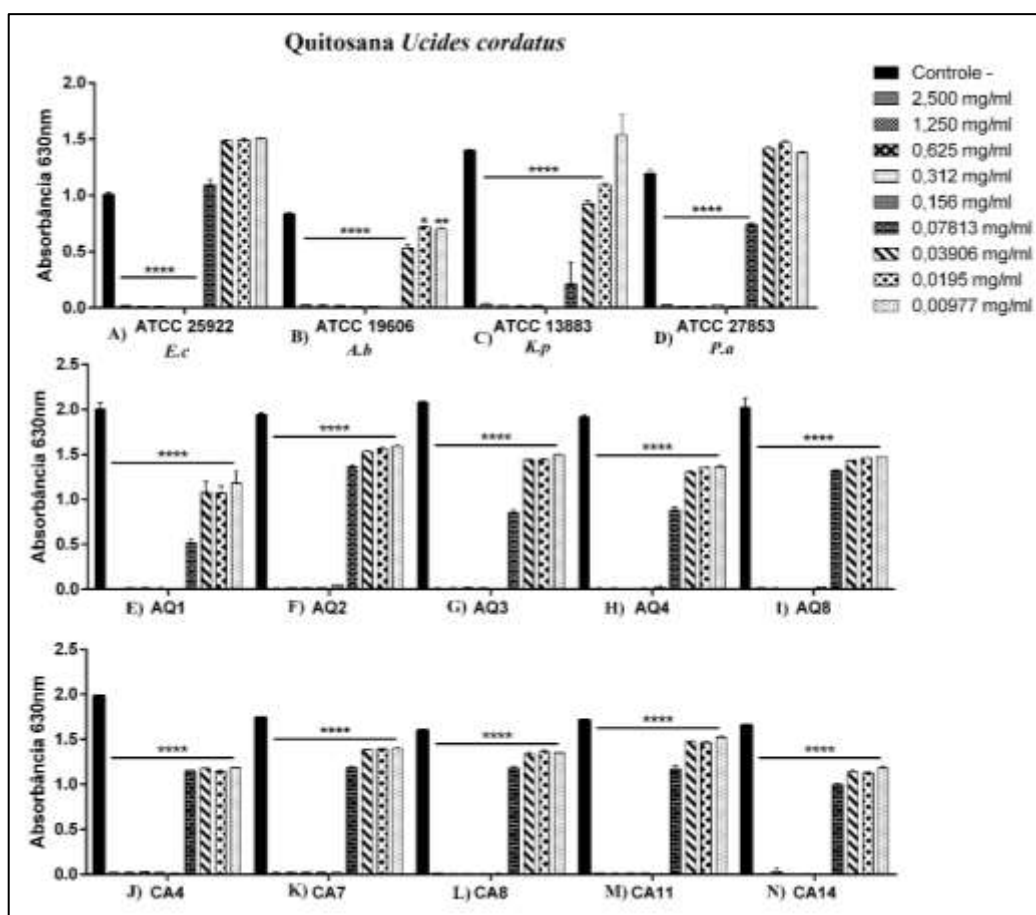
Legenda: Dados nas concentrações CIM e CBM são dados nas concentrações que obtiveram suas menores concentrações. Fotos das análises das (CBMs) disponíveis nos ANEXOS B e C. Fonte: Autor (2025).

Tratando-se da determinação dos valores de CIM e CBM achados nessa análise e realizando uma comparação aos estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana por quitosanas isoladas, e não considerando a ordem dos Dacopadas, é visto semelhança aos valores de concentração nos estudos de Keerthika *et al.* (2024), que isolou a quitosana de insetos adultos *Zophobas morio*, com grau de desacetilação em 96%, apresentando soluções bactericidas em 1,25; 2,5; 0,63 mg/mL em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. áureos* respectivamente, o estudo avaliou outros isolados microbianos. Já o estudo de Guarnieri e colaboradores (2022) também avaliou uma quitosana extraída de diferentes estágios de vida de insetos, e mostrou CIM de 0,15 mg/mL para *E. coli*, mas também relata concentrações mais baixa com atividade antimicrobiana abaixo do controle negativo em cepas Gram-negativas. Com tudo, nesse mesmo estudo, os autores relatam a observação da atividade antibacteriana da concentração do ácido diluente, o que não foi observado nesta pesquisa em questão, como podem ser visto nos resultados da tabela 7 e nas imagens do anexo A.

Além dos resultados que já foram relatados, foi observada diferenças estatísticas no comportamento dos extratos nas diferentes cepas analisadas. No extrato da *Ucides*

cordatus (figura 5), vemos inibição nas concentrações 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 mg/mL em todas as cepas, contudo, as concentrações 0,039; 0,019 e 0,009 nas cepas ATCCs *E.coli* e *P. aeruginosa* cresceram acima do controle negativo. No caso do extrato da quitosana comercial (figura 6), vemos uma inibição maior que se estende da concentração de 0,078 a 2,5 mg/mL, com crescimento acima do controle negativo nas duas menores concentrações, também nas cepas ATCCs *E.coli* e *P. aeruginosa*.

Figura 5 - Resultados do ensaio de microdiluição para CIM da quitosana *Ucides cordatus*

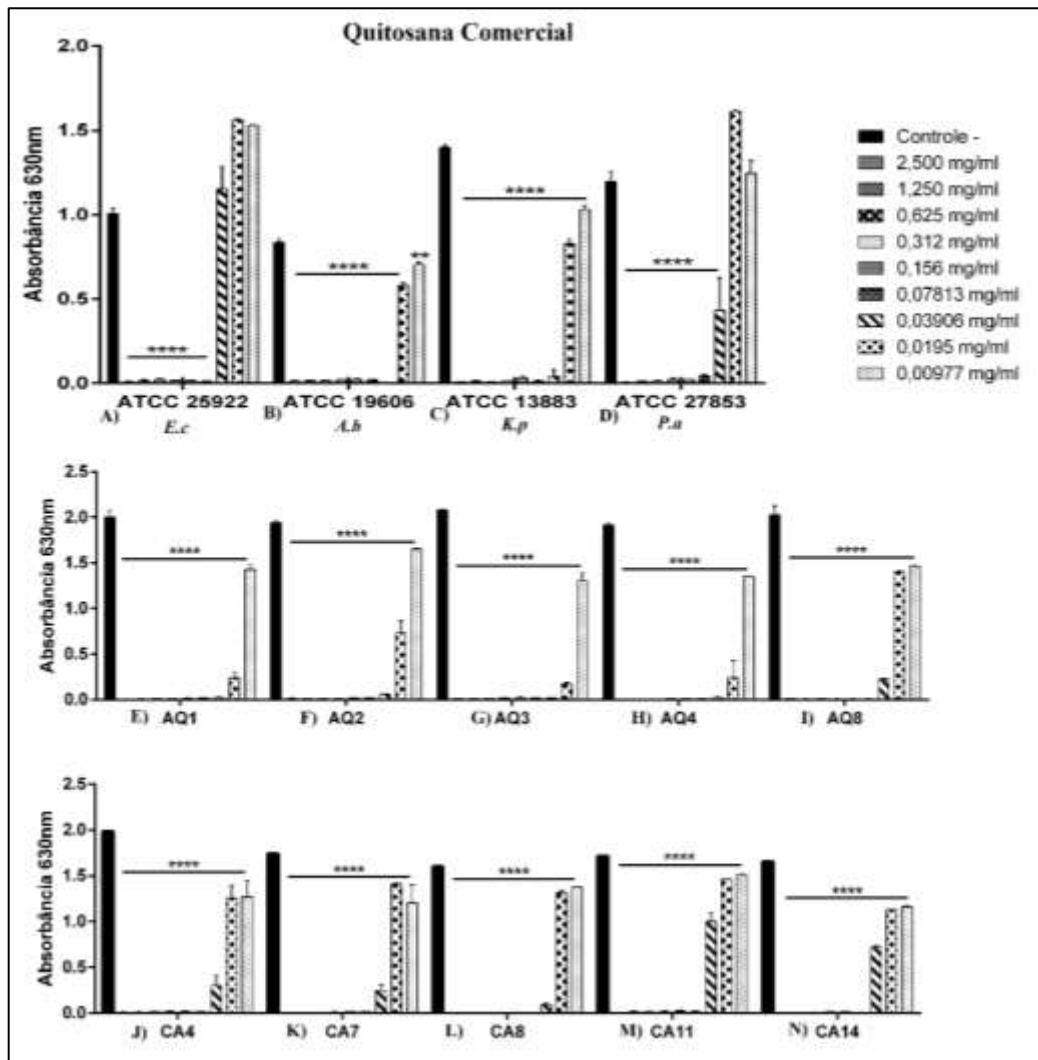


Legenda: Atividade antimicrobiana da quitosana *Ucides cordatus* comparada ao controle (CN) pelo ensaio de microdiluição em caldo testado em cepas padrões (A – ATCC 25922 *E. coli*; B – ATCC 19606 *A. baumannii*; C – ATCC 13883 *K. pneumoniae*; D – ATCC 27853 *P. aeruginosa*), e em isolados resistentes de *E. coli* (E, F, G, H, I, J, K, L, M e N). Os dados são representados como média \pm DP de três réplicas. Onde **** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle, ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle e * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. O teste de Dunnett (ANEXO D.1) foi realizado para comparações múltiplas onde apenas um tratamento (controle negativo) serve de referência. Fonte: Autor (2025).

Outra observação possível, são resultados parecidos quando comparado os diferentes extratos; tanto nas cepas padrões, quanto nas cepas resistentes de *E. coli*, que em

ambos os extratos mostraram absorvâncias menores que o controle negativo em todas as concentrações analisadas.

Figura 6 - Resultados do ensaio de microdiluição para CIM da quitosana comercial



Legenda: Atividade antimicrobiana da quitosana comercial comparada ao controle (CN) pelo ensaio de microdiluição em caldo testado em cepas padrões (A – ATCC 25922 *E. coli*; B – ATCC 19606 *A. baumannii*; C – ATCC 13883 *K. pneumoniae*; D – ATCC 27853 *P. aeruginosa*), e em isolados resistentes de *E. coli* (E, F, G, H, I, J, K, L, M e N). Os dados são representados como média \pm DP de três réplicas. Onde **** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle, ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle. O teste de Dunnett (ANEXO D.2) foi realizado para comparações múltiplas onde apenas um tratamento (controle negativo) serve de referência. Fonte: Autor (2025).

Os resultados encontrados para a atividade antimicrobiana da quitosana é relatada como sendo principalmente devido ao grau de desacetilação, peso molecular, pH, concentração do extrato e cepa bacteriana testada (HUANG *et al.*, 2020). E esses resultados

também podem estar associados, sobretudo, à natureza catiônica da quitosana, a qual permite sua interação eletrostática com os componentes celulares negativamente carregados. Essa interação promove alterações na permeabilidade da membrana celular, resultando em sua desintegração e consequente morte celular (REMESH *et al.*, 2025). Também há relatos científicos que apontam majoritariamente o uso de quitosana modificada com diferentes grupos funcionais, como heterocíclicos de seis membros, amido hidrolisado/quitosana, bases de Schiff de quitosana e derivados quaternários N-alquila e N,N-dialquila (WANG *et al.*, 2024b; SOUSA *et al.*, 2024), com o objetivo de aprimorar suas propriedades antibacterianas. Neste contexto, o presente estudo destaca-se por ser o primeiro a investigar o potencial antimicrobiano da quitosana isolada extraída de *Ucides cordatus*, utilizando tanto uma abordagem qualitativa, por meio do teste de difusão em ágar, quanto uma abordagem quantitativa, por meio do ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima.

E como destacado por Guarnieri *et al.* (2022), a realização dos testes de CIM confere maior robustez e precisão aos dados obtidos nos ensaios de difusão em ágar. No entanto, devido à diversidade de metodologias empregadas entre os estudos, e os poucos estudos que avaliaram espécies de Dacopadas isoladamente, os valores de CIM reportados na literatura são, por vezes, controversos. Em muitos casos, a determinação da CIM baseou-se apenas em avaliações visuais da turbidez dos poços contendo a amostra de quitosana e a cultura bacteriana correspondente, sem o suporte de análises quantitativas padronizadas. Essa variabilidade metodológica dificulta a comparação direta entre os resultados obtidos neste estudo.

5.3 Análise de Biofilme

A análise de biofilme foi avaliada em três fases; sendo a primeira a avaliação da capacidade das bactérias se associarem e produzirem biofilme, na sequência foi avaliada a concentração inibitória mínima de biofilme, e, por fim, a avaliação da atividade dos extratos sobre biofilmes pré-formados. Nessa análise foi somada mais um isolado que sabidamente é bom produtor de biofilme como controle de produção de biofilme, sendo usado o isolado PA01 (*P. aeruginosa*) (GRACE *et al.*, 2022).

Na avaliação da capacidade de produção de biofilme, os isolados foram analisados pelas médias resultantes das quintuplicada de casa isolado, respeitando a metodologia observada, sendo suas classificações apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Classificação Produção de Biofilme

Bactérias	Classificação Produção de Biofilme
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Fraca produção de Biofilme
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	Fraca produção de Biofilme
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Fraca produção de Biofilme
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Forte produção de Biofilme
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA01)	Forte produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - AQ1	Moderada produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - AQ2	Forte produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - AQ3	Moderada produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - AQ4	Moderada produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - AQ8	Fraca produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - CA4	Fraca produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - CA7	Fraca produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - CA8	Não produtora de Biofilme
<i>E. coli</i> - CA11	Fraca produção de Biofilme
<i>E. coli</i> - CA14	Fraca produção de Biofilme

Fonte: Autor (2025).

Apenas as amostras que apresentaram produção forte e moderada de biofilme foram analisadas quanto o efeito inibitório da concentração de biofilme e a avaliação de erradicação sobre biofilmes pré-formados. Os resultados são apresentados nas Figuras 7 e 8 (inibição), e 9 e 10 (erradicação).

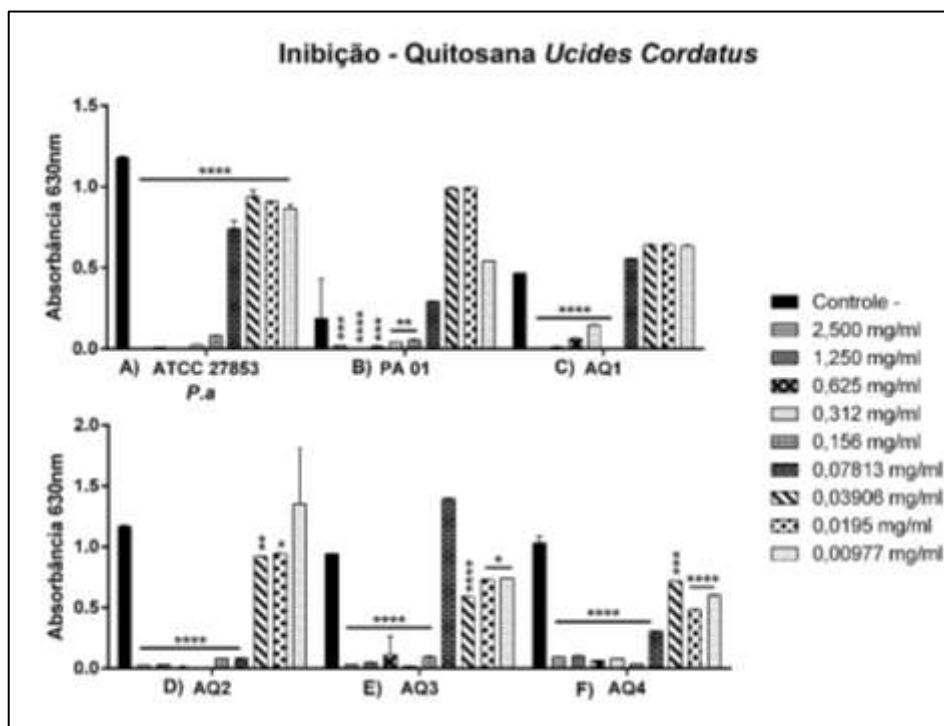
5.3.1 Avaliação da atividade das quitosanas sobre a formação de biofilmes

Quando observado as figuras 9 e 10 é possível visualizar os resultados encontrados nos isolados de *P. aeruginosa* ATCC 27853; *P. aeruginosa* (PA01); e *E. coli* (AQ1, AQ2, AQ3 e AQ4). Onde mostra que o comportamento dos isolados se mostraram parecidos com o encontrado na avaliação da concentração inibitória mínima, mesmo

havendo diferença no meio nutriente utilizado para o crescimento bacteriano, onde para as análises de biofilme o meio TSB foi suplementado com glicose, e usado na avaliação de inibição dos isolados.

Os efeitos da ação dos extratos de quitosanas sobre a formação dos biofilmes para as *P. aeruginosa* (ATCC 27853 e PA 01) quando avaliado o valor da CBM foi de 0,312 mg/mL, que mostra uma redução de aproximadamente 98% e 91% com o extrato de *U. cordatus*, respectivamente. Já a quitosana comercial onde o CBM foi de 0,078 mg/mL apresentou uma inibição de 92% para a ATCC e 80% para PA 01.

Figura 7 – Resultados do efeito inibitório dos extratos de quitosana *U. cordatus* na formação de biofilme

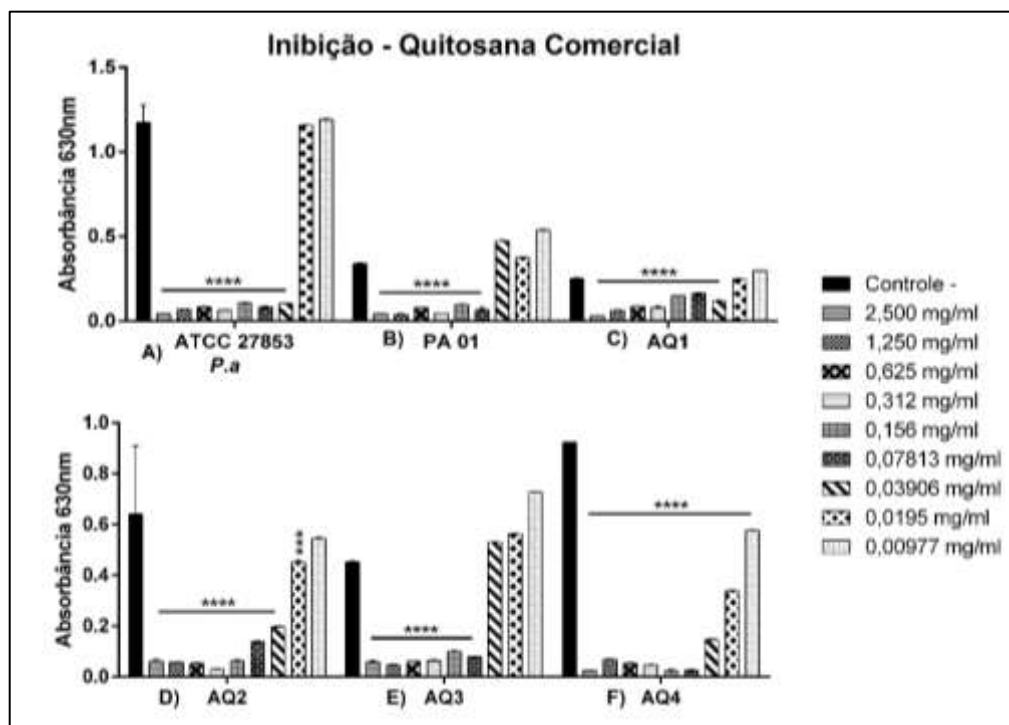


Legenda: Efeito inibitório dos extratos de quitosana *Ucides cordatus* na formação de biofilme comparado ao controle (CN) testado na cepa padrão (A) ATCC 27853 *P. aeruginosa*, (B) PA01 (*P. aeruginosa*) e em isolados resistentes de *E. coli* (C, D, E e F). Os dados são representados como média \pm DP de três réplicas. Onde **** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle, *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle, ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle e * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. O teste de Dunnett (ANEXO D. 3 e 4) foi realizado para comparações múltiplas onde apenas um tratamento (controle negativo) serve de referência. Fonte: Autor (2025).

Para os biofilmes das cepas de *E. coli* resistente, os valores de CBM de 0,625 mg/mL para AQ1, AQ2 e AQ3 de *U. cordatus*, e 1,25 mg/mL para o isolado AQ4, mostrou

resultados de inibição que variam entre 86 e 98% de inibição, sendo AQ4 89%. Nos gráficos C, D, E e F da figura 7, é possível notar semelhança no comportamento dos isolados quando comparado com o controle negativo, mostrando o mesmo grau de significância entre as concentrações mais altas.

Figura 8 – Resultados do efeito inibitório dos extratos de quitosana comercial na formação de biofilme



Legenda: Efeito inibitório dos extratos de quitosana comercial na formação de biofilme comparado ao controle (CN) testado na cepa padrão (A) ATCC 27853 *P. aeruginosa*, (B) PA01 (*P. aeruginosa*) e em isolados resistentes de *E. coli* (C, D, E e F). Os dados são representados como média \pm DP de três réplicas. Onde **** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle, *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle. O teste de Dunnett (ANEXO D. 5 e 6) foi realizado para comparações múltiplas onde apenas um tratamento (controle negativo) serve de referência. Fonte: Autor (2025).

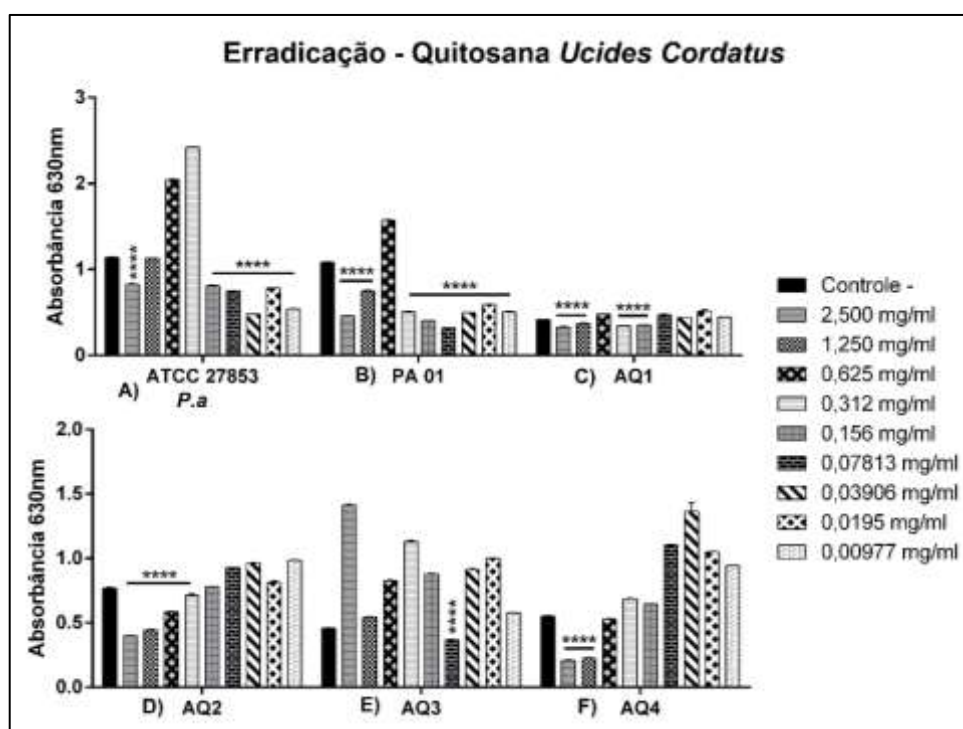
Já para os biofilmes das cepas de *E. coli* resistente, onde o extrato foi quitosana comercial, onde os valores de CBM foi de 0,156 mg/mL para AQ1, AQ2 e AQ3, e de 0,312 mg/mL para o isolado AQ4, mostrando resultados de inibição que variam entre 40 e 86%, sendo AQ4 94%. Nos gráficos C, D, E e F da figura 8, é visto que os isolados se comportam de forma semelhante quando comparado com o controle negativo, mostrando o mesmo grau de significância entre as concentrações mais altas. Foi observado também por meio dessa análise estatística, que algumas das menores concentrações de ambos os extratos mostraram

valores de absorvância maiores que o controle negativo, exceto os isolados ATCC 27853 e AQ4 para *U. cordatus*; e os isolados AQ2 e AQ4 para quitosana comercial.

5.3.2 Avaliação da atividade das quitosanas sobre biofilmes pré-formados

Em relação à atividade das quitosanas (*Ucides* e comercial) em biofilmes pré-formados para as diferentes cepas, é observado nas figuras 9 e 10, que em alguns casos não houve redução significativa, e que a grande maioria das concentrações favoreceram o crescimento acima do controle negativo. Também é notável que o crescimento observado, varia nas cepas e nas diferentes concentrações, não havendo uma padronização.

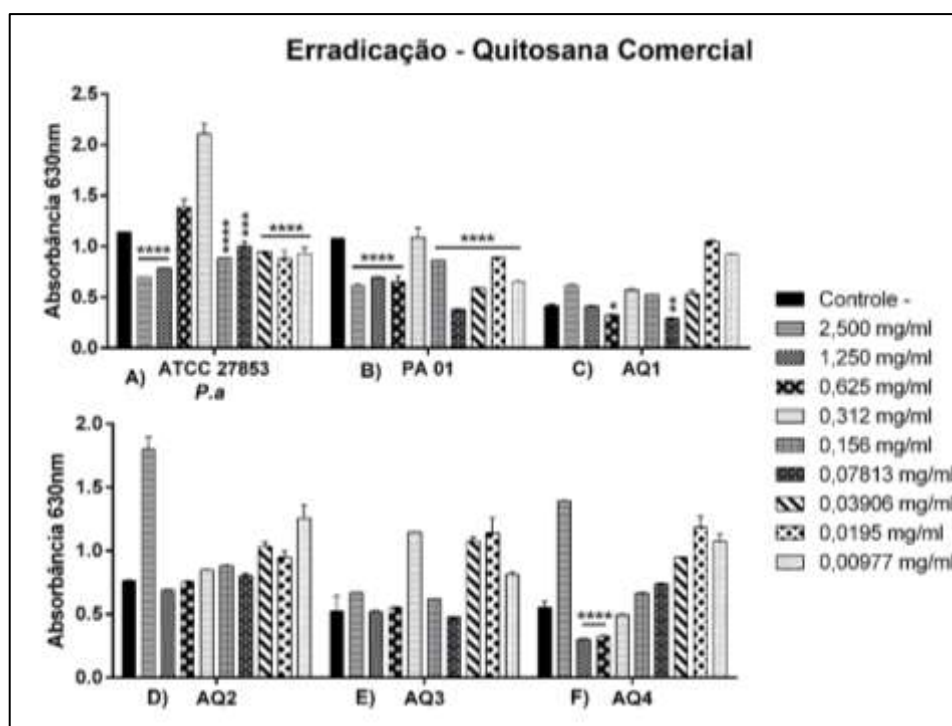
Figura 9 - Resultados do efeito dos extratos de quitosana *U. cordatus* sobre biofilmes pré-formados



Legenda: Ação dos extratos de quitosana *Ucides cordatus* sobre biofilmes pré-formados comparado ao controle (CN) testado na cepa padrão (A) ATCC 27853 *P. aeruginosa*, (B) PA01 (*P. aeruginosa*) e em isolados resistentes de *E. coli* (C, D, E e F). Os dados são representados como média \pm DP de três réplicas. Onde **** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle. O teste de Dunnett (ANEXO D. 7 e 8) foi realizado para comparações múltiplas onde apenas um tratamento (controle negativo) serve de referência. Fonte: Autor (2025).

Os valores percentuais da atividade de erradicação nas *P. aeruginosas* variaram entre 0,88% e 57% com o extrato da *Ucides* (figura 11, letra A e B), mas não apresentou uma padronização na escala das concentrações. Onde as concentrações como 0,625 e 0,312 mg/mL demonstrou o favorecimento do crescimento da ATCC e 0,625 mg/mL na PA 01. Enquanto no extrato comercial (figura 10, letra A e B) algo semelhante na ATCC, e na PA 01, se for considerado o intervalo de significância.

Figura 10 - Resultados do efeito dos extratos de quitosana comercial sobre biofilmes pré-formados



Legenda: Ação dos extratos de quitosana comercial sobre biofilmes pré-formados comparado ao controle (CN) testado na cepa padrão (A) ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, (B) PA01 (*P. aeruginosa*) e em isolados resistentes de *E. coli* (C, D, E e F). Os dados são representados como média \pm DP de três réplicas. Onde **** $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle, *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle, ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle e * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. O teste de Dunnett (ANEXO D. 9 e 10) foi realizado para comparações múltiplas onde apenas um tratamento (controle negativo) serve de referência. Fonte: Autor (2025).

Nos isolados de *E. coli* resistentes, o mesmo foi observado, entretanto, o isolado AQ2 (*ucides*) foi o isolado que mostrou uma curva de crescimento à medida que a concentração diminuía. Na quitosana comercial o mesmo isolado mostra algo parecido, com

diferença apenas na maior concentração, que mostra ser o maior crescimento de biofilme na escala da absorvância, até mais que os outros isolados sob o mesmo tratamento.

A formação de biofilmes por patógenos representa um dos principais mecanismos de resistência frente a agentes antimicrobianos. Esse processo envolve a adesão inicial das bactérias a superfícies bióticas ou abióticas, seguida pela fase de maturação estrutural e, por fim, pela dispersão das células, o que favorece a colonização de novos nichos e a persistência da infecção (REMESH *et al.*, 2025). Portanto, inibir a formação inicial de biofilme e eliminar o biofilme maduro pré-formado são estratégias essenciais para erradicar patógenos formadores de biofilme. As propriedades antibacteriana e antibiofilme de quitosana são influenciadas por múltiplos fatores estruturais. Naturalmente a quitosana é hidrofílica e por essa composição, pode apresentar aumento da alcalinidade e maior densidade de carga positiva, quando sofre protonação no grupo amina ($-\text{NH}_3^+$), o que dá à quitosana uma carga positiva significativa. E quanto maior o grau de desacetilação, mais grupos amino livres ela terá, resultando em uma maior densidade de carga positiva em meio ácido e maior alcalinidade relativa, pois mais locais estão disponíveis para aceitar prótons, e assim ter maior interação com as superfícies bacterianas (WANG *et al.*, 2024a). O estudo de Wang e colaboradores (2024b) realizou uma adição de substituintes (heterocíclicos) em uma quitosana comercial com grau de desacetilação em 89%, substituintes com uma eventual potencialização nas atividades antibacterianas e antibiofilme. Resultando taxas contra a atividade de remoção de biofilme que variou entre 45,8% e 70,2% contra *E. coli* e de 82,2% a 85,7% contra *S. aureus*. Para esse estudo a quitosana *U. cordatus* não passou por nenhuma modificação, e contra cepas Gram-negativas demonstrou atividades inibitórias de biofilme que variara entre as concentrações de 0,156 a 2,5 mg/mL.

Os crustáceos *Litopenaeus vannamei* (desacetilação 47,8%), *Parapenaeus longirostris* (desacetilação 66,7%) e *Portunus trituberculatus* (desacetilação 58,%) foram avaliados e apresentaram taxas de inibição e erradicação de biofilme em 63; 68 e 73% de inibição em *Salmonella typhimurium* e de 64; 68 e 61% em *S. aureus* respectivamente. Já para erradicação os mesmos extratos mostraram comportamento semelhantes, apenas com algumas poucas variações no percentual obtido (REMESH *et al.*, 2025). No entanto, a concentração mais efetiva demonstrada pelos autores no estudo, foi de 10 mg/mL, valor superior ao que foi observado no presente estudo. O que evidencia que quanto maior a quantidade da concentração, maior será o efeito inibitório e erradicante do biofilme pré-formado.

Quanto ao potencial favorecimento observado nesse estudo pela quitosana nas concentrações analisadas em biofilmes pré-formados não foi achado parecido na literatura quando comparado, mas foi observado que o biofilme pré-formado respondeu melhor a erradicação em concentrações de 2,5 e 5 mg/mL com taxas de 20% e maios ou menos 45% respectivamente no estudo de Wang e colaboradores (2024b), outras análises demonstrara resultados melhores, no entanto, a quitosana havia sido modificada com sais de amônio quaternário, o que permitia uma maior aumento na hidrofobicidade, evitando a associação entre os microrganismo e conseqüente formação da estrutura do biofilme. A hidrofobicidade está associada a uma interação hidrofóbica-hidrofóbica o que aumenta a atividade antibacteriana, como a quitosana sem modificação é considerada hidrofílica, em caso de menor densidade da massa utilizada no extrato, pode não apresentar inibição significativa e ocorre de servir como nutriente, tendo em vista se tratar de um polissacarídeo (WANG *et al.*, 2024a). No entanto, mais estudos são necessários para descobrir os mecanismos exatos envolvidos.

5.4 Capacidade molhante do revestimento em queijo coalho

Para a determinação da capacidade do revestimento de quitosana, foi empregado as análises de tensão crítica superficial e de molhabilidade, aplicados sobre a superfície de queijo coalho, comprado no mercado local de Fortaleza, Ceará.

5.4.1 Tensão Crítica Superficial

As variáveis independentes e dependentes (Equação 1) foram calculadas a partir dos valores dos ângulos de contato na superfície dos queijos coalhos de três compostos puros: água (D), formamida (E) e tolueno (F) (imagens do ângulo de contato dos compostos estão no ANEXO D). Os ângulos foram combinados com os valores de tensão superficial e seus componentes nos compostos puros, conforme relatado por Alcântara *et al.*, (2019); Vale *et al.*, (2020a) e Silva *et al.*, (2024), e estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Componentes da tensão superficial dos líquidos usados para caracterizar a superfície dos queijos coalhos

Componentes	γ_L (mN/m)	γ_L^d (mN/m)	γ_L^p (mN/m)
-------------	-------------------	---------------------	---------------------

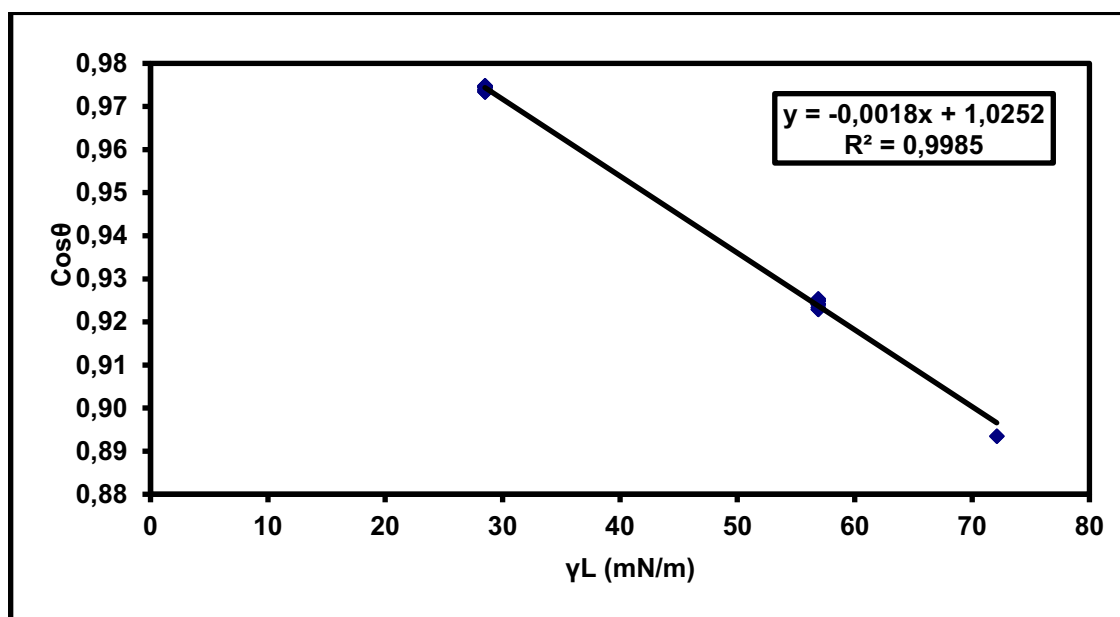
Água	72.10	19.90	52.20
Formamida	56.9	23.50	33.40
Tolueno	28.5	27.5	1.32

Fonte: Alcântara *et al.*, (2019); Vale *et al.*, (2020a) e Silva *et al.*, (2024).

A Equação 2, mostra a equação de regressão dos dados obtidos com os compostos puros na superfície das amostras. Essa equação foi utilizada para calcular os componentes da tensão superficial (polar e dispersivo) do queijo coalho.

O alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9985$) sugere uma forte correlação linear entre as variáveis dependentes e independentes. Para validar o modelo global e determinar a significância estatística dos parâmetros na Equação 2, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de $p < 0,05$ (Figura 11).

Figura 11 – Extrapolação do gráfico de Zisman para a superfície do queijo coalho (intervalo de confiança de 95%).



Fonte: Autor (2025).

Ao extrapolar o gráfico de Zisman (1964) para a superfície dos queijos coalhos (Figura 11), foi possível determinar um valor de tensão superficial crítica (CST) de -14,1399 e uma tensão superficial de 55,63 mN/m. Como o valor de CST é inferior a 100 mN/m, o método pode ser utilizado para estimar a tensão superficial crítica por meio da extrapolação do gráfico. O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9985$) indica que 99,85% da variação do

cos θ foi explicada pelo modelo. Isso demonstra uma forte associação linear entre o cosseno do ângulo de contato (θ) e a tensão superficial do líquido em teste.

O valor da tensão superficial do queijo coalho encontrado neste estudo (55,63 mN/m) apresenta um componente polar de 40,05 mN/m e um componente dispersivo de 15,58 mN/m. O valor mais alto do componente polar é devido principalmente ao alto conteúdo de água (Tabela 10) do músculo e à polaridade dos aminoácidos que compõem as proteínas (Santos *et al.*, 2011).

Tabela 10 - Composição Química do Queijo Coalho

Componente	Constituinte (%)
Umidade	57,58 ($\pm 1,04$)
Proteína	22,43 ($\pm 1,05$)
Gorduras	18,00 ($\pm 2,37$)
Carboidrato	0,98 ($\pm 0,01$)
Cinzas	2,96 ($\pm 0,15$)

Fonte: Santos *et al.*, (2011).

5.4.2 Molhabilidade dos Revestimentos de Quitosana no Queijo Coalho

A molhabilidade é um dos principais parâmetros analisados na avaliação da capacidade de uma solução em revestir uma superfície. As forças de adesão estabelecidas entre a solução e a superfície favorecem a dispersão do revestimento. O coeficiente de espalhamento (W_s) é determinado pela diferença entre as forças W_a e W_c , sendo o parâmetro utilizado para medir a eficiência da solução na cobertura da superfície. Os resultados das análises realizadas são descritas na tabela 11.

Tabela 11 - Média e Desvio Padrão dos valores de Adesão (W_a), Coesão (W_c) e Coeficiente de espalhamento (W_s) dos revestimentos de quitosana e glicerol nos queijos coalhos

Soluções	Quitosana + Glicerol % (m/v)	W_a (mN/m)	W_c (mN/m)	W_s (mN/m)
1 – <i>U. cordatus</i>	2,0 + 0,0	107,67 ($\pm 0,17$) ^a	121,86 ($\pm 1,07$) ^a	-14,19 ($\pm 0,17$) ^a
2 – <i>U. cordatus</i>	2,0 + 0,1	103,48 ($\pm 0,68$) ^{ab}	120,94 ($\pm 0,19$) ^{ab}	-17,46 ($\pm 0,68$) ^a
3 – <i>U. cordatus</i>	2,0 + 0,2	105,17 ($\pm 0,18$) ^{bc}	120,21 ($\pm 0,43$) ^{ab}	-15,04 ($\pm 0,18$) ^b
4 – Comercial	2,0 + 0,0	103,15 ($\pm 0,48$) ^c	113,96 ($\pm 2,38$) ^{bc}	-10,80 ($\pm 0,48$) ^{bc}

5 – Comercial	2,0 + 0,1	99,88 ($\pm 0,45$) ^d	110,48 ($\pm 1,36$) ^c	-10,60 ($\pm 0,45$) ^b
6 – Comercial	2,0 + 0,2	98,99 ($\pm 0,50$) ^d	111,40 ($\pm 2,18$) ^c	-12,41 ($\pm 0,50$) ^c

Legenda: Letras diferentes dentro dos grupos (colunas W_a , W_c e W_s) indicam diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$). Fonte: Aatoria (2025).

Onde o resultado é interpretado da seguinte maneira: Na coluna da análise do Coeficiente de Adesão (W_a), os resultados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas. Por exemplo, "5 - Comercial" e "6 - Comercial", letra D não diferem entre si, mas ambos são estatisticamente diferentes das letras A e B. Já na coluna do Coeficiente de Coesão (W_c), vemos que "1 - *U. cordatus*", letra A é estatisticamente diferente dos grupos "5 - Comercial" e "6 - Comercial", letra C, mas "2 - *U. cordatus*" e "3 - *U. cordatus*", letra AB, não diferem significativamente de "2 - Comercial", letra BC, pois compartilham a letra "B". E na coluna do Coeficiente de espalhamento (W_s), apresenta no grupo "4 - Comercial", letra BC, que não difere estatisticamente de "5 - Comercial", por possuir a letra B, mas é significativamente diferente de "1 - *U. cordatus*" e "2 - *U. cordatus*".

Em resumo, os resultados obtidos permite concluir de maneira geral que os grupos com a mesma letra não apresentam diferença estatística significativa. Grupos com letras diferentes são estatisticamente distintos. E que o uso do glicerol afeta significativamente os valores das variáveis, sendo que a quitosana de *U. cordatus* apresenta comportamento diferenciado em relação à quitosana comercial.

Sendo assim, a *U. cordatus* nas soluções 1 e 3 se mostraram a mais eficiente, sendo a 3 a sugestiva como a solução a ser aplicada no emprego do revestimento devido a sua composição ser associada ao glicerol. E nas soluções 4 e 5 (comercial), a mais adequada a ser considerada é a solução 5, pelo mesmo motivo, o emprego do glicerol. E quando comparada as soluções 3 e 5, foi observada que elas não apresentam diferença estatística significativa no coeficiente de espalhamento (W_s); portanto a quitosana *U. cordatus* se mostra tão eficiente quanto a quitosana comercial. O contato das soluções de quitosana com a superfície do queijo coalho foram registrados com o uso da câmera pixeLink Nikon, onde as imagens podem ser visualizadas no ANEXO D.

O ângulo de contato de superfícies de queijo regional Saloio, tradicional em Portugal, foi avaliado por essa técnica com finalidade de produzir um revestimento comestível, no entanto, a composição e a formulação do revestimento foi de Quitosana (não identificada sua origem de extração, mas comercial), galactomanana de *Gleditsia triacanthos* e ágar de *Glacilaria birdiae*, com diferentes formulações e adição de

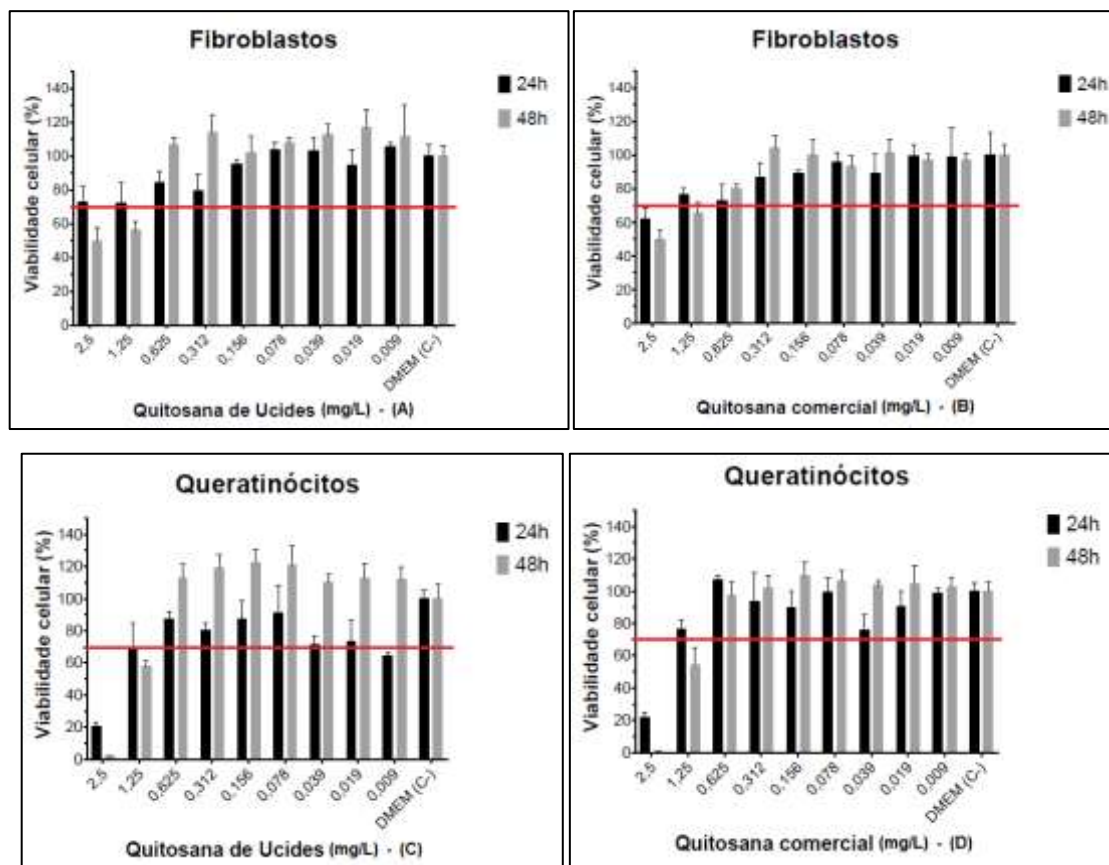
plastificante (glicerol e Tween 80) e óleo de milho. O resultado apresentou boa capacidade de revestimento pela técnica do ângulo de contato, e as taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ do queijo com revestimento mostraram uma diminuição das taxas de respiração. O queijo sem revestimento teve um extenso crescimento de mofo na superfície quando comparado ao queijo revestido. Os resultados mostram que esses revestimentos podem ser aplicados como uma alternativa aos revestimentos sintéticos (CERQUEIRA *et al.*, 2009). Diferente do estudo apresentado, essa pesquisa se limitou apenas a análise do ângulo de contato.

No entanto, revestimento de *U. cordatus* já foi descrito na literatura, sendo aplicado em outro alimento, sendo o filé de *Scomberomorus brasiliensis* (peixe), chegando à conclusão do seu potencial melhorando a qualidade físico-química e microbiológica do pescado, produzindo menor degradação de proteínas e formação de bases voláteis totais. No geral, as melhorias nas qualidades físico-químicas foram relacionadas à redução do número de bactérias presentes no filé de serra, devido ao revestimento com quitosana (VALE *et al.*, 2020a). E como demonstrado na tabela 3, a quitosana a mais de dez anos vem sendo utilizada como uma matéria prima na produção de biofilmes comestíveis, que agregam propriedades antimicrobianas e assim prolongam a vida útil de uma variada classe de alimentos, desde frutas, alimentos processados, ou alimentos cárneos.

5.5 Citotoxicidade *in vitro* dos Extratos de *Ucides cordatus* e Quitosana Comercial

O resultado para a análise de citotoxicidade dos extratos de ambas as quitosanas (*U. cordatus* e comercial), foi realizado por meio do teste de viabilidade celular, usando MTT, onde o percentual igual ou superior a 70% indicam não-citotoxicidade (ISO 10993-5). Logo, todas as amostras com percentual de viabilidade celular igual ou superior a 70% são consideradas não-citotóxicas. Percentual de viabilidade celular superior ao controle negativo (acima de 100%) indicam provável modulação positiva da proliferação celular. Significa que a amostra, além de não-tóxica, induziu maior proliferação celular em relação ao controle. Resultados descritos nas figuras 12 e 13.

Figura 12 – Análise de citotoxicidade *in vitro* para extratos de *Ucides cordatus* e Quitosana Comercial



Legenda: Análise de citotoxicidade *in vitro* para os extratos de *U. cordatus* (A) e Quitosana Comercial (B), incubados com fibroblastos; e *U. cordatus* (C) e Quitosana Comercial (D) incubados com queratinócitos. Observando as diferentes concentrações dos extratos, em diferentes intervalos de tempo, sendo: 24h (preto) e 48h (cinza). Fonte: Autor (2025).

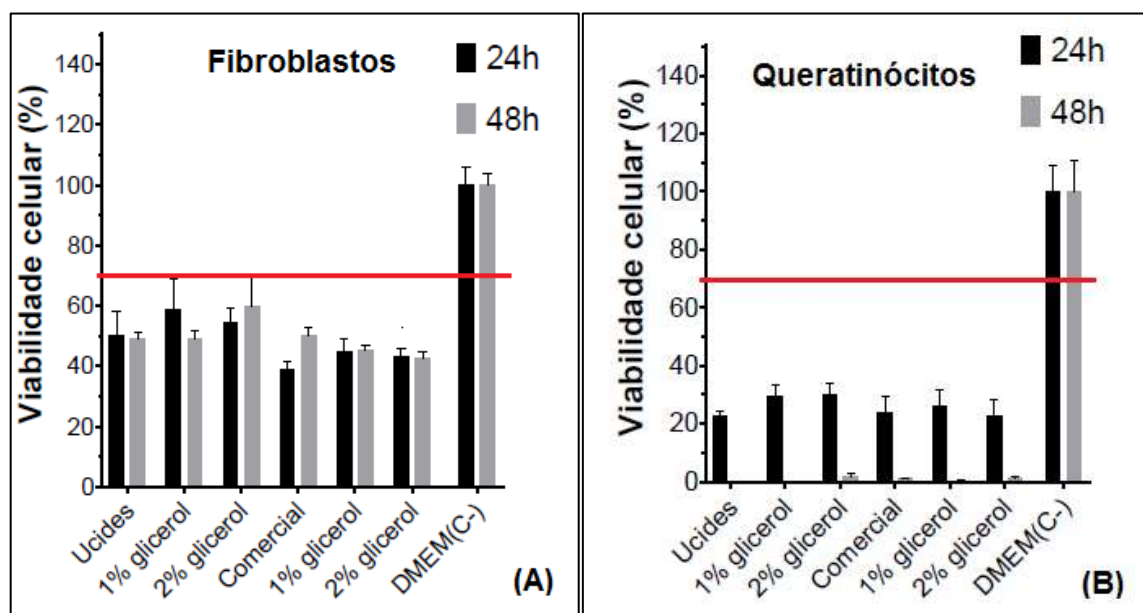
Foi observado que a quitosana de *U. cordatus* (A e C), demonstrou que a viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos tende a aumentar conforme a concentração da quitosana diminui. Onde em concentrações mais altas (2.5 e 1.25 mg/mL), há uma redução da proliferação das células abaixo de 70%, indicando citotoxicidade, sendo essa atividade toxica mais alta em células de queratinócitos na maior concentração. Já em concentrações menores (≤ 0.312 mg/mL), a viabilidade celular fica acima de 70%, indicando ausência de citotoxicidade. E algumas concentrações próximas a 0.078 – 0.009 mg/mL demonstram viabilidade acima de 100% após 48h, sugerindo um possível efeito proliferativo; registros do cultivo celular podem ser vistos no ANEXO E.

Quando comparadas os resultados, ambas as quitosanas apresentaram comportamento semelhante, sendo citotóxicas em concentrações mais altas (>1.25 mg/mL) e não-citotóxicas em concentrações menores. Apresentando um possível efeito proliferativo em algumas concentrações (entre 0.312 – 0.009 mg/mL) que mostraram viabilidade acima

de 100%, indicando que essas amostras podem estimular a proliferação celular. E nos diferentes tempos de exposição (24h vs. 48h), a viabilidade celular geralmente foi maior após 48h, indicando possível adaptação celular ou efeito positivo do material ao longo do tempo.

Outro ensaio de citotoxicidade foi realizado, só que agora das soluções aplicadas com finalidade de revestimento, avaliados pela técnica de molhabilidade. Os resultados podem ser visualizados na figura 13.

Figura 13 – Análise de citotoxicidade *in vitro* para as Soluções de *Ucides cordatus* e Quitosana Comercial que avaliou as propriedades de revestimento - capacidade de molhabilidade



Legenda: Análise de citotoxicidade *in vitro* para as soluções de *Ucides cordatus* e Quitosana Comercial em suas respectivas formulações. Sendo avaliadas em células de Fibroblasto (A) e Queratinócitos (B). Observando as diferentes concentrações dos extratos, em diferentes intervalos de tempo, sendo: 24h (preto) e 48h (cinza).
Fonte: Autor (2025).

Como pode ser visto na figura 14, imagens A e B, ambas as células sofreram efeitos tóxicos, diminuindo a proliferação das células. Porém mesmo tendo uma redução significativa abaixo de 70%, o desempenho das soluções se mostrou mais viável em células de fibroblastos, quando comparadas com as de queratinócitos, que apresentaram um crescimento de células entre 20-30% nas 24h, enquanto nas 48h as soluções se mostraram quase que 100% de toxicidade.

Em linhas gerais, a quitosana é uma molécula considerada atóxica, ou seja, não tóxica aos organismos vivos (HUANG *et al.*, 2020). Apesar do que foi achado nesse estudo, que nas maiores concentrações mostrou crescimento celular inferior a 70% sob as células avaliadas, considerando algumas condições, como o tempo de análise, e também a questão da associação ao polímero. As células de queratinócitos humanos, são células com maior grau de sensibilidade (DIAS *et al.*, 2023), e isso justifica sua ação de menor desenvolvimento, quando em contato com os extratos e soluções do revestimento. Estudos avaliaram a citotoxicidade da quitosana sobre células de Fibroblasto de Camundongos (L929), e encontraram resultados de não citotoxicidade para o polímero, no entanto, a concentração que foi induzida na avaliação foi de 0,5 mg/mL valor que assim como a *U. cordatus* que não apresentaram toxicidade (WANG *et al.*, 2024a). Outro estudo que também realizado pelo grupo de Wang (2024b) realizou avaliação citotóxica sobre extratos, no entanto as concentrações de MIC correspondente a 2,5 mg/mL não foi a mesma usada na avaliação citotóxica, mas sim de valores de 0,05; 0,1 e 0,5 mg/mL que correspondem um valor de M/V muito abaixo do que foi abordado nas análises que estão em discussão. Em ambos os achados é válido lembrar que a quitosana passou por modificações na sua estrutura química, diferente do objetivo traçado no presente estudo.

Por tanto, a avaliação da citotoxicidade da quitosana exige uma análise mais criteriosa de fatores técnicos que podem influenciar significativamente os resultados dos ensaios *in vitro*, especialmente a concentração do polímero, o tempo de exposição celular e o tipo de célula utilizado. Concentrações elevadas de quitosana tendem a aumentar a viscosidade do meio de cultura, dificultando a difusão de nutrientes e gases essenciais, o que pode comprometer a viabilidade celular de forma indireta, independentemente da toxicidade intrínseca do composto (DIAS *et al.*, 2023). Além disso, períodos prolongados de exposição à quitosana podem intensificar efeitos deletérios, enquanto tempos reduzidos de incubação, como demonstrado em estudos com aplicações específicas, podem atenuar esses impactos negativos. A escolha do tipo celular também é determinante, uma vez que diferentes linhagens, como células epiteliais humanas apresentam sensibilidades variadas, influenciando diretamente os desfechos dos testes. Assim, é imprescindível que esses parâmetros sejam cuidadosamente controlados e interpretados, a fim de evitar conclusões equivocadas quanto à biocompatibilidade e segurança da quitosana em aplicações biomédicas (NARVAEZ-FLORES *et al.*, 2021).

Todos os trabalhos discutidos, em combinação com os resultados apresentados aqui, mostram como polímeros de quitosana ainda necessitam de mais estudos, mesmo já

evidenciando uma resposta antimicrobianas eficazes, destacando sua aplicação na indústria alimentícia. Como próximos passos do trabalho, é essencial a identificação análises e padronizações metodológicas, e que possa abranger outros grupos de microrganismo, a fim de se ter uma melhor visão da diversidade antimicrobiana que pode ser desempenhada pela quitosana *U cordatus*.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que a quitosana extraída do exoesqueleto de *Ucides cordatus* apresenta atividade antimicrobiana significativa contra cepas Gram-negativas de isolados multirresistentes. Foi observado efeito inibitório e bactericida em todas as cepas analisadas, ainda que em concentrações distintas, com valores superiores aos da quitosana comercial utilizada como controle, mas com desempenho estatisticamente semelhante entre as concentrações próximas. Também foi observada ação antibiofilme eficaz, confirmando o potencial dessa biomolécula como agente de controle microbiano em contextos críticos de resistência.

A avaliação citotóxica demonstrou baixa toxicidade frente a fibroblastos e queratinócitos nas concentrações testadas, validando a biocompatibilidade dos extratos utilizados. A aplicação da quitosana em modelo de superfície alimentar reforçou sua viabilidade tecnológica como revestimento com propriedades antimicrobianas.

Dessa forma, conclui-se que a quitosana de *U. cordatus* é uma alternativa funcional e sustentável à quitosana convencional, com propriedades bioativas e perfil de segurança compatível com aplicações de interesse em biotecnologia de alimentos e saúde.

REFERÊNCIAS

- ABAVISANI, M. *et al.* Colistin resistance mechanisms in Gram-negative bacteria: a focus on *Escherichia coli*. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 76, n. 2, p. 1-13, fev. 2023. Oxford University Press (OUP).
- ABIA. Números do Setor – Faturamento. **Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação** [s.l.], 2019. Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2019.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2024.
- ABREU, F. O .M. da S. *et al.* Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Micro-Ondas. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, [s.l.], v. 23, n. 5, p. 630-635, 2013. FapUNIFESP (SciELO).
- AHMADI, E. *et al.* Molecular Detection and Antimicrobial Resistance Patterns of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Isolated from Bovine Subclinical Mastitis Milk Samples in Kurdistan Province of Iran. **Archives of Razi Institute**, [s.l.], maio 2020. Razi Vaccine & Serum Research Institute.
- AKDAŞCI, E. *et al.* Chitosan and Its Nanoparticles: a multifaceted approach to antibacterial applications. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 126, 16 jan. 2025. MDPI AG.
- ALCÂNTARA, L. *et al.* Evaluation of Surface Properties of Chitosan and Scale Gelatin Coatings on Shrimp Fillets (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [s.l.], v. 31, n. 10, p. 1115-1127, 19 out. 2022. Informa UK Limited.
- ALCÂNTARA, L.O. *et al.* Wettability of edible coatings on Nile tilapia fillets (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 247, p. 152-159, abr. 2019.
- ALENCAR, C. E. R. D. *et al.* Sexual Shape Dimorphism of the Mangrove Crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda, Ucididae) Accessed through Geometric Morphometric. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2014, p. 1-8, 2014. Hindawi Limited.
- ALI, A. *et al.* Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 124, n. 2, p. 620-626, jan. 2011. Elsevier BV.
- ARAÚJO, A. S. *et al.* Influence of the addition of gum arabic and xanthan gum in the preparation of sodium alginate microcapsules coated with chitosan hydrochloride on the survival of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 294, p. 139388, mar. 2025. Elsevier BV.
- ARAÚJO, J. P. A. *et al.* Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 72, n. 5, p. 1845-1860, set. 2020. FapUNIFESP (SciELO).

ARNON, H. *et al.* Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 87, p. 21-26, jan. 2014. Elsevier BV.

ASHRAFI, A. *et al.* Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 108, p. 444-454, mar. 2018. Elsevier BV.

BASSETTI, M. *et al.* Current and future perspectives in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 76, n. 4, p. 23-37, 1 nov. 2021. Oxford University Press (OUP).

BASSETTI, M. *et al.* Treatment of Bloodstream Infections Due to Gram-Negative Bacteria with Difficult-to-Treat Resistance. **Antibiotics**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. 632, 22 set. 2020. MDPI AG.

BHOWMIK, P. *et al.* Validated in Silico Model for Biofilm Formation in *Escherichia coli*. **Acs Synthetic Biology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 713-731, 13 jan. 2022. American Chemical Society (ACS).

BONA, E. A. M. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 81, n. 3, p. 218-225, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n° 73, de 23 de dezembro de 2019 - Produtos Lácteos**: Regulamento para enquadramento de produtores fornecedores de leite para fabricação de produtos lácteos artesanais. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2019b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte-selo-queijo-artesanal/legislacao/INSTRUONORMATIVAN73DE23DEDEZEMBRODE2019INSTRUONORMATIVAN73DE23DEDEZEMBRODE2019DOUImprensaNacional.pdf/view>. Acesso em: 28 fev. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Valor Bruto da Produção Agropecuária**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2019a.

BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Este documento, exceto onde indicado, é baseado nos pontos de corte da versão 15.0, 2024 do EUCAST(www.eucast.org) - **Versão BrCAST** válida a partir de 01-02-2024.

BREIJYEH, Z. *et al.* Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**, [s.l.], v. 25, n. 6, p. 1340, 16 mar. 2020. MDPI AG.

CAMPOS, L. A. A. *et al.* Ceftazidime/Tobramycin Co-Loaded Chitosan-Coated Zein Nanoparticles against Antibiotic-Resistant and Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 320, 29 fev. 2024. MDPI AG.

CASTILHO-WESTPHAL, G. G. *et al.* The state of the art of the research on the mangrove land crab, *Ucides cordatus*. **Archives of Veterinary Science**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 151-166, 4 dez. 2008. Universidade Federal do Parana.

CERQUEIRA, M. A. *et al.* Functional Polysaccharides as Edible Coatings for Cheese. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 4, p. 1456-1462, 25 fev. 2009. American Chemical Society (ACS).

CHICEA, D.; NICOLAE-MARANCIUC, A. A Review of Chitosan-Based Materials for Biomedical, Food, and Water Treatment Applications. **Materials**, [s.l.], v. 17, n. 23, p. 5770, 25 nov. 2024. MDPI AG.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31st ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-104-8 [Print]; ISBN 978-1-68440-105-8 [Electronic]). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, USA, 2021.

CORONA, A. *et al.* Antibiotic Therapy Strategies for Treating Gram-Negative Severe Infections in the Critically Ill: a narrative review. **Antibiotics**, [s.l.], v. 12, n. 8, p. 1262, 31 jul. 2023. MDPI AG.

CRUZ-ROMERO, M. C. *et al.* Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. **Food Control**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 393-397, dez. 2013. Elsevier BV.

CUI, H. *et al.* Edible film incorporated with chitosan and Artemisia annua oil nanoliposomes for inactivation of Escherichia coli O157: h7 on cherry tomato. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 52, n. 3, p. 687-698, 29 dez. 2016. Oxford University Press (OUP).

DETTORI, S. *et al.* Severe infections caused by difficult-to-treat Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Critical Care**, [s.l.], v. 29, n. 5, p. 438-445, 31 jul. 2023. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

DIAS, C. *et al.* Comparative Evaluation of the In Vitro Cytotoxicity of a Series of Chitosans and Chitoooligosaccharides Water-Soluble at Physiological pH. **Polymers**, [s.l.], v. 15, n. 18, p. 3679, 6 set. 2023. MDPI AG.

DOMÍNGUEZ, A. V. *et al.* Antibacterial Activity of Colloidal Silver against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Antibiotics**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 36, 19 jan. 2020. MDPI AG.

EL-HACK, M. E. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 164, p. 2726-2744, dez. 2020. Elsevier BV.

FERGESTAD, M. *et al.* Antimicrobial resistance and virulence characteristics in 3 collections of *staphylococci* from bovine milk samples. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 104, n. 9, p. 10250-10267, set. 2021. American Dairy Science Association.

GAMA, G. P. *et al.* Antimicrobial activity and chemical profile of wood vinegar from eucalyptus (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* - clone I144) and bamboo (*Bambusa vulgaris*). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 39, n. 7, p. 186, 8 maio 2023. Springer Science and Business Media LLC.

GHADERI-GHAHFAROKHI, M. *et al.* Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 102, p. 19-28, set. 2017. Elsevier BV.

GÎJIU, Cristiana Luminița *et al.* Crabs Marine Waste—A Valuable Source of Chitosan: tuning chitosan properties by chitin extraction optimization. **Polymers**, [s.l.], v. 14, n. 21, p. 4492, 24 out. 2022. MDPI AG.

GRACE, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: a genomic, phenotypic, and therapeutic review. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 13, p. 0, 13 out. 2022.

GU, H. *et al.* Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* Cells during Early-Stage Biofilm Formation. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 201, n. 18, 15 set. 2019. American Society for Microbiology.

GUARNIERI, A. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 8040, 16 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC.

HASSAN, L. *et al.* The Effectiveness of Chitosan Extraction from Crustaceans' Shells as a natural coagulant. **Journal Of Physics: Conference Series**, [s.l.], v. 2266, n. 1, p. 012002, 1 maio 2022. IOP Publishing.

HASSANI, S. *et al.* High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic foodborne bacteria isolated from bovine milk. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 12, n. 1, 9 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

HONG, K. *et al.* Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 144, p. 172-178, set. 2012. Elsevier BV.

HUANG, L. *et al.* Preparation and characterization of chitosan from crab shell (*Portunus trituberculatus*) by NaOH/urea solution freeze-thaw pretreatment procedure. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 147, p. 931-936, mar. 2020. Elsevier BV.

IBGE. **Censo agropecuário 2017: resultados definitivos**. 2017.

IMPEY, R. E. *et al.* Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. 623, 19 set. 2020. MDPI AG.

- KAMIMURA, B. A. *et al.* Brazilian Artisanal Cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 21 ago. 2019. Wiley.
- KARAKONSTANTIS, S. *et al.* Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], p. 271-282, 5 out. 2019. Oxford University Press (OUP).
- KEERTHIKA, K. *et al.* Extraction, characterization and evaluation of antimicrobial activity of chitosan from adult *Zophobas morio* (Fabricius, 1776) (Coleoptera: tenebrionidae). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 279, p. 135188, nov. 2024. Elsevier BV.
- KHAYROVA, A. *et al.* Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of Low Molecular Weight Chitosan Extracted from *Hermetia illucens* Relative to Crab Chitosan. **Molecules**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 577, 17 jan. 2022. MDPI AG.
- LA, D. D. *et al.* Effects of antibacterial ZnO nanoparticles on the performance of a chitosan/gum arabic edible coating for post-harvest banana preservation. **Progress In Organic Coatings**, [s.l.], v. 151, p. 106057, fev. 2021. Elsevier BV.
- LIN, X. *et al.* Antimicrobial Application of Chitosan Derivatives and their Nanocomposites. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 30, n. 15, p. 1736-1755, abr. 2023. Bentham Science Publishers Ltd.
- LIU, Xinhong. Advancements in Chitosan and Its Derivatives for Enhanced Wound Healing. **Journal Of Clinical and Nursing Research**, [s.l.], v. 8, n. 12, p. 304-309, 7 jan. 2025. Bio-Byword Scientific Publishing, Pty. Ltd..
- MACEDO, J. *et al.* ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE QUITOSANAS E SEUS DERIVADOS: influência das características estruturais. **Química Nova**, [s.l.], p. 690-704, 2022. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- MAHDAVI, V. *et al.* Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. **Food Science & Nutrition**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 269-279, dez. 2017. Wiley.
- MANCUSO, G. *et al.* The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: ⚔️ attack on titan ⚔️. **Microorganisms**, [s.l.], v. 11, n. 8, p. 1912, 27 jul. 2023. MDPI AG.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Queijos artesanais brasileiros**. Brasília, DF - 2021.
- MATICA, M. A. *et al.* Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: antimicrobial properties and mode of action. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 23, p. 5889, 24 nov. 2019. MDPI AG.

- MAWAZI, S. M. *et al.* Recent Applications of Chitosan and Its Derivatives in Antibacterial, Anticancer, Wound Healing, and Tissue Engineering Fields. **Polymers**, [s.l.], v. 16, n. 10, p. 1351, 10 maio 2024. MDPI AG.
- MEINDRAWAN, B. *et al.* Glucomannan–Beeswax–Chitosan Antimicrobial Edible Coating to Maintain the Storage Quality of Salak Fruit (*Salacca zalacca*). **Macromolecular Symposia**, [s.l.], v. 391, n. 1, p. 1900164, jun. 2020. Wiley.
- MOHAN, C. O. *et al.* Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 167-174, jan. 2012. Elsevier BV.
- MOREIRA, M. d. R. *et al.* Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: assessment on carrot, cheese, and salami. **Journal Of Food Science**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 54-63, 29 nov. 2010. Wiley.
- MUTHU, Manikandan *et al.* Crustacean Waste-Derived Chitosan: antioxidant properties and future perspective. **Antioxidants**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 228, 3 fev. 2021. MDPI AG.
- NAGHAVI, M. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. **The Lancet**, [s.l.], v. 404, n. 10459, p. 1199-1226, set. 2024. Elsevier BV.
- NARVAEZ-FLORES, J. *et al.* Cytotoxic and anti-inflammatory effects of chitosan and hemostatic gelatin in oral cell culture. **Acta Odontológica Latinoamericana**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 98-103, set. 2021. Sociedad Argentina de Investigacion Odontologica.
- NOWZARI, F. *et al.* Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 141, n. 3, p. 1667-1672, dez. 2013. Elsevier BV.
- PABAST, M. *et al.* Effects of chitosan coatings incorporating with free or nano-encapsulated Satureja plant essential oil on quality characteristics of lamb meat. **Food Control**, [s.l.], v. 91, p. 185-192, set. 2018. Elsevier BV.
- PACZKOWSKA-WALENDOWSKA, M. *et al.* Chitosan as a Functional Carrier for the Local Delivery Anti-Inflammatory Systems Containing *Scutellariae baicalensis radix* Extract. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 14, n. 10, p. 2148, 10 out. 2022. MDPI AG.
- PADRÃO INTERNACIONAL, **ISO 10993-5**. Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos — Parte 5: Testes de Citotoxicidade In Vitro (2009)
- PONTES, E. R. *et al.* Development of silanized bacterial cellulose aerogels for the incorporation of natural oils with healing properties: copaiba (*copaifera officinalis*), bourbon geranium (*pelargonium* x ssp.) essential oils and buriti (*mauritia flexuosa*) vegetable oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 269, p. 132266, jun. 2024. Elsevier BV.

- PUROHIT, S. D. *et al.* Fibras eletrofiadas à base de quitosana para engenharia de tecido ósseo: avanços recentes em pesquisa. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 281, p. 136530, nov. 2024. Elsevier BV.
- QIAO, Y. *et al.* Ação antibacteriana assistida por microondas de nanopartículas de Garcinia em bactérias Gram-negativas. **Nat Commun** **13**, 2461 (2022).
- QIN, Y. *et al.* Antimicrobial Chitosan Conjugates: current synthetic strategies and potential applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 499, 13 jan. 2020. MDPI AG.
- QUESADA, J. *et al.* Antimicrobial Active Packaging including Chitosan Films with Thymus vulgaris L. Essential Oil for Ready-to-Eat Meat. **Foods**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 57, 29 ago. 2016. MDPI AG.
- RANI, Z. *et al.* Antibacterial activity of freshwater lobster (*Cherax quadricarinatus*) shell chitosan gel preparation against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], p. 146, 2022. Open Science Publishers LLP.
- REMESH, S. D. *et al.* Antimicrobial and anti-biofilm activity of crustacean-derived chitosan against *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 68, p. 106697, jun. 2025. Elsevier BV.
- ROZMAN, N. A. S. *et al.* Potential Antimicrobial Applications of Chitosan Nanoparticles (ChNP). **Journal Of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 7, p. 1009-1013, 28 jul. 2019. Korean Society for Microbiology and Biotechnology.
- SALGADO-CRUZ, M. L. P. *et al.* Chitosan as a Coating for Biocontrol in Postharvest Products: a bibliometric review. **Membranes**, [s.l.], v. 11, n. 6, p. 421, 31 maio 2021. MDPI AG.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. *et al.* Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 57-63, abr. 2011. Elsevier BV.
- SANDS, K. *et al.* Caracterização de bactérias Gram-negativas resistentes a antimicrobianos que causam sepsé neonatal em sete países de baixa e média renda. **Nat Microbiol** **6**, 512–523 (2021).
- SANTOS, B. M. *et al.* Quality and acceptance of goat milk coalho cheese with inclusion of cow milk. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2011; 70(3):302-10
- SANTURIO, M. J. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.
- SARAVANAN, A. *et al.* A review on extraction of polysaccharides from crustacean wastes and their environmental applications. **Environmental Research**, [s.l.], v. 221, p. 115306, mar. 2023. Elsevier BV.

SEREJO, C. *et al.* Capítulo 8. Filo Arthropoda. Subfilo Crustácea. In: LAVRADO, H.P. & IGNACIO, B.L. (Eds.). **Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira**. Rio de Janeiro: Museu Nacional (2006), p. 299-337 (Série Livros n. 18). Disponível em <https://decapoda.nhm.org/pdfs/30091/30091.pdf>. Acesso em: 01 de jan. 2025.

SERRANO-LEÓN, J. S. *et al.* Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. **Food Research International**, [s.l.], v. 108, p. 93-100, jun. 2018. Elsevier BV.

SILVA, J. *et al.* The wettability of carrageenan-based edible coatings on chicken breasts. **Revista Ciência Agrônômica**, [s.l.], v. 55, 2024. GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd.

SONG, Y. J. *et al.* Anti-Biofilm Activity of Grapefruit Seed Extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal Of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 8, p. 1177-1183, 28 ago. 2019. Korean Society for Microbiology and Biotechnology.

SOUSA, J. M. *et al.* Study of the antibacterial and cytotoxic activity of chitosan and its derivatives chemically modified with phthalic anhydride and ethylenediamine. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 263, p. 130292, abr. 2024. Elsevier BV.

SOUZA, V. G. L. *et al.* Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: from in vitro assays to application in fresh poultry meat. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 89, p. 241-252, abr. 2019. Elsevier BV.

SOUZA, Z. N. *et al.* Antibiotic resistance profiles on pathogenic bacteria in the Brazilian environments. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 205, n. 5, p. 1-1, 12 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC.

STEGLINSKA, A. *et al.* Chitosan as an Antimicrobial, Anti-Insect, and Growth-Promoting Agent for Potato (*Solanum tuberosum L.*) Plants. **Molecules**, [s.l.], v. 29, n. 14, p. 3313, 13 jul. 2024. MDPI AG.

SYED, Y. Y. *et al.* Cefiderocol: a review in serious gram-negative bacterial infections. **Drugs**, [s.l.], v. 81, n. 13, p. 1559-1571, 24 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

TARTOR, Y. H. *et al.* Virulence Determinants and Plasmid-Mediated Colistin Resistance mcr Genes in Gram-Negative Bacteria Isolated From Bovine Milk. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, [s.l.], v. 11, p. 1-1, 23 nov. 2021. Frontiers Media SA.

VALE, D. A. *et al.* Chitosan-Based Edible Films Produced from Crab-Uçá (*Ucides cordatus*) Waste: physicochemical, mechanical and antimicrobial properties. **Journal Of Polymers and The Environment**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 694-706, 8 out. 2020b. Springer Science and Business Media LLC.

VALE, D. A. *et al.* Determining the wetting capacity of the chitosan coatings from *Ucides cordatus* and evaluating the shelf-life quality of *Scomberomorus brasiliensis* fillets. **Food Control**, [s.l.], v. 116, p. 107329, out. 2020a. Elsevier BV.

VENA, A. *et al.* Clinical Experience with Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Infections due to Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria Other than Carbapenem-Resistant Enterobacterales. **Antibiotics**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 71, 9 fev. 2020. MDPI AG.

VIEIRA, J. M. *et al.* Effect of chitosan– Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 116, p. 88-97, jun. 2016. Elsevier BV.

VU, K. D. *et al.* Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, [s.l.], v. 44, n. 1, p. 198-203, jan. 2011. Elsevier BV.

WANG, L. *et al.* Effect of the structure of chitosan quaternary ammonium salts with different spacer groups on antibacterial and antibiofilm activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 276, p. 133777, set. 2024b. Elsevier BV.

WANG, L. *et al.* Evaluating the antibacterial and antibiofilm activities of chitosan derivatives containing six-membered heterocyclics against *E. coli* and *S. aureus*. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 242, p. 114084, out. 2024a. Elsevier BV.

WANG, S. Y. *et al.* Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x aranassa* Duch.). **Lwt - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 52, n. 2, p. 71-79, jul. 2013. Elsevier BV.

WANG, Y. *et al.* Physical Characterization and Pork Packaging Application of Chitosan Films Incorporated with Combined Essential Oils of Cinnamon and Ginger. **Food And Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 503-511, 28 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

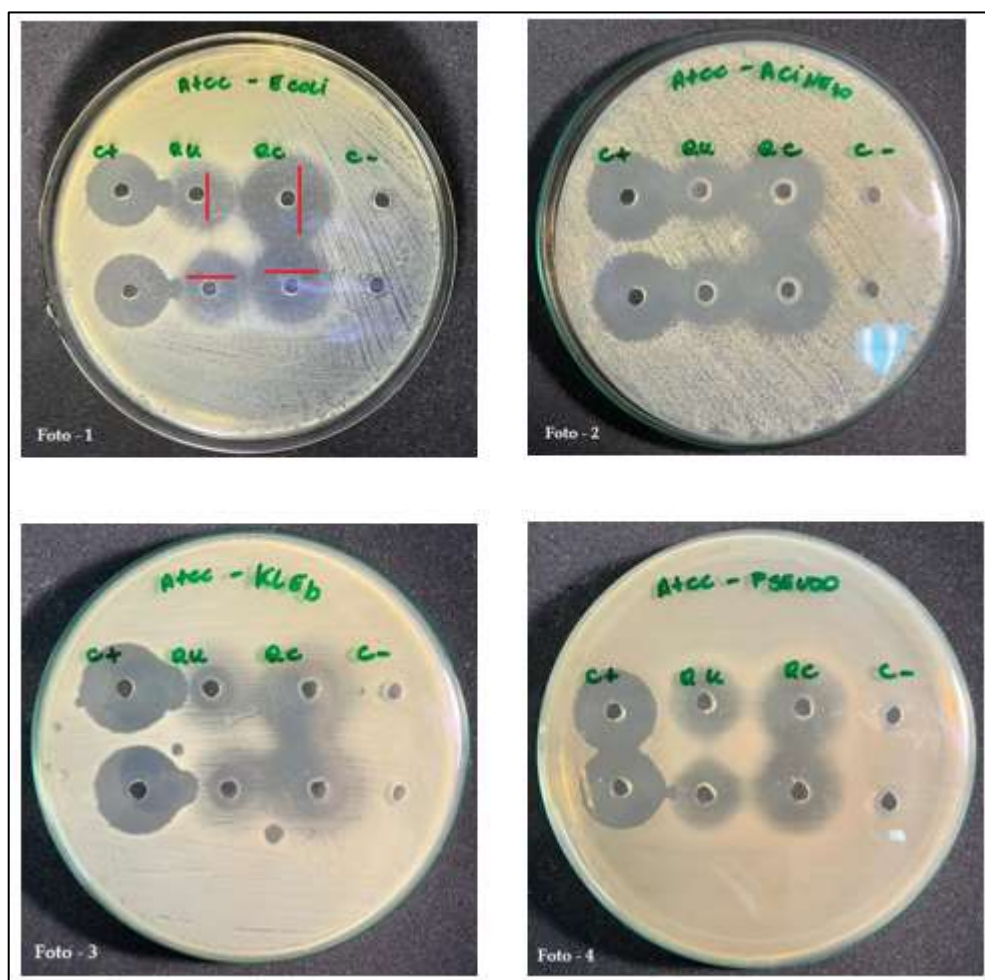
YAN, D. *et al.* Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. **Molecules**, [s.l.], v. 26, n. 23, p. 7136, 25 nov. 2021. MDPI AG.

YANG, J. *et al.* Preparation of ferulic acid-grafted chitosan using recombinant bacterial laccase and its application in mango preservation. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 8, n. 13, p. 6759-6767, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC).

ZHANG, H. *et al.* Chitosan coatings incorporated with free or nano-encapsulated Paulownia Tomentosa essential oil to improve shelf-life of ready-to-cook pork chops. **Lwt**, [s.l.], v. 116, p. 108580, dez. 2019. Elsevier BV.

ZISMAN, W. A. Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution. In: Fowkes, F., ed. Contact angle wettability and adhesion. Advances in Chemistry. **American Chemical Society**: Washington, DC, 1964. Cap. 1. p. 1-51. 1964.

ANEXO A – FOTOS DOS RESULTADOS DO TESTE FURO EM ÁGAR EM SOLUÇÃO MÃE DE *UCIDES CORDATUS* E QUITOSANA COMERCIAL NA CONCENTRAÇÃO DE 5 MG/ML SOB AS CEPAS *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922, *ACINETOBACTER BAUMANNII* ATCC 19606, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ATCC 13883 E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853.



Legenda: Foto 1 – *Escherichia coli* ATCC 25922; Foto 2 - *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; Foto 3 - *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; Foto 4 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Interpretação das letras: C+ Controle Positivo (Polimixina B em 0,016 mg/mL); QU Quitosana *Ucides cordatus*; QC Quitosana Comercial e C- Controle Negativo (ácido acético na concentração diluente). Interpretação dos Traços Vermelhos (Foto 1): Representa a leitura nas posições verticais e horizontais dos halos de inibição em todas as cepas bacterianas. Fonte: Autor, 2025.

ANEXO B – FOTOS DOS RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM), RESULTANTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS DE *UCIDES CORDATUS* E QUITOSANA COMERCIAL NAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES SOB AS CEPAS *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922, *ACINETOBACTER BAUMANNII* ATCC 19606, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ATCC 13883 E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853.

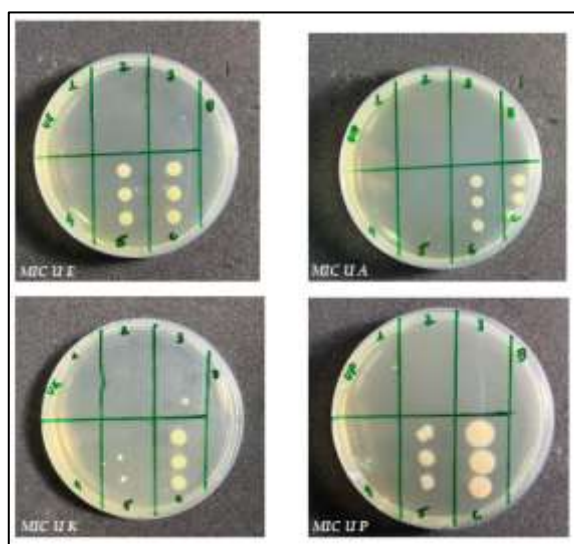


Foto 1 - *Ucides cordatus*

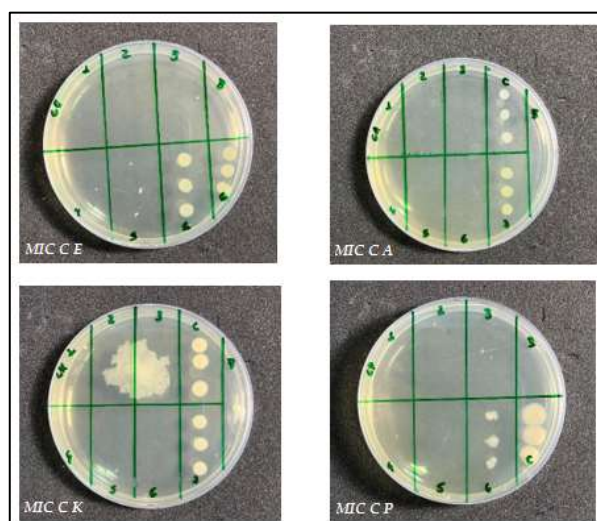


Foto 2 – Quitosana Comercial

Legenda: Foto 1 – Resultado dos extratos de *Ucides cordatus* nas concentrações inibidas nas concentrações 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 mg/mL, associadas ao controle positivo bacteriano, somado ao controle do teste em branco (ausência de bactéria na região da placa). Foto 2 - Resultados dos extratos de Quitosana Comercial nas concentrações inibidas nas concentrações 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156, 0,078 mg/mL, associadas ao controle positivo bacteriano, somado ao controle do teste em branco (ausência de bactéria na região da placa). Fonte: Autor (2025).

ANEXO C – FOTOS DOS RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM), RESULTANTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS DE *UCIDES CORDATUS* E QUITOSANA COMERCIAL NAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES SOB AS CEPAS *ESCHERICHIA COLI* MULTIRRESISTENTES.

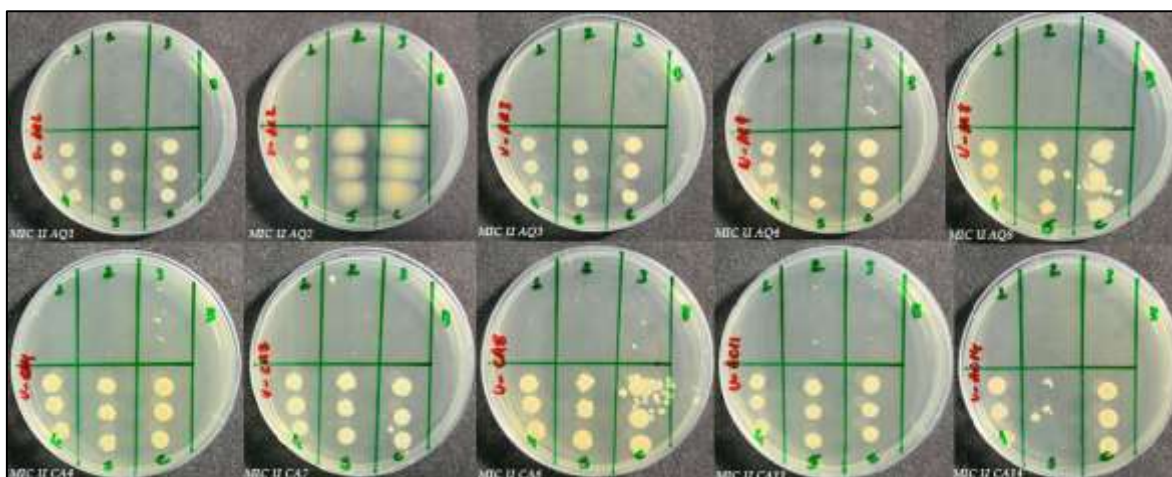


Foto 1 - *Ucides cordatus*

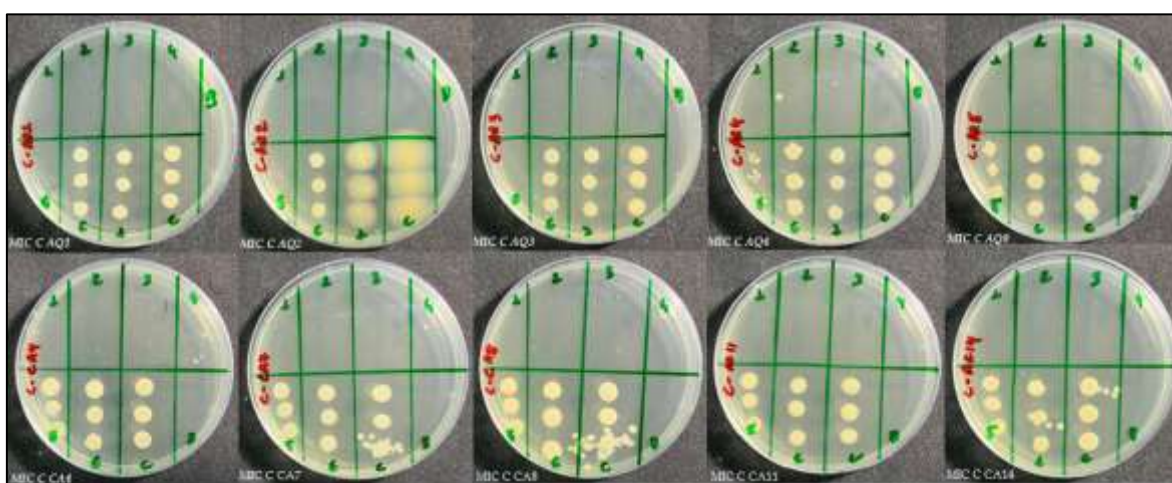
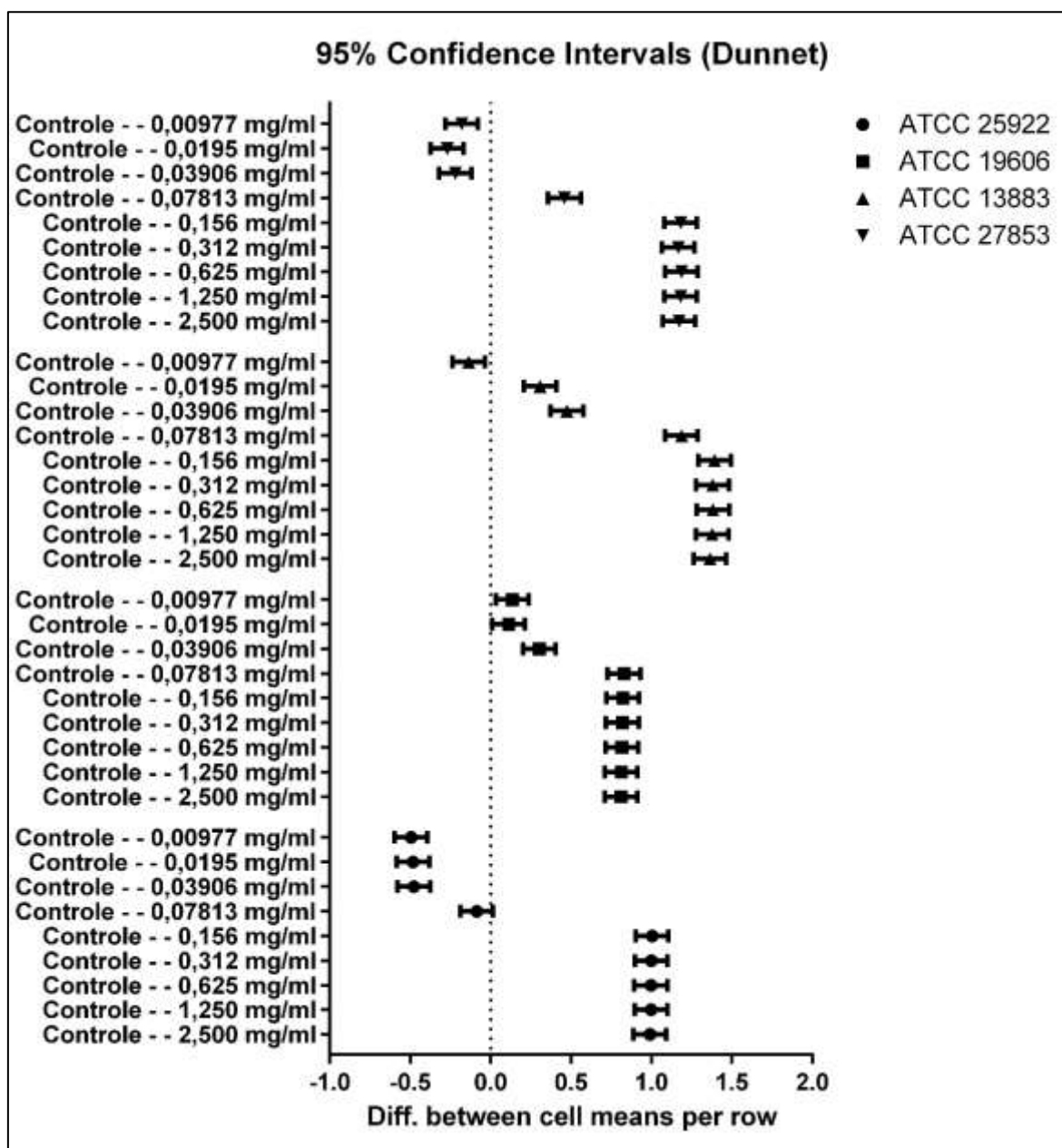


Foto 2 – Quitosana Comercial

Legenda: Foto 1 – Resultado dos extratos de *Ucides cordatus* com variações entre as concentrações inibidas nas concentrações 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 mg/mL, associadas ao controle positivo bacteriano, somado ao controle do teste em branco (ausência de bactéria na região da placa). Foto 2 - Resultados dos extratos de Quitosana Comercial com variações entre as concentrações inibidas 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156, mg/mL, associadas ao controle positivo bacteriano, somado ao controle do teste em branco (ausência de bactéria na região da placa). Fonte: Autor (2025).

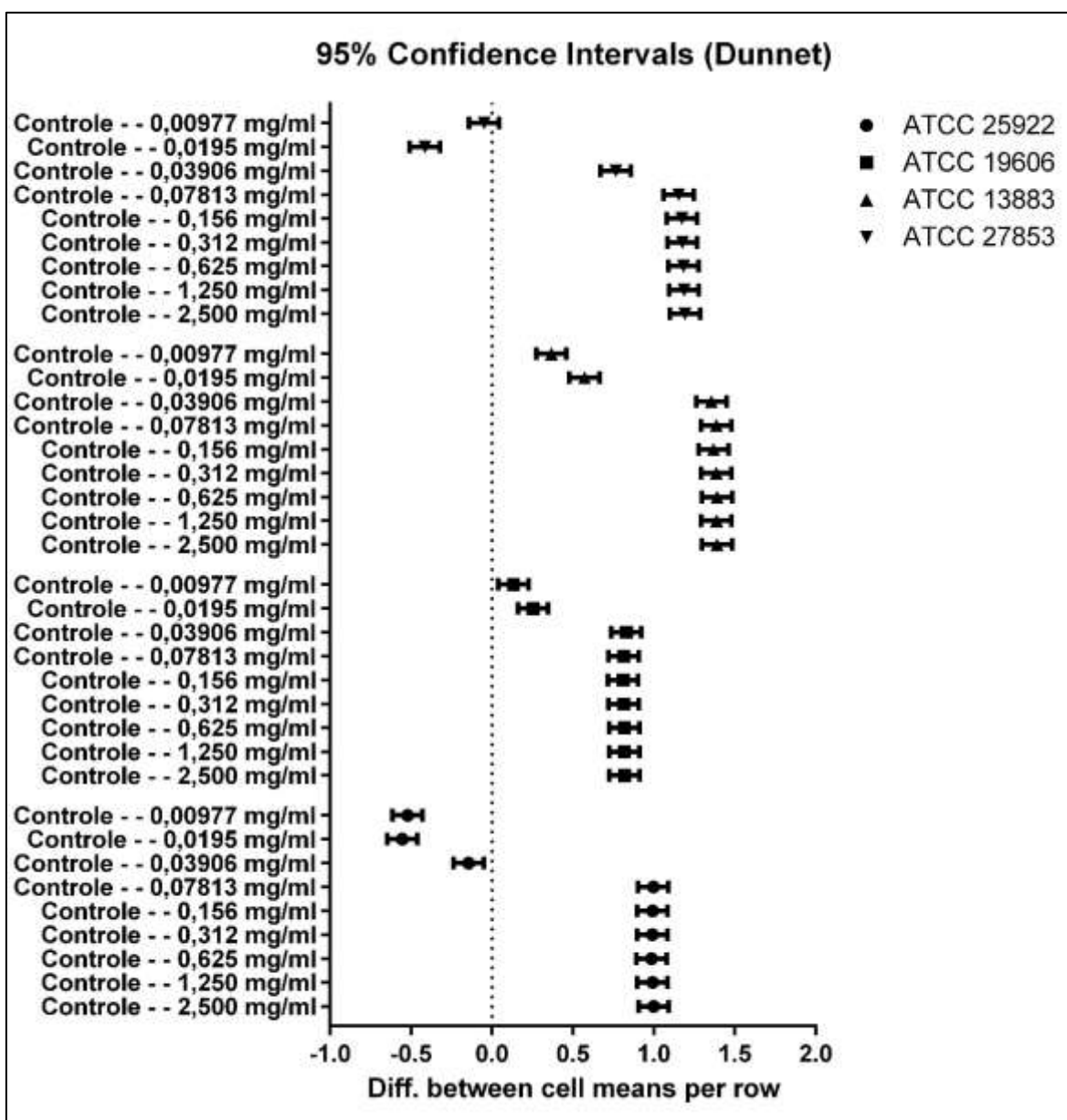
ANEXO D – INTERVALO DE CONFIANÇA DO TESTE DUNNETT (95%).

1 – Intervalo de confiança nos ensaios de microdiluição para a concentração inibitória mínima (CIM) nas amostras de quitosana *Ucides cordatus* nas cepas padrões.



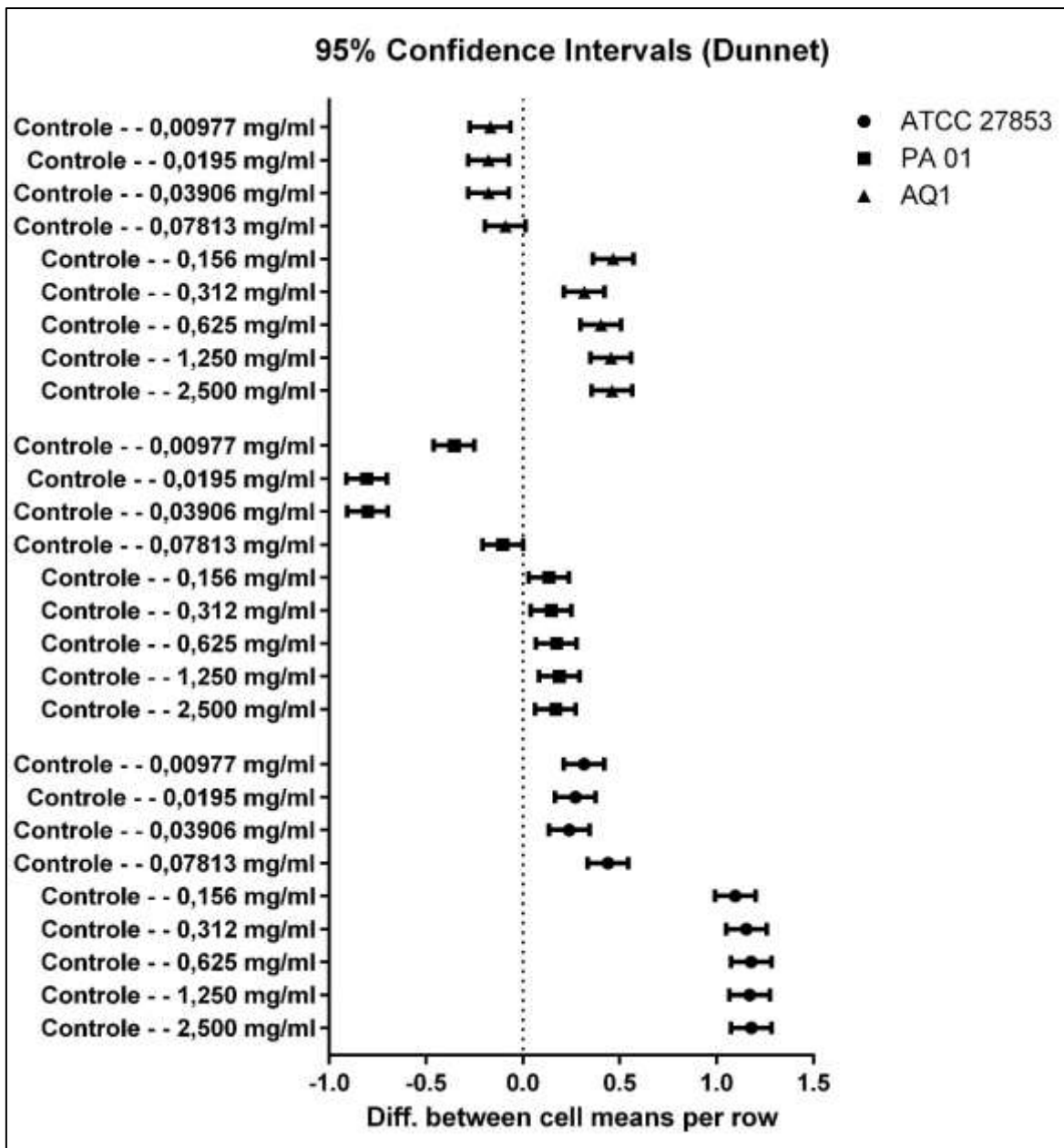
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,009; 0,019; 0,039 e 0,078 mg/mL para ATCC 25922; para a ATCC 13883 apenas a concentração 0,009 mg/mL. E 0,009; 0,019; 0,039 mg/mL para ATCC 27853. Fonte: Autor (2025).

2 – Intervalo de confiança nos ensaios de microdiluição para a concentração inibitória mínima (CIM) nas amostras de quitosana comercial nas cepas padrões.



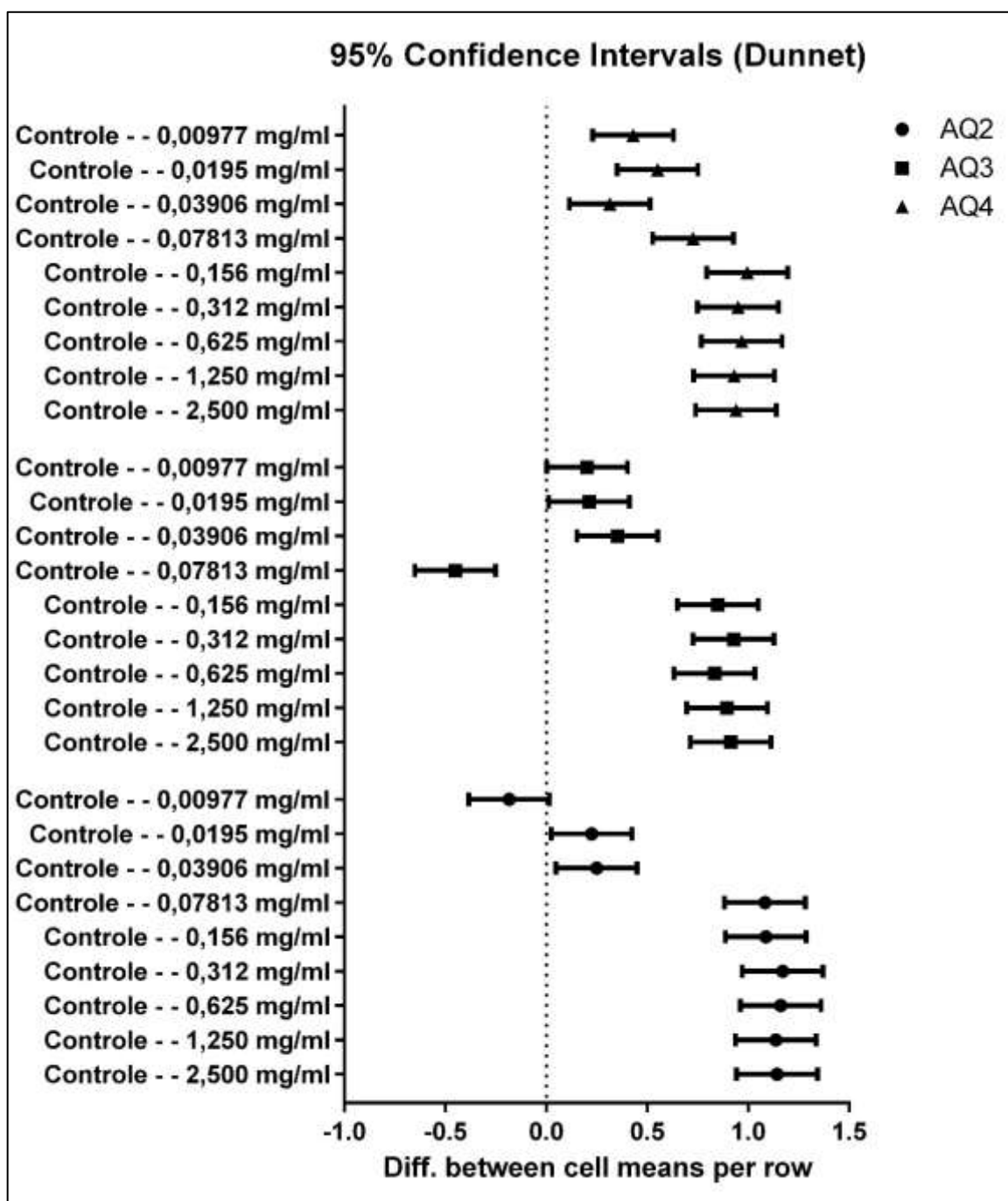
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,009; 0,019 e 0,039 mg/mL para ATCC 25922; e ATCC 27853 as concentrações 0,009 e 0,019 mg/mL. Fonte: Autor (2025).

3 – Intervalo de confiança nos ensaios inibitório dos extratos de quitosana *Ucides cordatus* na formação de biofilme.



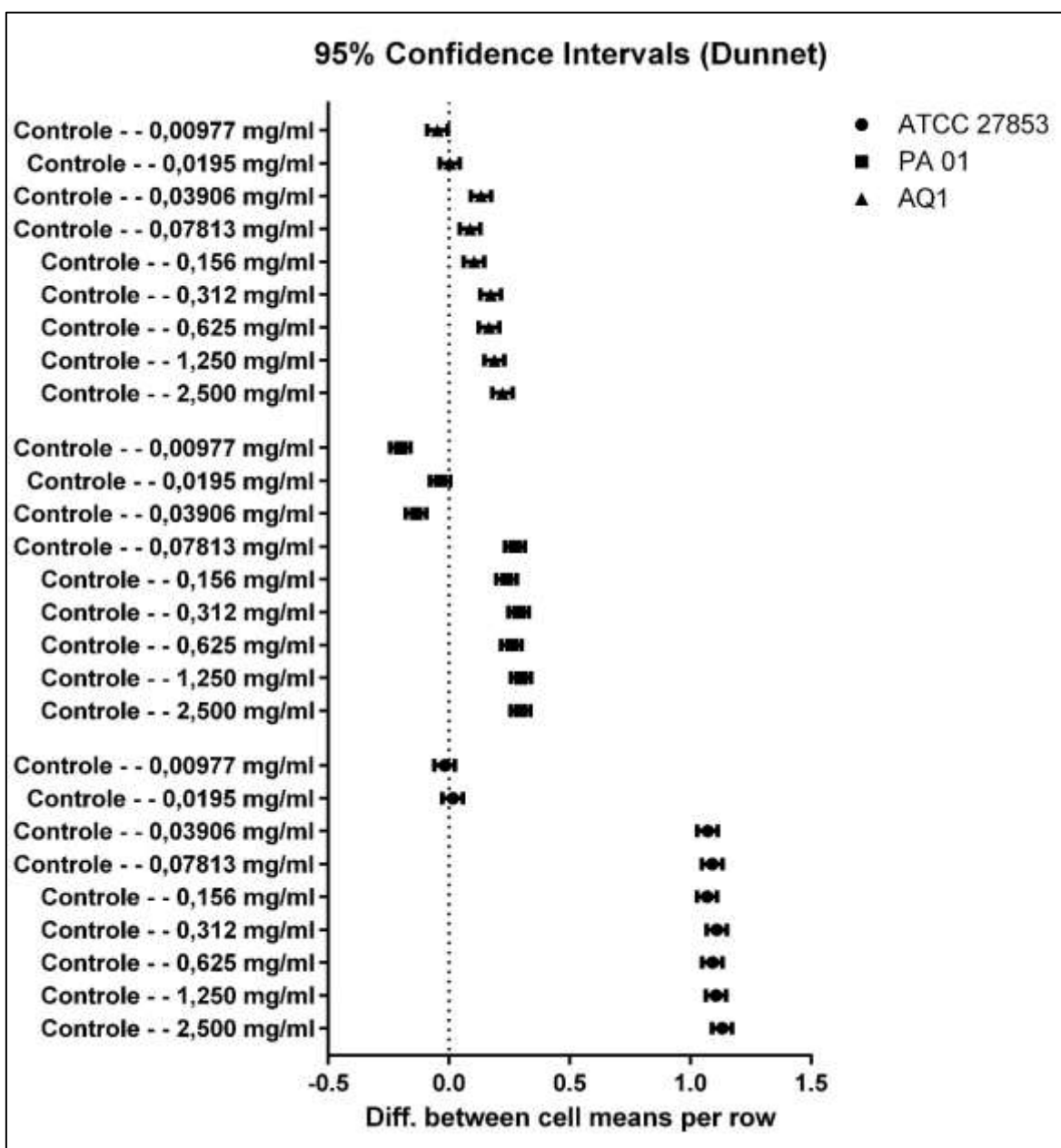
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,009; 0,019; 0,039 e 0,078 mg/mL para os isolados PA 01 e *E.coli* AQ1. Fonte: Autor (2025).

4 – Intervalo de confiança nos ensaios inibitório dos extratos de quitosana *Ucides cordatus* na formação de biofilme.



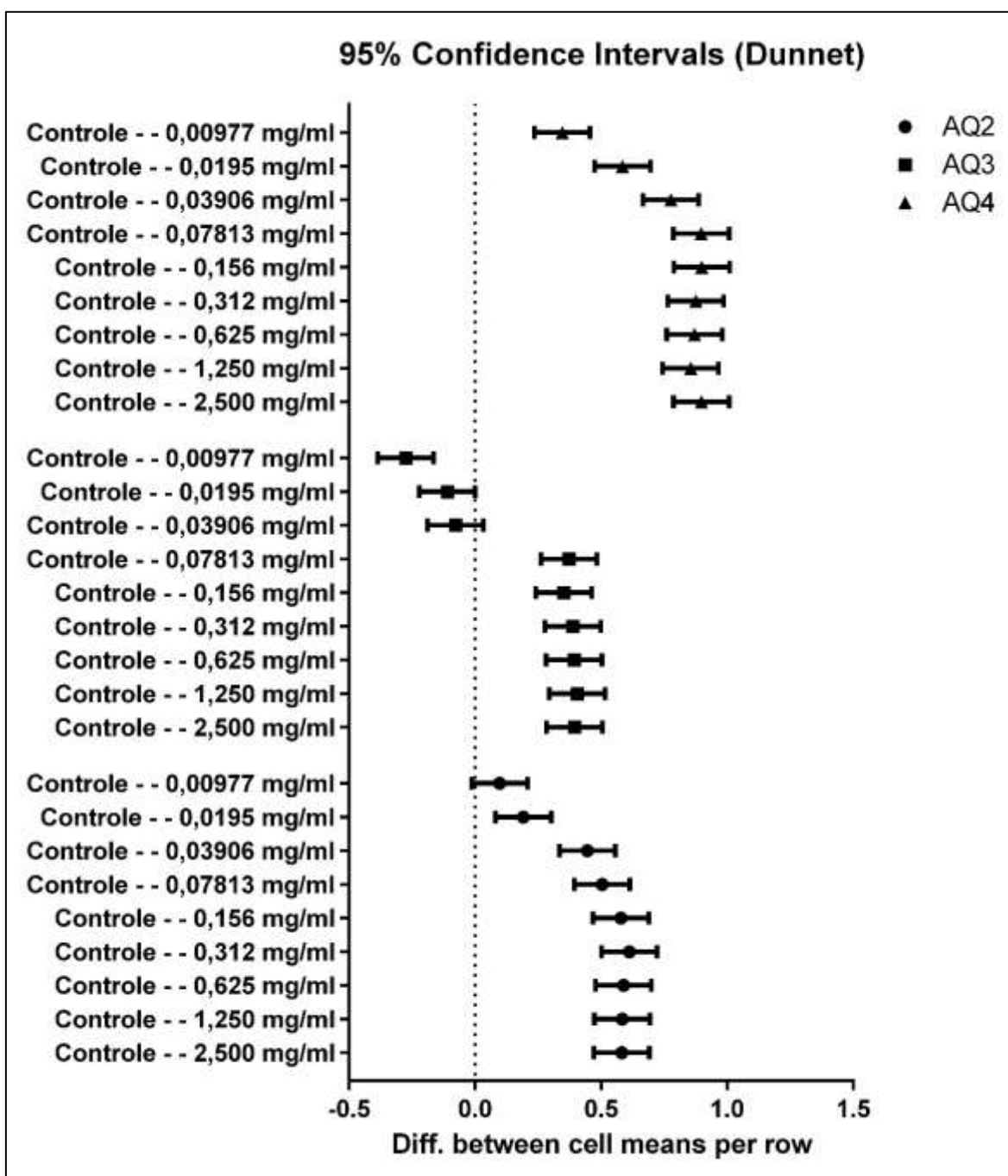
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,009 mg/mL para a *E.coli* AQ2 e 0,078 mg/mL para o isolado AQ3. Fonte: Autor (2025).

5 – Intervalo de confiança nos ensaios inibitório dos extratos de quitosana comercial na formação de biofilme.



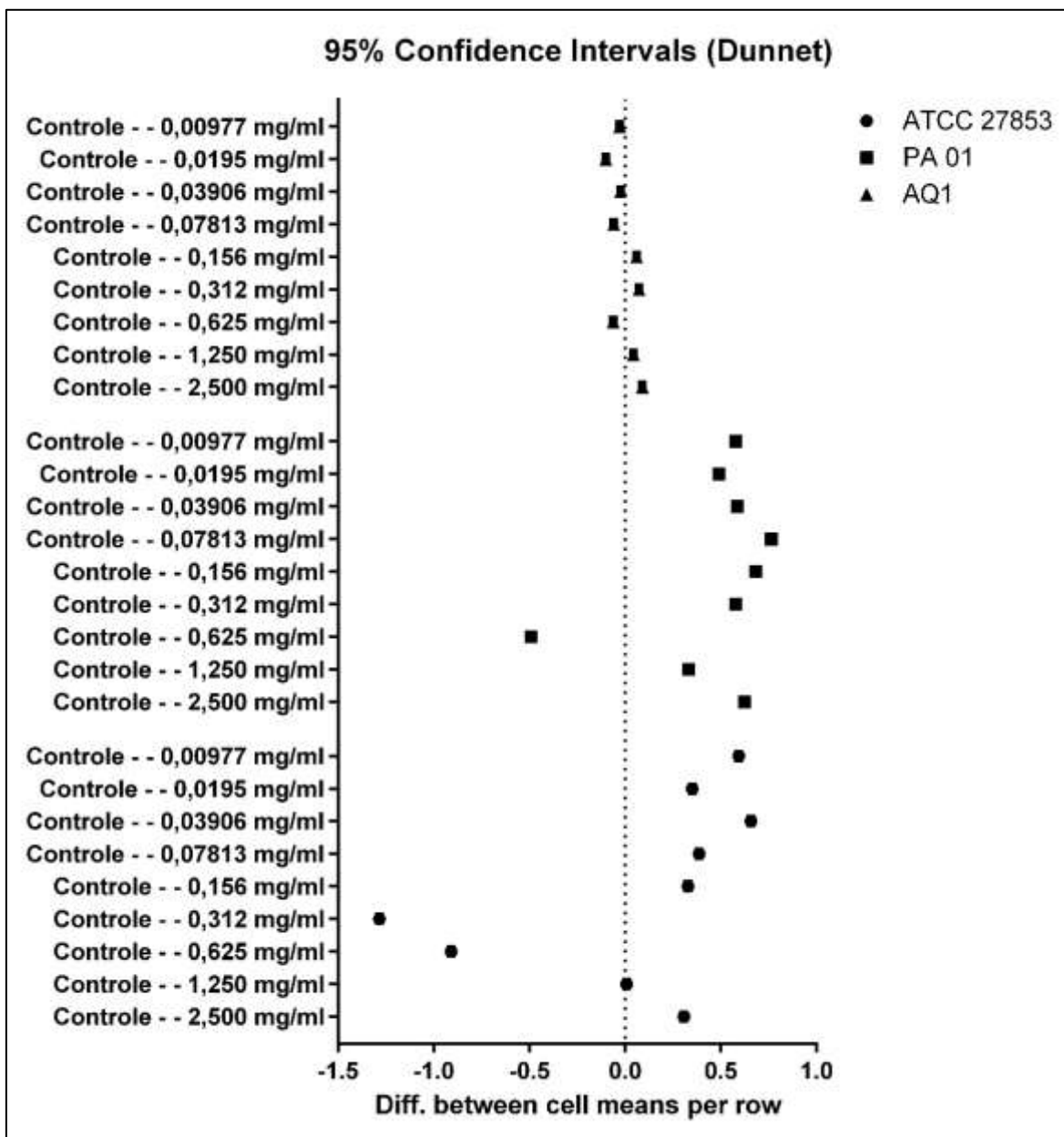
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,009 e 0,019 mg/mL para os isolados ATCC 27853 e *E.coli* AQ1; e as concentrações 0,009; 0,019 e 0,039 para PA 01. Fonte: Autor (2025).

6 – Intervalo de confiança nos ensaios inibitório dos extratos de quitosana comercial na formação de biofilme.



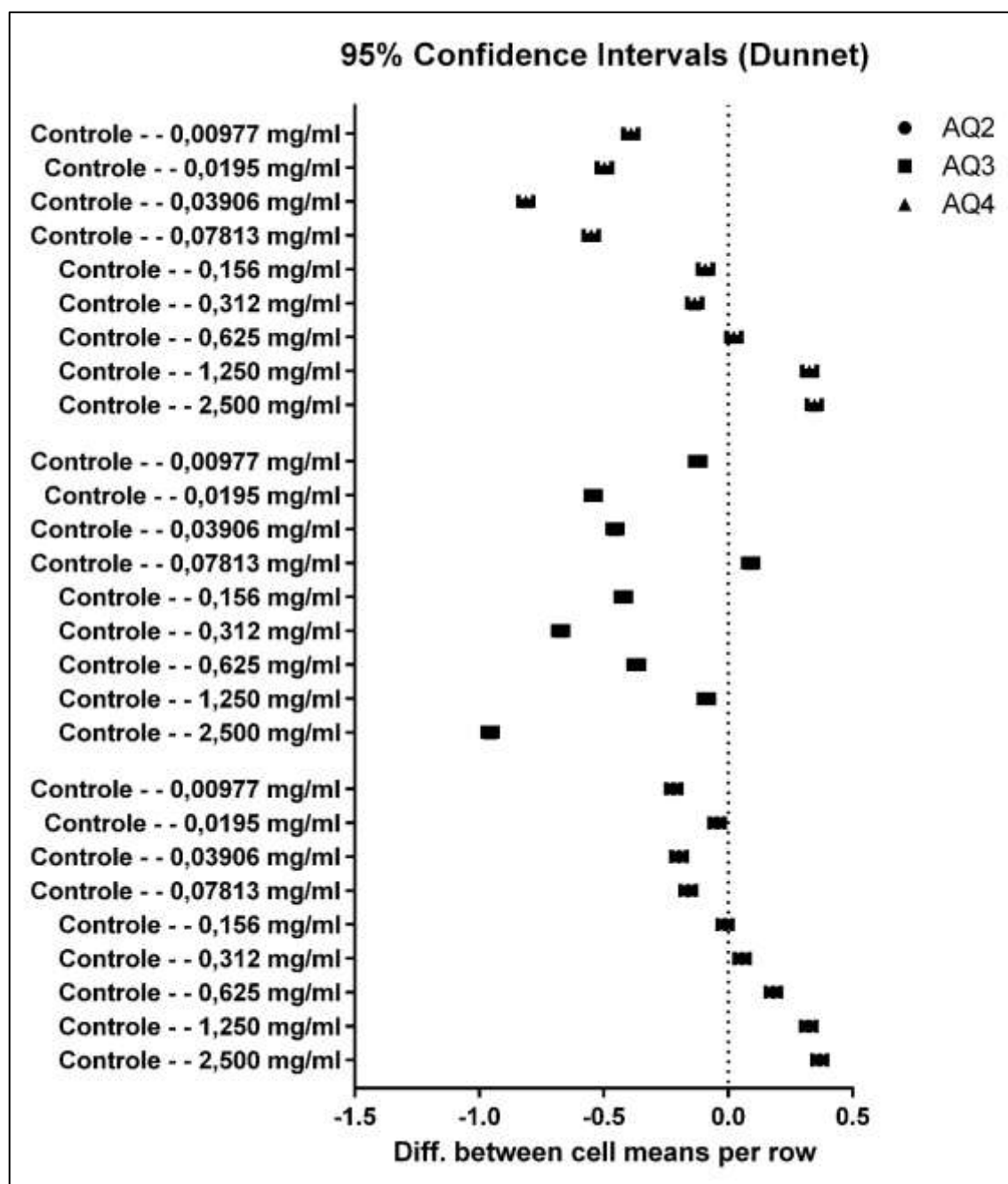
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,009 mg/mL para o isolado de *E.coli* AQ2; e as concentrações 0,009; 0,019 e 0,039 para AQ3. Fonte: Autor (2025).

7 – Intervalo de confiança nos ensaios de erradicação dos extratos de quitosana *Ucides cordatus* de biofilme pré-formados.



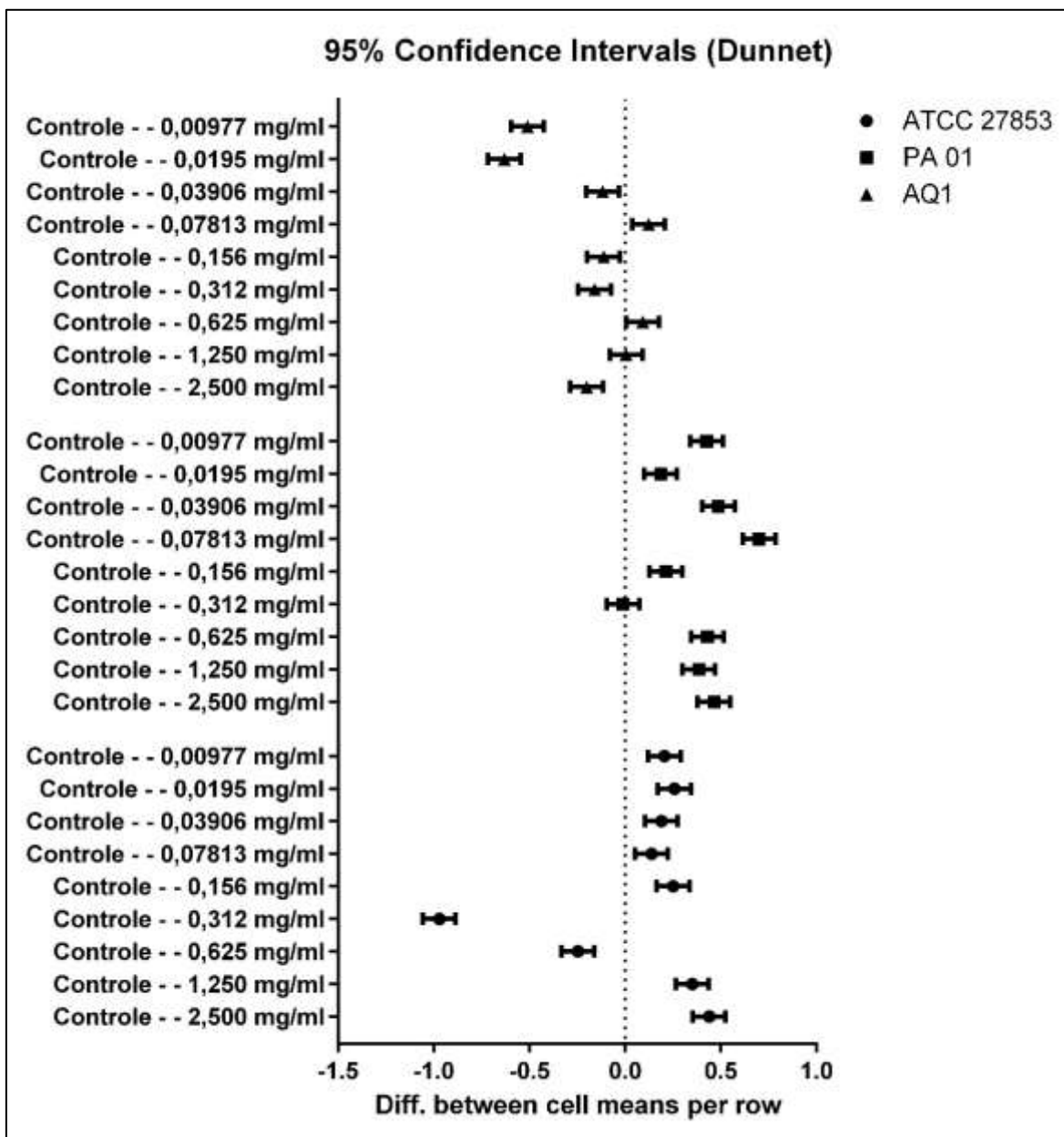
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,312 e 0,625 mg/mL para a ATCC 27853; 0,625mg/mL para o isolado PA 01; e as concentrações 0,009; 0,019; 0,039; 0,078 e 0,625 mg/mL para a *E.coli* para AQ1. Fonte: Autor (2025).

8 – Intervalo de confiança nos ensaios de erradicação dos extratos de quitosana *Ucides cordatus* de biofilme pré-formados.



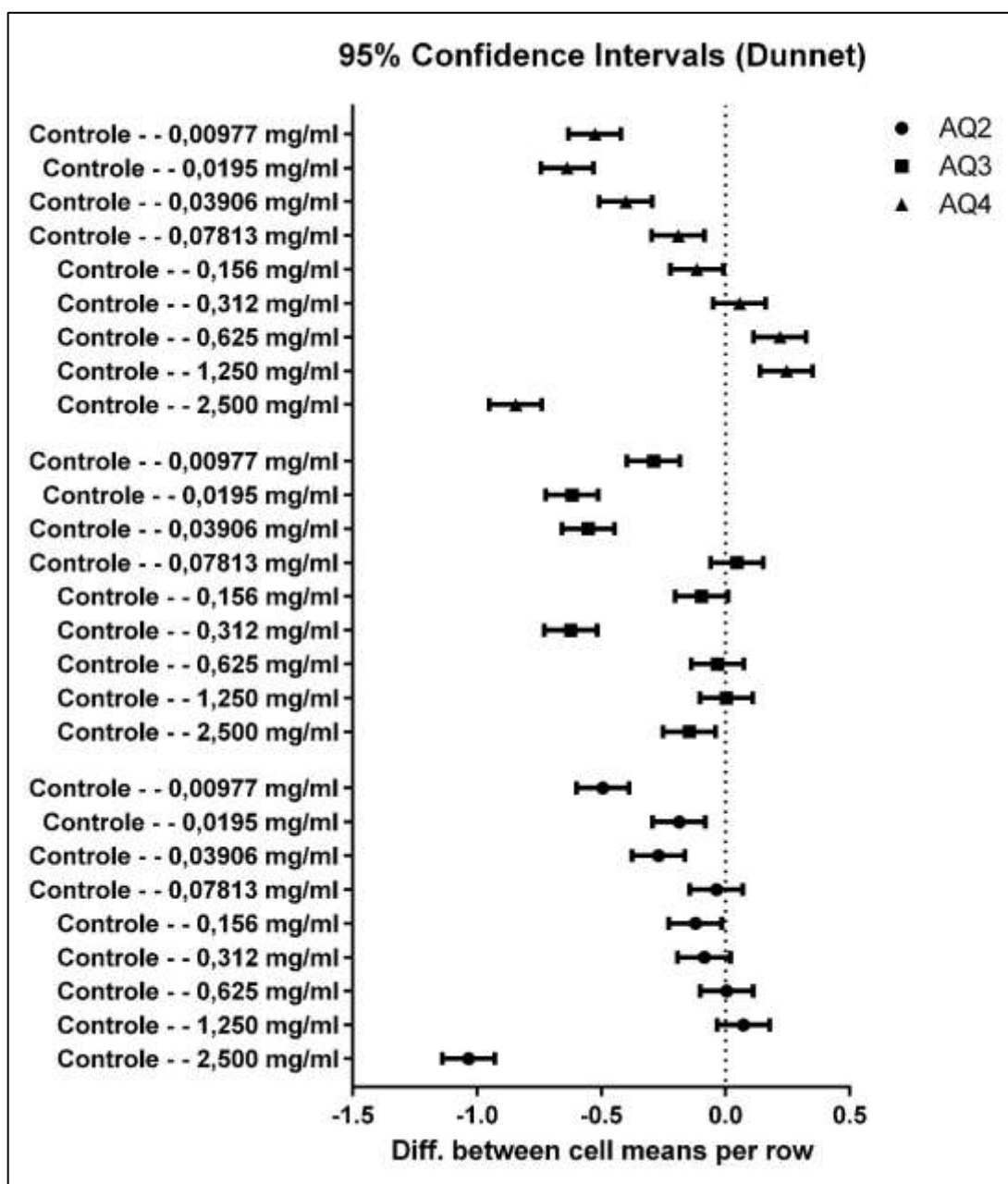
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,009; 0,019; 0,039; 0,078 mg/mL para o isolado *E.coli* AQ2. Todas as concentrações do isolado *E.coli* AQ3, com exceção de 0,078 mg/mL. E o intervalo das cinco menores concentrações (de 0,009 – 0,312 mg/mL) da *E.coli* AQ4. Fonte: Autor (2025).

9 – Intervalo de confiança nos ensaios de erradicação dos extratos de quitosana comercial de biofilme pré-formados.



Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo das concentrações 0,312 e 0,625 mg/mL para a ATCC 27853; 0,312mg/mL para o isolado PA 01, mas apenas dentro do intervalo de significância; e as concentrações 0,009; 0,019; 0,039; 0,156; 0,312 e 2,5 mg/mL para a *E.coli* para AQ1. Fonte: Autor (2025).

10 – Intervalo de confiança nos ensaios de erradicação dos extratos de quitosana comercial de biofilme pré-formados.










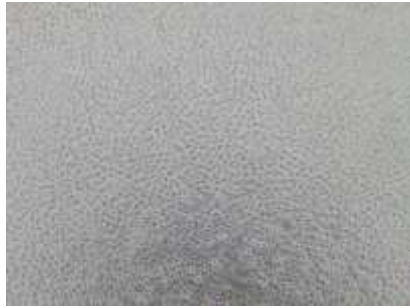
Legenda: O gráfico demonstra as concentrações que devem ser desconsideradas dentro do intervalo de confiança (95%), quando comparadas com o controle negativo, segundo o teste de Dunnett. Resultando no desprezo de todas as concentrações para os isolados *E.coli* AQ2 e AQ3 (exceto as concentrações que apresentam valores positivos quando respeitado o intervalo de significância). Já o isolado AQ4 considerou as concentrações 1,25; 0,625 e 0,312 mg/mL, desprezando todos os demais. Fonte: Autor (2025).









ANEXO E – FOTOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE MOLHABILIDADE SOBRE A SUPERFÍCIE DO QUEIJO COALHO.

Superfície Queijo 1 - (A)	Superfície Queijo 2 - (B)	Superfície Queijo 3 - (C)
Água - (D)	Formamida - (E)	Tolueno - (F)
Quitosana <i>U. cordatus</i> 0,0% de Glicerol - (G)	Quitosana <i>U. cordatus</i> 0,1% de Glicerol - (H)	Quitosana <i>U. cordatus</i> 0,2% de Glicerol - (I)
Quitosana Comercial 0,0% de Glicerol - (J)	Quitosana Comercial 0,1% de Glicerol - (K)	Quitosana Comercial 0,2% de Glicerol - (L)

Fonte: Autor (2025).

ANEXO F – FOTOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE 24H, RESULTANTE DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE UCIDES CORDATUS E QUITOSANA COMERCIAL NA CÉLULA DE FIBROBLASTO DE CAMUNDONGOS (L929) E QUERATINÓCITOS DA PELE HUMANA (HACAT).

Fibroblasto de Camundongos (L929) – 24horas		
Extratos de Quitosana <i>Ucides cordatus</i>	Concentrações do Extrato	Quitosana Comercial
	2,5 mg/mL (Diluição 1)	
	0,156 mg/mL (Diluição 5)	
	0,009 mg/mL (Diluição 9)	
	Controle DMEM	

Queratinócitos da pele humana (HaCaT) – 24horas		
Extratos de Quitosana <i>Ucides cordatus</i>	Concentrações do Extrato	Quitosana Comercial
	2,5 mg/mL (Diluição 1)	
	0,156 mg/mL (Diluição 5)	
	0,009 mg/mL (Diluição 9)	
	Controle DMEM	

Fonte: Autor (2025).