



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudo de revestimentos edíveis. Caracterização de algumas formulações e seus efeitos na conservação de frutos |

Catarina Isabel Barroso Melgão |

Orientação:

Professora Doutora Ana Cristina Agulheiro Santos |

Professor Doutor João Valente Nabais |

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2019



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudo de revestimentos edíveis. Caracterização de algumas formulações e seus efeitos na conservação de frutos |

Catarina Isabel Barroso Melgão |

Orientação:

Professora Doutora Ana Cristina Agulheiro Santos |

Professor Doutor João Valente Nabais |

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2019

Presidente do Júri

Célia Maria Miguel Antunes

(Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Évora)

Vogal – Arguente

Marta Sofia Serrano Valente Casimiro Laranjo

(Investigadora do ICAAM, Universidade de Évora)

Vogal – Orientador

João Valente Nabais

(Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Évora)

“(...) Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.”
Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À professora doutora Ana Cristina Agulheiro Santos por ter aceite a orientação desta dissertação, por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade, pelo constante incentivo e pela simpatia e amizade que sempre teve para comigo.

Ao professor doutor João Valente Nabais por ter também aceite a orientação da dissertação, pela sua disponibilidade constante, pela transmissão de conhecimentos, pela motivação, simpatia e amizade durante toda a realização do trabalho.

À Sara Ricardo-Rodrigues, por tudo o que me ensinou, por todo o tempo despendido comigo, pela motivação e disponibilidade, pela amizade e simpatia, por tudo o que fez por mim. O meu muito obrigada!

À professora doutora Maria do Rosário Félix por toda a ajuda na elaboração dos ensaios em placa, por todo o conhecimento transmitido, tempo despendido comigo e constante simpatia.

Ao professor doutor Luís Martins pela ajuda na caracterização reológica das formulações, por todo o tempo despendido, pelo conhecimento transmitido e simpatia para comigo.

Ao professor doutor Fernando Capela pela ajuda na caracterização das películas edíveis, pela sua disponibilidade, simpatia e conhecimento transmitido.

A todos os que se cruzaram comigo no Laboratório de Tecnologia e Pós-colheita, Maria Inês, Agostinho e Beatriz pelo apoio, ajuda nos ensaios, companheirismo e amizade. Um agradecimento especial à Joana Véstia que ajudou em inúmeros momentos, pelos conhecimentos transmitidos, pelo tempo, apoio, amizade e simpatia.

A todos os que me ajudaram nas avaliações sensoriais.

À D. Felicidade, pela sua constante boa disposição, pela sua disponibilidade e amizade em todos os momentos.

À D. Maria José pela partilha de conhecimentos, simpatia e disponibilidade no Laboratório de Microbiologia.

À engenheira Graça Machado e D. Margarida pela ajuda e disponibilidade com materiais e equipamentos no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Universidade de Évora.

À minha família, o meu grande pilar, em especial mãe, pai e mana. Pelo apoio constante, motivação e compreensão nos momentos mais difíceis, amizade, carinho e por nunca me deixarem desistir!

Ao João, pelo carinho, amizade, compreensão e apoio.

Ao meu mano emprestado pela alegria, amizade e motivação. Às amigas de sempre, pela amizade, apoio e compreensão. Aos amigos do mestrado, Maria João, Bruna, Manel e Vera. Aos amigos da licenciatura, Ana, Carolina, Nuno e Vanessa.

A todos os que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação fosse possível, o meu muito obrigada!

RESUMO

Estudo de revestimentos edíveis. Caracterização de algumas formulações e seus efeitos na conservação de frutos

Os revestimentos edíveis surgem como tecnologia pós-colheita para aumentar a vida útil dos frutos. Esta dissertação pretende caracterizar formulações de revestimentos edíveis de quitosano, com concentrações 1% e 1.5%, dissolvido em ácido acético a 0.5%, com e sem surfactante, e com adição de óleos essenciais, sob a forma de solução e de película. Foi avaliado o efeito de algumas destas soluções em frutos. No caso de estudo do morango o aumento do tempo de vida pós-colheita foi comprovado; o ensaio com cerejas foi inconclusivo. Todas as formulações testadas retardaram apresentaram ação antimicrobiana. As metodologias adaptadas para a avaliação física e química destas soluções e películas permitem selecionar as que apresentam formulação com 1% de quitosano. Por outro lado, formulações de quitosano nas concentrações de 1% e 1.5%, com ácido acético a 0.5%, foram aceites pelos provadores, sendo viável a sua utilização como revestimento na conservação de frutos frescos.

Palavras-chave: biopolímeros; antimicrobianos; quitosano; frutos; conservação

ABSTRACT

Study of edible films. Characterization of formulations and their effects on fruit conservation

Edible coatings appear as post-harvest technology to increase fruit shelf life. This dissertation intends to characterize formulations of edible coatings of chitosan, with concentrations 1% and 1.5%, dissolved in 0.5% acetic acid, with and without surfactant, and with the addition of essential oils, in the form of solution and film. The effect of some of these solutions on fruits was evaluated. In the case of strawberry study the increase in the post-harvest life time was proven; the cherry assay was inconclusive. All formulations tested retarded presented antimicrobial action. The methodologies adapted for the physical and chemical evaluation of these solutions and films allow to select those that present formulation with 1% of chitosan. On the other hand, chitosan formulations at concentrations of 1% and 1.5%, with 0.5% acetic acid, were accepted by the tasters, and their use as a coating in the conservation of fresh fruits is viable.

Keywords: biopolymers; antimicrobials; chitosan; fruits; conservation

INDÍCE GERAL

INDÍCE GERAL	<i>i</i>
INDÍCE DE FIGURAS	<i>iii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>viii</i>
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivo do estudo.....	2
1.2 Estrutura da dissertação	3
CAPÍTULO II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	6
2.1 Revestimentos edíveis	6
2.1.1 Quitosano	10
2.1.2 Compostos químicos de óleos essenciais.....	15
2.2 Conservação de frutos	19
CAPÍTULO III. Tema 1: Formulações	23
3.1 Introdução	24
3.1.1 Objetivo	24
3.2 Enquadramento Teórico	25
3.2.1 Revestimentos edíveis à base de quitosano.....	25
3.2.2 Avaliação das características das formulações.....	27
3.3 Materiais e Métodos	32
3.3.1 Preparação das formulações em solução.....	32
3.3.2 Avaliação das propriedades físicas e químicas das formulações em solução	34
3.3.3 Preparação das películas.....	38
3.4 Resultados e Discussão	40
3.4.1 Propriedades físicas e químicas das diferentes formulações em solução.....	40
3.4.2 Propriedades físicas e químicas das diferentes formulações em película.....	51
3.5 Conclusões	59
CAPÍTULO IV. Tema 2: Avaliação Sensorial	62
4.1 Introdução	63
4.1.1 Objetivo	63
4.2 Enquadramento Teórico	64
4.2.1 Análise sensorial.....	64
4.3 Materiais e Métodos	65
4.3.1 Preparação das soluções de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano.....	65
4.3.2 Aplicação dos revestimentos edíveis à base de quitosano nos frutos.....	65
4.3.3 Secagem dos revestimentos edíveis à base de quitosano nos frutos.....	66
4.3.4 Prova sensorial	66
4.4 Resultados e discussão	70
4.4.1 Teste triangular	70
4.4.2 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação em morangos	71
4.4.3 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação em cerejas	72
4.5 Conclusões	74

CAPÍTULO V. Tema 3: Avaliação da atividade antifúngica em placa.....	76
5.1 Introdução	77
5.1.1 Objetivo	77
5.2 Enquadramento Teórico	78
5.2.1 Revestimentos edíveis à base de quitosano para o controlo de fungos	78
5.2.2 Fungos <i>Botrytis spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> e <i>Rhizopus spp.</i>	78
5.3 Materiais e Métodos	79
5.3.1 Soluções de revestimentos edíveis à base de quitosano	79
5.3.2 Soluções de esporos.....	80
5.3.3 Construção do ensaio em placas	80
5.4 Resultados e Discussão.....	81
5.4.1 Efeito dos revestimentos sobre <i>Botrytis spp.</i>	81
5.4.2 Efeito dos revestimentos sobre <i>Penicillium spp.</i>	83
5.4.3 Efeito dos revestimentos sobre <i>Rhizopus spp.</i>	85
5.5 Conclusões	87
CAPÍTULO VI. Tema 4: Casos de Estudo – aplicação de revestimentos edíveis com quitosano a morango e a cereja	89
6.1 Introdução	90
6.1.1 Objetivo	90
6.2 Enquadramento Teórico	91
6.2.1 Período e perdas pós-colheita de fruta fresca	91
6.2.2 Revestimento edíveis à base de quitosano na conservação de frutos	91
6.2.3 Morango	98
6.2.4 Cereja.....	100
6.3 Materiais e Métodos	101
6.3.1 Preparação das soluções de revestimento	101
6.3.2 Ensaio de conservação	101
6.3.3 Tratamento estatístico	107
6.4 Resultados e discussão	107
6.4.1 Ensaio de conservação de morangos	107
6.4.2 Ensaio de conservação de cerejas	123
6.5 Conclusões	135
CAPÍTULO VII. Conclusões gerais.....	138
CAPÍTULO VIII. Referências Bibliográficas	141
CAPÍTULO IX. ANEXOS	viii

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura molecular da quitina.....	10
Figura 2.2 – Estrutura molecular do quitosano.....	11
Figura 2.3 – Derivados e aplicações do quitosano (Cunha, 2011).....	12
Figura 2.4 – Estrutura química do Eugenol (Mihai et al., 2015).....	17
Figura 2.5 – Estrutura química do mentol (Dewick, 2002).....	18
Figura 3.1 – Espectro eletromagnético.....	30
Figura 3.2 – Picnómetro.....	35
Figura 3.3 – Tensiómetro, com utilização de anel de du Nouy.....	36
Figura 3.4 – Medição do valor da tensão superficial instantânea em que o anel se separa da superfície do líquido.....	36
Figura 3.5 – Reómetro Kinexus Pro da Malvern.....	37
Figura 3.6 – Espectrofotómetro (Thermo).....	37
Figura 3.7 – Efeito da taxa de corte (s^{-1}) e da temperatura na viscosidade (Pa s) de soluções de quitosano com diferentes formulações; A: quitosano a 1% com ácido acético 0.5%; AT: quitosano a 1% com ácido acético 0.5% e Tween80 [®] ; B: quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5%; BT: quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5% e Tween80 [®] ; C: quitosano a 2% com ácido acético 0.5%; CT: quitosano a 2% com ácido acético 0.5% e Tween80 [®]	44
Figura 3.8 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5% (AcA), quitosano 1%+ácido acético 0.5% (Q1+AcA), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] (Q1+AcA+T), quitosano 1.5%+ácido acético 0.5% (Q1.5+AcA) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] (Q1.5+AcA+T).....	46
Figura 3.9 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5%+eugenol (AcA+E), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+eugenol (Q1+AcA+E), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] +eugenol (Q1+AcA+T+E), quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+eugenol (Q1.5+AcA+E) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] +eugenol (Q1.5+AcA+T+E).....	47
Figura 3.10 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5%+mentol (AcA+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+mentol (Q1+AcA+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] +mentol (Q1+AcA+T+M), quitosano	

1.5%+ácido acético 0.5%+mentol (Q1.5+AcA+M) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] +mentol (Q1.5+AcA+T+M).....	48
Figura 3.11 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5%+eugenol+mentol (AcA+E+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+eugenol+mentol (Q1+AcA+E+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] +eugenol+mentol (Q1+AcA+T+E+M), quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+eugenol+mentol (Q1.5+AcA+E+M) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80 [®] +eugenol+mentol (Q1.5+AcA+T+E+M).....	49
Figura 3.12 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5%; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.13 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80 [®] ; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.14 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.15 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Eugenol + Tween80 [®] ; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.16 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Mentol; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.17 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Mentol + Tween80 [®] ; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.18 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Mentol + Eugenol; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.19 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Mentol + Eugenol + Tween80 [®] ; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.20 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.21 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80 [®] ; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.22 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Eugenol; ampliação de 40x.....	53

Figura 3.23 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Eugenol + Tween80 [®] ; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.24 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Mentol; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.25 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Mentol + Tween80 [®] ; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.26 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Mentol + Eugenol; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.27 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol + Eugenol; ampliação de 40x.....	53
Figura 3.28 – Espectros de IV correspondentes às películas edíveis das formulações estudadas.....	55
Figura 3.29 – Espectros de IV correspondentes às películas edíveis das formulações estudadas.....	55
Figura 3.30- Solubilidade das películas edíveis das formulações estudadas.....	56
Figura 3.31 – Permeabilidade ao valor de água das películas edíveis correspondentes às formulações estudadas.....	58
Figura 4.1 – Processo de secagem dos morangos frutos.....	66
Figura 4.2 – Prova sensorial triangular.....	68
Figura 4.3 – Prova sensorial inserida no ensaio de conservação de morangos.....	69
Figura 4.4 - Gráfico de barras com os resultados das três análises sensoriais triangulares realizadas.....	70
Figura 5.1 – <i>Botrytis spp</i>	80
Figura 5.2 – <i>Penicillium spp</i>	80
Figura 5.3 – <i>Rhizopus spp</i>	80
Figura 5.4 – Escala de intensidade relativa ao crescimento do fungo <i>Botrytis spp</i>	81
Figura 5.5 – Escala de intensidade relativa ao crescimento do fungo <i>Penicillium spp</i>	83
Figura 5.6 – Escala de intensidade relativa ao crescimento do fungo <i>Rhizopus spp</i>	85
Figura 6.1 – Representação esquemática do sistema CIEL*a*b*.....	96
Figura 6.2 – Aspeto de uma plantação de morangueiro (Finch et al., 2014).....	99

Figura 6.3 – Morfologia de um morango (Santos, 2010).....	99
Figura 6.4 – Aspeto de pormenor de uma cerejeira.....	100
Figura 6.5 – Exemplo de cereja onde o revestimento aderiu por completo à superfície do fruto.....	102
Figura 6.6 – Exemplo de cereja onde o revestimento não aderiu à superfície do fruto.....	102
Figura 6.7 – Aspeto de texturómetro TA.HD.Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK).....	103
Figura 6.8 – Aspeto de avaliação da textura de morango e cereja, com recurso a teste de penetração, com sonda de 2mm, utilizando o texturómetro TA.HD.Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK).	104
Figura 6.9 – Colorímetro Cr-400, Konica Minolta (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japão).....	105
Figura 6.10 – Refratómetro digital ATAGO PR-32 α	105
Figura 6.11 – Aspeto da proliferação de fungos em morango da modalidade controlo após 9 dias de conservação.....	108
Figura 6.12 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente à percentagem de perda de peso dos morangos ao longo do tempo de ensaio, para as modalidades Controlo, Q1 e Q1.5.....	111
Figura 6.13 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente ao gradiente ao longo do tempo de ensaio, para as modalidades Controlo, Q1 e Q1.5.....	119
Figura 6.14 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente à firmeza da polpa dos morangos ao longo do tempo de ensaio, para as modalidades Controlo, Q1 e Q1.5.....	119
Figura 6.15 – Cereja da modalidade controlo, ao dia 14 de conservação.....	123
Figura 6.16 – Cereja da modalidade Q1_M_T, ao dia 14 de conservação.....	123
Figura 6.17 – Aspeto das cerejas ao dia 21	123
Figura 6.18 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente à perda de peso das cerejas ao longo do tempo de ensaio, para as modalidades Controlo Q1_T, Q1.5_T; Q1_M_T e Q1_M_E_T.....	126

Figura 6.19 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente ao valor de SST das cerejas ao longo do tempo de ensaio, para as modalidades Controlo Q1_T, Q1.5_T; Q1_M_T e Q1_M_E_T.....127

LISTA DE ABREVIATURAS

AcA – Ácido acético, com uma concentração de 0.5%

E – Eugenol, com uma concentração de 0.15%

FTIR – Espetroscopia de Infravermelho (IV) com transformação de Fourier

M – Mentol, com uma concentração de 0.15%

OE_s – Óleos essenciais

Q – Quitosano

SST – Sólidos solúveis totais

T – Tween80[®]

UV-Vis – Espetroscopia de Ultravioleta-Visível

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 2.1 – Equilíbrio de dissolução de quitosano em meio ácido

Equação 3.1 - Equação para cálculo do valor da densidade das soluções

Equação 3.2– Equação da Lei de Lambert-Beer, onde A corresponde à absorvância, b corresponde ao caminho ótico, ϵ corresponde à absortividade molar, P_0 corresponde à energia radiante incidente na amostra e P corresponde à energia radiante transmitida pela amostra (Skoog et al., 2007)

Equação 3.3– Equação para obtenção do valor de T

Equação 3.4 – Equação para obtenção do valor da solubilidade da película (Hosseini et al., 2013)

Equação 3.5 – Equação para obtenção do valor da permeabilidade ao vapor de água (Hosseini et al., 2013)

Equação 6.1 – Cálculo da percentagem de Perda de Peso

Equação 6.2 – Cálculo do ângulo Hue

Equação 6.3 – Cálculo do Chroma

Equação 6.4 – Cálculo da percentagem de ácido málico nos frutos

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

A indústria alimentar está em constante evolução e reinvenção na procura de novas estratégias e métodos mais sustentáveis, que permitam um maior tempo de vida útil dos alimentos. Recentemente começaram a ser utilizados e divulgados os revestimentos edíveis, com intuito de dar resposta às necessidades de conservação de alimentos, nomeadamente frutos. Existe um elevado interesse neste tipo de revestimentos, sendo os mais comuns os revestimentos à base de quitosano, não só para frutos frescos, mas também para gelados, chocolates, frutos secos entre outros.

É de extrema importância a caracterização física e química destes revestimentos, tanto em solução como na forma de película sendo também necessário testar a sua aplicação em contexto real de conservação de alimentos, neste caso em frutos frescos.

De realçar que alguns dos resultados obtidos no decorrer deste trabalho já foram apresentados em eventos científicos, abaixo listados e mostrados nos anexos 16 a 20.

Poster intitulado “Estudo do efeito *in vitro* dos revestimentos edíveis de quitosano com óleos essenciais no controlo de fungos” apresentado em POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha;

Artigo intitulado “Estudo do efeito *in vitro* dos revestimentos edíveis de quitosano com óleos essenciais no controlo de fungos” publicado por POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha;

Poster intitulado “Avaliação sensorial de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano” apresentado em POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha;

Artigo intitulado “Avaliação sensorial de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano” publicado por POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha;

Poster intitulado “Cherry storage using chitosan edible coatings and essential oils” apresentado em International Conference on Mediterranean Diet and Gastronomy.

1.1 Objetivo do estudo

O objetivo da presente dissertação é avaliar as características dos revestimentos edíveis à base de quitosano, em diferentes concentrações, com adição de surfactante

e compostos químicos de óleos essenciais, quando os mesmos se encontram na fase de solução e quando estes estão sob a forma de película. Pretende-se ainda estudar o efeito desses revestimentos edíveis na conservação de frutos frescos, sendo casos de estudo o morango e a cereja.

1.2 Estrutura da dissertação

A presente dissertação está repartida em nove capítulos:

- Capítulo I: Introdução
Resumo com informação acerca da organização da presente dissertação
- Capítulo II: Enquadramento Teórico
Revisão da literatura sobre os temas abordados no trabalho
- Capítulo III: Tema 1 – Formulações
Caracterização física e química das diferentes formulações com quitosano: concentração de 1% e 1.5%, com e sem surfactante (Tween80[®]) e com e sem adição de compostos químicos de óleos essenciais (eugenol e mentol) .
Revisão da literatura acerca dos revestimentos e seus constituintes, quitosano, Tween80[®] e compostos químicos de óleos essenciais utilizados, eugenol e mentol. Descrição dos materiais utilizados e metodologias seguidas e apresentação e discussão dos resultados obtidos.
- Capítulo IV: Tema 2 – Avaliação Sensorial
Apresentação do estudo realizado em termos de análise sensorial dos revestimentos edíveis. Revisão da literatura sobre o tema, nomeadamente normas ISO (International Organization for Standardization). Descrição da metodologia e materiais utilizados e apresentação e discussão dos resultados obtidos.
- Capítulo V: Tema 3 – Avaliação microbiológica em meio sólido
Avaliação do efeito dos revestimentos edíveis de quitosano sobre os fungos *Botrytis spp.*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus spp.* através de ensaios em placa. Revisão da literatura acerca dos efeitos do quitosano no controlo de fungos, em particular nos usados neste trabalho. Descrição dos métodos e materiais utilizados e apresentação e discussão dos resultados obtidos.

- Capítulo VI: Tema 4 – Casos de estudo

Apresentação dos casos de estudo realizados, em morango e cereja, para avaliação dos efeitos de conservação dos revestimentos edíveis estudados. Descrição da metodologia utilizada, tal como dos materiais utilizados. Apresentação de resultados.

- Capítulo VII: Conclusões e perspectivas futuras

- Capítulo VIII: Referências bibliográficas

- Capítulo IX: Anexos

CAPÍTULO II
ENQUADRAMENTO TEÓRICO

CAPÍTULO II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1 Revestimentos edíveis

Para a promoção de um futuro sustentável e face aos problemas que o planeta enfrenta, torna-se cada vez mais importante consciencializar mentes e tomar medidas em todas as áreas. A substituição de materiais de uso comum, como os plásticos sintéticos, por materiais biodegradáveis é uma medida que faz uma imensa diferença em todas as áreas, englobando também a indústria alimentar. Associado a esta substituição, a diminuição dos desperdícios alimentares e o aumento da rentabilidade, são fatores a ter em conta nesta área, ressaltando a importância da manutenção da qualidade dos alimentos por um maior período de tempo (Pagella et al., 2002; Casariego et al., 2009). O facto de os polímeros sintéticos não apresentarem biodegradabilidade e em simultâneo a necessidade de manutenção da qualidade dos alimentos durante um maior período de tempo levaram à investigação e ao desenvolvimento de novas técnicas e metodologias “amigas do ambiente” (Kester e Fennema, 1986; Liang et al., 2017).

Neste contexto surgem os revestimentos edíveis, uma metodologia que prima pela sustentabilidade e igualmente tem impacto no aumento da vida útil dos alimentos, nomeadamente frutos (Luvielmo et al., 2012). O principal interesse deste tipo de revestimentos baseia-se no seu potencial para evitar perda de qualidade e prolongar o tempo de vida útil dos produtos, modificando as propriedades da sua superfície, sem alterar as suas características organolépticas (Dutta et al., 2009).

Há muito tempo que os revestimentos são aplicados a frutas e vegetais frescos, nos séculos XII e XIII na China, os citrinos eram encerados de modo a diminuir a sua desidratação. As primeiras formulações utilizadas para revestimentos em frutos eram constituídas por suspensões de ceras e óleos em água (Ortiz et al., 2014). Os mesmos começaram a ser estudados devido às suas capacidades de controlar o desenvolvimento de humidade, transporte de oxigénio, perda de aroma e transporte de soluto. A primeira publicação referente à aplicação de ceras em frutos foi realizada em 1940 por um cientista americano, Claypool. Desde esta primeira publicação, o interesse sobre o assunto tem crescido entre a comunidade científica, principalmente nas últimas três décadas segundo Silva, 2010, e forma muito acentuada na última década como atestam as numerosas publicações sobre o assunto (Silva, 2010).

Revestimentos edíveis e filmes edíveis são designações muitas vezes consideradas como sinónimos, mas na realidade são distinguíveis. Um filme é uma película formada através da secagem da solução de biopolímero separadamente do alimento, sendo posteriormente aplicado ao mesmo; um revestimento é uma suspensão ou emulsão aplicada diretamente no alimento, havendo formação do filme após secagem (Pinheiro et al., 2010).

Os revestimentos edíveis têm um papel de relevo na conservação, distribuição e conservação de produtos alimentares por serem camadas finas de um material comestível, opaco ou transparente, inodoro, insípido, com potencial de evitar perda de qualidade e prolongar a vida útil de um produto. Nas suas funções constam a proteção contra danos mecânicos, físicos, químicos e atividade microbológica (Falguera et al., 2011). Constituem uma barreira ao transporte de gases e vapor de água, contribuindo para a manutenção da qualidade do fruto no período pós-colheita (Luvielmo et al., 2012; Park, 1999).

Os revestimentos edíveis de biopolímeros representam um sistema alternativo de embalagem, sem custos adicionais para o ambiente. Contudo, não é possível uma substituição total dos plásticos sintéticos por filmes ou revestimentos biodegradáveis, pois existem especificações das embalagens que não o permitem. O objetivo dos revestimentos e filmes edíveis não é a substituição dos materiais não edíveis e sintéticos, mas sim agirem como adjunto na melhoria da qualidade dos alimentos controlando transferências de massa, melhorando a integridade dos alimentos, controlando a atividade microbiana e assim aumentando o tempo de vida útil dos alimentos e eficiência económica dos materiais das embalagens (Kester e Fennema, 1986; Embuscado et al., 2009; Falguera et al., 2011; Olivas et al., 2009; Santos, 2006).

Na composição dos revestimentos edíveis são utilizados materiais com origem em fontes naturais, caracterizados por uma elevada complexidade estrutural e diversidade funcional (Falguera et al., 2011; Pinheiro et al., 2010; Silva, 2010). A maioria dos revestimentos edíveis apresentam na sua composição pelo menos um polímero de elevada massa molecular. As estruturas poliméricas de cadeia longa apresentam-se necessárias para a manutenção da matriz dos revestimentos com a força coesiva necessária. Por outro lado, o aumento da coesividade estrutural resulta numa redução da flexibilidade do revestimento, da porosidade, da permeabilidade aos gases, vapores

e solutos. A distribuição uniforme dos grupos polares ao longo da cadeia do polímero aumenta a coesão pelo aumento aparente das ligações de hidrogénio e das interações iónicas entre as cadeias (Santos, 2006). Para a elaboração dos revestimentos edíveis são utilizados os seguintes compostos: proteínas, polissacarídeos e lípidos, usados separadamente ou em combinação, tal como apresentado na Tabela 2.1 (Liang et al., 2017; Ortiz et al., 2014; Soazo et al., 2016).

Tabela 2.1 – Biopolímeros mais utilizados na composição de revestimentos edíveis: proteínas, polissacarídeos e lípidos; (adaptado Bourtoom, 2008; Olivas et al., 2009).

Revestimentos Edíveis		
Proteínas	Polissacarídeos	Lípidos
Animais	Celulose	Ceras
	Amido	
	Pectina	
Vegetais	Algas marinhas	Óleos
	Gomas	
	Alginato	
	Quitosano	

Os revestimentos edíveis constituídos por proteínas apresentam características moleculares diversas, dependendo da sua origem biológica e da sua função. As proteínas são dotadas de capacidade de formar um filme devido à possibilidade de formação de ligações intermoleculares cruzadas por parte das suas cadeias laterais. Os revestimentos de proteínas apresentam boas propriedades de barreira aos gases e características favoráveis no que respeita à estabilidade mecânica dos revestimentos, no entanto, a sua capacidade de barreira à água é baixa. (Soazo et al., 2016).

Os revestimentos edíveis de polissacarídeos são atualmente os mais utilizados em frutos. Os polissacarídeos apresentam uma boa capacidade de barreira aos gases, no entanto a sua elevada capacidade hidrofílica confere-lhe uma elevada permeabilidade ao vapor de água, fazendo com que apresentem uma baixa capacidade de barreira nas transferências de vapor de água. Estas características inviabilizam a

utilização de revestimentos edíveis em produtos imersos em soluções ou em ambientes de humidade relativa elevada (Azeredo et al., 2010; Falguera et al., 2011; Lin et al., 2007; Pinheiro et al., 2010; Perera, 2007; Serrano et al., 2015; Vargas et al., 2008).

Os revestimentos edíveis compostos por materiais lípidos foram desenvolvidos com o objetivo específico de limitar as migrações de água nos alimentos, já que sendo os lípidos substâncias hidrofóbicas, apresentam-se como barreiras eficazes (Debeaufort & Voilley, 2009). Este tipo de revestimentos edíveis é também utilizado quando se pretende uma superfície brilhante, utilizando-se para isso ceras, resinas naturais, óleos essenciais, emulsionantes e outros. No entanto, este tipo de revestimentos apresenta aspetos negativos consideráveis, porque os materiais lipídicos podem conferir ao alimento propriedades organolépticas indesejáveis e tornar a sua superfície oleosa ou dura; podem restringir as trocas gasosas até um ponto em que os níveis de oxigénio internos se tornem demasiado baixos, tornando-se insuportável a respiração aeróbia (o que resulta em altos níveis de etanol, acetaldeído e dióxido de carbono); podem ainda alterar-se em situações de variação de temperatura, pois são sensíveis a este fator, formando uma camada branca cerosa na superfície do alimento (Lin & Zhao, 2007).

O composto que dá origem ao revestimento edível encontra-se inicialmente na forma de solução no estado líquido e é aplicado normalmente por imersão, podendo ser também aplicado alternativamente por pulverização ou por pincelagem. No caso dos alimentos, o revestimento é aplicado diretamente e passa a fazer parte do mesmo (Falguera et al., 2011).

Em alguns alimentos, quando a aplicação do revestimentos não se revela uniforme, há necessidade de incorporação de um surfactante no revestimento, o qual é uma substância anfipática com capacidade de aumentar a estabilidade da emulsão na formulação do revestimento e reduzir a tensão superficial entre a solução e a superfície do alimento, aumentando assim a capacidade molhante do revestimento e a sua eficiência (Pinheiro et al., 2010).

É importante avaliar a formulação (matriz pré-formada) dos filmes comestíveis de modo a quantificar e qualificar propriedades mecânicas, óticas e antimicrobianas na medida em que o revestimento vai criar uma atmosfera modificada no produto onde é aplicado, o que restringe a transferência de O₂ e CO₂ e é também uma barreira às trocas com a atmosfera envolvente (Desbrières et al., 2010; Falguera et al., 2011).

2.1.1 Quitosano

O quitosano é um biopolímero não tóxico, biodegradável e biocompatível, obtido a partir de fontes renováveis, detentor de aplicações atuais e potenciais no tratamento de águas, na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética (Brychcy et al., 2015; Santos et al., 2003; Dutta et al., 2009; Fráguas et al., 2015; Homez-Jara et al., 2018).

Este material polisacarídico pode ser obtido por desacetilação da quitina (Baldwin, 2007; Bourtoom, 2008; Dhanapal et al., 2012; Embuscado et al., 2009; Pinheiro et al., 2010; Serrano et al., 2015; Shahidi et al., 1999; Šuput et al., 2016). A quitina (Figura 2.1) é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, sendo precedido pela celulose, sendo o composto orgânico mais abundante na estrutura esquelética de muitos invertebrados, podendo também ser encontrada nas paredes celulares de alguns fungos e espécies de algas (Bourtoom, 2008; Falguera et al., 2011; Luvielmo et al., 2012; Pinheiro et al., 2010). Comercialmente, a quitina é obtida a partir de crustáceos devido à elevada disponibilidade e à rentabilidade do processo (Fráguas et al., 2015; Santos et al., 2003). A quitina é constituída por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose, também designada N-acetil-D-glucosamina (GlcNHAc), unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) (Pinto, 2005).

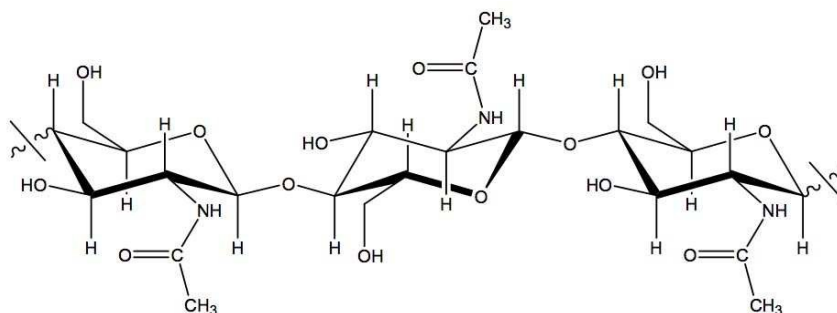


Figura 2.1 - Estrutura molecular da quitina

Mesmo sendo uma fonte de matéria-prima com potencialidades enormes, a quitina tem ainda uma aplicação bastante reduzida, maioritariamente devido à sua reduzida solubilidade e difícil tratamento, resultado das fortes ligações de hidrogénio entre as cadeias poliméricas (Santos, 2006). Um modo de contornar esta limitação consiste na desacetilação da quitina, a altas temperaturas e em meio alcalino forte, resultando deste tratamento o quitosano (Figura 2.2) (poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-

glucopirranose]) (Bourtoom, 2008; Pinheiro et al., 2010). A desacetilação pode originar diferentes tipos de quitosano tendo em conta o peso molecular e o grau de desacetilação do bioplímero.

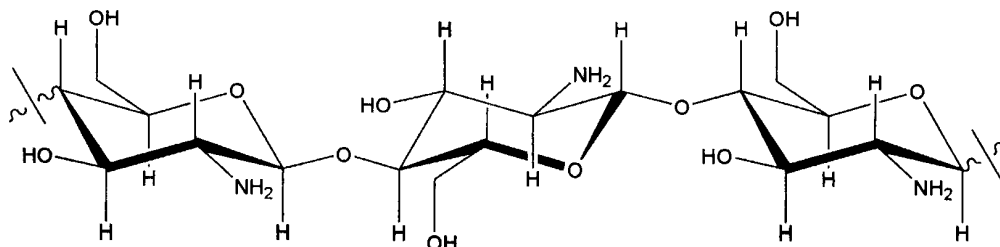


Figura 2.1 – Estrutura molecular do quitosano

2.1.1.1 Características físicas e químicas do quitosano

O quitosano é um biopolímero de cadeia linear longa composto por monómeros de 2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcN) e de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcNAc) unidos por ligações covalentes β -1,4 (Brychcy et al., 2015; Fráguas et al., 2015; Liang et al., 2017; Pinotti et al., 2007). É considerado como uma base forte, apresentando valores de pKa entre 6.3 e 7.0, havendo variação em função do grau de acetilação (Paul et al., 2014; Pillai et al., 2009).

A molécula de quitosano tem três grupos funcionais reativos, sendo eles um grupo amina na posição C-2 e dois grupos hidroxilo nas posições C-3 e C-6. Alguma alteração química registada num destes grupos funcionais vai conferir propriedades diferentes ao composto, ficando apto para variadas aplicações (Shahidi et al., 1999). O elevado número de aminas ao longo da cadeia molecular torna a molécula de quitosano bastante suscetível a alterações, nomeadamente reações de N-acetilação, N-alquilação, N-carboxilação, N-sulfonação e formação de bases de Schiff com cetonas e aldeídos. Estas reações têm impacto nas características dos produtos, tal como a solubilidade (Augusto, 2013; Desbrières et al., 2010; Santos et al., 2003).

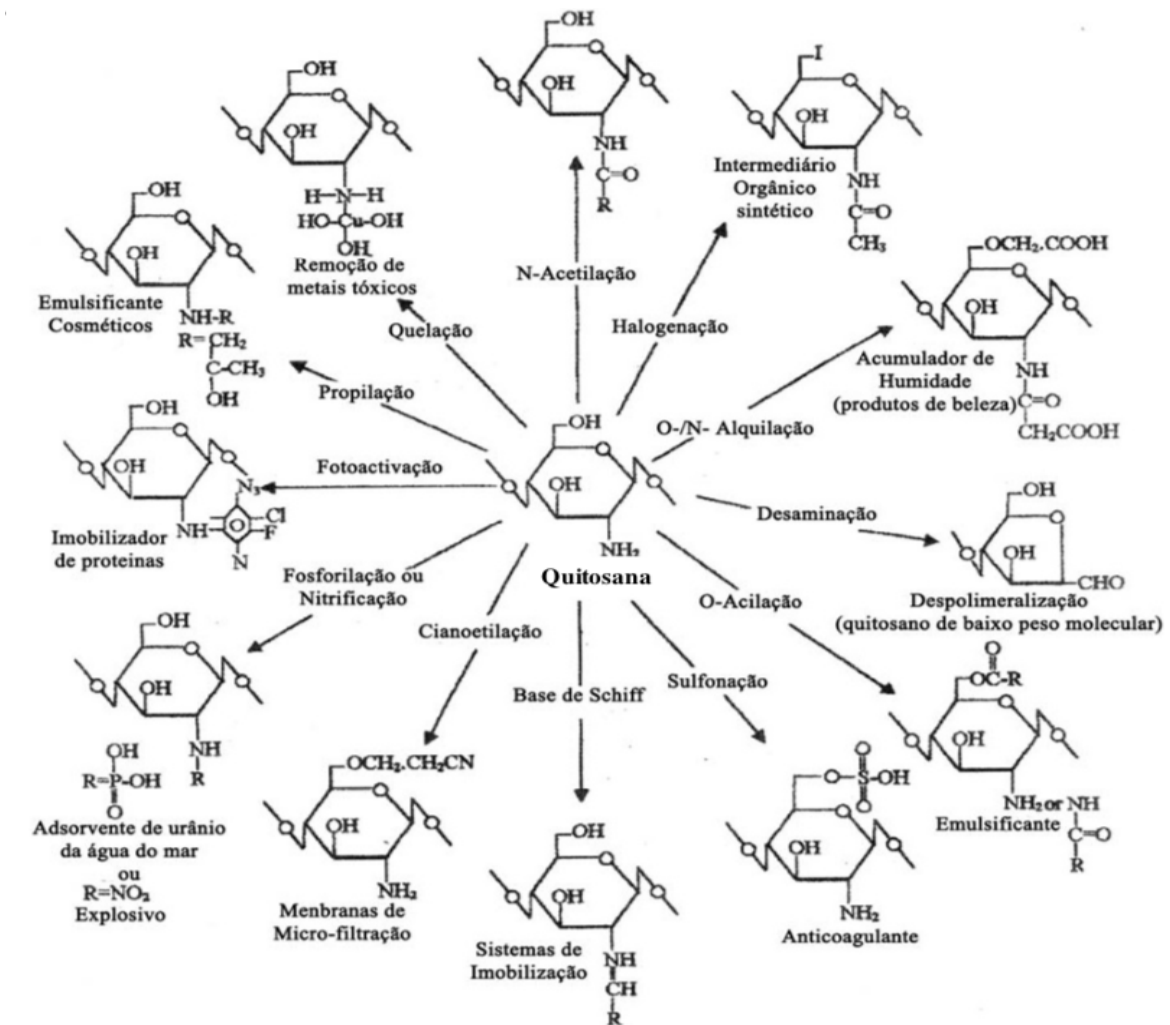


Figura 2.3 – Derivados e aplicações do quitosano (Cunha, 2011)

Quando em solução, o quitosano tem a capacidade de formar agregados micelares com polissacarídeos totalmente acetilados, interligados por conjuntos de polissacarídeos desacetilados, afastados por forças de repulsão eletrostática (Embuscado et al. 2009).

O quitosano é insolúvel em água sendo, no entanto, solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido fórmico, ou ácido cítrico, e em ácidos inorgânicos diluídos, como por exemplo ácido clorídrico, ácido nítrico ou ácido perclórico. No caso da dissolução em ácidos orgânicos, esta resulta numa solução líquida, enquanto que no caso da dissolução em ácidos inorgânicos resulta numa

solução viscosa (Romanazzi et al., 2009; Santos et al., 2003). Em meio ácido, ocorre o seguinte equilíbrio: (Pinto, 2005)



A sua solubilidade relaciona-se diretamente com a quantidade de grupos amina protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia molecular: quanto maior o número de grupos amina, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias, sendo também maior a solvatação em água. O grau de protonação vai depender do pK do ácido utilizado para a solubilização (Rodrigues, 2016).

2.1.1.2 Características biológicas

O quitosano é um polímero natural conhecido pelas suas características não-tóxicas, biodegradáveis e biocompatíveis, com excelente capacidade de formação de filmes e revestimentos. (Hajji et al., 2018). No âmbito da sua atividade biológica, é largo o espectro de ação deste biopolímero pelas suas propriedades anti-fúngicas, anti-microbianas, anti-inflamatórias e anti-oxidantes (Aranaz et al., 2009; Fonseca, 2012).

O mecanismo de ação como agente antimicrobiano não é ainda conhecido. Shahidi et al. sugeriu que o mecanismo pode estar relacionado com a interação de carga positiva das moléculas de quitosano com as membranas celulares de carga negativa dos microrganismos, havendo uma consequente alteração da permeabilidade das células, levando à saída de constituintes celulares. Existe também, segundo o autor, outra possível explicação que se baseia no facto de o quitosano de baixo peso molecular conseguir entrar no núcleo das células dos microrganismos, havendo interação com o DNA e interferência na síntese do RNA mensageiro, afetando consequentemente a síntese de proteínas, inibindo a atividade de algumas enzimas. Uma outra possível explicação para esta ação antimicrobiana está relacionada com o quitosano funcionar como quelante, criando complexos a partir de vestígios de metais, que são essenciais para as células de microrganismos (Ricardo-Rodrigues et al., 2017; Shahidi et al., 1999).

2.1.1.3 Aplicabilidade

O quitosano tem despertado cada vez mais interesse em várias áreas, como a indústria farmacêutica, cosmética, alimentar, sob as mais diversas formas (Sheikh et al., 2013). A sua atividade antimicrobiana e atividade antioxidante, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e propriedades físico-químicas versáteis, associadas à capacidade de formação de revestimentos e filmes faz do quitosano um composto de destaque na área alimentar (Dutta et al., 2009; Pinotti et al., 2007; Liang et al., 2017; Homez-Jara et al., 2018). Por conseguinte, apresenta a capacidade de conservação dos alimentos por diminuição da deterioração microbiana enquanto constituinte de revestimentos edíveis (Hajji et al., 2018). Este polímero consegue formar um filme nas superfícies de frutas e vegetais, o que leva à redução da taxa de respiração e ao ajuste da permeabilidade ao dióxido de carbono e oxigénio (Pereira et al., 2014; Silva et al., 2017; Suseno et al., 2014).

Este tipo de revestimentos já foi objeto de diversas publicações, em particular o estudo das capacidades dos revestimentos edíveis à base de quitosano em frutos frescos como morango (Petriccione et al., 2015; Ribeiro et al., 2007; Romanazzi et al., 2013; Velickova et al., 2013; Wang et al., 2013), manga, tomate cherry (Kumari et al., 2017), cereja (Petriccione et al., 2015), uva de mesa (Romanazzi et al., 2009), melão (Ortiz-Duarte et al., 2010), e damasco (Zhang et al., 2018). Os estudos já realizados apresentaram bons resultados acerca da utilização de revestimentos edíveis à base de quitosano para conservação de frutos, no entanto existe ainda muito a fazer sobre este tema. Existem muitas variáveis determinantes, como o tipo de fruto, concentração de quitosano, ácido utilizado na dissolução, utilização de surfatante e óleos essenciais, que têm influencia na efetividade deste tipo de revestimentos na conservação dos frutos no período pós-colheita (Park, 1999).

A utilização de quitosano na indústria alimentar foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) como aditivo alimentar seguro e pela U.S. Environmental Protection Agency como um biopesticida, podendo assim ser utilizado desde que garantido o seu grau de pureza (Shahidi et al., 1999). O quitosano é também aprovado para uso alimentar no regulamento (UE) 2015/165 da Comissão de 3 de fevereiro de 2015.

2.1.2 Compostos químicos de óleos essenciais

Óleos essenciais (OEs) são definidos pela International Organization for Standardization (ISO) como misturas complexas compostas por inúmeras substâncias com composição química variada, obtidos de plantas por hidrodestilação ou obtidos de frutos cítricos por prensagem a frio do fruto. São geralmente compostos aromáticos voláteis, lipofílicos, odoríferos e líquidos, encontrados em 10% do reino vegetal (Aleksic et al., 2014; Pereira et al., 2014). São armazenados nas plantas em estruturas secretoras frágeis, como ductos de resina ou glândulas secretoras. O teor de óleo essencial de uma planta, em geral, não excede 1% em massa. São reconhecidos como seguros pela Food and Drug Administration no 21 Code of Federal Regulations.

Este tipo de compostos e os seus componentes revelam-se como agentes biológicos promissores, isto porque são seguros, bem aceites pelo consumidor e apresentam um bom potencial de utilização.

Quimicamente, os OEs contidos nas plantas são terpenos, terpenóides ou compostos monoaromáticos livres, com uma diversidade imensas de estruturas químicas (Aleksic et al., 2014; Modjinou et al., 2017). São hidrofóbicos, sendo ligeiramente solúveis em água mas solúveis em álcool, solventes não polares ou fracamente polares, ceras e óleos. Apresentam-se como misturas complexas, que compreendem vários compostos e de densidade inferior à densidade da água (Aleksic et al., 2014). Em termos de coloração, apresentam-se geralmente incolores ou amarelo pálido. Apresentam também propriedades antifúngicas (Ribes et al., 2017).

Os óleos essenciais e seus compostos são utilizados há cerca de 3500 anos, tendo aplicação na cosmética, perfumes, tintas, ceras e na indústria alimentar, como agentes antimicrobianos naturais eficazes, apresentam boas propriedades ecológicas e biodegradáveis.

Devido ao seu potencial, o interesse na incorporação de OEs e seus compostos na indústria alimentar é crescente. Segundo Hajji et al., 2018, existem estudos recentes nos quais são incorporados em revestimentos comestíveis de quitosano agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos, tais como nisina, natamicina, extratos naturais de sementes e óleos essenciais, utilizados como uma embalagem ativa e fornecendo uma nova maneira de melhorar a qualidade dos frutos e aumentar a sua vida útil (Hajji et al., 2018). Também Choi et al., (2016) referem estudos que mostraram que o uso de óleos

essenciais, como óleo de orégão e óleo de bergamota, pode melhorar as propriedades de barreira à humidade quando associados a revestimentos edíveis de quitosano. No mesmo trabalho, fazem referência ao potencial do timol e carvacrol, compostos do óleos essencial de orégão, que demonstraram possuir atividade antibacteriana e antifúngica (Choi et al., 2016). Já Shahbazi, (2018) e Guerra et al., (2016) descreveram o óleo essencial de mentol como um agente antibacteriano, larvicida e antioxidante eficaz (Guerra et al., 2016; Shahbazi, 2018). Ribes et al., (2017) afirmou que o elevado conteúdo nos OEs em derivados fenólicos, como o eugenol, timol e outros, fazem das suas propriedades antifúngicas uma boa alternativa aos conservantes químicos sintéticos (Mihai & Popa, 2015; Ribes et al., 2017).

A lista de OEs reconhecidos como seguros, designação habitual “Generally Recognized as Safe” (“GRAS”) pela Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos da América é bastante extensa, o que faz com que possam ser utilizados em alimentos e embalagens alimentares como aditivos alimentares. Acresce ainda que têm um impacto positivo na capacidade de melhoria e/ou manutenção das propriedades nutricionais e organolépticas dos alimentos, e ao mesmo tempo que prolongando o tempo de vida útil e segurança dos mesmos, através da inibição do crescimento de microrganismos que causam a deterioração (Ribeiro-Santos et al., 2016).

Os OEs e os seus compostos são utilizados essencialmente associados a revestimentos edíveis, fortalecendo assim o aumento da sua eficácia (Choi et al., 2016; Hajji et al., 2018; Šuput et al., 2016).

2.1.2.1 Eugenol

O eugenol, 4-alil-2-metoxifenol (figura 2.4), é um composto fenólico de ocorrência natural encontrado em maior concentração no óleo de cravo-da-índia, ou cravinho, (*Syzygium aromaticum*), sendo considerado o composto principal (cerca de 85%) (Mihai et al., 2015; Modjinou et al., 2017; Woranuch et al., 2013); pode também ser encontrado em folhas de louro (*Laurus nobilis* L.) e de pimenta da Jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl) (Vieira, 2014).

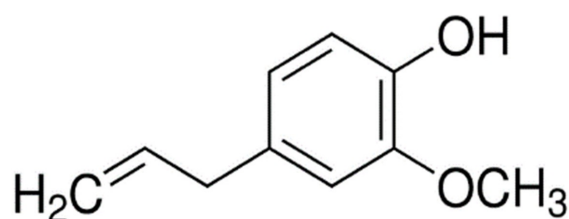


Figura 2.4 – Estrutura química do Eugenol (Mihai et al., 2015)

O cravo-da-índia é uma especiaria de aroma forte e sabor característico; é cultivado na Indonésia, sul da China, Madagáscar, Sri Lanka e Granada. É bastante utilizado na culinária, como condimento e especiaria, e na indústria farmacêutica. O seu óleo é extraído a partir do botão da flor e da folha, e é composto por uma elevada concentração de eugenol; apresenta propriedades analgésicas, antifúngicas e antiinflamatórias devido à presença deste composto. Tal facto foi comprovado por estudos onde as propriedades do eugenol são evidenciadas, como descreveram Mihai et al. (2015), Ribes e seus colaboradores (2017), Wiecznyńska e seus colaboradores (2018), entre outros.

O eugenol não apresenta citotoxicidade e portanto é considerado “GRAS” pela FDA (Hemaiswarya et al., 2010). A União Europeia aprovou a utilização de eugenol em 14 de Junho de 2013 pelo regulamento de execução (UE) n.º 546/2013 da comissão.

Relativamente ao seu modo de ação sobre os microrganismos, estudos prévios sugerem que a ação antibacteriana do eugenol ocorre por rutura da membrana citoplasmática, aumentando a sua permeabilidade. Para além disso, a sua natureza hidrofóbica faz com que o eugenol penetre na membrana celular bacteriana gram-negativa, alterando a estrutura celular e em consequência ocorre a fuga de componentes intracelulares. Estudos mais recentes apontam para a prevenção da ação enzimática das bactérias por parte do eugenol, onde o grupo hidroxilo da molécula deste se liga às proteínas. Tem a capacidade de inibição da ATPase, amílase, protéase e histidina descarboxilase, promovendo assim a lise celular (Devi et al., 2010). É ligeiramente solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos (Dewick, 2002).

As sua eficácia como agente antimicrobiano e antioxidante, fazem do eugenol um composto utilizado na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética e em embalagens ativas (Ribes et al., 2017; Woranuch et al., 2013).

2.1.2.2 Mentol

O mentol, (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol (figura 2.5), é um composto orgânico obtido a partir de óleos essenciais de mentas (*Mentha* L.) ou obtido sinteticamente. A principal forma deste composto que ocorre na natureza é (-)-mentol, à qual é atribuída a configuração (1R, 2S, 5R), podendo ser encontrado principalmente na hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*) (Dewick, 2002).

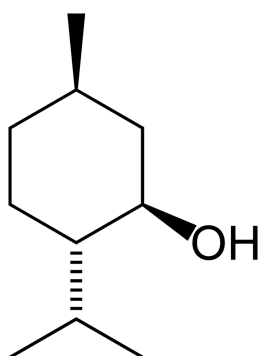


Figura 2.5 – Estrutura química do mentol (Dewick, 2002)

O género *Mentha* pertence à família Lamiaceae e encontra-se na Europa, Ásia, África, Austrália e América do Norte. Este género apresenta 25 espécies distintas e alguns híbridos, o que reflete uma grande variedade morfológica (Barros et al., 2015).

As espécies, em termos económicos, mais importantes são *Mentha aquatica*, *Mentha canadensis*, *Mentha spicata* e os híbridos *Mentha x gracilis*, *Mentha x villosonevata*; *Mentha x piperita*. Esta última vulgarmente designada por hortelã-pimenta é a espécie mais consumida e apresenta um sabor a menta muito característico, devido à presença na sua composição de mentol e dos seus isómeros (Curutchet et al., 2014).

À temperatura ambiente, o mentol encontra-se no estado sólido, entrando em fusão poucos graus acima desta. Apresenta-se como um composto ceroso, cristalino, com cor branca ou clara. Com um sabor e aroma refrescantes, é utilizado na culinária incluído nos chás, para fins medicinais, no tratamento de distúrbios digestivos, tratamento de náuseas, como analgésico e antiemético, e também na indústria

alimentar devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana. (Barros et al., 2015; Cowan, 1999; Isacan et al., 2002).

Existem registros na literatura de que os óleos essenciais de menta apresentam atividade antimicrobiana e antioxidante (Guerra et al., 2016; Shahbazi, 2018). Guerra e seus colaboradores (2016), afirmou que os óleos essenciais de *Mentha spp.*, principalmente o óleo essencial de *Mentha piperita*, são utilizados como agentes aromatizantes em alimentos e bebidas e são explorados devido às propriedades antioxidante e antimicrobianas que apresentam. Shahbazi e seus colaboradores (2018), identificou o óleo essencial de *Mentha spicata* como um agente antibacteriano, larvicida e antioxidante eficaz, podendo ser utilizado amplamente na indústria alimentar, inibindo o crescimento de microrganismos deteriorantes e, em consequência, promover o aumento de vida útil dos alimentos.

Apesar de já existirem registros a capacidade antioxidante e antimicrobiana do mentol, subsistem ainda algumas reservas acerca da sua utilização no contexto da conservação de alimentos. O seu sabor e aroma fortes podem encobrir as verdadeiras características organolépticas dos alimentos, o que o torna indesejável, ainda que apresente boas características em termos de conservação. Também subsistem dúvidas quanto ao metabolismo de ação deste composto da classe dos terpenos, o que requer futuras investigações para esclarecimento sobre o mesmo, já que apresenta um grande potencial (Curutchet et al., 2014).

2.2 Conservação de frutos

Com a crescente informação e interesse crescente para a importância da alimentação saudável, cada vez mais a população aposta na inclusão e aumento consumo de frutos frescos e minimamente processados, cujos benefícios são cada vez mais evidentes. Os frutos são elementos essenciais numa dieta alimentar equilibrada, fornecendo micro e macronutrientes essenciais, como vitaminas, nutrientes e fibras (Hussein et al., 2018). De modo a acompanhar a crescente procura de frutos frescos, é necessário garantir maiores quantidades disponíveis dos mesmos, durante um maior período de tempo, sem comprometer as características e qualidade.

Garantir a conservação dos frutos frescos não é um processo fácil. A aparência e o sabor são habitualmente os fatores qualitativos mais importantes, no entanto os consumidores mostram-se cada vez mais atentos a fatores como a segurança alimentar e o valor nutricional dos frutos frescos (Hussein et al., 2018).

Os frutos frescos são altamente perecíveis. Após a colheita, os seus processos metabólicos continuam levando à deterioração e à consequente perda de qualidade (Hussein et al., 2018). Esta deterioração pode dar-se por danos mecânicos ou por crescimento de microrganismos. No caso dos danos mecânicos, estes podem ocorrer em qualquer etapa do processamento que o fruto enfrenta, desde os processos de colheita no campo, processos de seleção e embalagem, transporte e manuseamento por parte do vendedor e do consumidor (Li et al., 2014). Os microrganismos, como fungos e bactérias, ocorrem nos frutos e levam à sua rápida deterioração; podem ocorrer por surtos de bactérias no campo, por qualquer lesão mecânica que permite o ataque de agentes patogénicos, em qualquer etapa do processamento, por contaminação pela água, na fase de lavagem. A contaminação com agentes patogénicos não só tem impacto económico, com o desperdício, mas também na saúde humana, no caso de consumo de frutos contaminados. Também a crescente preocupação com o meio ambiente e necessidade de racionalizar os recursos tornam os polímeros sintéticos, não biodegradáveis, cada vez menos uma opção para a conservação dos alimentos, neste caso dos frutos frescos (Kester et al., 1986; Liang et al., 2017) havendo necessidade de encontrar alternativas igualmente eficazes e não agressivas para o ambiente.

Com a crescente procura por frutos frescos todo o ano, torna-se crucial a procura por processos de conservação que permitam que os frutos mantenham as suas características por um maior período de tempo, recorrendo a outros materiais, dando-lhe um maior tempo de prateleira, evitando perdas e mantendo os consumidores satisfeitos.

A presente dissertação explora um desses processos de conservação de frutos frescos, a utilização de revestimentos edíveis à base de quitosano. Com este estudo, pretende-se caracterizar este tipo de revestimento no que respeita às suas características físicas e químicas, avaliar o seu impacto a nível sensorial, estudar a sua

capacidade de ação contra microrganismos que comumente proliferam nos frutos frescos e analisar o seu efeito em dois frutos distintos.

CAPÍTULO III
TEMA 1: FORMULAÇÕES

CAPÍTULO III. Tema 1: Formulações

3.1 Introdução

3.1.1 Objetivo: caracterização de diferentes formulações com quitosano

3.2 Enquadramento teórico

3.2.1 Formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano

3.2.1.1 Efeito da concentração de quitosano

3.2.1.2 Compostos químicos de óleos essenciais nas formulações

3.2.2 Avaliação das características das formulações

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Preparação das soluções de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano

3.3.2 Avaliação das propriedades físicas e químicas das diferentes formulações em solução

3.3.2.1 Densidade

3.3.2.2 Tensão Superficial

3.3.2.3 Reologia

3.3.2.4 UV-Vis (Absorção de luz e transparência das soluções)

3.3.3 Preparação das películas

3.3.4 Avaliação das propriedades físicas e químicas das diferentes formulações em película

3.3.4.1 Espessura

3.3.4.2 FTIR

3.3.4.3 Solubilidade

3.3.4.4 Permeabilidade ao vapor de água

3.4 Resultados e discussão

3.5 Conclusões

3.1 Introdução

Os revestimentos edíveis são bastante utilizados na conservação de alimentos. Mas é também de elevada importância caracterizar as diversas formulações que os originam. Com recurso a várias técnicas de análise físico-química, é possível caracterizar tanto soluções como películas resultantes das formulações à base de quitosano.

3.1.1 Objetivo

O objetivo principal do Tema I da presente dissertação consiste na caracterização física e química de várias formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano, tanto na forma de solução como na forma de películas.

3.2 Enquadramento Teórico

3.2.1 Revestimentos edíveis à base de quitosano

O quitosano apresenta-se como um biopolímero muito interessante, nomeadamente devido à sua capacidade de conservação no contexto agroalimentar. Devido ao seu carácter biodegradável, biocompatível, à sua atividade antimicrobiana, não toxicidade, propriedades físico-químicas versáteis e capacidade de formar revestimentos/películas, o quitosano é uma opção interessante enquanto parte de formulações de revestimentos edíveis (Liang et al., 2017).

Os revestimentos edíveis à base de quitosano podem ser incluídos na categoria de filme ativo, pois as suas propriedades antifúngicas, boas propriedades mecânicas e de barreira ao oxigénio, assim o ditam (Pinotti et al., 2007). Oferecem uma barreira defensiva contra as contaminações microbianas e a perda de humidade da superfície dos alimentos, prolongando a sua vida útil (Shiekh et al., 2013). Apresentam um grande potencial de controlo de perdas causadas por danos e de prolongamento do tempo de vida útil de alimentos (Fráguas et al., 2015). Foram testados em embalagens para carnes – frango, peru, porco – e para peixes, onde apresentaram um impacto positivo. Em frutos, a aplicação dos revestimentos edíveis à base de quitosano resultou em diminuição de perda de peso e diminuição da proliferação de microrganismos, retardando o amadurecimento (Fráguas et al., 2015, Homez-Jara et al., 2018).

A aplicação de revestimentos edíveis à base de quitosano é promissora para melhorar e prolongar o tempo de vida pós-colheita dos frutos. São considerados seguros, e conseguem formar um revestimento ideal na superfície do fruto, retardando o amadurecimento do mesmo (Azeredo, 2003, Suseno et al., 2014).

3.2.1.1 Efeito da concentração de quitosano

As formulações de revestimentos edíveis podem apresentar diferentes concentrações de quitosano. As concentrações mais utilizadas nos revestimentos para conservação de frutos estão entre 0.5% e 2% (m/V) (Casariego et al., 2009, Shiekh et al., 2013, Suseno et al., 2014, Valenzuela et al., 2015). Consoante a concentração de quitosano, as características dos revestimentos podem variar, tal como a sua eficácia de conservação dos frutos, tendo também o tipo de fruto um papel determinante.

Shiekh e seus colaboradores (2013), estudaram o efeito de várias concentrações de quitosano em dois frutos, Papaia (*Carica papaya* L.) e Lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), e concluíram que, para ambos os frutos, as concentrações de 1.5% e 2% foram as que apresentaram melhores resultados nos parâmetros avaliados, ressaltando a necessidade de um maior número de estudos sobre o tema, nomeadamente no que respeita ao impacto no sabor dos frutos (Shiekh et al., 2013).

Casariego e seus colaboradores (2009), utilizou três concentrações de quitosano, 1%, 1.5% e 2%, para a preparação de películas de quitosano e sua caracterização, analisando parâmetros como solubilidade em água, permeabilidade a gases, cor, resistência à tração (TS) e alongamento na rutura (E), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise de estabilidade térmica, microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e espessura dos filmes. Estes autores concluíram que a resistência à tração aumenta com o aumento da concentração de quitosano, o alongamento na rutura diminui com o aumento da concentração de quitosano e os valores de estabilidade térmica (T_m) também aumentaram com o aumento da concentração de quitosano (Casariego et al., 2009).

3.2.1.2 Compostos químicos de óleos essenciais nas formulações

Os compostos químicos de óleos essenciais apresentam a capacidade de manutenção e melhoria das propriedades nutricionais e organolépticas dos alimentos, sem nunca ocultar as suas características originais, enquanto conseguem também prolongar o tempo de vida útil e segurança dos mesmos, com a inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes (Ribeiro-Santos et al., 2016)

Tendo em conta as propriedades benéficas dos compostos químicos de óleos essenciais, estes são em muitos casos utilizados associados a revestimentos edíveis, reforçando assim a sua eficácia (Choi et al., 2016; Hajji et al., 2018; Šuput et al., 2016).

Choi e seus colaboradores (2016) publicaram um estudo onde combinou revestimentos de hidroxipropilmetilcelulose com compostos de óleos essenciais de orégãos e bergamota para aplicação em ameixas frescas “Formosa”, tendo obtido bons resultados sobre o potencial de conservação dos óleos essenciais associados a revestimentos edíveis (Choi et al., 2016). Guerra e seus colaboradores (2016), estudaram o efeito de revestimento de quitosano complementado com o composto

químico de óleo essencial *Mentha* em uva de mesa; dos resultados obtidos concluiu que este tipo de revestimentos apresentam potencial no tratamento pós-colheita para o controlo de infeções por fungos e posterior aumento de vida útil dos frutos (Guerra et al., 2016).

3.2.2 Avaliação das características das formulações

A caracterização das propriedades físicas e químicas e do comportamento das formulações, quer em solução quer em película, pode ser realizada por várias técnicas. Na presente dissertação optou-se por, na forma de solução, analisar os parâmetros: densidade, tensão superficial, comportamento reológico, absorção de luz e transparência das soluções. O estudo das características das películas foi efetuado pela determinação da espessura, solubilidade, permeabilidade e espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR).

Densidade

A densidade (g/cm^3) de uma substância corresponde à sua massa por unidade de volume. É representada pela letra grega ρ , e calcula-se pelo quociente entre massa e volume (equação 3.1). Para soluções, a densidade varia com a temperatura e com a pressão pelo impacto no volume do material (Serway et al., 2005).

$$\rho = \frac{m_{\text{solução}}}{V} \quad (3.1)$$

Tensão Superficial

A tensão superficial pode ser considerada como o resultado do desequilíbrio das forças que atuam sobre as moléculas da superfície e as moléculas no interior da solução (Casariego et al., 2009). É um fenómeno visível em interface líquido-gás, onde o líquido se comporta como se estivesse coberto por uma membrana elástica, sob tensão, demonstrando tendência para se contrair. Este fenómeno ocorre devido à ação das forças coesivas sobre as moléculas ser diferente no caso de se encontrarem no seio do líquido ou à superfície do mesmo. As moléculas presentes no interior do líquido são atraídas por forças iguais em todas as direções, ao contrário das moléculas que se encontram na superfície, que são atraídas para o interior do líquido, mais denso, com

forças superiores às forças que atraem para a fase gasosa, menos densa. Ocorrendo este desequilíbrio de forças, as moléculas da superfície tendem a migrar para o interior do líquido, resultando na contração da superfície.

Para a medição da tensão superficial, o método mais utilizado é o método do anel de *du Nouy*. Neste método, com recurso a um tensiómetro de *du Nouy*, é medida a força necessária para destacar o anel de platina, de diâmetro conhecido, que se encontra mergulhado na solução que se pretende analisar. O valor medido aquando do destacamento do anel da solução corresponde ao valor da tensão superficial (Toshev et al., 2006).

Reologia

A caracterização e compreensão da reologia de alimentos é de elevada importância para variados aspetos da tecnologia e ciência dos mesmos, como na padronização de matéria-prima e no desenvolvimento de novos produtos. No âmbito das formulações à base de quitosano, a caracterização reológica surge para caracterizar a facilidade de manuseamento das formulações, como na aplicação das formulações aos alimentos, com diferentes superfícies, e na retirada das soluções nos recipientes (Fischer et al., 2011).

Define-se reologia como a ciência que estuda a deformação e fluidez de materiais, resultados de uma força externa, isto é, o comportamento de materiais em reação a uma tensão sobre eles aplicada (Joyner, 2018). Aquando da aplicação de uma força tangencial, o material sofre uma deformação que pode ser permanente ou não; no caso de ser permanente, a deformação mantém-se mesmo depois de retirada a força, no caso de não ser permanente, ser elástica, o material volta à sua forma inicial quando a força é retirada. Com a caracterização reológica é possível quantificar as relações funcionais entre deformação, tensão e as propriedades reológicas, viscosidade, elasticidade ou viscoelasticidade. (Fischer et al., 2011)

Na avaliação do comportamento reológico de materiais, dependendo do seu estado físico, há uma propriedade associada ao material. Quando falamos em materiais líquidos a propriedade associada é a viscosidade enquanto que no caso de materiais sólidos a propriedade associada é a elasticidade. Existem também materiais que

apresentam um comportamento intermédio entre sólido e líquido, como espumas e suspensões, e nesse caso é associada a viscoelasticidade.

A viscosidade é uma propriedade física que caracteriza um fluido quanto à sua capacidade de resistência ao escoamento, ou seja, a capacidade de resistência que um líquido apresenta em relação ao fluxo que é induzido pela tensão aplicada. É uma propriedade variável com vários parâmetros, como natureza do material, concentração, pressão, temperatura, tempo e taxa de corte, pelo que estes devem ser bem definidos e constantes aquando da definição da viscosidade. A viscosidade aparente corresponde ao valor medido em cada ponto, através de tensão de corte constante (Castro et al., 2001; Leslie et al., 2001).

Aquando do estudo do comportamento reológico de um material, as duas principais grandezas a considerar são a tensão de corte ("*shear stress*") e a taxa de corte ("*shear rate*"). A primeira é a tensão gerada por forças aplicadas ao material, por unidade de área, com capacidade de provocar uma deformação no mesmo e é expressa em Pascal (Pa). A taxa de corte corresponde ao gradiente de velocidades entre os dois planos e o escoamento ou deformação, por unidade de tempo, é expressa em s^{-1} (Ricardo-Rodrigues, 2016).

Em termos de comportamento reológico, os fluidos podem ser classificados como newtonianos e não-newtonianos (Leslie et al., 2001). Os fluidos newtonianos apresentam uma relação linear entre a tensão e a taxa de corte, apresentando um comportamento de fluido ideal obedecendo à lei de Newton, como por exemplo a água. Nos fluidos com este comportamento a viscosidade é constante e independente da tensão de corte.

Os fluidos não-newtonianos não apresentam esta linearidade, ou seja, a tensão de corte não se verifica diretamente proporcional à taxa de corte. Neste tipo de fluido é possível observar dois tipos de comportamentos, reoespessante (ou dilatante) e pseudoplástico. O primeiro, pouco comum, é caracterizado por apresentar um aumento da tensão de corte mais rápido do que para um material newtoniano, pelo que a viscosidade aparente aumenta com o aumento da taxa de corte, como as areias movediças. O segundo, como os polímeros fundidos, que ocorre com maior frequência e caracteriza-se por apresentar uma tensão de corte não proporcional à taxa de corte, sendo que a viscosidade aparente não vai ser constante e vai diminuir com o aumento

da taxa de corte. Neste tipo de fluido, a viscosidade vai variar em consequência da ação aplicada ao fluido, seja ela agitação, escoamento ou repouso (Brehm, 2014; El-hefian & Yahaya, 2010; Leslie et al., 2001).

Absorção de luz e transparência (UV-Vis)

As propriedades óticas das formulações são de elevada importância para definir a funcionalidade das películas que se serão formadas nos alimentos, pois podem afetar a aparência do alimento que revestem, sendo este um fator importante no controlo de qualidade (Al-Hassan et al., 2012).

A espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis) refere-se à espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível do espectro. Nesta técnica é medida a quantidade de luz absorvida pela amostra em análise, relacionando-se esta com a concentração do analito (Prettyman, 2007). A absorção de radiação UV-Vis está relacionada com o facto de as moléculas apresentarem eletrões que podem passar para níveis de energia superiores, em função da absorção de energia (Skoog et al., 2007).

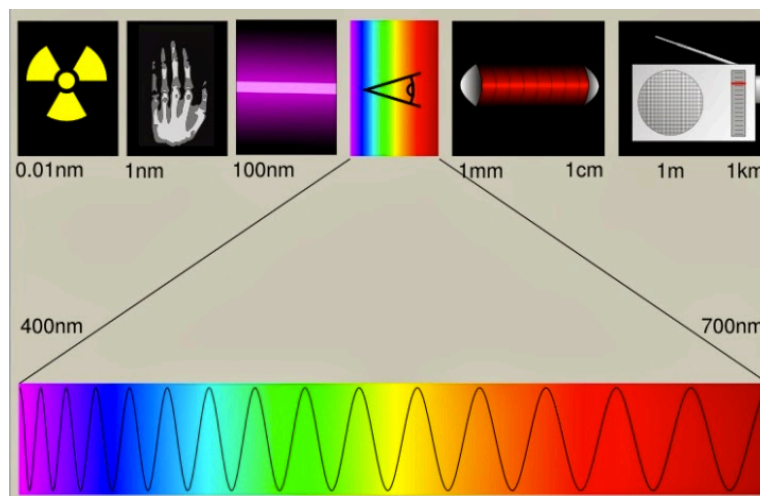


Figura 3.1 – Espectro eletromagnético

Para a determinação quantitativa da concentração de substâncias em solução que absorvem radiação, é aplicada a lei de Lambert-Beer. De acordo com esta lei, a absorvância (A) é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente (c) e ao caminho ótico (b) do meio.

$$A = \epsilon bc = \log \frac{P_0}{P} \quad (3.2)$$

FTIR

A técnica de espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) é utilizada para obtenção de espectros de absorção ou emissão de um sólido, líquido ou gás. Esta técnica faculta informações acerca dos grupos funcionais presentes na estrutura da substância em análise, sendo muitas vezes utilizada para a identificação de compostos e investigação da sua composição química (Bhunja, 2008). O FTIR usa a região do espectro eletromagnético entre 4500 e 400cm⁻¹.

Solubilidade

A solubilidade de uma película pode dar indicação acerca da sua integridade em sistemas aquosos, indicando também qual a sua resistência à água e a sua biodegradabilidade, um fator de extrema importância para os revestimentos e películas edíveis. Quanto maior for a solubilidade da película menor resistência à dissolução ela tem ; isto faz com que se possa dissolver quando em contacto com uma solução aquosa, perdendo-se o seu efeito (Augusto, 2013, Pinheiro et al., 2010).

Os fatores que mais afetam a solubilidade de uma película em água são a estrutura dos polissacarídeos e a presença de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos na sua composição (Pinotti et al., 2007).

Permeabilidade ao vapor de água

A par da solubilidade, a permeabilidade é também um fator bastante relevante para as películas edíveis. A taxa de permeabilidade ao vapor de água fornece informação acerca da propriedade de barreira das películas.

Quanto menor for a taxa de permeabilidade apresentada pela película, melhor vai ser a sua propriedade de barreira ao vapor de água. Isto vai impedir as trocas gasosas entre o produto revestido e o meio, o que contribui para a manutenção das características organolépticas do produto.

A permeabilidade está diretamente relacionada com a solubilidade das películas. A estrutura dos polissacarídeos e a presença ou ausência de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos na constituição das mesmas vão influenciar também este parâmetro (Pinotti et al., 2007).

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Preparação das formulações em solução

Para a caracterização dos revestimentos foram estudadas duas concentrações de quitosano, 1% e 1.5% dissolvido em ácido acético a 0.5%, com e sem adição de surfactante Tween80[®], com e sem compostos químicos de óleos essenciais, eugenol e mentol, conforme é mostrado na tabela 3.1. De notar que foram testadas outras concentrações de quitosano, tendo sido seleccionadas estas por serem as que apresentaram melhores resultados.

Tabela 3.1 – Resumo das formulações analisadas ao longo deste trabalho

Ácido acético 0.5%	Ácido Acético 0.5% + Eugenol	Ácido Acético 0.5% + Mentol	
Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5%	Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5% + Eugenol	Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5% + Mentol	Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5% + Eugenol + Mentol
Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®]	Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	Quitosano 1% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol + Mentol
Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5%	Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5% + Eugenol	Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5% + Mentol	Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5% + Eugenol + Mentol
Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®]	Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	Quitosano 1.5% + Ácido Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol + Mentol

A solução de quitosano a 1% (m/V) foi preparada em água acidificada com ácido acético a 0.5%, isto porque o quitosano não apresenta solubilidade em água, para um volume total de solução de 200mL de solução; adicionou-se depois 0.15% (m/V) de Tween80[®] à solução, relativamente ao volume e massa de quitosano (Romanazzi et al., 2009). A solução foi colocada sob agitação, a uma temperatura de 25°C, durante cerca

de 1 hora (Romanazzi et al. 2007; Silva, 2010). Foi repetido o procedimento para as restantes soluções, com as adições e ajustes necessários.

A soluções com compostos químicos de óleos essenciais, eugenol e mentol, foram preparadas como já referido e posteriormente adicionados os compostos, na concentração de 0.15%; no caso do eugenol na forma líquida e do mentol na forma de pó (Guerra et al., 2016, Guerreiro et al., 2015).

O quitosano utilizado foi o de baixa massa molecular fornecido pela Sigma-Aldrich Co., com um grau de desacetilação superior a 85% (ref. 448869-250G). Segundo Silva, 2010, o quitosano de baixa massa molecular apresenta um elevado potencial de controlo do fungo *Botrytis spp.*, tem menor permeabilidade ao vapor de água e menor viscosidade, para além de estar autorizado o seu uso para fins alimentares, pelo que foi selecionado para este trabalho. Foi utilizado ácido acético glacial fornecido pela Panreac, (ref.131008.1611). O surfatante Tween80[®] foi fornecido pela Sigma-Aldrich Co., (ref. P1754-1L). O eugenol e o mentol foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co., (ref. E51791-100G. e ref. M2772-100G-A).

3.3.2 Avaliação das propriedades físicas e químicas das formulações em solução

3.3.2.1 Densidade

A densidade das formulações, sob a forma de solução, foi medida com recurso a picnometria. Nesta técnica são utilizados picnómetros, como o representado na figura 3.2, e uma balança analítica EX324 Ohaus Explorer[®] da Ohaus Corporation (Parsippany, Nova Jersey, Estados Unidos).

Em primeiro lugar foi determinado o volume de cada picnómetro através do uso de água, para tal encheu-se cada picnómetro e pesou-se a água. O volume foi determinado sabendo que o valor da densidade à temperatura de trabalho (18.2°C) é de 0.998558g/cm³. A densidade das soluções foi determinada pelo enchimento do picnómetro com a solução e a massa determinada por pesagem.



Figura 3.2 – Picnómetro

Foram realizadas três repetições de cada medição, sendo calculado o valor da densidade com base nas seguintes formulas:

3.3.2.2 Tensão Superficial

A tensão superficial das soluções foi avaliada com recurso a um tensiómetro K6, Krüss GmbH, Alemanha, utilizando o método do anel de du Nouy, apresentando na figura 3.3.

As avaliações foram realizadas a uma temperatura de 21°C e em triplicado.

A amostra foi colocada num recipiente circular de vidro e o anel de platina do tensiómetro mergulhado na solução. De seguida o anel é movido sendo o valor da tensão superficial, em mN/m, lido no mostrador no momento em que o anel se separa da solução, como representado na figura 3.4.

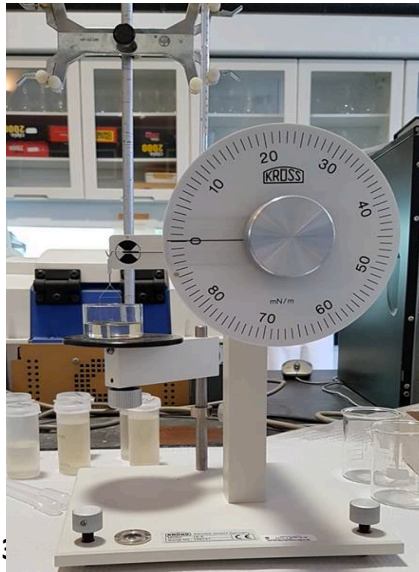


Figura 3.3 – Tensiômetro, com utilização de anel de du Nouy

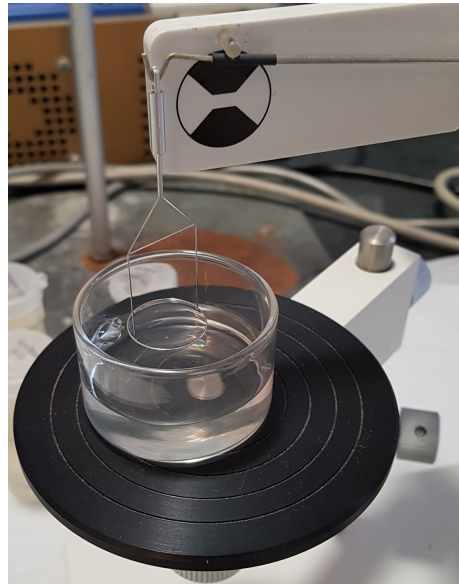


Figura 3.4 – Medição do valor da tensão superficial instantânea em que o anel se separa da superfície do líquido

Para avaliação do comportamento reológico dos revestimentos à base de quitosano, foram utilizadas soluções com concentrações de 1% e 1.5%, com e sem adição de surfactante Tween80[®]. No caso desta avaliação considerou-se pertinente a caracterização da solução de quitosano com concentração de 2%, com e sem adição de surfactante Tween80[®], pois previu-se um ponto de viragem do estado das amostras entre 1.5% e 2%.

Realizaram-se análises de viscosimetria a 25°C e a 10°C e análises da oscilação a frequência constante, a 25°C.

No caso da avaliação da viscosimetria foi imposta uma taxa de deformação crescente, de 0.01 a 100.00 s⁻¹. Aquando da avaliação da oscilação a frequência constante, esta foi de 1Hz.

O equipamento utilizado foi um reómetro Kinexus Pro da Malvern, Malvern Instruments Lda, Uk, representado na figura 3.5, e o software Kinexus rSpace. A geometria utilizada foi, para todas as soluções, foi a geometria de prato cone. Para as soluções de concentrações de 1% e 1.5% foi utilizada a geometria de cone CP1/60 (ângulo de 1°, diâmetro de 60 mm e GAP de 0,033mm). No caso das soluções com concentração de 2% foi utilizada a geometria de cone CP4/40 (ângulo de 4°, diâmetro de 40 mm e GAP de 0,15mm).

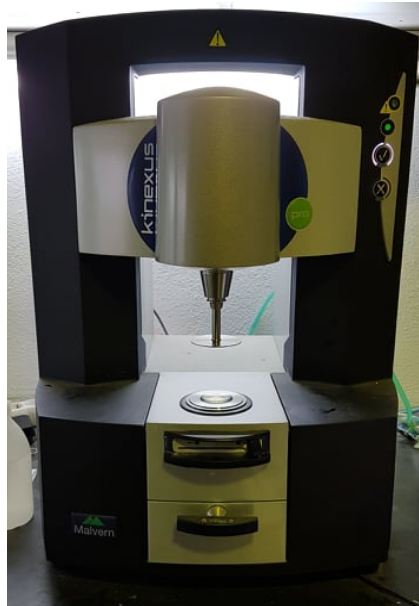


Figura 3.5 – Reômetro Kinexus Pro da Malvern

3.3.2.4 UV-Vis (Absorção de luz e transparência das soluções)

O procedimento realizado foi uma adaptação do método publicado por Al-Hassan e Norziah, 2012. No procedimento executado foram medidas as propriedades das soluções de revestimentos edíveis a um comprimento de onda de 550 nm num espectrofotômetro Thermo, mostrado na figura 3.6, utilizando o software VISIONPro. A transparência das soluções foi estimada pela aplicação da equação 3.5, onde A é a absorvância e x a espessura da célula de quartzo onde se encontrava a solução de revestimento edível a analisar (10mm). No método original x é a espessura do filme.



Figura 3.6 – Espectrofotômetro (Thermo)

$$T = \frac{A_{550}}{x} \quad (3.3)$$

3.3.3 Preparação das películas

Para a preparação das películas formuladas, foram colocados 5ml de solução de revestimento edível à base de quitosano, previamente preparada como descrito em 3.3.1, numa placa de Petri. Foram realizados testes prévios de modo a calcular o volume a colocar nas placas de modo a que fosse possível obter uma película uniforme. As placas de Petri foram colocadas em estufa, a 30°C, até as películas estarem totalmente secas, entre 5 e 7 dias . (Fráguas et al., 2015, Liang et al., 2017, Šuput et al., 2016).

3.3.3.1 Espessura

A avaliação da espessura das películas edíveis foi realizada com recurso a fotografias microscópicas das películas preparadas previamente utilizando um microscópio eletrónico Leica CME equipado com câmara digital Dino-Eypiece AM7023, com ampliação de 40 vezes, imagens foram obtidas através do Software DinoCapture 2.0 utilizando uma ocular com escala. As medições foram realizadas em triplicado e os valores expressos em milímetros (mm).

3.3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier foi realizada para análise dos grupos funcionais presentes nas películas, de modo a analisar as interações que ocorrem entre os compostos constituintes das formulações. As amostras de película foram analisadas com recurso a um espectrofotómetro Spectrum Two da PerkinElmer entre 400 e 4000 cm^{-1} (Liang et al., 2017, Pinotti et al., 2007).

3.3.3.3 Solubilidade em água

A solubilidade das películas em água foi calculada com adaptação do protocolo de Hosseini e colaboradores, 2013. Pesou-se um pedaço de película, com cerca de 4 cm^2 de área, correspondendo este valor ao peso seco inicial (W_i). Colocou-se a película imersa em 30 ml de água destilada, sujeita a agitação suave, durante 24 horas a uma temperatura ambiente (entre 22°C e 25°C). A solução resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman, de modo a haver recuperação da matéria insolúvel. O filtro com a matéria insolúvel foi seco em estufa, a 105°C, durante 24 horas. Foi depois pesado, correspondendo este valor ao peso seco final (W_f). Com os valores dos pesos secos inicial

e final, e através da equação apresentada em seguida (equação 3.6), é possível calcular a solubilidade da película, em percentagem.

$$SF(\%) = \left(\frac{(W_i - W_f)}{W_i} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

O procedimento foi realizado em triplicado e todas as formulação de películas em estudo (Hosseini et al., 2013, Pinotti et al., 2007).

3.3.3.4 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água das películas foi calculada de acordo com o método gravimétrico da água descrito na norma ASTM E96-95 (ASTM, 1995). Num recipiente de plástico depositou-se água destilada (HR 100%, 2800 Pa), completando $\frac{3}{4}$ do recipiente, ficando $\frac{1}{4}$ do mesmo livre até à película, que se encontrava no topo do recipiente, agregada à tampa do mesmo, com uma área exposta de 19 ± 6 mm. O recipiente foi pesado e depois colocado num dessecador com solução saturada de NaCl (HR 75.7%, 2119.6 Pa). Deste modo é possível medir a taxa de transmissão de vapor de água através da película, pois esta estava exposta a uma humidade relativa de 100% fornecida pela água destilada dentro do recipiente, por um lado, e a uma humidade relativa de 75.7% fornecida pela solução de NaCl saturada, por outro. Após 1 hora no dessecador, tirou-se o recipiente e pesou-se. Voltou a colocar-se o recipiente no dessecador e posteriormente foram realizadas pesagens a cada 30 minutos, durante 4 horas, havendo um total de nove valores pesados. O método foi repetido para a avaliação de todos as formulações de películas.

Fazendo o declive da perda de peso vs tempo de ensaio obteve-se uma regressão linear, e através da equação (equação 3.7) apresentada por Hosseini e colaboradores, 2013, obtém-se o valor da permeabilidade ao vapor de água.

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta P} \quad (3.5)$$

Na equação, WVP corresponde à permeabilidade ao vapor de água, expressa em (kg.m/s.m².Pa); (WVTR corresponde à taxa de transferência de vapor de água,

determinada pelo declive da reta a dividir pela área da película exposta; L corresponde à espessura média das películas e ΔP corresponde à variação de pressão parcial entre as duas fases da película (Hosseini et al., 2013, Pinotti et al., 2007).

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Propriedades físicas e químicas das diferentes formulações em solução

3.4.1.1 Densidade

Os resultados obtidos das medições da densidade das diferentes formulações estão apresentadas na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores de densidade das formulações em estudo medidas a 18.2°C

	Densidade (g/cm ³)
Ácido acético 0.5%	1.037513 ± 0.000021
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5%	1.002585 ± 0.000004
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®]	1.001347 ± 0.000005
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5%	1.005170 ± 0.000009
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®]	1.006272 ± 0.000015
Á. Acético 0.5% + Eugenol	1.036976 ± 0.000016
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Eugenol	1.003717 ± 0.000004
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	1.001407 ± 0.000003
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Eugenol	1.008832 ± 0.000014
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	1.005908 ± 0.000074
Á. Acético 0.5% + Mentol	1.002020 ± 0.000029
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Mentol	1.001593 ± 0.000009
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	1.004931 ± 0.000023
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Mentol	1.0043848 ± 0.000025
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	1.006239 ± 0.000020
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Eugenol + Mentol	1.001859 ± 0.000035
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol + Mentol	1.003652 ± 0.000013
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Eugenol + Mentol	1.004258 ± 0.000009
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol + Mentol	1.007042 ± 0.000058

Todas as formulações apresentam densidade superior à da água que para a temperatura de trabalho, 18.2°C, é de 0.998558g/cm³.

A concentração de quitosano nas formulações tem como impacto um acréscimo do valor da densidade. Se compararmos as formulações com igual composição em todos os restantes componentes, mas concentração diferente de quitosano, podemos ver que

nas formulações com concentração de quitosano 1.5% a densidade é sempre superior às formulações com concentração de 1%. Este facto foi verificado também por Singh e colaboradores (2014), no seu estudo sobre revestimentos edíveis à base de quitosano.

Quando às formulações foi adicionado o composto químico eugenol, em ambas as formulações com as duas diferentes concentrações de quitosano verificou-se um aumento dos valores de densidade, em comparação com os valores de densidade das formulações apenas com quitosano. Por outro lado, a adição de mentol tem como resultado uma diminuição da densidade das formulações. Quando ocorreu a junção dos dois compostos na mesma formulação, verifica-se uma diminuição da densidade em comparação com as formulações compostas apenas por quitosano, em ambas as concentrações estudadas. Assim, podemos concluir que o efeito do mentol se sobrepõe ao do eugenol, resultando em valores mais baixos de densidade destas formulações.

No que respeita ao efeito do Tween80[®] na densidade das soluções, os resultados obtidos não são sempre coerentes. Quando comparadas as formulações de quitosano 1% + ácido acético 0.5% e quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®], verificamos que a densidade diminui; já no caso das formulações quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®], ocorre um aumento da densidade. Podemos também observar uma diminuição da densidade quando às formulações se adiciona eugenol e com adição de eugenol e mentol quando comparando as formulações com e sem Tween80[®]. No caso das formulações com surfactante às quais se adicionou mentol, os valores de densidade aumentaram. Singh e seus colaboradores (2015) concluíram que a densidade de uma película de quitosano diminui com o aumento da concentração de surfactante (Singh et al., 2015).

3.4.1.2 Tensão Superficial

Os valores de tensão superficial, em mN/m, para as formulações estudadas são apresentados na tabela 3.3. Como se pode observar foram também analisadas as soluções de ácido acético 0.5%, ácido acético 0.5% + mentol e ácido acético 0.5% + eugenol pois, apesar de não apresentarem quitosano nas suas formulações, são comparáveis entre elas, no sentido de se observar o efeito dos compostos químicos dos óleos essenciais sem estarem agregados ao quitosano. O ácido acético 0.5% apresenta

um valor bastante superior quando sozinho (63.0 ± 2.6 mN/m) em comparação ao valor que apresenta quando agregado aos compostos eugenol (42.2 ± 0.8 mN/m) e mentol (42.3 ± 0.3 mN/m), sendo estes idênticos.

Relativamente às formulações com quitosano, e analisando os valores obtidos para todas, a que apresenta um maior valor de tensão superficial é a solução de quitosano 1% + ácido acético 0.5%, com 64.5 mN/m.

A primeira diferença e mais evidente nos valores obtidos está relacionada com a presença de Tween80[®], onde as formulações com a presença do surfactante a apresentarem valores inferiores às similares mas sem a presença do mesmo. No caso da formulação de quitosano 1% + ácido acético 0.5%, esta apresenta um valor de 64.5 ± 1.8 mN/m enquanto que a mesma com Tween80[®] apresenta um valor de 43.5 ± 0.5 mN/m. De notar que valores menores de tensão superficial indicam que as formulações apresentam melhor molhabilidade, com uma potencial melhor capacidade de aplicação por poder originar uma aplicação mais correta e homogénea dos revestimentos, tal como referiu Pinheiro e seus colaboradores.

Relativamente às diferenças entre as concentrações de quitosano, 1% e 1.5%, não se registam grandes diferenças, registando-se valores muito idênticos, à exceção das formulações de quitosano 1% + ácido acético 0.5% (64.5 ± 1.8 mN/m) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% (58.5 ± 0.0 mN/m), onde ocorre uma grande variação. Os valores idênticos entre concentrações sugere que as formulações atingiram a concentração micelar crítica, não aceitando mais moléculas na sua constituição.

A adição dos compostos químicos de OEs eugenol e mentol levaram a uma diminuição da tensão superficial das formulações, o que indica um aumento da capacidade molhante.

Tabela 3.3 – Valores de tensão superficial, em mN/m, para uma temperatura de 21°C, das diferentes formulações em estudo

	Valor de Tensão Superficial (mN/m)
Ácido acético 0.5%	63.0 ± 2.6
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5%	64.5 ± 1.8
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®]	43.5 ± 0.5
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5%	58.5 ± 0.0
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®]	44.3 ± 0.8
Á. Acético 0,5% + Eugenol	42.2 ± 0.8
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Eugenol	46.7 ± 0.3
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	40.0 ± 0.0
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Eugenol	43.7 ± 0.6
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	40.8 ± 0.3
Á. Acético 0.5% + Mentol	42.3 ± 0.3
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Mentol	44.8 ± 0.8
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	37.7 ± 0.3
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Mentol	42.7 ± 0.3
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	37.3 ± 0.3
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Eugenol + Mentol	41.8 ± 0.3
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol + Mentol	38.8 ± 0.3
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Eugenol + Mentol	45.7 ± 0.6
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 + Eugenol + Mentol	39.0 ± 0.0

3.4.1.3 Reologia

Os resultados obtidos da caracterização reológica, através de análises de viscosimetria e análises de oscilação, permitiram-nos verificar se existem e quais são as diferenças existentes entre as soluções causadas pelas concentrações, adição de Tween80[®] e pela temperatura.

Os testes de oscilação permitiram o cálculo do módulo complexo G^* , módulo elástico G' e módulo viscoso G'' de cada uma das soluções. Como se pode verificar pelos gráficos em anexo 1, a resistência à deformação é praticamente nula ou muito pouco significativa, tal como as componentes viscosa e elástica, o que reforça que as soluções se comportam como líquido. Sendo assim, a viscosimetria foi considerada como a avaliação mais pertinente para o enquadramento do trabalho.

As soluções de quitosano a 1% e 1.5%, com e sem Tween80[®] apresentaram comportamento de fluido newtonianos, como se pode verificar na figura 3.5. Verificou-se que, independentemente da concentração de quitosano, temperatura e presença ou não de surfactante, as soluções apresentaram comportamento de fluido newtoniano. No entanto, nota-se uma tendência para o comportamento não newtoniano para taxas de corte mais baixas com a solução de concentração 1.5% de quitosano. Para explorar este efeito foi efetuada a avaliação de uma solução com concentração de quitosano de 2%.

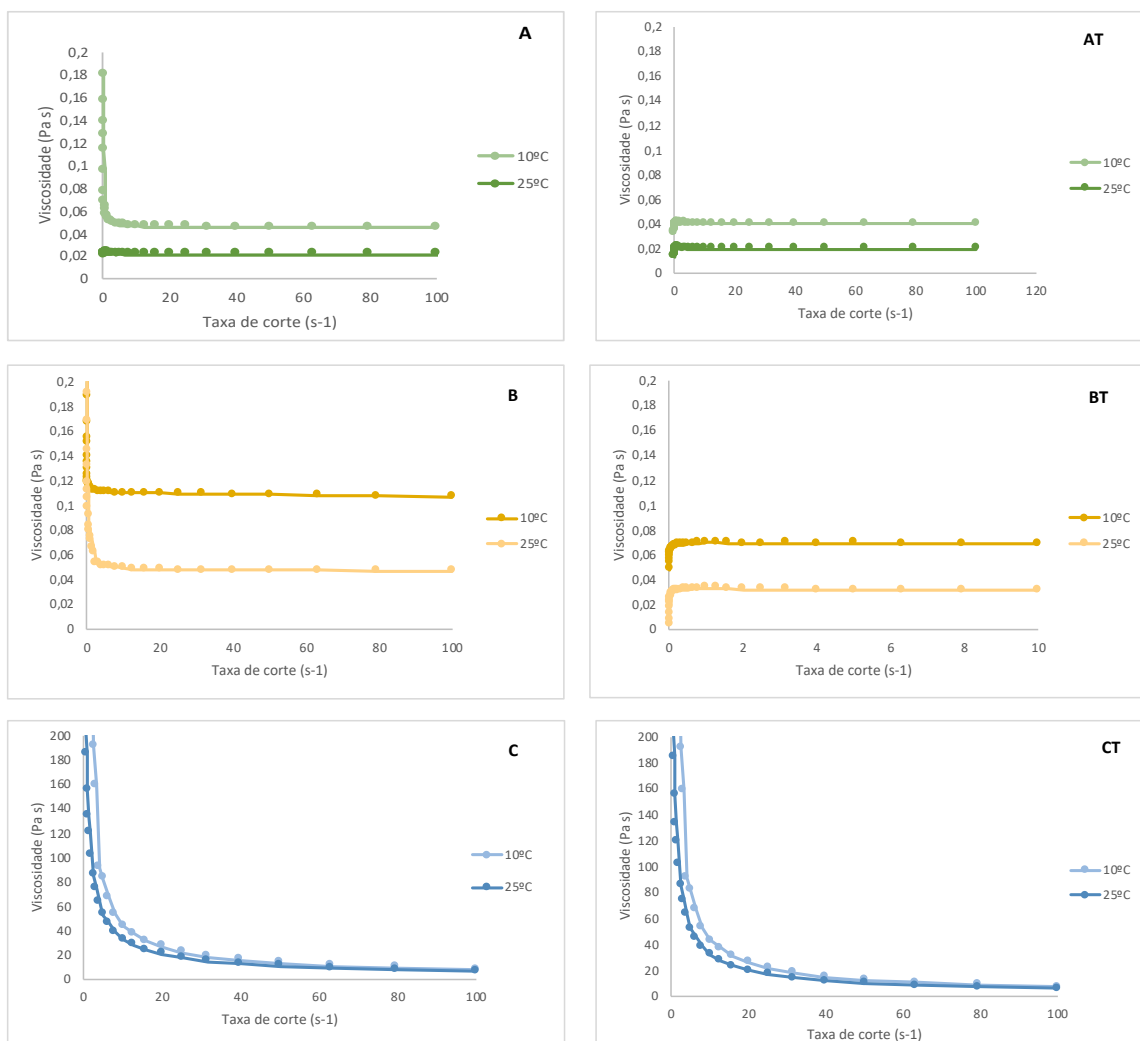


Figura 3.7 – Efeito da taxa de corte (s⁻¹) e da temperatura na viscosidade (Pa s) de soluções de quitosano com diferentes formulações; A: quitosano a 1% com ácido acético 0.5%; AT: quitosano a 1% com ácido acético 0.5% e Tween80[®]; B: quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5%; BT: quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5% e Tween80[®]; C: quitosano a 2% com ácido acético 0.5%; CT: quitosano a 2% com ácido acético 0.5% e Tween80[®].

A formulação com concentração de 2% em quitosano, com e sem surfactante, apresenta um comportamento diferente, do tipo não newtoniano pseudoplástico (reofluidificante). Neste caso, a taxa de deformação leva a uma diminuição da viscosidade, semelhante para as duas temperaturas (El-hefian & Yahaya, 2010). É possível também depreender que, tal como afirmou El-hefian & Yahaya, 2010, maiores concentrações apresentam valores mais elevados de viscosidade. Tal como já relatado por Pereira, 2010, com o aumento da concentração, o efeito reofluidificante da solução fica mais forte. No mesmo estudo, o autor afirma que a diminuição do valor da viscosidade com o aumento da taxa de deformação pode dever-se à ruptura das interações e entrelaçamentos moleculares, ou seja, a taxa a que as dissociações moleculares ocorrem excede o ritmo a que os novos entrelaçamentos pode refazer-se, ocorrendo um aumento da mobilidade das cadeiras poliméricas e uma diminuição da viscosidade da solução.

A figura 3.7 mostra que é possível observar uma tendência à estabilização dos valores de viscosidade com o aumento da taxa de corte, em todas as soluções estudadas, sendo verificado um comportamento newtoniano para taxas de corte mais elevadas. Este efeito foi também observado por Hwang et al., 2001, Lisboa et al., n.d. e Pereira, 2010. Relativamente à influência da temperatura na viscosidade, para as soluções de quitosano a 1% e 1.5%, verifica-se uma relação inversa entre a viscosidade e a temperatura, para 25°C são obtidos valores de viscosidade menores do que a 10°C, para os mesmos valores de taxa de corte, tal como seria de esperar. Quando a concentração de quitosano é 2%, verifica-se uma influência muito reduzida da temperatura, sendo que não existem alterações a taxas de corte mais elevadas (El-hefian & Yahaya, 2010). A introdução de Tween80[®] apenas tem impacto no caso da solução de quitosano a 1.5%, onde diminui, ainda que ligeiramente, os valores de viscosidade em relação à solução na ausência do surfactante.

Os gráficos de tensão de corte em função da taxa de corte, que também fornecem informação acerca do tipo de fluido em avaliação, encontram-se em anexo (anexo 2).

Futuramente deverão ser analisadas reologicamente as formulações com compostos químicos de OEs eugenol e mentol.

3.4.1.4 UV-Vis (Absorção de luz e transparência das soluções)

A avaliação do comportamentos das soluções no que respeita à sua capacidade de absorção de luz e transparência foi realizada por espectroscopia de UV-Vis. A absorvância define-se como a capacidade de absorção de luz, a determinado comprimento de onda, por parte de um material. Quanto maior for o valor de absorvância apresentado pelo material, maior será a sua capacidade de absorção de luz e, conseqüentemente, menos luz vai transmitir.

As figuras 3.8 a 3.11 mostram os espectros de absorção obtidos para as formulações estudadas.

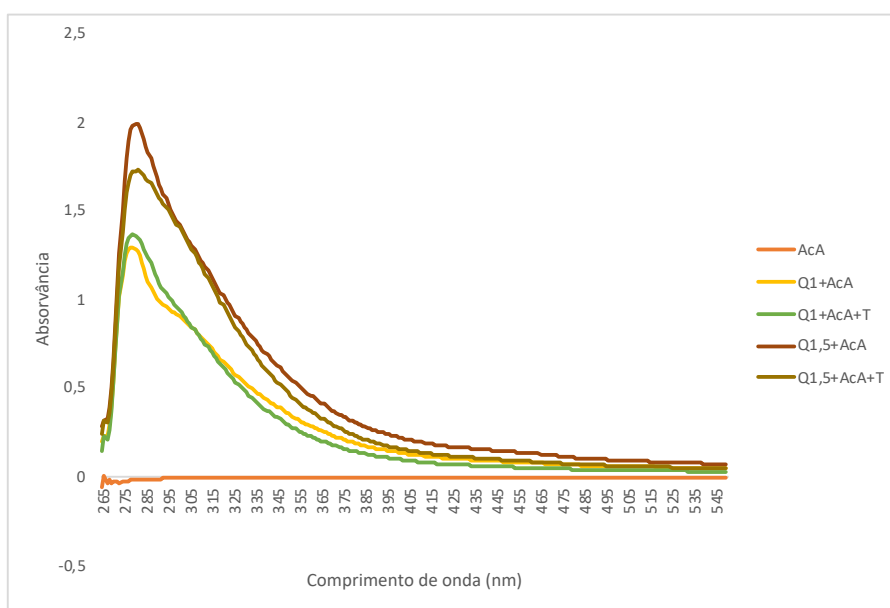


Figura 3.8 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5% (AcA), quitosano 1%+ácido acético 0.5% (Q1+AcA), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80[®] (Q1+AcA+T), quitosano 1.5%+ácido acético 0.5% (Q1.5+AcA) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80[®] (Q1.5+AcA+T)

Todas as formulações representadas nos espectros da figura 3.8 apresentam o mesmo comportamento com a presença de uma banda de absorção com o máximo situado a 290 nm. A solução de ácido acético foi também analisada para comparação e verificação da influência da presença deste ácido na absorção de luz. Como se pode ver na figura 3.8 esta solução não apresenta qualquer banda de absorção na gama estudada.

Podemos observar que, tal como seria de prever, quanto mais concentrada for a solução em quitosano maior será a sua capacidade de absorção de luz. As formulações com uma concentração de quitosano de 1.5% apresentaram maior absorvância em comparação com as formulações com uma concentração de quitosano de 1%. A

presença do surfactante Tween80[®] induz uma ligeira diminuição do valor da absorvância, sendo este impacto mais visível para a formulação de concentração 1.5% em quitosano.

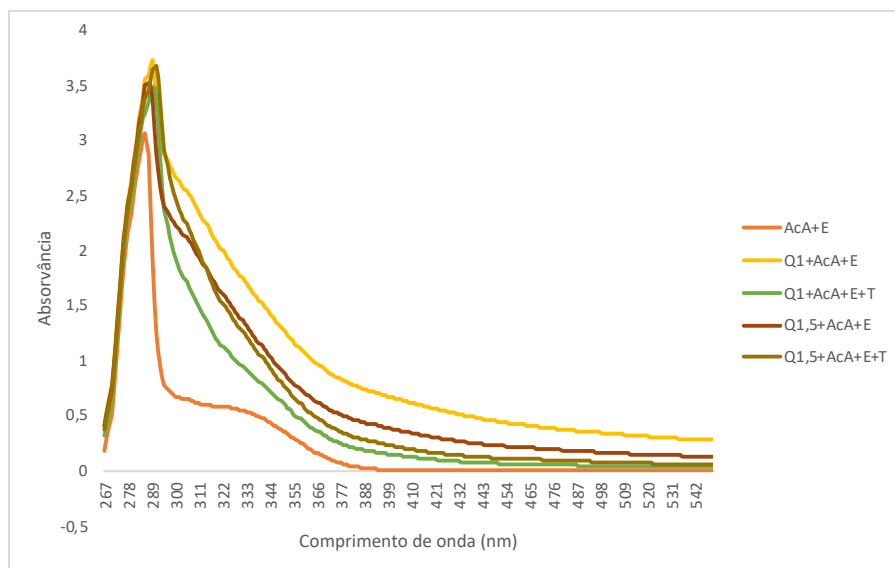


Figura 3.9 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5%+eugenol (AcA+E), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+eugenol (Q1+AcA+E), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80[®]+eugenol (Q1+AcA+T+E), quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+eugenol (Q1.5+AcA+E) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80[®]+eugenol (Q1.5+AcA+T+E)

A figura 3.9 mostra os espectros obtidos com a introdução de eugenol nas formulações. Tal como os espectros mostrados na figura 3.8, todas as formulações apresentam uma banda de absorção com o máximo de absorvância ao mesmo comprimento de onda de 290 nm. Com excepção da solução de ácido acético 0.5% e eugenol, todas as outras formulações apresentam valores de absorvância muito semelhantes o que indica que a introdução de eugenol nas formulações tem como impacto uma normalização da absorção de luz pelas formulações. De realçar que o eugenol produz formulações com maior valor de absorvância, quando comparadas com as formulações mostradas na figura 3.8 e 3.10.

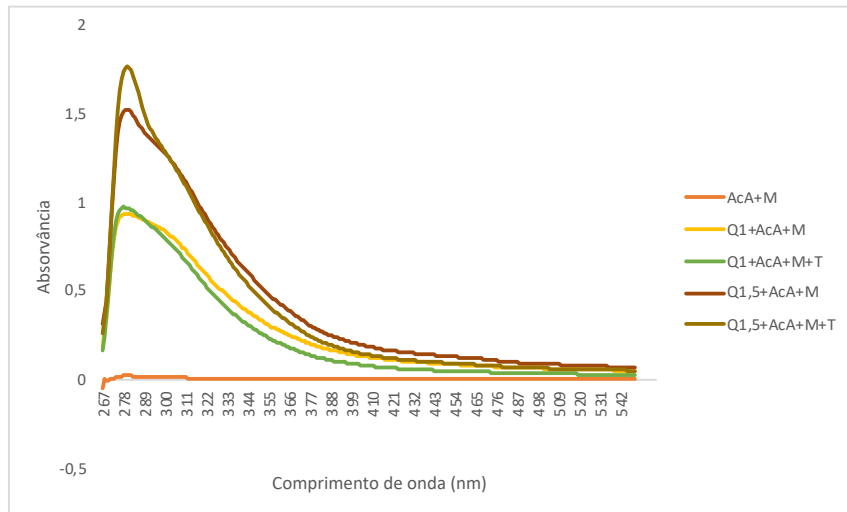


Figura 3.10 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5%+mentol (AcA+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+mentol (Q1+AcA+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80[®]+mentol (Q1+AcA+T+M), quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+mentol (Q1.5+AcA+M) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80[®]+mentol (Q1.5+AcA+T+M)

Os espectros mostrados na figura 3.10 representam a influência da adição de mentol na absorção de luz. Podemos ver que as curvas são muito semelhantes às mostradas na figura 3.8, o que indica que a presença do mentol nas formulações não tem um impacto significativo na capacidade de absorção de luz por parte das soluções. As soluções com maior concentração de quitosano nas suas formulações apresentam valores de absorvância maiores quando em comparação com as formulações com 1% de quitosano. A adição de surfactante tem uma ligeira influência induzindo uma subida do valor de absorvância mais visível nas formulações com quitosano a 1.5%.

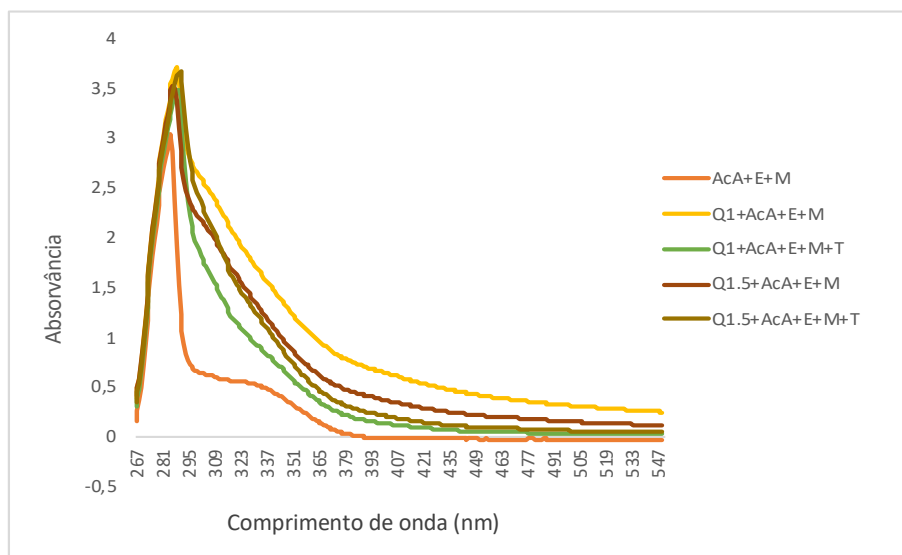


Figura 3.11 – Espectros de absorção UV-Vis relativos às soluções de ácido acético 0.5%+eugenol+mentol (AcA+E+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+eugenol+mentol (Q1+AcA+E+M), quitosano 1%+ácido acético 0.5%+Tween80[®]+eugenol+mentol (Q1+AcA+T+E+M), quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+eugenol+mentol (Q1.5+AcA+E+M) e quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%+Tween80[®]+eugenol+mentol (Q1.5+AcA+T+E+M)

Quando nas formulações existem os dois compostos de OEs, o efeito do eugenol sobrepõe-se e os espectros apresentam um aspeto semelhante aos apresentados na figura 3.11. Os valores de absorvância são muito semelhantes entre as formulações e as bandas ocorrem todas ao mesmo comprimento de onda de 290nm. Nestas formulações verifica-se também uma normalização das mesmas provada pela presença do eugenol.

Na tabela 3.4 estão representados os valores de absorvância a 550nm e os valores de T estimados com recurso à equação 3.5 apresentada neste capítulo, na secção 3.3.3.4. Segundo Al-Hassan e Norziah (2012), um maior valor de T corresponde a uma absorvância mais elevada e indica um menor grau de transparência da solução e posteriormente da película por ela formada (Al-Hassan et al., 2012).

Podemos observar que a adição de Tween80[®] tem um impacto na transparência, na medida em que as formulações com o surfactante apresentam valores mais baixos de T, e, por conseguinte, com maior transparência, quando comparados com as formulações sem o surfactante. Podemos também verificar que houve uma diminuição da transparência para concentrações mais elevadas de quitosano, com exceção da formulação de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol que apresenta menor valor de transparência que a formulação de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol. Verificou-se também que, quando presente o composto eugenol nas formulações de

quitosano e ácido acético 0.5%, estas apresentam valores bastante superiores de T sendo por isso menos transparente. A introdução de mentol produz formulações com menor valor de transparência, sendo este efeito pouco significativo. As formulações de quitosano, ácido acético 0.5% e eugenol são as que apresentam maiores valores de absorvância e, conseqüentemente, menor grau de transparência. Tal facto ocorre eventualmente devido à cor amarelada do composto químico eugenol.

Tabela 3.4 – Absorvância a 550nm e transparência das formulações

	A_{550nm}	T
Q1 + AcA	0.043	0.0043
Q1 + AcA + T	0.027	0.0027
Q1.5 + AcA	0.069	0.0069
Q1.5 + AcA + T	0.045	0.0045
Q1 + AcA + E	0.275	0.027
Q1 + AcA + T + E	0.032	0.0032
Q1.5 + AcA + E	0.127	0.0127
Q1.5 + AcA + T + E	0.057	0.0057
Q1 + AcA + M	0.047	0.0047
Q1 + AcA + T + M	0.024	0.0024
Q1.5 + AcA + M	0.067	0.0067
Q1.5 + AcA + T + M	0.048	0.0048

Soluções de quitosano 1% + ácido acético 0.5% (Q1+AcA), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1+AcA+T), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% (Q1.5+AcA) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1.5+AcA+T), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1+AcA+E), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + eugenol (Q1+AcA+T+E), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1.5+AcA+E) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + eugenol (Q1.5+AcA+T+E), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1+AcA+M), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol (Q1+AcA+T+M), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1.5+AcA+M) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol (Q1.5+AcA+T+M).

3.4.2 Propriedades físicas e químicas das diferentes formulações em película

3.4.2.1 Espessura

Na tabela 3.5 estão apresentados os valores de espessura obtidos para as diversas películas analisadas.

Tabela 3.5 – Valores de espessura, em mm, para as diferentes películas analisadas

	Espessura (mm)
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5%	0.143 ± 0.006
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®]	0.573 ± 0.012
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5%	0.433 ± 0.006
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®]	0.713 ± 0.015
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Eugenol	0.433 ± 0.021
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	0.727 ± 0.015
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Eugenol	0.087 ± 0.015
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol	0.293 ± 0.006
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Mentol	0.280 ± 0.010
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	0.447 ± 0.006
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Mentol	0.147 ± 0.006
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Mentol	0.440 ± 0.010
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Eugenol + Mentol	0.147 ± 0.012
Quitosano 1% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol + Mentol	0.149 ± 0.010
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Eugenol + Mentol	0.427 ± 0.012
Quitosano 1.5% + Á. Acético 0.5% + Tween80 [®] + Eugenol + Mentol	0.293 ± 0.015

O método usado para determinar a espessura das películas apenas consegue dar uma estimativa do valor devido às dificuldades experimentais e de análise das imagens. No entanto, e tendo em conta que foi utilizado o mesmo método para todas as medições, é possível comparar as espessuras das diferentes películas e avaliar o impacto dos diversos compostos das formulações na espessura das mesmas.

Relativamente às películas de formulações com quitosano e ácido acético 0.5%, verifica-se um aumento da espessura com o aumento da concentração, isto é, a película de quitosano 1% apresenta menor espessura que a película de quitosano 1.5%. Este comportamento é também verificado nas formulações com Tween80[®]. A introdução de eugenol implicou uma variação inversa com a concentração de quitosano, sendo a formulação com menor concentração a que apresenta o maior valor de espessura. Quando comparando as concentrações de quitosano de 1% e 1.5%, quanto maior é a

concentração, menor é a espessura das películas, nas formulações com e sem Tween80[®].

O mesmo comportamento se verifica quando a película apresenta mentol na sua formulação. As películas cujas formulações apresentam quitosano, ácido acético 0.5%, eugenol e mentol, verificam um aumento da espessura com o aumento da concentração, tanto na presença como na ausência de Tween80[®], apresentando um comportamento semelhante às películas apenas com quitosano e ácido acético, com ou sem Tween80[®].

O Tween80[®] apresenta um efeito de aumento da espessura das películas quando em comparação com as mesmas formulações sem a presença de surfatante. Os compostos químicos de óleos essenciais mentol e eugenol nas formulações de quitosano a 1% provocam um aumento da espessura das películas e uma diminuição nas formulações de quitosano a 1.5%.

Através das imagens capturadas para análise da espessura das películas, verificou-se que a superfície das películas apresentavam diferenças quando observadas ao microscópio com uma ampliação de 40x, tal como se pode verificar nas figuras 3.12 a 3.27 apresentadas em seguida. Podemos verificar que as películas com Tween80[®] nas suas formulações apresentam superfícies semelhantes, com exceção da película de quitosano 1.5%, ácido acético 0.5%, Tween80[®], mentol e eugenol. Em relação às películas das formulações sem o surfactante, todas se apresentam relativamente semelhantes, com exceção da superfície apresentada na figura 3.18, a única bastante diferente das restantes.

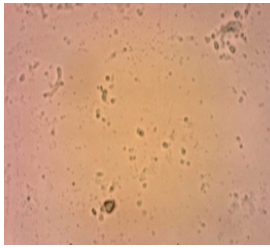


Figura 3.12 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5%; ampliação de 40x

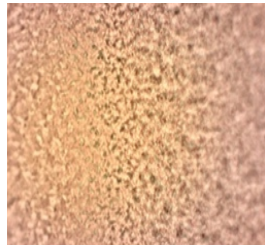


Figura 3.13 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]; ampliação de 40x

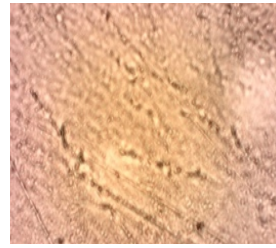


Figura 3.14 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol; ampliação de 40x

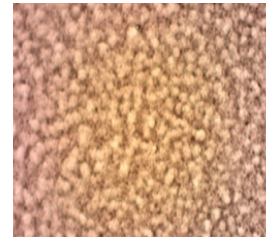


Figura 3.15 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + Eugenol; ampliação de 40x

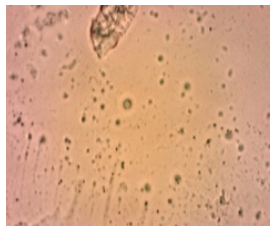


Figura 3.16 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Mentol; ampliação de 40x



Figura 3.17 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + Mentol; ampliação de 40x

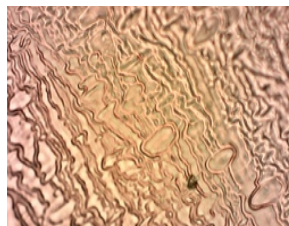


Figura 3.18 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Mentol + Eugenol; ampliação de 40x



Figura 3.19 - Superfície da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + Mentol + Eugenol; ampliação de 40x



Figura 3.20 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%; ampliação de 40x



Figura 3.21 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]; ampliação de 40x

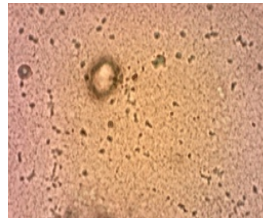


Figura 3.22 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Eugenol; ampliação de 40x



Figura 3.23 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + Eugenol; ampliação de 40x

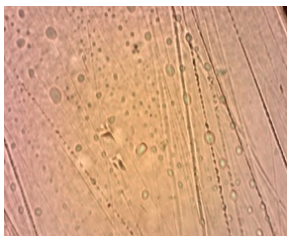


Figura 3.24 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Mentol; ampliação de 40x

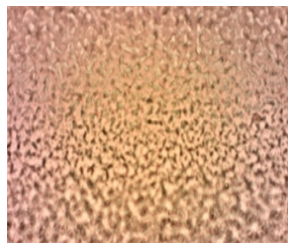


Figura 3.25 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + Mentol; ampliação de 40x

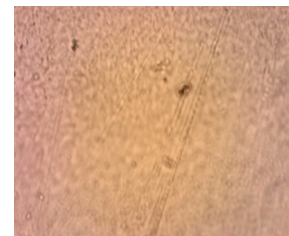


Figura 3.26 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Mentol + Eugenol; ampliação de 40x

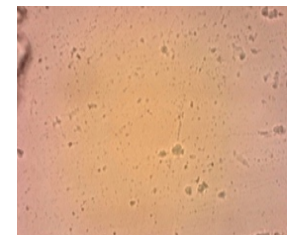


Figura 3.27 - Superfície da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + Mentol + Eugenol; ampliação de 40x

3.4.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

Os espectros FTIR das películas estão mostrados nas figuras 3.28 e 3.29 de uma forma agregada, os espectros individuais referentes a cada uma das formulações encontram-se nos anexos 3 e 4. Todos os espectros apresentam uma larga banda entre 3360 e 3400 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída ao alongamento dos grupos hidroxilo (-OH) e aminas (-NH). Verifica-se também, em todos os espectros, duas bandas entre 3000 e 2800 cm^{-1} , com intensidades diferentes entre formulações, associadas ao alongamento simétrico e assimétrico das ligações C-H.

As bandas apresentadas a 1556 e 1255 cm^{-1} são características de todos os espectros e características da molécula de quitosano, correspondendo a amina primária (C-NH₂) e alongamento de uma amida terciária (C-N). Esta última banda sugere uma reação de N-acetilação da molécula. Entre 1140 e 1020 cm^{-1} ocorrem bandas que podem ser atribuídas ao alongamento de C-O em álcoois. A banda que ocorre próxima a 1240 cm^{-1} representa as vibrações dos grupos C-N e N-H. Na zona de 1408 cm^{-1} ocorre uma banda correspondente ao O-H de um álcool primário. As bandas verificadas entre 1400 e 1380 cm^{-1} correspondem a deformações de -CH₂ e -CH₃.

A 1730 cm^{-1} ocorre uma banda apenas nos espectros que correspondem a formulações com a presença de Tween80[®], correspondente a um éster (-COO-), grupo presente na molécula deste surfactante.

Não se verificam diferenças nos espectros FTIR quando comparadas as formulações com e sem eugenol e mentol provavelmente porque se encontram nas formulações em quantidades muito diminutas e também porque os grupos funcionais são análogos aos existentes na molécula de quitosano (Brychcy et al., 2015; Fráguas et al., 2015; Homez-Jara et al., 2018; Pereira et al., 2014).

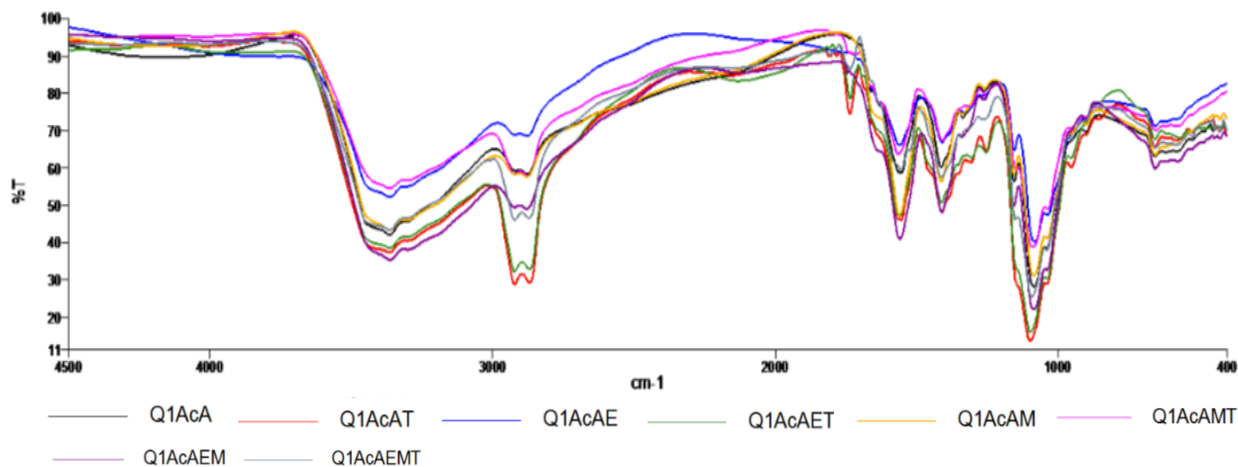


Figura 3.28 – Espectros de IV correspondentes às películas edíveis das formulações: quitosano 1% + ácido acético 0.5% (Q1AcA), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1AcAT), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1AcAE), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + eugenol (Q1AcAET), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1AcAM), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol (Q1AcAMT), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol (Q1AcAEM) e quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + eugenol + mentol (Q1AcAEMT).

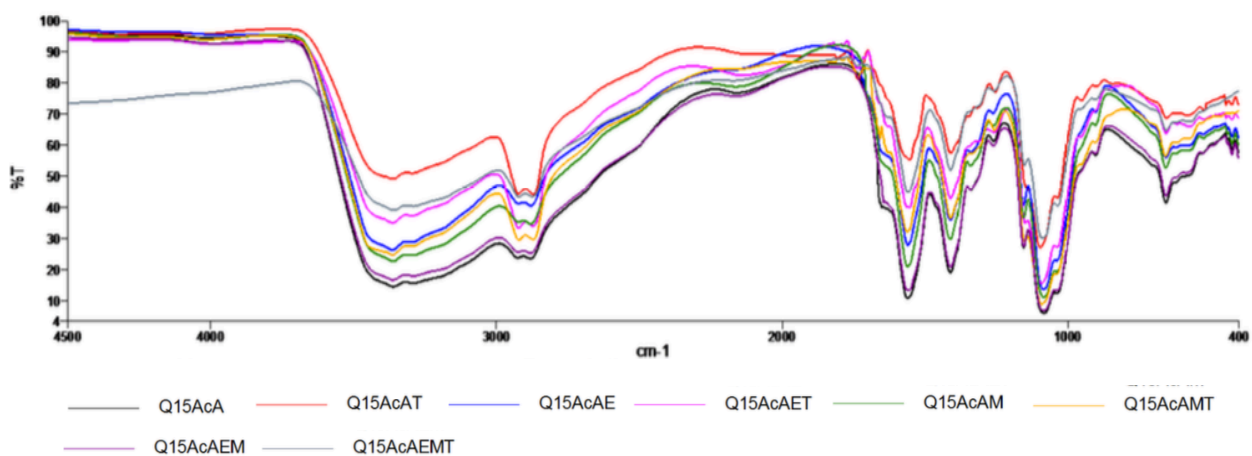


Figura 3.29 – Espectros de IV correspondentes às películas edíveis das formulações: quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% (Q15AcA), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q15AcAT), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q15AcAE), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + Tween80[®] (Q15AcAET), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol (Q15AcAM), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol + Tween80[®] (Q15AcAMT), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol (Q15AcAEM) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol + Tween80[®] (Q15AcAEMT).

3.4.2.3 Solubilidade

Como já referido acima neste capítulo, a solubilidade das películas edíveis em água fornece importantes informações no que respeita à resistência dos revestimentos em água. Uma película que apresente uma elevada solubilidade em água exibirá uma

menor resistência, querendo isto dizer que quando em contacto com esta, a película pode dissolver-se, levando isto à perda do seu efeito sobre o alimento (Pinheiro et al., Não se verificam diferenças nos espetros FTIR quando comparadas as formulações com e sem eugenol e mentol provavelmente porque se encontram nas formulações em quantidades muito diminutas e também porque os grupos funcionais são análogos aos existentes na molécula de quitosano (Brychcy et al., 2015; Fráguas et al., 2015; Homez-Jara et al., 2018; Pereira et al., 2014).

2010).

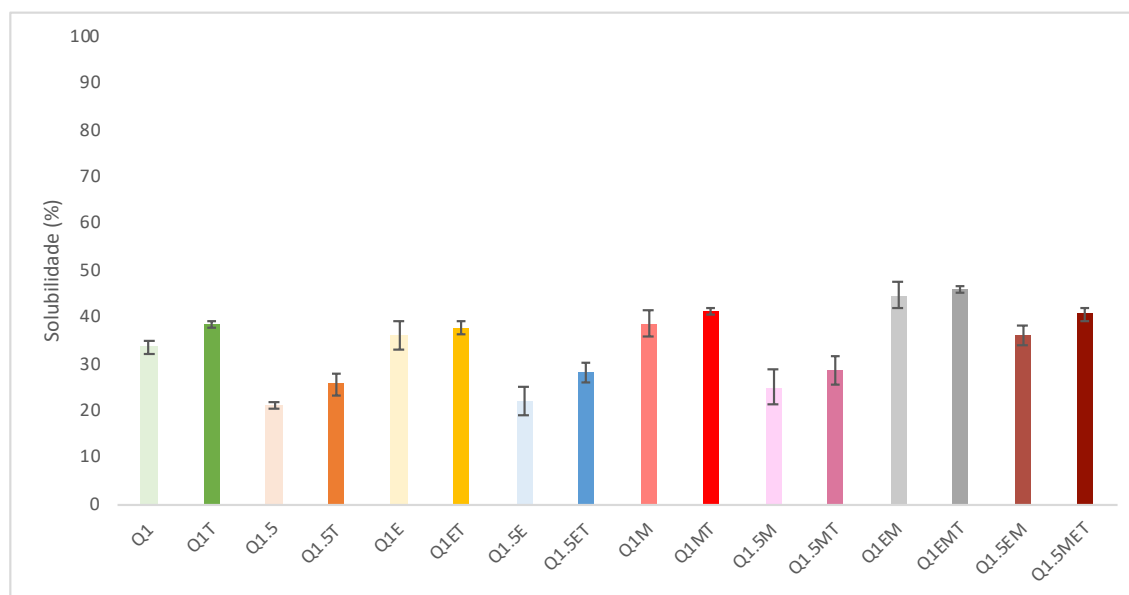


Figura 3.30 – Solubilidade das películas edíveis correspondentes às formulações estudadas: Películas de quitosano 1% + ácido acético 0.5% (Q1), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1T), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% (Q1.5) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1.5T), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1E), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + Tween80[®] (Q1ET), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1.5E) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + Tween80[®] (Q1.5ET), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1M), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol + Tween80[®] (Q1MT), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1.5M) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol + Tween80[®] (Q1.5MT), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol (Q1EM), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol + Tween80[®] (Q1EMT), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol (Q1.5EM) e quitosano 1.5%

Como se pode verificar pela figura 3.30, todas as películas apresentam uma baixa solubilidade em água, variando os valores entre 20% e 40%. Uma maior concentração de quitosano verifica menor solubilidade em água; os composto químicos de óleos

essenciais eugenol e mentol produzem um pequeno aumento da solubilidade, tal como o surfactante.

Singh e seus colaboradores, 2015, verificaram uma diminuição solubilidade com o aumento da concentração e uma influência do surfactante, aumentando ligeiramente a solubilidade (Singh et al., 2015). Também Homez-Jara e seus colaboradores, 2018, obtiveram a mesma relação de solubilidade e concentração (Homez-Jara et al., 2018).

As soluções com quitosano apresentam uma solubilidade baixa pois este composto é insolúvel em água, apenas é solúvel em soluções com pH ácido. Apresentando baixa solubilidade, não verifica capacidade de retenção de água, ocorrendo transferência para o meio envolvente (Park et al., 2004; Vargas et al., 2009).

3.4.2.4 Permeabilidade ao vapor de água

Os resultados obtidos estão representados na figura 3.31. De ressaltar que estes resultados foram obtidos a partir dos valores de espessura obtidos por estimativa, em 3.4.2.1, havendo portanto um erro associado ao cálculo dos valores de permeabilidade provocado pelos mesmos.

Verifica-se uma diminuição da permeabilidade com o aumento da concentração, sendo que a película edível de quitosano a 1% é mais permeável que a película com uma concentração de quitosano de 1.5%. Homez-Jara e seus colaboradores, 2018, e Casariego e seus colaboradores, 2009, concluíram o mesmo nos seus estudos. O Tween80[®] não apresenta influencia significativa, notando-se ainda assim uma pequena tendência para a diminuição dos valores de permeabilidade. A aplicação dos compostos químicos de OES eugenol e mentol provocam um ligeiro aumento da permeabilidade, muito pequeno devido provavelmente à pequena quantidade de eugenol e mentol (0.15%) quando comparada com a quantidade de quitosano (1% e 1.5%). Vargas e seus colaboradores, 2006, verificaram também um aumento dos valores de permeabilidade aquando da adição de um composto químicos de óleo essencial (óleo de palma) nas

formulações de quitosano. Este aumento pode dever-se ao aumento do carácter hidrofóbico das soluções.

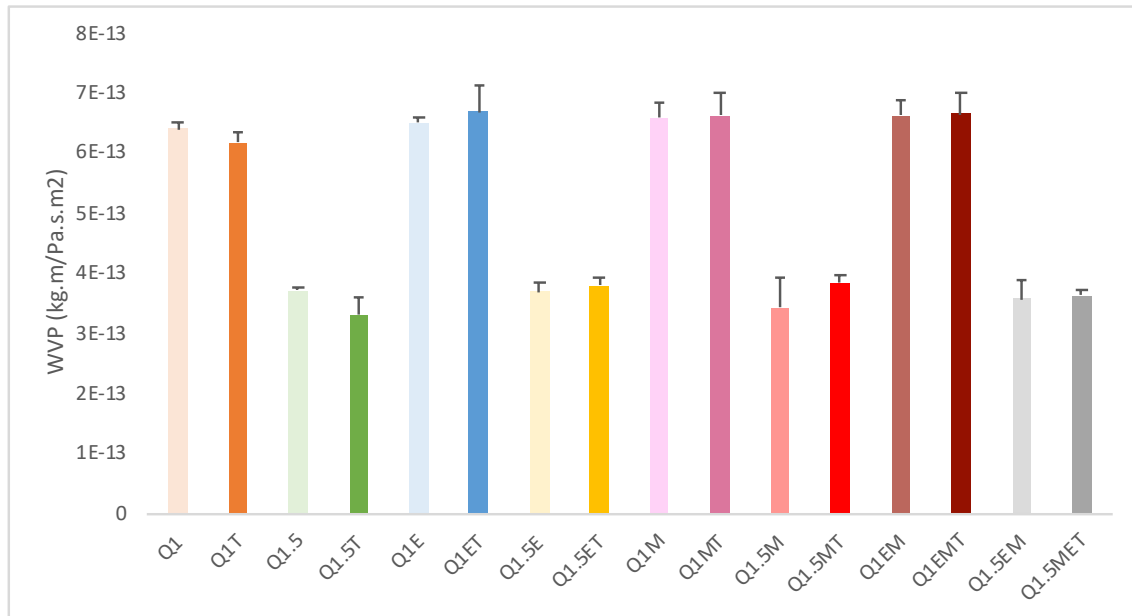


Figura 3.31 – Permeabilidade ao valor de água das películas edíveis correspondentes às formulações estudadas: Películas de quitosano 1% + ácido acético 0.5% (Q1), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1T), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% (Q1.5) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1.5T), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1E), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + Tween80[®] (Q1ET), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1.5E) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + Tween80[®] (Q1.5ET), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1M), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol + Tween80[®] (Q1MT), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1.5M) e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol + Tween80[®] (Q1.5MT), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol (Q1EM), quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol + Tween80[®] (Q1EMT), quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol

3.5 Conclusões

Os ensaios de caracterização das formulações permitiram obter um conjunto de informações relevantes para o estudo realizado nas formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano. Assim, podemos concluir que a densidade aumenta com a concentração de quitosano e que a introdução de eugenol tem como efeito o aumento da densidade das soluções. Por outro lado, a adição de mentol e Tween80[®] produz uma diminuição no valor da densidade. No que diz respeito à tensão superficial, a concentração de quitosano não tem impacto significativo enquanto que as formulações com Tween80[®] e OEs provocam uma diminuição deste parâmetro, aumentando conseqüentemente a capacidade molhante. Da avaliação do comportamento reológico verificou-se que a formulação com concentração de quitosano a 1% apresenta comportamento de fluido newtoniano, mantendo a viscosidade independentemente da taxa de corte aplicada.

Os resultados obtidos de UV-Vis demonstram que as formulações com maior concentração de quitosano, 1.5%, apresentam maiores valores de absorvância e a presença de surfactante diminui a absorvância das formulações, ainda que ligeiramente. O eugenol apresenta um efeito de normalização da absorção de luz pelas formulações e as formulações onde se encontra presente verificam valores mais altos de absorvância. O mentol não apresenta efeito quando comparadas as formulações com e sem este composto de OEs na sua composição. Relativamente aos valores de T, verifica-se o seu aumento com o aumento da concentração de quitosano de 1% para 1.5%, o que indica uma melhor barreira à oxidação induzida pela luz envolvente pelas formulações com maior concentração.

A espessura das películas de quitosano sofre um aumento quando foi adicionado Tween80[®] à formulação. Nas formulações com quitosano a 1% e 1.5%, ácido acético 0.5% e nas mesmas com adição dos dois compostos químicos de OEs em simultâneo ocorre um aumento da espessura com o aumento da concentração; nas formulações com os compostos químicos de OEs separadamente, eugenol e mentol, verifica-se uma diminuição da espessura com o aumento da concentração. Os espectros de FTIR das diferentes formulações revelam todos o mesmo comportamento, apenas havendo diferenças de uma banda adicional correspondente ao Tween80[®] nas formulações com

a presença do surfactante. Os espectros FTIR das diferentes formulações apresentam muitas semelhanças o que indicam serem todas quimicamente muito semelhantes. De realçar que a presença de Tween80[®] é visível nos espectros pelo surgimento da banda a 1730 cm⁻¹ e que a introdução de mentol e eugenol não é possível de identificar nos espectros pelo facto de a concentração ser baixa e pelo facto de as bandas associadas serem, na generalidade, as mesmas que para o quitosano. Relativamente à solubilidade, o mais visível é a alteração deste fator com a variação de concentração na medida em que a solubilidade apresenta valores menores para maiores concentrações; existe também um pequena influência por parte dos compostos de OEs e do surfactante, na medida em que aumentam a solubilidade. A permeabilidade ao vapor de água apresentou-se menor para maiores valores de concentração, não se verificando efeito da presença do Tween80[®] havendo também influência por parte dos compostos químicos de OEs no sentido de aumentar a permeabilidade dos revestimos edíveis à base de quitosano.

CAPÍTULO IV
TEMA 2: AVALIAÇÃO SENSORIAL

CAPÍTULO IV. Tema 2: Avaliação Sensorial

4.1 Introdução

4.1.1 Objetivo

4.2 Enquadramento teórico

4.2.1 Análise Sensorial

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Preparação das soluções de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano

4.3.2 Aplicação dos revestimentos edíveis à base de quitosano nos frutos

4.3.3 Secagem dos revestimentos edíveis à base de quitosano nos frutos

4.3.4 Prova sensorial

4.3.4.1 Teste triangular

4.3.4.2 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação dos morangos

4.3.4.3 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação das cerejas

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Teste triangular

4.4.2 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação em morangos

4.4.3 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação em cerejas

4.5 Conclusões

4.1 Introdução

No processo de criação ou modificação de produtos, e no controlo de qualidade, é muito importante a realização de análises sensoriais de modo a garantir a aceitação do produto por parte da comunidade.

4.1.1 Objetivo

O estudo sensorial dos revestimentos edíveis à base de quitosano em frutos tem como principal objetivo avaliar a viabilidade da sua utilização em frutos no período pós-colheita, verificando se a sua aplicação tem influência nas características organolépticas dos frutos aos quais foram aplicados.

4.2 Enquadramento Teórico

4.2.1 Análise sensorial

De acordo com a última Norma Portuguesa 4263 sobre análise sensorial publicada em 1994, define-se Análise Sensorial, ou também designado por exame organolético, como a avaliação das características organoléticas de um produto através dos órgãos dos sentidos, sendo característica organolética definida como uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos.

A Análise Sensorial tem a capacidade de responder a três questões relativamente aos alimentos: descrição, discriminação e preferência. Na descrição pretende-se realizar uma abordagem descritiva do produto, como por exemplo, a que sabe, quais as suas características sensoriais, se a sua qualidade difere de outro semelhante, entre outras questões. Na discriminação pretende-se saber se o consumidor deteta diferenças no produto, qual a dimensão da diferença, se o número de consumidores que deteta a diferença é significativo. Na preferência existe a intenção de saber se o consumidor gosta do produto, se o mesmo é melhor que um outro semelhante, quais as características mais apreciadas no produto (Sheick et al., 2013).

Existem, com base nas três questões referidas, três tipos de provas de análise sensorial, sendo elas provas descritivas, provas discriminativas e provas de preferência.

As provas descritivas são utilizadas em análise sensorial de alimentos, bebidas e água e têm como objetivo descrever os parâmetros sensoriais e medir a sua intensidade. Neste tipo de análise os provadores têm em conta aspetos como a aparência, cheiro e aroma, textura manual e percebida na cavidade bucal e sabor e também grau de intensidade de cada um dos parâmetros avaliados. De entre as provas descritivas, as mais utilizadas são o perfil de textura, perfil de sabor, tempo de intensidade e análise descritiva quantitativa. Neste tipo de análise requer-se um painel de provadores treinados.

As provas discriminativas são utilizadas em análise sensorial de alimentos, bebidas e água, onde se medem atributos específicos por discriminação simples, onde se indica, por comparação, se existem ou não diferenças entre as amostras. Estas são codificadas e analisadas por um painel pré-selecionado e treinado. Os testes deste tipo

mais utilizados em análise sensorial são o teste triangular, o teste duo-trio, o teste de ordenação e o teste de diferença do controle.

As provas de preferências são igualmente utilizadas em alimentos, bebidas e água, e neste tipo de prova, o provador expressa a sua opinião ao escolher um produto em detrimento de outro. É uma análise sensorial utilizada nos casos em que se quer medir a opinião de um elevado número de consumidores. Neste tipo de provas não são necessários provadores treinados (Noronha, 2003).

A análise sensorial, ao permitir determinar diferenças e caracterizar atributos sensoriais de produtos e permitir determinar se as diferenças nos produtos são detetadas e aceites ou não pelo consumidor, é uma ferramenta de extrema importância no controlo de qualidade e na reformulação e desenvolvimento de produtos (Sheick et al., 2013; Teixeira, 2009).

No âmbito desta dissertação, considerou-se fundamental realizar análises sensoriais de modo a verificar a aceitação dos revestimentos edíveis à base de quitosano por parte da comunidade, quando aplicados aos frutos, morango e cereja. Deste modo conseguiu-se avaliar a viabilidade da utilização destas películas edíveis em termos organoléticos dos mesmos.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Preparação das soluções de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano

As soluções das formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano utilizadas nas análises sensoriais foram preparadas de acordo com o já descrito no ponto 3.1.1 do Capítulo III, Tema 1: Formulações da presente dissertação.

4.3.2 Aplicação dos revestimentos edíveis à base de quitosano nos frutos

Os revestimentos foram aplicados aos frutos, tanto no caso dos morangos como das cerejas, por imersão dos mesmos nas soluções, por um período de 5 minutos, tal como descreveram Silva, 2010, Ricardo-Rodrigues e seus colaboradores (2017), Wang e seus colaboradores (2013).

4.3.3 Secagem dos revestimentos edíveis à base de quitosano nos frutos

Para a secagem dos frutos, colocaram-se os mesmos em suportes de rede adaptados para o efeito, tal como observado na figura 4.1. A secagem decorreu a uma temperatura ambiente, cerca de 22°C, no caso do morango durou 12 horas e no caso das cerejas durante 2 horas.



Figura 4.1 – Processo de secagem dos morangos frutos

Depois de secos, os frutos, morangos e as cerejas, foram separados e colocados em caixas de plástico, identificadas de acordo com a modalidade e com o respetivo dia para posterior saída de câmara para serem analisados. Foram depois colocados em câmara de frio a uma temperatura de 1 ± 1 °C e humidade relativa de 95%.

4.3.4 Prova sensorial

Na presente dissertação procederam-se a três momentos de análise sensorial. O primeiro momento tinha como objetivo perceber se os revestimentos edíveis à base de quitosano eram notados pelos provadores e quais as concentrações do mesmo que eram aceites, recorrendo para tal a um teste triangular. Neste teste sensorial foram utilizados morangos, pois é um fruto relativamente acessível em boas condições durante todo o ano. Passada esta fase preliminar, fez-se um ensaio de conservação com morangos onde foi integrado um teste de análise sensorial realizado de acordo com a Norma ISO 4121 (2003). Num segundo ensaio de conservação realizado, desta feita com cerejas, foi também realizado um teste sensorial de preferência.

4.3.4.1 Teste triangular com morangos

Os testes do tipo triangular são utilizados quando o intuito é determinar diferenças sensoriais não específicas entre dois produtos ou tratamentos, sendo utilizados provadores não treinados.

Estes testes foram realizados segundo a norma ISO 4120 (2004) em três sessões de análise sensorial, sendo que em cada uma foram testadas diferentes formulações em morangos 'Victory' provenientes da empresa Sudoberry, localizada no litoral alentejano, e colhidos de acordo com os procedimentos normais da empresa.

Na primeira sessão foi considerado um conjunto com morangos revestidos com a formulação de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] e um total de 27 provadores. Foram apresentados três morangos ao consumidor, sendo um não revestido e dois deles revestidos com película, num esquema ABB (A sem revestimento e B com revestimento), tendo sido o provador questionado a identificar a amostra diferente, registando-a em ficha de análise sensorial mostrada no anexo 5. Na segunda sessão, foram avaliados dois conjuntos e um total de 20 provadores, sendo que no primeiro foram usados morangos revestidos com a formulação de quitosano 1,5% + ácido acético 1% + Tween80[®]. Dois morangos revestidos e um não revestido, num esquema BAB (A sem revestimento e B com revestimento); no segundo conjunto foram utilizados morangos revestidos com a formulação de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80, dois morangos estavam revestidos e um não revestido, num esquema ABB (A sem revestimento e B com revestimento). Tal como na primeira sessão, ao provador foi pedido que identificasse a amostra diferente, registando-a em ficha de análise sensorial mostrada no anexo 6. Na terceira sessão foram também considerados dois conjuntos, onde no primeiro foram avaliados sensorialmente morangos com revestimento de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%, com dois morangos revestidos e um não revestidos, num esquema BAB (A sem revestimento e B com revestimento); no segundo conjunto foram avaliados morangos com revestimento de quitosano 1.5% com ácido acético 0.55% e Tween80, dois morangos revestidos e um não revestido, num esquema ABB (A sem revestimento e B com revestimento). Da mesma forma os provadores, num total de 14, escolheram a amostra diferente, registando em ficha de análise sensorial apresentada em anexo.



Figura 4.2 – Aspeto de uma apresentação de prova sensorial triangular

4.3.4.2 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação dos morangos

No âmbito do ensaio de conservação de morangos ‘Victory’ provenientes da empresa Sudoberry, foi realizada uma avaliação sensorial com um painel de 8 provadores treinados do painel da Universidade de Évora. Este teste foi realizado segundo a Norma ISO 4121 (2003), onde a intenção foi avaliar de forma objetiva a qualidade sensorial dos morangos, através da classificação dos atributos cor, cheiro, sabor ácido, doçura, sabor a fruta, textura e avaliação global dos morangos, ao longo dos dias de conservação, de acordo com as saídas de câmara (dia 0, dia 3, dia 6, dia 9 e dia 12). Por cada saída de câmara, cada provador avaliou 3 morangos, codificados, onde um morango se encontrava sem revestimento, outro morango apresentava revestimento de quitosano 1% + ácido acético 0.5% e outro morango apresentava revestimento de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%. Foi elaborada uma ficha de análise sensorial, apresentada em anexo, na qual foi considerada uma escala de intensidade, onde a cada descritor se associou um segmento de reta de 10 cm, nas quais os provadores assinalaram a sua opinião.

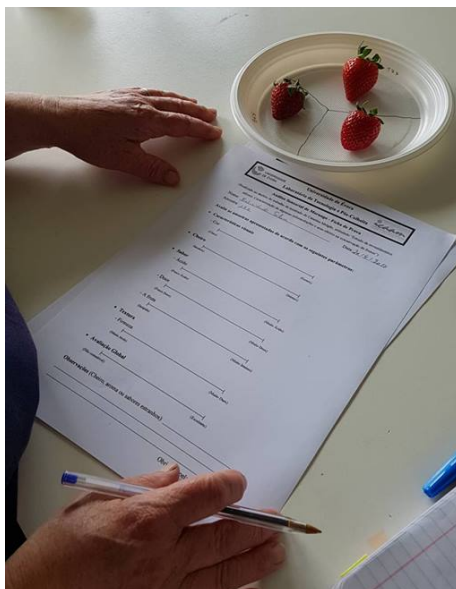


Figura 4.3 – Aspeto da prova sensorial inserida no ensaio de conservação de morangos

4.3.4.3 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação de cerejas

Inserida no ensaio de conservação de cerejas ‘Summit’, foi realizada uma prova sensorial onde se mediu o grau de satisfação do provador, não treinado, em relação a cinco amostras, uma cereja controlo sem aplicação de revestimento e quatro das cerejas revestidas com diferentes formulações de revestimentos edíveis de quitosano. De salientar que nas cerejas a aplicação do revestimento não se verificou acessível, ocorrendo irregularidade na aderência das soluções de revestimento à superfície das cerejas. As formulações utilizadas foram 1) quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®], 2) quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®], 3) quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol + Tween80[®] e 4) quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol + eugenol + Tween80[®]. As amostras foram avaliadas em dias específicos de saída de câmara dos frutos – dia 0, dia 7 e dia 14 – e cada provador avaliou cada uma das cinco amostras, registando a sua opinião em ficha de análise sensorial, idêntica à apresentada em anexo (anexo 8).

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Teste triangular

Das três sessões de avaliações sensoriais realizadas segundo o teste triangular, foram obtidos os resultados apresentados na figura 4.4, onde podemos verificar, em termos quantitativos, as amostras que os provadores identificaram como diferentes, sendo que “Sem” representa os frutos sem revestimento e “Com” os frutos com revestimento em estudo em cada ensaio.

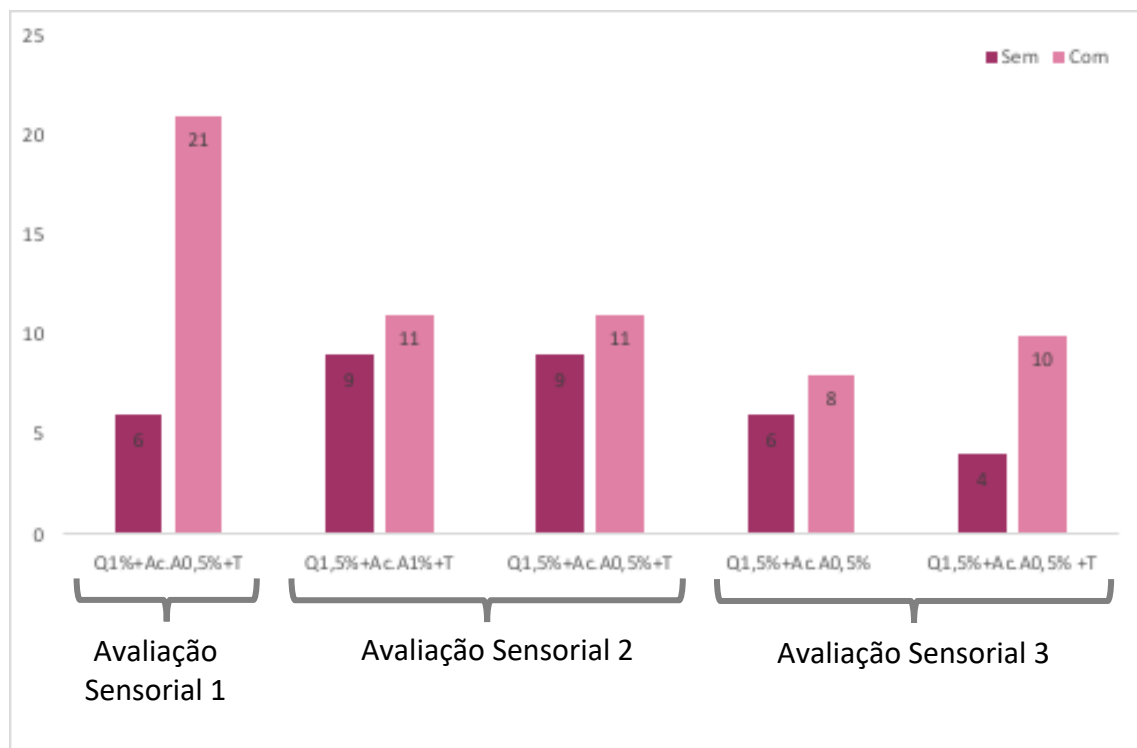


Figura 4.4 - Gráfico de barras com os resultados das três análises sensoriais triangulares realizadas

De acordo com a tabela A1 presente na norma ISO 4120 (2004) e observando os resultados presentes na figura 4.4, a nível estatístico não é possível identificar diferenças, considerando um nível de significância de 5%. A interpretação deste facto será que os consumidores, aqui representados pelos provadores que realizaram os testes, não encontram diferenças significativas entre os morangos com e sem película. Sendo assim, os revestimentos edíveis à base de quitosano apresentam viabilidade de utilização em morango.

Apesar de a nível estatístico se constatar que não existem diferenças, alguns dos provadores identificaram os frutos com revestimento de quitosano 1.5% + ácido acético 1% + Tween80[®] com um odor desagradável, possivelmente devido à elevada

concentração de ácido acético aplicada. Este facto leva à exclusão da utilização da concentração de ácido acético de 1% nos revestimentos edíveis.

4.4.2 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação em morangos

Na avaliação sensorial enquadrada no ensaio de conservação realizado com morangos, foram considerados os descritores cor, cheiro, sabor ácido, doçura, sabor a fruta, textura e avaliação global. Tendo em conta três modalidades: controlo, quitosano 1% + ácido acético 0.5% e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%, o tempo de avaliação, em dias, e o provador, realizaram-se análises fatoriais ANOVA a dois fatores, modalidade e provador, e modalidade e tempo de conservação, considerando um nível de significância de 0.05% ($p < 0.05\%$).

O estudo estava previsto para um total de 12 dias, no entanto ao dia 9 os frutos já não estavam em condições de consumo, portanto apenas se realizou a prova sensorial aos dias 0, 3 e 6.

A primeira análise ANOVA realizada teve como fatores ou variáveis independentes a modalidade e o provador, de modo a verificar se existiam diferenças significativas nas avaliações dos oito diferentes membros do painel, para cada descritor e assim aferir a atuação do painel. De acordo com os valores obtidos, e para um nível de significância de 0.05%, conclui-se que apenas para o descritor textura se encontraram diferenças significativas, não sendo assim considerado na avaliação. Para os restantes descritores, concluiu-se que o painel estava bem treinado, podendo ser consideradas as suas avaliações.

Efetuada a mesma análise de variância, mas desta feita com modalidade e dia como variáveis independentes, foram obtidos os valores de F e p para as diferentes interações, apresentados no anexo 9. Não se verificaram diferenças significativas, o que indica que o painel de provadores não notou diferenças nos descritores considerados, ao longo do tempo, e não verificou diferenças entre as modalidades, considerando não haver diferença entre as modalidades controlo e com revestimento. No entanto, através dos gráficos (apresentados no anexo 10) podem-se verificar as tendências de evolução das três modalidades ao longo do tempo, para cada um dos descritores, considerando a marca de 5 o limite entre o positivo (de 5 a 10) e negativo (0 a 5), tendo em conta que a escala utilizada foi de 0 a 10, através dos gráficos apresentados em

anexo 10. Relativamente ao cheiro e à cor verifica-se que ocorre primeiramente um aumento seguido de uma diminuição de intensidade ao longo do tempo na modalidade controlo e uma manutenção de intensidade nas modalidades quitosano 1% + ácido acético 0.5% e quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%. A acidez diminui em todas as modalidades ao longo do tempo, como também verificou Sheikh e seus colaboradores, 2013, no seu estudo sobre revestimentos edíveis de quitosano. A doçura apresenta variações nas modalidades, na medida em que a controlo apresenta um aumento e as restantes uma diminuição, isto ocorre devido à perda de água superior nos frutos não revestidos com quitosano, reforçando o efeito de barreira dos mesmos. Petriccione e seus colaboradores (2015), verificaram idêntico comportamento no seu estudo com cerejas. O sabor a fruta mantém-se na modalidade controlo e diminui nas restantes.

4.4.3 Análise sensorial enquadrada no ensaio de conservação em cerejas

Antes de mais é importante salientar que a aplicação efetiva dos revestimentos no caso das cerejas foi bastante difícil, pois os mesmos não aderiram como esperado à superfície dos frutos. Apesar da inclusão do surfactante nas formulações, não foi possível garantir que ocorreu a formação de película edível em todos os frutos, o que pode influenciar os resultados.

De acordo com a opinião dos provadores, foram obtidos os resultados apresentados na tabela 4.1. Nesta tabela estão representados, em percentagem, a opinião dos 8 provadores em relação às diversas amostras estudadas.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos da avaliação sensorial a cerejas com revestimentos edíveis, nos dias 0, 7 e 14 de conservação das mesmas

	Dia 0		Dia 7		Dia 14	
	Gosto (%)	Não gosto (%)	Gosto (%)	Não gosto (%)	Gosto (%)	Não gosto (%)
Controlo	100	0	87,50	12,50	100	0
Q1%+Ac.A0.5%+T	100	0	100	0	87,50	12,50
Q1.5%+Ac.A0.5%+T	100	0	100	0	87,50	12,50
Q1%+Ac.A0.5%+M+T	100	0	87,50	12,50	100	0
Q1%+Ac.A0.5%+M+E+T	87,50	12,50	87,50	12,50	87,50	12,50

Verificou-se que no dia 0, a aceitação foi quase completa, à exceção das cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol + eugenol que não foi aceite por um provador, indicando que fruta apresentava um sabor muito intenso a algo que não a fruta. No dia 7, apenas nas cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] e revestidas com quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] foi obtido aprovação total; nas restantes modalidades a aprovação foi parcial, havendo provadores que não gostaram dos frutos. No dia 14 também a maioria dos provadores considerou as cerejas boas, no entanto já se apresentavam com a superfície muito escura e mole.

A avaliação sensorial realizada no caso das cerejas foi uma avaliação muito primária, com intenção de perceber qual o nível de aceitação dos revestimento estudados, já que estes incluíam compostos com sabor e odor característicos muito fortes, causados pela inclusão de eugenol e mentol, que receava que fossem identificáveis e depreciativos aquando aplicados aos frutos. De um modo geral todos os frutos foram aceites, o que aponta para a viabilidade da utilização deste tipo de revestimentos em frutos. No entanto, e como já referido, esta foi uma análise muito rudimentar, com eventuais falhas devido à dificuldade sentida na aplicação dos revestimentos nas cerejas, o que faz com que o tema requeira um estudo mais intensivo.

4.5 Conclusões

A análise dos vários testes sensoriais realizados não apresentou diferenças expressivas entre os frutos revestidos e os frutos controlo, o que permite inferir que estes revestimentos nestes frutos não são percebidos pelos consumidores.

De um modo mais detalhado podem-se adiantar algumas conclusões úteis para futuras formulações como seja o caso do teste triangular ter como resultado a exclusão da utilização de uma concentração de ácido acético de 1%, porque os provadores notaram nos frutos revestidos com quitosano 1.5% + ácido acético 1% + Tween80[®] um odor desagradável. As restantes formulações avaliadas nesse teste apresentaram viabilidade, não sendo notadas pelos provadores. Esta ilação foi confirmada com a análise sensorial realizada no âmbito do ensaio de conservação de morangos na qual se verificou que o painel de provadores não identificou a presença dos revestimentos nos morangos, pelo que seria viável a sua utilização para efeitos de conservação.

No contexto do ensaio de conservação de cerejas concluiu-se que as formulações de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] e quitosano 1% + ácido acético 0.5%+ Tween80[®] foram aceites por 100% dos provadores; já as formulações com presença de eugenol e mentol foram identificadas por provadores como com um sabor demasiado intenso, que não a fruta, sendo por isso um aspeto negativo da avaliação.

Tendo em conta todos os resultados obtidos na avaliação sensorial, conclui-se que as formulações na presença de quitosano, nas concentrações de 1% e 1.5%, com ou sem Tween80[®] são viáveis para utilização como revestimentos edíveis para conservação de frutos.

CAPÍTULO V
TEMA 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA EM PLACA

CAPÍTULO V. Tema 3: Avaliação da atividade antifúngica em placa

5.1 Introdução

5.1.1 Objetivo

5.2 Enquadramento teórico

5.2.1 Revestimentos edíveis à base de quitosano para o controlo de fungos

5.2.2 Fungos *Botrytis spp.*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus spp.*

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Soluções de revestimentos edíveis

5.3.2 Soluções de esporos

5.3.3 Construção do ensaio em placas

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Efeito dos revestimentos sobre *Botrytis spp.*

5.4.2 Efeito dos revestimentos sobre *Penicillium spp.*

5.4.3 Efeito dos revestimentos sobre *Rhizopus spp.*

5.5 Conclusões

5.1 Introdução

5.1.1 Objetivo

O principal objetivo da avaliação da atividade antifúngica em placa é avaliar a eficácia dos revestimentos edíveis à base de quitosano no controlo do crescimento de fungos, nomeadamente *Botrytis spp*, *Penicillium spp* e *Rhizopus spp*.

5.2 Enquadramento Teórico

Os revestimentos edíveis à base de quitosano apresentam capacidade de diminuição da deterioração provocada por microrganismos, por redução da taxa respiratória e ajuste da permeabilidade ao dióxido de carbono e oxigénio em frutos e vegetais (Pereira et al., 2014; Silva et al., 2017; Suseno et al., 2014). Este facto é relevante e com interesse comercial, pois é sabido que a presença de fungos é uma das principais causas das perdas pós-colheita.

5.2.1 Revestimentos edíveis à base de quitosano para o controlo de fungos

Os revestimentos edíveis têm apresentado resultados favoráveis enquanto tecnologia para a manutenção da qualidade dos frutos frescos e consequente aumento do tempo de vida útil dos mesmos, constituindo uma barreira ao transporte de gases e vapor de água (Luvielmo et al., 2012). Esta barreira dificulta o desenvolvimento de microrganismos, como fungos e bolores, uma das principais perdas pós-colheita.

O quitosano tem demonstrado, em vários estudos, apresentar um potencial de inibição do crescimento de uma ampla gama de fungos e com capacidade de desencadear mecanismos defensivos nos frutos contra infeções causadas por diversos agentes patogénicos (Wang et al., 2013). Utilizando enquanto constituinte de revestimentos edíveis, apresenta-se como uma ferramenta muito útil para o controlo dos microrganismos. (Pinotti et al., 2007).

5.2.2 Fungos *Botrytis spp.*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus spp.*

Botrytis spp. é um fungo causador de uma doença pós-colheita, caracterizada pelo aparecimento de podridão cinzenta, qua causa danos essencialmente no período de armazenamento e leva a perdas significativas (Ma et al., 2019). Este fungo tem uma elevada capacidade de produção de esporos assexuados que, quando instalados na superfície da planta ou vegetal, crescem e têm a capacidade de romper a cutícula da mesma. Tem origem em infeções latentes com início no período anterior à colheita e apresenta capacidade de crescimento e desenvolvimento em todas as áreas climatéricas (Boddy, 2016; Elad et al. 2007). Este fungo induz a morte celular no seu hospedeiro e uma degradação progressiva do tecido infetado do qual se nutre (Sangsuwan et al., 2016).

O fungo *Penicillium spp.* é causador de outra doença pós-colheita, conferindo uma podridão azul ao seu hospedeiro. Tal como o fungo referido anteriormente, causa deterioração dos alimentos e alguns produzem mesmo micotoxinas (Errampalli, 2014). Este fungo cresce na matéria orgânica em ambientes húmidos e escuros, especialmente solos, contaminando frutos e sementes sendo disseminado por deslocções de ar. O fruto é infetado caso apresente feridas onde surgem inicialmente estruturas brancas correspondentes às estruturas vegetais do fungo, as quais evoluem depois para colónias de rápido crescimento de cor azul, dando origem à podridão azul (Jagus et al., 2016, Petrus et al., 2019).

Rhizopus spp. é um fungo caracterizado por micélios brancos e esporângios pretos sendo considerado como um dos causadores de doenças pós-colheita mais significativo (Salem et al., 2015). Ocorre geralmente durante o processamento em frutos e vegetais maduros, no tempo de prateleira ou casa do consumidor final, a temperaturas superiores a 5°C. Este fungo dissemina-se rapidamente de um material vegetal infetado para um saudável. Apresenta um metabolismo complexo com a produção de uma variedade de enzimas que permite a utilização de uma vasta gama de nutrientes. Devido à sua elevada taxa de crescimento, e por se desenvolverem a temperaturas relativamente elevadas, podem causar infeções serias em humanos e animais (Bullerman, 2003).

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Soluções de revestimentos edíveis à base de quitosano

As soluções das formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano utilizadas nas análises sensoriais foram preparadas de acordo com o já descrito no ponto 3.1.1 do Capítulo III, Tema 1: Formulações da presente dissertação.

As placas de Petri foram colocadas numa sala com temperatura controlada de 25°C e efetuada a observação do desenvolvimento dos fungos a cada 24 horas durante um período de 9 dias.

5.4 Resultados e Discussão

Os resultados relativos ao efeito dos revestimentos edíveis à base de quitosano sobre os fungos são essencialmente verificados pelo crescimento dos fungos, estimado de um modo qualitativo por observação das placas de Petri. Este estudo implicou a obtenção de um número bastante significativo de fotografias, cerca de 120, pois foi captada uma fotografia a cada 24h, durante 9 dias, para todas as formulações e fungos. Para não tornar a dissertação muito longa são apenas apresentadas nos anexos 11, 12 e 13 algumas fotografias representativas.

De modo a facilitar a avaliação dos efeitos dos revestimentos edíveis à base de quitosano sobre o crescimento dos fungos foi criada uma escala, para cada um deles, de seguida mostrada, onde se identifica o que é considerado nenhum crescimento (NADA), pouco crescimento (POUCO), algum crescimento (MÉDIO) e muito crescimento (MUITO), que se traduzem em escala numérica de 0,1,2 e 3 respetivamente.

5.4.1 Efeito dos revestimentos sobre *Botrytis spp.*

Na figura 5.4 é apresentada a escala para o caso do fungo *Botrytis spp.*

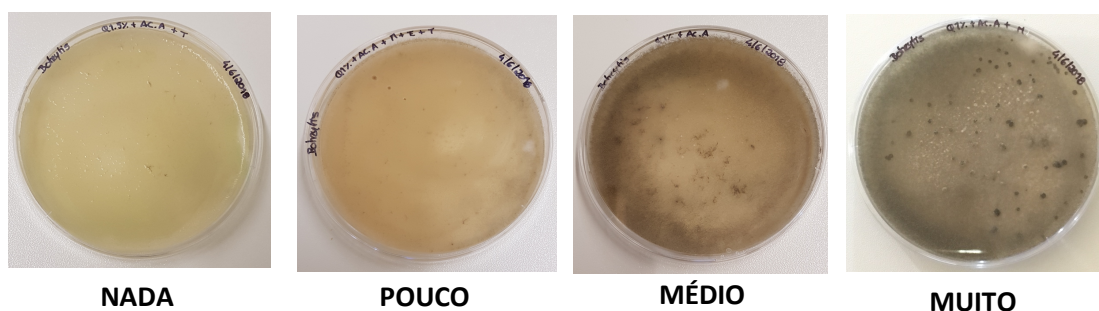


Figura 5.4 – Escala de intensidade relativa ao crescimento do fungo *Botrytis spp.*

Foi avaliado o efeito das formulações apresentadas na tabela 3.1 do Capítulo III, Tema 1: Formulações sobre o crescimento de *Botrytis spp.* durante 9 dias. Na tabela 5.1 encontram-se os resultados obtidos, de acordo com a escala apresentada.

Tabela 5.1 – Resumo do efeito das formulações sobre o controlo do crescimento de *Botrytis spp.*

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
Controlo	0	1	1	1	2	2	2	3	3
Ac.A	0	1	1	1	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A	0	1	1	1	1	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+T	0	1	1	1	1	2	2	2	2
Q1.5%+Ac.A	0	1	1	1	1	2	2	3	3
Q1.5%+Ac.A+T	0	0	1	1	1	1	1	2	2
Ac.A+M	0	0	1	1	1	2	2	2	2
Q1%+Ac.A+M	0	0	1	1	2	2	2	2	2
Q1%+Ac.A+M+T	0	0	0	1	2	2	2	2	2
Q1.5%+Ac.A+M	0	0	1	1	2	2	2	2	2
Q1.5%+Ac.A+M+T	0	0	1	1	2	2	2	2	2
Ac.A+E	0	0	1	1	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+E	0	0	1	1	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+E+T	0	0	1	1	2	2	2	2	3
Q1.5%+Ac.A+E	0	0	1	1	2	2	2	2	3
Q1.5%+Ac.A+E+T	0	0	1	1	2	2	2	2	2
Q1%+Ac.A+M+E	0	1	1	1	1	1	1	2	3
Q1%+Ac.A+M+E+T	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Q1.5%+Ac.A+M+E	0	0	1	1	1	1	1	2	2
Q1.5%+Ac.A+M+E+T	0	0	0	1	1	1	1	2	3

0 corresponde a NADA, 1 corresponde a POUCO, 2 corresponde a MÉDIO e 3 corresponde a MUITO

Analisando os resultados obtidos, nota-se um efeito dos revestimentos edíveis sobre o crescimento do fungo em estudo. Este efeito é notado principalmente com os revestimentos de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%+ Tween80[®], quitosano 1% +

ácido acético 0.5% + mentol + eugenol + Tween80 e nos revestimentos com a presença de mentol. Verifica-se que ao dia 9, o crescimento em algumas das placas era ainda classificado como pouco e médio, o que reforça o efeito de controlo por parte dos revestimentos aplicados sobre crescimento de *Botrytis spp.*

De notar que todos os revestimentos com a presença de quitosano apresentaram um efeito de controlo do crescimento do fungo de cerca de 24 horas, verificando-se ao dia 9 muitas placas com pouco e médio crescimento, continuando a ser notório o efeito dos revestimentos.

5.4.2 Efeito dos revestimentos sobre *Penicillium spp.*

A figura 5.5 representa a escala de avaliação do crescimento do fungo *Penicillium spp.*

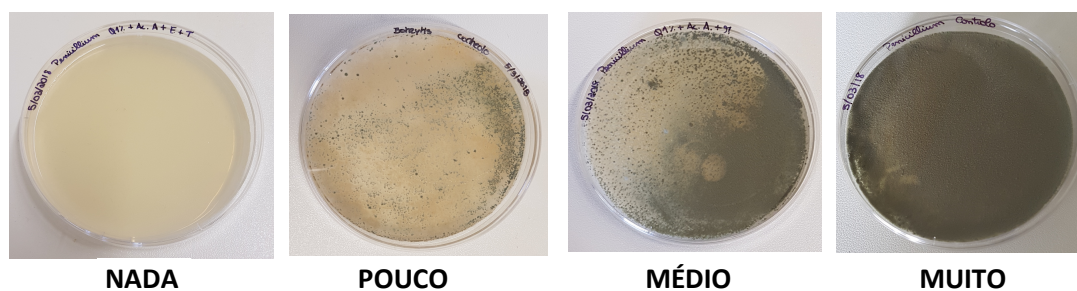


Figura 5.5 – Escala de intensidade relativa ao crescimento do fungo *Penicillium spp.*

Tal como no caso de *Botrytis spp.*, foi avaliado o efeito das formulações apresentadas na tabela 3.1 do Capítulo III, Tema 1: Formulações sobre *Penicillium spp.*, estando apresentados os resultados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Resumo do efeito das formulações sobre o controlo do crescimento de *Penicillium spp.*

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
Controlo	0	1	3	3	3	3	3	3	3
Ac.A	0	1	3	3	3	3	3	3	3
Q1%+Ac.A	0	0	0	1	1	1	2	2	2
Q1%+Ac.A+T	0	0	0	1	1	1	2	2	2
Q1.5%+Ac.A	0	0	0	1	1	1	2	2	2
Q1.5%+Ac.A+T	0	0	0	1	1	1	2	2	2
Ac.A+M	0	1	3	3	3	3	3	3	3
Q1%+Ac.A+M	0	0	1	2	2	2	2	2	3
Q1%+Ac.A+M+T	0	0	1	1	1	2	2	2	3
Q1.5%+Ac.A+M	0	0	1	1	2	2	2	2	3
Q1.5%+Ac.A+M+T	0	0	1	1	1	2	2	2	3
Ac.A+E	0	1	1	2	2	2	3	3	3
Q1%+Ac.A+E	0	0	1	1	1	1	1	2	2
Q1%+Ac.A+E+T	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Q1.5%+Ac.A+E	0	0	1	1	1	1	1	1	2
Q1.5%+Ac.A+E+T	0	0	1	1	1	2	2	2	2
Q1%+Ac.A+M+E	0	0	0	1	1	1	1	1	2
Q1%+Ac.A+M+E+T	0	0	0	0	1	1	1	2	2
Q1.5%+Ac.A+M+E	0	0	0	1	1	1	1	2	2
Q1.5%+Ac.A+M+E+T	0	0	0	1	1	1	1	2	2

0 corresponde a NADA, 1 corresponde a POUCO, 2 corresponde a MÉDIO e 3 corresponde a MUITO

Observando os resultados, é evidente o efeito dos revestimentos edíveis à base de quitosano sobre o crescimento deste fungo. Ao dia 2, apenas as placas que não apresentavam quitosano na sua composição apresentaram crescimento (Controlo,

Ac.A+M e Ac.A+E). Ao longo do tempo de observação é possível verificar que existe um menor crescimento nas placas revestidas com quitosano na concentração de 1% e eugenol na sua composição, enquanto que a introdução de Tween80[®] aparenta não ter um efeito significativo sobre o controlo do crescimento deste fungo. O uso de mentol não se verifica muito interessante pois o crescimento do fungo revestido com quitosano a 1%, ácido acético 0.5%, eugenol, mentol e Tween80[®] é muito semelhante ao crescimento quando revestido com quitosano a 1% + ácido acético + eugenol.

Os revestimentos edíveis à base de quitosano apresentaram neste estudo capacidade de retardar o crescimento de *Penicillium spp.* até 72 horas, notando que no final do ensaio, ao dia 9, eram muitas a placas que ainda eram classificadas como com MÉDIO crescimento e uma com pouco crescimento.

5.4.3 Efeito dos revestimentos sobre *Rhizopus spp.*

A escala para avaliação do crescimento do fungo *Rhizopus spp.* é apresentada na figura 5.6.

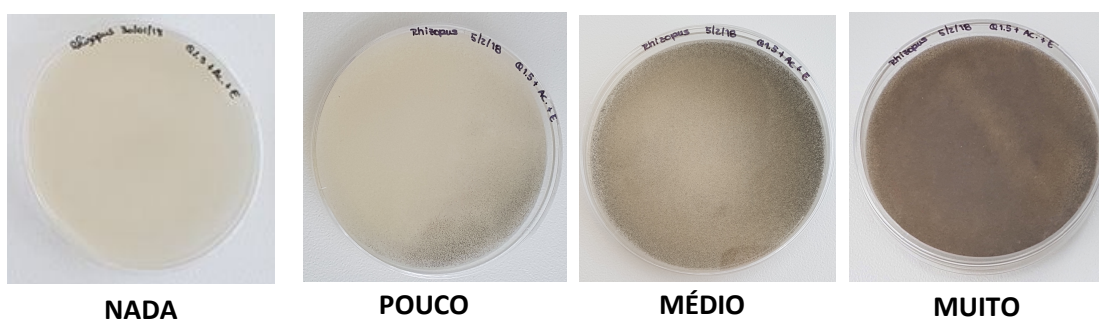


Figura 5.6 – Escala de intensidade relativa ao crescimento do fungo *Rhizopus spp.*

Tabela 5.3 - Resumo do efeito das formulações sobre o controlo do crescimento de *Rhizopus spp.*

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
Controlo	0	2	3	3	3	3	3	3	3
Ac.A	0	2	2	3	3	3	3	3	3
Q1%+Ac.A	0	0	1	1	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+T	0	0	1	1	2	2	2	3	3
Q1.5%+Ac.A	0	0	1	1	1	2	2	3	3
Q1.5%+Ac.A+T	0	0	1	1	1	2	2	3	3
Ac.A+M	0	0	1	1	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+M	0	0	1	1	1	2	2	2	3
Q1%+Ac.A+M+T	0	0	1	1	1	2	2	2	3
Q1.5%+Ac.A+M	0	0	1	1	1	1	2	2	3
Q1.5%+Ac.A+M+T	0	0	1	1	1	1	2	2	3
Ac.A+E	0	1	2	2	2	2	3	3	3
Q1%+Ac.A+E	0	1	2	2	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+E+T	0	1	2	2	2	2	2	3	3
Q1.5%+Ac.A+E	0	1	1	2	2	2	2	3	3
Q1.5%+Ac.A+E+T	0	1	2	2	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+M+E	0	0	1	1	2	2	2	3	3
Q1%+Ac.A+M+E+T	0	0	1	1	2	2	2	2	3
Q1.5%+Ac.A+M+E	0	0	1	1	1	2	2	3	3
Q1.5%+Ac.A+M+E+T	0	0	1	1	1	2	2	3	3

0 corresponde a NADA, 1 corresponde a POUCO, 2 corresponde a MÉDIO e 3 corresponde a MUITO

A análise dos resultados da tabela 5.3 permite concluir que os revestimentos apresentam todos um efeito positivo sobre o controlo do crescimento do fungo. Os

revestimentos que apresentam mentol na sua composição apresentaram um maior efeito sobre o crescimento de *Rhizopus spp.*, pois as placas revestidas com quitosano e mentol apresentaram pouco crescimento do fungo durante um maior período de tempo. Verifica-se também que a concentração de quitosano 1.5% tem um maior poder de controlo do crescimento do fungo.

De notar que estes resultados estão em linha com os já reportados por alguns autores que efetuaram estudos do efeito antifúngico do quitosano e dos compostos químicos dos óleos essenciais eugenol e mentol (Requena et al., 2019, Romanazzi et al., 2002, Sangsuwan et al., 2016, Xing et al., 2016).

5.5 Conclusões

Todas as formulações estudadas de revestimentos edíveis à base de quitosano apresentam efeitos positivos no controlo do crescimento dos fungos *Botrytis spp.*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus spp.*.

No controlo do crescimento do fungo *Botrytis spp.*, os revestimentos com mentol na sua composição, os revestimentos de quitosano 1.5%, ácido acético 0.5% e Tween80[®] e os revestimentos de quitosano 1%, ácido acético 0.5%, mentol, eugenol e Tween80[®] apresentaram melhores resultados. Em relação ao controlo de *Penicillium spp.* os revestimentos com quitosano a 1% e eugenol foram os que apresentaram resultados mais satisfatórios. O controlo do fungo *Rhizopus spp.* verificou-se mais eficaz por revestimentos com mentol na sua composição.

CAPÍTULO VI
TEMA 4: CASOS DE ESTUDO – APLICAÇÃO
DE REVESTIMENTOS EDÍVEIS COM
QUITOSANO A MORANGO E A CEREJA

CAPÍTULO VI. Tema 4: Casos de Estudo – aplicação de revestimentos edíveis com quitosano a morango e a cereja

6.1 Introdução

6.1.1 Objetivo

6.2 Enquadramento teórico

6.2.1 Período e perdas pós-colheita de fruta fresca

6.2.2 Revestimento edíveis à base de quitosano na conservação de frutos

6.2.2.1 Parâmetros físicos e químicos analisáveis num estudo de conservação

6.2.3 Morango

6.2.4 Cereja

6.3 Materiais e Métodos

6.3.1 Preparação das soluções de revestimento

6.3.2 Ensaio de conservação

6.3.2.1 Aplicação e secagem dos revestimentos edíveis à base de quitosano em morangos e em cerejas

6.3.2.2 Análise dos parâmetros físicos e químicos em morangos e cerejas

6.3.2.2.1 Perda de peso

6.3.2.2.2 Textura

6.3.2.2.3 Cor

6.3.2.2.4 Sólidos solúveis totais

6.3.2.2.5 Acidez titulável

6.3.2.2.6 Compostos fenólicos

6.3.2.2.7 Capacidade antioxidante

6.3.3 Tratamento estatístico

6.4 Resultados e discussão

6.4.1 Ensaio de conservação de morangos

6.4.2 Ensaio de conservação de cerejas

6.5 Conclusões

6.1 Introdução

6.1.1 Objetivo

O objetivo do presente capítulo é estudar dois casos de aplicação dos revestimentos edíveis à base de quitosano a frutos – morango e cereja – e estudar o efeito que os mesmos apresentam na conservação destes frutos frescos, em contexto real.

6.2 Enquadramento Teórico

6.2.1 Período e perdas pós-colheita de fruta fresca

A dieta alimentar está cada vez mais em foco no dia a dia da população, sendo o consumo de fruta fresca uma constante durante todo o ano, e o consumidor revela-se cada vez mais exigente na sua qualidade. Neste tipo de alimentos o período pós-colheita tem um papel determinante na sua qualidade, e seu indevido tratamento leva rapidamente à inadequação para consumo (Xing et al., 2016). A pós-colheita engloba todos os processos desde a definição do estado ótimo para a colheita, essa mesma operação e todas as outras que os frutos enfrentam, seleção, armazenamento, transporte e comercialização, até serem consumidos e que vão influenciar decisivamente a qualidade dos mesmos (Youwei et al., 2013). Desde a colheita até ao consumo existe uma longa sequência de acontecimentos durante os quais ocorrem alterações bioquímicas, enzimáticas, químicas, estruturais e nutricionais, que são cruciais no tempo de vida útil dos mesmos. Estas alterações provocam a perda da qualidade dos frutos refletida na perda de peso, alteração da cor, perda de firmeza e também desenvolvimento de fungos (Wang et al., 2013), podendo conduzir a perdas pós-colheita. As perdas pós-colheita são usualmente controladas com recurso aos métodos tradicionais de preservação, como o controlo de temperatura e humidade, melhoria das condições de transporte e embalamento. No entanto, estas estratégias não apresentam efetividade para suprimir a deterioração dos frutos e nem para o controlo de doenças pós-colheita provocadas por fungos (Ricardo-Rodrigues, 2016; Wang et al., 2018). Isto levou à investigação e desenvolvimento de novas técnicas, mais sustentáveis, alternativas ao uso de pesticidas, como os revestimentos edíveis, no sentido de dar resposta às necessidade de aumento do tempo de vida útil dos frutos e manutenção da qualidade dos mesmos (Kumari et al., 2017; Pinheiro et al., 2010; Romanazzi et al., 2013; Xing et al., 2016; Xing et al., 2016).

6.2.2 Revestimento edíveis à base de quitosano na conservação de frutos

Os revestimentos edíveis surgem como uma tecnologia sustentável de potencial, sustentável, para o aumento do tempo de vida útil dos frutos, assegurando a segurança microbiológica e proteção de fatores exteriores (Dutta et al., 2009, Luviélmo et al., 2012).

Estes revestimentos protegem os frutos das variáveis atmosféricas e oferecem limitação do movimento de componentes voláteis e humidade, retardando a sua deterioração, para além de que representam uma menor fonte de poluição ambiental, promovem produtos sem conservantes e possibilidade de maior retenção de cor e sabor (Kumari et al., 2017).

O quitosano é um dos polissacarídeos mais utilizados como revestimento edível principalmente devido às suas características biodegradáveis, biocompatíveis e não toxicidade com elevado potencial antioxidante, antimicrobiano e antifúngico (Fonseca, 2012). Muitos autores realizaram estudos onde foram utilizados revestimentos edíveis à base de quitosano em frutos frescos como descreveram Duran e seus colaboradores, (2016), Petriccione e seus colaboradores (2015), Kumari e seus colaboradores (2017), Ortiz-Duarte e seus colaboradores (2019), Pasquariello e seus colaboradores (2015), Petriccione e seus colaboradores (2015), Ribeiro e seus colaboradores (2007), Romanazzi e seus colaboradores (2009), e Xing e seus colaboradores (2016), entre outros, obtendo resultados satisfatórios. Contudo, mesmo considerando o amplo números de ensaios já realizados, podemos referir o mesmo não se encontra esgotado ainda havendo necessidade para mais investigação neste tema.

A eficácia deste tipo de revestimentos na conservação de frutos no período pós-colheita vai depender de fatores como o tipo de fruta, e a formulação do revestimento, considerado a concentração de quitosano, ácido utilizado na dissolução do quitosano, presença de surfactante e óleos essenciais (Park, 1999).

6.2.2.1 Parâmetros físicos e químicos analisáveis num estudo de conservação

Os métodos instrumentais de análise da qualidade pretendem minorar o possível erro introduzido pela maior subjetividade da análise sensorial, concedendo uma maior transparência na avaliação devido à sua natureza objetiva (Agulheiro-Santos et al., 2011).

Num estudo de conservação de frutos há alguns parâmetros que são essenciais pois fornecem as informações necessárias para que possam avaliadas as alterações sofridas pelos frutos ao longo do tempo de conservação e assim serem tiradas conclusões acerca do mesmo.

6.2.2.1.1 Perda de Peso

A perda de peso está relacionada, ainda que de forma indireta, com a atividade metabólica dos frutos durante o tempo de conservação. O principal mecanismo responsável pela perda de água é a transpiração, a qual ocorre devido às diferenças de pressão de vapor de água entre a superfície do fruto (lenticelas e estomas) e a atmosfera. Este fator está muito relacionado com a perda de qualidade dos frutos devido à perda de turgescência dos tecidos que o constituem.

A equação 6.1 mostra a fórmula de obtenção da percentagem de perda de peso do fruto.

$$\% \text{ Perda de Peso} = \left(\frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100 \quad (6.1)$$

6.2.2.1.2 Textura

A textura corresponde a um conjunto de propriedades mecânicas da superfície e geometria dos alimentos. No caso dos frutos, a textura está dependente das biomoléculas envolvidas na estrutura das paredes celulares (El-Ramady et al., 2015).

A textura dos vegetais pode ser atribuída a integridade estrutural da parede celular e da lamela media, à pressão osmótica celular e a mecanismos de ligação e rutura entre as células constituintes dos tecidos vegetais.

As características texturais são variáveis em função do período em que são avaliadas, pré e pós-colheita, sendo influenciadas pelo estado de maturação, nutrição vegetal, stress-hídrico, humidade relativa e temperatura de armazenamento e as alterações verificadas neste parâmetro ocorre devido a alterações na composição e estrutura dos polissacarídeos da parede celular (Chen et al., 2013; Contador et al., 2015). As alterações verificadas neste parâmetro levam à perda de firmeza dos frutos, e à consequente perda de qualidade dos mesmos, ocorrem devido a alterações na composição e estrutura dos polissacarídeos da parede celular (Chen et al., 2013; Contador et al., 2015; Valero & Serrano, 2010). Pode ser avaliada por análise sensorial e por métodos instrumentais, relacionados com a estrutura do alimento (Ricardo-Rodrigues, 2016). Os frutos apresentam um comportamento viscoelástico quando submetidos a uma carga, de forma que a força, a deformação e o tempo – ou seja

intensidade, duração e velocidade da carga- determinam seu comportamento reológico (Bourne, 1982; Abbott, 1999). Reologia é a ciência que estuda a deformação dos sólidos e o fluxo ou escoamento dos líquidos sob a ação de tensões.

Os testes mais utilizados para o estudo da reologia e avaliação da textura dos alimentos são os de compressão, de corte e de penetração. Estes últimos são de grande destaque no estudo de frutos, e consistem na penetração, ou seja aplicação uniaxial da carga, sendo medida a resistência oferecida ao avanço da sonda, geralmente cilíndrica, nos tecidos dos frutos, sendo essa resistência resultado da combinação de forças de compressão (área da sonda) e corte (perímetro da sonda). Mohsenin (1974) referia que a caracterização reológica dos frutos é um conhecimento imprescindível para proceder à seleção do melhor método de colheita, a definição dos parâmetros de qualidade, avaliação dos danos mecânicos durante a colheita e na pós-colheita. Desde essa data até à actualidade essa afirmação tem vindo a ser comprovada, sendo hoje em dia a realização de testes reológicos uma constante no estudo de alimentos entre os quais os frutos.

Segundo Pintado (2012) a curva Força/ Deformação obtida durante os testes de penetração é inicialmente linear, correspondendo a uma deformação elástica não destrutiva, até ao limite elástico no qual se observa um inflexão na curva. Verifica-se a partir daí a ruptura das células podendo ocorrer ou não o chamado ponto de biofluencia, com alteração do declive da curva, sendo depois observado o ponto de ruptura correspondente a uma ruptura significativa dos tecidos.

6.2.2.1.3 Cor

A cor é um parâmetro muito importante na avaliação da qualidade dos frutos pois tem um forte impacto no consumidor. É afetado pelo conteúdo total de antocianinas e pode alterar-se por ação de temperatura, oxigénio, luz, enzimas endógenas e iões metálicos (Nunes, 2008; Valero & Serrano, 2010; Wu & Sun, 2013)

Este parâmetro pode ser medido por dois métodos instrumentais, designadamente o método colorimétrico e método espectrofotométrico. No método colorimétrico, a medição é realizada com recurso a um colorímetro triestímulo de refletância, em que a amostra é irradiada com um iluminate de luz policromática,

medindo-se por fotocélula a luz refletida que passa através dos filtros. Neste equipamento são utilizados geralmente dois tipos de illuminate, C e D65, onde o primeiro diz respeito à luz média do dia, a uma temperatura de cor de 6800K, e o segundo representa a média luz do dia no espectro UV-Vis até 300nm, a uma temperatura de cor de 6504K (Bastos de Lima, 2012).

Existem vários sistemas de referência, sendo que o utilizado no presente estudo foi o sistema CIE L*a*b*, representado na figura 6.1, baseado no modelo proposto pela Commission Internationale de l'Éclairage, em 1979, e que sugere diferenças de cor mais uniformes e com melhor relação com a percepção do olho humano (Bastos de Lima, 2012). A escala de cores é baseada na teoria das cores opostas, onde L* corresponde à luminosidade, variável entre o preto (0) e o branco (100), e a* e b* correspondem a coordenadas cromáticas, com valores negativos e positivos, indicadores de vermelho/verde e amarelo/azul, respectivamente. Com estes valores é possível determinar o ângulo Hue (h_0), representado na equação 6.2, e o Chroma (C^*), representado na equação 6.3. O ângulo de Hue dá indicação sobre a tonalidade da cor; valores perto de 0° indicam cores púrpura, valores perto de 90° indicam cores amarelas, valores perto de 180° indicam cores verde-azuladas e valores próximos de 270° indicam cores azuis. O Chroma dá indicação sobre a pureza da cor, distinguindo cores vivas de cores baças (Pintado, 2012; Wu & Sun, 2013).

$$h_0 = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (6.2)$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (6.3)$$

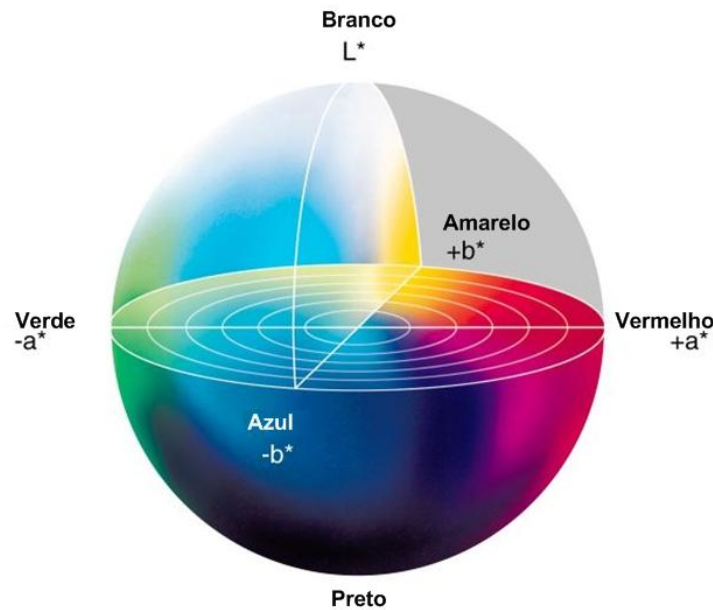


Figura 6.1 – Representação esquemática do sistema CIE L*a*b*

6.2.2.1.4 Sólidos Solúveis Totais

Tal como o nome indica, os sólidos solúveis totais dizem respeito a todos os sólidos dissolvidos em água, como glicose, frutose, sacarose, ácidos orgânicos e outros compostos. Nos frutos, o grupo de sólidos solúveis que se encontra presente em maior proporção são os açúcares, podendo ser associada a medição do parâmetro sólidos solúveis totais à avaliação do conteúdo em açúcares.

A avaliação deste parâmetro requer uma pequena quantidade de amostra, geralmente polpa ou sumo do fruto, e um refratômetro, aparelho medidor do índice de refração da solução a analisar. O valor obtido é expresso em grau Brix ($^{\circ}$ Brix), que corresponde a 1 grama de sacarose em 100g de solução (Shamili, 2019).

6.2.2.1.5 Acidez Titulável

A acidez é estimada pela acidez titulável e o pH, parâmetros determinados com metodologia diferente. No âmbito da avaliação de frutos, a acidez titulável é o parâmetro que melhor descreve o ácido no sabor deste tipo de alimentos (Souza et al., 2010).

A avaliação da acidez titulável é efetuada por titulação, tendo em conta o ácido predominantemente presente no fruto. Esta titulação vai permitir a determinação da

concentração de hidrogeniões tituláveis presentes na amostra por neutralização com base forte e com baixa concentração, como o hidróxido de sódio a 0.1M. Tendo em conta o ácido em estudo, e com recurso à equação 6.4, representada para o ácido málico, é possível calcular-se a percentagem de acidez titulável.

$$\text{Acidez Titulável}(\% \text{ ácido málico}) = \left(\frac{(\text{ml NaOH gasto}) \times (0.5M \text{ NaOH}) \times 0.067}{g \text{ amostra}} \right) \times 100 \quad (6.4)$$

6.2.2.1.6 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos orgânicos resultantes do metabolismo secundário de plantas, sintetizados pelo ciclo do ácido chiquímico. Estes compostos correspondem a um grupo de antioxidantes naturais encontrados na maioria dos alimentos de origem vegetal, que combatem os radicais livre. Contudo, quando em excesso no organismo provocam stress oxidativo levando ao envelhecimento celular. Apresentam uma grande variabilidade química, que inclui desde simples ácidos fenólicos a flavonoides complexos e têm influência em parâmetros organoléticos, como cor e sabor dos alimentos (Herrero et al., 2013).

Este tipo de compostos são hidrossolúveis e apresentam na sua composição um anel aromático e pelo menos um substituinte hidroxilo.

O conteúdo em compostos fenólicos apresentado pelos alimentos vai depender de fatores internos, como variedade, espécie e género e também de fatores externos, como condições ambientais, processo de amadurecimento e condições de armazenamento (Webb et al., 2017).

Os compostos fenólicos são usualmente quantificados pelo método Folin-Ciocalteu, baseado no número de grupos fenólicos ou outros possíveis grupos oxidáveis presentes nos compostos da amostra. Este tipo de compostos reage com o reagente Folin, em meio básico, motivo pelo qual se adiciona o carbonato de sódio, para a solução verificar um pH próximo de 10, a este valor ocorre formação do anião fenolato, por perda do protão, a partir do composto fenólico, tendo a capacidade de reduzir o reagente, formando-se compostos de cor azul (Ricardo-Rodrigues, 2016).

6.2.2.1.7 Capacidade antioxidante

Os antioxidantes são compostos químicos com capacidade de reduzir a oxidação. As reações de oxidação são reações que podem produzir radicais livres, podendo estes danificar as células. Os antioxidantes vão interferir neste processo, eliminando os radicais livres existentes e inibindo a formação de mais, por doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas (Rao, 2016; Xiao et al., 2019).

Um dos métodos mais utilizados na avaliação da capacidade dos antioxidantes de sequestrar radicais livres é o ensaio do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, sendo um dos poucos radicais orgânicos azotados estáveis comercialmente. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) é um radical livre estável, com capacidade de aceitar um átomo de hidrogénio ou eletrão, transformando-se num não radical de difícil oxidação (Rodrigues, 2016).

6.2.3 Morango

O morango é um fruto bastante apreciado pela população de todo o mundo. O seu sabor agradável, coloração brilhante, valor nutricional e versatilidade fazem deste fruto um dos mais apreciados e consumidos. Os morangos são uma boa fonte de antioxidantes naturais e, além de ricos em vitaminas e minerais, são ricos também em antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos, substâncias benéficas para a saúde (Shahbazi, 2018; Wang et al., 2013).



Figura 6.2 – Aspeto de uma plantação de morangueiro (Finch et al., 2014)

O morangueiro (figura 6.2), *Fragaria spp.*, é uma planta da família *Rosaceae*, distribuído em zonas subtropicais e temperadas (Finch et al., 2014). A planta é herbácea, dicotiledónea perene, com caule semi-subterrâneo. As folhas apresentam um numero elevado de estomas, 300 a 400 estomas/mm², tornando a planta muito sensível à falta de água, baixa humidade relativa, altas temperaturas e exposição solar de grande intensidade e por longos períodos de tempo. O sistema radicular é constituído por um feixe de raízes, sendo muitas superficiais; as flores são

hermafroditas, agrupadas em inflorescências; as pétalas, brancas ou avermelhadas, estão dispostas em volta do receptáculo, que após a fecundação, dá origem ao morango, representado na figura 6.3 (Silva, 2010). Este fruto é de crescimento rápido, atingindo a maturação entre 20 a 60 dias após atingir o seu máximo tamanho, variando com a temperatura (Smith et al., 2003; Tadapaneni et al., 2015).

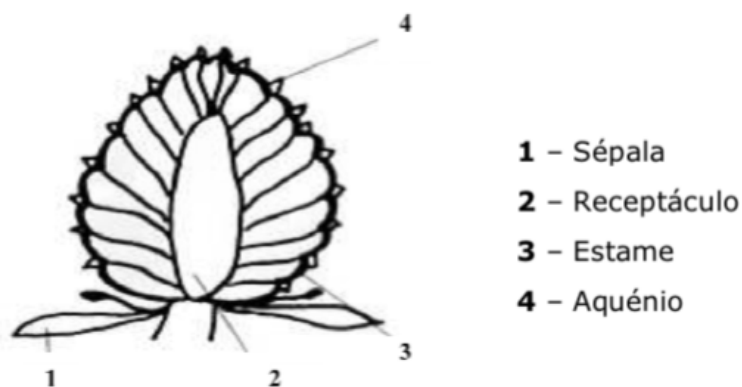


Figura 6.3 – Morfologia de um morango (Santos, 2010)

Os morangos, classificados como frutos múltiplos de aquénios, são bastante perecíveis, muito suscetíveis a lesão mecânica, dessecação, decaimento e distúrbios fisiológicos no processo de transporte e armazenamento (Vu et al., 2011). Apresentam um curto período de vida pós-colheita, essencialmente devido à elevada taxa de

respiração (50 a 100 ml CO₂/kg.hr à temperatura ambiente), textura macia excessiva, alta sensibilidade à temperatura, perda de água, deterioração microbiológica e lesões mecânicas, o que torna alongar do seu período pós-colheita um desafio com grande interesse prático (Petriccione et al., 2015; Shahbazi, 2018; Silva, 2010).

6.2.4 Cereja

Pertencente à mesma família do morango, *Rosacea*, a cereja é também um fruto bastante apreciado pelo seu sabor doce, polpa sumarenta e firme. As cerejas são boa fonte de melatonina, antioxidantes, antocianinas e compostos fenólicos, apresentado benefícios para a saúde.

A cerejeira é uma árvore bastante alta, podendo atingir os 15 metros, de folha obovada-acuminada, duplamente serrada e peluda na parte inferior, e as suas folhas necessitam de polinização para se reproduzir. O fruto é uma drupa arredondada, o seu epicarpo pode variar de amarelo a vermelho escuro e o mesocarpo pode variar



Figura 6.4 – Aspeto de pormenor de uma cerejeira

entre amarelado e vermelho. A polpa, vermelha ou amarelada, é firme, succulenta e doce (Loescher et al., 2003). É cultivada em climas temperados, apresentando uma grande capacidade de adaptação a diferentes condições de solo.

À semelhança do morango, a cereja é um fruto não-climatérico, altamente perecível, deteriorando-se muito e rapidamente a sua qualidade no período pós-colheita, muito embora apresente uma baixa taxa respiratória 22 a 28 ml CO₂/kg.hr à temperatura ambiente. Tanto o fruto como o pedúnculo são constituídos essencialmente por água, quando os níveis desta baixam ocorre perda de açúcares nas células, alteração da textura e escurecimento do caule. Também as contaminações microbiológicas contribuem em larga escala para a perda de qualidade das cerejas. Dados estes fatores, é um fruto que rapidamente se torna inapto para consumo, sendo

também o alargar o seu período pós-colheita um desafio para fazer chegar o produto ao consumidor nas ótimas condições.

6.3 Materiais e Métodos

6.3.1 Preparação das soluções de revestimento

As soluções de revestimentos edíveis à base de quitosano utilizadas nas análises sensoriais foram preparadas de acordo com o descrito no ponto 3.1.1 do Capítulo III, Tema 1: Formulações da presente dissertação.

No ensaio de conservação de morangos foram utilizadas as seguintes formulações: quitosano 1% + ácido acético 0.5% e quitosano 1.5 % + ácido acético 0.5%. Estas foram as formulações escolhidas para este caso de estudo pois o principal objetivo foi verificar o efeito dos revestimentos de quitosano e também quais as diferenças em termos de conservação por parte de diferentes concentrações, não tendo sido incluídos propositadamente os OEs anteriormente referidos. Não foi utilizado Tween80[®] pois verificou-se que as características da superfície do fruto em estudo exigia o surfactante para a adesão do revestimento.

No ensaio de conservação com cereja utilizaram-se as formulações que haviam apresentado melhores resultados em termos de controlo de crescimento de fungos, nos estudos in vitro, sendo elas: quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80, quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80, quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol + Tween80 e quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol + eugenol + Tween80. No caso da cereja, devido às características da sua superfície, foram utilizadas sempre formulações com surfactante.

6.3.2 Ensaio de conservação

O ensaio de conservação com morangos foi desenhado para uma duração de 12 dias, com 4 saídas de câmara e análises aos dias 0, 3, 6, 9 e 12.

O ensaio de conservação com cerejas estava desenhado para 28 dias, com cinco saídas de câmara e análises aos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Dada a qualidade das cerejas e o seu avançado estado de deterioração apenas se realizou até ao dia 14.

6.3.2.1 Aplicação e secagem dos revestimentos edíveis à base de quitosano nos morangos e em cerejas

A aplicação dos revestimentos edíveis à base de quitosano no morango e na cereja e a sua secagem no mesmo decorreu como referido no capítulo IV Tema 2: Sensoriais, nos pontos 4.3.2 e 4.3.3. De ressaltar que nas cerejas a aplicação dos revestimentos não se revelou ser possível de uma forma eficaz, tendo-se verificado uma grande irregularidade na aderência à superfície dos frutos, como mostrado nas figuras 6.5 e 6.6, observando-se que em muitos dos frutos não se formava película. Tal facto faz com que não seja possível garantir que em todas as cerejas tenha sido formada uma película homogénea e contínua, logo origina a introdução de possíveis erros no processo de avaliação.



Figura 6.5 – Exemplo de cereja onde o revestimento aderiu por completo à superfície do fruto



Figura 6.6 – Exemplo de cereja onde o revestimento não aderiu à superfície do fruto

6.3.2.3 Análise dos parâmetros físicos e químicos em morangos e cerejas

6.3.2.3.1 Perda de peso

A perda de peso ao longo do ensaio, tanto para morangos como para cerejas, foi determinada com recurso a uma balança digital PB1502 Mettler Toledo (Mettler Toledo AG, Greifensee, Suíça), expresso em gramas e com uma precisão de 0.1 g. Todos os frutos foram pesados antes do início do ensaio de conservação e a cada saída de câmara efetuada. Com os valores obtidos foi determinada a percentagem de perda de peso através da equação 6.1, apresentada na secção 6.2.2.1.1 do presente capítulo desta dissertação.

6.3.2.3.2 Textura

De modo a avaliar as propriedades reológicas dos morangos, realizou-se um teste destrutivo de penetração, com recurso a um texturómetro TA.HD.Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK), mostrado na figura 6.7, utilizando-se uma sonda 2 mm de base plana até 10mm de deformação. A penetração foi realizada em duas zonas do morango inteiro, como se mostra na figura 6.8.

Para as cerejas realizou-se um teste destrutivo de penetração, com recurso ao texturómetro TA.HD.Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK), utilizando-se uma sonda 2 mm de base plana, e percentagem de deformação inicialmente de 10% no dia 0, havendo necessidade de aumentar para 35% nos dias 7 e 14. Tal como nos morangos, a penetração realizou-se em duas zonas da cereja inteira.

Os dados obtidos foram representados sob a forma de gráficos utilizando um software de aquisição e recolha de dados, o Texture Exponent 32 versão 5.1.1.0.



Figura 6.7 – Aspeto de texturómetro TA.HD.Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK).

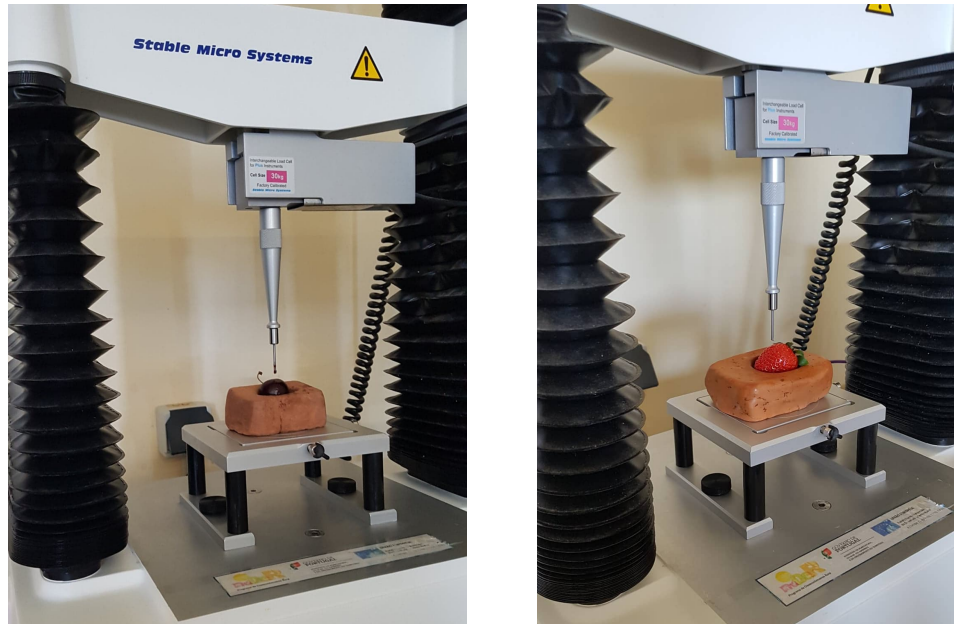


Figura 6.8 – Aspeto de avaliação da textura de morango e cereja, com recurso a teste de penetração, com sonda de 2mm, utilizando o texturómetro TA.HD.Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK).

6.3.2.3.3 Cor

A cor da superfície dos morangos foi determinada com recurso a um colorímetro Cr-400, da marca Konica Minolta (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japão), mostrado na figura 6.9, o qual avalia os valores de coordenadas cromáticas L^* , a^* , b^* . Antes da sua utilização, o colorímetro foi calibrado com um padrão de referência branco, cujas coordenadas são $Y = 86.8$, $x = -0.3171$, $y = 0.3242$. Por cada fruto foram realizadas duas leituras em duas zonas distintas do mesmo. As leituras realizaram-se com o iluminante C, com um ângulo de visão de 2° e com uma área de leitura de 8mm de diâmetro.

Obtidos os valores de a^* e b^* foi possível calcular o ângulo Hue (h_0) e o Chroma (C^*), com recurso às equações 6.2 e 6.3, representadas na secção 6.2.2.1.3 do presente capítulo desta dissertação.

Os dados foram recolhidos com o software Spectra MagicTM NX.

As medições de cor foram realizadas apenas para o ensaio de conservação dos morangos.



Figura 6.9 – Colorímetro Cr-400, Konica Minolta (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japão).

6.3.2.3.4 Sólidos solúveis totais

Os morangos foram partidos em duas partes, uma conservou-se e a outra foi utilizada para a medição do valor de sólidos solúveis totais (SST). Foram espremidas algumas gotas do fruto sobre a superfície do refratômetro, obtendo-se o valor de SST, em °Brix.

O refratômetro utilizado foi um refratômetro digital ATAGO PR-32 α (ATAGO CO., LTD, Tóquio, Japão), figura 6.10. O aparelho foi calibrado com água destilada para 0°Brix antes da utilização.



Figura 6.10 – Refratômetro digital ATAGO PR-32 α .

6.3.2.3.5 Acidez titulável

Para o cálculo deste parâmetro foi utilizada uma solução homogênea de polpa de morangos. Para a obtenção de cada uma das soluções analisadas foram trituradas cinco metades de morangos, obtendo-se uma polpa que foi depois filtrada em tecido de

malha fina para a obtenção de uma solução homogênea. Dissolveram-se 3 gramas da solução de polpa de morango obtida anteriormente em 50 mL de água destilada e a solução titulada com recurso a um titulador automático Crison Compact Tritrador – versão S (Crison Instruments, S.A., Barcelona, Espanha). Definiu-se o programa indicado a utilizar e o equipamento foi adicionando NaOH 0.5M à solução em estudo até um valor de pH de 8.1. Registou-se o volume de NaOH utilizados em cada titulação e calculou-se a acidez titulável em termos de percentagem de ácido málico nos frutos, o ácido predominante tanto no morango como na cereja (Petriccione et al., 2015) , através da equação 6.4.

6.3.2.3.6 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram quantificados com recurso ao método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado de Singleton e Rossi, 1965.

Num tudo de ensaio colocaram-se 125µL de amostra, 250µL de reagente de Folin puro e 1250µL de água destilada. Agitou-se, deixando a reagir durante 2 minutos. Adicionaram-se depois 400µL de carbonato de sódio 30% e posteriormente 2975µL de água destilada, agitando-se novamente. Mantiveram-se os tubos em local escuro e a temperatura ambiente por um período de 2 horas. Procedeu-se depois à leitura da absorvância por espectrofotometria UV-Visível, a um comprimento de onda de 750nm, sendo o branco utilizado uma amostra preparada como descrito acima, substituindo a amostra por água destilada.

A reta de calibração, em anexo foi elaborada com recurso a uma solução de ácido gálico, com 500mg/L de concentração. As soluções padrão realizaram-se para um volume final de 5mL, com concentrações de 50 a 500 mg/L, perfazendo-se os volumes com água destilada. A leitura foi realizada do mesmo modo descrito para as amostras.

6.3.2.3.7 Capacidade antioxidante

Num tubo de ensaio colocou-se 100µL de amostra e 3900µL de solução de DPPH em metanol de concentração 6×10^{-5} M. Os tubos foram colocados no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. As amostras foram lidas a 517nm.

Este parâmetro foi avaliado partindo de uma curva padrão de ácido ascórbico, sendo os resultados expressos em mg equivalente de ácido ascórbico por 100g de peso de fruto (mg AAE/g peso).

A reta de calibração realizou-se com a solução de ácido ascórbico com uma concentração de 1mmol/L. As soluções padrão foram feitas para um volume final de 5mL com concentrações entre 0.1mmol/L e 1mmol/L, perfazendo-se os volumes com água destilada. A leitura decorreu como descrito para as amostras.

6.3.3 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com recurso ao software Statistica7. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) fatorial para um nível de significância de 0.05.

6.4 Resultados e discussão

6.4.1 Ensaio de conservação de morangos

O ensaio de conservação de morangos decorreu até ao nono dia, após este dia os frutos foram considerados como inapropriados para consumo, e, portanto, foi decidido não prosseguir o estudo.

A tabela apresentada no anexo 16 contem os valores de F e p obtidos para cada um dos parâmetros avaliados, coma realização de análise de variância considerando como variáveis independentes ou fatores “Tempo de conservação” e “Modalidade”.

Relativamente à observação de proliferação de fungos nos frutos, verificou-se apenas crescimento na modalidade controlo após 9 dias, não se verificando crescimento de fungos em nenhum dos morangos revestidos.



Figura 6.11 – Aspeto da proliferação de fungos em morango da modalidade controlo após 9 dias de conservação

Tabela 6.1 - valores de F e p relativos a cada um dos parâmetros avaliados para verificação do efeito dos revestimentos edíveis na conservação de morangos.

		F	p
% Perda de Peso	Modalidade	16,057	0,000
	Tempo de conservação (dia)	390,555	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,247	0,041
SST	Modalidade	0,196	0,822
	Tempo de conservação (dia)	0,154	0,927
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	3,073	0,007
Acidez Titulável	Modalidade	1,783	0,171
	Tempo de conservação (dia)	29,990	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	6,601	0,000
L*	Modalidade	1,111	0,332
	Tempo de conservação (dia)	19,324	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,959	0,074
a*	Modalidade	0,574	0,564
	Tempo de conservação (dia)	10,539	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,353	0,033
b*	Modalidade	1,287	0,279
	Tempo de conservação (dia)	16,980	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,135	0,052
h ₀	Modalidade	1,197	0,305
	Tempo de conservação (dia)	11,106	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,184	0,047
C*	Modalidade	1,541	0,217
	Tempo de conservação (dia)	23,249	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,363	0,032
Firmeza da Epiderme	Modalidade	2,066	0,130
	Tempo de conservação (dia)	3,550	0,016
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,192	0,313
Gradiente	Modalidade	1,375	0,256
	Tempo de conservação (dia)	20,517	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	3,993	0,001
Área	Modalidade	2,468	0,088
	Tempo de conservação (dia)	3,092	0,029
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,610	0,147
Deformação	Modalidade	3,815	0,024
	Tempo de conservação (dia)	21,563	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	4,288	0,000
Firmeza da Polpa	Modalidade	4,750	0,010
	Tempo de conservação (dia)	0,532	0,661
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,378	0,226
Compostos Fenólicos	Modalidade	2,441	0,096
	Tempo de conservação (dia)	2,969	0,039
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,384	0,236
Capacidade Antioxidante	Modalidade	2,436	0,0961
	Tempo de conservação (dia)	7,566	0,000225
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,521	0,0304

Perda de peso

A análise de variância deste parâmetro apresentou diferenças significativas, para modalidade ($p < 0.001$), tempo de conservação ($p < 0.001$), e interação ($p = 0.05$), sendo o tempo de conservação o fator que melhor explica as diferenças pois é o que apresenta maior valor de F, sendo $F_{\text{Tempo de conservação}} = 390.555$ e o $F_{\text{Modalidade}} = 16.57$, como se pode verificar na tabela 6.1.

Na tabela 6.2 estão representados os valores médios e o desvio padrão para a percentagem de perda de peso.

Tabela 6.2 – Valores médios e desvio padrão em relação à percentagem de perda de peso (%) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controlo	0,0000 ± 0,0000
0	Q1	0,0000 ± 0,0000
0	Q1.5	0,0000 ± 0,0000
3	controlo	4,2550 ± 0,6096
3	Q1	2,9104 ± 0,4835
3	Q1.5	2,9850 ± 0,7476
6	controlo	6,6112 ± 1,4254
6	Q1	5,5835 ± 1,8638
6	Q1.5	4,9637 ± 0,9898
9	controlo	9,3664 ± 1,6499
9	Q1	7,5963 ± 2,0970
9	Q1.5	7,8742 ± 1,5582

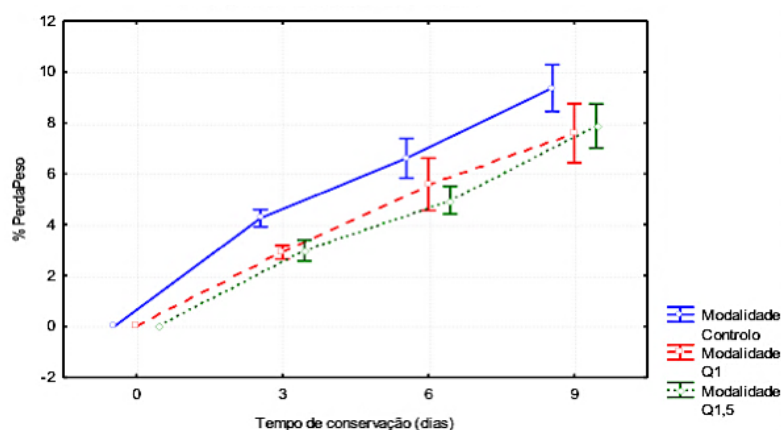


Figura 6.12 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente à percentagem de perda de peso dos morangos ao longo do tempo de ensaio, para as modalidade Controlo – morangos sem revestimento, Q1 – morangos revestidos com quitosano 1% + ácido acético 0.5% e Q1.5 – morangos revestidos com quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%.

Por observação da figura 6.12 pode verificar-se que nos morangos da modalidade controlo a percentagem de perda de peso foi sempre superior, ainda que pouco, ao verificado nas restantes modalidades. Ao terceiro dia, a percentagem de peso perdido pela modalidade controlo revelou-se o duas vezes superior à percentagem de peso perdido pelas modalidades Q1 e Q1.5, que verificaram a mesma perda de peso, cerca de 2%. Após 6 dias a modalidade que apresentou menor percentagem de peso perdido foi a modalidade Q1.5, seguindo-se da modalidade Q1 e por fim a modalidade controlo, com cerca de 6.5% de perda de peso, valor já superior a 5% muitas vezes indicado na prática como limite. Ao nono dia as modalidade Q1 e Q1.5 voltam a igualar, apresentando a mesma percentagem de peso perdido, cerca de 7.5%, havendo uma perda de peso de 9% por parte da modalidade controlo, sendo todas elas bastante inaceitáveis sob o ponto de vista comercial.

Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado pois, tal como mencionado por alguns autores, os revestimentos de quitosano constituem uma barreira retardando as perdas de água por parte dos frutos (Guerra et al., 2016; Silva, 2010; Shahbazi, 2018; Velickova et al., 2013).

SST

Os SST apresentam diferenças significativas apenas para a interação modalidade*tempo de conservação ($p=0.007$), como se pode verificar na tabela 6.1. Ao dia 0, os frutos da modalidade controlo apresentaram valores de SST ($^{\circ}$ Brix) inferiores aos apresentados pelos frutos das restantes modalidades em estudo. Ao dia 9 de conservação verificou-se a mesma tendência.

Na tabela 6.3 representada em seguida podem verificar-se os valores médios e desvio padrão correspondentes aos SST.

Tabela 6.3 - Valores médios e desvio padrão em relação aos sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controlo	6,2267 \pm 1,1215
0	Q1	7,6333 \pm 1,3756
0	Q1.5	7,8600 \pm 1,0979
3	controlo	7,8333 \pm 1,6906
3	Q1	6,7867 \pm 1,4769
3	Q1.5	6,8800 \pm 1,3219
6	controlo	7,6000 \pm 1,6089
6	Q1	7,6200 \pm 1,9843
6	Q1.5	6,9000 \pm 1,1180
9	controlo	7,0133 \pm 1,9949
9	Q1	7,2867 \pm 1,1544
9	Q1.5	7,4800 \pm 1,1912

A modalidade controlo obteve um valor de SST ($^{\circ}$ Brix) inicial perto dos 6 $^{\circ}$ Brix, aumentando ao dia 3, e diminuindo novamente até ao dia 9 do tempo de conservação até 7 $^{\circ}$ Brix. A modalidade Q1 apresentou um valor inicial de cerca de 7.6 $^{\circ}$ Brix, diminuindo ao dia 3, aumentando ao dia 6 e novamente diminuindo ao dia 9, com um valor de 7.3 $^{\circ}$ Brix. A modalidade Q1.5 apresentou um comportamento diferente, com valor inicial próximo da modalidade Q1, de 7.8 $^{\circ}$ Brix, ocorrendo diminuição ao dia 3 e

estabilização até ao dia 6, e aumento ao dia 9, para um valor de 7.5° Brix. Verifica-se então uma grande diferença na evolução dos SST.

É expectável que o valor de SST diminua ao longo do tempo, devido às perdas de água. Segundo Silva, 2010, o comportamento de um fruto em relação a este parâmetro apresenta um lento aumento durante o período de refrigeração, em resultado da solubilização dos polissacarídeos da parede celular das células vegetais e da perda de água dos frutos; segue-se depois uma queda dos valores de °Brix no período de senescência, em consequência da diminuição da quantidade de polissacarídeos solubilizados. Apenas a modalidade controlo verifica este comportamento. É expectável que o valor de SST diminua ao longo do tempo, devido às perdas de água. Segundo Silva (2010), o comportamento de um fruto em relação a este parâmetro apresenta um lento aumento durante o período de refrigeração, em resultado da solubilização dos polissacarídeos da parede celular das células vegetais e da perda de água dos frutos; segue-se depois uma queda dos valores de SST (°Brix) no período de senescência, em consequência da diminuição da quantidade de polissacarídeos solubilizados. Apenas a modalidade controlo verifica este comportamento. Também é de referir que a perda de água por transpiração pode ter reflexo nos valores de SST, já que se trata de uma medição feita por refratometria portanto baseada na concentração de sólidos solúveis, que forçosamente se altera com a perda de água.

Outro aspeto a ter em conta é a grande heterogeneidade dos frutos em estudo e a capacidade analítica também por motivos inerentes ao próprio delineamento dos ensaios, com 24h como tempo adequado para realizar todos os testes com material fresco, tem que ser considerado um número relativamente reduzido de frutos.

Acidez Titulável

No parâmetro da acidez titulável ocorreram variações significativas no tempo de conservação ($p=0,000$) e na interação ($p=0,000$), sendo o tempo de conservação o que melhor explica as diferenças existentes, com um valor de $F_{\text{Tempo de conservação}}=29.99$ em comparação com $F_{\text{Modalidade*Tempo de conservação}}=6.60$.

Na tabela 6.4 estão representados os valores médios e desvio padrão para a acidez titulável.

Tabela 6.4 - Valores médios e desvio padrão em relação à acidez titulável (% ácido málico) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controlo	0,7411± 0,1518
0	Q1	0,7753 ± 0,0022
0	Q1.5	0,7355 ± 0,0744
3	controlo	1,0050 ± 0,1439
3	Q1	0,9149 ± 0,1831
3	Q1.5	0,8971 ± 0,0562
6	controlo	0,8308 ± 0,0227
6	Q1	0,7873 ± 0,1105
6	Q1.5	0,8851 ± 0,0374
9	controlo	0,7649 ± 0,0585
9	Q1	0,8476 ± 0,0371
9	Q1.5	0,9276 ± 0,0461

A modalidade controlo apresenta um aumento ao dia 3 de conservação, seguida de diminuição até ao dia 9. As modalidades Q1 e Q1.5 apresentam a mesma tendência evolutiva, com aumento ao terceiro dia, diminuição ao sexto dia e ligeiro aumento ao nono dia. O aumento verificado no dia 3 após conservação é maior para a modalidade controlo do que para as modalidades Q1 e Q1.5, o que sugere que os revestimentos de quitosano apresentam algum efeito inibitório no aumento da acidez dos frutos.

Alguns autores verificaram que frutos revestidos com quitosano apresentam valores de acidez titulável superiores relativamente a frutos sem revestimento (Dang et al., 2010). Outros referem existirem pequenas diminuições dos valores de acidez titulável nas soluções revestidas com quitosano relativamente ao controlo (Petriccione, Pasquariello, et al., 2015; Vargas et al., 2006). Nestes últimos casos verificaram-se perdas de água nos frutos revestidos.

Cor

Relativamente à cor dos morangos, as coordenadas L* e b* apresentaram diferenças significativas no fator tempo de conservação e enquanto que a*, h0 e C* verificaram diferenças significativas no tempo de conservação e na interação modalidade*tempo de conservação, como se pode ver pelos valores apresentados na tabela 6.1.

Na tabela 6.5 observam-se os valores médios e desvio padrão relativos aos parâmetros h0 e C*.

Tabela 6.5 - Valores médios e desvio padrão em relação a h0 e C* para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão h0	Média e desvio padrão C*
0	controlo	0,1926 ± 0,0508	1,341 0± 0,2268
0	Q1	0,1620 ± 0,0450	1,8377 ± 0,2396
0	Q1.5	0,1666 ± 0,0345	1,8652 ± 0,2910
3	controlo	0,1359 ± 0,0226	1,883 5± 0,3552
3	Q1	0,1523 ± 0,0314	1,811 5± 0,2796
3	Q1.5	0,1565 ± 0,0285	1,7730 ± 0,2957
6	controlo	0,1297 ± 0,0250	2,1458 ± 0,3127
6	Q1	0,1312 ± 0,0325	2,1358 ± 0,3867
6	Q1.5	0,1354 ± 0,0265	1,9978 ± 0,3642
9	controlo	0,1150 ± 0,0231	1,9896 ± 0,3148
9	Q1	0,1254 ± 0,0130	2,1736 ± 0,3554
9	Q1.5	0,1417 ± 0,0407	2,2829±0,4353

Verificou-se uma diminuição ao longo do tempo de conservação em todos os parâmetros avaliados, relacionados com a cor, sendo a diminuição mais acentuada no caso da modalidade controlo em todos eles. As diferenças entre os morangos da modalidade controlo e das restantes modalidades me estudo eram, no entanto, pequenas.

Petriccione e seus colaboradores (2015), e Velickova e seus colaboradores, (2012), observaram a mesma tendência de diminuição dos parâmetros relativos à cor nos seus estudos de conservação de morangos com quitosano.

Textura

Em relação à textura dos frutos, foram analisados os parâmetros firmeza da epiderme, gradiente, firmeza da polpa, deformação e área entre as duas deformações pré-definidas, dos quais foram escolhidos três firmeza da epiderme, gradiente e firmeza da polpa pois são os que melhor permitem caracterizar a textura dos frutos.

Firmeza da epiderme

No teste de penetração, é bastante utilizado na avaliação da textura de frutos, o parâmetro de firmeza correspondente à força máxima no ponto de rutura da epiderme (Pintado, 2012; Ricardo-Rodrigues, 2016).

Na tabela 6.6 observam-se os valores médios e desvio padrão relativos à firmeza da epiderme.

Tabela 6.6 - Valores médios e desvio padrão em relação à firmeza da epiderme (N) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controlo	0,8664 ± 0,2425
0	Q1	0,9025 ± 0,2492
0	Q1.5	0,9756 ± 0,1767
3	controlo	0,9408 ± 0,2694
3	Q1	1,0591 ± 0,3113
3	Q1.5	0,9536 ± 0,3096
6	controlo	1,0087 ± 0,2747
6	Q1	0,8840 ± 0,2873
6	Q1.5	1,0955 ± 0,2379
9	controlo	0,7644 ± 0,2518
9	Q1	0,8278 ± 0,2132
9	Q1.5	0,9245 ± 0,2457

A firmeza da epiderme varia ao longo do tempo, sendo o fator tempo de conservação o único com significado neste contexto ($p=0.016$).

Em todas a modalidade se verificou a mesma tendência, aumento seguido de diminuição da firmeza, sendo que a modalidade controlo e a modalidade Q1.5 apresentaram o aumento ao dia 6 de conservação e a modalidade Q1 ao dia 3. Ao dia 9 os valores de firmeza verificados são inferiores aos valores de firmeza ao dia 0, isto indica que, tal como previsto, a força necessária para romper a superfície do morango é menor no último dia de avaliação em comparação com o primeiro dia. A modalidade controlo apresenta o menor valor, 0.78 N, seguida da modalidade Q1, 0.83 N, e o maior valor é verificado pela modalidade Q1.5, 0.92 N. A diminuição verificada está associada à senescência, quebra da parede celular e perda de água e está de acordo com a perda de peso, o aumento ao terceiro dia não corresponde ao comportamento esperado neste parâmetro.

Vargas e seus colaboradores (2006), verificaram também um decréscimo menos acentuado deste parâmetro para os morangos revestidos com película de quitosano em conservação a baixas temperaturas. Silva (2010) no seu estudo com morangos e revestimentos edíveis à base de quitosano verificou também um efeito benéfico no que respeita à firmeza dos frutos.

Gradiente

O parâmetro gradiente, relacionado com a elasticidade da epiderme do fruto apresentou variações significativas no tempo de conservação ($p=0.000$) e na interação ($p=0.001$), com valores de $F_{\text{Tempo de conservação}}=20.517$ e $F_{\text{Modalidade*Tempo de conservação}}=3.993$, sendo o tempo de conservação que justifica as diferenças.

Tabela 6.7 - Valores médios e desvio padrão em relação ao gradiente ($N.mm^{-1}$) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controle	$0,6369 \pm 0,1692$
0	Q1	$0,4917 \pm 0,1195$
0	Q1.5	$0,5268 \pm 0,1037$
3	controle	$0,4911 \pm 0,0984$
3	Q1	$0,5724 \pm 0,1153$
3	Q1.5	$0,5348 \pm 0,1123$
6	controle	$0,4605 \pm 0,0859$
6	Q1	$0,4255 \pm 0,1539$
6	Q1.5	$0,5419 \pm 0,0726$
9	controle	$0,3726 \pm 0,1045$
9	Q1	$0,3799 \pm 0,0819$
9	Q1.5	$0,3982 \pm 0,0833$

Como se pode verificar na tabela 6.7, ao longo do tempo, verifica-se uma diminuição do gradiente por parte de todas as modalidades analisadas, apresentando ligeiras diferenças entre elas no dia 9 relativamente ao valor do gradiente, como representado na figura 6.13. No caso da modalidade controle apresentou um valor de $0.65 N.mm^{-1}$ no dia 0 e $0.35 N.mm^{-1}$ no dia 9; a modalidade Q1 apresentou um valor de $0.5 N.mm^{-1}$ no dia 0 e $0.38 N.mm^{-1}$ no dia 9 e a modalidade Q1.5 um valor de $0.52 N.mm^{-1}$ no dia 0 e 0.4 no dia 9.

Tal como no parâmetro da firmeza da epiderme, também o gradiente está de acordo com as perdas de peso verificadas pelos frutos das diferentes modalidades analisadas, confirmando-se a influência dos revestimentos edíveis nos parâmetros em causa.

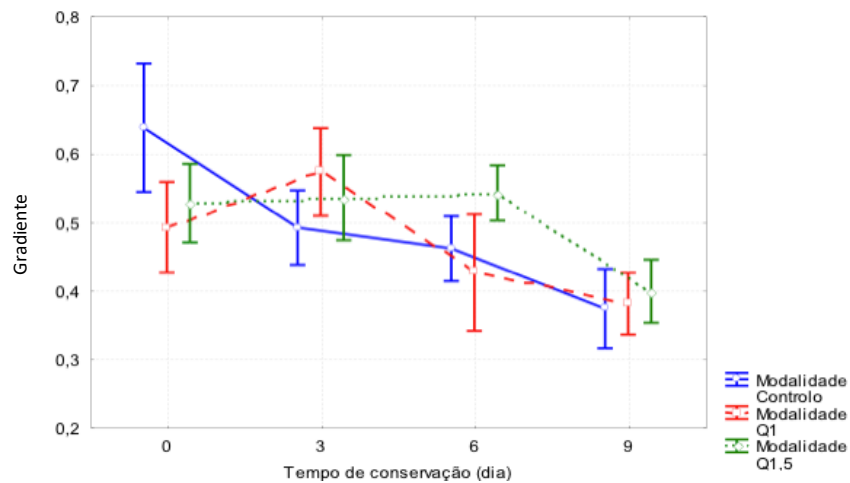


Figura 6.13 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente ao gradiente ao longo do tempo de ensaio, para as modalidade Controlo – morangos sem revestimento, Q1 – morangos revestidos com quitosano 1% + ácido acético 0.5% e Q1.5 – morangos revestidos com quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%.

Firmeza da Polpa

No caso da firmeza da polpa, obtida pela força média, nenhum dos fatores apresentou diferenças significativas. No entanto, pela análise do gráfico é possível verificar que embora não significativas em termos estatísticos ocorreram diferenças, como se verifica na figura 6.14 e na tabela 6.8.

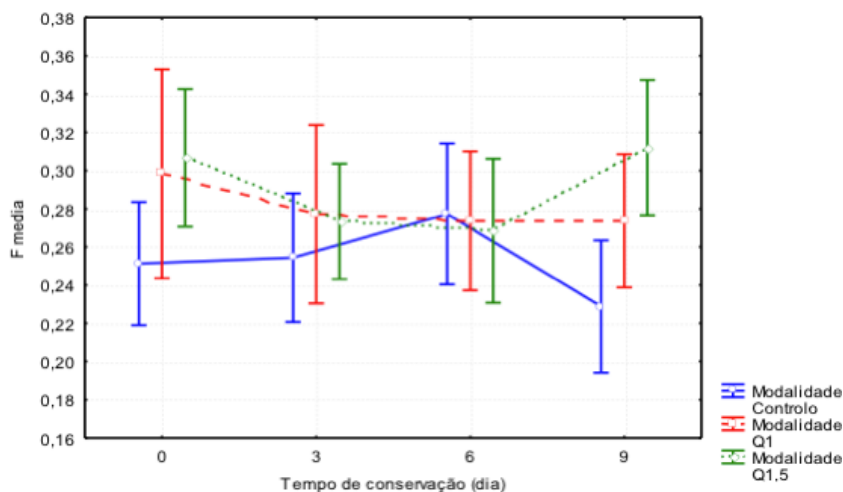


Figura 6.14 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente à firmeza da polpa dos morangos ao longo do tempo de ensaio, para as modalidade Controlo – morangos sem revestimento, Q1 – morangos revestidos com quitosano 1% + ácido acético 0.5% e Q1.5 – morangos revestidos com quitosano 1.5% + ácido acético 0.5%.

Tabela 6.8 - Valores médios e desvio padrão em relação à firmeza da polpa (N) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controle	0,2512 ± 0,0584
0	Q1	0,2982 ± 0,0988
0	Q1.5	0,3067 ± 0,0650
3	controle	0,2544 ± 0,0609
3	Q1	0,2771 ± 0,0844
3	Q1.5	0,2734 ± 0,0545
6	controle	0,2773 ± 0,0668
6	Q1	0,2737 ± 0,0659
6	Q1.5	0,2684 ± 0,0682
9	controle	0,2288 ± 0,0626
9	Q1	0,2737 ± 0,0631
9	Q1.5	0,3120 ± 0,0639

A modalidade controle revela-se bastante diferente das restantes, numa forma geral com valores de firmeza da parte interna do morango mais baixos, o que indica um efeito positivo dos revestimentos edíveis de quitosano na manutenção da textura interna dos frutos. Nas modalidades Q1 e Q1.5 verificou-se uma estabilização ou até ligeiro aumento da firmeza da polpa dos morangos, respetivamente. Este parâmetro verifica então o efeito benéfico dos revestimentos na manutenção da firmeza da polpa do fruto.

Compostos Fenólicos

No que respeita aos compostos fenólicos, este parâmetro apresentou diferenças ao longo do tempo de conservação ($p=0.039$).

Os valores médios e desvio padrão para este parâmetro estão representados na tabela 6.9.

Verificou-se uma grande heterogeneidade de valores entre os morangos das diferentes modalidades e todas as modalidades apresentaram o mesmo comportamento em relação ao conteúdo em compostos fenólicos, uma diminuição ao dia 3 seguida de aumento até ao dia 9 de conservação, sendo os valores ao dia 9

ligeiramente superiores aos obtidos no dia 0. O aumento foi mais significativo para a modalidade Q1, sugerindo um efeito dos revestimentos de quitosano a 1% neste parâmetro.

Tabela 6.9 - Valores médios e desvio padrão em relação aos compostos fenólicos para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controlo	204,2202 ± 8,3778
0	Q1	208,7254 ± 33,9035
0	Q1.5	223,1305 ± 47,6511
3	controlo	204,7754 ± 85,3910
3	Q1	157,6244 ± 19,0180
3	Q1.5	172,7355 ± 9,9048
6	controlo	245,8641 ± 51,5332
6	Q1	220,9455 ± 35,0735
6	Q1.5	179,3680 ± 42,2874
9	controlo	220,3643 ± 36,5333
9	Q1	210,9847 ± 31,3202
9	Q1.5	196,5138 ± 45,4696

Petriccione e seus colaboradores (2015), verificaram um aumento deste parâmetro para os morangos que estudou, observando maior aumento para os frutos revestidos (Petriccione, Pasquariello, et al., 2015). Kerch (2015), no seu artigo de revisão compilou informação permitindo-lhe afirmar que o conteúdo em fenóis nos morangos diminui ao longo de 7 dias de conservação (Kerch, 2015).

Com o ligeiro aumento dos valores deste parâmetro, não se verifica depreciação da qualidade intrínseca dos frutos, do ponto de vista do consumidor, garantindo a conservação durante 9 dias.

Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante revelou diferenças significativas nos fatores tempo de conservação ($p=0.0002$) e na interação modalidade*tempo de conservação ($p=0.030$), como verificado na tabela 6.1. O tempo de conservação é o que melhor explica as diferenças verificadas, sendo o que apresenta maior valor de F.

Tabela 6.10 - Valores médios e desvio padrão em relação à capacidade antioxidante para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de morangos.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	controle	0,6576 ± 0,1071
0	Q1	0,6534 ± 0,0796
0	Q1.5	0,5615 ± 0,1434
3	controle	0,5795 ± 0,0960
3	Q1	0,5729 ± 0,0895
3	Q1.5	0,5839 ± 0,0606
6	controle	0,7229 ± 0,0618
6	Q1	0,7729 ± 0,0467
6	Q1.5	0,6200 ± 0,0633
9	controle	0,6401 ± 0,0339
9	Q1	0,5330 ± 0,0957
9	Q1.5	0,6204 ± 0,0949

Como representado na tabela 6.10, ocorre um comportamento igual em todas as modalidades, com valores muito semelhantes entre si, com ligeiro aumento ao dia 6 seguido de ligeira diminuição até ao final do ensaio.

Wang e seus colaboradores (2013), verificaram também valores próximos entre as modalidades e um decréscimo na capacidade antioxidante até ao final do ensaio.

6.4.2 Ensaio de conservação de cerejas

O ensaio de conservação de cerejas decorreu em 14 dias, com avaliações no dia 0, sem qualquer tempo de conservação, e após 7 e 14 dias. No anexo 17 encontram-se os valores de F e p para os parâmetros analisados.

Relativamente à proliferação de fungos nas cerejas, verificou-se crescimento de fungos em duas cerejas na modalidade controlo (Figura 6.15) e numa única cereja na modalidade Q1_M_T (Figura 6.16) ao dia 14°. No 21º dia as cerejas já não estavam em condições adequadas para consumo, pelo que não foram realizadas mais análises (Figura 6.17).

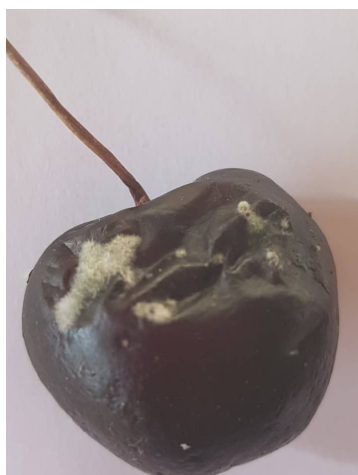


Figura 6.15 – Cereja da modalidade controlo, ao dia 14 de conservação



Figura 6.16 – Cereja da modalidade Q1_M_T, ao dia 14 de conservação



Figura 6.17 – Aspeto das cerejas ao dia 21

Tabela 6.11 - valores de F e p relativos a cada um dos parâmetros avaliados para verificação do efeito dos revestimentos edíveis na conservação de cerejas.

		F	p
% Perda de Peso	Modalidade	13,137	0,000
	Tempo de conservação (dia)	825,684	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	4,558	0,000
SST	Modalidade	1,519	0,205
	Tempo de conservação (dia)	35,192	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,144	0,345
Acidez Titulável	Modalidade	5,315	0,001
	Tempo de conservação (dia)	7,925	0,001
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,584	0,015
Firmeza da Epiderme	Modalidade	1,334	0,265
	Tempo de conservação (dia)	6,362	0,003
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	3,016	0,005
Gradiente	Modalidade	0,513	0,726
	Tempo de conservação (dia)	1512,102	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	0,851	0,561
Área	Modalidade	2,866	0,029
	Tempo de conservação (dia)	287,112	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	2,661	0,013
Deformação	Modalidade	5,373	0,001
	Tempo de conservação (dia)	23,017	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,728	0,106
Firmeza da Polpa	Modalidade	0,688	0,603
	Tempo de conservação (dia)	16,272	0,000
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	1,413	0,205
Compostos Fenólicos	Modalidade	2,200	0,077
	Tempo de conservação (dia)	2,502	0,089
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	3,048	0,005
Capacidade Antioxidante	Modalidade	1,147	0,341
	Tempo de conservação (dia)	3,828	0,026
	Modalidade*Tempo de conservação (dia)	0,532	0,829

Perda de peso

O parâmetro da perda de peso apresentou diferenças significativas para os fatores modalidade ($p=0.000$), tempo de conservação ($p=0.000$) e interação ($p=0.000$), como se pode verificar na tabela 6.11, sendo o que melhor explica as diferenças ocorridas é o fator tempo de conservação dado o seu valor de F ser muito superior aos restantes, $F_{\text{Tempo de conservação}}=825.684$, $F_{\text{Modalidade}}=13.137$ e $F_{\text{Modalidade*Tempo de conservação}}=4.558$.

Na tabela 6.12 estão representados os valores médios e desvio padrão para o parâmetro perda de peso.

Tabela 6.12 - Valores médios e desvio padrão em relação à percentagem de perda de peso (%) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de cerejas.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	Controlo	0,0000 ± 0,0000
0	Q1_T	0,0000 ± 0,0000
0	Q1.5_T	0,0000 ± 0,0000
0	Q1_M_T	0,0000 ± 0,0000
0	Q1_M_E_T	0,0000 ± 0,0000
7	Controlo	2,5627 ± 0,3763
7	Q1_T	3,0253 ± 0,3085
7	Q1.5_T	3,3761 ± 1,4173
7	Q1_M_T	3,6923 ± 0,3427
7	Q1_M_E_T	3,5833 ± 0,2349
14	Controlo	4,5213 ± 0,2970
14	Q1_T	5,2462 ± 0,2808
14	Q1.5_T	6,0357 ± 1,4173
14	Q1_M_T	6,0385 ± 0,3669
14	Q1_M_E_T	6,3641 ± 0,4676

A análise do gráfico da figura 6.18, permite observar que ao dia 14, a modalidade controlo foi a que apresentou menor de perda de peso (abaixo dos 5%), contrariamente ao esperado. Estes resultados podem decorrer da dificuldade de aplicação dos revestimentos nos frutos, como referido na secção 6.3.2.2 do presente capítulo, sendo que eventualmente não ocorreu formação de película edível em todos os frutos. Podem também estar relacionados com o efeito de difusão do revestimento, favorecido pela presença do surfactante.

Faz-se notar que tal comportamento inesperado também foi observado por Godinho (2014) que obteve resultados semelhante aos obtidos neste estudo, no sentido em que os frutos revestidos apresentaram maior percentagem de perda de peso em comparação com os frutos não revestidos.

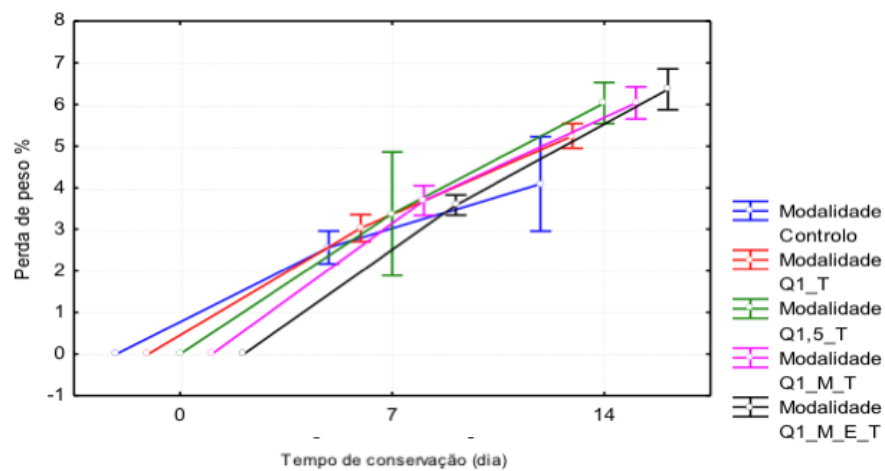


Figura 6.18 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente à perda de peso das cerejas ao longo do tempo de ensaio, para as modalidades Controlo – cerejas sem revestimento, Q1_T – cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]; Q1.5_T – cerejas revestidas com quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]; Q1_M_T – cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]; Q1_M_E_T – cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol + eugenol

SST

A análise de variância dos valores obtidos na medição dos sólidos solúveis totais (SST), o tempo de conservação ($p=0.000$) foi o fator que revelou diferenças significativas. Dada a perda de peso verificada, seria de esperar um aumento de SST ($^{\circ}$ Brix) na mesma proporção, já que a concentração de sólidos solúveis aumentaria. Tal comportamento não é absolutamente claro mas os valores de uma forma geral aumentam ao longo do tempo de conservação. Nos trabalhos realizados por Godinho, (2014); Petriccione et al., (2015) o valor de SST aumentou ao longo do tempo.

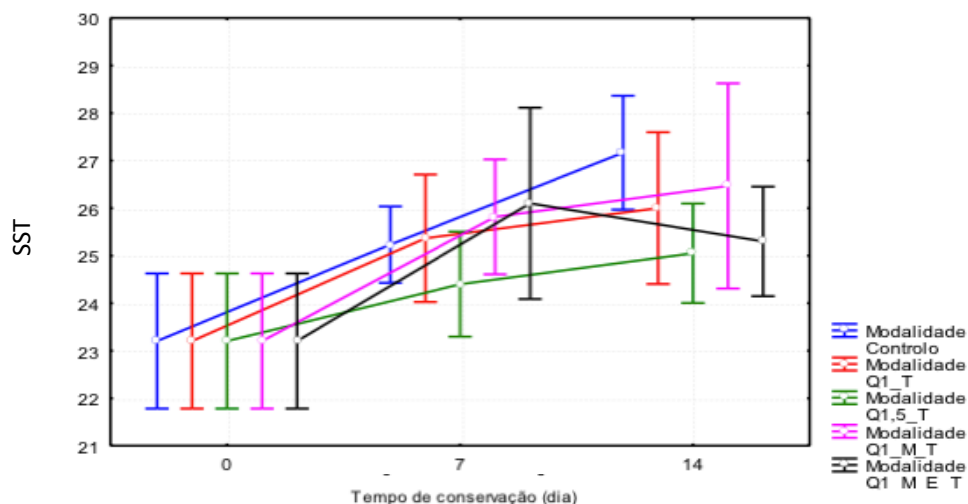


Figura 6.19 – Gráfico de interação Modalidade*Tempo de conservação relativamente ao valor de SST das cerejas ao longo do tempo de ensaio, para as modalidades Controle – cerejas sem revestimento, Q1_T – cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]; Q1.5_T – cerejas revestidas com quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]; Q1_M_T – cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol; Q1_M_E_T - cerejas revestidas com quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol + eugenol

Como se pode verificar no gráfico da figura 6.19 e na tabela 6.13, nas modalidades controle, Q1_T, Q1.5_T e Q1_M_T ocorreu aumento constante com o tempo, sendo a modalidade controle a que apresentou um maior valor de SST (°Brix) ao dia 14. Na modalidade Q1_M_E_T observa-se aumento provavelmente em resultado da solubilização dos polissacarídeos da parede celular das células vegetais e da perda de água dos frutos; segue-se depois uma queda dos valores de SST (°Brix) já no período de senescência, em consequência da diminuição da quantidade de polissacarídeos solubilizados (Silva, 2010). O comportamento diferente por parte das modalidades com eugenol na formulação do revestimento sugere a influência deste composto químico de OEs neste parâmetro.

Tabela 6.13 - Valores médios e desvio padrão em relação aos sólidos solúveis totais (°Brix) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de cerejas.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	Controlo	23,2033 ± 1,3547
0	Q1_T	23,2033 ± 1,3547
0	Q1.5_T	23,2033 ± 1,3547
0	Q1_M_T	23,2033 ± 1,3547
0	Q1_M_E_T	23,2033 ± 1,3547
7	Controlo	25,2333 ± 0,7659
7	Q1_T	25,3667 ± 1,2785
7	Q1.5_T	24,4000 ± 1,0526
7	Q1_M_T	25,8167 ± 1,1531
7	Q1_M_E_T	26,1000 ± 1,9183
14	Controlo	27,0600 ± 1,2422
14	Q1_T	26,0000 ± 1,5205
14	Q1.5_T	25,0500 ± 0,9975
14	Q1_M_T	26,4667 ± 2,0569
14	Q1_M_E_T	25,3000 ± 1,0973

Acidez Titulável

No caso da acidez titulável, todos os fatores se revelaram com diferenças significativas na análise de variância, com valores próximos de F ($F_{\text{Tempo de conservação}}=7.92$, $F_{\text{Modalidade}}=5.31$ e $F_{\text{Modalidade*Tempo de conservação}}=2.58$), como verificado na tabela 6.11.

Tabela 6.14 - Valores médios e desvio padrão em relação à acidez titulável (% ácido málico) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de cerejas.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	Controlo	0,7067 ± 0,0444
0	Q1_T	0,7067 ± 0,0444
0	Q1.5_T	0,7067 ± 0,0444
0	Q1_M_T	0,7067 ± 0,0444
0	Q1_M_E_T	0,7067 ± 0,0444
7	Controlo	0,6909 ± 0,0716
7	Q1_T	0,7993 ± 0,0570
7	Q1.5_T	0,6918 ± 0,0629
7	Q1_M_T	0,7873 ± 0,0723
7	Q1_M_E_T	0,8083 ± 0,0582
14	Controlo	0,7752 ± 0,0162
14	Q1_T	0,7984 ± 0,0789
14	Q1.5_T	0,6909 ± 0,0590
14	Q1_M_T	0,7935 ± 0,0460
14	Q1_M_E_T	0,7382 ± 0,0579

Os valores de acidez titulável observados nos morangos das modalidades analisadas foram bastante diferente entre elas, como verificado na tabela 6.14, apenas se verificando a mesma tendência em duas delas. A modalidade controlo apresenta manutenção do valor de acidez titulável seguido de aumento. As modalidades Q1_T e Q1_M_T apresentaram aumento seguido de manutenção dos valores do parâmetro em análise. A modalidade Q1.5_T manteve ao longo do tempo os mesmos valores de acidez titulável. A modalidade Q1_M_E_T verifica aumento seguido de diminuição. Esta diversidade não permite tirar conclusões sobre este parâmetro.

Tal como verificado no parâmetro SST, também neste parâmetro se verifica um comportamento diferenciado por parte da modalidade com revestimento com eugenol na sua composição, sugerindo a influência deste composto na acidez titulável.

Textura

Em relação à textura das cerejas foram considerados a firmeza da epiderme e a firmeza da polpa pois são os parâmetros que melhor descrevem as variações de textura neste fruto, sendo que a epiderme tem grande contribuição para a textura da drupa.

Firmeza da epiderme

Na análise de variância da firmeza da epiderme verificou-se existirem diferenças significativas para o fator tempo de conservação ($p=0.003$), como visível na tabela 6.11.

Os valores médios e desvio padrão para a firmeza da epiderme estão representados na tabela 6.15.

É expectável que a firmeza da epiderme se altere menos para os frutos revestidos, o que indica a manutenção das características da epiderme do fruto ao longo do tempo, como verificou Petriccione e seus colaboradores (2015). Os resultados obtidos neste estudo foram muito diferentes do que se esperava, sendo que todas as modalidades verificaram igual comportamento, apresentando um ligeiro aumento ao dia 7 seguido de manutenção dos valores de firmeza ao dia 14.

Pela avaliação visual dos frutos, tanto ao dia 7 como ao dia 14, não se verificaram diferenças consideráveis entre os frutos das diferentes modalidades em estudo.

Tabela 6.15 - Valores médios e desvio padrão em relação à firmeza da epiderme (N) para o tempo de conservação e modalidade no ensaio de conservação de cerejas.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	Controlo	1,5469 ± 0,0685
0	Q1_T	1,5469 ± 0,0685
0	Q1.5_T	1,5469 ± 0,0685
0	Q1_M_T	1,5469 ± 0,0685
0	Q1_M_E_T	1,5469 ± 0,0685
7	Controlo	1,5061 ± 0,1981
7	Q1_T	1,7313 ± 0,1240
7	Q1.5_T	1,6758 ± 0,1150
7	Q1_M_T	1,7166 ± 0,2571
7	Q1_M_E_T	1,6912 ± 0,2590
14	Controlo	1,9983 ± 0,3211
14	Q1_T	1,7577 ± 0,2525
14	Q1.5_T	1,4796 ± 0,2896
14	Q1_M_T	1,7887 ± 0,1818
14	Q1_M_E_T	1,5940 ± 0,2521

Firmeza da Polpa

Na análise de variância da firmeza da polpa também se verificou existirem diferenças significativas para o fator tempo de conservação ($p=0.000$). Tal como no parâmetro analisado anteriormente, firmeza da epiderme, não se verificaram diferenças entre as cerejas da modalidade controlo e das restantes modalidade. Observou-se um aumento ao dia 7, seguido de diminuição ao dia 14, como ocorrido na firmeza da pele, como se pode observar na tabela 6.16.

Tabela 6.16 - Valores médios e desvio padrão em relação à firmeza da polpa (N) para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de cerejas.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	Controlo	0,2721 ± 0,0528
0	Q1_T	0,2721 ± 0,0528
0	Q1.5_T	0,2721 ± 0,0528
0	Q1_M_T	0,2721 ± 0,0528
0	Q1_M_E_T	0,2721 ± 0,0528
7	Controlo	0,3094 ± 0,0745
7	Q1_T	0,3311 ± 0,0470
7	Q1.5_T	0,3639 ± 0,0441
7	Q1_M_T	0,3505 ± 0,0562
7	Q1_M_E_T	0,3820 ± 0,0598
14	Controlo	0,3558 ± 0,0548
14	Q1_T	0,2816 ± 0,0423
14	Q1.5_T	0,2951 ± 0,0382
14	Q1_M_T	0,3199 ± 0,0360
14	Q1_M_E_T	0,3134 ± 0,0441

Os resultados obtidos para os parâmetros relativos à textura, firmeza da epiderme e da polpa, permitem afirmar que as cerejas apresentaram capacidade de conservação em termos de textura, até 14 dias, mesmo sem qualquer revestimento aplicado, o que releva o papel natural da epiderme da cereja bastante eficaz no que concerne à perda de água.

Compostos Fenólicos

Nas cerejas, os compostos fenólicos estão concentrados na pele e contribuem para as qualidades sensoriais e organoléticas das cerejas.

Da análise de variância resultou que não se verificam diferenças significativas em nenhum dos fatores em estudo. No entanto, verificou-se existirem pequenas diferenças no comportamento das cerejas sujeitas às diferentes modalidades, como visível na tabela 6.17; as modalidades controlo, Q1T_ e Q1.5_T mantiveram os valores de

compostos fenólicos enquanto que as modalidades Q1_M_T e Q1_M_E_T apresentaram aumento seguido de diminuição dos compostos.

Tabela 6.17 - Valores médios e desvio padrão em relação aos compostos fenólicos para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de cerejas.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	Controlo	289,3870 ± 67,1858
0	Q1_T	289,3870 ± 67,1858
0	Q1.5_T	289,3870 ± 67,1858
0	Q1_M_T	289,3870 ± 67,1858
0	Q1_M_E_T	289,3870 ± 67,1858
7	Controlo	337,0282 ± 41,1941
7	Q1_T	296,2083 ± 44,1023
7	Q1.5_T	260,5132 ± 43,8655
7	Q1_M_T	394,9175 ± 79,0546
7	Q1_M_E_T	333,1486 ± 74,3108
14	Controlo	341,1579 ± 36,2553
14	Q1_T	326,9730 ± 56,5603
14	Q1.5_T	364,8578 ± 130,3970
14	Q1_M_T	336,9903 ± 40,0378
14	Q1_M_E_T	218,3954 ± 27,6166

Tal como para outros parâmetros neste ensaio de conservação, a evolução dos compostos fenólicos não decorreu como descrito na bibliografia. Petriccione e seus colaboradores (2015), verificaram um decréscimo menor neste parâmetro nas modalidades com revestimento em comparação com a modalidade controlo.

Capacidade Antioxidante

Neste parâmetro, os resultados da análise de variância permitiram verificar diferenças significativas no fator tempo de conservação ($p=0.026$), como representado na tabela 6.11.

Na modalidade controlo a capacidade antioxidante manteve-se constante ao longo de todo o ensaio de conservação. Também Petriccione e seus colaboradores (2015), verificou uma manutenção deste parâmetro ao longo do ensaio de conservação.

Enquanto que nas restantes modalidades, com quitosano, foi verificado um pequeno aumento do valor da capacidade antioxidante, mostrando-se muito semelhantes entre as cerejas das várias modalidades, como verificado na tabela 6.18.

Tabela 6.18 - Valores médios e desvio padrão em relação à capacidade antioxidante para o tempo de conservação e modalidade para o ensaio de conservação de cerejas.

Tempo de conservação	Modalidade	Média e desvio padrão
0	Controlo	0,7179 ± 0,0947
0	Q1_T	0,7179 ± 0,0947
0	Q1.5_T	0,7179 ± 0,0947
0	Q1_M_T	0,7179 ± 0,0947
0	Q1_M_E_T	0,7179 ± 0,0947
7	Controlo	0,7395 ± 0,1655
7	Q1_T	0,7750 ± 0,0627
7	Q1.5_T	0,7988 ± 0,0615
7	Q1_M_T	0,7755 ± 0,0627
7	Q1_M_E_T	0,7540 ± 0,0748
14	Controlo	0,7592 ± 0,0926
14	Q1_T	0,7424 ± 0,0486
14	Q1.5_T	0,8265 ± 0,0287
14	Q1_M_T	0,8164 ± 0,0194
14	Q1_M_E_T	0,7897 ± 0,0794

6.5 Conclusões

No ensaio de conservação de morangos foi evidente o efeito de manutenção da qualidade dos frutos por parte dos revestimentos edíveis à base de quitosano. Uma maior concentração de quitosano apresentou melhores resultados. Os parâmetros que melhor expressaram o efeito positivo dos revestimentos edíveis na conservação de morangos foram perda de peso, sólidos solúveis totais, textura e compostos fenólicos.

Na perda de peso verificou-se uma maior percentagem de perda para a modalidade controlo em comparação com as restantes modalidades. Para os sólidos solúveis totais observou-se uma diminuição maior nos morangos da modalidade controlo, que acompanha a tendência da perda de peso. Em relação aos parâmetros de textura, são várias as observações que atestam o efeito positivo destes revestimentos em diversos parâmetros de textura: a firmeza da epiderme verificou menor diminuição para os frutos revestidos, para o gradiente, indicador da elasticidade da epiderme, verificaram-se maiores valores para as modalidades de Q1 e Q1.5 e a firmeza da polpa, tal como aconteceu na firmeza da epiderme, diminuiu muito para a modalidade controlo em comparação com as restantes modalidades. Em relação aos compostos fenólicos, verificou-se efeito dos revestimentos de quitosano no aumento deste parâmetro, maior para a concentração de 1% de quitosano. Na capacidade antioxidante, não se verificaram diferenças nos morangos das várias modalidades, apresentando estas o mesmo comportamento ao longo do tempo de conservação sem qualquer influência dos revestimentos neste parâmetro.

No ensaio de conservação de cerejas o efeito dos revestimentos edíveis à base de quitosano não foi evidente. Neste caso de estudo verificou-se uma grande heterogeneidade de frutos e uma acentuada dificuldade na aplicação eficaz dos revestimentos, o que pode ter conduzido a resultados pouco esclarecedores sobre o efeito destas películas em cereja.

Na perda de peso verificou-se maior perda de peso por parte dos frutos revestidos, ao contrário do que se esperava. Em relação à textura, verificou-se a manutenção, com pequenas flutuações, dos valores ao longo do tempo de conservação em todas as cerejas das modalidades, controlo e revestidas. Em relação aos compostos fenólicos e capacidade antioxidante, tal como nos restantes parâmetros avaliados, não

foi verificado o efeito da presença dos revestimentos edíveis para efeitos de conservação das cerejas.

Posto isto, pode considerar-se que as cerejas apresentam viabilidade de conservação durante 14 dias, sem qualquer revestimento aplicado, não sendo possível tirar ilações sobre o efeito das películas edíveis, já que parece não ter ocorrido a sua formação de forma eficaz. Sugere-se a utilização de diferentes formulações com melhor capacidade de formação de película aderente ao fruto.

CAPÍTULO VII
CONCLUSÕES GERAIS

CAPÍTULO VII. Conclusões gerais

Os revestimentos edíveis atuam positivamente na conservação de alimentos, e são por isso muito utilizados nomeadamente em frutos, sendo necessário conhecer as suas características específicas para avaliar o seu comportamento. Neste trabalho apresentam-se metodologias adaptadas à avaliação das soluções e das películas. Um revestimento edível deve ter boa capacidade molhante, elevada absorção de luz, quando em solução deve ter comportamento de fluido newtoniano, deve ser mais denso que a água, com capacidade de formação de películas permeáveis e insolúveis de modo a manterem a resistência e a libertação de água. Sendo assim e com base nos resultados obtidos, conclui-se que, para utilização em conservação de frutos, as soluções indicadas são as que apresentam na sua formulação 1% de quitosano.

As avaliações sensoriais efetuadas permitem concluir que o ácido acético numa concentração de 1% nas soluções não é viável pois os provadores notam um odor desagradável; o eugenol e o mentol foram também identificados como dando um sabor demasiado intenso que não a fruta. As formulações de quitosano, nas concentrações de 1% e 1.5%, com ácido acético a 0.5%, com ou sem surfactante, foram aceites por todos os provadores, sendo viáveis para utilização como revestimentos na conservação de frutos.

Todas as formulações testadas no controlo dos fungos *Botrytis spp.*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus spp.* apresentaram efeito de retardamento na sua proliferação. As formulações de quitosano 1.5%, com ácido acético a 0.5% e Tween80[®] e as formulações de quitosano 1%, com ácido acético a 0.5%, mentol, eugenol e Tween80[®] apresentaram melhores resultados no controlo de *Botrytis spp.*, as formulações com concentração de 1% e eugenol apresentaram melhor efeito no fungo *Penicillium spp.* e as formulações com mentol apresentaram melhor controlo do crescimento do fungo *Rhizopus spp.* Seria de todo o interesse em estudos futuros avaliar-se o efeito dos revestimentos edíveis no controlo do crescimento de fungo *in vivo*, com recurso a técnicas de quantificação.

Dos casos de estudo levados a cabo, é possível concluir que nos morangos foi evidente o efeito positivo dos revestimentos edíveis à base de quitosano estudados na conservação dos frutos. Considerando os resultados obtidos na caracterização das formulações, na avaliação sensorial e no crescimento de fungos, conclui-se que as

formulações de quitosano, tanto a 1% como a 1.5% apresentam viabilidade de utilização para o aumento de tempo de vida útil de morangos.

No caso das cerejas tal não se verificou, possivelmente dada a dificuldade de aplicação dos revestimentos sobre a epiderme dos frutos que levou à não formação de película. É de notar que estas soluções apresentavam boa formação de película em placa de Petri. O caso de estudo de cerejas poderá ser repensado e realizado utilizando outras técnicas de aplicação do revestimento e de secagem, de modo a permitir uma verdadeira constituição de película na superfície dos frutos.

Em investigação futura deverão ser realizados estudos de conservação com todas as formulações avaliadas, especificamente para cada fruto no qual se pretenda utilizar as películas edíveis, de modo a verificar a efetividade do seu efeito em termos de aumento de tempo de vida útil de cada fruto, com qualidade e segurança.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO VIII. Referências Bibliográficas

- Abbott, J.A. 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 207-225.
- Agulheiro-Santos, A.C., & Barreto, P. (2011). Qualidade pós-colheita de diferentes produzidas com distintas adubações. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 18, 105–114.
- Al-Hassan, A.A., Norziah, M.H. (2012). Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 108–117.
- Aleksic, V., Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169(4), 240–254.
- American Society for Testing and Materials. (1995). ASTM E96: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 552(1), 203.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galled, G., Heras, Á. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203–230.
- Augusto, A.L. (2013). Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para produtos de IV gama. Dissertação para obtenção do grau de mestre em biotecnologia dos recursos marinhos. Leiria: Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar - Instituto Politécnico de Leiria.
- Azeredo, H. M. C. (2003). Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial da aplicação. *B. Ceppa*, 21(2), 267–278.
- Azeredo, H.M.C., Mattoso, L.H.C., Avena-Bustillos, R.J., Ceotto Filho, G., Munford, M.L., Wood, D., McHugh, T.H. (2010). Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science* 75(1), 9N1–N7.
- Baldwin, E.A. (2007). Surface Treatments and Edible Coatings in Food Preservation, in: Rahman, M.S. (Ed.), *Handbook of Food Preservation*. CRC Press, 486 – 488.
- Barros, A. S., Morais, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., Fontenelle, R. O. S., Menezes, J. E. S. A., Silva, F. W. F., Sousa, H. A. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76, 557–564.
- Bastos de Lima, M.G., 2012. Análise Química e Física de Alimentos - Sebenta (Análise Física).
- Boddy, Lynne. (2016). The Fungi - Third Edition. *Cardiff University, UK*. 245-292.
- Bourne, M.C. 1982. Food texture and viscosity: Concept and measurement. *Academic Press Inc., New York*, 325.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.

- Brehm, T. M. (2014). Reologia de Materiais Compósitos. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Materiais, Universidade Nova de Lisboa.
- Brychcy, E., Kulig, D., Zimoch-korzycka, A., Marycz, K., Jarmoluk, A. (2015). Physicochemical Properties of Edible Chitosan / Hydroxypropyl Methylcellulose / Lysozyme Films Incorporated with Acidic Electrolyzed Water.
- Bhunia, A. K. (2008). *Advances in Food and Nutrition Research*. 54, 1-44
- Bullerman, L.B. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. 5511-5522
- Casariogo, A., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1895–1902.
- Castro, A.G., Covas, J.A., Diogo, A.C. (2001). Reologia e suas aplicações industriais. *Coleção Ciência e Técnica - Instituto Piaget*, Lisboa.
- Chen, L., Linus, U. (2013). Approaches to analysis and modeling texture in fresh and processed foods – A review. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 497–507.
- Choi, W.S., Singh, S., Lee, Y.S. (2016). Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of “Formosa” plum (*Prunus salicina* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 70, 213–222.
- Contador, L., Shinya, P., Infante, R. (2015). Scientia Horticulturae Texture phenotyping in fresh fleshy fruit. *Scientia Horticulturae*, 193, 40–46.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582
- Cunha, Â. M. (2011). Desenvolvimento de filmes de quitosana com atividade antioxidante. *Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química, Universidade de Aveiro*, 102.
- Curutchet, A., Dellacassa, E., Ringuet, J.A., Chaves, A.R., Viña, S. Z. (2014). Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*mentha × piperita* and *m. Spicata*). *Food Chemistry*, 143, 231–238.
- Dang, Q.F., Yan, J.Q., Li, Y., Cheng, X.J., Liu, C.S., Chen, X.G. (2010). Chitosan acetate as an active coating material and its effects on the storing of *Prunus avium* L. *Journal of Food Science*, 75, 125– 131.
- Dhanapal, A., Sasikala, P., Rajamani, L., Kavitha, V., Yazhini, G., Banu, M.S. (2012). Edible films from Polysaccharides. *Food Sci. Qual. Manag.*, 3, 9–18.
- Debeaufort, F., Voilley, A. (2009). Lipid-Based Edible Films and Coatings. In K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*, New York: Springer: 135-168
- Desbrières, J., Babak, V. (2010). Interfacial properties of chitin and chitosan based systems. *Soft Matter*, 6(11), 2358.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the

-
- cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107–115.
- Dewick, P.M. (2002). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach* (Vol. 5).
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. Delen N. (2004). Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. 1-8
- El-hefian, E.A., Elgannoudi, E.S., Mainal, A., Yahaya, A.H. (2010) Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish J. Chem.* 34, 47–56.
- El-hefian, E.A., Yahaya, A.H., (2010). Rheological study of chitosan and its blends: An overview. *J. Sci. Technol.* 4, 210–22.
- El-ramady, H.R., Domokos-szabolcsy, É., Abdalla, N.A., Taha, H.S., Fári, M. (2015). *Postharvest Management of Fruits and Vegetables Storage*.
- Embuscado, M.E. & Huber K.C. (eds). 2009. Edible Films and Coatings for Food Applications. NY: Springer. 403.
- Errampalli, Deena. (2014). Postharvest Decay, Control Strategies. 189-231
- Espitia, P.J.P., Otoni, C.G., Soares, N.F.F. (2016). Antimicrobial Food Packaging. 425-431
- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A., Ibarz, A. (2011a). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303.
- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A., Ibarz, A. (2011b). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*.
- Finch, H.J.S., Samuel, A.M., Lane., G.P.F. (2014). Lockhart & Wiseman’s Crop Husbandry. Including Grassland (Ninth Edition). 396-430.
- Fischer, P., & Windhab, E. J. (2011). Rheology of food materials. *Current Opinion in and Interface Science*, 16(1), 36–40.
- Fonseca, J.P.C.G.Q. (2012). Revestimentos comestíveis à base de quitosano e cera de abelha: aplicação na conservação da uva de mesa. *Instituto Superior de Agronomia*.
- Fráguas, R.M., Simão, A.A., Faria, P.V., Queiroz, E. R., Oliveira Junior, Ê.N., Abreu, C.M.P. (2015). Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. *Polímeros*, 25(spe), 48–53.
- Freitas, D.G.C., Soares, A.G., Fonseca, M.J.O., Neves Jr, A.C.V., Coneglian, R.C.C. (2009). Metodologia de Detecção da Adstringência em Frutos de Caqui para Determinação do Tempo de Destanização. *Journal of Food Quality*, 34(3), 163–170.
- Godinho, A.C.M. (2014). Revestimentos comestíveis bioativos com extrato de carqueja : Aplicação na conservação pós-colheita da cereja. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de

Agronomia – Universidade de Lisboa.

- Guerra, I.C.D., Oliveira, P.D.L., Santos, M.M.F., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., Madruga, M.S., Souza, E.L. (2016). The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita L. or x villosa Huds)* essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 112–121.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C., Antunes, M.D.C. (2015). The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 51–60.
- Hajji, S., Younes, I., Affes, S., Boufi, S., Nasri, M. (2018). Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocolloids*, 83, 375–392.
- Hemaiswarya, S., Doble, M. (2010). Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 59(12), 1469–1476.
- Herrero, M., Castro-Puyana, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2013). Cromatografia líquida Aplicações. 295-317.
- Homez-Jara, A., Daza, L.D., Aguirre, D. M., Muñoz, J.A., Solanilla, J.F., Váquiro, H.A. (2018). Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1233–1240.
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M., Ghavi, F.F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1490–1495.
- Hussein, Z., Fawole, O.A., Opara, U.L. (2018). Preharvest factors influencing bruise damage of fresh fruits – a review. *Scientia Horticulturae*, 229, 45–58.
- Hwang, J.K., Shin, H.H. (2001). Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*, 12(3), 175–179.
- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu M., Baser, K.H.C., Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem* 50, 3943–6
- Jagus, R.J., Gerschenson L.N., Resa, C.P.Ollé (2016). Antimicrobial Food Packaging. 599-608
- Joyner (Melito), H.S. (2018). Explaining food texture through rheology. *Current Opinion in Food Science*, 21, 7–14.
- Kerch, G. (2015). Trends in Food Science & Technology Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 159–166.
- Kester, J.J., Fennema, O.R. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technol.* 40(12), 47–59.

-
- Kumari, M., Mahajan, H., Joshi, R., Gupta, M. (2017). Development and structural characterization of edible films for improving fruit quality. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 42–50.
- Leslie J. Struble, Xihuang Ji,. (2001) Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science Technology - Principles, Techniques, and Applications, 333-367
- Li, Z., Thomas, C. (2014). Quantitative evaluation of mechanical damage to fresh fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 35(2), 138–150.
- Liang, J., Yan, H., Zhang, J., Dai, W., Gao, X., Zhou, Y., Wan, X., Puligundla, P. (2017). Preparation and characterization of antioxidant edible chitosan films incorporated with epigallocatechin gallate nanocapsules. *Carbohydrate Polymers*, 171, 300–306.
- Lin, D., Zhao, Y. (2007). Innovations in the Development and Application of Edible Coating for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60–75.
- Lisboa, H.M., Borges, J. P., Fook, M.V.L., Ramos, A.M., Cidade, T. (n.d.). Morphological and Rheological Characterization of Chitosan Liquid- Crystalline Solutions and Gels.
- Loescher, W. (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). 1135-1140.
- Luvielmo, M. de M., Lamas, S. V. (2012). Revestimentos comestíveis em frutas. *Estudos Tecnológicos Em Engenharia*, 8, 8-15.
- Mihai, A.L., Popa, M.E. (2015). In vitro Activity of Natural Antimicrobial Compounds against Aspergillus Strains. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, 585–592.
- Modjinou, T., Versace, D., Abbad-andaloussi, S., Langlois, V., Renard, E. (2017). Antibacterial and antioxidant photoinitiated epoxy co-networks of resorcinol and eugenol derivatives. *Materials Today Communications*, 12, 19–28.
- Mohsenin, N.N. (1977). Characterization and failure in solid foods with particular reference to fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies*, 8, 169-193.
- Noronha, J.F. (2003). Análise Sensorial - Metodologia. *Apontamentos de Análise Sensorial*.
- Nunes, M.C. N. (2008). *Color Atlas of Postharvest Quality of Fruits and Vegetables*.
- Olivas, G.I.; Barbosa-Cánovas, G. (2009). *Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables*. *Minerva Ginecologica*, 46.
- Ortiz-Duarte, G., Pérez-Cabrera, L.E., Artés-Hernández, F., Martínez-Hernández, G. B. (2019). Ag-chitosan nanocomposites in edible coatings affect the quality of fresh-cut melon. *Postharvest Biology and Technology*, 147, 174–184.
- Ortiz, C.M., Vicente, A.R., Mauri, A.N. (2014). Combined use of physical treatments and edible coatings in fresh produce : moving beyond. *Stewart Postharvest Review*, 3(5), 1–6.
- Pagella, C., Spigno, G., De Faveri, D.M. (2002). Characterization of starch based edible

- coatings. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, 80(3), 193–198.
- Park, H.J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 10(8), 254–260.
- Park, S., Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1933–1939.
- Paul, W., Deepa, R., Anilkumar, T.V., Sharma, C.P. (2014). Chitin and chitosan derivatives for wound - healing applications. *Chitin and Chitosan Derivatives. CRC Press*, 243-260.
- Pearson, M. N., Bailey, A. M. (2013). Advances in Virus Research. 86, 249-272.
- Pereira, A.G.B., Muniz, E.C., Hsieh, Y. Lo. (2014). Chitosan-sheath and chitin-core nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 107(1), 158–166.
- Pereira, Á.I.S., Pereira, A.G.S., Sobrinho, O.P.L., Cantanhede, E.K.P., Siqueira, L. F. S. (2014). Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. *Educacion Quimica*, 25(4), 446–449.
- Perera, C.O., (2007). Minimal Processing of Fruits and Vegetables. *Handbook of Food Preservation*. CRC Press, 137–150.
- Petriccione, M., Mastrobuoni, F., Pasquariello, M., Zampella, L., Nobis, E., Capriolo, G., Scortichini, M. (2015). Effect of Chitosan Coating on the Postharvest Quality and Antioxidant Enzyme System Response of Strawberry Fruit during Cold Storage. *Foods*, 4(4), 501–523.
- Petriccione, M., Pasquariello, M. S., Mastrobuoni, F., Zampella, L., Di Patre, D., Scortichini, M. (2015). Influence of a chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. *Scientia Horticulturae*, 197, 287–296.
- Petrus, J., Korsten, L. (2019). Postharvest Biology and Technology Impact of ripeness on the infection and colonisation of *Penicillium digitatum* and *P. expansum* on plum. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 148–158.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641-678.
- Pinheiro, C., Cerqueira, M. , Souza, B. W. S., Martins, J. T., Teixeira, J., Vicente, A.A. (2010). Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. *Boletim de Biotecnologia*, 18-28
- Pintado, C.M., 2012. Utilización de atmósferas modificadas en el almacenamiento frigorífico de uva de mesa. Tesis Doctoral: Dpto. Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la tierra - Universidad de Extremadura.
- Pinto, L. (2005). Síntese e estudos de derivados de quitosano com potencial interesse biológico e ambiental. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

-
- Pinotti, A., García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. (2007). Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 66–72.
- Prettyman, T. H. (2007). Encyclopedia of the Solar System (Second Edition). 765-786.
- Rao, V.R. (2016). Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives. 137-150.
- Reis, R.C., Minim, V.P.R., Bolini, H. M. A., Dias, B. R. P., Minim, L. A., Ceresino, E. B. (2011). Sweetness equivalence of different sweeteners in strawberry-flavored yogurt. *Journal of Food Quality*, 34(3), 163–170.
- Requena, R., Vargas, M., Chiralt, A. (2019). Eugenol and carvacrol migration from PHBV films and antibacterial action in different food matrices. *Food Chemistry*, 277(October 2018), 38–45.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Sanches-silva, A. (2016). Óleos essenciais : atividade biológica in vitro e sua potencial aplicação a embalagens alimentares. *Boletim Epidemiológico*, (21), 29–33.
- Ribeiro, C., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., Miranda, C. (2007). Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 44(1), 63–70.
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., Talens, P., Martínez-Máñez, R., Barat, J. M. (2017). Eugenol and thymol immobilised on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: Application in strawberry jam. *Food Control*, 81, 181–188.
- Ricardo-Rodrigues, S., Laranjo, M., Martins, P., Rato, A.E., Shahidian, S., Vaz, M.,Vieira, F. (2017). Effect of chitosan and acetic acid on postharvest storage of table grapes, 40(1), 246–253.
- Ricardo-Rodrigues, S.I.R. (2016). Conservação de uva de mesa ‘Crimson’ com recurso a revestimentos edíveis. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Agrónómica, Universidade de Évora.
- Romanazzi, G., Karabulut, O.A., Smilanick, J.L. (2007). Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 45 (1), 134-140.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., Landi, L. (2013). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 24–27.
- Romanazzi, G., Gabler, F.M., Margosan, D., Mackey, B. E., Smilanick, J. L. (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology*, 99(9), 1028–1036.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Di Venere, D., Salerno, M. (2002). Effects of Pre- and Postharvest Chitosan Treatments to Control Storage Grey Mold of Table Grapes, 67(5), 1–6.
- S.B. Silva, M.G. Silva, J. Silva, D.S. (2017). Desenvolvimento de filmes de quitosana para

- aplicação como embalagem ativa em queijo tipo colonial fatiado. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
- Salem, E.A., Youssef, K., Marianna, S. (2016). Scientia Horticulturae Evaluation of alternative means to control postharvest Rhizopus rot of peaches. *Scientia Horticulturae*, 198, 86–90.
- Sangsuwan, J., Pongsapakworawat, T., Bangmo, P., Sutthasupa, S. (2016). Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oils in inhibiting Botrytis cinerea and their application in strawberry packaging system. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 14–20.
- Santos, C.N.S. (2006). Propriedades de Filmes de Quitosano – Influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero, Dissertação para obtenção do grau de mestre em Química e Qualidade dos Alimentos, Universidade de Aveiro.
- Santos, J.E., Soares, J.D.P., Dockal, E.R., Campana Filho, S.P., Cavalheiro, É.T.G. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*, 13(4), 242–249.
- Serrano, M; Martínez-Romero, D.; Zapata, P.J.; Guillén, F.; Valverde, J.M.; Díaz-Mula, H.M.; Castillo, S. e Valero, D. (2015). Advances in Edible Coatings. In: Wills, R.B.H. e Golding, J.B. (Eds.) – *Advances in Postharvest Fruit and Vegetable Technology*. CRC Press.
- Serway, R., Jewett, J. (2005). Principles of Physics: A Calculus-Based Text. Cengage Learning. 467
- Shahbazi, Y. (2018). Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing Mentha spicata essential oil in fresh strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 264–272.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*. 10(2), 37–51.
- Shamili, M. (2019). The estimation of mango fruit total soluble solids using image processing technique. *Scientia Horticulturae*. 249, 383–389.
- Shiekh, R.A., Malik, M.A., Al-Thabaiti, S.A., Shiekh, M.A. (2013). Chitosan as a Novel Edible Coating for Fresh Fruits. *Food Science and Technology Research*, 19(2), 139–155.
- Silva, É. R. (2010). Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e Aloe vera em morangos. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia, Universidade de Aveiro.
- Singh, T.P., Chatli, M.K., Sahoo J. (2014) Development of chitosan based edible films: process optimization using response surface methodology. *J Food Sci Technol*. 2530–2543.
- Skoog, Douglas A., Holler, F. James, Crouch, Stanley R. (2007). Principles of Instrumental Analysis. 6th edition, 335-398.

-
- Smith, R.B., Skog L. J., Dale, A. (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd Edition). 5624-5628.
- Soazo, M., Pérez, L.M., Piccirilli, G.N., Delorenzi, N.J., Verdini, R.A. (2016). Antimicrobial and physicochemical characterization of whey protein concentrate edible films incorporated with liquid smoke. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 285–291.
- Souza, L. M., Barreto, L. P., Neto, B. (2010). Comparação de metodologias de análise de pH e acidez titulável em polpa de melão, *X Jornada De Ensino, Pesquisa E Extensão – Jepex 2010 – Ufrpe: Recife*, 3–5.
- Šuput, D., Lazić, V., Pezo, L., Markov, S., Vaštag, Ž., Popović, L., Radulović, A., Ostojić, S., Zlatanović, S., Popović, S. (2016). Characterization of starch edible films with different essential oils addition. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(4), 277–285.
- Suseno, N., Savitri, E., Sapei, L., Padmawijaya, K. S. (2014). Improving shelf-life of Cavendish Banana Using Chitosan Edible Coating. *Procedia Chemistry*, 9, 113–120.
- Tadapaneni, R.K., Edirisinghe, I. Burton-Freeman, B. (2015). Processing and Impact on Active Components in Food. 619-627.
- Teixeira, L.V. (2009). Análise Sensorial Na Indústria De Alimentos. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes,"* 12–21.
- Toshev, B. V, Platikanov, D. (2006). Wetting : Gibbs ' superficial tension revisited, *291*, 177–180.
- Valenzuela, C., Tapia, C., López, L., Bungler, A., Escalona, V., Abugoch, L. (2015). Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 406–411.
- Valero, D., Serrano, M. (2010). Changes in fruit quality attributes during handling, processing, and storage. *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*. CRC Press, 49 – 55.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D.J., González-Martínez C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48, 496-511.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536–547.
- Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V.D., Moldão-Martins, M. (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 80–92.
- Vieira, A.I.A. (2014). Eficácia de películas edíveis suplementadas com componentes de óleos essenciais no controlo de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Typhimurium. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Biológica, Universidade Do Algarve.
- Vu, K. D., Hollingsworth, R. G., Leroux, E., Salmieri, S., Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198–203.

- Wang, Q., Lei, J., Ma, J., Yuan, G., Sun, H. (2018). Effect of chitosan-carvacrol coating on the quality of Pacific white shrimp during iced storage as affected by caprylic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 123–129.
- Wang, S.Y., Gao, H. (2013). Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x arnansa Duch.*). *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 71–79.
- Webb, G.P. (2017). Dietary Supplements—A Classification and Overview of Uses and Efficacy in Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.
- Wieczyńska, J., Cavoski, I. (2018). Antimicrobial, antioxidant and sensory features of eugenol, carvacrol and trans-anethole in active packaging for organic ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Chemistry*, 259, 251–260.
- Woranuch, S., Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 578–585.
- Wu, D., Sun, D. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control - A review. *Trends in Food Science & Technology* 29, 5-20.
- Xiao, Z., Wang, Y., Wang, J., Li, P., Ma, F. (2019). Structure-antioxidant capacity relationship of dihydrochalcone compounds in *Malus*. *Food Chemistry*, 275(3), 354–360.
- Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Chen, C., Ma, L., Li, S., Che, Z., Lin, H. (2016). Chitosan-based coating with antimicrobial agents: Preparation, property, mechanism, and application effectiveness on fruits and vegetables. *International Journal of Polymer Science*, 2016.
- Xing, Y., Xu, Q., Yang, S. X., Chen, C., Tang, Y., Sun, S., Zhang, L., Che, Z., Li, X. (2016). Preservation mechanism of chitosan-based coating with cinnamon oil for fruits storage based on sensor data. *Sensors (Switzerland)*, 16(7).
- Youwei, Y., Yinzhe, R. (2013). Effect of Chitosan Coating on Preserving Character of Post-Harvest Fruit and Vegetable: A Review. *Journal of Food Processing & Technology*, 04(08), 8–10.
- Zhang, L., Chen, F., Lai, S., Wang, H., Yang, H. (2018). Impact of soybean protein isolate-chitosan edible coating on the softening of apricot fruit during storage. *Lwt*, 96, 604–611.

CAPÍTULO IX

ANEXOS

Anexo 1.

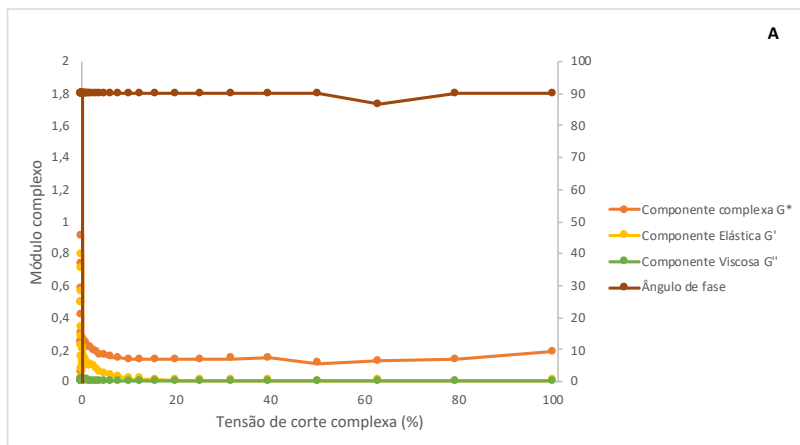


Figura A1.1 - Gráfico de oscilação a frequência constante, a 25°C, para a formulação de quitosano a 1% com ácido acético 0.5%

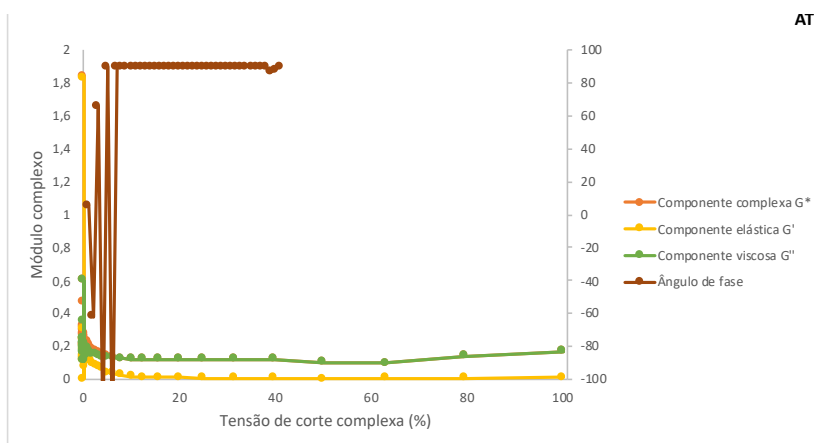


Figura A1.2 - Gráfico de oscilação a frequência constante, a 25°C, para a formulação quitosano a 1% com ácido acético 0.5% e Tween80[®]

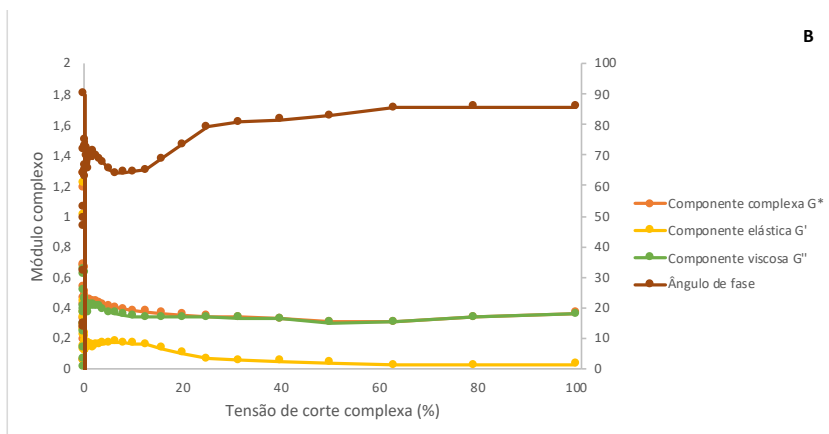


Figura A1.3 - Gráfico de oscilação a frequência constante, a 25°C, para a formulação: quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5%

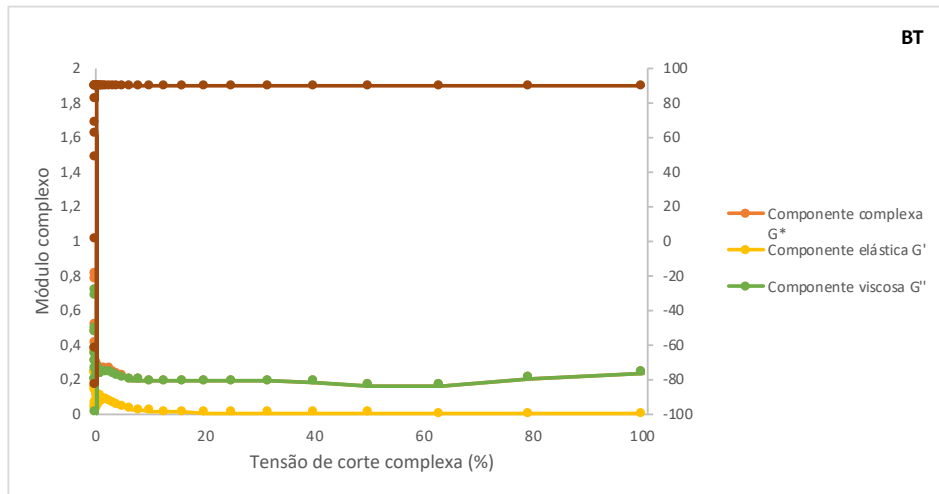


Figura A1.4 - Gráfico de oscilação a frequência constante, a 25°C, para a formulação de quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5% e Tween80[®].

Anexo 2.

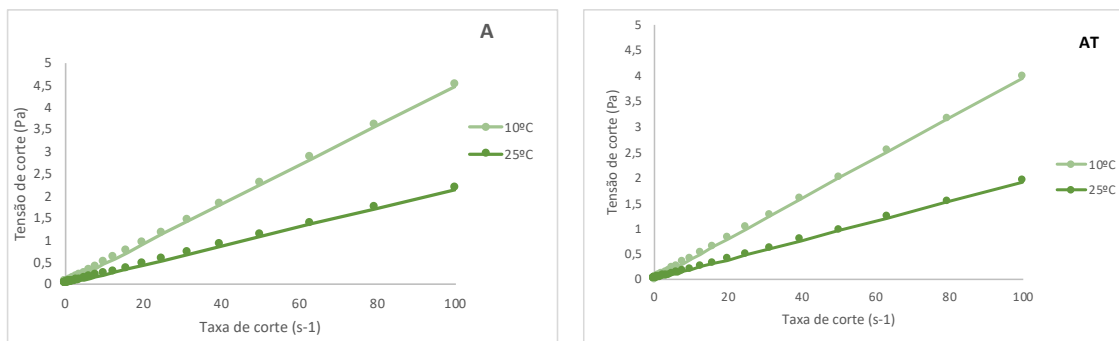


Figura A2.1 - Gráficos representativos da tensão de corte (Pa) em função da taxa de corte (s⁻¹), a duas temperaturas diferentes, 10°C e 25°C, para as formulações: A: quitosano a 1% com ácido acético 0.5%; AT: quitosano a 1% com ácido acético 0.5% e Tween80[®]

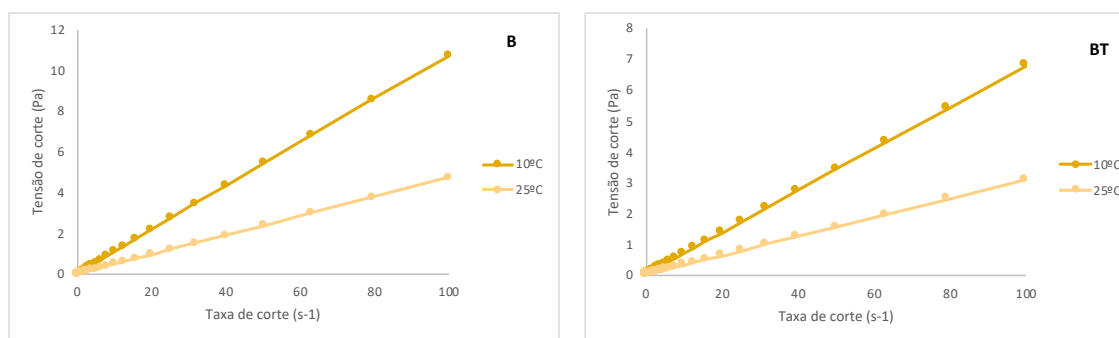


Figura A2.2 - Gráficos representativos da tensão de corte (Pa) em função da taxa de corte (s⁻¹), a duas temperaturas diferentes, 10°C e 25°C, para as formulações: B: quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5%; BT: quitosano a 1.5% com ácido acético 0.5% e Tween80[®]

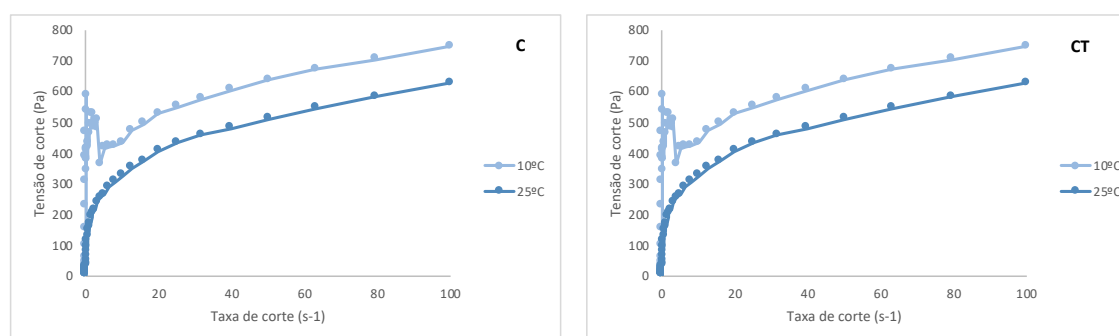


Figura A2.3 - Gráficos representativos da tensão de corte (Pa) em função da taxa de corte (s⁻¹), a duas temperaturas diferentes, 10°C e 25°C, para as formulações: C: quitosano a 2% com ácido acético 0.5%; CT: quitosano a 2% com ácido acético 0.5% e Tween80[®]

Anexo 3.

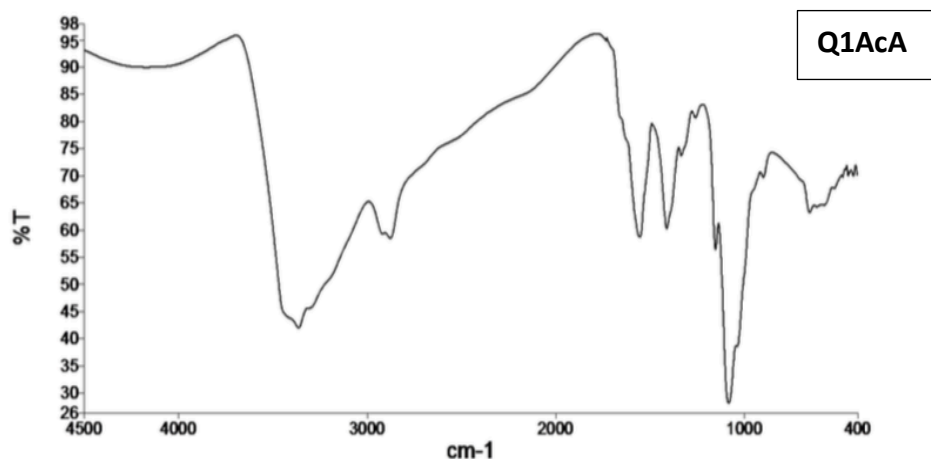


Figura A3.1 - Espectros de Infravermelho da película quitosano 1% + ácido acético 0.5% (Q1AcA)

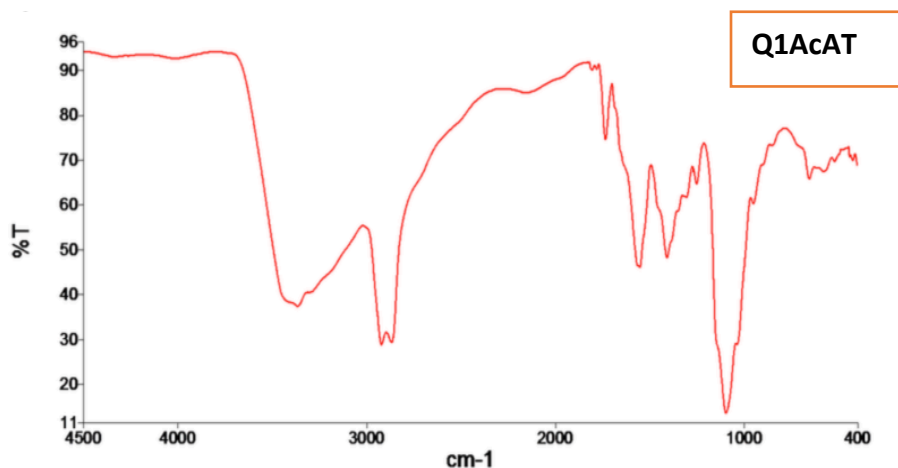


Figura A3.2 - Espectros de Infravermelho da película quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] (Q1AcAT)

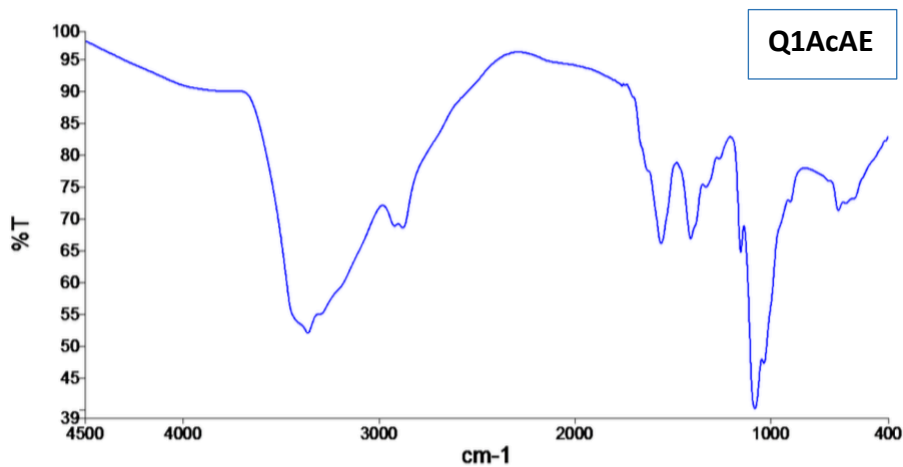


Figura A3.3 - Espectros de Infravermelho da película quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q1AcAE)

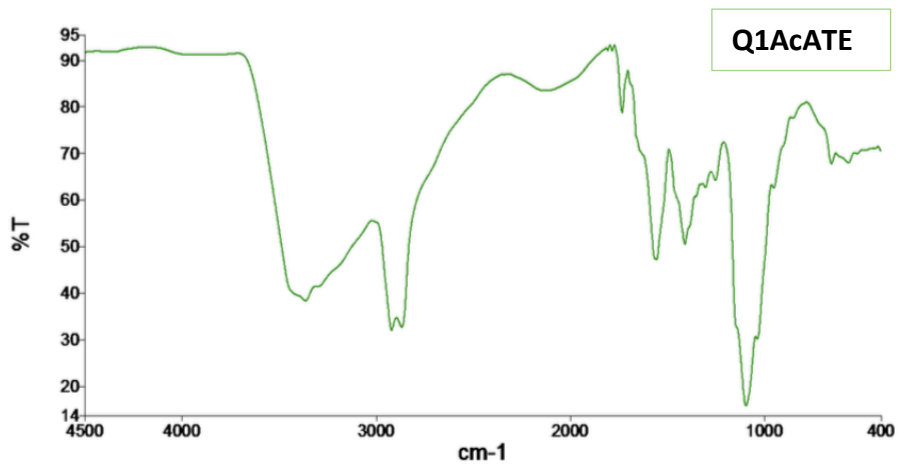


Figura A3.4 - Espetros de Infravermelho da película quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + eugenol (Q1AcATE)

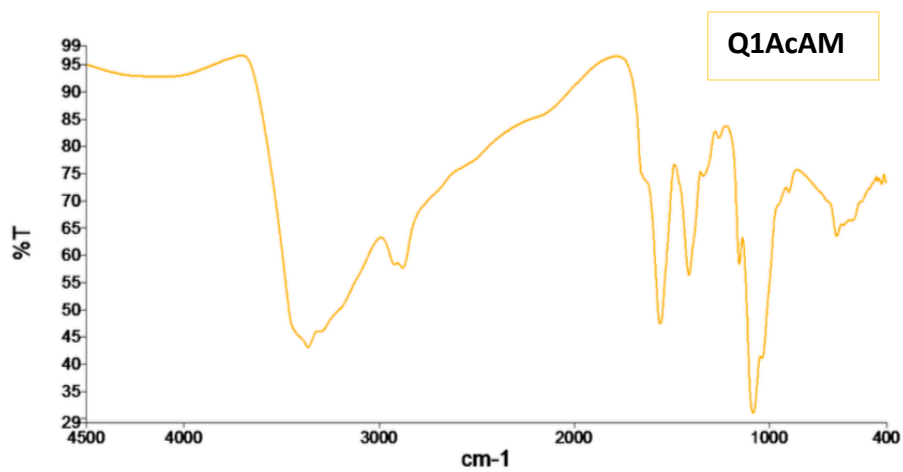


Figura A3.5 - Espetros de Infravermelho da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + mentol (Q1AcAM)

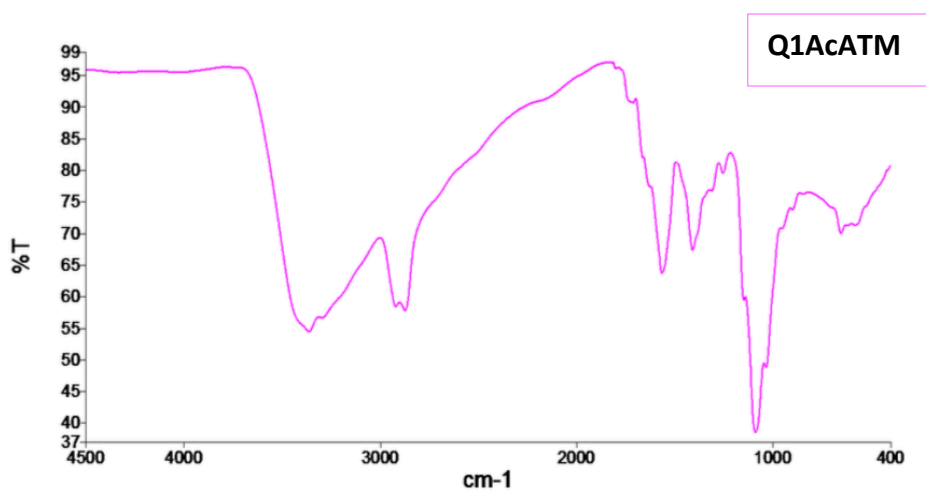


Figura A3.6 - Espetros de Infravermelho da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®]+ eugenol + mentol (Q1AcATEM)

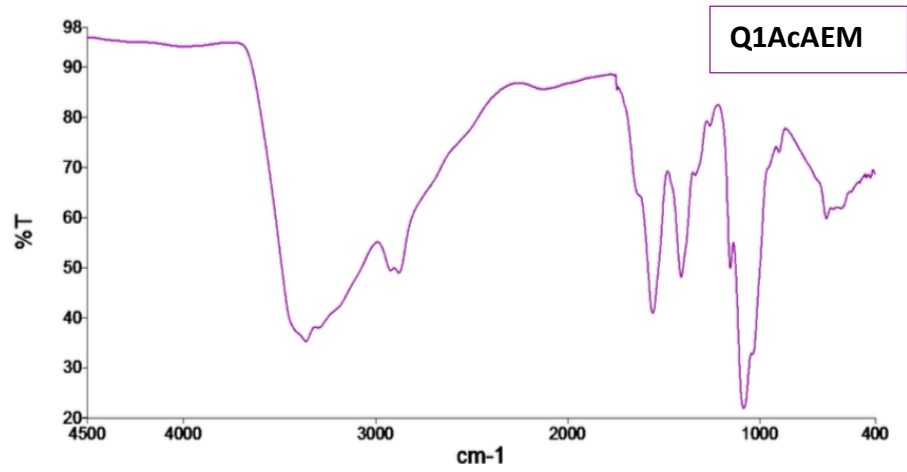


Figura A3.7 - Espectros de Infravermelho da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol (Q1AcAEM)

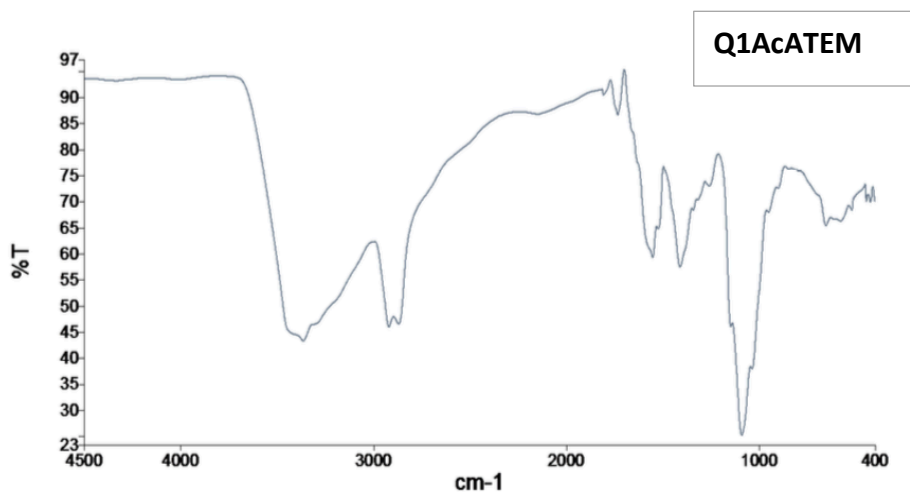


Figura A3.8 - Espectros de Infravermelho da película de quitosano 1% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] eugenol + mentol (Q1AcAEMT)

Anexo 4.

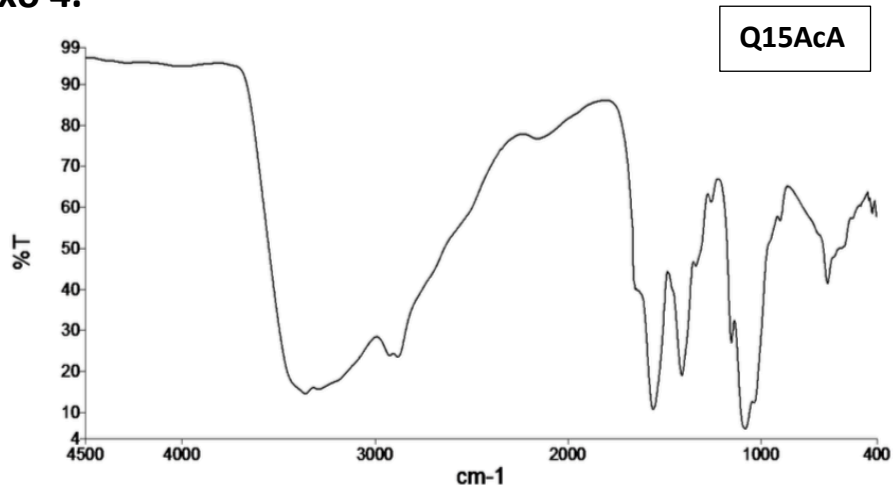


Figura A4.1 – Espectro de Infravermelho da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% (Q15AcA)

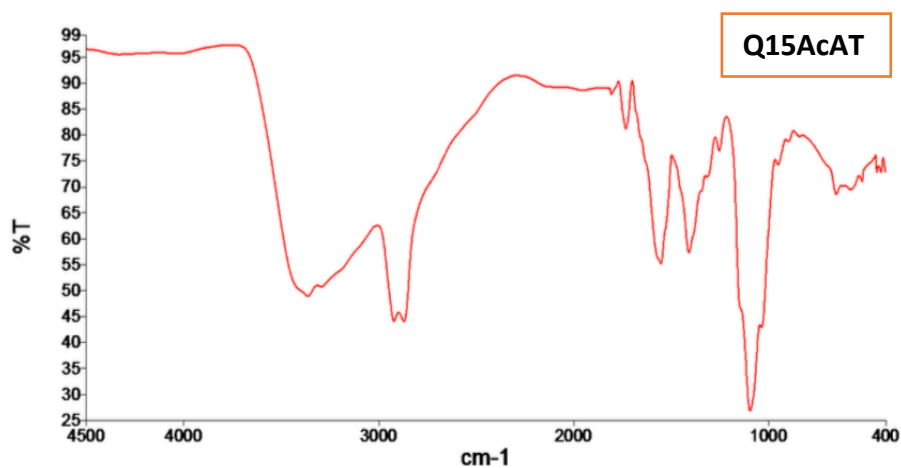


Figura A4.2 – Espectro de Infravermelho da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80® (Q15AcAT)

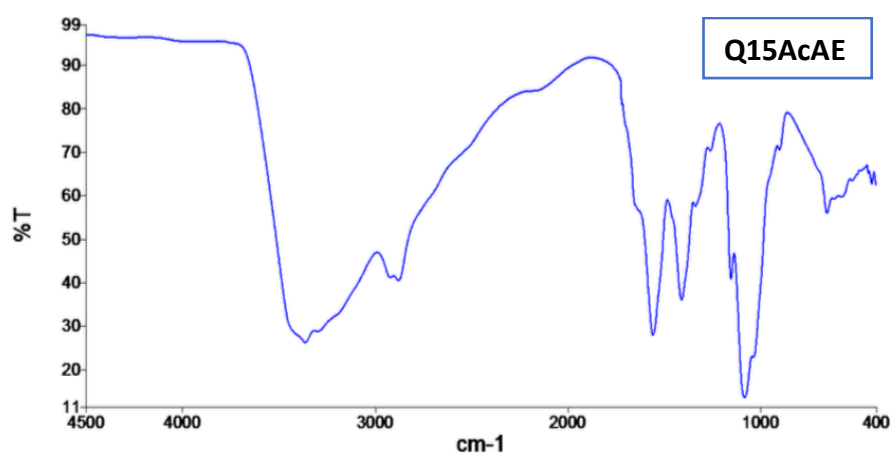


Figura A4.3 – Espectro de Infravermelho da película quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol (Q15AcAE)

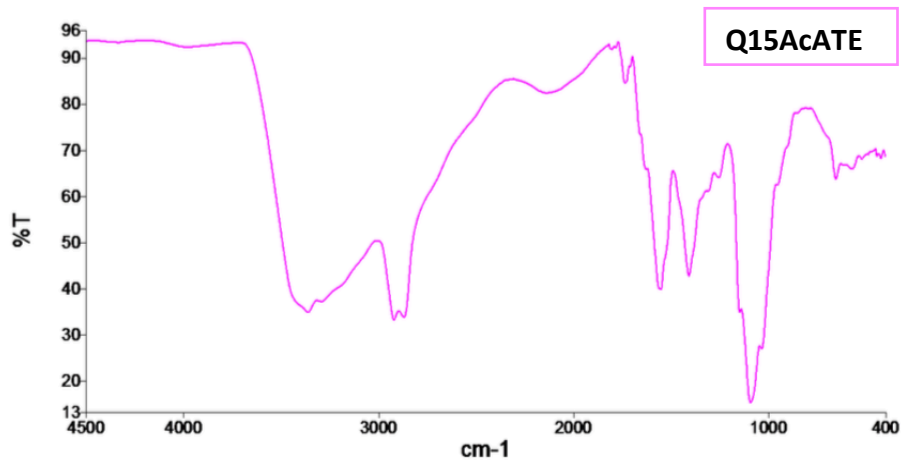


Figura A4.4 – Espectro de Infravermelho da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + eugenol (Q15AcATE)

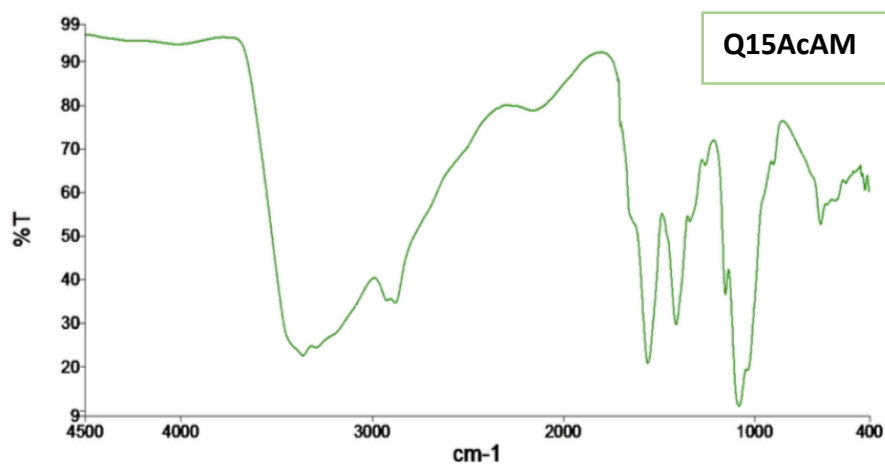


Figura A4.5 – Espectro de Infravermelho da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + mentol (Q15AcAM)

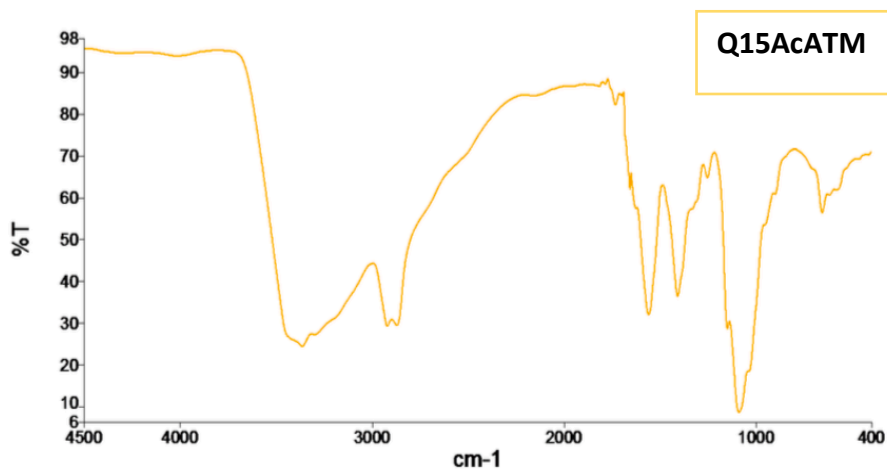


Figura A4.6 – Espectro de Infravermelho da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + mentol (Q15AcATM)

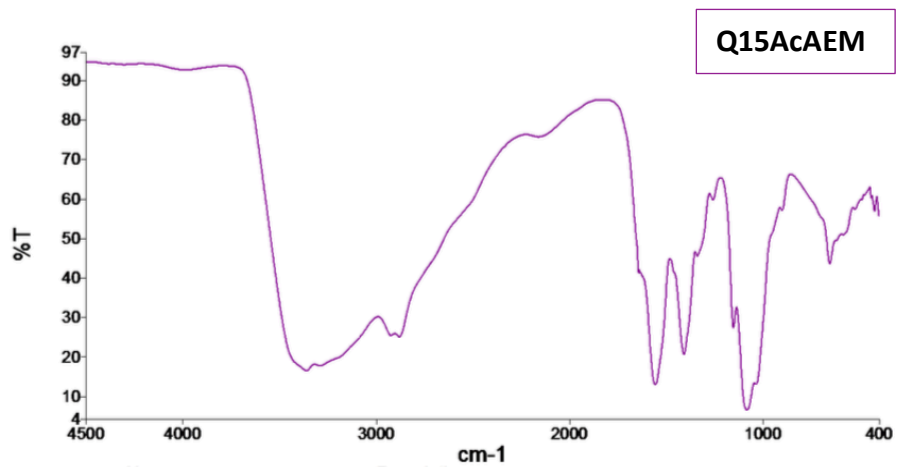


Figura A4.7 – Espectro de Infravermelho da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + eugenol + mentol (Q15AcAEM)

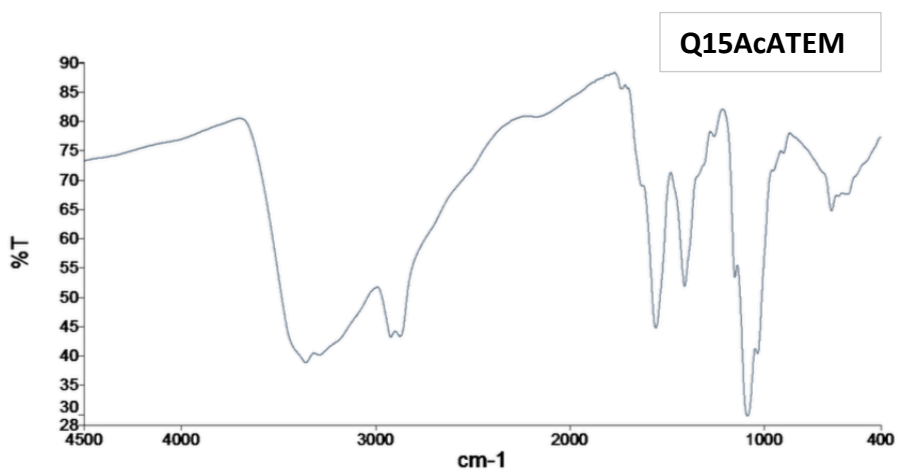




Figura A4.8 – Espectro de Infravermelho da película de quitosano 1.5% + ácido acético 0.5% + Tween80[®] + eugenol + mentol (Q15AcATEM)

Anexo 5. Ficha de prova utilizada na análise sensorial de morangos

	Universidade de Évora Laboratório de Tecnologia e Pós-		Colheita
-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	-----------------



Nome: _____

Data: ____/____/____

Em cada conjunto (I, II) existem duas amostras que são iguais e uma que é diferente. **Prove** as amostras da esquerda para a direita e coloque um círculo à volta do número da amostra diferente em cada conjunto. **Identifique** o que torna a amostra diferente das restantes.

Conjunto	Códigos			O que é diferente? (Cor, firmeza, sabor...)
I	A	B	C	

Anexo 6. Ficha de prova utilizada na análise sensorial de morangos

	Universidade de Évora Laboratório de Tecnologia e Pós-		Colheita
-------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------	-----------------

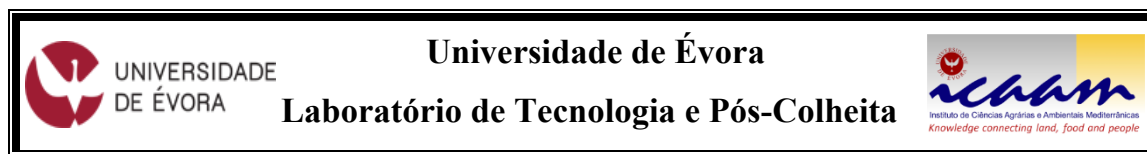
Nome: _____

Data: ____/____/____

Em cada conjunto (I, II) existem duas amostras que são iguais e uma que é diferente. **Prove** as amostras da esquerda para a direita e coloque um círculo à volta do código da amostra diferente em cada conjunto. **Identifique** o que torna a amostra diferente das restantes.

Conjunto	Códigos			O que é diferente? (Cor, firmeza, sabor...)
I	A	B	C	
II	A	B	C	

Anexo 7. Ficha de prova utilizada na análise sensorial de morangos



Análise Sensorial de Morango - Ficha de Prova

(Realizado no âmbito do trabalho de mestrado intitulado “Estudo de revestimentos edíveis. Caracterização de algumas reformulações e seus efeitos na conservação de frutos”)

Nome: _____ Data: ___/___/___

Amostra: _____

Avalie as amostras apresentadas de acordo com os seguintes parâmetros:

- **Características visuais**

- Tonalidade



- **Cheiro**



- **Sabor**

- Ácido



- Doce



- A fruta



- **Textura:**

- Firmeza



- Avaliação Global



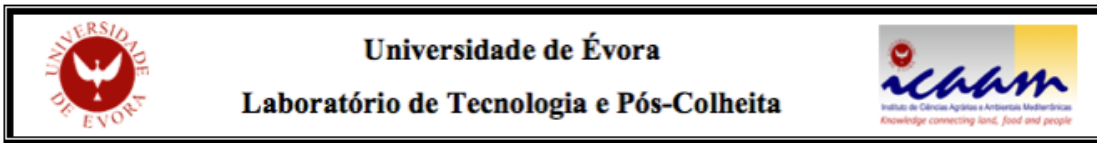
(Refugo)

(Excelente)

Observações: _____

Obrigado pela Colaboração!

Anexo 8. Ficha de prova utilizada na análise sensorial de cerejas.



Nome: _____ Data: ____/____/____

Coloque um **X** na tabela de modo a expressar a sua opinião acerca das diferentes amostras de cerejas.

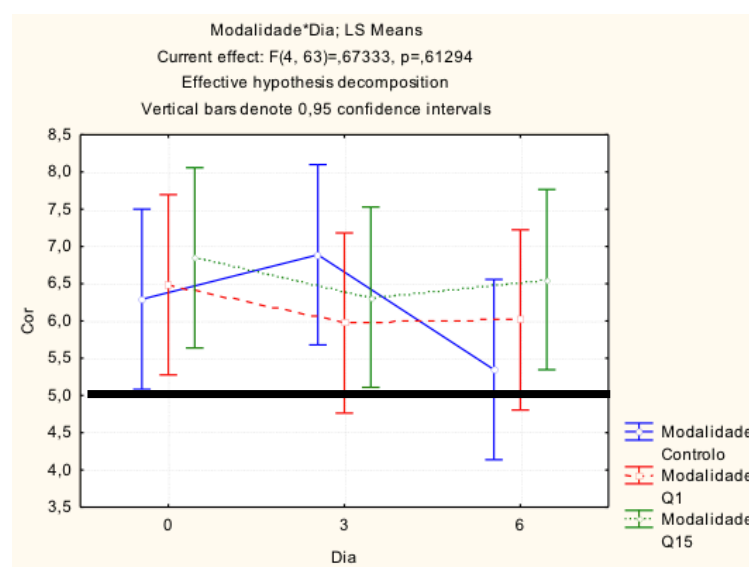
	GOSTO	NÃO GOSTO
Amostra 1		
Amostra 2		
Amostra 3		
Amostra 4		
Amostra 5		

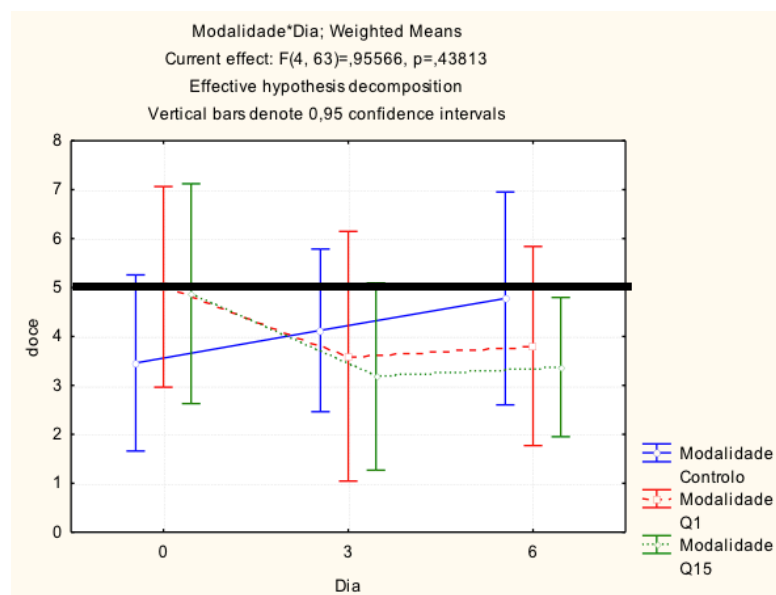
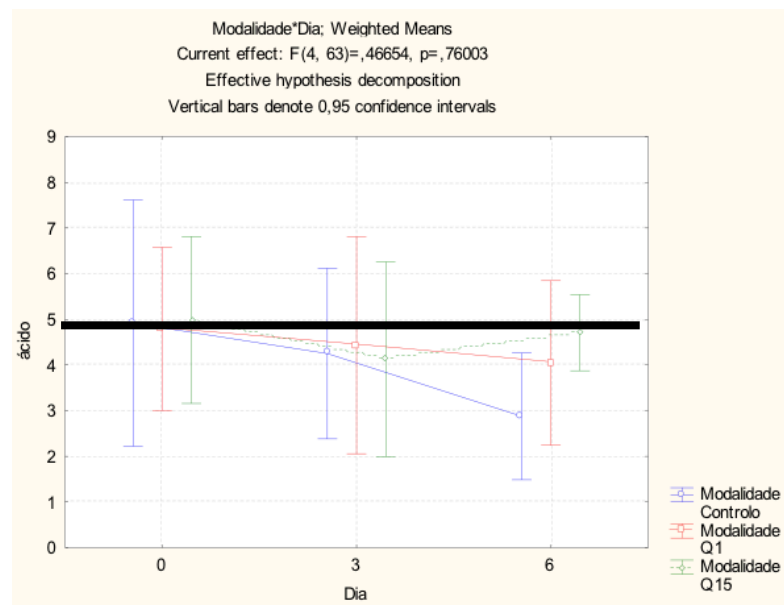
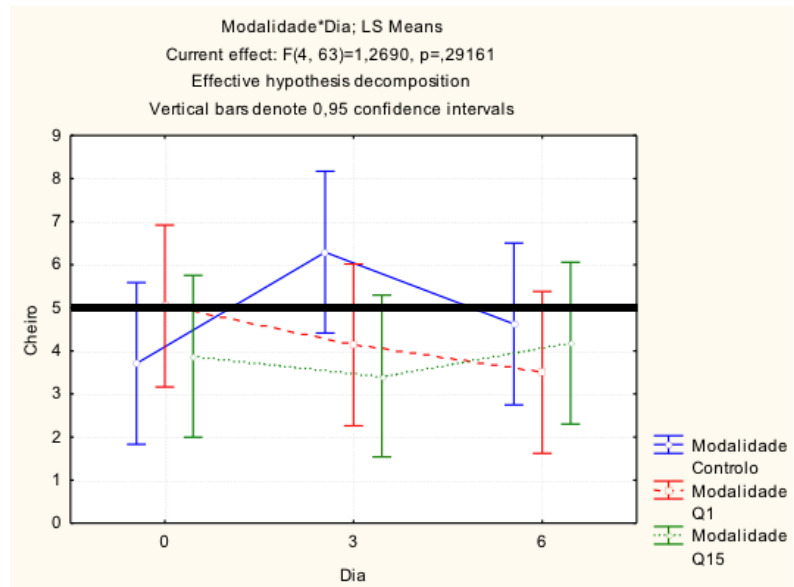
Obs: _____

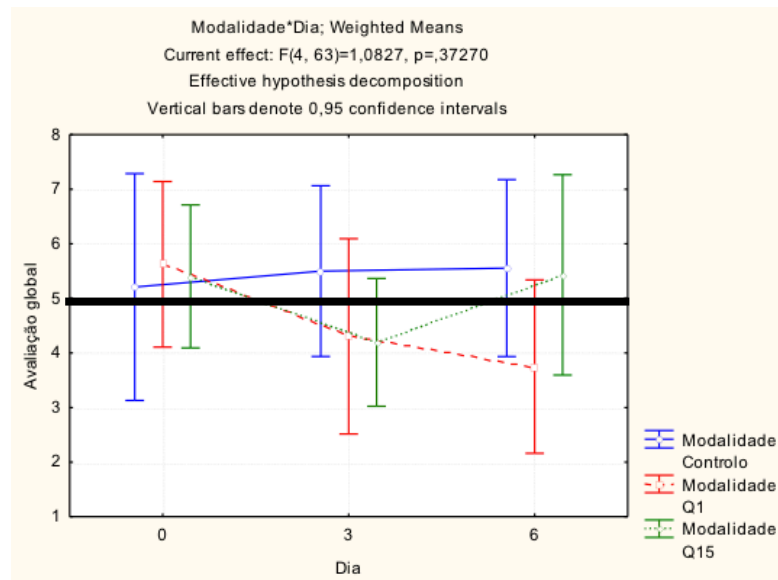
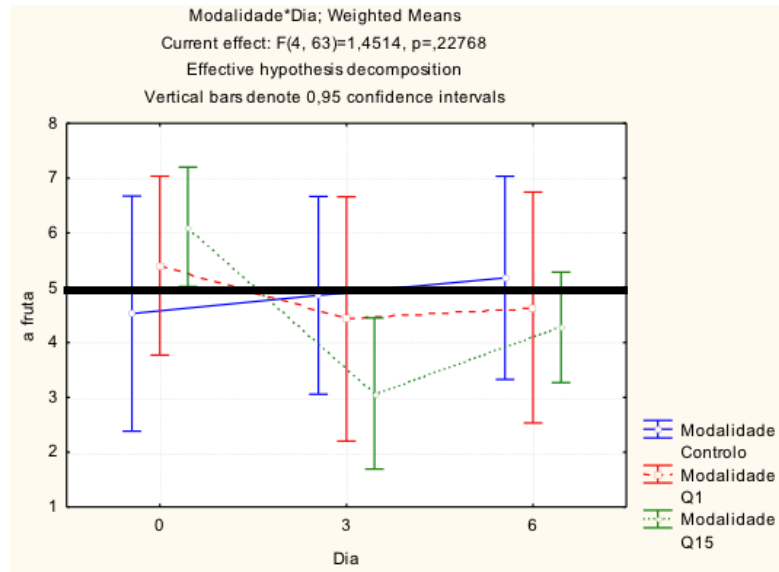
Anexo 9. Valores de F e p obtidos por análise ANOVA a dois fatores, com interação de modalidade e dia, para a análise sensorial de morangos.

		F	p
Cor	Modalidade	0.637516	0.637516
	Dia	0.493507	0.493507
	Modalidade*Dia	0.612941	0.612941
Cheiro	Modalidade	0.390477	0.390477
	Dia	0.779729	0.779729
	Modalidade*Dia	0.291610	0.291610
Sabor ácido	Modalidade	0.661594	0.661594
	Dia	0.306476	0.306476
	Modalidade*Dia	0.760029	0.760029
Doçura	Modalidade	0.231301	0.794165
	Dia	2.070900	0.134565
	Modalidade*Dia	1.451400	0.227680
Sabor a fruta	Modalidade	1.195900	0.309189
	Dia	0.168400	0.845356
	Modalidade*Dia	0.708000	0.589468
Avaliação global	Modalidade	1.172700	0.316193
	Dia	0.912300	0.406853
	Modalidade*Dia	1.082700	0.372703

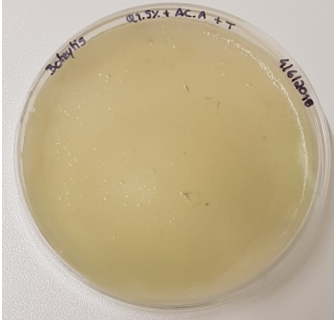
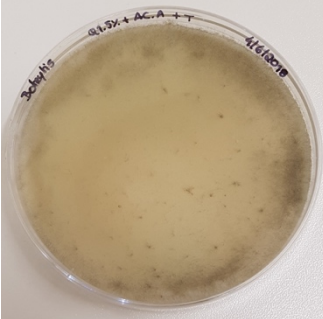
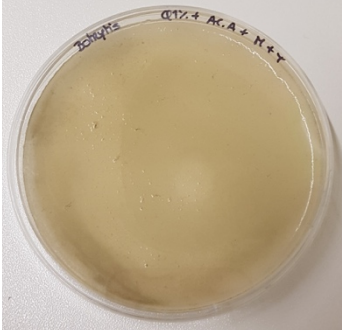
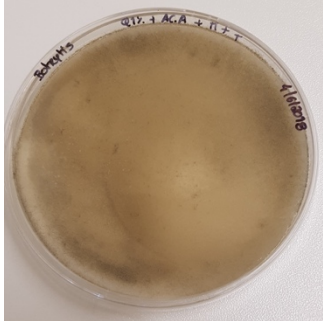
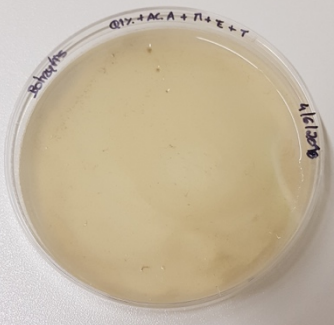
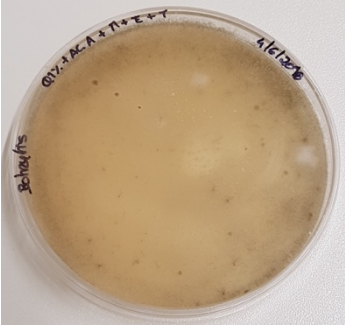
Anexo 10. Gráficos obtidos por análise ANOVA a dois fatores para análise sensorial de morangos, com interação de modalidade e dia para as modalidades: controlo, Q1 (quitosano 1%+ácido acético 0.5%) e Q15 (quitosano 1.5%+ácido acético 0.5%)



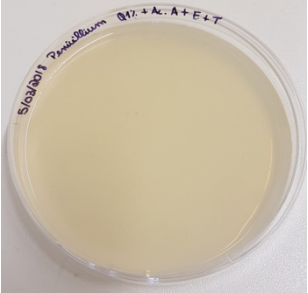
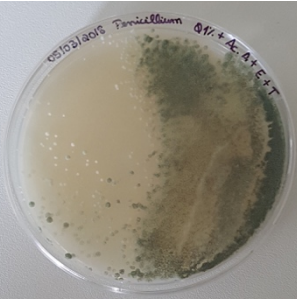
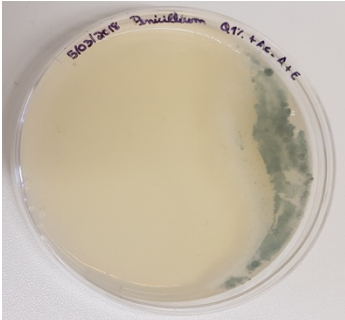
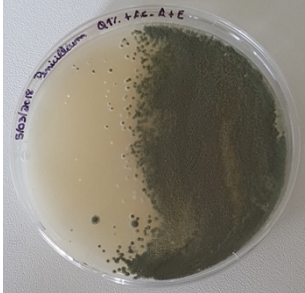




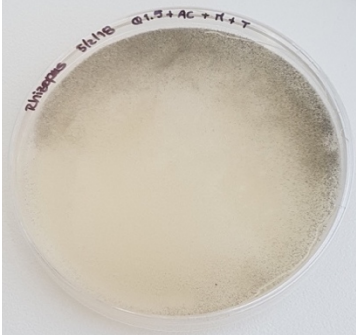
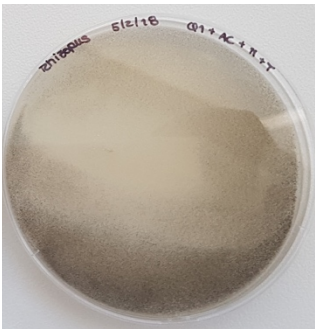
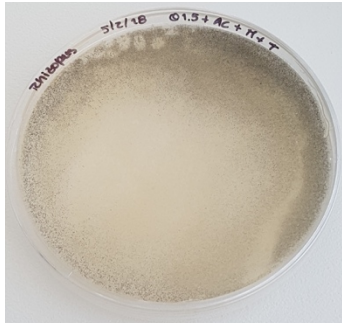
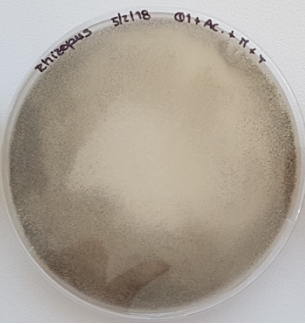
Anexo 11. Captações do crescimento dos fungos *Botrytis spp*, aos dias 3 e 9, com aplicação dos revestimentos Quitosano 1.5% + Ácido acético 0.5% + Tween80[®], Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Mentol e Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Eugenol +Mentol + Tween80[®]

	Dia 3	Dia 9
<p>Quitosano 1.5% + Ácido acético 0.5% + Tween80[®]</p>		
<p>Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Mentol</p>		
<p>Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Eugenol +Mentol + Tween80[®]</p>		

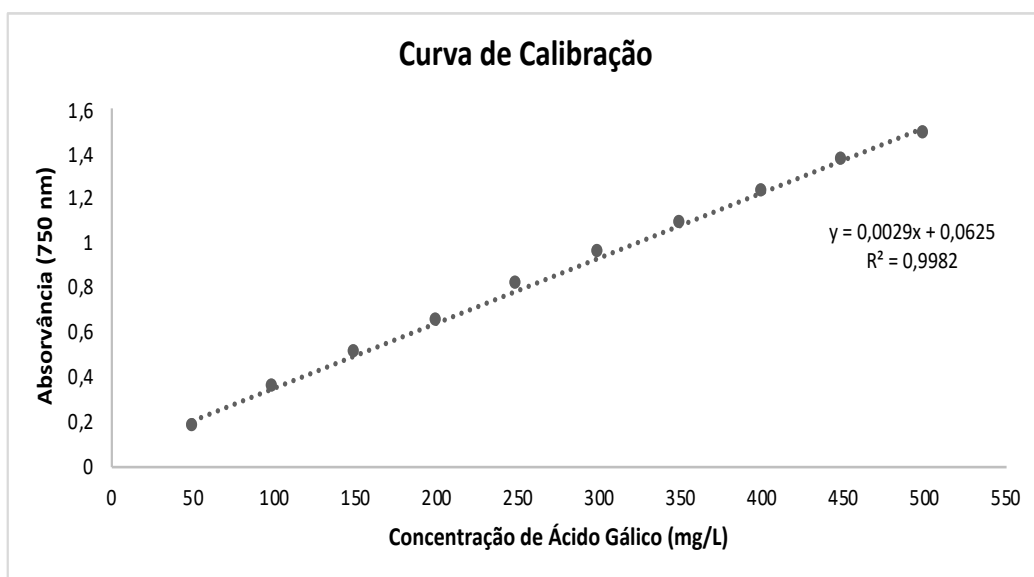
Anexo 12. Captações do crescimento dos fungos *Penicilliu spp.*, aos dias 3 e 9, com aplicação dos revestimentos Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Eugenol Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Mentol e Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Eugenol +Mentol + Tween80[®]

	Dia 3	Dia 9
<p>Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Eugenol + Tween80[®]</p>		
<p>Quitosano 1% + Ácido acético 0.5% + Eugenol</p>		

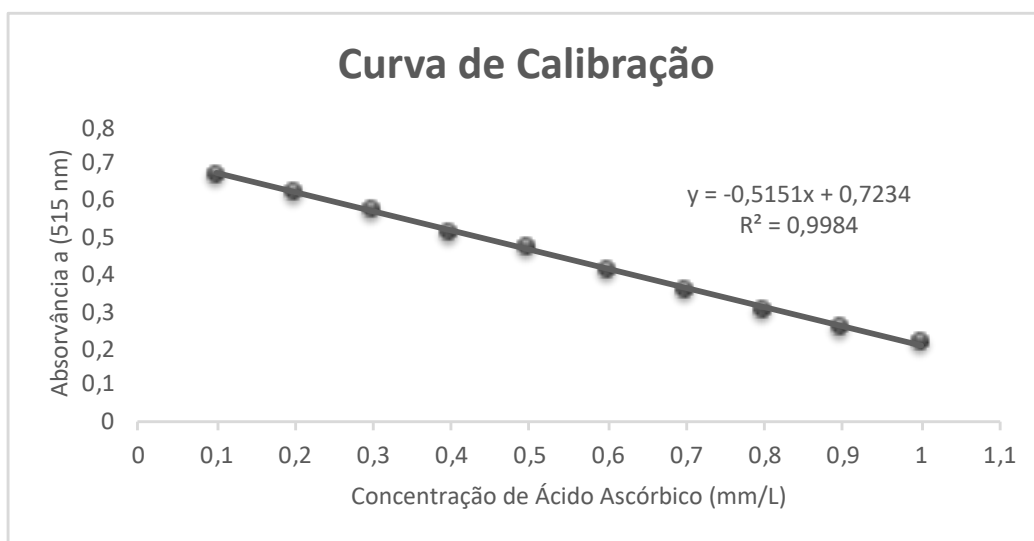
Anexo 13. Captações do crescimento dos fungos *Rhizopus spp.*, aos dias 3 e 8, com aplicação dos revestimentos Quitosano 1.5% + Ácido acético 0.5% + Mentol + Tween80[®] e Quitosano 1.5% + Ácido acético 0.5% + Mentol

	Dia 3	Dia 8
<p>Quitosano 1.5% + Ácido acético 0.5% + Mentol + Tween80[®]</p>		
<p>Quitosano 1.5% + Ácido acético 0.5% + Mentol</p>		

Anexo 14. Curva de calibração de ácido gálico para a determinação do conteúdo em compostos fenólicos.



Anexo 15. Reta de calibração de ácido ascórbico para a determinação da capacidade antioxidante.



Anexo 16. Artigo apresentado no congresso POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha.

Estudo do efeito *in vitro* dos revestimentos edíveis de quitosano com óleos essenciais no controlo de fungos

Melgão, Catarina¹; Ricardo-Rodrigues, Sara²; Félix, Maria do Rosário²; Nabais, João³; Agulheiro-Santos, Ana Cristina².

¹Aluna do mestrado em Bioquímica, Universidade de Évora (UEvora), 2016/2018, email: catarina.melgao@gmail.com

²Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) UEvora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal ³ Departamento de Química, UEvora, Rua Romão Ramalho no59, 7000-671 Évora, Portugal

Resumo

Uma das principais causas das perdas pós-colheita em frutos é a infeção por fungos diversos, como *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Botrytis* cinérea, *Rhizopus* stolonifer, entre outros. O presente trabalho pretende avaliar a capacidade de diferentes revestimentos edíveis controlarem o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de fungos como *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. Este objectivo está inserido num projeto que visa estudar a ação de revestimentos edíveis com diferentes concentrações de quitosano, e simultaneamente com adição de compostos químicos de óleos essenciais (OEs), eugenol e mentol na conservação de frutos durante o período de pós-colheita. Verificou-se que a aplicação de quitosano nas diferentes formulações estudadas efetivamente retardou o crescimento e desenvolvimento de ambos os fungos em estudo *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. Para o controlo de *Penicillium* spp. as formulações com eugenol apresentaram uma ação antifúngica mais acentuada, enquanto que para o controlo de *Rhizopus* spp. o mentol mostrou-se mais eficaz. Os resultados obtidos neste ensaio *in vitro* serão utilizados no subsequente ensaio *in vivo* com revestimentos edíveis em morango.

Palavras-chave: conservação, fungos, revestimentos edíveis

Introdução

Hoje em dia dedica-se uma maior atenção à dieta alimentar, sendo relevante o consumo de fruta fresca durante todo o ano. Nem sempre é fácil a manutenção de qualidade deste tipo de produtos durante o tempo desejado pelos consumidores, pelo que a procura de novas tecnologias de pós-colheita revela-se de extrema importância. A aplicação de revestimentos edíveis tem-se revelado uma boa tecnologia para a manutenção da qualidade dos frutos frescos e conseqüente aumento da sua vida útil, constituindo barreira ao transporte de gases e vapor de água (Luvielmo e Lamas, 2012). O quitosano, um biopolímero não tóxico obtido a partir da desacetilação da quitina, apresenta características muito adequadas para esta aplicação pois é biodegradável, biocompatível, apresenta atividade antimicrobiana e as suas propriedades físico-químicas são muito versáteis (Dutta et al. 2009). Existem já estudos onde são adicionados compostos OEs aos revestimentos de quitosano, pois estes OEs apresentam também propriedade antifúngicas e são uma alternativa aos conservantes químicos sintéticos (Ribes et al. 2017; Vieira, 2014; Guerra et al. 2016; Shahbazi, 2018). Uma das principais causas de perdas pós-colheita de frutos é a contaminação fúngica. Fungos como *Rhizopus* spp. e *Penicillium* spp. causam infeções nos frutos, limitando a vida útil de muitos frutos, como no caso do morango no qual fica limitada a 5 dias (Silva, 2010).

Neste estudo pretende-se avaliar a actividade antifúngica de revestimentos de quitosano em diferentes concentrações associados aos OEs eugenol e mentol, especificamente em *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. isolados a partir de morango.

Materiais e Métodos

Foram testadas em placa de Petri formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano nas concentrações de 1,0% e 1,5%, com e sem adição do surfactante Tween80© e com adição de compostos químicos de óleos essenciais (eugenol a 0,15% e mentol a 0,15%), durante um período de 9 dias. A solução de quitosano a 1% (m/V) foi preparada em água acidificada com ácido acético a 0,5%, porque o quitosano não apresenta solubilidade em água, para um volume total de solução de 200mL; adicionou-se depois 0,15% (m/V) de Tween80© à solução, relativamente ao volume e massa de quitosano (Romanazzi et al. 2009). A solução foi colocada sob agitação, a uma temperatura de 25oC, durante cerca de 1 hora (Romanazzi et al. 2007; Silva, 2010). Foi repetido o procedimento para as restantes soluções, com as adições e ajustes necessários. O quitosano utilizado foi o de baixa massa molecular fornecido pela Sigma-Aldrich Co., com um grau de desacetilação superior a 85% (ref. 448869-250G). Segundo Silva (2010), o quitosano de baixa massa molecular apresenta um elevado potencial de controlo do fungo *Botrytis*, tem menor permeabilidade ao vapor de água e menor viscosidade, para além de estar autorizado o seu uso para fins alimentares, pelo que foi selecionado para este trabalho. Foi utilizado ácido acético glacial fornecido pela Panreac, (ref.131008.1611). O surfatante Tween80© foi fornecido pela Sigma-Aldrich Co., (ref. P1754-1L). O eugenol e o mentol foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co., (ref. E51791-100G. e ref. M2772-100G-A).

Os fungos *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp foram isolados a partir de morangos provenientes empresa Sudoberry Portugal. Os fungos, obtidos nesses frutos, foram isolados e inoculados em placa de Petri de 90mm com PDA, até ao desenvolvimento de micélio, a partir do qual se preparou uma suspensão de esporos para cada fungo na concentração de 1×10^6 . Adicionou-se 100uL da suspensão de esporos e espalhou-se na placa; distribuindo-se posteriormente 20uL da solução de revestimento em estudo. As placas de Petri foram colocadas, numa sala com temperatura controlada de 25oC.

Resultados e Discussão

Durante o período de observação de 9 dias, foi notório o efeito de controlo do crescimento por parte de qualquer das soluções de quitosano, quer para o *Penicillium* spp. quer para o *Rhizopus* spp.. No caso do fungo *Penicillium* spp., o revestimento com quitosano foi essencial no controlo do crescimento do fungo, já que as placas apenas com ácido acético e eugenol, apresentavam um maior desenvolvimento e semelhante em ambas, comparando com a placa de controlo. Verifica-se um menor crescimento do *Penicillium* spp. nas placas com revestimentos com quitosano a 1% e que apresentam na sua composição o composto químico eugenol (Fig. 3) já a solução contendo Tween80 parece não ter efeito sobre o controlo de crescimento deste fungo (Figs. 2 e 3). Quando aplicada a solução com quitosano a 1%, ácido acético 0,5%, eugenol, mentol e Tween 80 (Fig. 5), o efeito é muito semelhante ao observado quando se aplica apenas a solução com quitosano a 1%, ácido acético e eugenol (Fig. 2), sendo de considerar que o mentol não afecta o desenvolvimento do micélio de *Penicillium* spp.. As placas foram colocadas estrategicamente numa superfície inclinada, de modo a avaliar na mesma placa o efeito da quantidade de revestimento no desenvolvimento dos fungos. É de notar que o lado da placa que esteve em constante contacto com as soluções (lado esquerdo) apresenta um crescimento bastante inferior ao crescimento observado no lado da placa

que esteve em contacto temporário com o revestimento (lado direito) (Figs. 2 e 3). Pode afirmar-se que, no caso de *Penicillium* spp., o quitosano retardou o crescimento do mesmo até um período de 9 dias. Relativamente ao fungo *Rhizopus* spp., os revestimentos que apresentavam mentol na sua composição revelaram um controlo mais eficaz sobre o crescimento do fungo e os revestimentos que contam com o quitosano a uma concentração de 1,5% apresentam um melhor resultado (Figs. 8 e 9). No caso do *Rhizopus* spp. continua a não ser evidente o efeito do Tween 80. Este controlo por parte do revestimento é menos evidente do que no caso do fungo *Penicillium* spp. e ocorre por um período de tempo menor. Os revestimentos revelaram capacidade para retardar o crescimento do fungo até 72 horas, no entanto ainda se verificam ligeiras diferenças ao fim de 9 dias. No caso do *Rhizopus* spp. continua a ser evidente o efeito da inclinação da superfície das placas, ou seja, da quantidade de revestimento (Figs. 9 e 10), pelo que se torna necessário aprofundar este aspeto.

Conclusões

A utilização de revestimentos de quitosano tem efeito no controlo de alguns dos fungos que afectam a vida útil dos frutos, nomeadamente *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp., provenientes de morango. A associação dos revestimentos de quitosano com OEs melhora o controlo destes fungos. No caso do fungo *Penicillium* spp. os revestimentos que continham eugenol apresentaram um melhor efeito de controlo do desenvolvimento do fungo e para o *Rhizopus* spp foram os revestimentos com mentol que o fizeram com maior eficácia.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao ICAAM pelo apoio logístico e uso de infraestruturas. Os autores agradecem ao Núcleo de I&D Vale da Rosa.

Referências

- Dutta, P.K., Shipra Tripathi, G.K. Mehrotra, e Joydeep Dutta. 2009. “Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Application.” *Food Chemistry*, 114, (4), pp.1173-1182.
- Guerra, I.C.D., de Oliveira, P.D.L., Santos, M.M.F., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., Madruga, M.S., de Souza, E.L. 2016. “The Effects of Composite Coatings Containing Chitosan and *Mentha* (*Piperita* L. or *X Villosa* Huds) Essential Oil on Postharvest Mold Occurrence and Quality of Table Grape Cv. Isabella.” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34, April 2016, pp.112-121.
- Luvielmo, M.M., e Lamas, S.V. 2012. “Revestimentos Comestíveis em Frutas.” *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 8(1), pp. 8-15.
- Silva, E.R., 2010. “Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e Aloe vera em morangos”. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em biotecnologia. Departamento de Química, Universidade de Aveiro.
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, E., Fuentes, A., Talens, P., Martínez-Máñez, R., Barata, J.M. 2017. “Eugenol and Thymol Immobilised on Mesoporous Silica- Based Material as an Innovative Antifungal System: Application in Strawberry Jam.” *Food Control*, 81, pp. 181–188.

Romanazzi, G., Karabulut, O.A., Smilanick, J.L. 2007. “Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes.” *Postharvest Biology and Technology*, 45 (1), pp. 134-140.

Romanazzi, G., Gabler, F.M., Margosan, D., Mackey, B. E., Smilanick, J.L. 2009. “Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape.” *Phytopathology*, 99, pp. 1028-1036.

Shahbazi, Yasser. 2018. “Application of Carboxymethyl Cellulose and Chitosan Coatings Containing *Mentha Spicata* Essential Oil in Fresh Strawberries.” *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, pp. 264–72.

Vieira, A.I. 2014. “Eficácia de películas edíveis suplementadas com componentes de óleos essenciais no controlo de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica Typhimurium*” Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biológica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.

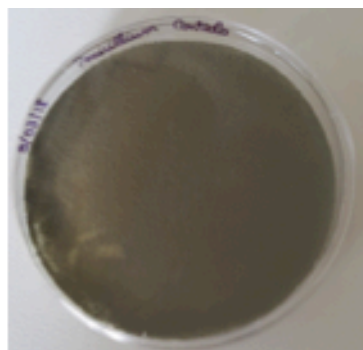


Figura 1 – Crescimento de *Penicillium* spp. (controle) passados nove dias

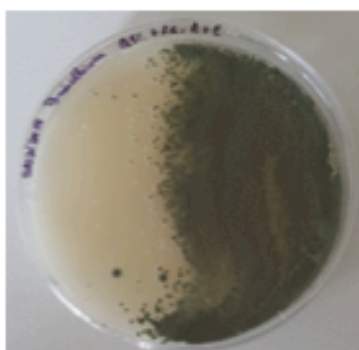


Figura 2 – Ação do revestimento de quitosano 1% com ácido acético 0,5% e eugenol sobre *Penicillium* spp., passados nove dias

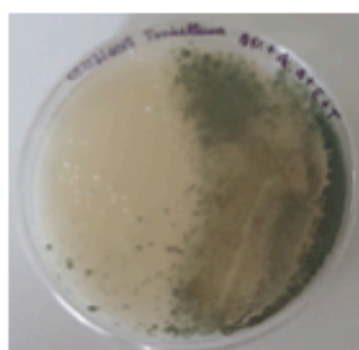


Figura 3 – Ação do revestimento de quitosano 1% com ácido acético 0,5%, eugenol e tween 80 sobre *Penicillium* spp., passados nove dias

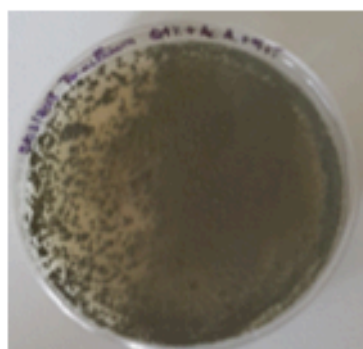


Figura 4 – Ação do revestimento de quitosano 1% com ácido acético 0,5%, mentol e tween 80 sobre *Penicillium* spp., passados nove dias

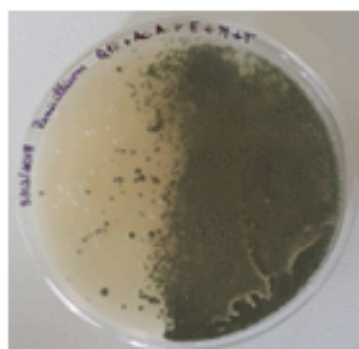


Figura 5 – Ação do revestimento de quitosano 1% com ácido acético 0,5%, eugenol, mentol e tween 80 sobre *Penicillium* spp., passados nove dias

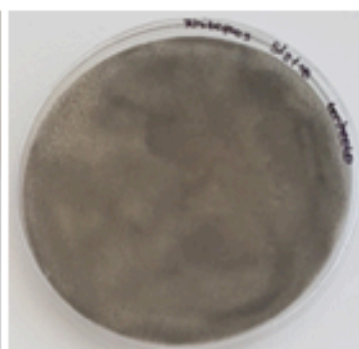


Figura 6 – Crescimento de *Rhizopus* spp. (controle) passados três dias

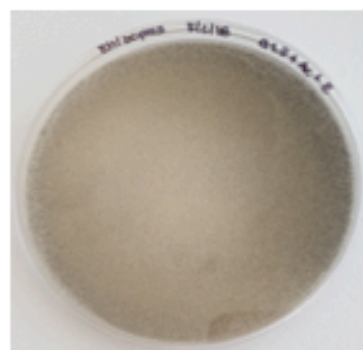


Figura 7 – Ação do revestimento de quitosano 1,5% com ácido acético 0,5% e eugenol sobre *Rhizopus* spp., passados três dias

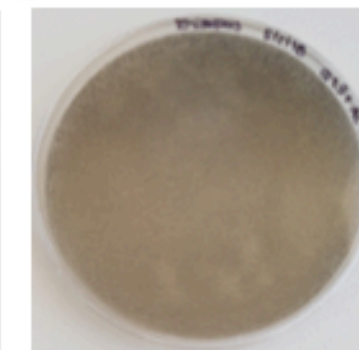


Figura 8 – Ação do revestimento de quitosano 1,5% com ácido acético 0,5%, eugenol e tween 80 sobre *Rhizopus* spp., passados três dias

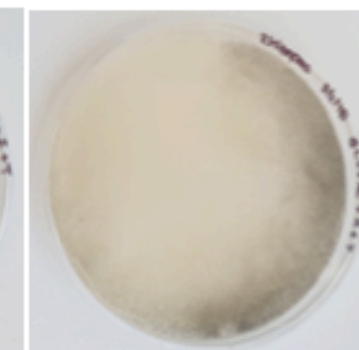


Figura 9 – Ação do revestimento de quitosano 1,5% com ácido acético 0,5%, mentol e tween 80 sobre *Rhizopus* spp., passados três dias

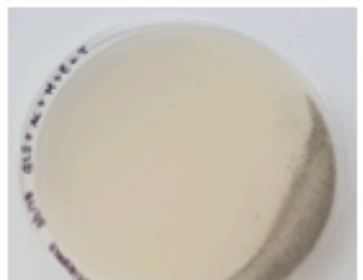


Figura 10 – Ação do revestimento de quitosano 1,5% com ácido acético 0,5%, mentol, eugenol e tween 80 sobre *Rhizopus* spp., passados três dias

Anexo 17. Poster apresentado no congresso POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha.



SESIÓN 3 DE POSTERS
7 DE JUNIO
PATOLOGÍA
POSTCOSECHA DE
FRUTAS Y HORTALIZAS

Estudo do efeito *in vitro* dos revestimentos edíveis de quitosano com óleos essenciais no controlo de fungos

Melgão, Catarina¹; Ricardo-Rodrigues, Sara²; Félix, Maria do Rosário²; Nabais, João³; Agulheiro-Santos, Ana Cristina².

¹Aluna do mestrado em Bioquímica, Universidade de Évora (UEvora), 2016/2018, email: catarina.melgao@gmail.com

²Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) UEvora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

³Departamento de Química, UEvora, Rua Romão Ramalho n°59, 7000-671 Évora, Portugal





1. Introdução

Uma das principais causas das perdas pós-colheita em frutos é a infeção por fungos diversos, como *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Botrytis* cinérea, *Rhizopus stolonifer*, entre outros. O uso de revestimentos edíveis, nomeadamente à base de quitosano, apresenta-se como uma boa tecnologia para manutenção da qualidade dos frutos frescos e aumento da sua vida útil. O quitosano apresenta características muito adequadas para esta aplicação pois é biodegradável, biocompatível, apresenta atividade antimicrobiana, não é tóxico e as suas propriedades físico-químicas são muito versáteis. Existem já estudos onde são adicionados compostos químicos de óleos essenciais (OEs) aos revestimentos de quitosano, pois estes OEs apresentam também propriedade antifúngicas e são uma alternativa aos conservantes químicos sintéticos.

2. Objetivos

Avaliação da actividade antifúngica de revestimentos de quitosano em diferentes concentrações associados aos OEs eugenol e mentol, especificamente em *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. isolados a partir de morango.

3. Materiais e Métodos

Preparação das soluções de revestimentos



Preparação das suspensões de esporos



Preparação das placas



Avaliação durante 9 dias



Soluções de revestimentos edíveis de quitosano nas concentrações de 1,0% e 1,5%, com e sem adição do surfactante Tween80® e com adição de OEs (eugenol a 0,15% e mentol a 0,15%)

4. Resultados












É notório o efeito de controlo do crescimento por parte de qualquer das soluções de quitosano.

5. Conclusões

A utilização de revestimentos de quitosano tem efeito positivo no controlo de alguns dos fungos que afectam a vida útil dos frutos, nomeadamente *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp, provenientes de morango.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao ICAAM pelo apoio logístico e uso de infraestruturas e ao Núcleo de I&D Vale da Rosa.

Referências

Dutta, P.K., Shipra Tripathi, G.K. Mehrotra, e Joydeep Dutta. 2009. "Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Application." Food Chemistry, 114, (4), pp.1173-1182.

Silva, E.R., 2010. "Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e Aloe vera em morangos". Dissertação para obtenção do grau de Mestre em biotecnologia. Departamento de Química, Universidade de Aveiro.

Romanazzi, G., Karabulut, O.A., Smilanick, J.L. 2007. "Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes." Postharvest Biology and Technology, 45 (1), pp. 134-140.

Anexo 18. Artigo apresentado no congresso POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha.

Avaliação sensorial de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano

Melgão, Catarina¹; Ricardo-Rodrigues, Sara²; Nabais, João³; Agulheiro-Santos, Ana Cristina²

¹Aluna do mestrado em bioquímica 2016/2018, email: catarina.melgao@gmail.com

²Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

³Departamento de Química, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho nº59, 7000-671 Évora, Portugal

Resumo

A indústria alimentar procura, de forma constante, novos métodos e estratégias que permitam o aumento do período de pós-colheita de frutos, sem alteração das suas características físico-químicas e organoléticas. Essa procura visa, cada vez mais, a utilização de materiais sustentáveis e biodegradáveis, pelo que tem surgido um elevado interesse na utilização de revestimentos edíveis à base de quitosano. O quitosano é um polissacarídeo obtido por desacetilação da quitina, com reconhecido potencial de aplicação, cada vez mais versátil, nomeadamente no controlo do fungos e manutenção da qualidade dos frutos no período pós-colheita.

Inserido num projeto que estuda a ação de revestimentos edíveis à base de quitosano, na conservação de frutos durante o período de pós-colheita, surgiu o presente trabalho que visa avaliar a influência da utilização de diferentes formulações de revestimentos edíveis, à base de quitosano, nas características organoléticas dos frutos nos quais foram aplicados os revestimentos. Neste caso de estudo, o fruto utilizado foi o morango, e a análise sensorial selecionada foi um teste triangular. Foram realizadas três sessões de análise sensorial, nas quais se consideraram as diferentes soluções em estudo: concentrações de 1,0 e 1,5% de formulações de revestimentos de quitosano; 0,5% e 1,0% de ácido acético, com e sem adição do surfactante Tween 80®. Os resultados do presente estudo permitem concluir que a utilização de ácido acético a 1,0% não deve ser utilizada para a formulação de revestimentos edíveis à base de quitosano, uma vez que os consumidores identificaram a sua presença na concentração de 1,0% de ácido, sendo apontada existência de odores estranhos no morango. Não foram identificadas diferenças significativas nas amostras independentemente da concentração de quitosano e da adição ou não de Tween80®. Os consumidores não identificaram a presença dos revestimentos das formulações produzidas e utilizadas em morango fresco, com exceção para a formulação com ácido acético a 1,0% de concentração.

Palavras-chave: conservação, película edível, pós-colheita, sensorial

Introdução

Cada vez se revela como mais importante recorrer a materiais biodegradáveis para promover um futuro mais sustentável. Esta tendência também vigora na indústria alimentar, com o desenvolvimento de novas metodologias “amigas do ambiente” e promotoras do aumento de vida útil dos alimentos. Por outro lado, a população tem um cuidado crescente com a alimentação, sendo que a fruta desempenha um papel muito importante na dieta, e é essencial que seja de elevada qualidade e se encontre disponível durante todo o ano. Os revestimentos edíveis tendo a capacidade de constituir barreira ao transporte de gases e vapor de água, têm sido estudados desde há décadas e apresentam-se como uma boa estratégia para manter a qualidade dos frutos frescos,

umentando o seu período de vida útil, nomeadamente os que são à base de quitosano (Luvielmo & Lamas, 2012). O quitosano é um biopolímero natural não tóxico, biocompatível, biodegradável, com atividade microbiana e apresenta propriedades físico-químicas bastante versáteis (Dutta et al., 2009). Obtém-se por desacetilação da quitina, constituinte do exosqueleto dos crustáceos. (Fonseca, 2012)

De modo a avaliar a viabilidade dos revestimentos edíveis à base de quitosano na conservação de frutos no período pós-colheita, é essencial verificar se estes apresentam influência nas características organolépticas dos frutos aos quais foram aplicados. Uma avaliação sensorial, com recurso a teste triangular pode ser utilizado no controlo de qualidade e desenvolvimento de novos produtos, para verificar se o produto mantém as características padrão. Este teste consiste na apresentação, em simultâneo, de três amostras codificadas, em que duas são iguais. As combinações de amostras devem ser apresentadas em número igual de acordo com as seis combinações possíveis previstas na ISO 4120 de 2004. (Reis et al., 2011)(Freitas et al., 2009)

Materiais e Métodos

Os morangos ‘Victory’ utilizados neste ensaio foram provenientes da empresa Sudoberry, localizada no litoral alentejano e colhidos de acordo com os procedimentos normais da empresa. Para a preparação dos revestimentos utilizou-se quitosano de baixa massa molecular (Sigma-Aldrich Co.), com um grau de desacetilação superior a 85% (Silva (2010)), ácido acético glacial (Panreac) e Tween 80 (Sigma-Aldrich).

A solução de quitosano a 1% (m/V) foi preparada em água acidificada com ácido acético a 0,5% para um volume total de solução de 300mL; adicionou-se 0,15% (m/V) de Tween 80 à solução, relativamente ao volume e massa de quitosano. A solução foi colocada sob agitação, a uma temperatura de 25° C, durante cerca de 1 hora (Romanazzi et al., 2007; Silva, 2010). O procedimento foi repetido para as restantes soluções testadas: quitosano 1,5% em ácido acético 1% e Tween 80; quitosano 1,5% em ácido acético 0,5% e Tween 80, quitosano 1,5% em ácido acético 0,5% sem Tween 80. A aplicação das soluções de quitosano aos morangos foi realizada por imersão dos frutos, individualmente, nas soluções, durante 5 minutos, tal como descreveram Valverde et al. (2005), Martínez-Romero et al. (2006) e Silva (2010). Após a aplicação da solução, os morangos foram colocados em suporte de rede durante 12 horas, a uma temperatura de 20°C, tal como descrito por Silva (2010). As amostras foram depois colocadas em caixas de plástico previamente identificadas e conservadas à mesma temperatura (20°C) de secagem. (Ricardo-rodrigues et al., 2017).

Os testes sensoriais triangulares foram realizados segundo a norma ISO 4120 (2004). Foram realizadas três sessões de análise sensorial, utilizando diferentes formulações sendo o consumidor forçado a identificar na ficha de análise sensorial a amostra diferente (fig. 1). Na primeira sessão foi considerado um conjunto com a solução de quitosano a 1% com ácido acético 0,5% e Tween80. Na segunda sessão foram avaliados dois conjuntos, no primeiro foi considerada a solução de quitosano a 1,5% com ácido acético 1% e Tween80; no segundo foi considerada a solução de quitosano a 1,5% com ácido acético 0,5% e Tween80.

Na terceira sessão foram considerados também dois conjuntos, no primeiro utilizada a solução de quitosano 1,5% com ácido acético 0,5%, no segundo foi utilizada a solução de quitosano 1,5% com ácido acético 0,5% e Tween 80.

Resultados e Discussão

Segundo a tabela A1 da ISO 4120, e analisando o gráfico 1 com os resultados obtidos das três provas sensoriais realizadas, onde A representa os frutos sem revestimento e B os

frutos com revestimento, não é possível identificar diferenças a nível estatístico, para um nível de significância de 5%, o que indica que todas as soluções apresentam viabilidade. No entanto, no caso dos frutos com revestimento de quitosano 1,5%, ácido acético 1% e Tween 80, os consumidores identificaram um odor desagradável, devido à elevada concentração de ácido acético, o que leva à exclusão do uso de revestimentos com concentração de ácido acético a 1%.

Conclusões

A nível sensorial, não foram detetadas diferenças significativas a nível estatístico nas amostras. Os provadores apenas detetaram um odor diferente desagradável nos frutos com revestimentos com ácido acético numa concentração de 1%. Relativamente aos restantes revestimentos com quitosano, ácido acético a 0,5%, com e sem Tween80, não foram detetadas diferenças, o que indica que os mesmos são viáveis para utilização na conservação de fruta fresca, de modo a aumentar o seu período pós-colheita.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao ICAAM pelo apoio logístico e uso de infraestruturas.

Os autores agradecem ao Núcleo I&D Vale da Rosa.

Os autores agradecem à empresa Sudoberry, de onde são provenientes os morangos em estudo.

Referências

Dutta, P.K., Shipra Tripathi, G.K. Mehrotra, e Joydeep Dutta. 2009. “Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Application.” *Food Chemistry*, 114, (4), pp.1173-1182.

Freitas, D. D. G. C., Soares, A. G., Fonseca, M. J. de O., Neves Jr, A. C. V., Coneglian, R. C. C., Reis, R. C., ... Ceresino, E. B. (2009). Metodologia de Detecção da Adstringência em Frutos de Caqui para Determinação do Tempo de Destanização. *Journal of Food Quality*, 34(3), 163–170.

LUVIELMO, M. de M., & LAMAS, S. V. (2012). Revestimentos comestíveis em frutas. *Estudos Tecnológicos Em Engenharia*.

Martínez-Romero, D.; Albuquerque, N.; Valverde, J.M.; Guillén, F.; Castillo, S.; Valero, D. e Serrano, M. (2006) – Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by Aloe vera treatment: A new edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 39, n. 1, p. 93-100.

Romanazzi, G., Karabulut, O.A., Smilanick, J.L. 2007. “Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes.” *Postharvest Biology and Technology*, 45 (1), pp. 134-140.


Reis, R. C., Minim, V. P. R., Bolini, H. M. A., Dias, B. R. P., Minim, L. A., & Ceresino, E. B. (2011). Sweetness equivalence of different sweeteners in strawberry-flavored yogurt. *Journal of Food Quality*, 34(3), 163–170.

Ricardo-Rodrigues, S., Laranjo, M., Martins, P., Rato, A. E., Shahidian, S., Vaz, M., Vieira, F. (2017). Efeito do quitosano e ácido acético na conservação de uva de mesa, 40(1), 246–253.

Silva, E.R., 2010. “Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e Aloe vera em morangos”. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em biotecnologia. Departamento de Química, Universidade de Aveiro.


Silva, S.B., Silva, M.G., Silva, J., Souza, D. 2017. “Desenvolvimento de Filmes de Quitosana para Aplicação como Embalagem Ativa em Queijo Tipo Colonial Fatiado.” X CIGR Section IV International Technical Symposium - XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. At: Gramado, Brasil.

Valverde, J.M.; Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Castillo, S. e Serrano, M. (2005) – Novel edible coating based on aloe vera gel to maintain table grape quality and safety. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, n. 20, p. 7807-7813.



Universidade de Évora

Laboratório de Tecnologia e Pós-Colheita



Nome: _____
 Data: __/__/____

Em cada conjunto (I, II) existem duas amostras que são iguais e uma que é diferente. **Prove** as amostras da esquerda para a direita e coloque um círculo à volta do número da amostra diferente em cada conjunto. **Identifique** o que torna a amostra diferente das restantes.

Conjunto	Códigos			O que é diferente? (Cor, firmeza, sabor...)
I	A	B	C	

Fig. 2 – Ficha de análise sensorial

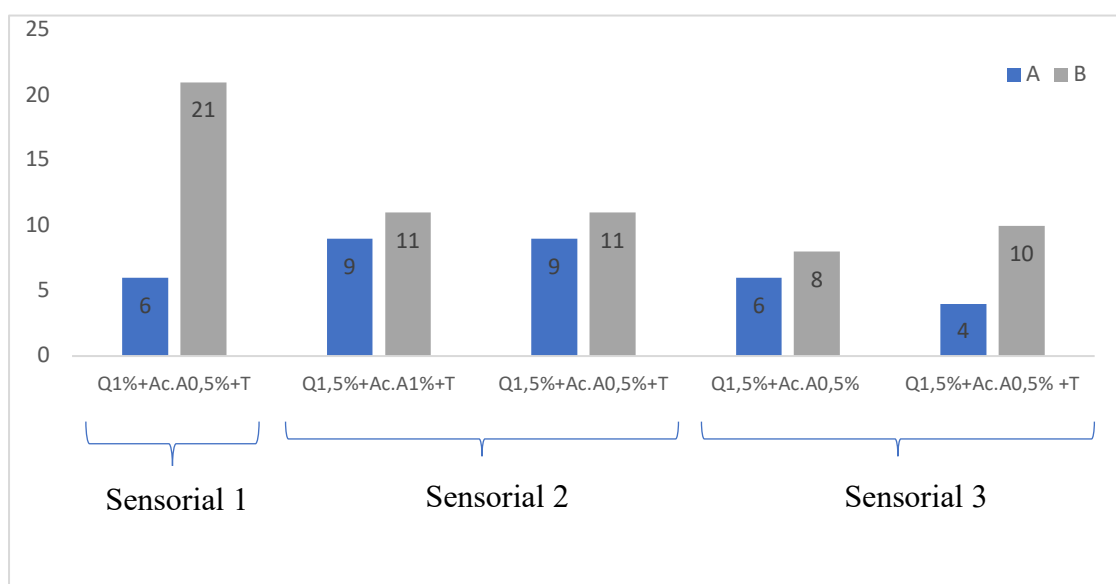



Gráfico 1 – Gráfico de barras com os resultados das três análises sensoriais triangulares realizadas

Anexo 19. Poster apresentado no congresso POST18 - XII Simposio Nacional y X Ibérico de Maduración y Postcosecha.



SESIÓN DE POSTERS 2
5 DE JUNIO
TECNOLOGÍAS Y
CALIDAD
POSTCOSECHA DE
FRUTAS Y HORTALIZAS

Avaliação sensorial de formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano

Melgão, Catarina¹; Ricardo-Rodrigues, Sara²; Nabais, João³; Agulheiro-Santos, Ana Cristina².

¹Aluna do mestrado em bioquímica 2016/2018, email: catarina.melgao@gmail.com
² Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal
³ Departamento de Química, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho nº59, 7000-671 Évora, Portugal





1. Introdução

Os revestimentos edíveis apresentam-se como uma boa estratégia para manter a qualidade dos frutos frescos, aumentando o seu período de vida útil, nomeadamente os que são à base de quitosano. O quitosano é um biopolímero natural não tóxico, biocompatível, biodegradável, com atividade microbiana e apresenta propriedades físico-químicas bastante versáteis. Para este tipo de revestimentos ser utilizado, é necessário a verificação da manutenção das características organoléticas dos frutos aos quais foram aplicados, com recurso a análises sensoriais.

2. Objetivos

Avaliação da influência da utilização de diferentes formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano nas características organoléticas dos frutos nos quais foram aplicados revestimentos.

Revestimentos edíveis:
 Quitosano 1% + Ácido Acético 0,5% + Tween80
 Quitosano 1,5% + Ácido acético 1,0% + Tween80
 Quitosano 1,5% + Ácido acético 0,5% + Tween80
 Quitosano 1,5% + Ácido acético 0,5%

3. Materiais e Métodos

Preparação das soluções



Aplicação dos revestimentos nos frutos por imersão



Secagem por 12 horas



Análise sensorial triangular



4. Resultados



Gráfico 1 – Gráfico de barras com os resultados das três análises sensoriais triangulares realizadas

De acordo com a tabela A1 da ISO 4120 e analisando o gráfico 1, onde A representa os frutos sem revestimento e B os frutos com revestimento, pode verificar-se que não existem diferenças a nível estatístico, para um nível de significância de 5%, o que indica que todas as soluções são viáveis.

Apenas nos frutos com revestimentos com ácido acético a 1% detetaram na mesma um odor desagradável.

5. Conclusões

Sensorialmente, não foram detetadas diferenças significativas a nível estatístico. Os provadores detetaram um odor desagradável nos frutos com revestimentos com ácido acético numa concentração de 1%.

Todos os revestimentos apresentam viabilidade, à exceção dos apresentam ácido acético na concentração de 1% na sua composição.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao ICAAM pelo apoio logístico e uso de infraestruturas, à empresa Sudoberry, de onde são provenientes os morangos utilizados para o estudo e ao Núcleo I&D Vale da Rosa.

Referências

Dutta, P.K., Shipra Tripathi, G.K. Mehrotra, e Joydeep Dutta. 2009. "Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Application." Food Chemistry, 114, (4), pp.1173-1182.

Ricardo-Rodrigues, S., Laranjo, M., Martins, P., Rato, A. E., Shahidian, S., Vaz, M., Vieira, F. (2017). Efeito do quitosano e ácido acético na conservação de uva de mesa, 40(1), 246–253.

Silva, E.R., 2010. "Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e Aloe vera em morangos". Dissertação para obtenção do grau de Mestre em biotecnologia. Departamento de Química, Universidade de Aveiro.

Valverde, J.M.; Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Castillo, S. e Serrano, M. (2005) – Novel edible coating based on aloe vera gel to maintain table grape quality and safety. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, n. 20, p. 7807-7813.

Anexo 20. Poster apresentado no congresso International Conference on Mediterranean Diet and Gastronomy.



International Conference on
MEDITERRANEAN DIET
AND GASTRONOMY

FCT
Fundação para a Ciência e a Tecnologia

GOVERNO DE
PORTUGAL

ICAM
Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas

CHERRY STORAGE USING CHITOSAN EDIBLE COATINGS AND ESSENTIAL OILS

C. Melgão¹; S. Ricardo-Rodrigues²; Véstia, J.²; J. Nabais³; M.R. Felix²; A.C. Agulheiro-Santos²

¹ Student of Biochemistry master course 2016/2018, email: catarina.melgao@gmail.com

² Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

³ Departamento de Química, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho nº59, 7000-671 Évora, Portugal

1. INTRODUCTION

Maintaining fruit quality during post-harvest period is a constant goal of the producers. Edible coatings based on chitosan have emerged as an effective response to this purpose. Chitosan is a polysaccharide obtained by deacetylation of chitin which has an already demonstrated capacity for fungal control and maintenance of sensory and nutritional quality in the post-harvest period of fruits. To this coating solution are often associated essential oils, also having a positive effect on fungal control. Cherries are fruits that are much appreciated and sought by the consumers all over the world, but which are available at proper production season and are very sensitive to decay. So the idea of increasing the shelf life of cherries has benefits for both producers and consumers.

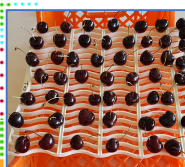


2. OBJECTIVES

Evaluation of the effect of chitosan based edible coatings and essential oils (menthol and eugenol) on cherries for a cold storage period of 21 days.

3. MATERIAL AND METHODS

Application of edible coatings based on chitosan and OE's on cherries in commercial maturation stage



- Solution of Chitosan 1% + Tween80®
- Solution of Chitosan 1,5% + Tween80®
- Solution of Chitosan 1% + Tween80® + Menthol
- Solution of Chitosan 1% + Tween80® + Menthol + Eugenol

Conservation in a cold room, at 3°C
Analyzes performed on days 0, 7, 14 and 21

Parameters evaluated:

- Weight loss
- Soluble Solids Content
- Texture
- Titratable Acidity
- Sensory analysis



4. RESULTS

- Until the 14th day of storage the sensory evaluation was positive, all the tasters considered the cherries from all the modalities fit for consumption.
- On the 21st, cherries were considered by pannelists as unproper for consumption.
- After 21 days of storage, the samples belonging to control presented more molds than coated cherries.

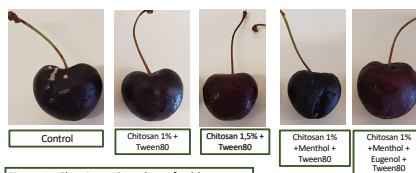


Figure 1 - Cherries at 21st days of cold storage

		F	p
Weight loss (%)	Modality	13,032	0,000
	Day	1112,603	0,000
SSC (°Brix)	Modality*Day	3,988	0,001
	Day	1,43	0,232
TA (mg acid malic/g fw)	Modality	34,02	0,000
	Day	1,02	0,430
Skin Firmness (MaxF) (N)	Modality*Day	5,12	0,001
	Day	8,21	0,001
MaxF/D (N. mm ⁻¹)	Modality	2,68	0,012
	Day	1,360	0,256
Area (N.mm)	Modality	6,416	0,003
	Day	2,944	0,007
Maximum Deformation (mm)	Modality*Day	0,483	0,748
	Day	1485,795	0,000
Pulp Firmness (N)	Modality	0,765	0,635
	Day	2,928	0,026
Pulp Firmness (N)	Modality*Day	282,953	0,000
	Day	2,648	0,013
Pulp Firmness (N)	Modality	5,357	0,001
	Day	22,829	0,000
Pulp Firmness (N)	Modality*Day	1,728	0,106
	Day	0,683	0,606
Pulp Firmness (N)	Modality	16,086	0,000
	Day	1,373	0,222

Table 1 - ANOVA results obtained from the parameters evaluated, considering a level of significance of 0.05

5. CONCLUSIONS

The edible coatings based on chitosan have a notorious antifungic effect during the 21 days of storage. The edible coatings affected also the respiration and turgidity, as well as the acidity of the cherries.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to ICAAM, from University of Évora, for the logistical support and use of infrastructures. This research was partially supported by National Funds through the FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, project UID/AGR/00115/2013.

REFERENCES

- Dutta, P.K.; Tripathi, S., Mehrotra, G.K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114 (4), 1173- 1182.
- Valverde, J.M.; Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Castillo, & Serrano, M. (2005) - Novel edible coating based on aloe vera gel to maintain table grape quality and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20), 7807-7813.
- Chockchaisawasdee, S., Golding, J.B., Vuong, Q.V., Papoutsis, K., & Stathopoulos, C.E. (2016). Trends in Food Science & Technology. Sweet cherry: Composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 72-83.