



**Élio Ruben  
Duarte Silva**

**Avaliação do potencial de revestimentos de  
quitosano e *Aloe vera* em morangos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Teixeira Lopes da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Maria Luísa Beirão da Costa**

professora catedrática com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

**Professor Doutor José António Teixeira Lopes da Silva**

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Agradeço ao Professor Lopes da Silva, pela confiança demonstrada ao aceitar este trabalho e pela orientação científica.

Da mesma forma, agradeço também à Professora Adelaide Almeida, pela disponibilidade e interesse demonstrados.

À Aloecorp e à LusoMorango, pela cooperação e disponibilização gratuita do material necessário à realização deste trabalho.

À Carla, um obrigado especial, por toda a paciência que sempre demonstrou, mesmo quando parecia humanamente impossível, pelo carinho na hora certa e pela ajuda em todos aqueles pequenos pormenores imperceptíveis.

Aos meus pais, aos meus amigos e aos meus colegas de laboratório por toda a força que me transmitiram.

## palavras-chave

revestimentos comestíveis, *Aloe vera*, quitosano, conservação, pós-colheita, frutos, morangos

## resumo

A partir do momento em que um fruto é colhido da planta mãe, têm lugar uma série de alterações ao nível estrutural, químico, nutricional, bioquímico e enzimático, que conduzem, em última análise, ao período de senescência, no qual o fruto deixa de ser comestível.

No sentido de permitir a manutenção dos frutos num estado comestível durante um espaço de tempo mais alargado, foram desenvolvidos e postos em prática, nas últimas décadas, métodos e tecnologias que permitem minorar a degradação das características fisiológicas dos mesmos. A aplicação de revestimentos comestíveis em frutos é um desses métodos. A implementação desta técnica cria uma barreira protectora semipermeável na superfície do fruto, tendo um efeito inibitório de determinadas alterações características do seu período de pós-colheita.

Neste trabalho foi desenvolvido um revestimento comestível para aplicar em morangos, a partir de *Aloe vera* e de quitosano. O primeiro começou a ser estudado como revestimento comestível recentemente, sendo diminuta a bibliografia existente, e nunca foi antes aplicado em morangos. O uso de quitosano como revestimento encontra-se vastamente documentado, com várias aplicações bem sucedidas em frutos frescos.

Para atingir os objectivos propostos, foram realizadas diversas simulações, que tiveram lugar em dois momentos temporais distintos. No total, a amostra estudada foi constituída por 27 kg de morangos, tendo sido analisados os parâmetros cor, textura, massa, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, carga microbiológica e infecções, associados ao processo degenerativo dos frutos.

Os resultados evidenciam o potencial dos materiais utilizados como revestimentos comestíveis na conservação dos morangos. De facto, foi possível retardar significativamente o aparecimento de infecções de origem fúngica, o que se traduz num decréscimo das elevadas taxas de perdas comuns neste fruto. Foram encontrados indícios de melhoria na manutenção das características texturais dos frutos, especialmente ao nível externo e médio interior. Esta manutenção, conjugada com o aumento inesperado da taxa de perdas de água, comprova que a acção dos revestimentos na manutenção da textura vai para além do controlo do turgor celular, sugerindo assim uma acção sobre os processos enzimáticos e/ou metabólicos característicos da degradação da textura dos frutos. Os resultados da quantificação de sólidos solúveis e ácidos mostraram que os materiais utilizados nos revestimentos induziram a um consumo superior de ácidos orgânicos e de polissacarídeos por parte dos morangos, sugerindo uma metabolização energética superior. Ao nível das alterações cromáticas, foram detectadas diferenças, no entanto os resultados não foram conclusivos.



**keywords**

edible coatings, *Aloe vera*, chitosan, conservation, post-harvest, fruit, strawberries

**abstract**

After a fruit is harvested from its mother plant, structural, chemical, nutritional, biochemical and enzymatic changes occur, leading, ultimately, to the senescence period in which the fruit ceases to be edible.

To achieve the maintenance of fruits for a longer time, methods and technologies were developed and implemented during the last decades. The application of edible coatings on fruits is one of these methods, which creates a permeable protective barrier on the surface of the fruit, with an inhibitory effect of certain changes characteristic of the period of post-harvest.

Through this project, an *Aloe vera* and chitosan-based coating was developed and applied in strawberries. *Aloe vera* began to be studied as an edible coating recently, having few studies published, and it has never been applied before in strawberries. The use of chitosan as a coating is widely documented, with several successful applications in fresh fruits.

To achieve these objectives, several simulations were carried out, taking place at two different times. In total, the study sample consisted of 27 kg of strawberries and the parameters color, texture, mass, acidity, soluble solids, microbiological growth and infections, associated with the degenerative process of the fruit, were analyzed.

The results have shown the potential of the materials used as edible coatings on the storage of strawberries. In fact, it was possible to delay the onset of infections of fungal origin significantly, which lead to a decrease in the high rates of strawberries losses. Evidence of improvement in maintaining the textural characteristics of fruits was found, especially concerning the external and internal medium texture. This maintenance coupled with the unexpected increase in the rate of water loss shows that the action of the coatings in maintaining the texture goes beyond the control of turgor cell, thus suggesting an action on the enzymatic and/or metabolic pathways of texture degradation. The results of the quantification of soluble solids and acids showed that the materials used in coatings induced a higher consumption of organic acids and polysaccharides by strawberries, suggesting a higher energy metabolism. In terms of color changes, differences were detected, however the results were inconclusive.



## Índice

<b>Capítulo 1</b>	<b>Introdução geral e enquadramento do trabalho</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2</b>	<b>Introdução teórica</b>	<b>7</b>
2.1.	Morangos ( <i>Fragaria x ananassa</i> )	9
2.1.1.	Importância	9
2.1.2.	Origem botânica	10
2.1.3.	Morfologia	11
2.1.4.	Crescimento e maturação	12
2.1.5.	Composição química	14
2.1.6.	Alterações físico-químicas durante o período de pós-colheita	15
2.2.	Revestimentos comestíveis em frutos	19
2.2.1.	Influência dos revestimentos comestíveis na conservação de frutos	20
2.2.2.	Materiais usados como revestimentos	23
2.3.	Quitosano	25
2.3.1.	Actividades biológicas do quitosano	26
2.3.2.	Quitosano no contexto dos revestimentos comestíveis aplicados em frutos	27
2.4.	<i>Aloe vera</i>	28
2.4.1.	Composição química	29
2.4.2.	Actividades biológicas do <i>Aloe vera</i>	31
2.4.3.	<i>Aloe vera</i> no contexto dos revestimentos comestíveis aplicados em frutos	31
<b>Capítulo 3</b>	<b>Procedimento experimental</b>	<b>33</b>
3.1.	Materiais utilizados	35
3.1.1.	Morangos	35
3.1.2.	Quitosano	36
3.1.3.	<i>Aloe vera</i>	37
3.2.	Metodologia	39
3.2.1.	Formulação dos revestimentos	40
3.2.2.	Seleção dos morangos	42
3.2.3.	Aplicação dos revestimentos	42
3.2.4.	Perdas de massa e infecções	44
3.2.5.	Cor	45
3.2.6.	Textura	48
3.2.7.	Total de sólidos solúveis	51



3.2.8. Acidez titulável e pH .....	53
3.2.9. Microbiologia .....	53
3.2.10. Tratamento e apresentação de resultados.....	55
<b>Capítulo 4 Resultados e discussão.....</b>	<b>57</b>
4.1. Primeira simulação.....	59
4.1.1. Temperatura e Humidade.....	59
4.1.2. Infecções .....	60
4.1.3. Alterações mássicas.....	61
4.1.4. Total de sólidos solúveis.....	64
4.1.5. Acidez titulável .....	66
4.1.6. pH.....	68
4.1.7. Textura.....	68
4.2. Segunda simulação .....	73
4.2.1. Temperatura e Humidade.....	73
4.2.2. Infecções .....	74
4.2.3. Microbiologia .....	75
4.2.4. Alterações mássicas.....	78
4.2.5. Total de sólidos solúveis.....	80
4.2.6. Acidez titulável .....	82
4.2.7. pH.....	83
4.2.8. Cor.....	84
4.2.9. Textura.....	87
<b>Capítulo 5 Conclusões e Recomendações .....</b>	<b>93</b>
5.1. Conclusões.....	95
5.2. Sugestão para trabalhos futuros .....	96
<b>Capítulo 6 Bibliografia.....</b>	<b>97</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>107</b>



## Índice de Figuras

Figura 2.1	Morfologia de um morango. ....	12
Figura 2.2	Produção de etileno (ppt/h) em função dos dias de formação e crescimento. ....	13
Figura 2.3	Estrutura do ácido elágico. ....	15
Figura 2.4	Produção de etileno (ppt/h) em função dos dias de maturação e amadurecimento. ....	16
Figura 2.5	Estruturas moleculares da pelargonidina e da cianidina. ....	18
Figura 2.6	Componentes mais utilizados no revestimento de frutos frescos. ....	24
Figura 2.7	Estrutura da quitina. ....	25
Figura 2.8	Estrutura do quitosano. ....	25
Figura 2.9	Reacção de desacetilação da quitina. ....	26
Figura 2.10	Corte transversal de uma folha de <i>Aloe vera</i> . ....	29
Figura 2.11	Estrutura molecular da acemanana. ....	30
Figura 3.1	Campo de cultivo na zona do Pedrógão, Leiria. ....	36
Figura 3.2	Esquema representativo da ordenação da metodologia associada à primeira simulação. ....	39
Figura 3.3	Esquema representativo da ordenação da metodologia associada à segunda simulação. ....	40
Figura 3.4	Processos de imersão com agitação mecânica e de secagem. ....	43
Figura 3.5	Acondicionamento dos morangos. ....	44
Figura 3.6	Esquema representativo do modo de obtenção de imagem. ....	46
Figura 3.7	Processo de tratamento das imagens e obtenção de coordenadas. ....	47
Figura 3.8	Modelo de cor CIELAB. ....	48
Figura 3.9	Processo de preparação das amostras e perfuração com o analisador de textura. ....	49
Figura 3.10	Exemplo de um gráfico resultante da análise de textura de um morango. ....	50
Figura 3.11	Operações efectuadas pela macro. ....	51
Figura 3.12	Processo de liquidificação de morangos e centrifugação da polpa. ....	52
Figura 3.13	Refractómetro manual. ....	52
Figura 3.14	Placas de cultura de aeróbios totais (A) e de fungos e leveduras (B). ....	55
Figura 4.1	Representação gráfica da incidência infecciosa média por cuvete. ....	60
Figura 4.2	Representação gráfica da percentagem de perdas média por cuvete. ....	61
Figura 4.3	Representação gráfica da alteração percentual da massa dos morangos. ....	62
Figura 4.4	Representação gráfica da taxa de perda mássica diária. ....	63



Figura 4.5	Representação gráfica da alteração do total de sólidos solúveis durante os dias da simulação. ....	64
Figura 4.6	Representação gráfica da acidez titulável registada durante os dias da simulação. ....	66
Figura 4.7	Representação gráfica do pH registado durante os dias da simulação. ...	68
Figura 4.8	Representação gráfica dos valores médios obtidos através do cálculo da área gráfica proveniente do analisador de textura, em função dos dias da simulação. ....	69
Figura 4.9	Representação gráfica dos valores médios da força necessária à ruptura da pele dos morangos, em função dos dias da simulação.....	70
Figura 4.10	Representação gráfica dos valores médios registados através do cálculo do declive da zona linear de crescimento do pico de ruptura, em função dos dias da simulação.....	71
Figura 4.11	Representação gráfica dos valores médios da força mínima obtida na zona média interior, em função dos dias da simulação.....	72
Figura 4.12	Gráfico representativo da incidência infecciosa média por cuvete, durante os dias da simulação. ....	74
Figura 4.13	Gráfico representativo da percentagem de infeções por cuvete, durante os dias da simulação. ....	75
Figura 4.14	Gráfico representativo da média das contagens microbiológicas de organismos totais, durante os dias da simulação. ....	76
Figura 4.15	Gráfico representativo da média das contagens microbiológicas de fungos e leveduras, durante os dias da simulação.....	77
Figura 4.16	Gráfico representativo da percentagem de perdas de massa totais (incluindo os morangos infectados retirados).....	78
Figura 4.17	Gráfico representativo da percentagem de perda de massa total até ao registo de uma infeção.....	79
Figura 4.18	Representação gráfica da taxa de perda de massa diária. ....	80
Figura 4.19	Representação gráfica da alteração do total de sólidos solúveis durante os dias da simulação. ....	81
Figura 4.20	Representação gráfica das alterações registadas na acidez titulável durante os dias da simulação. ....	82
Figura 4.21	Representação gráfica das alterações registadas no pH durante os dias da simulação.....	83
Figura 4.22	Gráfico representativo da média do valor da coordenada L* obtida, em função dos dias da simulação. ....	84
Figura 4.23	Gráfico representativo da média do valor da coordenada a* obtida, em função dos dias da simulação. ....	85
Figura 4.24	Gráfico representativo da média do valor da coordenada b* obtida, em função dos dias da simulação. ....	86
Figura 4.25	Representação gráfica dos valores médios obtidos através do cálculo da área gráfica proveniente do analisador de textura, em função dos dias da simulação. ....	88



- Figura 4.26 Representação gráfica dos valores médios da força necessária à ruptura da pele dos morangos, em função dos dias da simulação..... 89
- Figura 4.27 Representação gráfica dos valores médios registados através do cálculo do declive da zona linear de crescimento do pico de ruptura, em função dos dias da simulação..... 90
- Figura 4.28 Representação gráfica dos valores médios da força mínima obtida na zona média interior, em função dos dias da simulação..... 91





## **Índice de Tabelas**

Tabela 2.1	Produção mundial de morangos em 2008 (FAO, 2010) .....	10
Tabela 2.2	Composição química do morango maduro (Salunkhe, 1995).....	14
Tabela 2.3	Composição do resíduo insolúvel em álcool obtido a partir do filete interior de <i>Aloe vera</i> (Femenia et al., 1999) .....	30





# **Capítulo 1**    Introdução geral e enquadramento do trabalho

---





Nos últimos anos observou-se uma evolução da consciência dos consumidores em relação aos benefícios do consumo de frutos frescos e ao seu impacto na saúde humana. Esta consciencialização gerou um crescente aumento do consumo de frutos frescos por parte dos consumidores, bem como uma maior exigência em relação aos padrões qualitativos dos produtos. Surgiu assim uma necessidade acrescida de uma evolução tanto ao nível da melhoria das técnicas de cultivo, como das tecnologias de conservação pós-colheita.

Os morangos (*Fragaria x ananassa*) são um dos frutos mais valorizados economicamente e populares no mundo inteiro, devido às suas características organolépticas, bem como às suas propriedades nutricionais. No entanto, estes frutos são altamente perecíveis e as suas propriedades qualitativas degradam-se muito rapidamente.

Com o objectivo de minorar este problema, o sector frutícola procurou melhorar as suas técnicas de conservação, a par com os desenvolvimentos científicos realizados na área, possibilitando a criação de técnicas que efectivamente são capazes de retardar a degradação do fruto durante o período de pós-colheita. As técnicas aplicadas passaram (i) pela melhoria das condições de armazenamento, especificamente, por uma optimização da temperatura de armazenamento e por um controlo da atmosfera circundante, tanto ao nível da composição de oxigénio e de dióxido carbono como de água; (ii) pela criação de embalagens que limitam a perda do teor de humidade e protegem contra danos físicos durante todo o período de pós-colheita. No entanto, apesar dos esforços, as perdas associadas à comercialização do morango continuam a ser preocupantes, estando principalmente associadas a infecções por parte dos fungos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus sp.*, e o seu prazo de vida continua a situar-se na ordem dos cinco dias.

A comercialização de morangos é neste momento feita à escala global. Devido à localização geográfica, nem todos os países (especialmente os nórdicos) têm a capacidade de produzir este fruto de uma forma economicamente sustentável, sendo assim necessária a sua importação de países de regiões temperadas. Esta realidade gera assim a necessidade de desenvolver tecnologias que permitam minorar a degradação das características fisiológicas dos morangos, permitindo a manutenção do fruto num estado comestível durante espaços de tempo mais alargados.



A tentativa de contornar este problema através da utilização de embalagens de atmosfera modificada, confrontou-se com várias limitações. Apesar do embalamento na presença de uma atmosfera isolada com grande concentração de dióxido de carbono permitir reduzir a incidência de podridões, regista-se uma degradação mais acentuada ao nível da coloração, do conteúdo de anti-oxidantes e do sabor.

Os revestimentos comestíveis podem constituir uma alternativa ao uso de embalagens de atmosfera modificada, visto criarem uma barreira protectora, semi-permeável a gases e a vapor de água, com vista a atingir uma preservação mais eficiente do morango no período de pós-colheita. A aplicação de revestimentos comestíveis pode ainda, em certos casos, melhorar as características organolépticas e reduzir a proliferação microbiológica ao longo do período de pós-colheita.

É neste contexto que surge o presente trabalho, cujo intuito visa avaliar as potencialidades de revestimentos comestíveis baseados em quitosano e *Aloe vera*, nas possíveis capacidades de: (i) retardar os processos fisiológicos característicos do amadurecimento do morango, (ii) ter uma acção inibitória contra a proliferação fúngica, e (iii) retardar a deterioração das características organolépticas. Complementarmente, é expectável que os materiais utilizados possuam propriedades benéficas ao nível medicinal e nutricional, proporcionando uma mais-valia no que respeita à valorização comercial do produto.

No Capítulo 2 desta tese serão descritos os fundamentos teóricos e o estado actual do conhecimento essenciais para a melhor compreensão do trabalho, visando a caracterização do morango no panorama da sua importância, evolução botânica, morfologia, modificações associadas ao processo de maturação, composição química e alterações físico-químicas associadas ao período de pós-colheita (Secção 2.1). Na Secção 2.2 far-se-á uma abordagem introdutória aos revestimentos comestíveis aplicados em frutos frescos, às suas propriedades conservativas e aos materiais habitualmente usados na sua formulação. Nas Secções 2.3 e 2.4 apresentar-se-á uma caracterização dos revestimentos estudados no presente trabalho, o quitosano e o *Aloe vera*, respectivamente, no que respeita às actividades biológicas associadas a cada material e às potencialidades da sua aplicação em frutos frescos.

No Capítulo 3, serão descritos os aspectos envolventes à planificação, preparação e execução do trabalho experimental, apresentando uma descrição dos factores



inerentes à escolha dos materiais utilizados (Secção 3.1) e uma caracterização dos métodos de análise associados ao procedimento experimental (Secção 3.2).

Os resultados do trabalho experimental serão apresentados e discutidos no Capítulo 4. Por fim, no Capítulo 5, será apresentada a síntese conclusiva deste trabalho, bem como sugestões para análises futuras, no âmbito da temática analisada.



## **Capítulo 2** Introdução teórica

---







## **2.1. Morangos (*Fragaria x ananassa*)**

### **2.1.1. Importância**

O morango é uma das frutas mais apreciadas pelos consumidores em várias regiões do mundo graças à sua coloração, aroma, sabor delicado, valor nutricional e versatilidade na culinária e gastronomia. O fruto é especialmente consumido em fresco, sendo contudo também usado na produção de enlatados, compotas, sumos e corantes.

A produção mundial de morangos foi estimada, em 2008, em aproximadamente 4,1 milhões de toneladas de frutos frescos. O maior produtor, a nível mundial, são os Estados Unidos da América, contribuindo com cerca de 28% da produção mundial. Na Europa a produção total representa cerca de 35% da produção mundial. Como pode ser observado na Tabela 2.1, Espanha, Turquia e Polónia são os países com maior peso na produção europeia (FAO, 2010).

Em Portugal o morango tem pouco peso na produção total de frutos frescos, encontrando-se na 19ª posição da lista de frutos mais produzidos no país, com cerca de 0,16% do total de fruta produzida em 2008. Relativamente à produção europeia no ano de 2008, Portugal contribuiu com apenas 0,2% da totalidade de morangos produzidos (FAO, 2010). O preço médio pago ao produtor, em Portugal, em 2008, foi de 286€/100Kg, tornando-se assim no fruto mais valorizado de todas as culturas frutícolas produzidas no nosso país (INE, 2009).

As regiões com maior peso na produção nacional são o Algarve, o Alentejo (morango precoce: Janeiro a Abril e Setembro a Novembro), o Ribatejo e o Oeste (produção de primavera: Abril a Junho). A Beira Litoral e Trás-os-Montes, apesar de menos representativas, são extremamente importantes, visto apresentarem uma calendarização mais tardia. Os métodos de cultura variam entre regiões, com vista a uma adaptação mais eficiente a cada clima, no entanto, os morangos são predominantemente cultivados ao ar livre, em estufas, em cultura protegida e em cultura sob coberto (OMAI, 2009).



**Tabela 2.1** | Produção mundial de morangos em 2008 (FAO, 2010)

Ranking	Países	Produção em 2008 (toneladas)
1	Estados Unidos da América	1148405
2	Espanha	267500
3	Turquia	261078
4	México	207485
5	Coreia do Sul	203227
6	Polónia	200723
7	Egipto	200254
8	Japão	190700
9	Itália	155583
10	Alemanha	150854
11	Rússia	145000
12	Marrocos	130000
13	Reino Unido	87200
14	Ucrânia	52900
15	Bielorrússia	50400
16	Colômbia	43920
17	França	43541
18	Holanda	41000
19	Chile	40000
19	Bélgica	40000
54	Portugal	2600
	Total mundial	4077910

Em Portugal, a produção e comercialização do morango efectua-se durante todo o ano, graças à utilização de cultivares com produções escalonadas e à importação. As duas principais épocas de cultivo situam-se nos intervalos de Abril a Junho e de Setembro a Novembro.

A importação de morango é bastante significativa no nosso país e concentra-se no pico de produção espanhola, de Fevereiro a Maio. A exportação, apesar de ser ainda modesta, vem sofrendo nos últimos anos um crescente aumento (INE, 2009). Os países nórdicos, Reino Unido, França e Holanda, são mercados nos quais o morango português regista cada vez mais aceitação.

### 2.1.2. Origem botânica

O primeiro registo histórico em que há referência aos morangos, remonta ao período dos Romanos, altura em que Virgil (70 a 19 a.C.) escreveu "*huminascentia fraga*" (Morangos filhos da terra), na sua terceira égloga, com a intenção de advertir as crianças para o perigo das serpentes, aquando da apanha de morangos selvagens.



Virgil indica assim que os morangos não eram cultivados durante o seu tempo (Folta e Gardiner, 2009).

O primeiro morango domesticado a ser cultivado foi o *Fragaria vesca*, mais conhecido como *fraise de bois*, que no século XIII já era cultivado ao longo da Europa. O pico de produção deste género de morango aconteceu entre o século XV e XVI, antes da introdução de espécies provenientes do Novo Mundo. *F. Moschata* também era uma espécie popular durante este período, sendo o seu fruto bastante apreciado pelos Ingleses (Darrow, 1967).

A primeira espécie proveniente do novo mundo, a *F. virginiana*, chegou à Europa no século XVI, pela mão de Jacques Cartier. Proveniente do Canadá e da Virgínia, esta espécie encontrava-se no estado selvagem, visto não ser cultivada pelos aborígenes Norte Americanos. Esta espécie tornou-se rapidamente popular e começou a substituir a *Fragaria vesca* nos campos de cultivo europeus (Folta e Gardiner, 2009).

Em 1714, aconteceu o mais importante evento da história dos morangos modernos, o espião francês, Amédée Frézier, transportou para França de uma missão no Chile, uma nova espécie, a *Fragaria chiloensis*, cultivada pelos índios chilenos durante vários séculos, que possuía uma característica desconhecida nas espécies europeias, um grande tamanho. E foi em França que Duchesne consumou o cruzamento e criou a base da maioria das espécies cultivadas actualmente, o híbrido *F. chiloensis* × *F. virginiana*, posteriormente designado de *F. ananassa* devido a ter aroma a ananás (Darrow, 1967).

Actualmente, a variedade *F. ananassa* é a dominante do cultivo mundial de morango. A *F. vesca* actualmente é apenas cultivada em pequenos jardins, sendo considerada uma delicadeza, devido ao seu pequeno porte e às suas propriedades aromáticas. A *F. chiloensis* é cultivada ainda no Chile, mas a sua produção é pouco significativa. As variedades *F. virginiana* e *F. moschata* não possuem valor comercial (Folta e Gardiner, 2009).

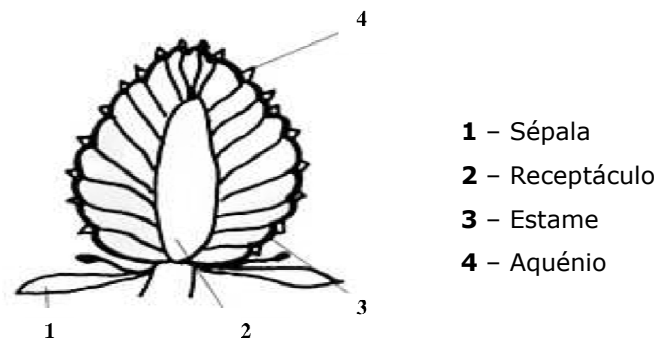
### **2.1.3. Morfologia**

O morangueiro, *Fragaria spp*, é uma planta da ordem *Rosales*, família *Rosaceae*, subfamília *Rosidaeae*, e género *Fragaria L.* Há mais de 20 espécies do género *Fragaria*



com o nome comum de morangueiro, com ampla distribuição nas zonas temperadas e subtropicais, e que se distinguem pelo grau de poliploidia que exibem (Darrow, 1967). De modo geral, as espécies de morangueiro com mais cromossomas tendem a ser mais robustas e maiores, produzindo também, em geral, frutos de maior tamanho.

A planta é herbácea, dicotiledónea perene, com caule semi-subterrâneo que apresenta um tecido condutor periférico em espiral, em ambos os sentidos, unido às folhas. As folhas são alternadas, dispostas helicoidalmente, compostas, com forma e cor variando conforme o cultivar. As folhas possuem entre 300 a 400 estomas/mm<sup>2</sup>, um número bastante elevado, fazendo com que a planta seja muito sensível à falta de água, a baixa humidade relativa no ar ambiente, a altas temperaturas e a exposições solares de grande intensidade e duração (Pineli, 2009). O sistema radicular é fasciculado, constituído por numerosas raízes superficiais. As flores são hermafroditas e estão agrupadas em inflorescências com número variável de flores. As pétalas são livres, brancas ou avermelhadas, dispostas em redor do receptáculo (glabro), o qual, após a fecundação, se torna no morango (Figura 2.1).



**Figura 2.1** | Morfologia de um morango (Hennion, 1997).

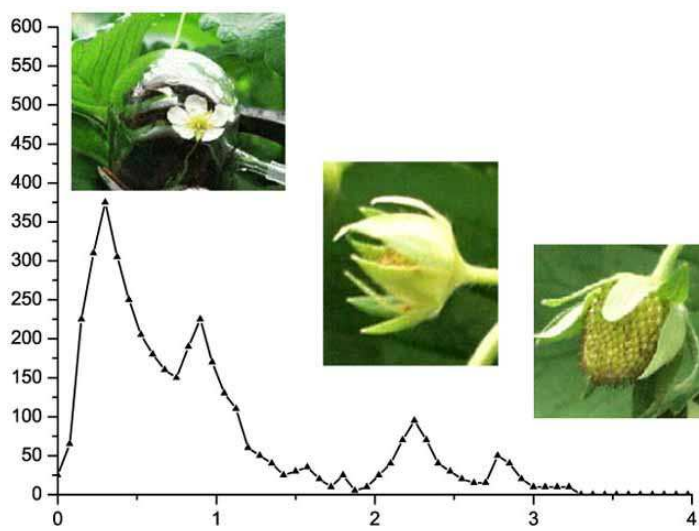
A parte carnuda, suculenta, com cor avermelhada, chamada de morango, na verdade não é um verdadeiro fruto. Os verdadeiros frutos (aquênios) são os pequenos pontos amarelos, que compõem a superfície em grande quantidade (Azevedo, 2007).

#### **2.1.4. Crescimento e maturação**

Os morangos crescem rapidamente, atingindo o tamanho máximo entre 60 a 80 dias após o plantio ou cerca de 30 dias após a antese (altura em que a flor se encontra totalmente aberta e funcional). A cinética de crescimento pode apresentar uma ou duas fases, com diferentes velocidades, dependendo do cultivar utilizado, e é



controlada pela libertação de hormonas, particularmente a auxina e o etileno (Figura 2.2) (Seymour et al., 1993). O tamanho dos frutos é condicionado pela posição em que se encontram na inflorescência, sendo maiores os morangos que se encontram na posição primária, relegando os que se encontram em posições secundárias para tamanhos inferiores.



**Figura 2.2** | Produção de etileno (ppt/h) em função dos dias de formação e crescimento (URL#1).

O tempo de maturação está compreendido entre 20 a 60 dias após o fruto atingir o seu tamanho máximo, variando proporcionalmente com a temperatura, reflectindo o seu efeito sobre a taxa metabólica e actividade enzimática.

Durante o período de maturação dão-se grandes alterações organolépticas. A cor é o parâmetro onde as alterações são mais evidentes: No início do período de maturação o fruto apresenta cor verde e, sofrendo uma descoloração ao longo do tempo, torna-se branco aproximadamente 20 dias após a antese. Rapidamente o fruto se transforma, apresentando cor rosa e atingindo uma tonalidade vermelha escura cerca de 10 dias depois (Seymour et al., 1993). No que respeita à textura, este parâmetro apresenta uma velocidade de amolecimento bastante lenta, excepto no intervalo de tempo em que o morango passa da cor branca para rosa. A degradação da textura durante este período está relacionada com a degradação das pectinas, solubilizadas pela acção de enzimas endógenas (poligalacturonases e pectina-metilesterases) (Azodanlou et al., 2004).



### 2.1.5. Composição química

Na Tabela 2.2 apresenta-se a composição química do morango maduro. Consoante a variedade da planta, o estado de maturação, o método de cultivo, e as condições ambientais durante os períodos de colheita e pós-colheita, os frutos apresentam heterogeneidade na sua constituição, pelo que os valores apresentados nesta Tabela devem ser considerados como valores de referência.

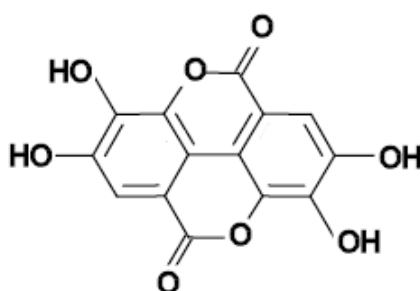
**Tabela 2.2** | Composição química do morango maduro (Salunkhe, 1995)

Constituinte	Valor
Água (%)	89,9
Hidratos de carbono (%)	8,4
Proteína (%)	0,7
Gordura (%)	0,5
Minerais (mg/100 g)	
Cálcio	22
Fósforo	23
Potássio	161
Magnésio	11,7
Sódio	1,5
Ferro	1
Vitaminas (mg/100 g)	
Vitamina C	89
Vitamina A	60
Niacida	0,6
Caroteno	0,15
Tiamina	0,03
Riboflavina	0,027

Os hidratos de carbono constituem o maior componente solúvel do morango, representando cerca de 8,4% da massa total do fruto, sendo constituídos na sua maioria por açúcares redutores (Salunkhe, 1995). Estão incluídos neste grupo os polissacarídeos, constituintes da parede celular, e os açúcares solúveis, constituídos na sua grande parte (99%) por frutose e glucose, em quantidades menos elevadas por sacarose, e com o xilitol, o sorbitol e a xilose a estarem presentes em quantidades vestigiais (Seymour et al., 1993, Sturm et al., 2003). A constituição de açúcares presentes no morango contribui de uma forma inequívoca para a construção do perfil sensorial associado ao sabor adocicado, característico do morango, e é correlacionada com a quantidade de sólidos solúveis presentes na polpa. Para o morango possuir um perfil sensorial correcto ao nível do sabor, é necessário que ele possua no mínimo 7% de sólidos solúveis totais (Azevedo, 2007).



Depois dos açúcares, os ácidos orgânicos são aqueles que mais contribuem para o teor de sólidos solúveis, contribuindo de forma significativa para o sabor característico do morango. O ácido cítrico é o predominante, com um teor de aproximadamente 90% da constituição total de ácidos, sendo seguido pelo ácido málico, e estando presentes os ácidos isocítrico, succínico, oxalacético, glicérico e glicólico, em quantidades mais diminutas (Sturm et al., 2003). Para além destes, os morangos são especialmente ricos em ácido elágico (Figura 2.3), um derivado do ácido gálico que possui algumas propriedades de compostos fenólicos e é visto actualmente como um antimutagénico e anticarcinogénico altamente eficiente (Maas et al., 1991, Maatta-Riihinen et al., 2004, Strati et al., 2009).



**Figura 2.3** | Estrutura do ácido elágico (URL#2).

As proteínas, os minerais e as vitaminas são compostos minoritários no morango, estando presentes em quantidades inferiores a 2%. A vitamina C é a vitamina com maior relevância neste fruto, juntamente com o  $\beta$ -caroteno, a tiamina, a riboflavina e a niacina, que apesar de se encontrarem em pequena quantidade comparativamente com a vitamina C, representam uma componente de grande importância do ponto de vista nutricional.

#### **2.1.6. Alterações físico-químicas durante o período de pós-colheita**

O período de pós-colheita inicia-se quando o morango, já maduro, que até então se encontrava a realizar fotossíntese e a receber nutrientes da planta mãe, é separado desta, iniciando um processo de alterações ao nível estrutural, químico, nutricional, bioquímico e enzimático, até entrar na fase de senescência, em que o fruto deixa de ser comestível. Durante o período de pós-colheita acontecem alterações degradativas, como o colapso da clorofila, hidrólise do amido, alterações na composição e estrutura da parede celular, e alterações construtivas como a formação de pigmentos (carotenóides, antocianinas, etc.), voláteis aromáticos e hormonas (Azodanlou et al., 2004, Rahman, 1999).

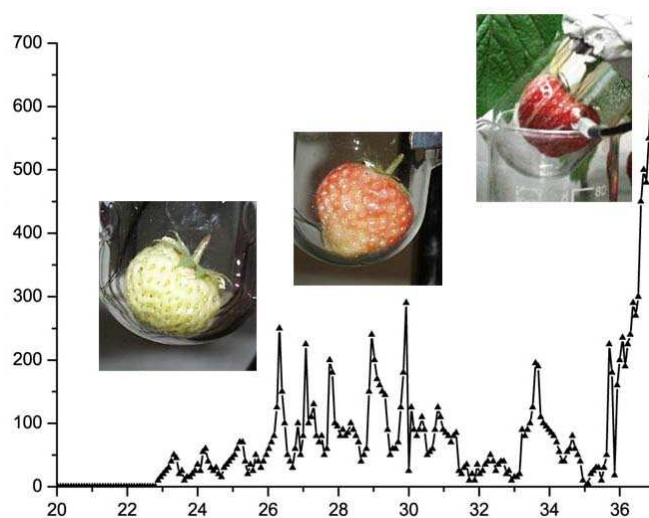




Nos subcapítulos seguintes, serão analisadas com maior detalhe algumas destas alterações.

### 2.1.6.1. Respiração e regulação hormonal

Os morangos são classificados classicamente como frutos não climatéricos, devido à sua diminuta produção de etileno e ao facto da sua respiração diminuir no decurso do processo de amadurecimento (Rahman, 1999). No entanto, estudos recentes mostram que a respiração e vários processos metabólicos associados ao processo de amadurecimento estão directamente relacionados com a produção de etileno, sugerindo assim que o morango possui características de um fruto climatérico (Iannetta et al., 2006). Como se pode observar na Figura 2.4, a produção de etileno varia consideravelmente durante o processo de amadurecimento. No entanto, a hormona com maior importância na regulação das diferentes fases do morango é a auxina e é libertada pelos aquénios desde a fase inicial de desenvolvimento do fruto (Griesser et al., 2008).



**Figura 2.4** | Produção de etileno (ppt/h) em função dos dias de maturação e amadurecimento (URL#1).

Durante o amadurecimento, em função da fase em que se encontra o fruto, é necessária a síntese de novas proteínas e mRNA, bem como de novos pigmentos e compostos aromáticos, logo, é necessário ter tanto fontes de energia, como fontes de carbono. Assim se justifica que, durante as várias fases de desenvolvimento do morango, ocorra uma contínua oscilação da taxa de respiração por parte dos frutos. Os dois maiores substratos utilizados na respiração, os açúcares e os ácidos orgânicos, encontram-se sequestrados no interior dos vacúolos, de modo a estarem disponíveis



para serem libertados quando são necessários na produção de energia. As vias energéticas usadas pelo morango são comuns a todos os tecidos vegetais, e são nomeadamente a glicólise, a via das pentoses-fosfato e o ciclo de Krebs. Uma das alterações mais notadas no morango, como consequência da respiração, é a grande diminuição da quantidade ácido málico e, em menor quantidade, do ácido cítrico, reflectindo-se numa diminuição da acidez do fruto ao longo do processo de amadurecimento (Seymour et al., 1993).

#### **2.1.6.2. Textura**

O morango é um fruto particularmente sensível a alterações na textura, representando este parâmetro um importante factor qualitativo, aquando da avaliação por parte do consumidor. Estas alterações devem-se essencialmente a quatro mecanismos degradativos da estrutura celular: perda de turgor (associado à transpiração), degradação do amido, efeito de espécies reactivas de oxigénio sobre a parede celular e, o mais significativo, efeito de enzimas degradativas da parede celular (Cheng et al., 2008, Figueroa et al., 2010, Seymour et al., 1993).

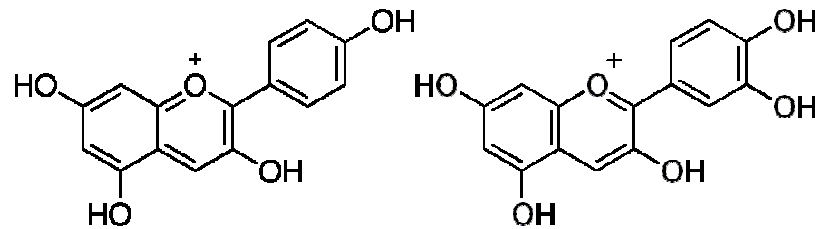
As alterações na parede celular do morango estão sobretudo associadas à solubilização e despolimerização de pectina e, menos significativamente, associadas à degradação de hemicelulose (Koh e Melton, 2002). Os agentes que intervêm nas alterações das pectinas são essencialmente duas enzimas pectinolíticas, a poligalacturonase e pectinametilesterase (Seymour et al., 1993), associadas à acção de enzimas ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase, etc.) que removem açúcares neutros das pectinas e assim permitem expor os polímeros à acção das enzimas pectinolíticas (Figueroa et al., 2010).

#### **2.1.6.3. Cor**

A característica mais importante dos morangos, no que respeita à sua avaliação, na fase pré-consumo, por parte do consumidor, é a sua cor. Os pigmentos de antocianinas são os compostos mais relevantes para a formação da cor característica do morango, sendo estes flavonóides derivados de metabolitos de fenilpropanoide (Seymour et al., 1993). As antocianinas mais abundantes na superfície do morango são as pelargonidinas (pigmento predominante com a tonalidade vermelho claro) e as cianidinas (pigmentos minoritários com a tonalidade vermelho escuro), cujas



estruturas moleculares estão representadas na Figura 2.5. Outros flavonóides também contribuem para a tonalidade do fruto e são classificados como copigmentos, sendo a quercetina e o caempferol os mais abundantes no morango. Estas substâncias, para além do efeito cromático, são potentes antioxidantes e contribuem de forma fulcral para a resistência do fruto a ataques de microrganismos patogénicos (Halbwirth et al., 2006).



**Figura 2.5** | Estruturas moleculares da pelargonidina e da cianidina (URL#3, URL#4).

As principais enzimas responsáveis pela acumulação das antocianinas, e subsequentemente responsáveis pela alteração da cor durante o processo de amadurecimento, são a fenilalanina amónia liase e a uridina difosfato glicuronosil transferase (Seymour et al., 1993).

#### 2.1.6.4. Sabor e aroma

O sabor do morango é originado primordialmente pelos açúcares e pelos ácidos orgânicos presentes na sua constituição, como já foi descrito anteriormente. No entanto, os compostos fenólicos contribuem também para completar o perfil sensorial associado ao sabor característico. O conteúdo em compostos fenólicos (polifenóis, proantocianidinas e ésteres de ácido hidroxibenzóico e de ácido hidroxicinâmico) é normalmente correlacionado com o sabor adstringente, resultante da sua interacção com proteínas e mucopolissacarídeos presentes na saliva. No entanto, os morangos vão perdendo a sua adstringência à medida que vão amadurecendo, não pela perda do seu conteúdo em compostos fenólicos, mas sim pela sua interacção com pectinas solubilizadas (Seymour et al., 1993).

O aroma é resultado de uma composição bastante complexa de compostos voláteis e, apesar de já mais de duzentas substâncias terem sido identificadas, a compreensão da sua contribuição para o aroma sentido é ainda escassa (Seymour et al., 1993). No entanto, sabe-se que um dos principais voláteis associados ao aroma do morango é o furaneol, sendo este biossintetizado a partir de açúcares, provavelmente por acção de



enzimas (Azodanlou et al., 2004). Os ésteres, particularmente o acetato de metilo e o butanoato de metilo, foram também identificados como importantes contribuidores do aroma, sendo provavelmente resultantes de reacções químicas não enzimáticas, em que os ácidos gordos são intervenientes (Azodanlou et al., 2004). Os álcoois têm também um papel interveniente na formação do aroma (Azodanlou et al., 2004).

## **2.2. Revestimentos comestíveis em frutos**

Nas últimas décadas verificou-se um grande aumento do consumo de frutos frescos nos países desenvolvidos. Esta mudança de comportamento está fortemente relacionada, por um lado, com os avanços na agricultura, permitindo uma maior produção e preços mais acessíveis, por outro, com a procura do consumidor, que está cada vez mais consciente da importância dos frutos frescos numa alimentação saudável. Acompanhando esta tendência, a exigência e a expectativa do consumidor perante os frutos também aumentou, havendo uma necessidade de melhorar, de dia para dia, aspectos relacionados com a qualidade organoléptica e nutricional, segurança alimentar, e de aumentar a duração da vida útil do fruto. No entanto, apesar dos esforços de toda a comunidade científica e empresarial, a taxa de perdas neste sector atinge valores alarmantes, que variam dos 20% aos 80% (Krochta et al., 1994).

Um dos métodos que surgiram com o objectivo de minorar este problema foi a utilização de revestimentos comestíveis. Este método consiste na aplicação de materiais comestíveis na superfície dos frutos, que criam uma barreira protectora semipermeável, com o intuito de minorar a degradação de aspectos qualitativos característicos dos frutos no período de pós-colheita e diminuir as taxas de perda.

Na verdade, estima-se que já no século XII, no Império Chinês, eram aplicadas ceras na superfície de citrinos com o intuito de diminuir as perdas de água dos frutos. No entanto, foi apenas em 1940 que um cientista americano chamado Claypool publicou o primeiro artigo referente à aplicação de ceras em frutos, como revestimento preservativo (Embuscado e Huber, 2009). Daí em diante foram-se multiplicando os interessados na matéria, atingindo este tema grande popularidade na comunidade científica nos últimos 20 anos, criando assim condições para se registarem maiores desenvolvimentos científicos na área.



### **2.2.1. Influência dos revestimentos comestíveis na conservação de frutos**

Criar um revestimento comestível eficiente passa por respeitar o equilíbrio do metabolismo do fruto com o conjunto de interações que o revestimento vai ter para com a sua fisiologia. De um modo geral, o objectivo passa por melhorar a saúde do fruto no seu todo, pois cada característica qualitativa está intimamente ligada a uma infinidade de interdependências com o conjunto total.

Nas secções seguintes (2.2.1.1 a 2.2.1.6) irá analisar-se o papel dos revestimentos comestíveis na conservação de frutos, em particular no que respeita a cada característica fisiológica ou processo biológico associado à qualidade dos mesmos. Tentar-se-á descrever, de uma forma simplificada, as interações conhecidas entre revestimentos comestíveis e a respiração do fruto, os parâmetros perda de água, textura, cor, sabor e aroma, e a microbiologia associada ao processo degenerativo dos frutos.

#### **2.2.1.1. Respiração**

Reduzir a respiração é um dos principais objectivos da aplicação de revestimentos comestíveis em frutos, visto influenciar prioritariamente todas as alterações do fruto, durante o período de pós-colheita.

No entanto, a redução deste processo biológico não pode ser excessiva, pois, quando o revestimento apresenta uma permeabilidade demasiado baixa à troca gasosa, o fruto desenvolve uma respiração anaeróbia, provocando reacções secundárias que induzem a uma senescência acentuada e à produção de sabores e aromas estranhos ao perfil sensorial característico (Bai et al., 2003). Estas alterações são fruto da modificação da atmosfera interna e da retenção de compostos voláteis. Quando a troca de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> do fruto com o ar ambiente é restringida em demasia, gera uma sintetização de metabolitos secundários resultantes da respiração anaeróbia, como o acetato de etilo, e a retenção de compostos voláteis, como o etanol e o acetaldeído (Almenar et al., 2009).

Contudo, vários estudos (Baldwin et al., 1999, Certel et al., 2004, Dang et al., 2008) comprovam que é possível criar revestimentos que, para além de diminuírem a troca gasosa sem gerarem respiração anaeróbia, podem melhorar o sabor do fruto,



restringindo a saída de compostos orgânicos voláteis responsáveis pelo aroma característico. O sucesso da aplicação prende-se, então, com a selecção de revestimentos apropriados, que respeitem o equilíbrio gasoso da atmosfera interna do fruto (Park, 1999).

#### **2.2.1.2. Perda de água**

A evaporação de água é uma consequência inerente à manutenção dos processos biológicos durante a vida do fruto. Este fenómeno induz alterações na textura, nomeadamente no que respeita à rigidez celular, visto ser a água responsável pelo turgor celular nas células vegetais (Embuscado e Huber, 2009), por outro lado, a degradação da estrutura celular que ocorre com o amadurecimento origina a diminuição da capacidade de retenção de água por parte do fruto.

Quando se escolhe um revestimento com o objectivo prioritário de diminuir a perda de água, é importante ter em conta que, quanto maior a hidrofobicidade do material usado, maior a sua capacidade em diminuir a saída de vapor de água. Assim, gorduras, ceras e ácidos gordos são exemplos de revestimentos pouco permeáveis ao vapor de água.

A capacidade dos revestimentos funcionarem como barreira contra a evaporação da água está dependente das condições de armazenamento. Com o aumento da temperatura e da humidade relativa do ambiente envolvente, a permeabilidade do revestimento ao vapor de água também aumenta (Olivas e Barbosa-Canovas, 2005), facto que deve ser tido em conta na escolha do método (ou combinação de métodos) de conservação mais adequados a cada caso específico.

#### **2.2.1.3. Textura**

A preservação da textura depende em grande parte da troca gasosa que ocorre durante a respiração, factor preponderante no processo metabólico subjacente ao amadurecimento dos frutos, que induz alterações na parede celular, lamela média e membrana celular (Olivas e Barbosa-Canovas, 2005).

A evaporação de água é outro factor de extrema importância quando se fala da textura de frutos, visto ter um peso importante na manutenção da rigidez celular,



através do turgor exercido pela água no interior dos vacúolos. Ao funcionarem como barreira contra a evaporação da água, os revestimentos comestíveis estão, portanto, a ter um papel importante na preservação da textura dos frutos.

Outra propriedade preservativa dos revestimentos prende-se com a possibilidade de estes conterem substâncias que funcionam como promotores, por um lado, da manutenção da estrutura celular, criando uma maior coesão entre as células, por vezes associada à capacidade de criar interações com pectinas (Sams, 1999), por outro, da redução de actividade enzimática responsável pela degradação de pectinas (Valverde et al., 2005).

#### **2.2.1.4. Cor**

Um dos atributos qualitativos mais importantes dos frutos, no que diz respeito à selecção sensorial do consumidor, é a cor. Um fruto que possua uma coloração desajustada com o perfil sensorial comum, irá sofrer uma grande desvalorização comercial. Estudos demonstram que a formulação de um revestimento adequado ao fruto pode melhorar a sua aparência (Dang et al., 2008, Valverde et al., 2005), devido provavelmente à retenção de maior quantidade de compostos antioxidantes e pela interferência na bioactividade de enzimas responsáveis pela biodegradação de pigmentos.

#### **2.2.1.5. Sabor e aroma**

Os atributos mais importantes na avaliação da qualidade do fruto são, provavelmente, o sabor e o aroma. Quando um consumidor compra um fruto não avalia estas propriedades, baseia-se apenas na aparência, no entanto, se o sabor não corresponder ao esperado, provavelmente o consumidor não o voltará a comprar.

Os revestimentos podem contribuir para melhorar o sabor e o aroma a partir de dois mecanismos de acção, a retenção de voláteis aromáticos característicos do fruto e como um encapsulador de sabores e aromas adicionados (Embuscado e Huber, 2009). No entanto, e como já referido na secção 2.2.1.1, quando o revestimento tem propriedades difusivas demasiado restritivas no que diz respeito à troca gasosa, origina a produção de metabolitos fermentativos (Almenar et al., 2009) que causam sabores desagradáveis, de uma forma directa ou indirecta (precursores). Por outro



lado, as propriedades difusivas relativamente aos compostos voláteis também são extremamente importantes, visto que uma acumulação anormal de voláteis naturais do metabolismo normal do fruto pode alterar o seu perfil de sabor característico (Almenar et al., 2009). Por último, também é possível que substâncias presentes no revestimento reajam entre elas ou com constituintes do fruto, interagindo negativamente com aspectos fisiológicos do processo normal de detecção sensorial humano (Vargas et al., 2006).

#### **2.2.1.6. Microbiologia**

A inibição de crescimento microbiológico, associado ao processo degenerativo dos frutos, é mais uma das propriedades possíveis de induzir através da aplicação de revestimentos comestíveis, especialmente importante no caso de frutos que apresentam elevada perecibilidade face a contaminações de origem fúngica ou bacteriológica. Esta propriedade pode ser inculcada tanto pela incorporação de aditivos com efeito antimicrobiano na matriz de revestimento, como pelo efeito do próprio material polimérico usado na base do revestimento.

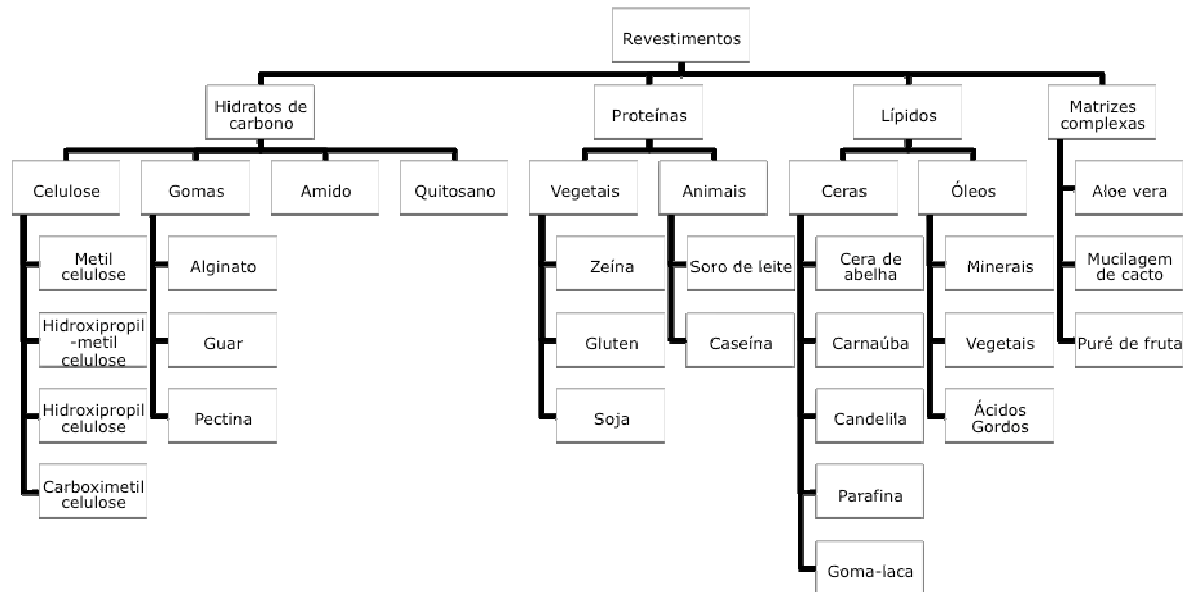
Geralmente, o princípio de acção baseia-se em três mecanismos: (i) diminuição da actividade da água na superfície do fruto, (ii) reacções de substâncias sobre a estrutura funcional do microrganismo, e (iii) a própria estimulação de respostas imunitárias por parte do fruto (Devlieghere et al., 2004).

É importante ressaltar que, para além dos atributos bioactivos dos materiais usados na composição do revestimento, quando se pretende obter um revestimento eficiente contra microrganismos é importante ter em conta o método de obtenção do material (alterações consequentes do processo de fabrico), o pH do revestimento, bem como as condições de armazenamento (humidade relativa e composição gasosa) e acondicionamento (Embuscado e Huber, 2009).

#### **2.2.2. Materiais usados como revestimentos**

A composição dos revestimentos comestíveis aplicados a frutos frescos baseia-se em hidrocolóides, como polissacarídeos e proteínas, ou em compostos hidrofóbicos, como os lípidos. A Figura 2.6 apresenta os tipos de componentes mais utilizados para revestir frutos frescos.





**Figura 2.6** | Componentes mais utilizados no revestimento de frutos frescos.

A dificuldade dos polissacarídeos (compostos usados que apresentam normalmente maior actividade benéfica) serem boas barreiras contra a evaporação da água, gerou a necessidade de criar revestimentos com partículas hidrofóbicas contidas numa matriz hidrofílica, os revestimentos compostos (Krochta et al., 1994). No entanto, a baixa permeabilidade dos lípidos pode ser vista como um problema quando o fruto apresenta uma elevada taxa de respiração e uma produção elevada de compostos voláteis. Assim, de modo a suprimir este problema, surge a necessidade de criar novos revestimentos não lipídicos, compostos por elementos que apresentem mecanismos de acção complementares.

Para além dos materiais usados como base na estrutura do revestimento, vários aditivos podem ser aplicados com múltiplas finalidades, destacando-se os compostos anti-escurecimento, agentes anti-microbianos, potenciadores texturais, nutrientes, probióticos, plastificantes e sabores (Embuscado e Huber, 2009).

### 2.3. Quitosano

O quitosano é um dos polissacarídeos mais utilizados em filmes e revestimentos para aplicação agro-alimentar e foi um dos componentes dos revestimentos estudados nesta tese.

A quitina, poli[ $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glucopirranose] (Figura 2.7), é, a seguir à celulose, o polissacarídeo mais abundante no planeta, disponível na Natureza na ordem das 10 gigatoneladas/ano (Embuscado e Huber, 2009, Prashanth e Tharanathan, 2007). Encontra-se na Natureza como o componente orgânico maioritário da estrutura esquelética de invertebrados, estando também presente na parede celular de alguns fungos (*Aspergillus Níger*, *Mucorrouxii*, *Penicillumnotatum*) e algas (diatomáceas) (Almenar et al., 2009, Pinto, 2005). A nível industrial é obtida, essencialmente, a partir de restos de crustáceos (cascas de camarões, caranguejos, lagostins, etc.), visto serem subprodutos da indústria pesqueira, produzidos em grande quantidade e com pouco valor económico associado (Santos, 2006). A extracção da quitina a partir desta fonte, presente entre os 20% a 30% da constituição da matéria prima, é obtida por três passos: a remoção de proteínas (30% a 40%), a desmineralização (30% a 50%) e a despigmentação (quantidade irrisória) (Carneiro, 2009, Pinto, 2005).

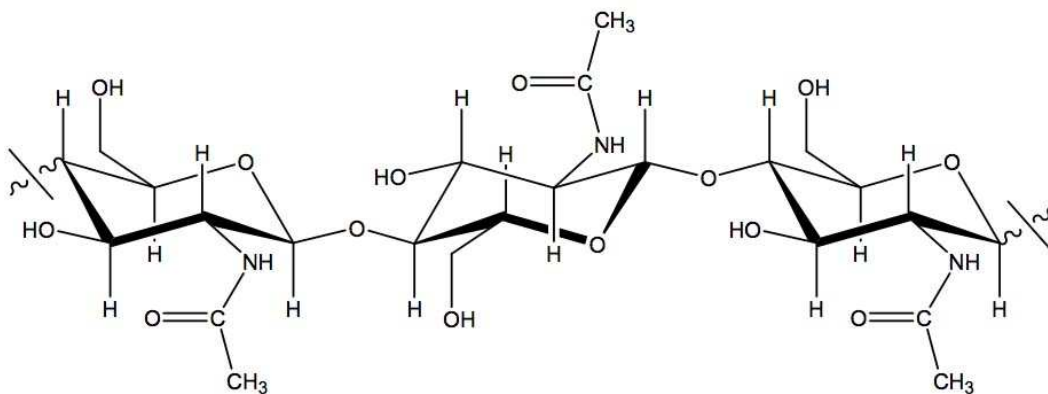


Figura 2.7 | Estrutura da quitina (Pinto, 2005).

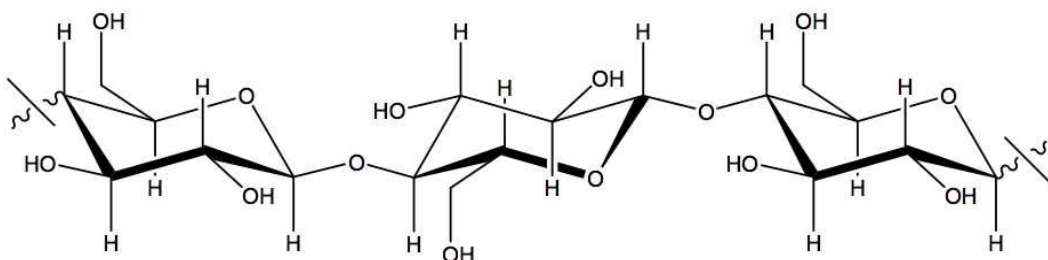
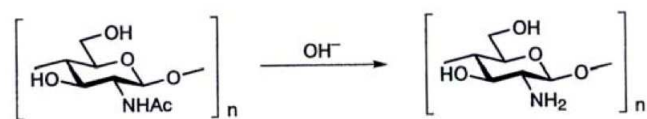


Figura 2.8 | Estrutura do quitosano (Pinto, 2005).



O quitosano, poli[ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose] (Figura 2.8), é obtido normalmente a partir de uma reacção de desacetilação parcial da quitina (Figura 2.9), por hidrólise dos grupos acetamida, com soluções básicas muito concentradas (NaOH ou KOH, 40 a 50%) e a temperaturas superiores a 60 °C (Pinto, 2005). Em função da variação da concentração da base e das temperaturas usadas no processo de derivatização, é possível obter quitosano com diferentes graus de acetilação e diferentes massas moleculares, sendo estes factores extremamente importantes no que diz respeito às suas propriedades funcionais. Tipicamente, o grau de desacetilação do quitosano comercial é de aproximadamente 85% (Embuscado e Huber, 2009).



**Figura 2.9** | Reacção de desacetilação da quitina (Santos, 2006).

Em solução, o quitosano forma agregados micelares de segmentos de polissacarídeos totalmente acetilados, interligados por blocos de polissacarídeos totalmente desacetilados, esticados por forças de repulsão electrostática (Embuscado e Huber, 2009). O quitosano é insolúvel em água a pH neutro; contudo, devido à protonação dos grupos amina, é possível solubilizá-lo em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como ácido acético, láctico, fórmico e cítrico, e em ácidos inorgânicos diluídos, como o ácido clorídrico, nítrico e perclórico (Romanazzi et al., 2009). O seu pKa situa-se entre 6,3 e 7,0, variando em função do grau de acetilação. Isto deve-se ao facto de, quanto maior a quantidade de grupos amina protonados na cadeia do polissacarídeo, maior o numero de interacções electrostáticas repulsivas entre as cadeias, influenciando assim a capacidade de dissolução. É importante não esquecer que a massa molecular (normalmente entre os 100 e os 1200 kDa) tem, no que diz respeito à solubilidade e às propriedades reológicas, um papel importante, visto o tamanho da cadeia polimérica influenciar o conjunto de interacções que ocorrem entre as cadeias e, consequentemente, a sua solubilidade, bem como a sua viscosidade (Pinto, 2005, Santos, 2006).

### 2.3.1. Actividades biológicas do quitosano

O quitosano é considerado não tóxico, não alergénico, biodegradável, biofuncional e biocompatível (Aider, 2010, Senel e McClure, 2004). As suas actividades biológicas



compreendem uma grande gama de acção, destacando-se propriedades anti-diabéticas, anti-colesterolémicas (Yao et al., 2008), anti-microbianas (Campaniello et al., 2008), anti-oxidantes (Anraku et al., 2009), anti-cancerígenas (Huang et al., 2006), anti-inflamatórias (Yang et al., 2010) e promotoras da absorção de cálcio e ferro (Liao et al., 2007).

As potenciais aplicações do quitosano estendem-se muito para além da conservação alimentar, estando no presente a serem desenvolvidas pesquisas de modo a aplicar o quitosano nas áreas da agricultura, ciências dos materiais, biotecnologia, terapia genética, cosmética, farmacêutica, medicina e nutrição (Prashanth e Tharanathan, 2007, Senel e McClure, 2004).

### **2.3.2. Quitosano no contexto dos revestimentos comestíveis aplicados em frutos**

De acordo com Krochta et al. (1994), um estudo dirigido por Arai foi o primeiro a referir, em 1968, que o quitosano retardava o amadurecimento de frutos. No entanto, foi nas últimas duas décadas que as pesquisas na tentativa de criar revestimentos comestíveis baseados em quitosano se multiplicaram, encontrando-se agora esta área vastamente documentadas, com várias aplicações bem sucedidas em frutos frescos, como lichias (Dong et al., 2004), mangas (Zhu et al., 2008), cerejas (Dang et al., 2010) e morangos (Hernandez-Munoz et al., 2008).

O quitosano destaca-se na aplicação em revestimentos de frutos frescos pela formação de filmes poliméricos eficientes na superfície dos frutos, pela capacidade de reduzir a evaporação de água, pela sua capacidade de limitar a troca gasosa inerente à taxa respiratória e ainda apresentar um grande espectro de acção antimicrobiano, acompanhado sinergeticamente por uma acção estimulante sobre o sistema imunitário do fruto (Embuscado e Huber, 2009, Romanazzi et al., 2009).

Uma das mais-valias deste composto é o facto de potenciar uma diminuição da perda do teor de água dos frutos durante o período de pós-colheita. Esta característica não é comum à maioria dos polissacarídeos e, quando conjugada com o facto do quitosano ser mais permeável à troca gasosa que os lípidos (Embuscado e Huber, 2009), possibilita uma acção eficiente no retardamento deteriorativo de frutos que apresentam taxas de respiração elevadas. No entanto, a sua formulação deve ser tida



em conta, visto que, tanto a sua concentração como a sua massa molecular influenciam a permeabilidade gasosa e de compostos voláteis, a qual, no caso de ser excessivamente restritiva, cria deturpações nos perfis sensoriais dos frutos (Almenar et al., 2009).

O facto do quitosano se revelar como um potente anti-bacteriano e anti-fúngico, é uma grande mais-valia no que diz respeito à conservação de frutos, especialmente frutos mais susceptíveis a contaminações microbiológicas. O quitosano possui actividade anti-microbiológica contra *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakey*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomona fluorescens*, *Cândida lambica*, *Cryptococcus humiculus*, e *Botrytis cinerea* (Devlieghere et al., 2004, Romanazzi et al., 2009).

Para além das propriedades enunciadas, os revestimentos de quitosano produziram em vários frutos uma degradação menos acentuada ao nível da coloração externa (Dang et al., 2010, Gonzalez-Aguilar et al., 2009, Hernandez-Munoz et al., 2008). Este factor foi correlacionado com a diminuição da actividade da enzima polifenoloxidase (responsável pela oxidação de compostos fenólicos) provocada pela acção do revestimento de quitosano (Dang et al., 2010).

#### **2.4. Aloe vera**

Além do quitosano, também o *Aloe vera* foi utilizado na presente tese, na formulação de revestimentos comestíveis.

A *Aloe vera* L. (*Aloe barbadensis* Miller), membro da família liliaceae, é uma xerófita suculenta perene, que desenvolve um tecido de armazenamento de água no interior das folhas, verdes e túrgidas, para sobreviver em zonas áridas de pluviosidade baixa ou irregular. As folhas (Figura 2.10) são formadas por uma espessa epiderme, coberta por cutículas em torno do mesófilo, podendo este diferenciar-se em células da clorênquima e células com paredes mais finas que formam a parênquima. As células da parênquima contêm no seu interior uma substância mucilagínosa transparente, conhecida como gel de *Aloe vera* (Femenia et al., 1999).



**Figura 2.10** | Corte transversal de uma folha de *Aloe vera*.

#### **2.4.1. Composição química**

O tecido da parênquima é conhecido por polpa e refere-se ao filete intacto do interior da folha, que inclui a parede celular, organelos e o líquido interior. Contém aproximadamente 98,5% de água, sendo o restante constituído por proteínas, vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, lípidos, aminoácidos, minerais, enzimas, hidratos de carbono, compostos fenólicos, ácidos orgânicos e compostos inorgânicos (Boudreau e Beland, 2006, Hamman, 2008). Os polissacarídeos são os compostos mais relevantes, dado serem os constituintes em maior quantidade (mais de 60% da massa do resíduo sólido), e uma vez que a si se atribui a maioria das propriedades medicinais e estruturais. No entanto, crê-se que estas propriedades não se baseiam apenas numa substância, mas sim num sinergismo entre vários componentes presentes na sua constituição (Femenia et al., 1999, Hamman, 2008).

Existem grandes flutuações na composição de polissacarídeos na polpa de *Aloe vera* encontradas na bibliografia consultada, provavelmente devido ao facto da manana, polissacarídeo de reserva da planta, sofrer grandes alterações em função da época de colheita. Para além disso, o próprio cultivar e a zona geográfica em que o *Aloe vera* é produzido, e o próprio método de extracção, podem diferenciar os resultados referentes à sua constituição (Hamman, 2008, Ni et al., 2004). A Tabela 2.3 apresenta valores referentes a um resíduo insolúvel em álcool produzido a partir de filetes de *Aloe vera*.





Para além de hidratos de carbono, foram também isolados vários compostos com actividades biológicas como o *alprogen*, uma glicoproteína com propriedades antialérgicas (Ro et al., 2002), várias C-glicosil-cromonas, com propriedades anti-inflamatórias (Hutter et al., 1996), bem como ácido salicílico, lignana, saponinas, esteróides, triterpenóides, enzimas (carboxipeptidase, glutathione peroxidase e várias isoenzimas superóxido dismutase). O gel contém ainda vitaminas A, C, E, B12, tiamina, niacina, e ácido fólico (Wani et al., 2010).

#### **2.4.2. Actividades biológicas do *Aloe vera***

As actividades biológicas referentes ao *Aloe vera* não são consensuais entre a comunidade científica. Várias pesquisas atribuem ao *Aloe vera* diferentes propriedades: (i) aumento da biodisponibilidade das vitaminas C e E (Vinson et al., 2005), (ii) promotor de penetração cutânea (Cole e Heard, 2007), (iii) promotor da regeneração cutânea (Eshghi et al., 2010), (iv) anti-diabético (Misawa et al., 2008), (v) anti-colesterolémico (Arora et al., 2009), (vi) anti-inflamatório (Langmead et al., 2004), (vii) anti-oxidante (Yagi et al., 2002), (viii) anti-cancerígeno (Tabolacci et al., 2010) e anti-microbiano (Habeeb et al., 2007). No entanto, algumas pesquisas contradizem certas actividades enunciadas anteriormente, provavelmente devido aos extractos utilizados possuírem discrepâncias ao nível da sua constituição (Hamman, 2008), atribuídas a diferentes métodos de extracção dos produtos usados e às consequentes alterações estruturais ao nível dos compostos presentes na matriz da polpa de *Aloe vera* (Ramachandra e Srinivasa, 2008).

#### **2.4.3. *Aloe vera* no contexto dos revestimentos comestíveis aplicados em frutos**

O *Aloe vera* apenas foi aplicado como revestimento comestível muito recentemente, sendo a bibliografia existente bastante diminuta e concentrada em apenas quatro tipos de frutos: uvas (Serrano et al., 2006, Valverde et al., 2005), cerejas (Martinez-Romero et al., 2006), nectarinas (Ahmed et al., 2009) e mangas (Dang et al., 2008).

Valverde et al. (2005) foram os primeiros a usar um extracto de gel de *Aloe vera* (diluído 1:3 v/v) como revestimento, com o intuito de preservar a qualidade durante o período de pós-colheita bem como aumentar o prazo de vida de uvas de mesa, armazenadas a 1 °C e a 20 °C. Os resultados foram surpreendentes, para ambas as





temperaturas: as uvas tratadas foram comparadas com o grupo de controlo e revelaram uma diminuição da respiração, da produção de etileno e da perda de peso, durante todo o período de armazenamento. Este comportamento foi acompanhado por uma manutenção mais eficaz da textura, por melhorias ao nível da cor e pela diminuição da proliferação microbiana. Foram também avaliadas as características sensoriais por um painel treinado, tendo o parâmetro doçura (avaliado sensorialmente) do fruto sido o único a apresentar pior classificação do que a amostra de controlo (Valverde et al., 2005). O mesmo grupo, como complemento ao estudo efectuado, mostrou em 2006 que os frutos tratados retiveram, durante o armazenamento sob as mesmas condições que os frutos não tratados, maior quantidade de antioxidantes (Serrano et al., 2006).

Martinez-Romero et al. (2006), apresentaram um artigo no qual o objecto de estudo eram cerejas, sob condições refrigeradas (1 °C). Os resultados revelados foram semelhantes aos obtidos por Valverde et al. (2005), com excepção da doçura do fruto, que apresentou melhorias no grupo com revestimento face ao grupo de controlo.

Num estudo posterior, foi avaliado o efeito do gel de *Aloe vera* no revestimento de mangas. Neste estudo as concentrações usadas foram muito superiores (100% e 50% de gel), tendo os resultados mostrado que o revestimento afectou a biossíntese de sesquiterpenos, lactonas e compostos aromáticos, juntamente com uma acumulação de etanol. A explicação sugeriu que o *Aloe vera* diminuiu a troca gasosa, a taxa metabólica e ao mesmo tempo alterou as vias metabólica, resultando numa alteração do perfil aromático (Dang et al., 2008).

O estudo mais recente (Ahmed et al., 2009) teve como objectivo avaliar o comportamento de nectarinas revestidas com gel de *Aloe vera*, na concentração de 0,25% de extracto sólido (equivalente à diluição 1:1 de gel). Neste estudo foi observado que, tanto à temperatura ambiente como sob refrigeração, as nectarinas revestidas diminuíram a produção de etileno, taxa de respiração, perda de água e alterações na textura, tendo também diminuído, no entanto, os níveis de ácido ascórbico e total de antioxidantes.

## **Capítulo 3**

Procedimento experimental

---





Neste capítulo serão apresentadas as razões que levaram à escolha da fonte dos materiais base usados no trabalho prático e far-se-á uma descrição aprofundada dos métodos usados no revestimento dos morangos e na avaliação do seu estado fisiológico.

### **3.1. Materiais utilizados**

#### **3.1.1. Morangos**

A escolha da fonte dos morangos baseou-se em duas razões primordiais, conseguir uma amostra que apresentasse grande homogeneidade entre os frutos e seleccionar uma empresa fornecedora que tivesse grande relevância ao nível da exportação. Como foi descrito na introdução teórica, os morangos apresentam grande diferenciação em função do local onde são cultivados, condições climáticas, tipo de fertilização, entre outros, e assim era importante para este trabalho ter uma amostragem que apresentasse baixa variabilidade. Para além disso era útil que a empresa fornecedora tivesse interesse na aplicação de um revestimento que prolongasse o tempo de vida do morango, com vista a minorar a sua degradação durante o processo de exportação, que necessariamente induz a um maior tempo de transporte e uma relação perdas/prejuízo mais elevada.

Depois de uma pesquisa intensiva sobre o mercado nacional de morangos e as suas tecnologias de produção, foi possível encontrar o parceiro ideal para este trabalho. A LusoMorango é a organização de produtores de pequenos frutos com maior significância ao nível da produção e exportação de morangos em Portugal. Complementarmente, possui empresas associadas que produzem morangos pelo método da hidroponia (sem solo), em prateleiras elevadas da terra, cuja fertilização tem por base água com nutrientes, e o uso de substratos de casca de pinheiro ou fibra de coco, sendo conhecido como método de produção em túnel. Este método de produção diminui a quantidade de variáveis diferenciadoras entre os morangos, sendo assim ideal para a elaboração de um estudo comparativo.

Com o objectivo de estabelecer uma cooperação, foi contactado o director executivo da LusoMorango, Eng. Gonçalo Andrade, que mostrou todo o interesse e disponibilidade em fornecer gratuitamente os morangos necessários a este estudo.



No entanto, no momento da primeira simulação, não foi possível obter morangos provenientes da cultura em túnel, visto esta estar no período de paragem de produção. Assim foram fornecidos como alternativa, morangos provenientes de cultivo ao ar livre na zona do Pedrógão, Leiria.

Os morangos foram colhidos manualmente no campo de cultivo (Figura 3.1) e, cerca de duas horas após a sua colheita, foram acondicionados em embalagens normalmente utilizadas para o transporte internacional, sendo posteriormente transportados (protegidos da radiação solar) para o Departamento de Química da Universidade de Aveiro, onde foram imediatamente colocados sob refrigeração.



**Figura 3.1** | Campo de cultivo na zona do Pedrógão, Leiria.

Na primeira simulação, foram recolhidos, dia 14 de Julho de 2010, cerca de 15 Kg de morangos do cultivar Lanais. Na segunda simulação, no dia 5 de Agosto de 2010, devido a problemas meteorológicos que originaram grandes perdas na produção, apenas foi possível recolher cerca de 12 Kg, do cultivar Anis.

### **3.1.2. Quitosano**

Na escolha da amostra de quitosano foi importante considerar a solubilidade e a variação das suas características reológicas e bioactivas, em função da variação da massa molecular. No entanto era também importante seleccionar uma amostra que fosse potencialmente de baixo custo, com vista a uma sustentabilidade económica da sua aplicação por parte da indústria frutícola.



Numa fase preparatória foram efectuados testes com uma amostra de quitosano comercial obtido de cascas de caranguejo (Sigma, minimum 85% deacetylated, referência: C3646-100G), para avaliar a sua capacidade em criar revestimentos eficientes em morangos. Os resultados mostraram que as soluções preparadas eram demasiado viscosas, criando assim um revestimento muito espesso quando aplicado no morango. Este facto proporcionou uma aparência artificial e uma textura com características plásticas no cálix do morango, chegando mesmo a criar uma adesão excessiva ao suporte de secagem, que, aquando da finalização do processo de secagem e conseqüente retirada do suporte, provocava uma danificação na estrutura do cálix.

Assim, surgiu a necessidade de seleccionar outra amostra para a realização deste trabalho. A análise bibliográfica sugeriu fortemente a aplicação de um quitosano de baixa massa molecular, visto apresentar maior eficácia contra os fungos *Botrytis cinerea* (Badawy e Rabea, 2009) e *Rhizopus* sp. (Hernandez-Lauzardo et al., 2008) bem como para um grande numero de bactérias (Goy et al., 2009), e complementarmente, apresentar menor permeabilidade ao vapor de água (Hwang et al., 2003) e menor viscosidade.

Com base nas razões apresentadas, foi seleccionada a amostra de quitosano com baixa massa molecular (Fluka, chitosan low-viscosity; referência: 50494) para a realização das simulações futuras.

### **3.1.3. Aloe vera**

O processamento de *Aloe vera* compreende vários passos que podem alterar de maneira inequívoca a estrutura dos polissacarídeos que compõem a planta no seu estado original, modificando a sua actividade biológica (Rodriguez et al., 2010). Assim, na escolha do extracto utilizado, foi necessário investigar as tecnologias associadas à produção do mesmo, a eficiência do processo ao nível das potenciais alterações nos polissacarídeos e a certificação possuída ao nível de entidades externas.

No mercado existem vários processos de produção de derivados de *Aloe vera*, no entanto, os únicos que são fabricados sem aditivos e que apresentam maior



semelhança com o gel de *Aloe vera* no estado natural ao nível da sua constituição e integridade, são os extractos secos (Ramachandra e Srinivasa, 2008).

Dentro dos extractos secos, o passo mais importante a considerar, com influência ao nível da degradação estrutural dos polissacarídeos, é o processo de desidratação. Na produção de extractos são utilizadas várias tecnologias de desidratação (spray-drying, microondas, radiofrequência etc.), contudo, as únicas que apresentam uma manutenção elevada da estrutura do *Aloe vera* e consequentemente da actividade biológica, são a liofilização e um novo método de produção denominado de Qmatrix (Ramachandra e Srinivasa, 2008). Os extractos produzidos por liofilização, apesar de apresentarem alta integridade funcional, apresentam um custo de produção demasiado elevado para serem considerados na aplicação em revestimentos comestíveis de frutos. O Qmatrix é um processo patenteado de produção da Aloecorp (a maior empresa mundial de produção de extractos de *Aloe vera*), composto por uma nova tecnologia de desidratação baseada no ideal Low Temperature Short Time e denominada de Refractance Window.

As mais-valias da utilização do processo Qmatrix prendem-se com a obtenção de um extracto de qualidade elevada, com solubilidade e propriedades reológicas equivalentes aos extractos provenientes do processo de liofilização (Nindo et al., 2010, Ramachandra e Srinivasa, 2008), aliado ao facto do custo ser muito inferior, graças a um processo de grande eficiência energética e produtiva. Este género de extracto é certificado pela International Aloe Science Council, uma organização sem fins lucrativos dedicada ao estudo e certificação de produtos de *Aloe vera* (Rodriguez et al., 2010). Com base nas razões apresentadas, foi seleccionado este género de extracto para aplicar como revestimento comestível em morangos.

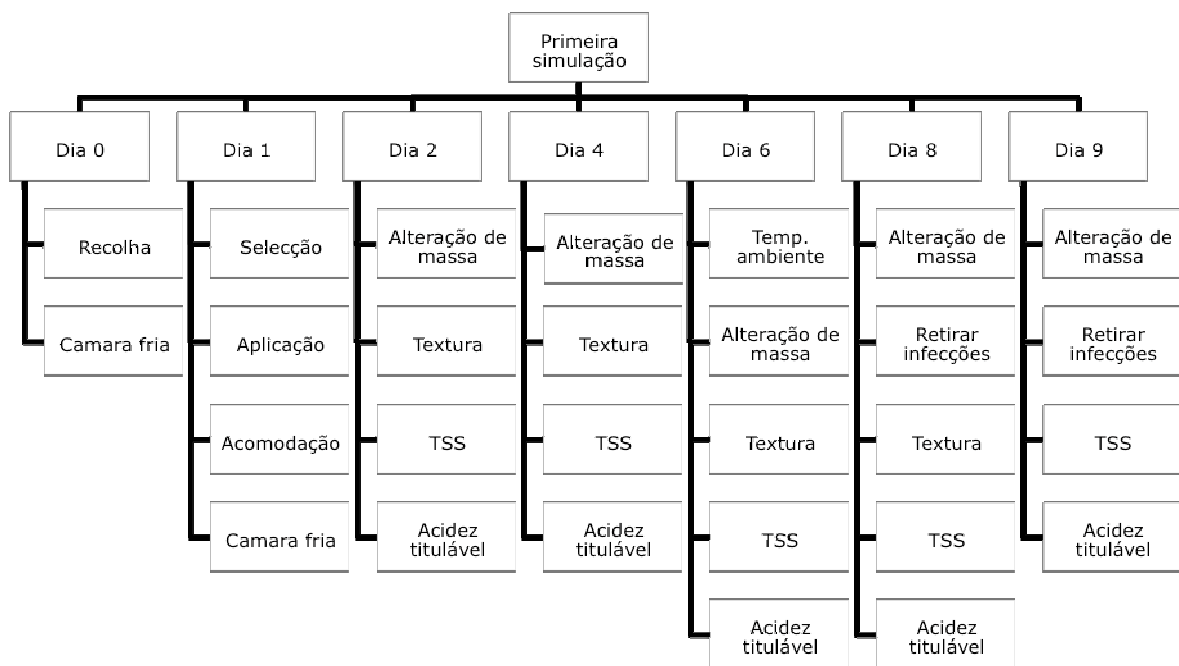
Assim, foi contactado o director científico da Aloecorp, Dr. Ken Jones, que depois de ser informado relativamente ao objectivo do trabalho, recomendou o uso do extracto "ACTIVAlloe® *Aloe vera* Gel QM200X Flakes" (referência: AA8010XQ-10) e forneceu gratuitamente as amostras necessárias à realização deste trabalho.



### 3.2. Metodologia

A metodologia adoptada pretendeu avaliar a eficiência de vários revestimentos comestíveis, durante o período de pós-colheita de morangos. As simulações focaram-se nos circuitos normalmente adoptados no processo de armazenamento, exposição de venda e armazenamento por parte do consumidor.

Na primeira experiência pretendeu-se simular uma cadeia precária de venda, comum à maioria dos mercados tradicionais e bastante relevante ao nível do consumo nacional de morangos, acompanhada de um armazenamento à temperatura ambiente por parte do consumidor. Com esse objectivo foi criado um protocolo de trabalho, caracterizado pela mudança da temperatura de armazenamento dos frutos ao quinto dia (tempo comum necessário ao processo de armazenamento e transporte) após a aplicação dos revestimentos, permanecendo à temperatura ambiente até à sua degeneração total. A Figura 3.2 apresenta um esquema simplificado da metodologia usada para avaliar as alterações ocorridas nos morangos durante a primeira simulação.



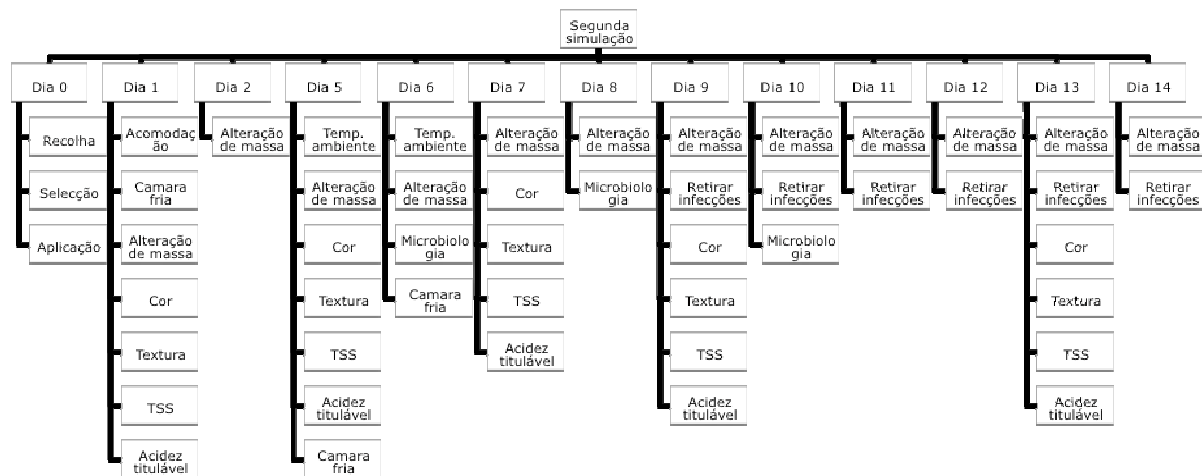
**Figura 3.2** | Esquema representativo da ordenação da metodologia associada à primeira simulação.

Na segunda experiência pretendeu-se avaliar a eficiência dos revestimentos seleccionados, num sistema otimizado de venda, usado por supermercados mais





actualizados ao nível tecnológico e organizacional, acompanhado por um armazenamento a baixas temperaturas por parte do consumidor. Com esse objectivo foi criado um protocolo de trabalho caracterizado pela mudança dos morangos, ao quinto e sexto dia após a aplicação dos revestimentos, para a temperatura ambiente durante 12 horas (tempo de exposição para venda), sendo posteriormente armazenados na câmara frigorífica até se degenerarem totalmente. A Figura 3.3 apresenta um esquema simplificado da metodologia usada para avaliar as alterações ocorridas nos morangos durante a segunda simulação.



**Figura 3.3** | Esquema representativo da ordenação da metodologia associada à segunda simulação.

Nos próximos subcapítulos será explicado detalhadamente cada método usado no decurso de ambas as simulações.

### 3.2.1. Formulação dos revestimentos

O quitosano foi usado em diferentes concentrações na formulação de revestimentos para frutos (Han et al., 2004, Hernandez-Munoz et al., 2006). No entanto, a concentração de 1 % foi aquela que mostrou ser mais eficiente na conservação de morangos, sem aumentar a concentração de metabolitos resultantes da respiração anaeróbia (Almenar et al., 2009) e sem provocar a formação de sabores estranhos (Han et al., 2005).



Quanto ao *Aloe vera*, a bibliografia é pouco extensa, no entanto, vários autores mostraram que diluições na ordem de 1:3 (v/v) de gel em água, foram eficientes na preservação de vários frutos, sem provocar alterações negativas no perfil sensorial destes (Ahmed et al., 2009, Martinez-Romero et al., 2006, Valverde et al., 2005). Dang et al. (2008) mostraram que a utilização de gel puro de *Aloe vera* como revestimento de mangas, provocou a acumulação de metabolitos provenientes da respiração anaeróbia e a redução da metabolização de compostos aromáticos.

Com base nestas observações e tendo em conta o efeito cumulativo da aplicação de dois materiais sobre a redução respiratória do morango, foi criado um revestimento com 0,8% de quitosano, conjugado com *Aloe vera* nas diluições de 1:7, 1:3 e 1:1 (v/v), de modo a tentar criar um revestimento sinérgico eficiente, sem provocar alterações no perfil sensorial do morango.

Com este objectivo, foi inicialmente preparada uma solução de quitosano com a concentração de 1% através da dissolução da amostra sólida numa solução de ácido acético 0,1 mol/L, visto ser este o ácido que conjugado com o quitosano apresenta maior actividade antimicrobiana contra o fungo *Botrytis cinerea* (Romanazzi et al., 2009). A dissolução demorou cerca de 3 horas a estar totalmente concluída, sendo a solução posteriormente reservada na câmara frigorífica.

O passo seguinte consistiu em ajustar o pH para 5,6, da solução controlo (apenas na primeira simulação, visto que na segunda o grupo controlo não foi imerso) e da solução de quitosano, com a adição de uma solução de hidróxido de sódio 0,05 mol/L, sob agitação mecânica. O ajuste para o pH de 5,6 teve como base o facto de ser este o pH da chuva e, complementarmente, o mais equilibrado para aplicação em tecidos vivos. No final do acerto, o volume da solução de quitosano foi ajustado com água, de modo a atingir uma concentração final de 0,8%.

Seguidamente, as soluções contendo quitosano foram divididas em vários erlenmeyers. Na primeira simulação foi reservada uma amostra contendo apenas quitosano, tendo-se adicionado às restantes amostras diferentes quantidades de extracto seco de *Aloe vera*, de forma a obter soluções finais de revestimento com 0,8% de quitosano e 0%, 0,0625%, 0,125% e 0,25% de *Aloe vera*. Na segunda simulação foram seleccionados os revestimentos que apresentaram melhores resultados (0,125% e 0,25%) na primeira simulação. Note-se, para efeitos de



comparação com dados da bibliografia, que as concentrações 0,0625%, 0,125% e 0,25% de *Aloe vera* correspondem, respectivamente, às diluições 1:7, 1:3 e 1:1 (v/v), visto o extracto utilizado ser correspondente a 0,5% da massa do gel de *Aloe vera* no estado natural.

### **3.2.2. Selecção dos morangos**

Todos os morangos foram analisados antes da aplicação do revestimento, de modo a rejeitar os que apresentassem sinais de se encontrar numa fase avançada ou numa fase prematura de maturação e os que apresentassem sinais de doença. Os requerimentos usados para a selecção foram: (i) ter pelo menos 75% da superfície vermelha, (ii) não apresentar danos físicos, (iii) não apresentar sinais de qualquer tipo de infecção e (iv) apresentar o cálix verde e saudável.

### **3.2.3. Aplicação dos revestimentos**

A aplicação nos morangos é um passo importante para o sucesso do revestimento, visto influenciar determinantemente as propriedades dos filmes usados como revestimento.

Vários autores referem que a imersão dos frutos em soluções de quitosano ou de *Aloe vera* deve ser feita durante 5 minutos, com agitação, sendo posteriormente secos à temperatura de 20°C durante duas horas (Ahmed et al., 2009, Almenar et al., 2009, Hernandez-Munoz et al., 2008, Martinez-Romero et al., 2006).

O método adoptado para a aplicação dos revestimentos consistiu, de acordo com a bibliografia e com o apresentado no parágrafo anterior, na imersão dos morangos durante 5 minutos, com agitação manual na primeira simulação, e com agitação moderada produzida mecanicamente com um agitador magnético na segunda simulação (Figura 3.4).



**Figura 3.4** | Processos de imersão com agitação mecânica e de secagem.

Para o processo de secagem, foi construído um suporte em madeira (Figura 3.4) com tamanho suficiente para albergar todos os morangos em simultâneo e permitir a circulação de ar (1,7 metros de largura, 2,5 metros de comprimento e 1 metro de altura), com uma rede plástica de suporte com uma porosidade adaptada ao tamanho do morango (1,2 x 2,2 centímetros) e com divisórias para separar as várias amostras. Com o objectivo de avaliar as condições de secagem, foram efectuados testes prévios em que se verificou que as duas horas, sugeridas pela bibliografia, não eram suficientes para secar os revestimentos, sendo necessárias cerca de 5 horas para atingir a secagem total.

Assim, o método adoptado para a secagem consistiu na colocação dos morangos no suporte durante 5 horas na primeira simulação, e durante 12 horas na segunda simulação, com recurso a agitação de ar (ventoinha a uma velocidade moderada), à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). Foram impostas alterações no tempo de secagem na segunda simulação, uma vez que os resultados obtidos na primeira simulação, no que respeita às alterações mássicas, foram inesperados, sugerindo que os revestimentos não estariam totalmente secos no momento de armazenamento, devido possivelmente ao aumento da humidade relativa criada pela grande quantidade de morangos utilizados.

Finalizado o processo de secagem, os morangos foram divididos por amostras e colocados em cuvetes plásticas próprias para o seu acondicionamento, previamente marcadas com referências identificativas. As cuvetes, cada uma contendo cerca de 400 gramas (22 morangos), foram organizadas em caixas plásticas apropriadas para o efeito (Figura 3.5) e armazenadas na câmara frigorífica.



**Figura 3.5** | Acondicionamento dos morangos.

#### **3.2.4. Perdas de massa e infecções**

Calcular as perdas de água sofridas pelo fruto e registar a evolução da incidência de infecções no fruto são dois dos parâmetros mais relevantes neste trabalho, visto serem estes os principais aspectos que geram maiores perdas a nível comercial. A perda de água por parte dos frutos durante o período de pós-colheita vai influenciar várias características posteriormente avaliadas, como a quantidade de sólidos solúveis e a textura do fruto, para além de se traduzir numa perda de massa, diminuindo assim o retorno financeiro dos frutos. A incidência de infecções é, no caso dos morangos, o maior factor limitante no que diz respeito ao tempo de vida pós-colheita, visto estes serem particularmente susceptíveis a infecções fúngicas.

Várias pesquisas mostram que a aplicação de quitosano como revestimento comestível em morangos permite diminuir a taxa de perda de água durante o período de armazenamento e retardar a incidência de infecção fúngica (Han et al., 2004, Hernandez-Munoz et al., 2008, Hernandez-Munoz et al., 2006). No que diz respeito à aplicação de *Aloe vera* como revestimento comestível em morangos, não foram até à data publicados artigos com esse intuito. No entanto, o revestimento de *Aloe vera* mostrou ter propriedades semelhantes às do quitosano quando aplicado em cerejas (Martinez-Romero et al., 2006). Note-se que as cerejas apresentam várias semelhanças com os morangos: Pertencem à mesma família botânica (Rosaceae), apresentam um género de respiração semelhante (não climatérica) e possuem um tempo de vida relativamente curto, normalmente demarcado pela incidência de microrganismos (*Penicillium*, *Botrytis* e *Monilia*) (Martinez-Romero et al., 2006).

Com o objectivo de avaliar as alterações mássicas associadas às perdas de água dos morangos, foram separadas várias cuvetes (3 na primeira simulação e 4 na segunda)



contendo 22 morangos, e registada a sua massa em vários momentos das simulações (sendo posteriormente subtraída a massa das cuvetes). As cuvetes usadas para registar as alterações de massa foram também observadas diariamente para procura de infecções, sendo retirados todos os morangos que apresentassem sinais de infecções fúngicas ou bacterianas.

### **3.2.5. Cor**

O método adoptado teve como objectivo detectar as alterações cromáticas dos morangos que ocorreram ao longo dos vários dias em que decorreram as simulações e, complementarmente, comparar as alterações ocorridas entre as diversas amostras.

Vários autores (Ahmed et al., 2009, Hernandez-Munoz et al., 2006, Valverde et al., 2005) avaliaram este parâmetro em frutos, através do uso de colorímetros comerciais, registando valores em vários pontos dos frutos. No entanto, este método está associado a várias limitações, visto que a superfície do morango apresenta, por um lado, grande heterogeneidade na sua coloração (no mesmo fruto é possível encontrar desde um vermelho intenso a um branco amarelado), por outro, uma superfície irregular (várias depressões em toda a superfície), e contém grande quantidade de aquénios (com coloração diferente). Assim, um método que apenas registe valores de pequenos pontos na superfície do fruto, como é o caso da metodologia associada ao uso do colorímetro, acarreta consigo um grande erro associado, não parecendo adequado para avaliar o desenvolvimento da coloração dos morangos.

Com o objectivo de ultrapassar os erros descritos anteriormente foi desenvolvido um método alternativo, de modo a avaliar uma parte significativa da área superficial do morango. O sistema de visão computadorizada foi o recurso seleccionado, visto ter mostrado resultados eficientes em vários estudos na área alimentar (F Mendoza, 2005, Kang e Sabarez, 2009, Yam e Papadakis, 2004) e ser um processo de baixo custo económico.

Com vista à aplicação da metodologia adoptada foram necessários vários instrumentos de suporte: uma máquina fotográfica digital reflex (Nikon D40), um tripé fotográfico regulável (com níveis horizontais e esféricos), um suporte universal (com uma adaptação para colocar os morangos a uma altura regulável), um nível horizontal



(para verificar a inclinação do suporte da amostra), quatro lâmpadas fluorescentes e um computador com software de edição e análise fotográfica (Adobe Photoshop CS4).

A fase inicial desta metodologia prendeu-se com a padronização da obtenção das imagens digitais. Para isso foi necessário instalar, numa sala branca, imutável e isolada de qualquer fonte luminosa externa, uma estrutura que permitisse colocar os morangos no centro da fonte de iluminação, com o fruto a fazer um ângulo de 45° com ambas as fontes de radiação, uma barreira reflectora entre o operador e o fruto e a lente da máquina fotográfica a 20 cm do fruto. Esta montagem foi construída para permitir que todas as faces do morango fossem expostas à mesma intensidade luminosa, que a distância entre o operador e o fruto não interferisse na radiação incidente, que a radiação reflectida na face superior da superfície do morango incidisse directamente na fonte de captura e que a posição da máquina não criasse uma barreira entre a fonte de emissão e o objecto. É importante ressaltar que o operador vestiu sempre uma bata branca de modo a que as cores da sua vestimenta não interferissem na radiação capturada. Um esquema simplificado da montagem instrumental é apresentado na Figura 3.6.



**Figura 3.6** | Esquema representativo do modo de obtenção de imagem.

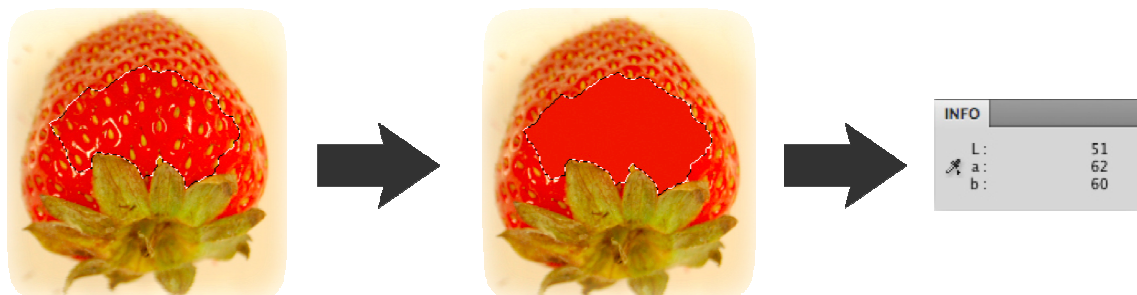
Analogamente à padronização do sistema luminoso, foi necessário configurar a máquina fotográfica de modo a obter sempre o mesmo espectro de captura. Com esse fim, o modo de captura foi configurado da seguinte forma: (i) formato de saída JPEG, (ii) sensibilidade do sensor em ISO 1600, (iii) tamanho da imagem de 3008 x 2000 pixels, (iv) balanço de brancos pré-ajustado para o suporte dos frutos, (v) ampliação



da lente de 55mm, (vi) tempo de exposição de 0,05 segundos e (vii) abertura com um f-stop de  $f/5,6$ .

Depois de padronizado o método de aquisição, foram tiradas duas fotografias em ambas as faces (duas partes mais achatadas) a cada morango de cada grupo, sendo cada grupo composto por 20 unidades.

Depois das imagens serem exportadas para o computador, foram tratadas e analisadas com recurso ao Photoshop. O processo de tratamento e obtenção de coordenadas (Figura 3.7) baseou-se em 3 fases distintas: (i) selecção da área focada (a partir da ferramenta de selecção automática), visto ser esta a área fotográfica que apresenta menores interferências provocadas pelo ângulo de reflexão (desvios médios inferiores a  $10^\circ$ ) (Kang et al., 2008); (ii) homogeneização de todos os pixels da área seleccionada, ferramenta esta que efectua uma média de todas as coordenadas de cada pixel; (iii) leitura e registo de coordenadas no modelo de cor CIELAB correspondentes à área total seleccionada.



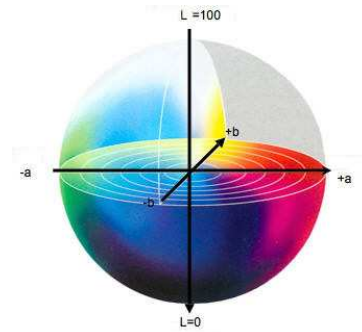
**Figura 3.7** | Processo de tratamento das imagens e obtenção de coordenadas.

O modelo Lab ( $L^*a^*b^*$ ), desenvolvido pela Comissão Internacional de Iluminação, difere da maioria dos modelos de cor por ser independente do dispositivo usado (Yam e Papadakis, 2004) e por pressupor uma linearização entre a percepção humana e as coordenadas obtidas (De Silva et al., 2005). Estas características fazem dele um óptimo modelo para avaliar as alterações de cor em frutos com o objectivo de analisar as características percebidas por parte dos consumidores. Os parâmetros que compõem este modelo são a luminosidade ( $L^*$ ), que varia entre os valores 0 e 100, e os dois componentes cromáticos, que variam entre  $\pm 120$ , o  $a^*$  (do verde para o vermelho) e o  $b^*$  (do azul para o amarelo) (Kang et al., 2008). A Figura 3.8





representa as variações da cor correspondentes às diferentes conjunções de coordenadas deste modelo.



**Figura 3.8 |** Modelo de cor CIELAB.

Nas simulações efectuadas, as análises a este parâmetro terminaram quando foi detectada alguma infecção num dos morangos que compunham o grupo destinado a ser avaliado por este método.

### 3.2.6. Textura

A análise de textura teve como objectivo avaliar as alterações na textura dos morangos ao longo do tempo e, simultaneamente, comparar as várias amostras que compunham a simulação.

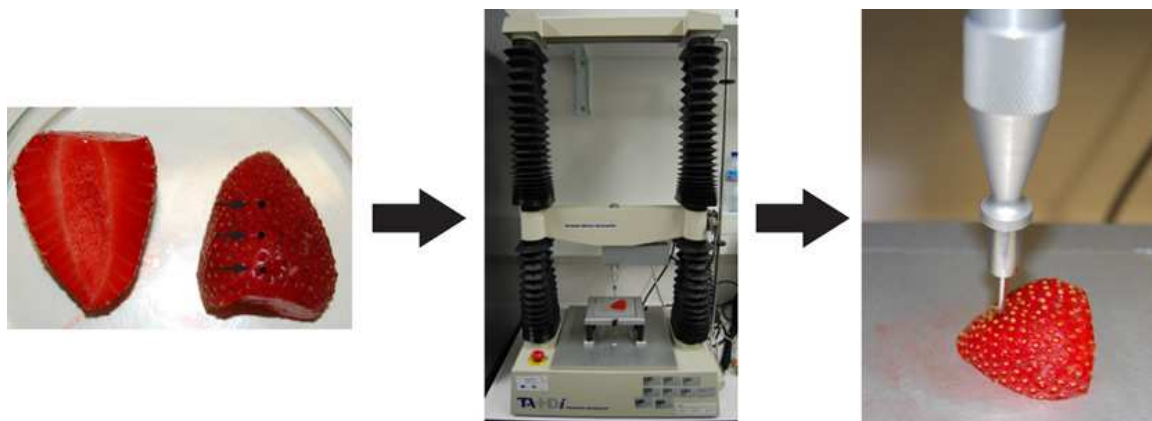
Vários autores (Hernandez-Munoz et al., 2008, Hernandez-Munoz et al., 2006, Ribeiro et al., 2007, Vargas et al., 2006) sugerem, como método indicado para a análise da textura de morangos, a penetração do fruto com sondas circulares ligadas a um analisador de textura. No entanto, a maioria dos autores considerou apenas a força máxima de penetração como o valor indicativo da textura do fruto, algo que considerei insuficiente, visto a força máxima de ruptura fornecer dados muito dependentes da firmeza do pericarpo (pele). Esta característica, apesar de ser um dado importante, é limitativa para avaliar o estado total da textura do fruto. Assim o método seleccionado propõe analisar não só a firmeza do pericarpo e a sua elasticidade, mas também a firmeza da polpa relacionada com a resistência à penetração pela sonda.

Foram necessários à realização deste método experimental um analisador de textura (Stable Micro Systems TA.HDi) adaptado com uma sonda circular de penetração (com diâmetro de 2 mm) e um computador, com um software de aquisição e análise de



dados (Texture Expert Exceed, versão 1.0). A partir do software foram inseridas as instruções da amostragem: velocidade da sonda (1 mm/s), penetração máxima (15 mm), massa da célula de carga (5 kg), e dados de saída pretendidos (N/mm), e posteriormente enviadas para o texturómetro.

Para realizar esta metodologia foram seleccionados aleatoriamente vários morangos (5 para a primeira simulação e 10 para a segunda) de cada uma das amostras e cortados longitudinalmente. Seguidamente foi colocada uma metade no suporte do texturómetro, ajustando a posição deste para um dos três pontos do eixo longitudinal do morango, exemplificados na primeira imagem da Figura 3.9. Depois de ajustada a posição foi dada a ordem, a partir do software, para iniciar a perfuração, tendo o cuidado de apoiar os morangos manualmente, de modo a não permitir deslizamentos do morango na superfície do equipamento. Este processo foi repetido 6 vezes por cada morango analisado.

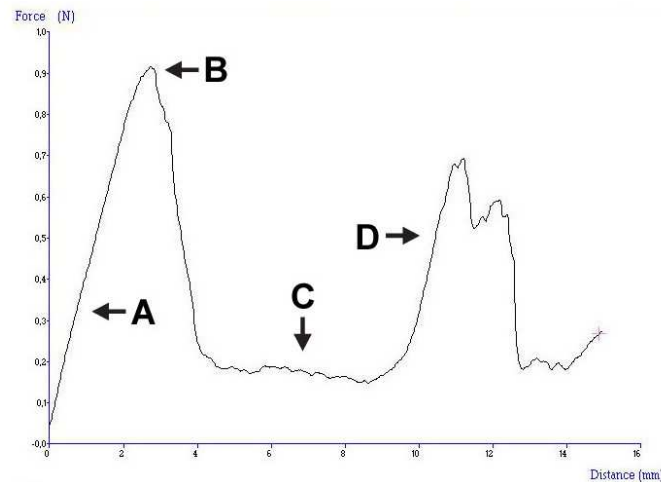


**Figura 3.9** | Processo de preparação das amostras e perfuração com o analisador de textura.

Cada perfuração efectuada foi automaticamente representada pelo software na forma gráfica, com as abcissas em unidades de distância (milímetros) e as ordenadas em unidades de força (newtons). A Figura 3.10 apresenta um exemplo de um gráfico típico resultante de uma perfuração de um morango. A região do gráfico marcada com a letra A apresenta uma zona de variação linear, estando o seu declive, conhecido como o módulo de Young, relacionado com a elasticidade da pele do fruto. O ponto B indica a força máxima requerida para fracturar o pericarpo, a uma considerada distância que está dependente da elasticidade da pele e da resistência interna do morango. A região C apresenta um comportamento relativamente constante, correspondente à força de resistência exercida pela polpa do fruto à passagem da

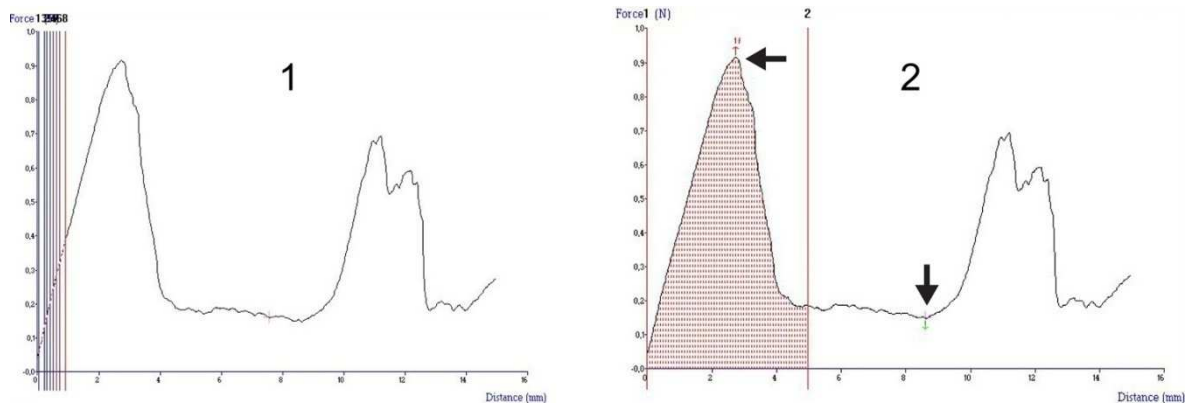


sonda. O pico D representa a força de resistência exercida pela parte central esbranquiçada do morango (ver Figura 3.9).



**Figura 3.10** | Exemplo de um gráfico resultante da análise de textura de um morango.

A obtenção dos dados foi efectuada directamente no software “Texture Expert Exceed”, devido à possibilidade de criar operações automatizadas para a análise de todos os gráficos de cada grupo testado. Foi assim criada uma macro com instruções para: (i) calcular o declive da zona linear de aumento da força com a distância de penetração (gráfico 1 da Figura 3.11), (ii) determinar a área do gráfico até aos 5 milímetros de perfuração (zona avermelhada da gráfico 2 da Figura 3.11), (iii) registar a força e a distância correspondentes ao primeiro pico (ponto a vermelho no gráfico 2 da Figura 3.11) e (iv) registar a força mínima na zona intermediária entre os dois primeiros picos (ponto a verde no gráfico 2 da Figura 3.11). A parte central interior, correspondente ao segundo pico, não foi avaliada visto ser extremamente difícil distinguir esta zona em determinados gráficos, devido à grande variabilidade entre as zonas analisadas do morango.



**Figura 3.11** | Operações efectuadas pela macro.

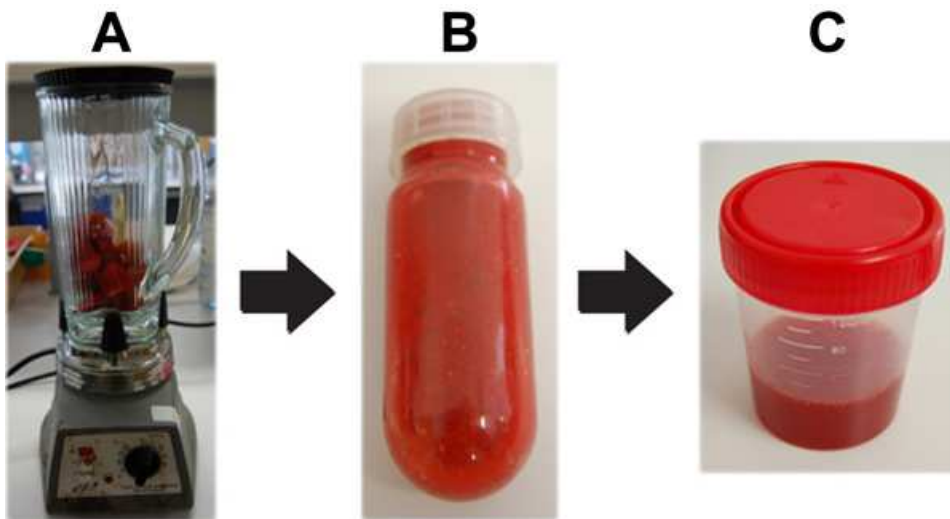
Os dados obtidos foram agrupados por morango e calculada a média dos valores obtidos a partir das seis perfurações correspondentes.

### 3.2.7. Total de sólidos solúveis

A quantificação de sólidos solúveis na polpa de frutos é uma análise comum na avaliação do estado de maturação de frutos, sendo normalmente utilizada para prever a altura ideal para colher os frutos, visto o seu valor ser correlacionado com as alterações quantitativas de açúcares no fruto durante o período de maturação. Para além da avaliação no período de pré-colheita, este método é também usado por vários autores (Azodanlou et al., 2004, Hernandez-Munoz et al., 2006, Vargas et al., 2006) com o objectivo de avaliar as alterações degradativas (parede celular das células, perda de água, doçura, etc.) durante o período de pós-colheita.

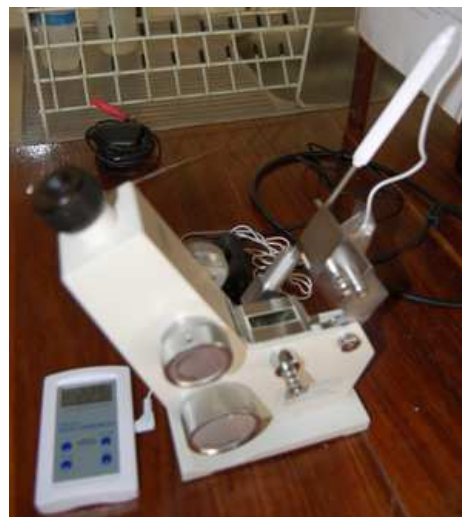
Com o objectivo de quantificar o total de sólidos solúveis, foi seleccionado o método analítico oficial da Association of Official Agricultural Chemists (932.12), especificado para frutos e derivados (AOAC International, 1995).

A fase inicial deste método pressupõe a transformação do fruto em polpa e retirar os sólidos insolúveis desta. Com esse objectivo, os morangos provenientes da análise de textura (5 na primeira simulação e 10 na segunda) foram liquidificados durante 3 minutos (A, Figura 3.12). Seguidamente, com o objectivo de retirar a matéria sólida presente (B, Figura 3.12), a polpa foi centrifugada durante 15 minutos, à temperatura de 20 °C e uma velocidade de 20.000 rotações por minuto. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi colocado num porta amostras (C, Figura 3.13), contendo neste momento um líquido sem matéria em suspensão.



**Figura 3.12** | Processo de liquidificação de morangos e centrifugação da polpa.

A quantificação do total de sólidos solúveis presentes nas amostras foi realizada através de um refractómetro manual (Krüss AR3) (Figura 3.13), previamente padronizado com água. Foram colocadas três gotas da amostra na sua superfície e registada a sua leitura (Graus Brix), bem como a temperatura a que ocorreu a medição. Este processo foi repetido em triplicado.



**Figura 3.13** | Refractómetro manual.

Os resultados obtidos foram posteriormente corrigidos para corresponderem aos valores obtidos a uma temperatura de 20 °C (AOAC International, 1995).



### 3.2.8. Acidez titulável e pH

A acidez titulável é, conjuntamente com a quantidade de sólidos solúveis, um dos métodos mais comuns na análise de frutos durante o período de pré-colheita, sendo normalmente usado para o estabelecimento de índices representativos do estado de maturação. A sua alteração durante o período de pós-colheita está relacionada com vários metabolismos comuns a este período que resultam na degradação de diversos ácidos orgânicos. As alterações de pH da polpa são também extremamente importantes visto o seu aumento durante o período de pós-colheita aumentar a susceptibilidade do fruto sofrer infecções microbiológicas.

Com o objectivo de determinar a acidez titulável em frutos, foi seleccionado o método analítico oficial da Association of Official Agricultural Chemists (942.15), especificado para derivados de frutos (AOAC International, 1995).

O líquido analisado por estes métodos provém da centrifugação da polpa, como enunciado no subcapítulo anterior (3.2.7).

A análise de pH do sumo puro foi obtida pela imersão directa do eléctrodo de vidro do medidor de pH (WTW - inoLab) no sumo. A análise da acidez titulável foi efectuada a partir da titulação potenciométrica de sumo diluído (10% do volume), sob agitação moderada, com hidróxido de sódio (0,1 mol/L). Foram registados a partir do pH 7, de quatro em quatro gotas, os valores do pH e da quantidade de base gasta. A titulação terminou quando se adicionaram as últimas quatro gotas, depois de se atingir o pH de 8,1. No final foram interpolados os dados para obter o volume correspondente ao pH 8,1, com os valores usados próximos da gama  $8,1 \pm 0,2$ .

### 3.2.9. Microbiologia

Quantificar a evolução da flora microbiológica dos morangos é extremamente importante para este trabalho, visto funcionar como um suporte à compreensão dos resultados obtidos através do registo da incidência de infecções. Vários autores já demonstraram a capacidade anti-microbiológica do quitosano e do *Aloe vera*, tanto in vitro (Goy et al., 2009, Habeeb et al., 2007) como aplicados em frutos na forma de revestimentos comestíveis (Campaniello et al., 2008, Valverde et al., 2005). Ainda assim, era importante perceber qual o impacto da variação da concentração do *Aloe vera*, quando usado como revestimento comestível em morangos. Entre os possíveis



microrganismos contaminantes, é particularmente importante avaliar a evolução de fungos e leveduras, visto estes serem responsáveis pela maior parte das infecções em morangos, durante o período de pós-colheita.

Com o objectivo de detectar a evolução dos microrganismos totais, foi adoptada uma metodologia com base na norma NF V 08-051:1999 e, para detectar a evolução de bolores e leveduras, foi adoptada uma metodologia com base na norma NP 3277:1987. As alterações efectuadas face ao indicado nas normas incidiram sobre o método de amostragem: as normas sugerem usar 10 gramas de amostra, algo que considerei insuficiente, visto corresponder apenas a cerca de 1,5 morangos. Assim, foi adicionado um passo preparatório em que se homogeneizaram 10 morangos, sendo posteriormente retiradas 10 gramas de amostra para preparar a solução-mãe com água peptonada.

Depois de preparada a solução-mãe, esta foi diluída em água peptonada em várias concentrações (previamente optimizadas num ensaio preparatório), na proporção 1:10. Quando todas as diluições foram preparadas, foram inoculadas duas placas por cada diluição; no caso dos microrganismos totais, por incorporação em meio Plate Count Agar (PCA), no caso dos fungos e leveduras, por espalhamento em meio Cooke Rose Bengal Agar (CRBA). Minutos depois da inoculação, quando os meios de cultura solidificaram, as placas para contagem de microrganismos totais foram invertidas e armazenadas na estufa a 30 °C e as placas para contagem de bolores e leveduras foram armazenadas na estufa a 25 °C.

As contagens de microrganismos totais (A da Figura 3.14) foram realizadas 3 dias após a inoculação. As contagens de bolores e leveduras (B da Figura 3.14) tiveram lugar 5 dias após a inoculação.





**Figura 3.14** | Placas de cultura de aeróbios totais (A) e de fungos e leveduras (B).

### 3.2.10. Tratamento e apresentação de resultados

Os resultados foram inicialmente registados e tratados com recurso a folhas de cálculo do software Microsoft Office Excel. Posteriormente foram importados para o software de análise de dados científicos e representador de gráficos, o SigmaPlot.

A análise estatística comparativa foi efectuada através do teste Two-Way ANOVA. Sempre que foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ( $P < 0,001$ ) foi realizado o teste de Tukey, de modo a efectuar uma comparação múltipla entre as amostras durante o período de testes.

Os resultados obtidos foram representados sob a forma gráfica através do software SigmaPlot. Os gráficos representativos das alterações registadas durante as simulações mostram para cada momento o valor da média dos dados e o desvio padrão associado. Os gráficos representativos da variabilidade dos dados foram representados sob a forma de caixas de bigodes: a linha interior à caixa representa a mediana (percentil 50°), os limites da caixa são indicativos dos percentis 25° (primeiro quartil) e 75° (terceiro quartil), as rectas externas (bigodes ou whiskers) são indicativas dos percentis 10° e 90° e, por fim, os pontos representados depois dos limites indicados anteriormente indicam os outliers.





## **Capítulo 4** Resultados e discussão

---





Neste capítulo serão apresentados e analisados os resultados obtidos durante o procedimento experimental, bem como a sua discussão. Serão apresentados os resultados das análises sob a forma gráfica, representando-se a média e o desvio padrão de cada grupo, e as conclusões dos testes estatísticos comparativos. Nos Anexos serão apresentados complementarmente, sempre que possível, as caixas de bigodes indicativas da dispersão dos resultados dentro de cada grupo e os dados de saída dos testes estatísticos efectuados.

#### **4.1. Primeira simulação**

Durante a primeira simulação foram analisados morangos imersos nas seguintes soluções:

- A - Água destilada (controlo);
- B - Quitosano 0,8%;
- C - Quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,25%;
- D - Quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,125%;
- E - Quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,0625%;

Esta simulação ocorreu durante um período de nove dias, tempo que permitiu registar as alterações ocorridas em todos os grupos, até à entrada no período de senescência de grande parte dos morangos pertencentes a cada grupo estudado.

##### **4.1.1. Temperatura e Humidade**

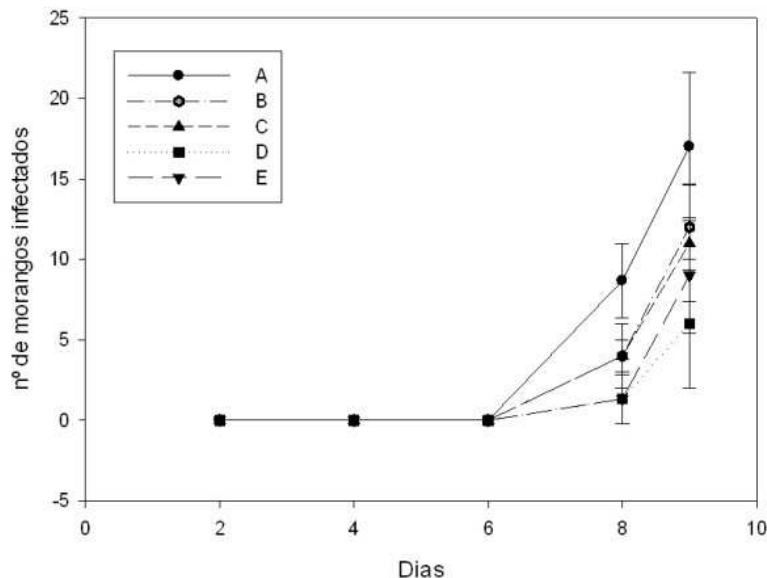
Como descrito no capítulo anterior, esta simulação pretendeu avaliar a eficiência dos revestimentos no decurso de uma cadeia precária de venda e consumo, caracterizada por cinco dias iniciais de armazenamento refrigerado e pelos restantes dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Durante o decurso da simulação foi registada a temperatura e a humidade relativa, três vezes por dia, no espaço circundante à realização de cada momento da simulação. Sob as condições de armazenamento refrigerado foi registada uma temperatura média de  $5,9 \pm 0,5$  °C e humidade relativa média de  $83 \pm 7$  %. Sob condições de armazenamento à temperatura ambiente foi registada uma temperatura média de  $21,9 \pm 2$  °C e humidade relativa média de  $55 \pm 10$  %.



#### 4.1.2. Infecções

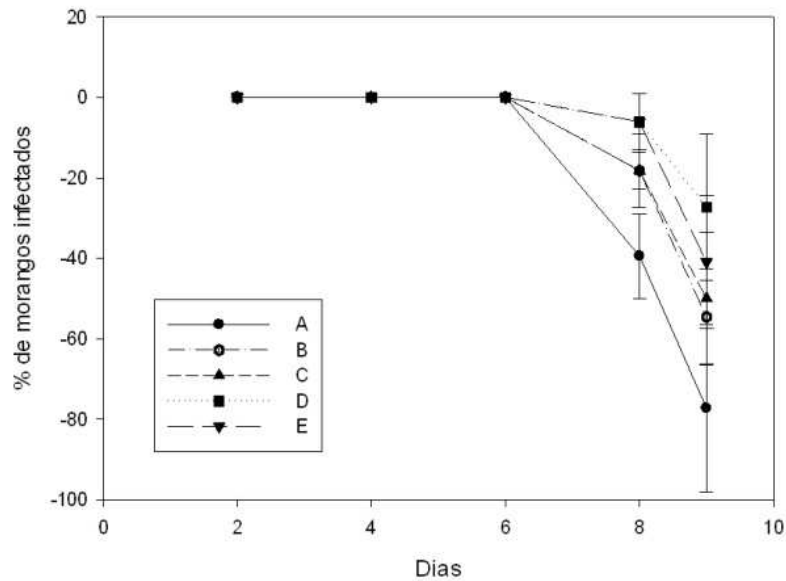
O gráfico apresentado na Figura 4.1 representa a média de morangos por cuvete nos quais foram detectados sinais de podridão causada por infecções fúngicas ou bacterianas, durante os dias em que decorreu a primeira simulação.



**Figura 4.1** | Representação gráfica da incidência infecciosa média por cuvete.

Os dados apresentados mostram que todos revestimentos aplicados proporcionaram uma diminuição na incidência de infecções registadas face ao grupo de controlo (amostra A) ( $P < 0,05$ ), destacando-se a amostra D (Quitosano 0,8% + *Aloe vera* 1:3), como aquela que produziu melhores resultados até ao último dia da simulação ( $P < 0,05$ ). Entre as amostras B, C, D e E, não foram registadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ).

O gráfico apresentado na Figura 4.2 mostra a percentagem média de morangos retirados por cuvete, devido à verificação de indícios de infecções.



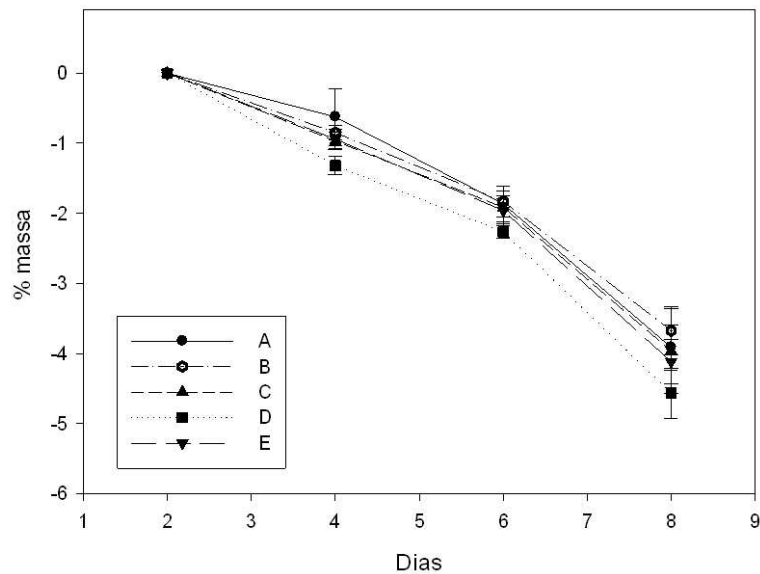
**Figura 4.2 |** Representação gráfica da percentagem de perdas média por cuvete.

Pela análise gráfica é possível verificar que o grupo controlo atingiu no último dia da simulação uma incidência média de podridões de 77% do total de morangos presentes em cada cuvete, enquanto que a amostra D mostrou uma melhoria significativa, visto terem sido apenas registadas 27% de infecções. Verifica-se assim uma diferença significativa na eficiência dos vários revestimentos testados no que respeita à diminuição das perdas totais de morangos, causadas pela acção microbiana.

Estes resultados mostraram-se concordantes com vários trabalhos em que foi registado um decréscimo do total de infecções registadas ao longo do período de pós-colheita, tanto no caso de morangos revestidos com quitosano (Hernandez-Munoz et al., 2008, Martinez-Romero et al., 2006, Vargas et al., 2006), bem como no caso de frutos revestidos com *Aloe vera* (Ahmed et al., 2009, Martinez-Romero et al., 2006).

#### 4.1.3. Alterações mássicas

O gráfico apresentado na Figura 4.3, representa a percentagem média das perdas totais de massa registadas por cada grupo de tratamentos, até ao momento da ocorrência da primeira infecção. Estes valores obtidos estão correlacionados com perda de água por parte dos morangos, durante o período de pós-colheita.



**Figura 4.3 |** Representação gráfica da alteração percentual da massa dos morangos.

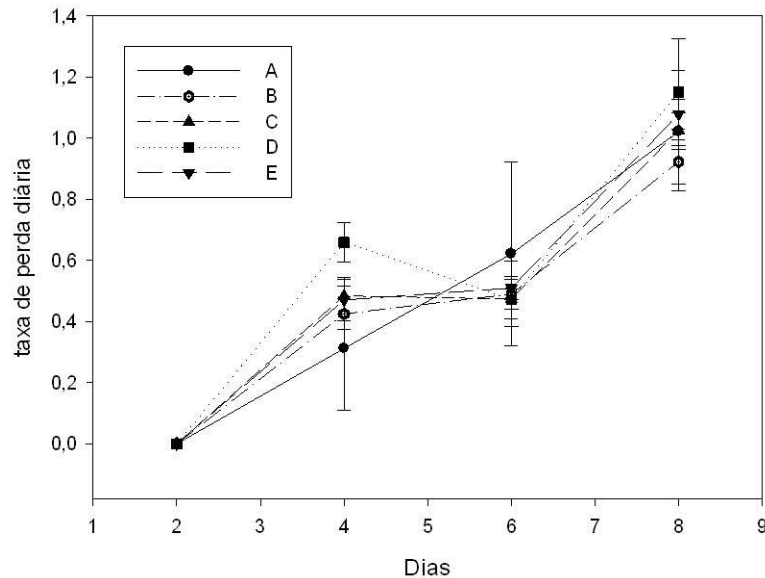
Pela análise dos dados é possível concluir que a amostra D é significativamente diferente da amostra controlo (A) ( $P < 0,05$ ), mostrando que o revestimento provocou um aumento significativo da perda de água por parte dos frutos. Relativamente às restantes amostras foram detectadas diferenças significativas entre elas, no entanto, nenhuma mostrou efectivamente induzir uma diminuição significativa da perda de água durante todo o tempo de simulação, comparativamente ao grupo controlo ( $P > 0,05$ ). É possível, no entanto, observar que nos últimos dois momentos de análise, os morangos revestidos apenas com quitosano (B) mostraram diminuir as perdas de massa totais.

Os resultados obtidos não corresponderam ao esperado, visto vários autores terem demonstrado que, tanto os revestimentos baseados em quitosano (Hernandez-Munoz et al., 2008, Vargas et al., 2006) como os baseados em *Aloe vera* (Ahmed et al., 2009, Martinez-Romero et al., 2006, Valverde et al., 2005) proporcionam uma acção retardativa sobre a perda de água registada por parte de frutos, ao longo de todo o período de armazenamento.

Com o objectivo de clarificar os resultados obtidos anteriormente, foi calculada a velocidade de perda de massa, pelo quociente entre a diferença da percentagem de massa perdida entre cada momento de análise e o momento anterior, e o número de



dias entre as análises. Assim, o gráfico apresentado na Figura 4.4 pretende comparar as taxas de perdas registadas, em função de cada momento de análise.



**Figura 4.4** | Representação gráfica da taxa de perda mássica diária.

Pela análise do gráfico apresentado é possível verificar que a aplicação dos revestimentos induziu a uma taxa de perda mássica acentuada entre a primeira e a segunda medição, comparativamente à amostra controlo. Entre a segunda e a terceira medição é possível observar que as taxas de perdas dos morangos revestidos estabilizaram, ao contrário da amostra controlo que apresentou um comportamento de crescimento linear. Entre as duas últimas medições é possível observar que todos os morangos apresentaram uma taxa de perda mássica semelhante, no entanto, a amostra revestida apenas com quitosano apresentou uma taxa de perdas inferior. É possível observar ainda que as alterações nas condições de armazenamento (temperatura ambiente a partir do sexto dia) levaram a um incremento da taxa de perdas.

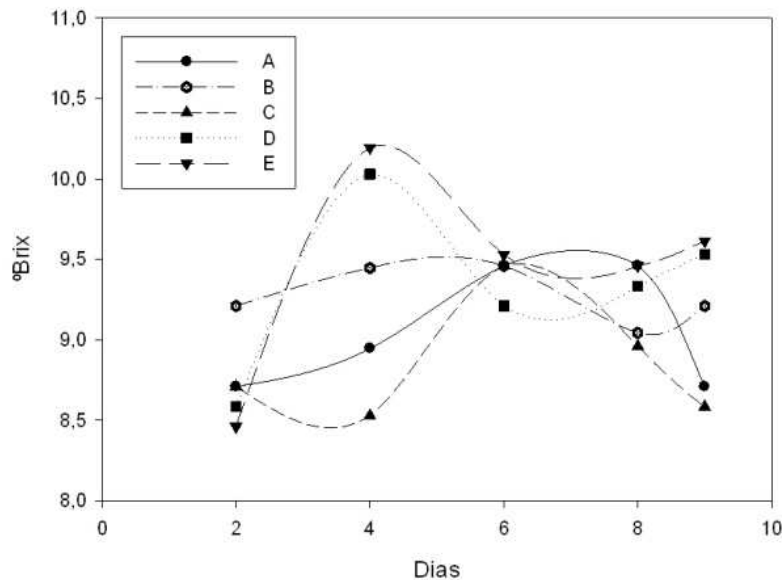
A interpretação destes resultados inesperados sugeriu a hipótese de uma secagem incompleta dos revestimentos ser a causa pela qual os morangos revestidos apresentaram uma grande perda de massa entre o primeiro e o segundo momento. Surgiu assim a necessidade de aumentar o tempo de secagem na segunda simulação, de modo a testar esta hipótese.





#### 4.1.4. Total de sólidos solúveis

O gráfico apresentado na Figura 4.5 mostra a evolução da quantidade de sólidos solúveis registada para os vários grupos durante o período de armazenamento. É importante ressaltar que os principais sólidos solúveis presentes nos morangos são os polissacarídeos e os ácidos orgânicos.



**Figura 4.5** | Representação gráfica da alteração do total de sólidos solúveis durante os dias da simulação.

Pela análise dos dados é possível verificar grandes diferenças relativamente ao comportamento evolutivo do total de sólidos solúveis (TSS) entre os vários tipos de revestimento, durante o período de armazenamento.

A amostra controlo mostra o comportamento normal do fruto durante o período de pós-colheita, tradicionalmente caracterizado por um lento aumento da concentração de sólidos solúveis durante o período de refrigeração, resultado da solubilização de polissacarídeos provenientes da parede celular das células vegetais e da perda de água por parte do fruto. Posteriormente, no período característico da senescência, verifica-se uma queda acentuada da concentração de TSS, decorrente da diminuição da quantidade de polissacarídeos solubilizados provenientes da parede celular e, provavelmente, acoplado a este efeito, da degradação de polissacarídeos por parte de microrganismos.



A amostra revestida apenas com quitosano mostrou reduzir o TSS durante o período de armazenamento à temperatura ambiente (a partir do dia 6), excepto no último dia de análise.

As amostras revestidas com *Aloe vera* apresentaram comportamentos bastante distintos de qualquer uma das restantes amostras. As amostras D e E, contendo revestimentos com menor quantidade de *Aloe vera*, mostram um incremento, face às restantes amostras, do aumento do TSS durante o período inicial do período de pós-colheita. No entanto, a longo prazo mostraram estabilizar a concentração de TSS, não se registando o decréscimo acentuado tradicional do período de senescência. A amostra C, revestida com a quantidade mais elevada de *Aloe vera*, mostrou um comportamento curioso, caracterizado por uma diminuição inicial do TSS relativamente ao grupo de controlo, e também por uma diminuição acentuada durante o armazenamento à temperatura ambiente.

Praticamente toda bibliografia consultada, na qual foi avaliado este parâmetro, mostrou que os revestimentos baseados em quitosano (Dang et al., 2010, Hernandez-Munoz et al., 2008, Hernandez-Munoz et al., 2006) e em *Aloe vera* (Ahmed et al., 2009, Martinez-Romero et al., 2006, Valverde et al., 2005) provocaram uma diminuição da concentração de sólidos solúveis em frutos, ao longo de todo o tempo analisado, sendo necessário ter em consideração que também diminuíram as perdas de água dos mesmos. Contudo, foram também encontrados artigos (Mazaro et al., 2008, Vargas et al., 2006) referentes à aplicação de revestimentos de quitosano em morangos em que este comportamento dos TSS não se verificou, apesar de ter sido registada uma diminuição das perdas de água registadas pelos frutos.

Para compreender estes resultados é importante correlacionar os resultados obtidos com as alterações registadas nas taxas de perdas de água (Figura 4.4), devido à relação perda de água/aumento da concentração de sólidos solúveis.

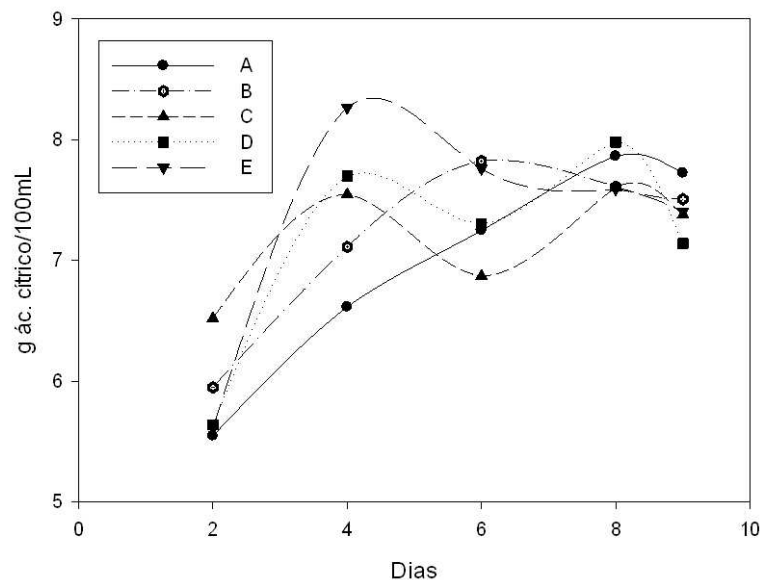
Tendo em conta que no primeiro intervalo de medições foi registado um grande aumento da taxa de perdas por parte das amostras revestidas, é possível encontrar uma justificação para o aumento do TSS das amostras B, D e E. No entanto, o grupo C, revestido com uma concentração de *Aloe vera* superior (0,25%), apesar do aumento da taxa de perda de água, revelou um TSS inferior ao grupo controlo, algo que indicia uma acção do revestimento na diminuição da degradação normal da



parede celular, e/ou no aumento da respiração (polissacarídeos e ácidos usados como substrato) por parte do fruto. Para além disso, é possível verificar que, apesar da amostra D (0,125% de *Aloe vera*) ter registado uma perda de água superior (ver Figura 4.3) comparativamente com a amostra E (0,0625% de *Aloe vera*) ao longo de todo o período de pós-colheita, mostrou no decurso das análises valores inferiores de TSS, algo que indicia uma correlação entre o aumento da concentração de *Aloe vera* e uma diminuição do TSS.

#### 4.1.5. Acidez titulável

O gráfico apresentado na Figura 4.6 mostra a evolução da acidez titulável registada nos vários grupos de morangos, durante o período de armazenamento.



**Figura 4.6** | Representação gráfica da acidez titulável registada durante os dias da simulação.

A análise da acidez titulável mostrou que os morangos aumentaram a sua concentração de ácidos orgânicos, do início para o fim do período de pós-colheita. Este resultado não era inteiramente esperado, visto ocorrer uma diminuição contínua da quantidade de ácidos orgânicos após o momento de colheita, devido ao uso destes como substrato no processo de respiração. Este facto pode ser justificado pelas perdas de água registadas durante o período de pós-colheita.

Pela análise do gráfico apresentado é possível verificar que os revestimentos provocaram uma alteração no perfil evolutivo da concentração de ácidos,



comparativamente com o grupo controlo, particularmente relevante nos morangos revestidos com *Aloe vera*. No entanto, nos últimos dois dias testados, todas as amostras apresentaram valores aproximados.

Os morangos revestidos com quitosano apresentaram de uma forma geral um comportamento semelhante ao da amostra controlo. No entanto, é possível verificar que, durante o período de armazenamento à temperatura ambiente, se registou uma diminuição da acidez titulável registada.

As amostras sujeitas à aplicação de revestimentos contendo *Aloe vera* mostraram um comportamento semelhante entre elas, caracterizado por um aumento inicial brusco da quantidade de ácidos presentes na polpa, seguido de oscilações até ao término da simulação.

A bibliografia analisada mostra resultados variados relativamente a este parâmetro. Vários autores sugerem que frutos revestidos com quitosano (Dang et al., 2010, Mazaro et al., 2008) ou com *Aloe vera* (Ahmed et al., 2009, Valverde et al., 2005) mostram valores de acidez titulável superiores ao longo de todo o tempo analisado. No entanto, noutros artigos (Hernandez-Munoz et al., 2008, Hernandez-Munoz et al., 2006, Vargas et al., 2006), relativos a morangos revestidos com quitosano, não são encontradas diferenças significativas entre os morangos revestidos e o grupo controlo. Note-se que em todos estes trabalhos foi observada uma diminuição das perdas de água por parte dos frutos revestidos.

De modo a compreender estes resultados é importante correlacionar os resultados obtidos com as alterações registadas nas taxas de perdas de água (Figura 4.4) e as alterações de massa (Figura 4.3), devido à relação perda de água/aumento da concentração de ácidos.

Tendo em conta que entre o primeiro e o segundo momento de análise, foi registada uma taxa de perda de água significativamente superior em todas as amostras revestidas, pode justificar-se a razão para todos os revestimentos apresentarem uma concentração superior de ácidos no momento da segunda análise.

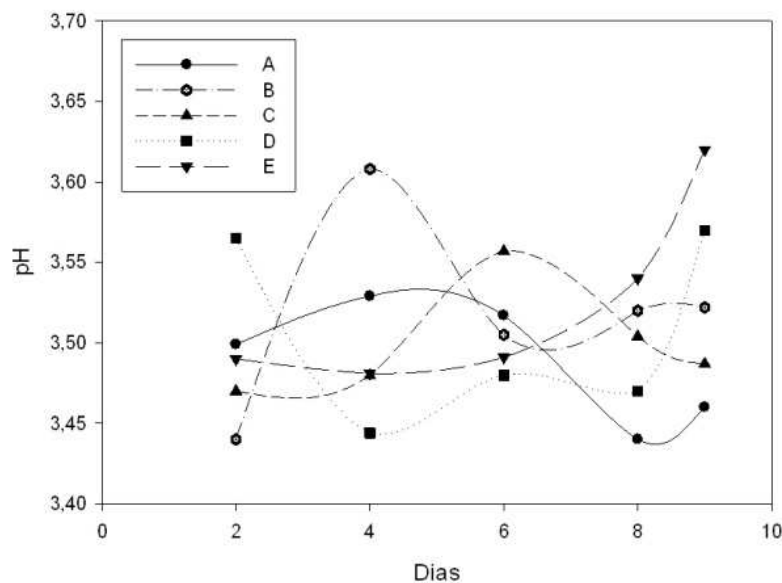
No entanto, a partir do sexto dia de simulação todos os morangos revestidos apresentaram tendência a ter uma concentração de ácidos inferior à amostra controlo,



apesar de neste intervalo apenas a amostra B ter mostrado reter mais água. Assim, é possível inferir que os revestimentos contendo *Aloe vera* provocaram uma degradação acentuada de ácidos orgânicos, provavelmente devido a um aumento da respiração.

#### 4.1.6. pH

O gráfico apresentado na Figura 4.7 mostra a evolução do pH registado na polpa dos vários grupos, em função dos dias de análise.



**Figura 4.7** | Representação gráfica do pH registado durante os dias da simulação.

Os resultados demonstram que apesar dos revestimentos terem controlado a incidência infecciosa, nos últimos dias de armazenamento provocaram uma diminuição da acidez do fruto, aumentando assim a sua susceptibilidade a ataques microbiológicos. Este comportamento é particularmente relevante no caso dos revestimentos com quantidades inferiores de *Aloe vera* (C e D).

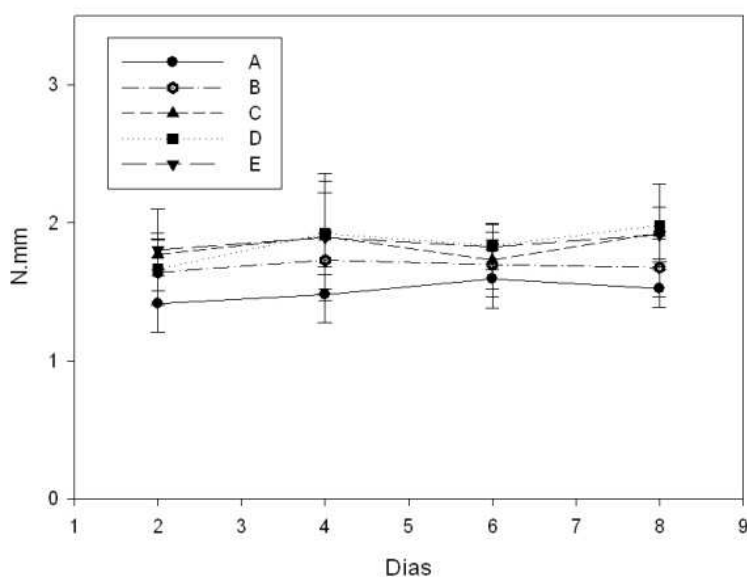
#### 4.1.7. Textura

Nos próximos subcapítulos serão apresentados os resultados obtidos com o intuito de avaliar as potencialidades dos revestimentos aplicados na conservação das características texturais dos morangos.



#### 4.1.7.1. Textura média

De modo a comparar a resistência apresentada pelos morangos aquando da perfuração, foi quantificada a quantidade de energia necessária para perfurar os frutos até aos 5 milímetros de profundidade, sendo classificado este valor como um indicador da textura média. O gráfico apresentado na Figura 4.8 representa a média dos valores obtidos em cada grupo de morangos testado, no cálculo da textura média, durante os dias de análise.



**Figura 4.8** | Representação gráfica dos valores médios obtidos através do cálculo da área gráfica proveniente do analisador de textura, em função dos dias da simulação.

Pela análise estatística dos dados é possível verificar que todos os revestimentos contendo *Aloe vera* (C, D e E) produziram alterações significativas na textura média dos morangos ( $P < 0,05$ ). A amostra revestida apenas com quitosano (B) não produziu alterações significativas face ao grupo controlo ( $P > 0,05$ ).

Os dados obtidos permitem inferir que os morangos revestidos com quitosano e *Aloe vera* mostraram melhorias na manutenção da textura média dos morangos, face ao grupo controlo e ao grupo revestido apenas com quitosano.

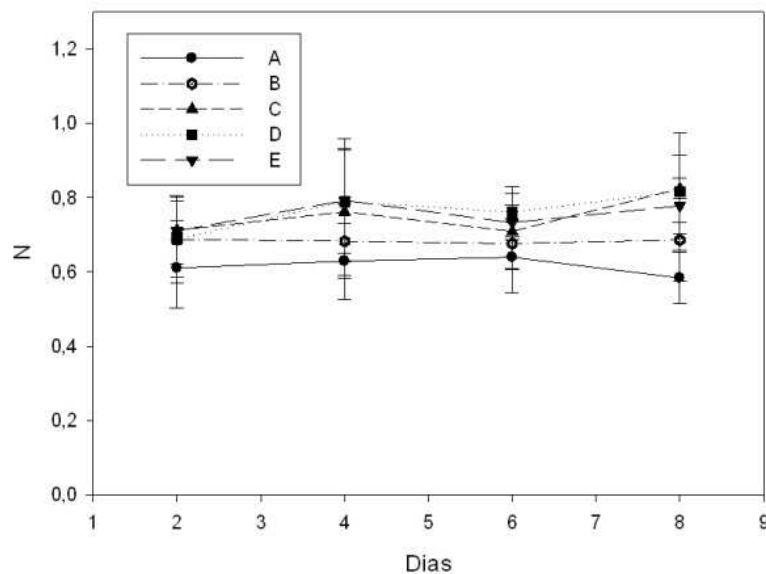
Apesar da análise estatística não confirmar diferenças significativas entre a amostra B e A, pela análise do gráfico é possível observar que a amostra contendo apenas quitosano mostrou valores médios superiores ao grupo controlo durante todos os



momentos testados, sugerindo que o quitosano contribuiu para as melhorias verificadas nas restante amostras.

#### 4.1.7.2. Força máxima de ruptura

O gráfico apresentado na Figura 4.9, representa a média da força máxima de ruptura da pele verificada em cada grupo de morangos testado, durante os dias de análise.



**Figura 4.9** | Representação gráfica dos valores médios da força necessária à ruptura da pele dos morangos, em função dos dias da simulação.

Pela análise estatística dos dados é possível verificar que todos os revestimentos contendo *Aloe vera* (C, D e E) produziram diferenças significativas na força necessária à ruptura da pele dos morangos ( $P < 0,05$ ). A amostra revestida com apenas quitosano (B) não produziu alterações significativas face ao grupo controlo ( $P > 0,05$ ).

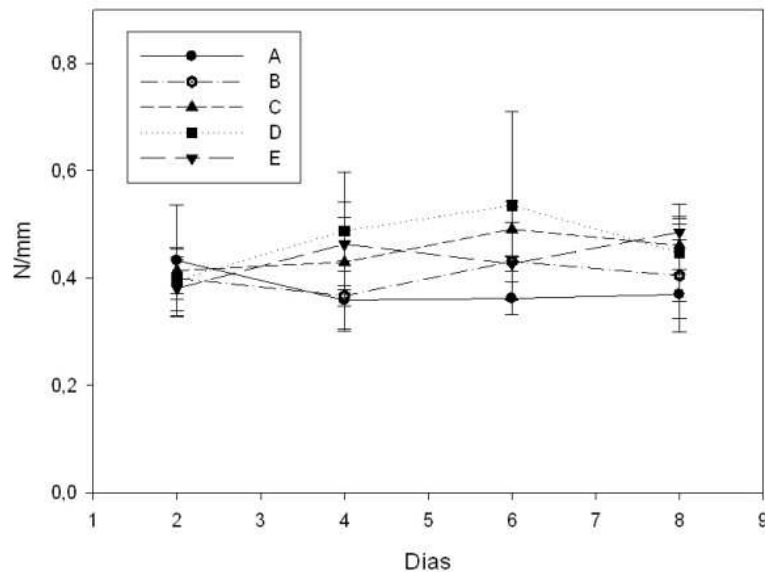
Com base nestes resultados é possível inferir que os revestimentos contendo quitosano *Aloe vera* produziram melhorias ao nível da resistência da pele dos morangos.

Apesar da análise estatística não confirmar diferenças significativas entre a amostra B e A, pela observação do gráfico é possível reparar que a amostra contendo apenas quitosano mostrou valores médios superiores ao grupo controlo durante todos os momentos testados, sugerindo que o quitosano contribuiu para as melhorias verificadas nas restante amostras.



#### 4.1.7.3. Módulo de Young

O gráfico apresentado na Figura 4.10 representa a média do módulo de Young (declive da zona de variação linear do pico de ruptura) obtido em cada grupo de morangos testado, durante os dias de análise.



**Figura 4.10** | Representação gráfica dos valores médios registados através do cálculo do declive da zona linear de crescimento do pico de ruptura, em função dos dias da simulação.

Pela análise estatística dos dados é possível verificar que todos os revestimentos contendo maior quantidade de *Aloe vera* (D e C) originaram diferenças significativas ao nível do módulo de elasticidade da pele dos morangos ( $P < 0,05$ ). As amostras revestidas com apenas quitosano (B) e a amostra contendo menor quantidade de *Aloe vera* (E) não produziram alterações significativas face ao grupo controlo ( $P > 0,05$ ).

Com base nestes resultados é possível inferir que a aplicação de revestimentos contendo quitosano e *Aloe vera* nas concentrações de 0,125 e 0,25% produziu melhorias ao nível da elasticidade do morango.

Apesar da análise estatística não confirmar diferenças significativas entre a amostra B e A, pela observação do gráfico é possível verificar que a amostra contendo apenas quitosano mostra, a partir do segundo momento de análise, valores médios superiores

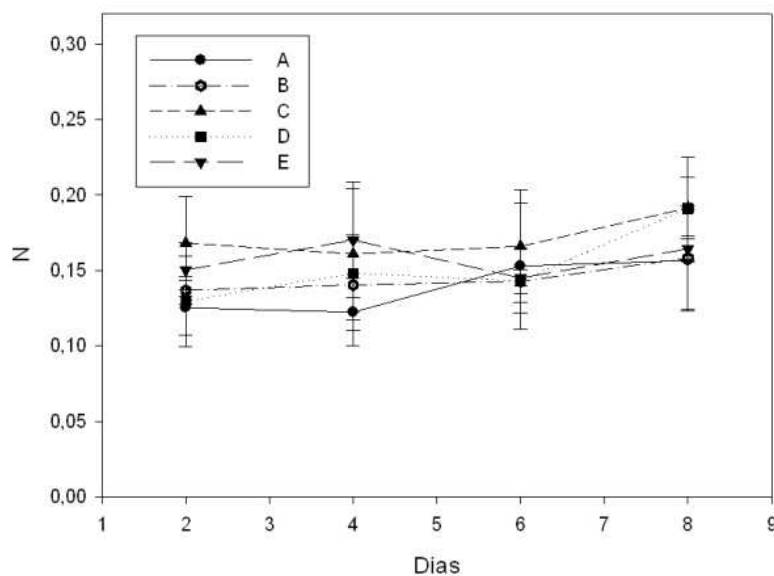




ao grupo controlo, sugerindo que o quitosano contribuiu para as melhorias verificadas nas restante amostras.

#### 4.1.7.4. Textura interna

O gráfico apresentado na Figura 4.11 representa a média dos valores correspondentes à textura interior (força mínima obtida na zona média interior), obtidos em cada grupo de morangos testado, durante os dias de análise.



**Figura 4.11** | Representação gráfica dos valores médios da força mínima obtida na zona média interior, em função dos dias da simulação.

Pela análise estatística dos dados é possível verificar que apenas a amostra revestida com *Aloe vera* na concentração média (D) resultou numa manutenção superior da textura interior dos morangos ( $P < 0,05$ ). A amostra revestida apenas com quitosano (B) e as amostras contendo diferentes quantidades de *Aloe vera* (C e E) nos seus revestimentos não evidenciaram alterações significativas face ao grupo controlo ( $P > 0,05$ ). No entanto, através da análise estatística individual entre a amostra A e a amostra C é possível verificar que, nas três medições realizadas entre os dias quatro e oito, as amostras foram sempre significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Com base nestes resultados é possível inferir que a aplicação de revestimentos contendo quitosano e *Aloe vera* nas concentrações de 0,125 e 0,25% produziram melhorias ao nível da textura interna do morango.



## 4.2. Segunda simulação

Durante a segunda simulação foram analisados morangos revestidos com as soluções que apresentaram melhores resultados na primeira simulação:

- A - Controlo (sem imersão);
- B - Quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,125%;
- C - Quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,25%;

Esta simulação ocorreu durante um período de catorze dias, tempo que permitiu registar as alterações ocorridas em todos os grupos, até à entrada no período de senescência de uma parte significativa de morangos pertencentes cada grupo estudado.

### 4.2.1. Temperatura e Humidade

Durante o decurso da simulação foi registada a temperatura e a humidade relativa, três vezes por dia, no interior de uma cuvette específica contendo morangos. Esta alteração no espaço de medição permitiu medir mais assertivamente as condições a que os morangos foram sujeitos durante o decurso da simulação, bem como perceber as alterações causadas pelo uso de cuvetes ao nível da manutenção da temperatura e da humidade relativa. É importante ressaltar que o local e as condições de armazenamento durante o período de refrigeração e o período de temperatura ambiente foram as mesmas da primeira simulação.

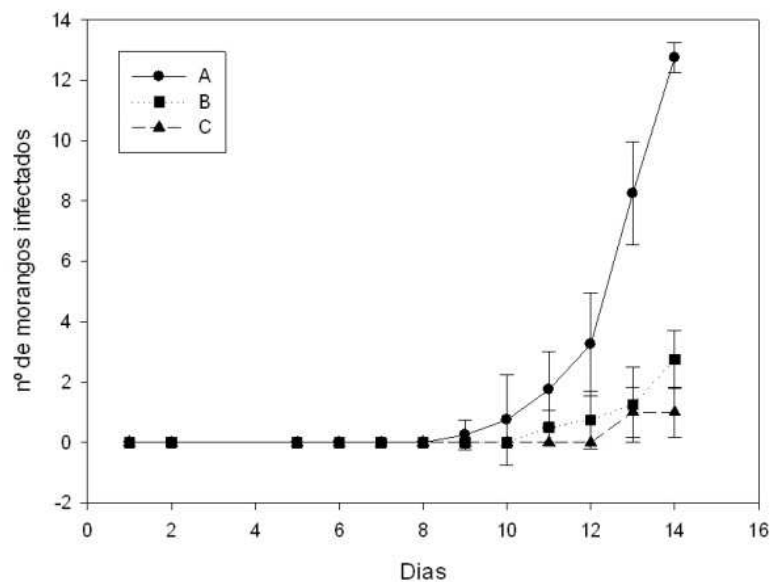
Sob as condições de armazenamento refrigerado foi registada uma temperatura média de  $5,7 \pm 0,5$  °C e humidade média de  $87 \pm 3$  %. Sob condições de armazenamento à temperatura ambiente foi registada uma temperatura média de  $23,0 \pm 0,8$  °C e humidade média de  $81 \pm 5$  %.

Pela análise comparativa dos dados recolhidos nesta simulação com a primeira simulação, é possível inferir que o uso deste tipo de cuvette aumentou significativamente a humidade relativa circundante aos morangos, em ambas condições de armazenamento. Quanto à temperatura, não foram detectadas diferenças significativas.



#### 4.2.2. Infecções

O gráfico apresentado na Figura 4.12 representa a média do número de morangos por cuvete em que foram detectados sinais de podridão causada por infecções fúngicas ou bacterianas, durante os dias em que decorreu a segunda simulação.

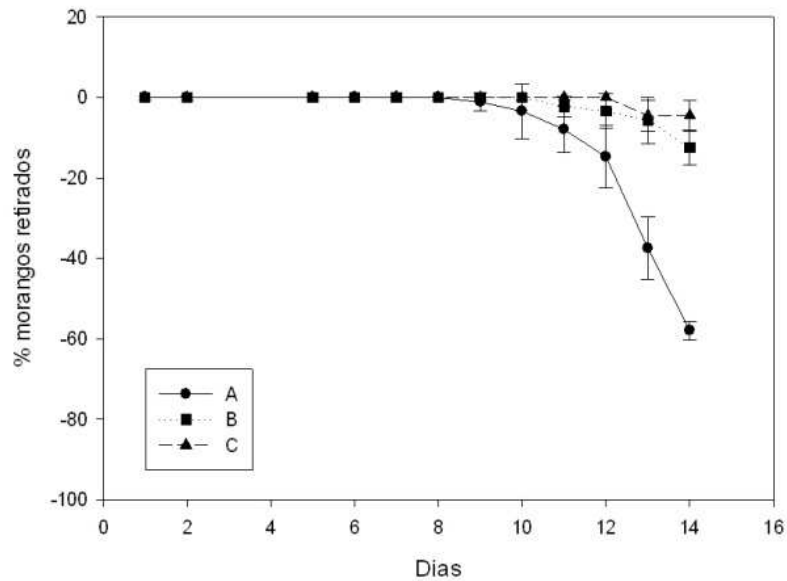


**Figura 4.12** | Gráfico representativo da incidência infecciosa média por cuvete, durante os dias da simulação.

Os dados apresentados mostram que os revestimentos aplicados proporcionaram uma diminuição da incidência de infecções registadas face ao grupo de controlo ( $P < 0,05$ ).

A amostra A (controlo) mostrou os primeiros indícios de infecção ao nono dia após o dia de colheita enquanto que a amostra B (Quitossano 0,8% + *Aloe vera* 0,125%) obteve um registo semelhante dois dias mais tarde. A amostra C (Quitossano 0,8% + *Aloe vera* 0,25%) destacou-se como aquela que retardou durante mais tempo a incidência de infecções, quatro dias após o registo da primeira infecção no grupo controlo, prolongando assim em aproximadamente 45% a vida útil dos morangos face aos não revestidos.

O gráfico apresentado na Figura 4.13 mostra a percentagem média de morangos retirados por cuvete, devido à verificação de indícios de infecções.



**Figura 4.13** | Gráfico representativo da percentagem de infecções por cuvete, durante os dias da simulação.

Através da análise do gráfico é possível ter uma melhor noção do potencial de impacto dos revestimentos sobre a diminuição dos desperdícios causados por infecções microbiológicas.

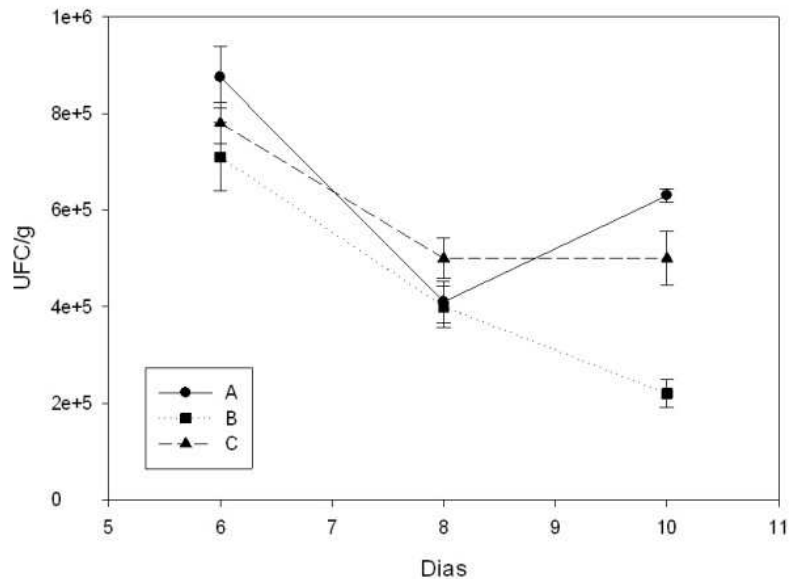
Verificar que o controlo atingiu no último dia da simulação uma incidência média de podridões de aproximadamente 58% do total de morangos presentes em cada cuvete, enquanto que as amostras B e C mostraram uma melhoria significativa, visto terem sido apenas registadas no dia término aproximadamente 13% e 5% de infecções, respectivamente.

### 4.2.3. Microbiologia

Nos subcapítulos seguintes serão apresentados os resultados relativos às contagens microbiológicas, efectuadas em três momentos distintos.

#### 4.2.3.1. Microrganismos totais

No gráfico apresentado na Figura 4.14 é possível observar os resultados obtidos através da contagem de microrganismos totais (aeróbios), cultivados em três momentos da segunda simulação.



**Figura 4.14** | Gráfico representativo da média das contagens microbiológicas de organismos totais, durante os dias da simulação.

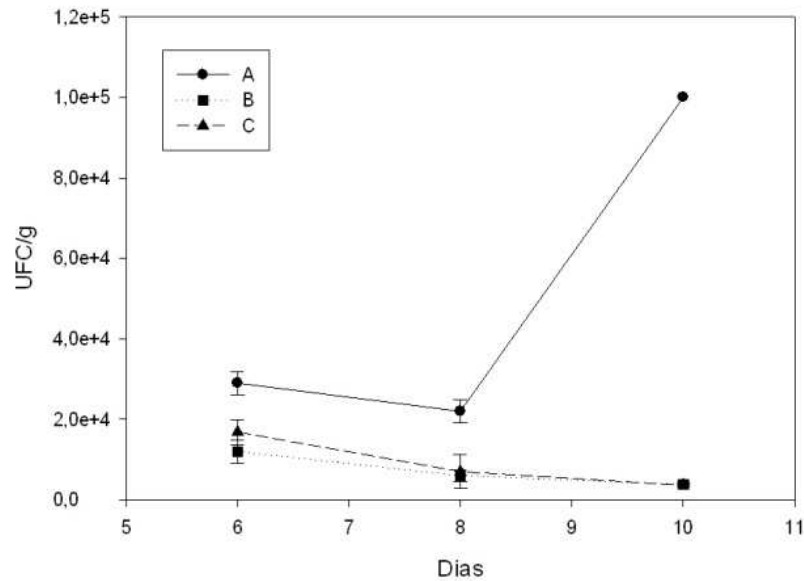
Pela análise estatística dos dados obtidos é possível inferir que os morangos revestidos não mostraram diferenças significativas face ao grupo de controlo ( $P < 0,05$ ).

No último momento da simulação (segundo dia após a primeira infecção no grupo A) é possível observar um aumento significativo do número de unidades formadoras de colónias contabilizadas no grupo de controlo, face aos comportamentos constante (C) e decrescente (B), registados nos morangos revestidos.

Os resultados permitem afirmar que os revestimentos não foram eficientes na diminuição da flora total do morango, algo que contraria o esperado com base nos dados da bibliografia (Campaniello et al., 2008, Goy et al., 2009, Martinez-Romero et al., 2006, Valverde et al., 2005).

#### 4.2.3.2. Fungos e Leveduras

No gráfico apresentado na Figura 4.15 é possível observar os resultados obtidos através da contagem de fungos e leveduras, particularmente relevantes no caso de estudo, cultivados em três momentos da segunda simulação.



**Figura 4.15** | Gráfico representativo da média das contagens microbiológicas de fungos e leveduras, durante os dias da simulação.

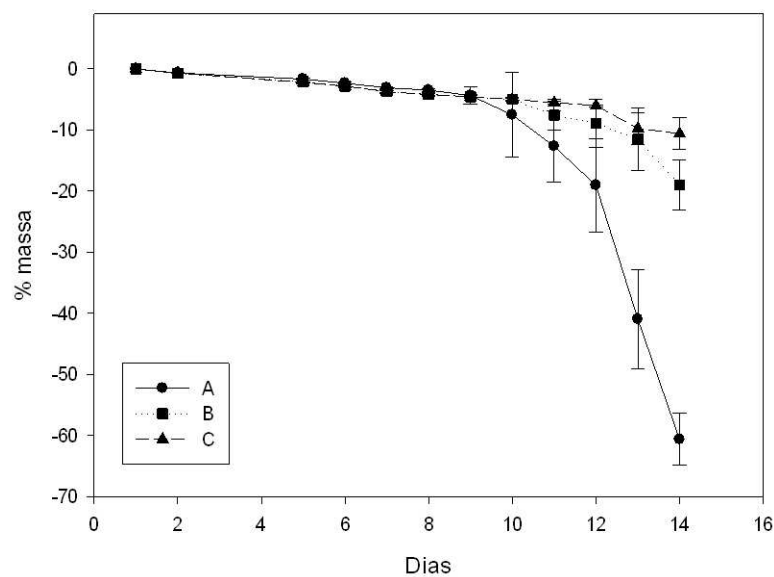
Pela análise estatística dos dados é possível afirmar que ambos os revestimentos aplicados diminuiriam efectivamente o desenvolvimento de fungos e leveduras durante todos os dias analisados, comparativamente ao grupo controlo ( $P < 0,05$ ). No que diz respeito às diferenças entre os dois revestimentos, não foram detectadas diferenças significativas entre ambos ( $P > 0,05$ ).

Os resultados obtidos confirmam a acção anti-fúngica dos materiais utilizados como revestimento (*Aloe vera* e quitosano). No entanto, o facto de não terem sido detectadas diferenças significativas entre as duas amostras contendo diferentes quantidades de *Aloe vera*, mostra que as diferenças verificadas no retardamento do dia da primeira infecção (Figura 4.12), não se devem apenas à actividade anti-fúngica do revestimento. É possível ainda verificar que o aumento registado entre as últimas duas análises (segundo dia após a primeira infecção no grupo A) dos fungos e leveduras contribuiu em apenas 35% do aumento registado nos microrganismos totais durante o mesmo intervalo, sugerindo assim que as infecções, apesar de visualmente indicarem ser de origem fúngica, estarão fortemente relacionadas com a proliferação bacteriológica.



#### 4.2.4. Alterações mássicas

O gráfico apresentado na Figura 4.16, representa a percentagem média das perdas totais de massa registadas, incluindo a massa dos morangos retirados devido a infecções, durante todo o período em que decorreu a simulação. Este gráfico pretende mostrar o potencial de redução do desperdício mássico de morangos, por parte dos revestimentos aplicados.



**Figura 4.16** | Gráfico representativo da percentagem de perdas de massa totais (incluindo os morangos infectados retirados).

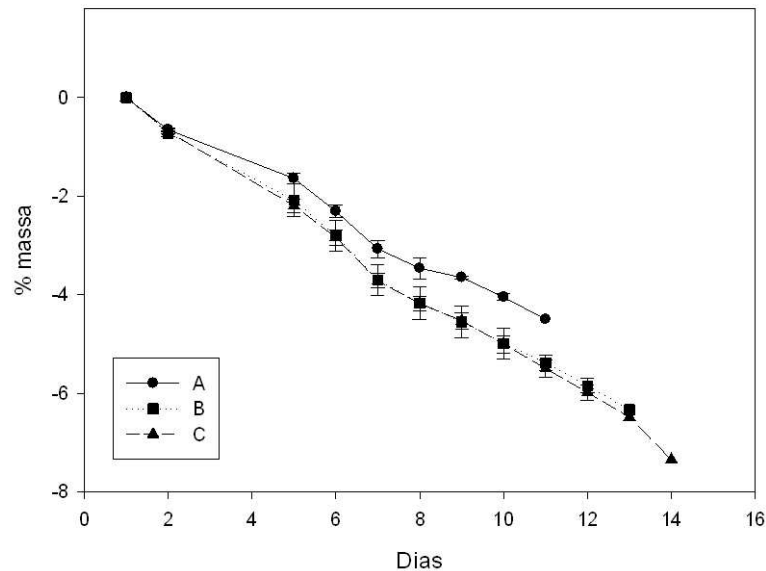
Pela análise do gráfico é facilmente detectada a grande diferença entre as perdas registadas no grupo de controlo (60,6% no último dia de análise) e as perdas registadas nos grupos em que foram aplicados revestimentos (19,0% no grupo B e 10,6% no grupo C, no último dia de análise). A análise estatística mostra que há diferenças significativas entre os dois revestimentos no último dia de análise ( $P > 0,05$ ).

A análise dos dados obtidos permite concluir que os revestimentos aplicados mostram um grande potencial na redução do desperdício, causado por infecções, a partir do nono dia pós-colheita.

O gráfico apresentado na Figura 4.17, representa a percentagem média das perdas totais de massa registadas por cada grupo de tratamentos, até ao momento da ocorrência da primeira infecção em cada cuvette. Estes valores obtidos estão



correlacionados com perda de água por parte dos morangos, durante o período de pós-colheita.



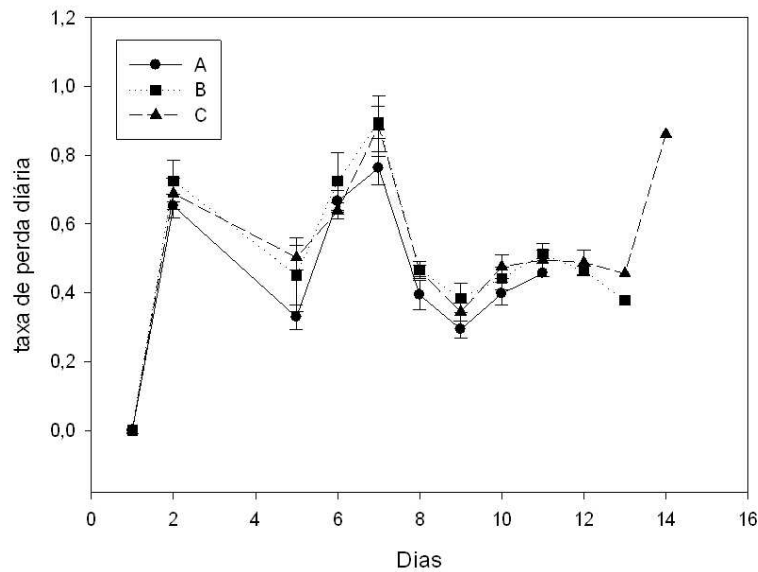
**Figura 4.17** | Gráfico representativo da percentagem de perda de massa total até ao registo de uma infecção.

Pela análise estatística dos dados obtidos, é possível afirmar que os revestimentos aplicados causaram diferenças significativas na percentagem de massa perdida, face ao grupo controlo ( $P < 0,05$ ). Não são no entanto detectadas diferenças significativas entre os morangos tratados com os diferentes revestimentos ( $P > 0,05$ ).

Com base nestes resultados, é possível confirmar que os revestimentos induziram a uma perda de massa superior ao longo do tempo.

Com o objectivo de clarificar os resultados obtidos, foi calculada a velocidade de perda de massa, pelo quociente entre a diferença da percentagem de massa perdida entre cada momento de análise e o momento anterior, e o número de dias entre as análises, tal como explicado anteriormente. Assim, o gráfico apresentado na Figura 4.18 pretende comparar as taxas de perdas registadas, em função de cada momento de análise.





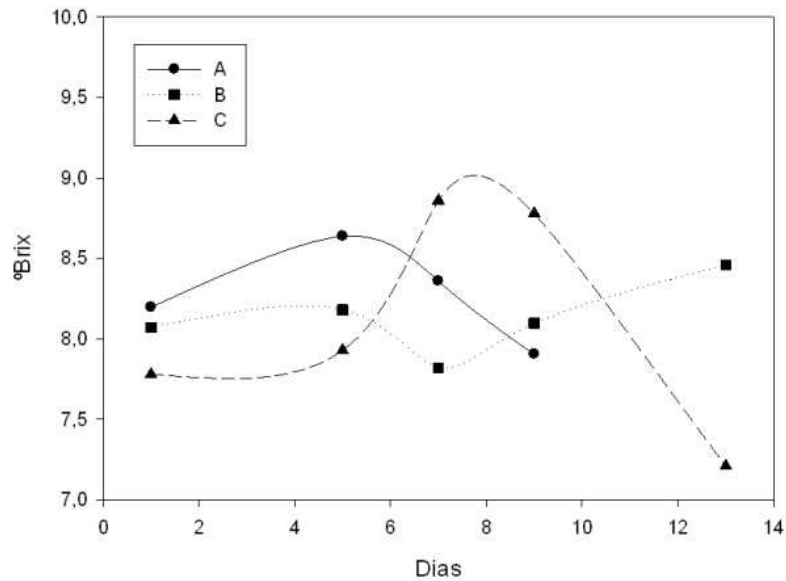
**Figura 4.18** | Representação gráfica da taxa de perda de massa diária.

Através da análise do gráfico apresentado é possível verificar que as amostras revestidas apenas apresentaram diferenças substanciais na taxa de perda mássica, comparativamente com a amostra controlo, entre o segundo e o sétimo dia. Durante os restantes momentos de análise, o comportamento observado e os valores obtidos são semelhantes entre todas as amostras, verificando-se que todos os morangos revestidos apresentam taxas de perda mais elevadas.

Estes dados, conjugados com o facto das amostras terem sido sujeitas a um período alargado de secagem, permitiram rejeitar a hipótese formulada na primeira simulação, que sugeria que o factor responsável pelo aumento elevado das taxas de perda de massa das amostras revestidas, no período inicial de armazenamento, fosse a secagem incompleta dos revestimentos.

#### 4.2.5. Total de sólidos solúveis

O gráfico apresentado na Figura 4.19 mostra a evolução da quantidade de sólidos solúveis registada nos vários grupos, durante o período de armazenamento. É importante destacar que no momento da última análise (dia 13), a amostra controlo (A) não foi analisada devido a terem sido retirados uma quantidade significativa de morangos devido a infecções e, assim, a análise dos morangos não infectados nesta altura poder induzir em erro.



**Figura 4.19** | Representação gráfica da alteração do total de sólidos solúveis durante os dias da simulação.

Pela análise dos dados é possível encontrar, à semelhança da simulação anterior, grandes diferenças relativamente ao comportamento evolutivo da quantidade de sólidos solúveis entre as várias amostras testadas.

Comparando os dados obtidos na primeira simulação com os dados apresentados, é possível encontrar uma grande semelhança ao nível do perfil do comportamento apresentado pela amostra controlo (A). No que diz respeito à amostra B (0,8% de quitosano + 0,125% *Aloe vera*), apenas o pico de crescimento inicial registado na primeira simulação não é agora observado, podendo no entanto ter acontecido no intervalo entre o primeiro e o quinto dia, sendo que nos restantes dias foi verificado um perfil de comportamento semelhante. Por fim, a amostra C (0,8% de quitosano + 0,25% *Aloe vera*) mostrou também um perfil evolutivo semelhante, à excepção da ligeira queda inicial que ocorreu na primeira simulação, podendo no entanto ter acontecido nesta segunda simulação no intervalo compreendido entre as primeira duas medições, não sendo por isso identificável no gráfico.

Para além destes aspectos, é possível observar que, à semelhança do que aconteceu na primeira simulação, ambos os revestimentos mostraram valores de TSS inferiores ao grupo A (controlo) em vários dias de análise, apesar da perda de água ter sido significativamente superior (Figura 4.17) em todos os momentos testados. Este facto

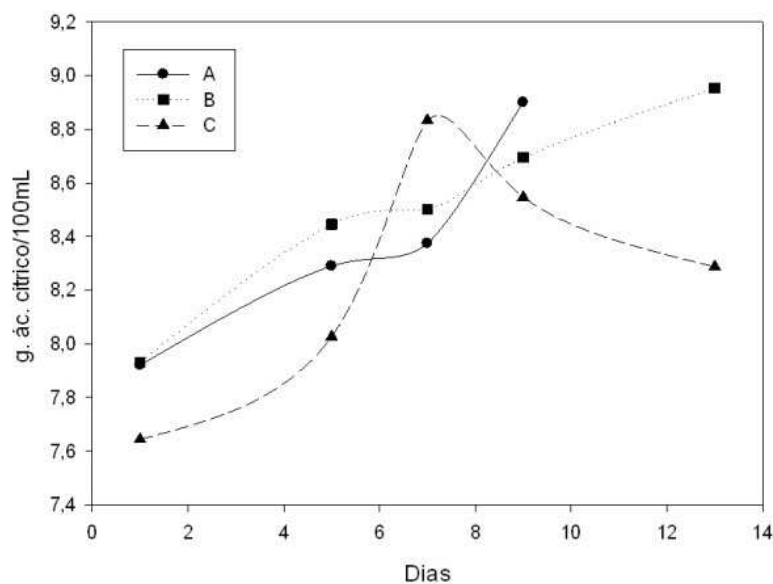


sustenta a observação efectuada no decurso da primeira simulação, sugerindo que os revestimentos mostraram indícios de terem reduzido a solubilização característica de polissacarídeos da parede celular e/ou ter aumentado a sua metabolização energética (gasto de polissacarídeos).

Outra observação que pode ser constatada através da análise da evolução do TSS ao longo do tempo, em ambas as simulações, é o facto de a amostra B (quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,125%) não ter mostrado sinais da queda final, característica do período de senescência, enquanto que a amostra C (quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,25%), mostrou uma queda acentuada nos últimos dois dias de armazenamento.

#### 4.2.6. Acidez titulável

O gráfico apresentado na Figura 4.20 mostra a evolução da acidez titulável registada nos vários grupos, durante o período de armazenamento.



**Figura 4.20** | Representação gráfica das alterações registadas na acidez titulável durante os dias da simulação.

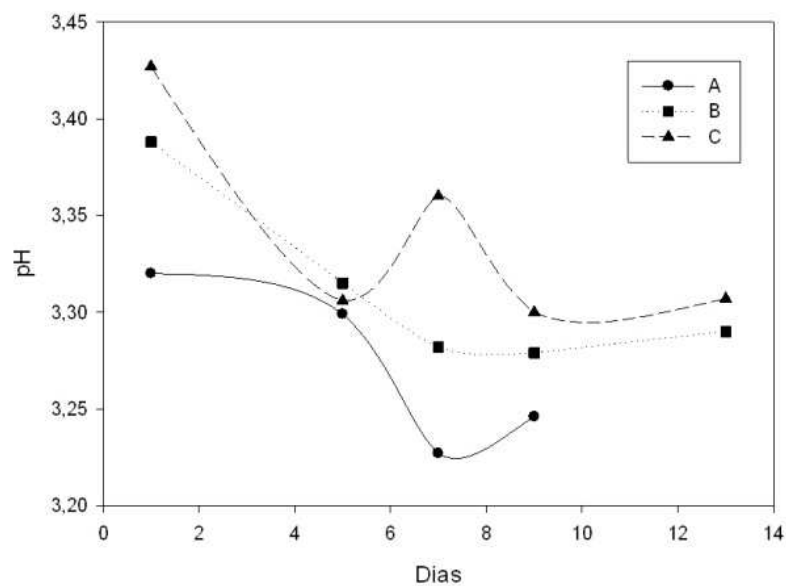
A análise da acidez titulável mostrou que os morangos aumentaram a sua concentração de ácidos orgânicos ao longo de todo o período de pós-colheita, à excepção da amostra contendo uma quantidade superior de *Aloe vera* (C), em que se registou um decréscimo acentuado entra a penúltima e última análise.



Para além destes aspectos é possível observar que, à semelhança do que aconteceu na primeira simulação, o grupo C (quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,25%), mostrou concentrações de ácidos inferiores ao grupo A (controlo), em quase todos os momentos testados (excepto no dia 7), apesar da perda de água ter sido significativamente superior (Figura 4.17) em todos os momentos testados. Este facto sustenta a observação efectuada no decurso da primeira simulação, sugerindo que este revestimento induziu a um consumo adicional de ácidos orgânicos, provavelmente relacionado com o aumento das reacções enzimáticas inerentes à respiração.

#### 4.2.7. pH

O gráfico apresentado na Figura 4.21 mostra a evolução do pH registado na polpa dos vários grupos, em função dos dias de análise.



**Figura 4.21** | Representação gráfica das alterações registadas no pH durante os dias da simulação.

A análise dos dados referentes aos valores obtidos pela análise do pH da polpa do fruto mostra que os revestimentos aplicados produziram alterações no perfil evolutivo da acidez da polpa. Os resultados demonstram ainda que, apesar dos revestimentos terem controlado a incidência infecciosa, provocaram uma diminuição da acidez dos frutos ao longo de todos os dias analisados, podendo assim aumentar a sua susceptibilidade a ataques microbiológicos.

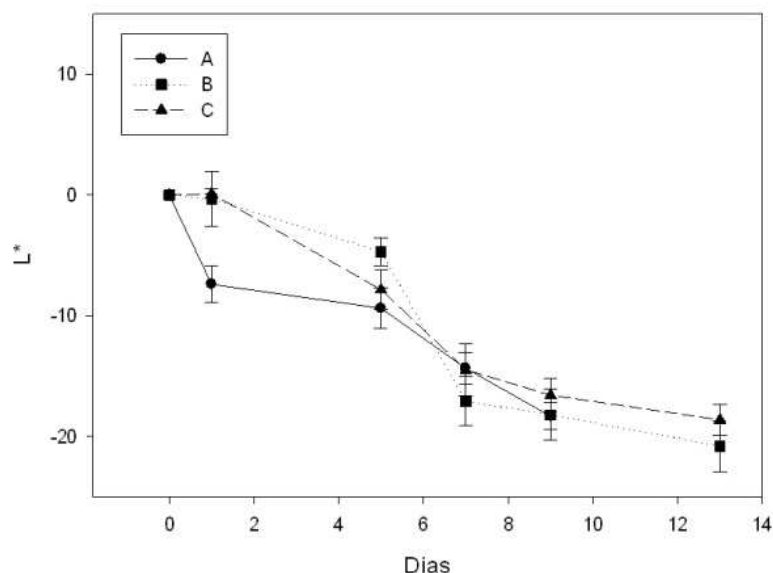


#### 4.2.8. Cor

Nos subcapítulos seguintes serão avaliadas as alterações das três coordenadas cromáticas do modelo CIELAB, obtidas através de análise de visão computadorizada.

##### 4.2.8.1. L\*

O gráfico apresentado na Figura 4.22 mostra a média das alterações percentuais da coordenada L\* registada nos vários grupos, tendo como referência inicial os morangos antes de serem sujeitos à aplicação dos revestimentos.



**Figura 4.22** | Gráfico representativo da média do valor da coordenada L\* obtida, em função dos dias da simulação.

Através da análise dos dados obtidos relativos a esta coordenada, é possível afirmar, com base em testes estatísticos, que ambos os revestimentos provocaram resultados significativamente diferentes da amostra controlo ( $P < 0,05$ ). Entre as amostras B e C não são detectadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ).

Com base na análise gráfica é possível observar que a aplicação dos revestimentos produziu, imediatamente após a sua secagem, uma melhoria da luminosidade nos morangos face ao apresentado pelo grupo controlo. Este efeito dever-se-á provavelmente ao aspecto brilhante conferido por este género de revestimentos.

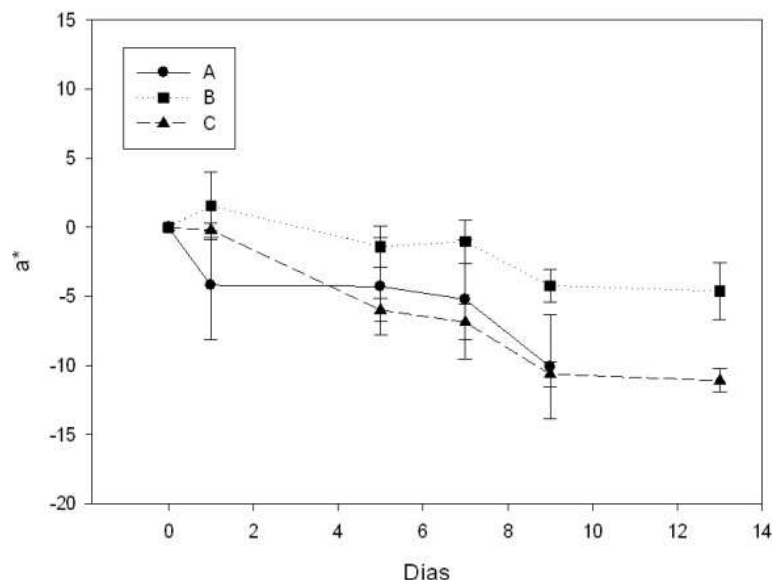


Para além disso é possível verificar que apenas o revestimento C (quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,25%), mostrou ter efeitos benéficos na manutenção desta coordenada ao longo de todo o tempo em que ocorreram as análises.

Estes resultados ficaram bastante aquém do esperado, visto terem sido encontrados indícios na bibliografia (Hernandez-Munoz et al., 2008, Hernandez-Munoz et al., 2006, Valverde et al., 2005), que sugeriam melhorias inequívocas das coordenadas cromáticas apresentadas pelos frutos revestidos, ao longo de todo o período de pós-colheita. No entanto, é necessário ter em atenção que o tempo de pós-colheita analisado foi aumentado consideravelmente em relação às simulações com morangos apresentadas na bibliografia, e que a actividade da enzima oxidativa de compostos fenólicos, a polifenoloxidase, aumenta quando os frutos perdem mais água (Dang et al., 2010).

#### 4.2.8.2. a\*

O gráfico apresentado na Figura 4.23 mostra a média das alterações percentuais da coordenada a\* registada nos vários grupos estudados, tendo como referência inicial os morangos antes de serem sujeitos à aplicação dos revestimentos.



**Figura 4.23** | Gráfico representativo da média do valor da coordenada a\* obtida, em função dos dias da simulação.

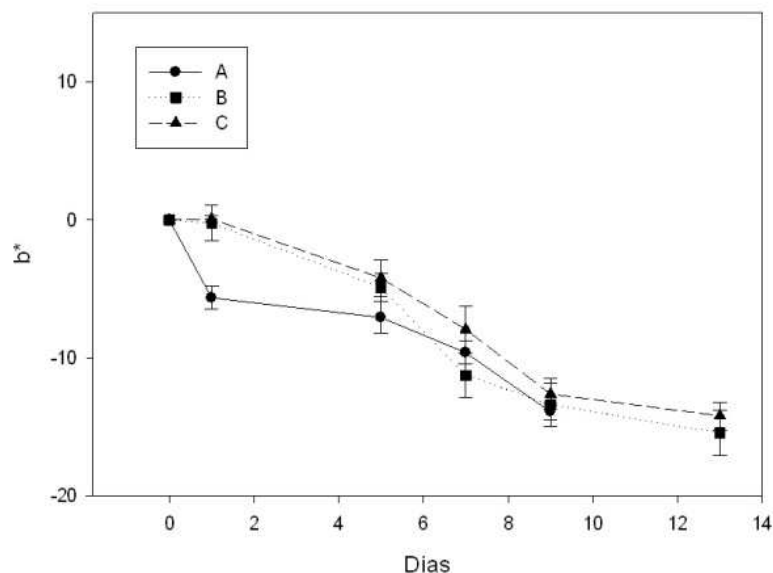


Através da análise dos dados obtidos relativos a esta coordenada é possível afirmar, com base em testes estatísticos, que o revestimento B provocou resultados significativamente diferentes da amostra controlo e da amostra C ( $P < 0,05$ ).

Com base na análise gráfica, é possível observar que a aplicação dos revestimentos conduziu, no período inicial, imediatamente após a secagem, a uma manutenção significativa da cor vermelha, face ao grupo controlo. No entanto, é possível observar que o revestimento B (quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,125%), induziu a uma melhoria bastante relevante ao longo de todos os dias analisados, enquanto que o grupo C (quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,25%) mostrou ter um efeito pejorativo na manutenção desta característica visual, a partir do terceiro momento de medição.

#### 4.2.8.3. b\*

O gráfico apresentado na Figura 4.24 mostra a média das alterações percentuais da coordenada  $a^*$  registada nos vários grupos, tendo como referencia inicial os morangos antes de serem sujeitos à aplicação dos revestimentos.



**Figura 4.24** | Gráfico representativo da média do valor da coordenada  $b^*$  obtida, em função dos dias da simulação.

Através da análise dos dados obtidos relativos a esta coordenada, é possível afirmar, com base em testes estatísticos, que ambos os revestimentos provocaram resultados



significativamente diferentes tanto entre si como em comparação com a amostra controlo ( $P < 0,05$ ).

Com base na análise gráfica é possível verificar que ambos os revestimentos mostraram melhorias significativas na manutenção da cor amarela do morango, no período inicial de armazenamento. No entanto, as diferenças entre estes grupos e o grupo controlo parece diminuir ao longo do tempo, chegando-se mesmo a registar valores médios inferiores na amostra B (quitosano 0,8% + *Aloe vera* 0,125%), a partir do dia 7.

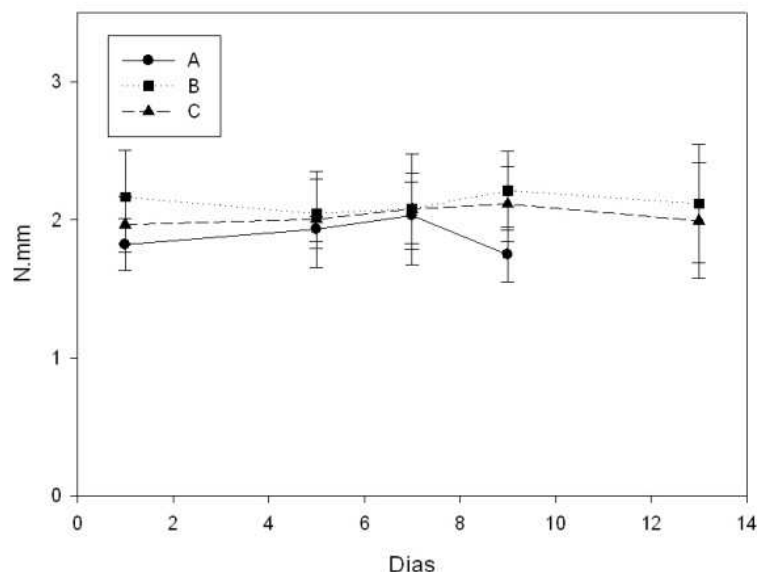
#### **4.2.9. Textura**

Nos próximos subcapítulos serão apresentados os resultados obtidos com o intuito de avaliar as potencialidades dos revestimentos aplicados na conservação das características texturais dos morangos.

##### **4.2.9.1. Textura média**

De modo a comparar a resistência apresentada pelos morangos aquando da perfuração, foi quantificada a quantidade de energia necessária para perfurar os frutos até aos 5 milímetros de profundidade, sendo classificado este valor como um indicador da textura média. O gráfico apresentado na Figura 4.25 representa a média dos valores obtidos em cada grupo de morangos testado, no cálculo da textura média, durante os dias de análise.





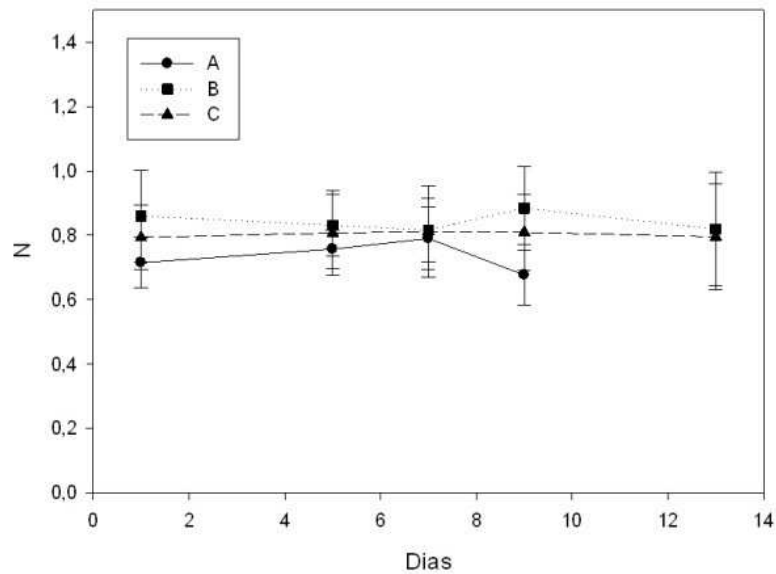
**Figura 4.25** | Representação gráfica dos valores médios obtidos através do cálculo da área gráfica proveniente do analisador de textura, em função dos dias da simulação.

Pela análise estatística dos dados é possível verificar que todos os morangos revestidos mostraram diferenças significativas ao nível dos valores obtidos na análise da textura média, face ao grupo controlo ( $P < 0,05$ ). No entanto não existem diferenças significativas entre a amostra B e C ( $P > 0,05$ ).

Com base nos resultados obtidos e tendo em conta os resultados obtidos na primeira simulação, é possível inferir que os revestimentos aplicados proporcionaram melhorias ao nível da manutenção da textura média dos morangos. A amostra B (quitosano 0,8%+ *Aloe vera* 0,125%) mostrou valores médios superiores a todos os grupos, ao longo de todo o tempo de análise.

#### 4.2.9.2. Força máxima de ruptura

O gráfico apresentado na Figura 4.26 representa a média da força máxima de ruptura verificada em cada grupo de morangos testado, durante os dias de análise.



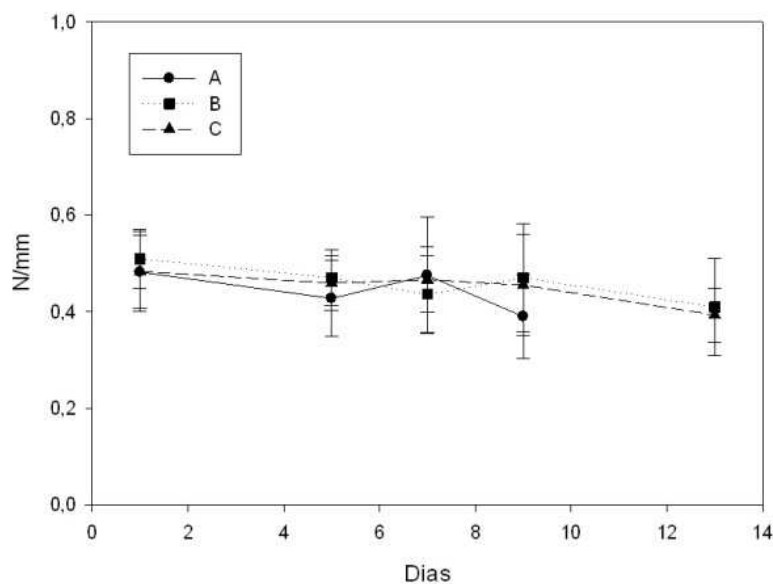
**Figura 4.26** | Representação gráfica dos valores médios da força necessária à ruptura da pele dos morangos, em função dos dias da simulação.

Pela análise estatística dos dados é possível verificar que ambos os grupos revestidos mostraram diferenças significativas, face ao grupo controlo ( $P < 0,05$ ). Não existindo diferenças significativas entre a amostra B e C ( $P > 0,05$ ).

Com base nestes resultados e tendo em conta os resultados obtidos na primeira simulação, é possível inferir que os revestimentos aplicados proporcionaram melhorias, ao nível da manutenção da resistência demonstrada pela pele, face ao grupo controlo. A amostra B (quitosano 0,8%+ *Aloe vera* 0,125%) mostrou valores médios superiores a todos os grupos, ao longo de todo o tempo de análise.

#### 4.2.9.3. Módulo de Young

O gráfico apresentado na Figura 4.27, representa a média do módulo de Young obtido em cada grupo de morangos testado, durante os dias de análise.



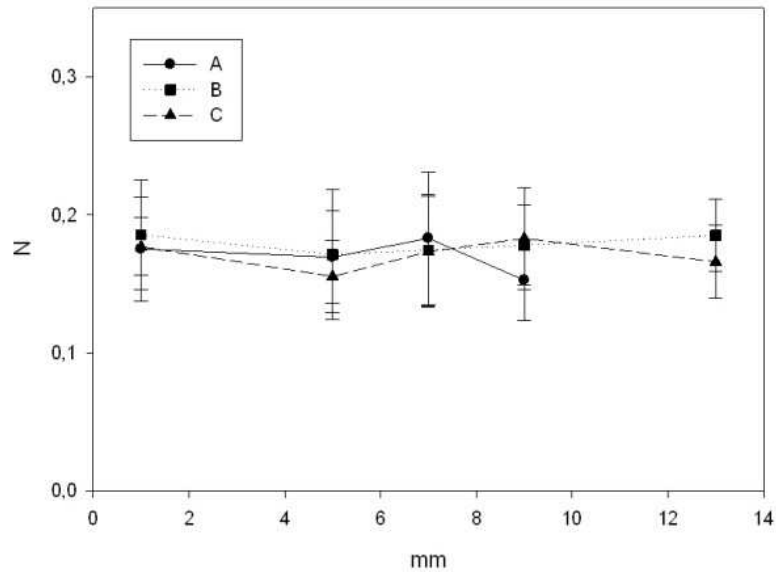
**Figura 4.27** | Representação gráfica dos valores médios registados através do cálculo do declive da zona linear de crescimento do pico de ruptura, em função dos dias da simulação.

Os testes estatísticos sugerem que não há diferenças significativas entre as amostras ( $P > 0,05$ ). No entanto, com base na análise das médias, é possível observar que os morangos revestidos mostraram valores médios do módulo da elasticidade ligeiramente superiores, durante todos os dias testados, excepto no dia sete, apesar dos morangos revestidos terem mostrado perdas de água significativamente superiores.

Com base nos resultados obtidos e tendo em conta os resultados obtidos na primeira simulação, são dadas indicações de que os revestimentos aplicados podem proporcionar melhorias ao nível da manutenção da elasticidade dos morangos.

#### 4.2.9.4. Textura interna

O gráfico apresentado na Figura 4.11 representa a média dos valores correspondentes à textura interior, obtidos em cada grupo de morangos testado, durante os dias de análise.



**Figura 4.28** | Representação gráfica dos valores médios da força mínima obtida na zona média interior, em função dos dias da simulação.

Os testes estatísticos sugerem que não há diferenças significativas entre as amostras ( $P > 0,05$ ). No entanto, com base na análise das médias, é possível observar que os morangos revestidos mostraram valores médios da textura interior inferiores, durante todos os dias testados, excepto no dia nove. No entanto é necessário ter em conta que os morangos revestidos apresentaram perdas de água superiores ao longo de toda a simulação, influenciando assim a análise dos resultados.

Assim, tendo em conta que na primeira simulação foram detectadas melhorias ao nível deste parâmetro, os resultados obtidos não são conclusivos quanto ao papel que os revestimentos de *Aloe vera* e quitosano desempenham relativamente à textura interna dos morangos.



## **Capítulo 5**

Conclusões e Recomendações

---





### **5.1. Conclusões**

A aplicação de revestimentos comestíveis baseados em *Aloe vera* e quitosano em morangos mostrou um grande potencial relativamente a um aumento do período de comestibilidade destes frutos, desde que este método seja aplicado conjuntamente com métodos de armazenamento eficientes.

O trabalho desenvolvido permitiu mostrar grande potencial de eficiência destes revestimentos no controlo anti-fúngico, causa primordial de desperdícios no período de pós-colheita dos morangos. Esta eficácia foi comprovada, por um lado, pela diminuição de infecções registadas ao longo do tempo, por outro, através da análise microbiológica durante o período de pós-colheita, e reflecte-se num incremento bastante significativo do tempo de vida útil do morango e, assim, numa diminuição das elevadas taxas de perdas comuns neste fruto.

Um aspecto interessante deste trabalho prendeu-se com a observação de taxas de perdas de massa superiores nos frutos revestidos, comparativamente a frutos sem qualquer tipo de tratamento, contrariando as constatações observadas por vários autores que se debruçaram sobre o mesmo método. Este aspecto, correlacionado com os resultados obtidos na análise das alterações ocorridas ao nível do total de sólidos e da acidez titulável, sugere que os revestimentos induziram a um aumento do metabolismo energético, por parte dos frutos.

Foram encontrados indícios de melhoria na manutenção das características texturais dos frutos, especialmente ao nível externo e médio interior. Esta manutenção, conjugada com o aumento da taxa de perdas de água registadas, comprova que a acção dos revestimentos na manutenção da textura dos morangos vai para além do controlo do turgor celular, sugerindo assim uma acção sobre os processos enzimáticos e/ou metabólicos responsáveis pela degradação da textura.

Ao nível das alterações cromáticas, foi constatado um efeito pró-activo dos revestimentos na manutenção das características cromáticas iniciais. No entanto, não é possível inferir que os revestimentos realmente produzam melhorias ao nível das características visuais, ao longo de todo tempo de armazenamento. Os resultados sugeriram que os revestimentos provocaram uma alteração no perfil de desenvolvimento do aspecto visual, não sendo estas alterações necessariamente benéficas.





Com base nestas conclusões é possível detectar um grande potencial de aplicação deste género de revestimentos comestíveis, com vista ao aumento do período de vida útil e melhorias ao nível da manutenção de várias características qualitativas de morangos.

## **5.2. Sugestão para trabalhos futuros**

Com base nas limitações detectadas por parte dos revestimentos aplicados ao nível do efeito barreira contra a evaporação de água, seria interessante testar a permeabilidade aquosa destes revestimentos, bem como o efeito da adição de plastificantes sobre a capacidade de formação de um filme eficiente baseado nesta matriz, na superfície do morango.

De modo a confirmar o mecanismo de acção destes revestimentos sobre o metabolismo dos frutos, seria importante analisar as alterações ocorridas na taxa de respiração, bem como verificar as alterações ocorridas ao nível das quantidades de metabolitos indicadores de fermentação anaeróbia. Como complemento a este tipo de análise, seria interessante avaliar sensorialmente a influência da aplicação destes revestimentos sobre a alteração do perfil sensorial, especialmente ao nível da doçura e da presença de sabores estranhos.

Por fim, é proposto testar concentrações de *Aloe vera* no intervalo entre os 0,125% e os 0,25%, visto que os resultados deste trabalho sugerem que será nesse intervalo que os revestimentos terão maior potencialidade de sucesso, quando aplicados em morangos.

## **Capítulo 6** Bibliografía

---





AHMED, M. J., SINGH, Z. & KHAN, A. S. 2009. Postharvest *Aloe vera* gel-coating modulates fruit ripening and quality of 'Arctic Snow' nectarine kept in ambient and cold storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1024-1033.

AIDER, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Lwt-Food Science and Technology*, 43, 837-842.

ALMENAR, E., HERNANDEZ-MUNOZ, P. & GAVARA, R. 2009. Evolution of Selected Volatiles in Chitosan-Coated Strawberries (*Fragaria x ananassa*) during Refrigerated Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 974-980.

ANRAKU, M., FUJII, T., FURUTANI, N., KADOWAKI, D., MARUYAMA, T., OTAGIRI, M., GEBICKI, J. M. & TOMIDA, H. 2009. Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 104-109.

AOAC. 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed., P.A. Cunniff (Ed.) AOAC International, Gaithersburg, MD.

ARORA, D., GOYAL, M. & AGARWAL, R. P. 2009. Efficacy of *Aloe vera* juice consumption on glycemic response in Type-2 diabetic patients. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 46, 160-162.

AZEVEDO, S. 2007. Estudo de taxas de respiração e de factores de qualidade na conservação de morango fresco (*Fragaria x ananassa Duch.*). Dissertação apresentada à Universidade Aberta para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Consumo Alimentar.

AZODANLOU, R., DARBELLAY, C., LUISIER, J. L., VILLETIAZ, J. C. & AMADO, R. 2004. Changes in flavour and texture during the ripening of strawberries. *European Food Research and Technology*, 218, 167-172.

BADAWY, M. E. I. & RABEA, E. I. 2009. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 110-117.

BAI, J. H., HAGENMAIER, R. D. & BALDWIN, E. A. 2003. Coating selection for 'Delicious' and other apples. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 381-390.

BALDWIN, E. A., BURNS, J. K., KAZOKAS, W., BRECHT, J. K., HAGENMAIER, R. D., BENDER, R. J. & PESIS, E. 1999. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica L.*) ripening during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 215-226.

BOUDREAU, M. D. & BELAND, F. A. 2006. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. *Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 24, 103-154.



CAMPANIELLO, D., BEVILACQUA, A., SINIGAGLIA, M. & CORBO, M. R. 2008. Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. *Food Microbiol*, 25, 992-1000.

CARNEIRO, J. 2009. *Desenvolvimento de novos materiais por modificação química do quitosano* Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis.

CERTEL, M., USLU, M. K. & OZDEMIR, F. 2004. Effects of sodium caseinate- and milk protein concentrate-based edible coatings on the postharvest quality of Bing cherries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1229-1234.

CHENG, G. P., DUAN, X. W., SHI, J., LU, W. J., LUO, Y. B., JIANG, W. B. & JIANG, Y. M. 2008. Effects of reactive oxygen species on cellular wall disassembly of banana fruit during ripening. *Food Chemistry*, 109, 319-324.

COLE, L. & HEARD, C. 2007. Skin permeation enhancement potential of Aloe Vera and a proposed mechanism of action based upon size exclusion and pull effect. *International Journal of Pharmaceutics*, 333, 10-16.

DANG, K. T. H., SINGH, Z. & SWINNY, E. E. 2008. Edible coatings influence fruit ripening, quality, and aroma biosynthesis in mango fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 1361-1370.

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, S125-S131.

DARROW 1967. *The Strawberry: History, Breeding and Physiology*, Holt, Rinehart and Winston, New York.

DE SILVA, L. C., PEREIRA, A., PUNCHIHEWA, A. 2005. Food Classification using Color Imaging. *Conference on Image and Vision Computing New Zealand* Massey University.

DEVLIEGHERE, F., VERMEULEN, A. & DEBEVERE, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.

DONG, H., CHENG, L., TAN, J., ZHENG, K. & JIANG, Y. 2004. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *Journal of Food Engineering*, 64, 355-358.

EMBUSCADO, M. E., HUBER, K. C. 2009. *Edible Films and Coatings for Food Applications*, Dordrecht ; London, Springer.

ESHGHI, F., HOSSEINIMEHR, S. J., RAHMANI, N., KHADEMLOO, M., NOROZI, M. S. & HOJATI, O. 2010. Effects of Aloe vera Cream on Posthemorrhoidectomy Pain and Wound Healing: Results of a Randomized, Blind, Placebo-Control Study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16, 647-650.



FAO 2010. Statistical Yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

FEMENIA, A., SÁNCHEZ, E., SIMAL, S. & ROSSELLÓ, C. 1999. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate polymers*, 39, 109-117.

FIGUEROA, C. R., ROSLI, H. G., CIVELLO, P. M., MARTINEZ, G. A., HERRERA, R. & MOYA-LEON, M. A. 2010. Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria xananassa* fruits. *Scientia Horticulturae*, 124, 454-462.

FOLTA, K. M., GARDINER, S. E. 2009. *Genetics and genomics of rosaceae*, New York, Springer.

GONZALEZ-AGUILAR, G. A., VALENZUELA-SOTO, E., LIZARDI-MENDOZA, J., GOYCOOLEA, F., MARTINEZ-TELLEZ, M. A., VILLEGAS-OCHOA, M. A., MONROY-GARCIA, I. N. & AYALA-ZAVALA, J. F. 2009. Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya 'Maradol'. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 15-23.

GOY, R. C., DE BRITTO, D. & ASSIS, O. B. G. 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros-Ciência E Tecnologia*, 19, 241-247.

GRIESSER, M., HOFFMANN, T., BELLIDO, M. L., ROSATI, C., FINK, B., KURTZER, R., AHARONI, A., MUNOZ-BLANCO, J. & SCHWAB, W. 2008. Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*, 146, 1528-1539.

HABEEB, F., SHAKIR, E., BRADBURY, F., CAMERON, P., TARAVATI, M. R., DRUMMOND, A. J., GRAY, A. I. & FERRO, V. A. 2007. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of *Aloe vera* inner gel. *Methods*, 42, 315-320.

HALBWIRTH, H., PUHL, I., HAAS, U., JEZIK, K., TREUTTER, D. & STICH, K. 2006. Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1479-1485.

HAMMAN, J. H. 2008. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules*, 13, 1599-1616.

HAN, C., LEDERER, C., MCDANIEL, M. & ZHAO, Y. 2005. Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. *Journal of Food Science*, 70, S172-S178.

HAN, C., ZHAO, Y., LEONARD, S. & TRABER, M. 2004. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33, 67-78.

HENNION, B. VESCHAMBRE, D. 1997. *La fraise: maîtrise de la production*, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes. Paris.



HERNANDEZ-LAUZARDO, A. N., BAUTISTA-BANOS, S., VALLE, M. G. V. D., MENDEZ-MONTEALVO, M. G., SANCHEZ-RIVERA, M. M. & BELLO-PEREZ, L. A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Carbohydrate polymers*, 73, 541-547.

HERNANDEZ-MUNOZ, P., ALMENAR, E., DEL VALLE, V., VELEZ, D. & GAVARA, R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110, 428-435.

HERNANDEZ-MUNOZ, P., ALMENAR, E., OCIO, M. & GAVARA, R. 2006. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*, 39, 247-253.

HUANG, R., MENDIS, E., RAJAPAKSE, N. & KIM, S. K. 2006. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sciences*, 78, 2399-2408.

HUTTER, J. A., SALMAN, M., STAVINOHA, W. B., SATSANGI, N., WILLIAMS, R. F., STREEPER, R. T. & WEINTRAUB, S. T. 1996. Antiinflammatory C-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *Journal of Natural Products*, 59, 541-543.

HWANG, K. T., KIM, J. T., JUNG, S. T., CHO, G. S. & PARK, H. J. 2003. Properties of chitosan-based biopolymer films with various degrees of deacetylation and molecular weights. *Journal of Applied Polymer Science*, 89, 3476-3484.

IANNETTA, P. P. M., LAARHOVEN, L. J., MEDINA-ESCOBAR, N., JAMES, E. K., MCMANUS, M. T., DAVIES, H. V. & HARREN, F. J. M. 2006. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*, 127, 247-259.

INE 2009. Estatísticas Agrícolas de 2008. Portugal: Instituto Nacional de Estatística.

JETTANACHEAWCHANKIT, S., SASITHANASATE, S., SANGVANICH, P., BANLUNARA, W. & THUNYAKITPISAL, P. 2009. Acemannan Stimulates Gingival Fibroblast Proliferation; Expressions of Keratinocyte Growth Factor-1, Vascular Endothelial Growth Factor, and Type I Collagen; and Wound Healing. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109, 525-531.

KANG, S. P., EAST, A. R. & TRUJILLO, F. J. 2008. Colour vision system evaluation of bicolour fruit: A case study with 'B74' mango. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 77-85.

KANG, S. P. & SABAREZ, H. T. 2009. Simple colour image segmentation of bicolour food products for quality measurement. *Journal of Food Engineering*, 94, 21-25.

KOH, T. H. & MELTON, L. D. 2002. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 23-33.



KROCHTA, J. M., BALDWIN, E. A. & NISPEROS-CARRIEDO, M. O. 1994. *Edible coatings and films to improve food quality*, Lancaster, Pa., Technomic.

LANGMEAD, L., MAKINS, R. J. & RAMPTON, D. S. 2004. Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 19, 521-527.

LIAO, F. H., SHIEH, M. J., CHANG, N. C. & CHIEN, Y. W. 2007. Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. *Nutrition Research*, 27, 146-151.

MAAS, J. L., WANG, S. Y. & GALLETTA, G. J. 1991. Evaluation of Strawberry Cultivars for Ellagic Acid Content. *Hortscience*, 26, 66-68.

MAATTA-RIIHINEN, K. R., KAMAL-ELDIN, A. & TORRONEN, A. R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6178-6187.

MARTINEZ-ROMERO, D., ALBURQUERQUE, N., VALVERDE, J., GUILLEN, F., CASTILLO, S., VALERO, D. & SERRANO, M. 2006. Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by *Aloe vera* treatment: A new edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 93-100.

MAZARO, S. M., DESCHAMPS, C., DE MIO, L. L., BIASI, L. A., DE GOUVEA, A. & SAUTTER, C. K. 2008. Post harvest behavior of strawberry fruits after pre harvest treatment with chitosan and acibenzolar-S-methyl. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 185-190.

MENDOZA, F., AGUILERA J., DEJMEK, P. 2005. Predicting Ripening Stages of Bananas (*Musa cavendish*) by Computer Vision. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Post-Harvest Symposium, Vol.1-3, Acta Horticulturae, Book Series, 682: 1363-1369.

MISAWA, E., TANAKA, M., NOMAGUCHI, K., YAMADA, M., TOIDA, T. & IWATSUKI, K. 2008. Administration of phytosterols isolated from aloe vera gel reduce visceral fat mass and improve hyperglycemia in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Diabetes*, 57, A475-A475.

NI, Y., TURNER, D., YATES, K. & TIZARD, I. 2004. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *International immunopharmacology*, 4, 1745-1755.

NINDO, C. I., POWERS, J. R. & TANG, J. 2010. Thermal Properties of *Aloe Vera* Powder and Rheology of Reconstituted Gels. *Transactions of the Asabe*, 53, 1193-1200.

OLIVAS, G. I. & BARBOSA-CANOVAS, G. V. 2005. Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 657-670.

OMAIIA 2009. A Produção e Comercialização do Morango em Portugal. Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares.





PARK, H. J. 1999. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 254-260.

PINELI, L. 2009. *Qualidade e Potencial Antioxidante in vitro de Morangos in Natura e Submetidos a Processamentos*. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasil.

PINTO, L. 2005. *Síntese e Estudo de Derivados do Quitosano com Potencial Interesse Biológico e Ambiental*. Tese de Mestrado. Universidade do Porto.

PRASHANTH, K. V. H. & THARANATHAN, R. N. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 117-131.

RAHMAN, S. 1999. *Handbook of food preservation*, New York, Marcel Dekker.

RAMACHANDRA, C. & SRINIVASA, P. 2008. Processing of Aloe Vera Leaf Gel: A Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3 (2), 502-510.

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, 63-70.

RO, J. Y., KIM, J. Y., PARK, Y. I. & CHUNG, Y. J. 2002. The inhibitory effects of alprogen, Aloe vera single component, on the allergic rhinitis and asthma animal model. *Allergy*, 57, 136-136.

RODRIGUEZ, E. R., MARTIN, J. D. & ROMERO, C. D. 2010. Aloe vera as a Functional Ingredient in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 305-326.

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, 1028-1036.

SALUNKHE, D. K., Kadam, S. S. 1995. *Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing*, Logan, Marcel Dekker Inc., New York.

SAMS, C. E. 1999. Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 249-254.

SANTOS, C. 2006. *Propriedades de Filmes de Quitosano - Influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero*. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.

SENEL, S. & MCCLURE, S. J. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1467-1480.

SERRANO, M., VALVERDE, J., GUILLEN, F., CASTILLO, S., MARTINEZ-ROMERO, D. & VALERO, D. 2006. Use of Aloe vera gel coating preserves the functional properties of table grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 3882-3886.



SEYMOUR, G. B., TAYLOR, J. E. & TUCKER, G. A. 1993. *Biochemistry of fruit ripening*, London, Chapman & Hall.

STRATI, A., PAPOUTSI, Z., LIANIDOU, E. & MOUTSATSOU, P. 2009. Effect of ellagic acid on the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) alpha plus beta plus transcript in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Clinical Biochemistry*, 42, 1358-1362.

STURM, K., KORON, D. & STAMPAR, F. 2003. The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. *Food Chemistry*, 83, 417-422.

TABOLACCI, C., LENTINI, A., MATTIOLI, P., PROVENZANO, B., OLIVERIO, S., CARLOMOSTI, F. & BENINATI, S. 2010. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. *Life Sciences*, 87, 316-324.

TALMADGE, J., CHAVEZ, J., JACOBS, L., MUNGER, C., CHINNAH, T., CHOW, J. T., WILLIAMSON, D. & YATES, K. 2004. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *International immunopharmacology*, 4, 1757-1773.

URL#1:[http://www.ru.nl/tracegasfacility/life\\_science\\_trace/plant\\_physiology/ethylene\\_during/](http://www.ru.nl/tracegasfacility/life_science_trace/plant_physiology/ethylene_during/) (consultado a 12 de Setembro de 2010)

URL#2:[http://en.wikipedia.org/wiki/Ellagic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Ellagic_acid) (consultado a 22 de Setembro de 2010)

URL#3:<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pelargonidina> (consultado a 22 de Setembro de 2010)

URL#4:<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cianidina> (consultado a 22 de Setembro de 2010)

VALVERDE, J., VALERO, D., MARTINEZ-ROMERO, D., GUILLEN, F., CASTILLO, S. & SERRANO, M. 2005. Novel edible coating based on *Aloe vera* gel to maintain table grape quality and safety. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 7807-7813.

VARGAS, M., ALBORS, A., CHIRALT, A. & GONZALEZ-MARTINEZ, C. 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 164-171.

VINSON, J., AL KHARRAT, H. & ANDREOLI, L. 2005. Effect of *Aloe vera* preparations on the human bioavailability of vitamins C and E. *Phytomedicine*, 12, 760-765.

WANI, M. Y., HASAN, N. & MALIK, M. A. 2010. Chitosan and *Aloe Vera*: Two Gifts of Nature. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31, 799-811.

YAGI, A., KABASH, A., OKAMURA, N., HARAGUCHI, H., MOUSTAFA, S. M. & KHALIFA, T. I. 2002. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Medica*, 68, 957-960.

YAM, K. & PAPADAKIS, S. 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61, 137-142.



YANG, E. J., KIM, J. G., KIM, J. Y., KIM, S. C., LEE, N. H. & HYUN, C. G. 2010. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. *Central European Journal of Biology*, 5, 95-102.

YAO, H. T., HUANG, S. Y. & CHIANG, M. T. 2008. A comparative study on hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of high and low molecular weight chitosan in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1525-1534.

ZHU, X., WANG, Q., CAO, J. & JIANG, W. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32, 770-784.

## **Anexos**

---



## Anexo A | Primeira simulação

### 1. Infecções

**Quadro A-1** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
A vs. D	3,667	5	7,702	<0,001	Yes
A vs. E	3,067	5	6,441	<0,001	Yes
A vs. C	2,133	5	4,481	0,021	Yes
A vs. B	1,933	5	4,061	0,045	Yes
B vs. D	1,733	5	3,641	0,091	No
B vs. E	1,133	5	2,380	0,453	Do Not Test
B vs. C	0,200	5	0,420	0,998	Do Not Test
C vs. D	1,533	5	3,221	0,169	Do Not Test
C vs. E	0,933	5	1,960	0,639	Do Not Test
E vs. D	0,600	5	1,260	0,899	Do Not Test

### 2. Alterações mássicas

**Quadro A-2** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

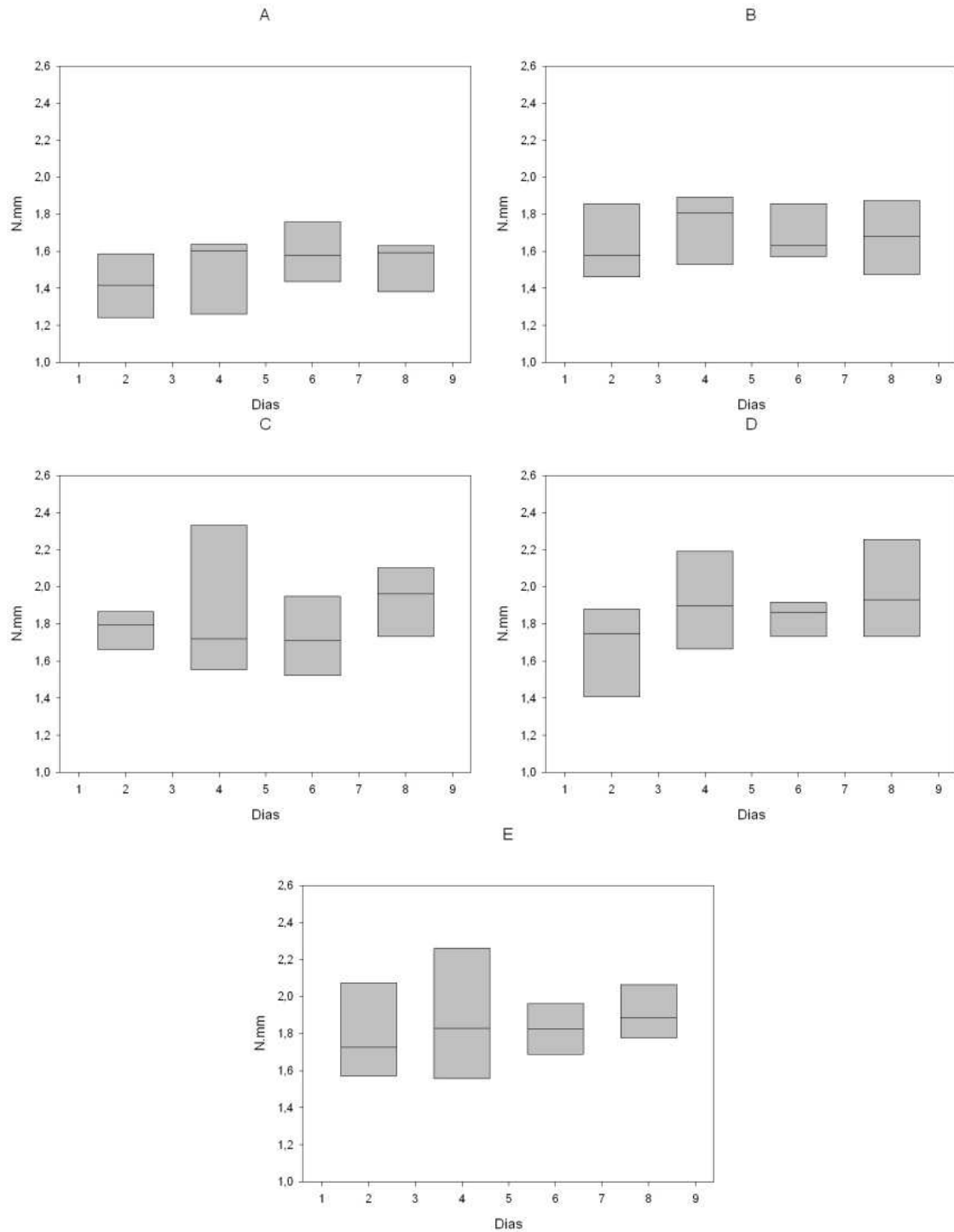
Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
B vs. D	0,448	5	6,150	<0,001	Yes
B vs. E	0,166	5	2,277	0,500	No
B vs. C	0,124	5	1,697	0,751	Do Not Test
B vs. A	0,0121	5	0,167	1,000	Do Not Test
A vs. D	0,436	5	5,983	0,001	Yes
A vs. E	0,154	5	2,111	0,573	Do Not Test
A vs. C	0,112	5	1,530	0,815	Do Not Test
C vs. D	0,325	5	4,453	0,024	Yes
C vs. E	0,0423	5	0,581	0,994	Do Not Test
E vs. D	0,282	5	3,873	0,066	No



### 3. Textura

#### 3.1. Textura média



**Figura A-1** | Representação gráfica da dispersão dos dados registados, no calculo da área gráfica proveniente do analisador de textura em função dos dias da simulação.



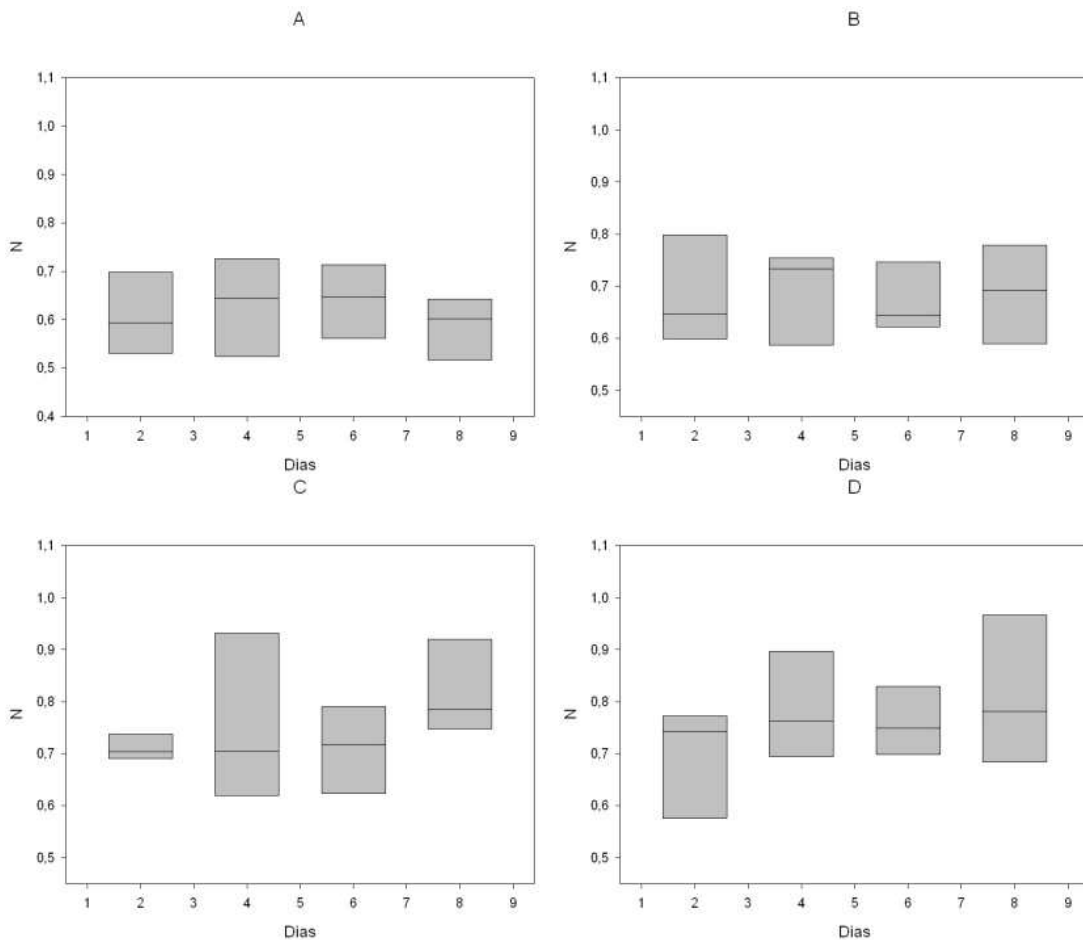
**Quadro A-3 | Resultados do teste estatístico de Tukey.**

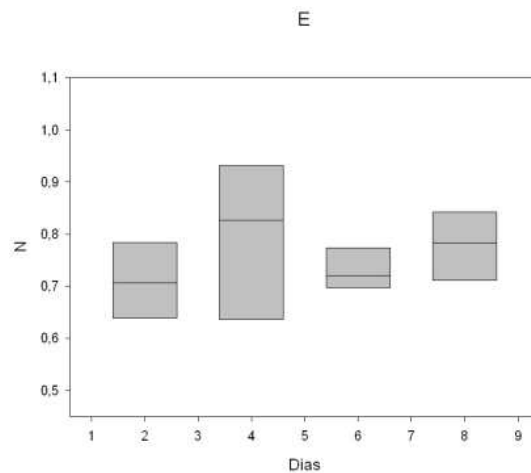
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
E vs. A	0,356	5	6,444	<0,001	Yes
E vs. B	0,173	5	3,132	0,185	No
E vs. C	0,0273	5	0,494	0,997	Do Not Test
E vs. D	0,00917	5	0,166	1,000	Do Not Test
D vs. A	0,347	5	6,278	<0,001	Yes
D vs. B	0,164	5	2,967	0,231	Do Not Test
D vs. C	0,0181	5	0,328	0,999	Do Not Test
C vs. A	0,329	5	5,950	<0,001	Yes
C vs. B	0,146	5	2,638	0,344	Do Not Test
B vs. A	0,183	5	3,311	0,143	No

### 3.2. Força máxima de ruptura





**Figura A-2** | Representação gráfica da dispersão dos dados registados pela força máxima inicial registada pelo analisador de textura, em função dos dias da simulação.

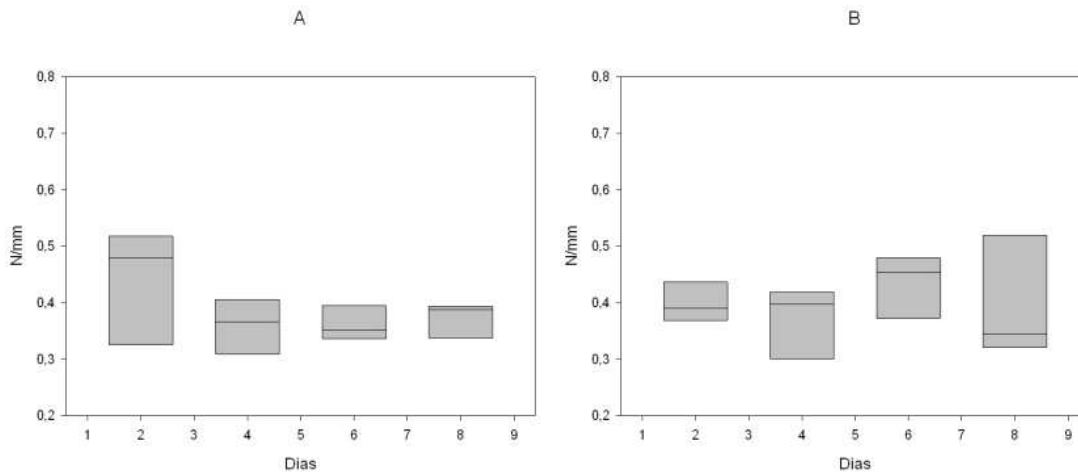
**Quadro A-4** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

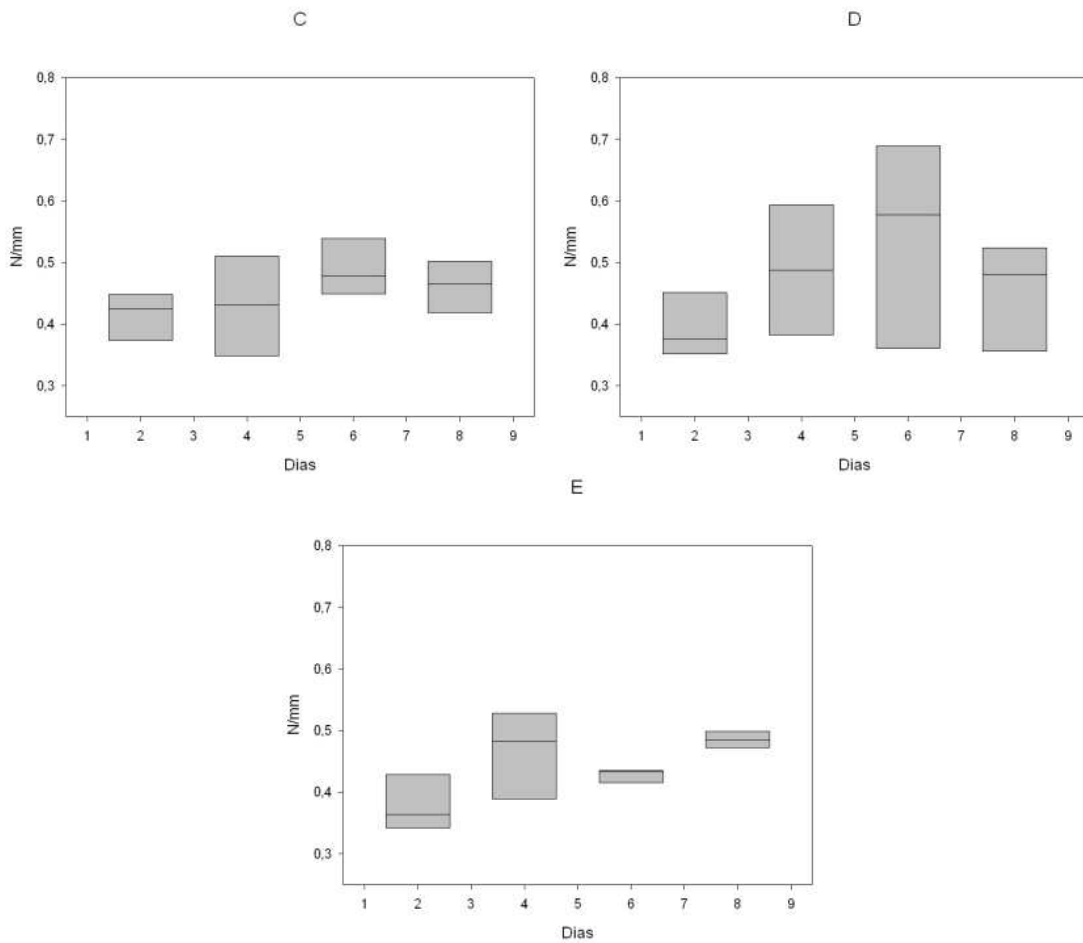
Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
D vs. A	0,148	5	6,190	<0,001	Yes
D vs. B	0,0804	5	3,364	0,132	No
D vs. C	0,0119	5	0,498	0,997	Do Not Test
D vs. E	0,0104	5	0,437	0,998	Do Not Test
E vs. A	0,137	5	5,753	0,001	Yes
E vs. B	0,0700	5	2,927	0,243	Do Not Test
E vs. C	0,00147	5	0,0616	1,000	Do Not Test
C vs. A	0,136	5	5,691	0,001	Yes
C vs. B	0,0685	5	2,866	0,263	Do Not Test
B vs. A	0,0675	5	2,826	0,276	No

### 3.3. Módulo de Young







**Figura A-3** | Representação gráfica da dispersão dos dados registados através do cálculo do declive da zona linear de crescimento do pico de ruptura, em função dos dias da simulação.

**Quadro A-5** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

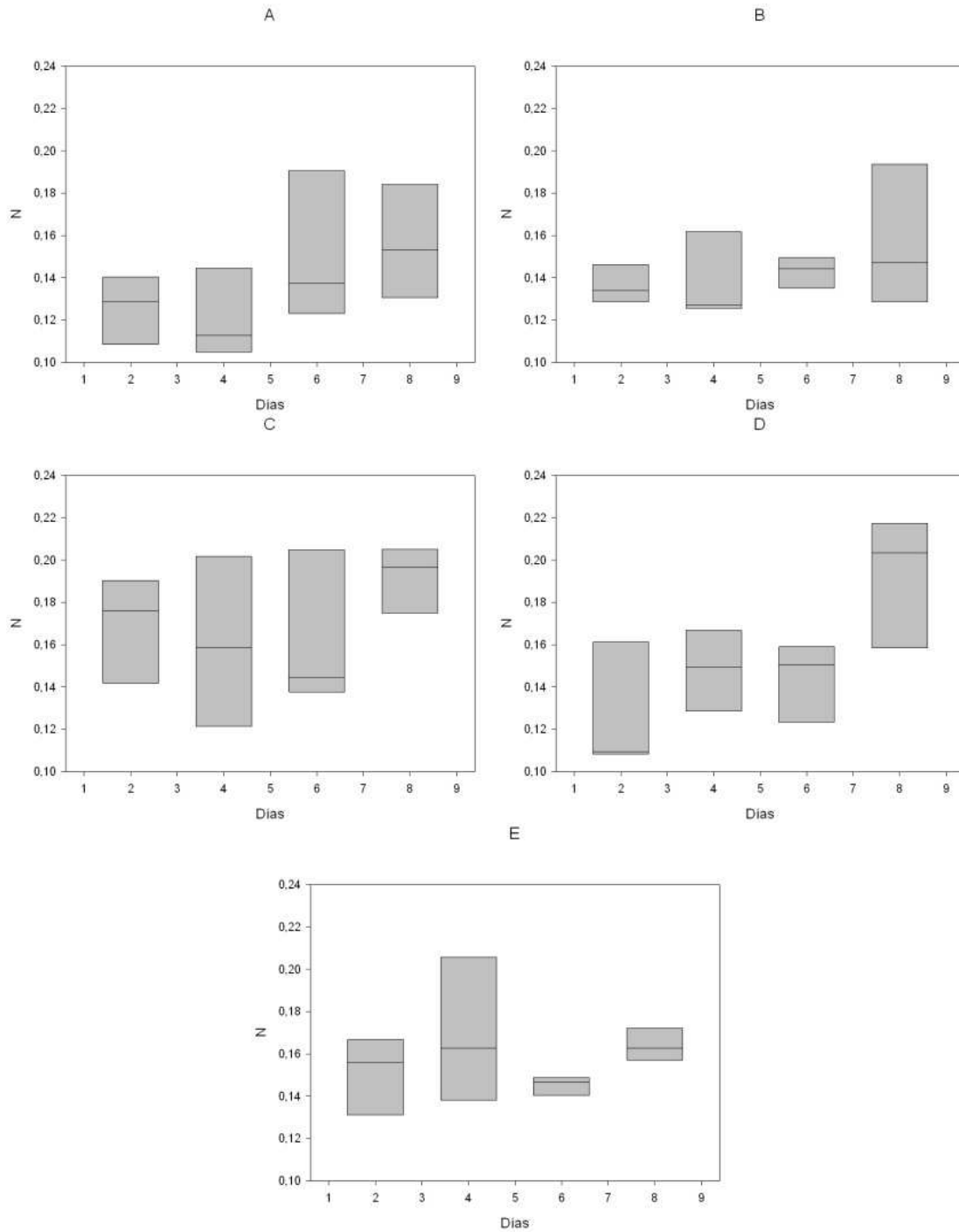
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
D vs. A	0,0858	5	5,024	0,006	Yes
D vs. B	0,0661	5	3,869	0,058	No
D vs. E	0,0276	5	1,617	0,783	Do Not Test
D vs. C	0,0178	5	1,043	0,947	Do Not Test
C vs. A	0,0680	5	3,981	0,047	Yes
C vs. B	0,0483	5	2,826	0,276	Do Not Test
C vs. E	0,00981	5	0,574	0,994	Do Not Test
E vs. A	0,0582	5	3,407	0,124	No
E vs. B	0,0385	5	2,252	0,507	Do Not Test
B vs. A	0,0197	5	1,155	0,925	Do Not Test



### 3.4. Textura interna



**Figura A-4** | Representação gráfica da dispersão do valor mínimo da força obtido na zona média interior, em função dos dias da simulação.



**Quadro A-6 | Resultados do teste estatístico de Tukey.**

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,050</b>
C vs. A	0,0323	5	5,168	0,004	Yes
C vs. B	0,0270	5	4,327	0,025	Yes
C vs. D	0,0186	5	2,981	0,227	No
C vs. E	0,0141	5	2,261	0,503	Do Not Test
E vs. A	0,0182	5	2,907	0,250	No
E vs. B	0,0129	5	2,066	0,591	Do Not Test
E vs. D	0,00450	5	0,720	0,986	Do Not Test
D vs. A	0,0137	5	2,187	0,536	Do Not Test
D vs. B	0,00841	5	1,346	0,876	Do Not Test
B vs. A	0,00525	5	0,841	0,976	Do Not Test





## Anexo B | Segunda simulação

### 1. Infecções

**Quadro B-1** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
A vs. C	2,083	3	22,177	<0,001	Yes
A vs. B	1,813	3	19,294	<0,001	Yes
B vs. C	0,271	3	2,883	0,108	No

### 2. Microbiologia

#### 2.1. Microrganismos totais

**Quadro B-2** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **DIAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
6,000 vs. 8,000	351666,667	3	18,071	<0,001	Yes
6,000 vs. 10,000	338333,333	3	17,386	<0,001	Yes
10,000 vs. 8,000	13333,333	3	0,685	0,880	No

#### 2.2. Fungos e Leveduras

**Quadro B-3** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRAS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
A vs. B	43066,667	3	43,035	<0,001	Yes
A vs. C	41200,000	3	41,170	<0,001	Yes
C vs. B	1866,667	3	1,865	0,421	No



### 3. Alterações mássicas

**Quadro B-4** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

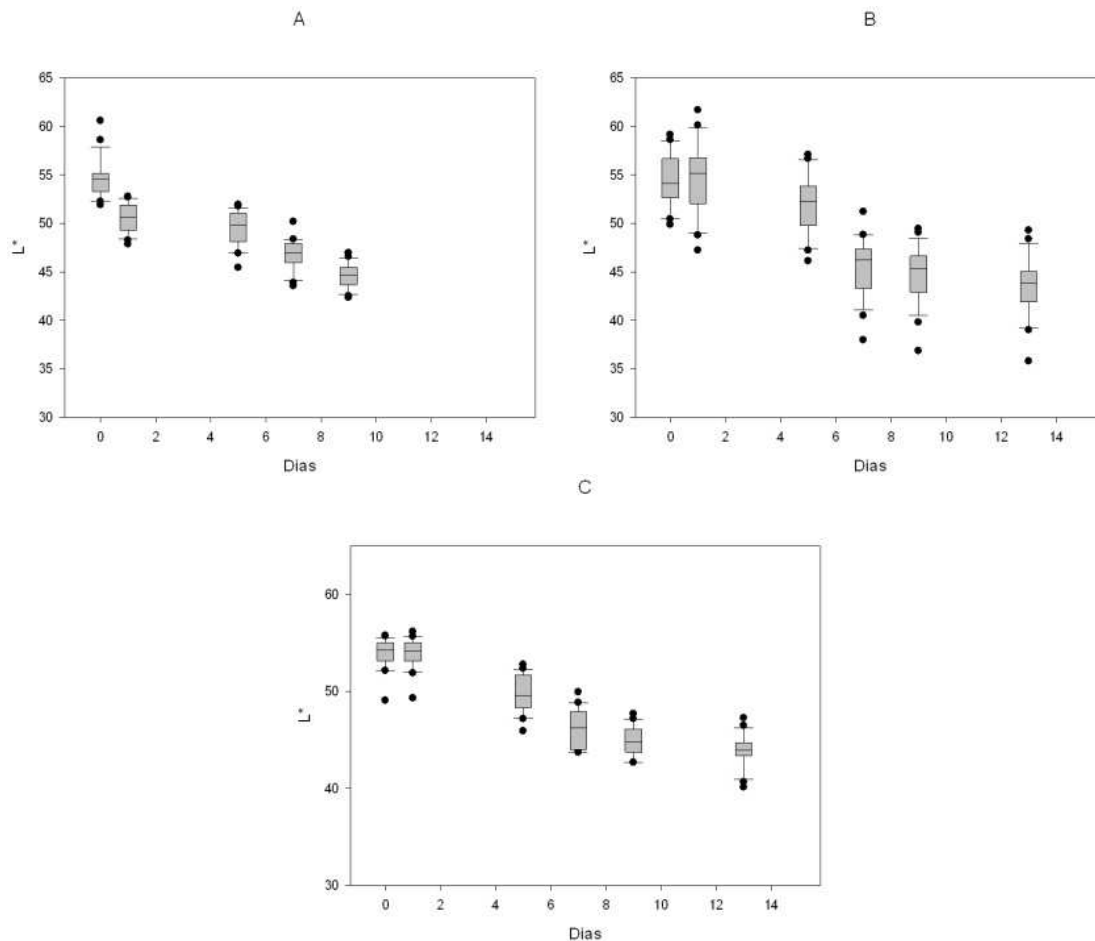
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: AMOSTRAS

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
C vs. A	8,439	3	20,103	<0,001	Yes
C vs. B	1,248	3	2,973	0,094	No
B vs. A	7,191	3	17,130	<0,001	Yes

### 4. Cor

#### 4.1. L\*



**Figura B-1** | Representação gráfica da dispersão relativamente à coordenada cromática L\*, em função dos dias da simulação.



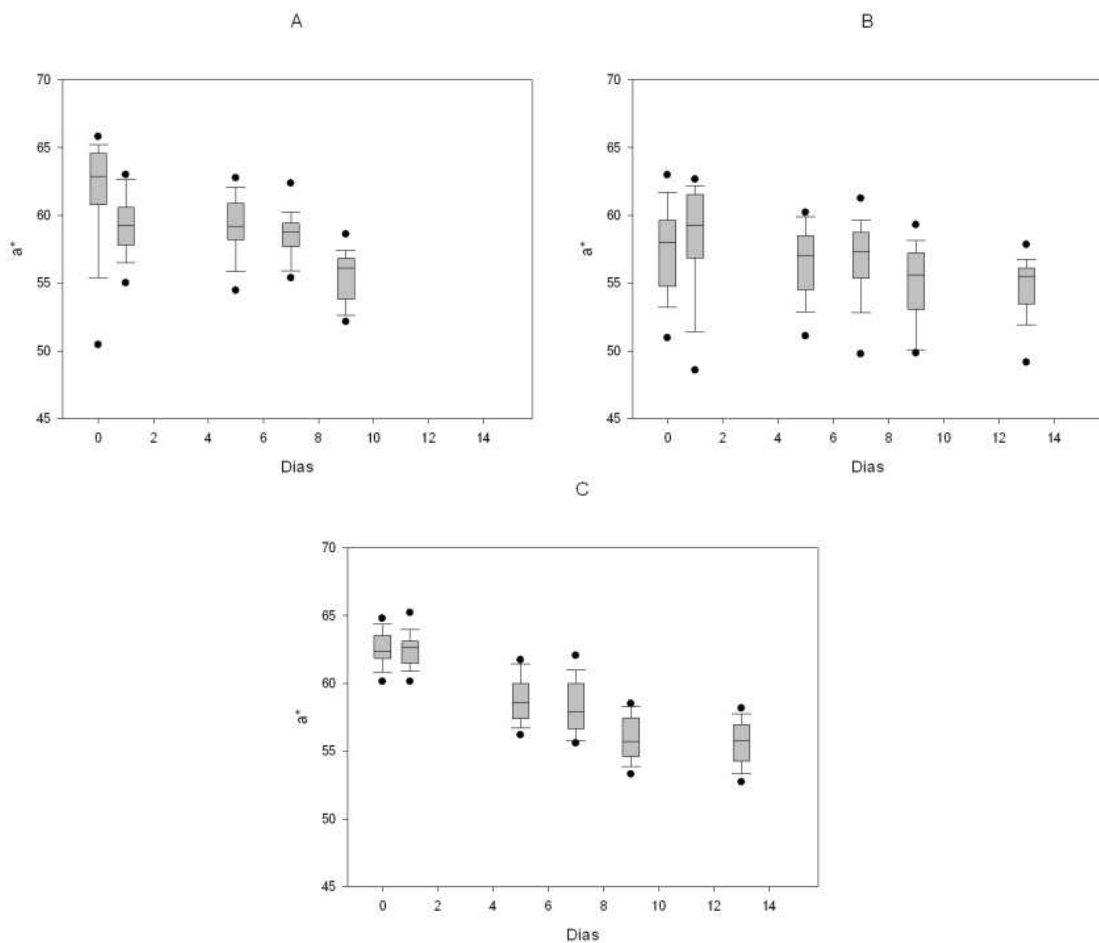
**Quadro B-5** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Amostras**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
C vs. A	2,126	3	15,234	<0,001	Yes
C vs. B	0,304	3	2,176	0,273	No
B vs. A	1,822	3	13,058	<0,001	Yes

#### 4.2. a\*



**Figura B-2** | Representação gráfica da dispersão dos morangos relativamente a coordenada cromática  $a^*$ , em função dos dias da simulação.

**Quadro B-6** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

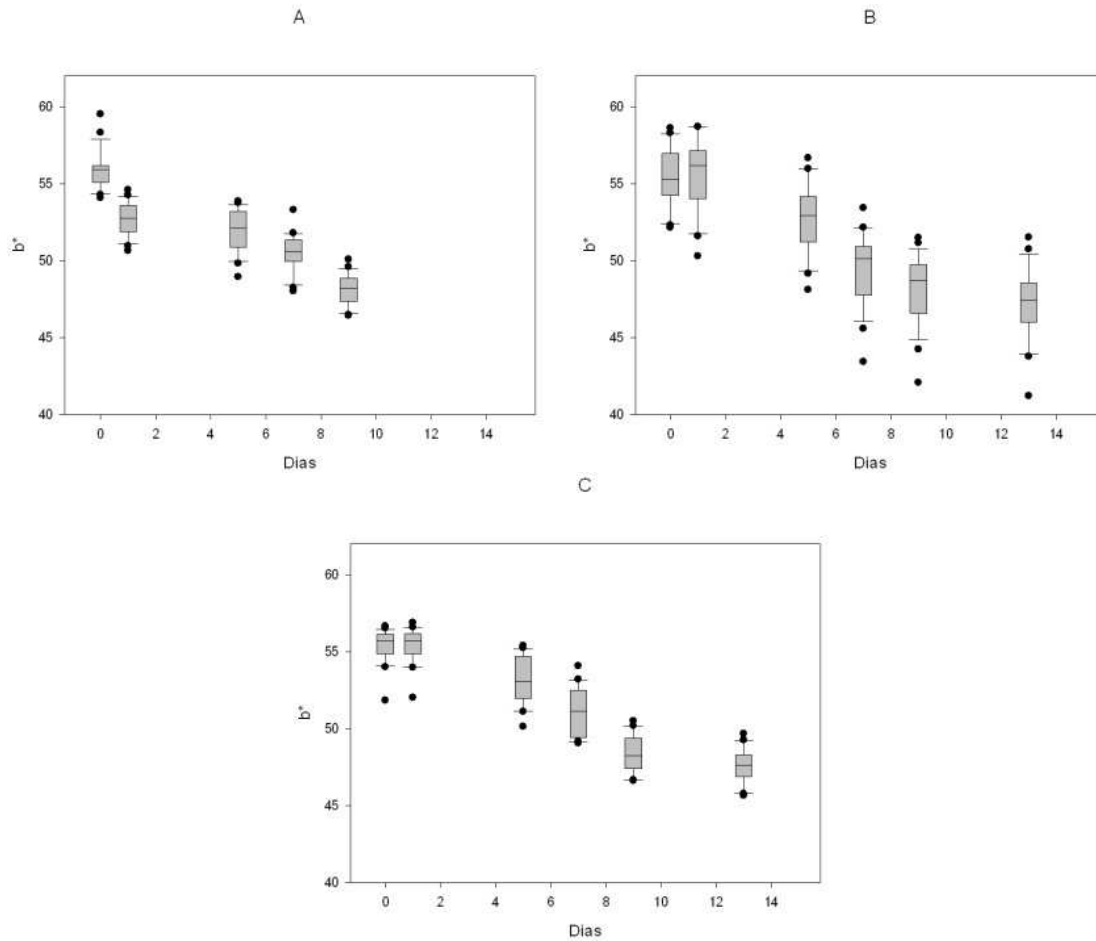
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Amostras**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
B vs. C	3,871	3	6,622	<0,001	Yes
B vs. A	3,719	3	6,362	<0,001	Yes
A vs. C	0,152	3	0,260	0,982	No



### 4.3. b\*



**Figura B-3** | Representação gráfica da dispersão dos morangos relativamente a coordenada cromática  $b^*$ , em função dos dias da simulação.

### Quadro B-7 | Resultados do teste estatístico de Tukey.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Amostras**

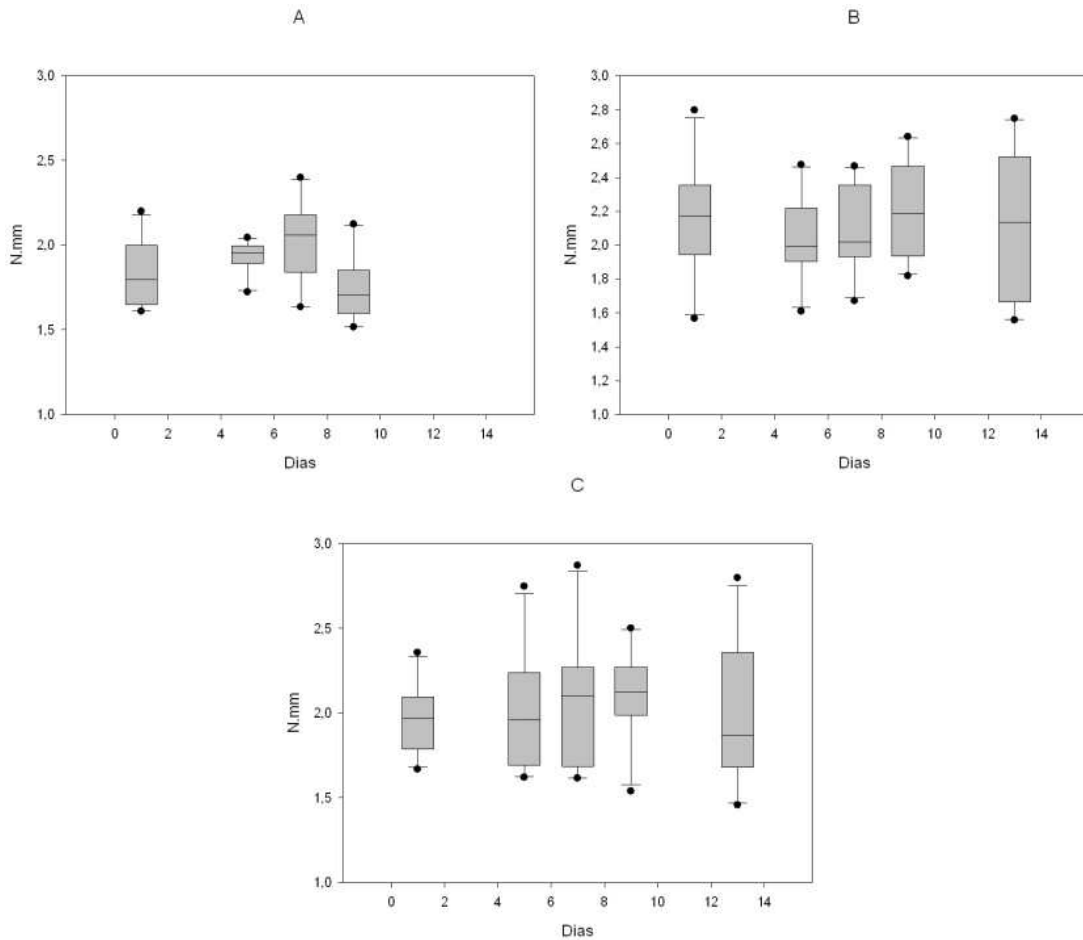
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
C vs. A	2,305	3	22,078	<0,001	Yes
C vs. B	1,013	3	9,698	<0,001	Yes
B vs. A	1,292	3	12,380	<0,001	Yes





## 5. Textura

### 5.1. Textura média



**Figura B-4** | Representação gráfica da dispersão dos dados registados, no calculo da área gráfica proveniente do analisador de textura em função dos dias da simulação.

**Quadro B-8** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

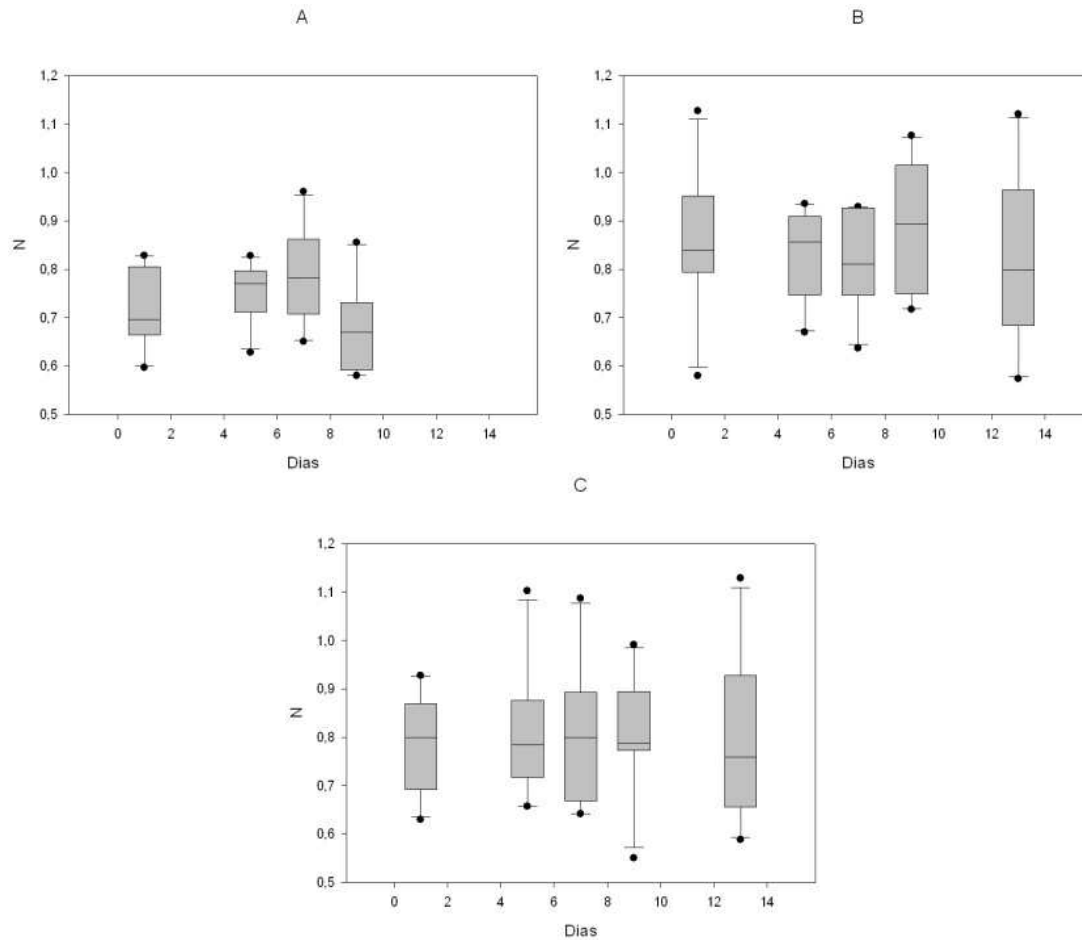
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRA**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
B vs. A	0,243	3	5,728	<0,001	Yes
B vs. C	0,0849	3	2,003	0,336	No
C vs. A	0,158	3	3,725	0,026	Yes



## 5.2. Força máxima de ruptura



**Figura B-5** | Representação gráfica da dispersão dos dados registados pela força máxima inicial registada pelo analisador de textura, em função dos dias da simulação.

**Quadro B-9** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

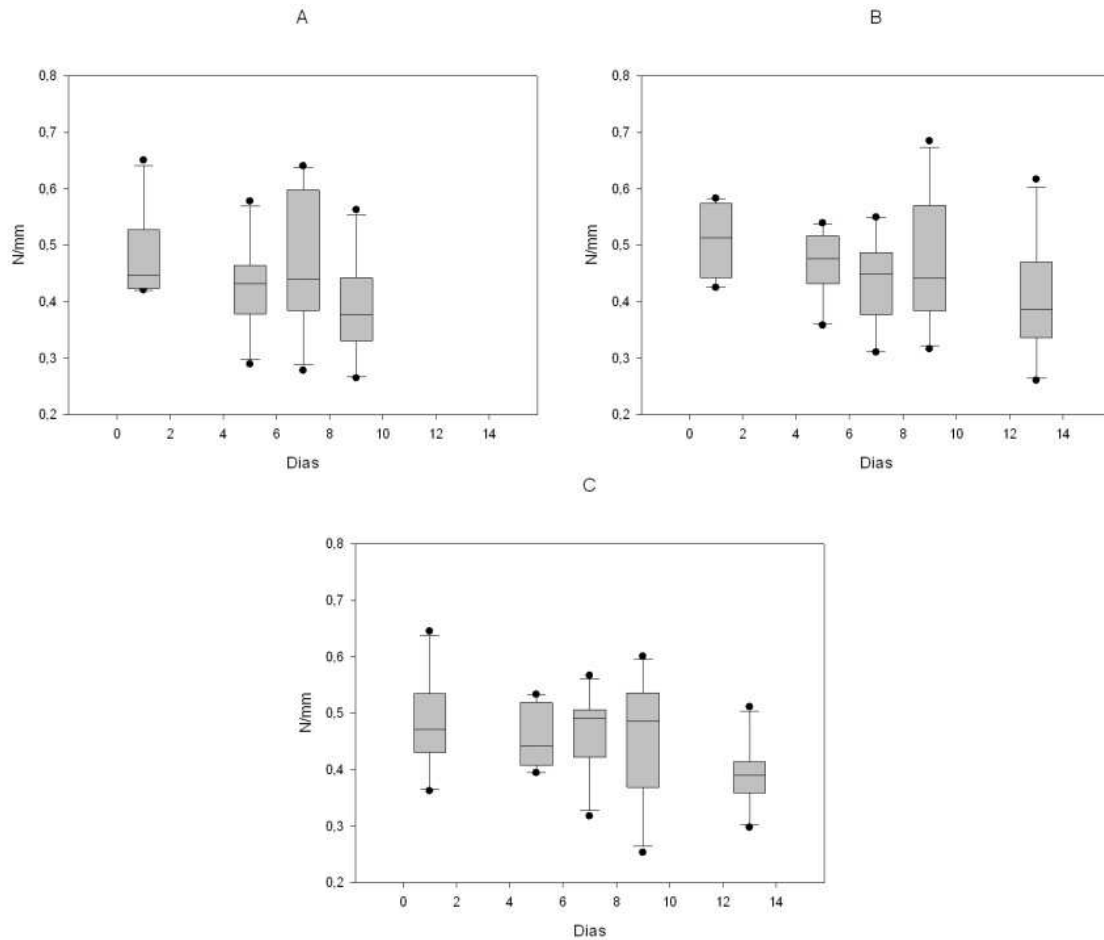
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **AMOSTRA**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
B vs. A	0,113	3	6,462	<0,001	Yes
B vs. C	0,0423	3	2,421	0,206	No
C vs. A	0,0706	3	4,041	0,014	Yes



### 5.3. Módulo de Young



**Figura B-6** | Representação gráfica da dispersão dos dados registados através do cálculo do declive da zona linear de crescimento do pico de ruptura, em função dos dias da simulação.

**Quadro B-10** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

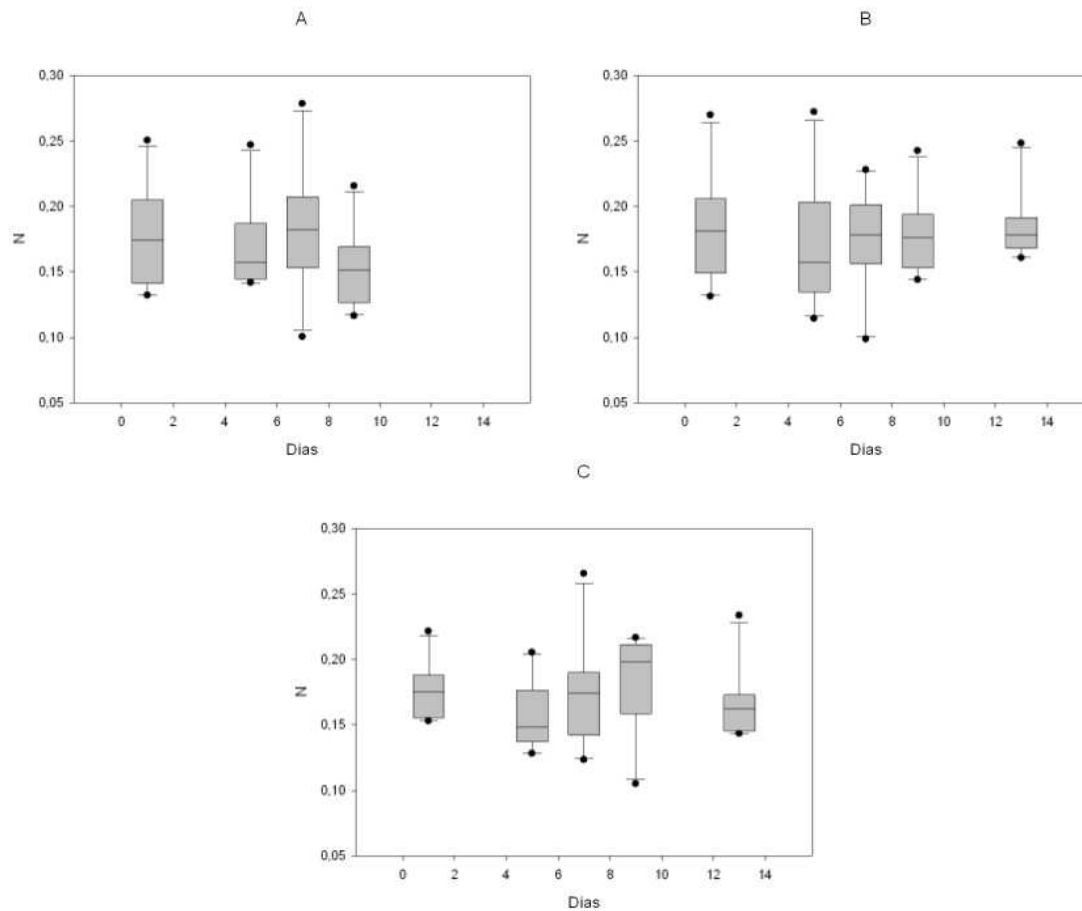
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: AMOSTRAS

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
B vs. A	0,0289	3	2,241	0,252	No
B vs. C	0,00771	3	0,652	0,889	Do Not Test
C vs. A	0,0212	3	1,642	0,476	Do Not Test



## 5.4. Textura interna



**Figura B-7** | Representação gráfica da dispersão do valor mínimo da força obtido na zona média interior, em função dos dias da simulação.

### **Quadro B-11** | Resultados do teste estatístico de Tukey.

The difference in the mean values among the different levels of AMOSTRAS is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in DIAS. There is not a statistically significant difference ( $P = 0,418$ ).