

Revestimentos comestíveis bioativos com extrato de carqueja:

Aplicação na conservação pós-colheita da cereja

Adriana Carneiro Mira Godinho

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professor Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

Coorientador: Professora Doutora Margarida Moldão-Martins

Juri:

Presidente: Doutora Fernanda Maria dos Reis Torroaes Valente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Isabel Maria Rôla Coelho, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

A realização desta dissertação contou com diversos e importantes contributos que quero fazer referência e deixar os meus sinceros agradecimentos:

Ao orientador Professor Doutor Vítor Alves, por todo o apoio na realização deste trabalho, esclarecimento de dúvidas, simpatia, e cuidada revisão da dissertação.

À coorientadora Professora Doutora Margarida Moldão, pelo entusiasmo e conhecimento partilhado, assim como pela igual disponibilidade, orientações e força transmitida durante estes meses.

Ao Bernardo Ribeiro, bolsheiro do projeto no qual o tema desta tese se insere, pela paciência gigante e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

À minha colega Sara Silva pelo companheirismo e amizade ao longo de todo o trabalho experimental. Agradeço também aos restantes colegas de laboratório pela boa disposição contagiante durante a realização do trabalho prático.

Não posso deixar de agradecer a todos os professores e colegas com que me cruzei ao longo do curso, que contribuíram para a minha formação e para a minha sensação de completa satisfação com a escolha no curso que fiz.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais pelo contínuo apoio durante o meu percurso académico e por todas as oportunidades que me concederam ao longo destes anos.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um revestimento comestível compósito bioactivo para aplicação em cereja fresca, com a finalidade de aumentar o seu tempo de prateleira. A partir de um delineamento experimental acoplado à metodologia de superfície de resposta, foi seleccionada a seguinte formulação base, tendo em conta as propriedades mecânicas e de resistência à água dos revestimentos analisados sob a forma de película: 2% de quitosano (m/m solução) em 1% de ácido acético (v/v solução), com 50% de ácido cítrico (m/m quitosano), 50% de glicerol (m/m quitosano) e 1,5% de tween80 (m/m solução). A esta formulação base adicionou-se 5% (m/m quitosano) de cera de abelha ou óleo de girassol e 1% de extrato de carqueja (m/m solução), obtendo-se quatro formulações distintas.

Os revestimentos com carqueja permitiram diminuir de forma mais efectiva a perda de massa (cerca de 5%) e o desenvolvimento de bolores e leveduras durante a conservação em condições refrigeradas ($T=4^{\circ}\text{C}$) por um período de 28 dias, mantendo a firmeza, a cor e o teor de sólidos solúveis dos frutos.

Palavras-chave: Revestimentos comestíveis compósitos, cereja, conservação pós-colheita, quitosano, cera de abelha, óleo de girassol

Abstract

The goal of the present study was the development of an edible composite bioactive coating to application in fresh cherry, with the final aim of increasing their shelf life. Using an experimental design coupled with a surface response methodology, it was selected the following base-formulation, taking into consideration the mechanical and water resistance properties of the coatings analyzed as a film: 2% chitosan (w/w) in 1% acetic acid (v/v), with 50% citric acid (w/w CH), 50% glycerol (w/w CH) and 1,5% tween80 (w/w). To this base-formulation was added 5% (w/w CH) of beeswax or refined sunflower oil and 1% of carqueja extract (w/w), obtaining four different formulations.

The applied coatings with carqueja extract had positive effects on the control of weight loss (about 5%), as well as in the control of growth of molds and yeasts during a conservation essay under refrigerated conditions ($T=4^{\circ}\text{C}$) for a period of 28 days. These coatings maintained the firmness, color and soluble solid content of the fruits.

Keywords: composite edible coatings, cherry, post-harvest conservation, chitosan, beeswax, sunflower oil

Extended Abstract

Presently, one of the market segments with higher growth in the food industry is the market of minimally processed fruits and vegetables. Packaging is an important factor in food conservation and the materials used are mainly petroleum-based polymers. In order to decrease the use of synthetic non-biodegradable packaging materials and their ecological impact, the research involved in the production and characterization of edible films and coatings has grown considerably in the last few years.

The present study is within the scope of edible coatings, with the aim of developing an effective preservation method in increasing the shelf life of cherries, more specifically by the application of edible composite bioactive coatings based on chitosan. In this sense, it was optimized an edible coating based on chitosan (a biopolymer obtained from crustacean shells), to which was added a lipidic barrier to water (beeswax or refined sunflower oil), a crosslinking agent (citric acid), a plasticizer (glycerol), a surfactant (Tween80) and a *carqueja* (*Pterospartum tridentatum* L.) aqueous extract as bioactive agent (antimicrobial and antioxidant) .

As chitosan is a water-insoluble polymer, six organic acids in different concentrations were initially tested to dissolve this polymer. Acetic acid (1% v/v) was selected to proceed with the study, as the other organic acids did not present good results in chitosan dissolution or produced films with inappropriate characteristics. It was also tested two concentrations of chitosan, 1.5% and 2% (w/w). The concentration of 2% chitosan (w/w) was selected, as it resulted in films with higher thickness and strength.

In order to select the most appropriate concentration of crosslinking agent and plasticizer, a central composite rotatable design coupled with the response surface methodology was carried out. The coatings were characterized in the form of films with the citric acid and glycerol concentrations being the independent variables. The films were characterized in terms of their mechanical properties (extension and puncture tests), water vapour permeability, solubility, swelling and color, with the aim of selecting the concentration of acid citric and glycerol that provides the most appropriated characteristics to the films. As a result of these tests, the concentrations of 50% citric acid (w/w CH) and 50% glycerol (w/w CH) were chosen.

Afterwards, different concentrations of beeswax and sunflower oil were tested on the films. As a result, formulations with a composition of 5 % beeswax (with and without the addition of 1% of *carqueja* extract) and 5% refined sunflower oil (with and without addition of 1% of *carqueja* extract) were selected.

The next stage of this study consisted on the application of the four selected solutions to cherry fruits and in carrying out a conservation essay for 28 days under refrigerated conditions (T=4°C). The colour of the cherries before and after the coating application, mass loss, soluble solid content, texture (puncture test) and the analysis of yeasts and moulds growth throughout the storage time were

evaluated. The objective of these tests was to understand whether the films properties were reproduced when applied as a coating to the fruit, and also to understand whether that application was benefic to studied product (both in terms of shelf life and sensory characteristics).

It was observed that the chitosan coatings had positive effects on the control of weight loss, as well as in the control of growth of molds and yeasts. The coatings with *carqueja* extract showed an even more efficient antifungal effect. The texture of the fruits was not significantly affected by the application of the coatings or along the storage time. In respect to the colour of the fruits, only coatings with oil in its composition caused significant changes after application.

During sensory evaluation, the panelists have not notice alterations in the fruits flavor. Though, they identified visually the presence of the coating. This negative aspect may be overcome by optimizing the content of surfactant in the coatings formulation and improving their application on the fruits surface.

Índice

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
2.1. Os revestimentos comestíveis.....	3
2.1.1. <i>Origem e definição</i>	3
2.1.2. <i>Funções e requisitos dos Revestimentos comestíveis</i>	4
2.1.3. <i>Revestimentos vs Filmes comestíveis</i>	5
2.1.4. <i>Materiais utilizados na produção de revestimentos comestíveis</i>	5
2.2. O quitosano e a sua aplicação em revestimentos comestíveis.....	9
2.2.1. <i>Características moleculares do quitosano</i>	9
2.2.2. <i>Filmes e revestimentos de quitosano</i>	10
2.2.3. <i>Ação antimicrobiana do quitosano</i>	11
2.2.4. <i>Aprovação para uso alimentar do quitosano</i>	11
2.3. A Cereja	12
2.3.1. <i>Aspetos Botânicos</i>	12
2.3.2. <i>Distribuição geográfica</i>	12
2.3.3. <i>Aspetos Agronómicos</i>	12
2.3.4. <i>Período pós-colheita e alguns estudos realizados na sua conservação</i>	13
2.4. A Carqueja	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Seleção da concentração dos componentes das soluções filmogénicas	17
3.1.1. <i>Seleção do agente de dissolução do quitosano</i>	17
3.1.2. <i>Estudo do efeito da concentração de Ácido Cítrico e Glicerol</i>	18
3.1.3. <i>Estudo do efeito da concentração de um lípido (cera/óleo)</i>	20
3.2. Preparação das soluções filmogénicas.....	21
3.2.1. <i>Soluções de quitosano, glicerol e ácido cítrico</i>	21
3.2.2. <i>Soluções filmogénicas com Óleo</i>	21
3.2.3. <i>Soluções filmogénicas com Cera de Abelha</i>	21
3.3. Caracterização reológica das formulações selecionadas	21
3.4. Filmes à base de quitosano	22
3.4.1 <i>Método de preparação</i>	22
3.4.2. <i>Corte e identificação</i>	22
3.4.3. <i>Medição da espessura</i>	22
3.4.4. <i>Caracterização</i>	23
<i>Medição da cor</i>	23
<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	24
<i>Extensão</i>	26
<i>Perfuração</i>	27
3.4.5. <i>Análise Estatística</i>	27
3.5. Aplicação dos revestimentos comestíveis em cereja.....	28
3.5.1. <i>Método de aplicação</i>	28

3.5.2.	<i>Controlo analítico dos frutos</i>	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.5.	Otimização da solução filmogénica	33
4.5.1.	<i>Seleção do agente de dissolução do quitosano</i>	33
4.5.2.	<i>Estudo do efeito da concentração de Ácido Cítrico e Glicerol</i>	34
4.6.	Otimização da concentração de Ácido Cítrico e Glicerol	36
4.6.1.	<i>Propriedades óticas</i>	36
4.6.2.	<i>Propriedades higroscópicas</i>	38
4.6.3.	<i>Propriedades mecânicas</i>	44
4.7.	Seleção do tipo e concentração de lípido	52
4.8.	Soluções filmogénicas para os revestimentos	53
4.8.1.	<i>Análise reológica das soluções</i>	53
4.8.2.	<i>Análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) dos filmes obtidos</i>	54
4.8.3.	<i>Propriedades óticas dos filmes obtidos</i>	57
4.8.4.	<i>Propriedades higroscópicas dos filmes obtidos</i>	58
4.8.5.	<i>Propriedades mecânicas dos filmes obtidos</i>	63
4.9.	Estudo sobre o impacto da aplicação dos revestimentos selecionados na conservação da cereja 68	
4.9.1.	<i>Cor (antes e depois da aplicação do revestimento)</i>	68
4.9.2.	<i>Perda de massa</i>	69
4.9.3.	<i>Textura</i>	71
4.9.4.	<i>Teor de sólidos solúveis</i>	72
4.9.5.	<i>Crescimento de Bolores e Leveduras</i>	73
4.9.6.	<i>Análise Sensorial</i>	73
4.9.7.	<i>Análise Multivariada</i>	77
5.	CONCLUSÕES	81
6.	PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO	82
7.	BIBLIOGRAFIA	83
8.	ANEXOS	87

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Soluções testadas para dissolução do quitosano	18
Tabela 2 - Condições estudadas nos ensaios preliminares.	19
Tabela 3 - Delineamento experimental usado para a otimizar a quantidade de Ácido Cítrico e Glicerol a adicionar à solução filmogénica de quitosano.	20
Tabela 4 – Formulações testadas para a otimizar a concentração de lípido a adicionar à solução filmogénica de quitosano.	20
Tabela 5 – Soluções utilizadas para revestimento da cereja.....	29
Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos pelos diferentes solventes testados.....	34
Tabela 7 – Resultados obtidos nos ensaios preliminares: aspeto e resistência à solubilização (filme que não solubilizou-✓; filme que solubilizou-✕).....	35
Tabela 8 – Diferença de cor (ΔE) entre as cartolinas padrão e os filmes sobre as cartolinas e valores de saturação (C^*) e matiz (h°) da cor dos filmes sobre as cartolinas padrão.....	37
Tabela 9 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na permeabilidade ao vapor de água com a equação que traduz a superfície de resposta (AC- Concentração de ácido cítrico, Gly – Concentração de glicerol.	39
Tabela 10 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na capacidade de absorção de água (AC – ácido cítrico, Guy – Glicerol).	41
Tabela 11- Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de PVA (10-11 mol.m/m ² sPa) de algumas Runs.	43
Tabela 12- Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de tensão na rutura (MPa) de algumas Runs.	45
Tabela 13- Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de alongamento na rutura (%) de algumas Runs.	46
Tabela 14 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis no módulo de Young (AC – ácido cítrico, Guy – Glicerol).	48
Tabela 15 - Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de tensão de perfuração (MPa) de algumas Runs.....	50
Tabela 16 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na deformação de rutura (%) (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).	51
Tabela 17 – Aspeto e resistência à solubilização (filme que não solubilizou - ✓; filme que solubilizou - ✕) das formulações testadas para otimização da concentração de lípido (cera de abelha/óleo de girassol).	52
Tabela 18 – Diferença de cor (ΔE) entre as cartolinas padrão e os filmes sobre as cartolinas.....	57
Tabela 19 – <i>P-values</i> obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativo aos valores de ΔE obtidos pelos vários filmes analisados sobre as cartolinas de 3 cores (amarelo, verde e vermelho).	57
Tabela 20 - Resumo dos valores médios de solubilidade, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.....	59
Tabela 21 - Resumo dos valores médios de capacidade de absorção de água, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.....	60
Tabela 22 – Comparação da solubilidade e capacidade de absorção de água (CAA) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	61

Tabela 23 – Comparação dos valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	61
Tabela 24 - Resumo dos valores médios de permeabilidade ao vapor de água, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	62
Tabela 25 - Resumo dos valores médios de tensão de rutura na extensão, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	63
Tabela 26 - Resumo dos valores médios de alongamento na rutura, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	64
Tabela 27 - Resumo dos valores médios do Módulo de Young no ponto de rutura, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	65
Tabela 28 – Comparação dos parâmetros obtidos no teste de extensão (tensão, alongamento de rutura e Módulo de Young) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	65
Tabela 29 - Resumo dos valores médios de tensão de rutura no teste de perfuração, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	66
Tabela 30 - Resumo dos valores médios de deformação no teste de perfuração, desvios padrão e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	67
Tabela 31 – Comparação dos parâmetros obtidos no teste de perfuração (tensão e deformação de rutura) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos <i>p-values</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.	68
Tabela 32 – Diferença de cor (ΔE) entre as amostras revestidas e antes da aplicação dos revestimentos.	68
Tabela 33 – Resumo do número provável de bolores e leveduras por grama de produto obtidos na determinação efetuada no dia 7 e no dia 22 do ensaio de conservação.	73
Tabela 34 - Resumo dos valores de <i>p-value</i> obtidos a partir do teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às classificações médias atribuídas à “apreciação global” das amostras.	76
Tabela 35 - Resumo dos valores de <i>p-value</i> obtidos a partir do teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às classificações atribuídas à “intenção de compra” das amostras.	76
Tabela 36 – <i>Eigenvalues</i> da matriz de correlações e estatísticas relacionadas (variáveis ativas apenas)	77
Tabela 37 - Valores próprios das variáveis.	78
Tabela 38 – Composição da cereja (<i>Prunus avium L.</i>) (<i>adaptado de Silva & Alarcão, 1999</i>)	87
Tabela 39 – <i>P-values</i> do teste post-hoc de Anova, Tukey, em que são comparadas as médias dos valores de saturação (C^*) das cartolinas padrão com as médias dos valores de saturação dos filmes (Runs centrais) sobre as cartolinas correspondentes.	94
Tabela 40 – <i>P-values</i> do teste post-hoc de Anova, Tukey, em que são comparadas as médias dos valores da matiz da cor (h^a) das cartolinas padrão com as médias dos valores de saturação dos filmes (Runs centrais) sobre as cartolinas correspondentes.	94
Tabela 41 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na permeabilidade ao vapor de água com a equação que traduz a superfície de resposta (AC- Concentração de ácido cítrico, Guy – Concentração de glicerol.	95
Tabela 42 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na tensão de rutura (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).	95
Tabela 43 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis no alongamento na rutura (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).	95

Tabela 44 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na tensão de perfuração (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).	96
Tabela 45 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise do parâmetro a* da cor.	97
Tabela 46 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise do parâmetro b* da cor.	98
Tabela 47 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores de luminosidade (L).	98
Tabela 48 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores de saturação da cor (C*).....	99
Tabela 49 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores de matiz da cor (h°).	100
Tabela 50 - Resumo dos valores de <i>p-value</i> obtidos a partir do teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores médios de tensão de perfuração (MPa).	101
Tabela 51 – Resumo dos valores de <i>p-value</i> , obtidos no teste post-hoc de ANOVA de Scheffé, relativamente à determinação do grau brix (%).	101
Tabela 52 - Resumo dos valores médios atribuídos pelos provadores às amostras de cereja para os diferentes atributos, nos dias 1 e 10 do ensaio de conservação.	102

Índice de Figuras

Figura 1 - Principais biopolímeros usados na produção de filmes revestimentos comestíveis para vegetais e frutas frescos ou minimamente processados.	6
Figura 2 – Estrutura molecular do quitosano.....	9
Figura 3 – Representação esquemática do modelo CIELAB.....	23
Figura 4 – Montagem experimental utilizada para medir a permeabilidade ao vapor de água.....	25
Figura 5 - Esquema representativo do cálculo da deformação na rutura num ensaio de perfuração.	27
Figura 6 – Secagem do revestimento aplicado nos frutos.	29
Figura 7 – Imagens de filmes obtidos nos ensaios preliminares.....	36
Figura 8 – Representação gráfica dos resultados experimentais do plano a^*b^* das amostras estudadas (Run 5, Run 6 e Run 7 - ponto central).....	37
Figura 9 – Solubilidade (%) dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.	39
Figura 10 - Efeito da concentração de ácido cítrico (g AC/ gCH) e da concentração de glicerol (g Gly/ g CH) na solubilidade (%) dos filmes de quitosano.	39
Figura 11 – Capacidade de absorção em água (%) dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.	41
Figura 12 - Efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na capacidade de absorção de água dos filmes de quitosano.	42
Figura 13 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.....	43
Figura 14 – Tensão de rutura dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.....	44
Figura 15 – Alongamento na rutura dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.	46
Figura 16 – Módulo de Young dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.....	47
Figura 17 - Gráfico de superfície do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol no módulo de Young dos filmes de quitosano.	48
Figura 18 –Tensão de perfuração dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.	49
Figura 19 – Representação gráfica dos valores de deformação na rutura (%).	50
Figura 20 - Gráfico de superfície do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na deformação de rutura dos filmes de quitosano.	51
Figura 21 – Aspeto dos filmes obtidos após a adição de um lípido (a) 5% óleo de girassol, b) 5% ácido oleico, c) 5% cera de abelha d) 10% cera de abelha).	52
Figura 22 – Curvas de escoamento das cinco soluções analisadas a 20°C	53
Figura 23 – Curvas de escoamento das cinco soluções analisadas a 40°C	54
Figura 24 – Imagens da superfície dos filmes obtida por microscopia eletrónica de varrimento, com uma ampliação de 1000x (1: amostra sem lípido; 2: Ol+T; 3: Ol+T+CA; 4: C+T; 5: C+T+CA)	55
Figura 25 – Imagens da secção de corte dos filmes obtida por microscopia eletrónica de varrimento, com uma ampliação de 700x (1: amostra sem lípido; 2: Ol+T; 3: Ol+T+CA; 4: C+T; 5: C+T+CA).....	56
Figura 26 – Representação gráfica dos resultados experimentais do plano a^*b^* das amostras a) C+T e C+T+CA e b) Ol+T e Ol+T+CA.	58
Figura 27 – Solubilidade das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	59
Figura 28 – Representação gráfica dos valores médios da capacidade de absorção de água (%) das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	60
Figura 29 – Representação gráfica dos valores médios de permeabilidade ao vapor de água, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	62

Figura 30 – Representação gráfica dos valores médios de tensão de rutura no teste de extensão, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	63
Figura 31 – Representação gráfica dos valores médios de alongamento no ponto de rutura (%) das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	64
Figura 32 – Representação gráfica dos valores médios do Módulo de Young no ponto de rutura, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	65
Figura 33 – Representação gráfica dos valores médios de tensão de perfuração (MPa), das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	66
Figura 34 – Representação gráfica dos valores médios de deformação (%) no teste de perfuração, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.	67
Figura 35 - Representação gráfica dos valores de perda de massa (%) obtidos para as amostras de cereja sem revestimento (controlo) e com revestimentos comestíveis.	70
Figura 36 - Valores médios da tensão de perfuração (kPa) das amostras de cerejas.	71
Figura 37 - Grau brix das amostras de cerejas (CT, C+T, C+T+CA, Ol+T, Ol+T+CA) ao longo do tempo de conservação (dias).	72
Figura 38 - Representação gráfica das classificações médias dos atributos estudados nas provas sensoriais realizadas para todas as amostras de cerejas revestidas.	75
Figura 39 - Projeção das variáveis (a) e das amostras (b) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.	78
Figura 40 - Dendrograma das amostras de cereja no dia 4 e no dia 10 do ensaio de conservação.	79
Figura 41 - Dendrograma das amostras de cereja no dia 1, 4, 10, 22 e 28 do ensaio de conservação.	80
Figura 42 – Gráficos da tensão em função do alongamento, durante a extensão das amostras analisadas (11 Runs)	89
Figura 43 – Representação gráfica dos resultados experimentais do plano $a*b^*$ das amostras de cereja antes da aplicação dos revestimentos (a vermelho) e depois da aplicação dos revestimentos (a azul).	97
Figura 44 - Luminosidade (L) das amostras de cereja antes e depois da aplicação dos quatro revestimentos (C+T, C+T+CA, Ol+T, Ol+T+CA).	98
Figura 45 - Saturação da cor (C^*) das amostras de cereja antes e depois da aplicação dos quatro revestimentos (C+T, C+T+CA, Ol+T, Ol+T+CA).	99
Figura 46 - Valores de matiz de cor (h°) das amostras de cereja antes e depois da aplicação dos quatro revestimentos (C+T, C+T+CA, Ol+T, Ol+T+CA).	99

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As frutas e os vegetais minimamente processados são um dos segmentos de mercado em maior crescimento na indústria alimentar (Lin & Zhao, 2007). Com a expansão dos sistemas de transporte, os alimentos são cada vez menos consumidos junto dos locais de produção. Entre a colheita e o consumo é comum existir um intervalo de tempo considerável, o que compromete a qualidade dos alimentos – é possível verificar alguma desidratação, deterioração, perda de *flavour*, diminuição do valor nutricional e degradação da aparência. Estas alterações podem ocorrer em apenas algumas horas, se medidas necessárias não forem tomadas após a colheita (Pavlath & Orts, 2009).

Um importante fator na conservação dos alimentos é a sua embalagem. Atualmente, o material das embalagens alimentares é dominado pelos polímeros de origem petrolífera. Estes materiais são sintéticos e não-biodegradáveis, o que acarreta um impacto ecológico negativo. No sentido de minimizar a utilização deste tipo de materiais, têm sido desenvolvidos vários estudos relacionados com a produção e utilização de materiais alternativos. Muitos desses estudos foram desenvolvidos no âmbito dos filmes comestíveis. Em geral, os filmes comestíveis têm por base polímeros biodegradáveis, o que permite aproveitar subprodutos da indústria alimentar e simultaneamente reduzir a exigência de embalagem dos alimentos (Vargas et al., 2008).

O presente trabalho tem como principal objetivo desenvolver um método efetivo para o aumento do tempo conservação da cereja, mais concretamente através da aplicação de revestimentos comestíveis à base de quitosano (um polímero obtido a partir do exoesqueleto dos crustáceos). Com a utilização deste tipo de revestimentos, pretende-se:

- Reduzir as perdas de massa durante o tempo de conservação da cereja;
- Reduzir o aparecimento de bolores e leveduras;
- Obter um revestimento com uma boa aceitabilidade pelo consumidor (boas propriedades organoléticas) e o menos perceptível possível, ou que melhore o aspeto dos frutos;

Para satisfazer todos estes requisitos, estudou-se um revestimento à base de quitosano, em que se adicionou um componente lipídico (cera de abelha e óleo de girassol), um reticulante (ácido cítrico), um plastificante (glicerol), um surfatante (tween80), e um agente com ação antifúngica (extrato de carqueja).

O composto lipídico foi incluído na formulação dos revestimentos com a finalidade de reduzir a permeabilidade ao vapor de água, devido à baixa afinidade com a água. No entanto, a incorporação de lípidos numa matriz hidrofílica, requer a adição de um agente surfatante em simultâneo, de forma a estabilizar a emulsão. A adição de um surfatante à formulação de um revestimento comestível reduz também a tensão superficial entre a solução e a superfície do alimento, aumentando a eficiência do revestimento.

Foi também adicionado um plastificante à solução filmogénica, com o propósito de conferir uma maior elasticidade ao revestimento. O plastificante escolhido (glicerol) tem a capacidade de se interpor entre as cadeias do polímero que formam a rede polimérica tridimensional, diminuindo as forças intermoleculares e aumentando a mobilidade das cadeias de polímero.

Com a função de conferir uma maior resistência ao filme, foi adicionado ácido cítrico à solução filmogénica. Este composto, reage com os grupos amina das moléculas de quitosano, formando ligações amida (Cui, Beach & Anastas, 2011), reforçando a resistência e estabilidade da matriz polimérica.

Foi também acrescentado um composto com ação antimicrobiana à solução filmogénica. O extrato de carqueja foi adicionado com o intuito de reforçar as propriedades antimicrobianas conferidas pelo quitosano ao revestimento, pois o extrato desta planta apresenta atividade antifúngica (Coelho et al., 2011).

Com o objetivo principal de desenvolver revestimentos comestíveis contendo todos estes elementos, apresentando também características apropriadas à aplicação ao alimento em vista, executou-se um trabalho experimental que se dividiu em várias etapas com objetivos específicos:

(i) Fase de otimização em que se testaram várias concentrações de quitosano e a sua dissolução em diferentes ácidos orgânicos, de forma a selecionar o melhor solvente para prosseguir com o estudo.

(ii) Aplicação de um delineamento experimental, onde se estudou o efeito de diferentes proporções de ácido cítrico e de glicerol nas propriedades dos revestimentos (avaliadas sob a forma de filmes)

(iii) Avaliação do efeito da adição de tween80 e do composto lipídico (óleo de girassol ou cera de abelha).

(iv) Seleção das formulações a aplicar nos ensaios de conservação de cereja, tendo como base as propriedades obtidas na caracterização dos filmes por elas obtidos: propriedades mecânicas (em testes de extensão e perfuração), permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, capacidade de absorção de água, cor e microestrutura.

(v) Aplicação das soluções filmogénicas selecionadas à cereja, realizando-se um ensaio de conservação durante 28 dias em condições de refrigeração.

A presente dissertação reparte-se, na sequência desta introdução, em cinco capítulos principais; De imediato apresentar-se-á o enquadramento teórico, seguindo-se as metodologias aplicadas, os resultados e a respetiva discussão. Por fim, existe um capítulo dedicado às conclusões com sugestões de trabalho futuro.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. Os revestimentos comestíveis

2.1.1. Origem e definição

A atual situação de aumento da procura por produtos alimentares minimamente processados e de alta qualidade, em conjunto com a consciencialização de consumidores e industriais quanto às consequências ambientais dos materiais plásticos não biodegradáveis, criou interesse no desenvolvimento de materiais de embalagem biodegradáveis. Uma solução a ir de encontro a esta procura são os biopolímeros - polímeros gerados a partir de recursos naturais renováveis, normalmente biodegradáveis e não tóxicos (Rhim & Ng, 2007). Estes materiais têm sido utilizados com sucesso na conservação das frutas e vegetais frescos ou minimamente processados, na forma de revestimentos comestíveis. Estes revestimentos apresentam também a vantagem de poderem servir de veículo à incorporação de ingredientes funcionais e outros compostos, benéficos para a saúde do consumidor e para a conservação do próprio alimento (Lin&Zhao, 2007).

Um revestimento comestível é qualquer material utilizado para envolver (revestir ou embrulhar) os alimentos, com o objetivo de aumentar a sua vida útil e que pode ser ingerido em conjunto com este. Geralmente, a sua espessura é inferior a 0,3 mm, e pode encontrar-se na superfície ou em finas camadas entre diferentes componentes do alimento. Quanto aos componentes usados na produção deste tipo de revestimentos, devem estar em conformidade com os regulamentos que se aplicam ao produto alimentar que está a revestir (Pavlath & Orts, 2009; Vargas, et al., 2008).

Nos últimos anos, têm sido conduzidos estudos com o intuito de desenvolver revestimentos comestíveis baseados em polímeros biodegradáveis, que não só permitam reduzir a exigência de embalagem, como também possibilitar o aproveitamento de alguns subprodutos da indústria alimentar (Vargas et al., 2008). Esta inovação visa contribuir para a resolução de alguns problemas ambientais, através da redução do desperdício de embalagem sintética e da utilização de fontes renováveis. Para além disso, os revestimentos comestíveis apresentam um custo-eficácia muito favorável na manutenção da qualidade e segurança dos alimentos (Pavlath & Orts, 2009).

- **Evolução dos revestimentos comestíveis**

Os revestimentos comestíveis são utilizados desde há vários séculos para manter a qualidade e aumentar o tempo de vida útil de frutas e vegetais frescos (Baldwin et al., 1996 e Li& Baryh 1998, citados por Lin&Zhao, 2007). Este método de conservação é usado desde muito antes dos seus princípios químicos serem entendidos, embora o termo “revestimento comestível” tenha começado a ser utilizado com frequência há menos de 50 anos. Os primeiros revestimentos a demonstrar sucesso

neste tipo de alimentos tinham por base lípidos (como a cera) e eram utilizados com a finalidade de reduzir os danos na superfície provocados durante o manuseamento, melhorar a aparência dos alimentos ou reduzir as perdas de água (Pavlath & Orts, 2009). Até há alguns anos, os revestimentos comestíveis eram aplicados apenas com a finalidade de criar uma barreira que minimizasse a perda de água e atrasasse a senescência natural dos frutos. Atualmente, os revestimentos estão a ser concebidos com a finalidade complementar de incorporar e/ou libertar alguns compostos desejados no alimento, através do uso de tecnologias modernas como a nanoencapsulação ou a aplicação camada a camada (Vargas et al., 2008).

De acordo com o *US Department of Agriculture*, nos últimos 10 anos o mercado de filmes e revestimentos comestíveis apresentou um evidente crescimento, e espera-se que este crescimento continue. O desenvolvimento nesta área não seria possível sem uma vasta quantidade de conhecimento adquirida através de pesquisa e investigação, a par dos grandes avanços no conhecimento de novos materiais e tecnologias de processamento. O interesse nesta tecnologia continuará a aprofundar-se devido às atuais preocupações com as questões de sustentabilidade, pegada de carbono e utilização de recursos renováveis (Pavlath & Orts, 2009).

2.1.2. Funções e requisitos dos Revestimentos comestíveis

Segundo Pavlath e Orts (2009) e Kester e Fennema (1986) (citado por Vargas et al., 2008), o revestimento/filme comestível ideal deve obedecer a 10 requisitos:

- Não conter componentes tóxicos, alérgenos ou não-digestíveis;
- Fornecer estabilidade estrutural e evitar danos mecânicos provocados durante o transporte, manuseamento e comercialização;
- Ter uma boa adesividade à superfície dos alimentos, fornecendo uma cobertura uniforme;
- Controlar a migração de água tanto para o interior como para o exterior dos alimentos, mantendo o conteúdo de hidratação desejado;
- Ser semi-permeável, mantendo o equilíbrio interno dos gases envolvidos na respiração aeróbia e anaeróbia, possibilitando, deste modo, atrasar a senescência;
- Evitar a perda de componentes do aroma, *flavour*, características nutricionais ou organolépticas, necessários para a aceitação do consumidor;
- Proporcionar estabilidade bioquímica e microbiana, enquanto fornece proteção contra a contaminação, infestações de pragas, proliferação de micróbios e outros tipos de decaimento;
- Manter ou melhorar o aspeto e os atributos sensoriais do produto;
- Servir como veículo a aditivos desejáveis como aromas, corantes, nutrientes e vitaminas. A incorporação de agentes antioxidantes e antimicrobianos fica limitada à superfície, minimizando assim o custo e sabores intrusivos;
- Serem facilmente produzidos e economicamente viáveis;

- Devem apresentar propriedades sensoriais adequadas ao alimento a revestir, serem transparentes e não apresentarem qualquer sabor nem odor;
- As suas formulações devem conter substâncias seguras, food-grade e de baixo custo;
- A sua tecnologia de produção não deve ser cara;

Os revestimentos comestíveis têm demonstrado capacidade de melhorar a qualidade e prolongar o tempo de vida útil dos produtos frescos, através das seguintes funções (Krochta et al., 1994; Lin&Zhao, 2007):

- Fornecimento de uma barreira na superfície do produto que previne a perda de hidratação (perdas de hidratação levam a perdas de massa e alterações na textura, flavour e aparência);
- Fornecimento de uma barreira seletiva aos gases que permite controlar as trocas gasosas entre o produto fresco e a atmosfera envolvente, o que abranda a respiração e atrasa a deterioração. Pode também atrasar a oxidação enzimática e proteger o produto do acastanhamento e perdas de firmeza durante o armazenamento;
- Controlo da troca de compostos voláteis entre o produto e o ambiente envolvente, evitando, por um lado, a perda de compostos voláteis e componentes de cor e, por outro, a aquisição de odores estranhos por parte do alimento;
- Melhorar a integridade estrutural das frutas e vegetais, protegendo dos danos físicos causados pelo impacto mecânico, pressão, vibração e outros fatores mecânicos;
- Atuação como meio de transporte de ingredientes funcionais como agentes antimicrobianos e antioxidantes, nutracêuticos, ingredientes de cor e *flavour*, melhorando a estabilidade dos alimentos, a qualidade e a segurança reduzindo a carga microbiana, atrasando a oxidação e a alteração da cor.

2.1.3. Revestimentos vs Filmes comestíveis

Geralmente, os termos revestimento e filme comestível são utilizados indistintamente para indicar que a superfície dos alimentos se encontra coberta por uma camada de um determinado material. No entanto, se formos rigorosos, podemos distinguir os dois conceitos: os revestimentos comestíveis são aplicados ou formados diretamente na superfície do produto (passando a ser parte integrante do alimento), enquanto que os filmes comestíveis são estruturas auto-suficientes concebidas com a finalidade de envolver os produtos e que podem ser ingeridos com estes (Pavlath & Orts, 2009).

2.1.4. Materiais utilizados na produção de revestimentos comestíveis

Os materiais envolvidos na produção dos revestimentos comestíveis devem ser aprovados pela Food and Drug Administration (FDA). Por não ser praticável para a FDA a elaboração de uma lista com

todos os potenciais ingredientes alimentares, a organização criou o estatuto GRAS (Generally Recognized As Safe), uma designação que garante a aprovação de um determinado composto para uso alimentar (Pavlath & Orts, 2009). Este estatuto é sustentado por estudos científicos já concluídos, levados a cabo por peritos qualificados na avaliação da segurança alimentar através de formação e experiência na área.

De acordo com o *USA Code of Federal Regulations* (FDA, 2006), os ingredientes usados nos revestimentos comestíveis têm de ser GRAS, encontrarem-se listados no próprio código (*USA Code of Federal Regulations*) e a quantidade utilizada deve ser apenas a necessária para atingir o efeito desejado.

Os principais componentes dos nossos alimentos (proteínas, polissacáridos e lípidos) podem preencher os requisitos como materiais-base na produção de filmes comestíveis. Estes biopolímeros são vulgarmente empregados como revestimentos nos alimentos e podem ser utilizados de forma isolada ou combinados entre si ou com outros compostos. As características químicas e físicas dos biopolímeros influenciam grandemente a funcionalidade dos revestimentos resultantes, por isso a sua seleção deve ser criteriosa de acordo com as suas propriedades e exigências do alimento a revestir. A seleção dos materiais de revestimento é geralmente baseada nas características de solubilidade em água, natureza hidrofílica e hidrofóbica, capacidade de formar de filme e propriedades sensoriais (Lin & Zhao, 2007). Os materiais mais utilizados na formulação de revestimentos comestíveis para frutas e vegetais encontram-se categorizados na Figura 1.

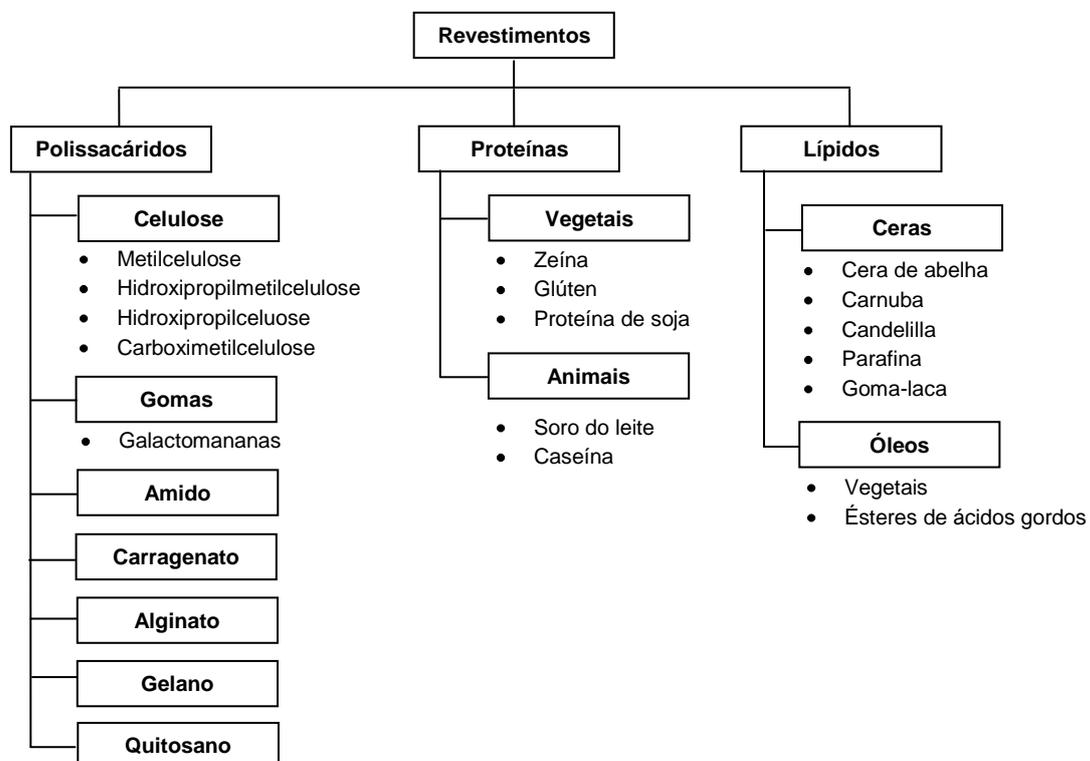


Figura 1 - Principais biopolímeros usados na produção de filmes revestimentos comestíveis para vegetais e frutas frescos ou minimamente processados (adaptado de Olivas & Barbosa-Cánovas, 2009).

Usualmente, considera-se que os revestimentos comestíveis podem classificar-se de acordo com o material-base na sua composição, em: revestimentos de polissacáridos, proteicos e lipídicos.

Atualmente, para melhorar a funcionalidade dos revestimentos, o desenvolvimento de revestimentos comestíveis tem-se focado em revestimentos compósitos, em que compostos lipídicos são integrados num revestimento de proteínas ou polissacáridos, de forma a complementar as suas propriedades.

Seguidamente, neste capítulo, são referidas sucintamente as propriedades e limitações de cada tipo de revestimento, assim como os materiais mais utilizados.

- **Revestimentos de Polissacáridos**

Os polissacáridos são os componentes mais utilizados em revestimentos comestíveis para frutos, encontrando-se presentes na maioria das formulações disponíveis comercialmente. Estes polímeros oferecem boas propriedades de barreira aos gases, mas a sua alta hidrofiliabilidade faz com que tenham elevada permeabilidade ao vapor de água, o que os torna inadequados para a utilização em produtos imersos em soluções ou em ambientes com elevada humidade relativa (Vargas et al., 2007).

Atualmente, existe uma grande diversidade de polissacáridos que são utilizados na produção de filmes comestíveis, com distintas características de peso molecular, grau de ramificação, conformação, carga elétrica e hidrofobicidade. Diferenças nas suas características moleculares traduzem-se em diferenças na tendência para formar filmes e no desempenho dos filmes formados (Vargas et al., 2007). Os polissacáridos mais utilizados na produção de filmes e revestimentos comestíveis são sobretudo: amido e derivados, derivados da celulose, alginatos, carragenato, galactomananas, polissacáridos microbianos (e.g. gelano), quitosano e pectinas (Lin & Zhao, 2007).

- **Revestimentos Proteicos**

Tal como os polissacáridos, as proteínas podem apresentar distintas características moleculares, dependendo da sua origem biológica e função. Normalmente, estes polímeros possuem a capacidade de formar filmes devido à aptidão das suas cadeias laterais para formar ligações intermoleculares cruzadas. As propriedades dos filmes formados dependem, então, da natureza destas interligações. Em geral, considera-se que os filmes de materiais proteicos têm boas propriedades de barreira aos gases e ótimas características de estabilidade mecânica. Como principal desvantagem, aponta-se o facto das suas propriedades de barreira à água serem geralmente pobres (Gennadios et al., 1994).

As proteínas mais comuns em revestimentos para frutas e legumes são a zeína, o glúten, a proteína de soja e a proteína do soro de leite.

- **Revestimentos Lipídicos**

Os revestimentos comestíveis baseados em substâncias hidrofóbicas (como os lípidos) foram desenvolvidos especificamente para limitar as migrações de água nos alimentos. Substâncias

hidrofóbicas são barreiras eficazes contra a migração de água devido à sua natureza apolar (Debeaufort & Voilley, 2009). Estes revestimentos são também utilizados quando uma superfície brilhante é desejada. Geralmente, estas substâncias são óleos, margarinas, ceras, resinas naturais, óleos essenciais, emulsionantes ou agentes ativos de superfície.

Como principais aspetos negativos, os revestimentos lipídicos podem conferir uma superfície oleosa ou dura e propriedades organolépticas indesejáveis, como um sabor ceroso ou rançoso (Lin & Zhao, 2007). Alguns destes revestimentos (como ceras e goma-laca) podem restringir as trocas de gases entre a atmosfera e o alimento a um ponto em que os níveis de oxigénio internos se tornam demasiado baixos para suportar a respiração aeróbia - resultando em altos níveis internos de etanol, acetaldeído e dióxido de carbono. Este fenómeno pode provocar uma acumulação de *flavours* indesejáveis no alimento (Lin & Zhao, 2007). Outro aspeto negativo que podem apresentar, é a sua instabilidade a alterações de temperatura, formando uma camada branca cerosa na superfície do alimento (Lin & Zhao, 2007).

- **Revestimentos Compósitos: bicamada e emulsões**

Os filmes e revestimentos compósitos podem ser produzidos a partir de bicamadas ou de emulsões estáveis.

No caso dos revestimentos compósitos de bicamada, geralmente são utilizados lípidos como camada adicional sobre uma camada de polissacárido ou proteína. No caso das emulsões, os lípidos são dispersos e retidos na matriz polimérica de proteínas e polissacáridos.

O carácter anfifílico das proteínas permite que estas estabilizem as emulsões de lípido-solução proteica através do equilíbrio entre as forças electrostáticas e hidrofóbicas, enquanto que os polissacáridos estabilizam as emulsões por aumentarem a viscosidade da fase contínua, e formarem uma camada polimérica ou uma rede que sustenta as gotas de lípido evitando a sua coalescência.

Neste trabalho, foram desenvolvidos revestimentos comestíveis para conservação da cereja. Os revestimentos elaborados e estudados têm por base um composto polissacárido, o quitosano. Este biopolímero tem sido investigado nas últimas décadas como componente-base de revestimentos comestíveis para frutas e vegetais, tendo vindo a apresentar resultados motivadores.

Seguidamente, no ponto 2.2. deste trabalho, apresentam-se as principais características do quitosano e a sua potencialidade na produção de revestimentos comestíveis. No ponto 2.3., apresentar-se-ão alguns aspetos sobre a cereja, as suas exigências no período pós-colheita e estudos que foram realizados na sua conservação, nomeadamente com a aplicação de revestimentos comestíveis.

2.2. O quitosano e a sua aplicação em revestimentos comestíveis

O quitosano é um polissacárido obtido a partir da quitina, um constituinte abundante no exoesqueleto dos crustáceos, sendo o segundo recurso polissacárido mais abundante no planeta, a seguir à celulose (Olivas & Cánovas, 2007). O quitosano é obtido através da desacetilação alcalina da quitina a altas temperaturas, embora também seja possível a sua obtenção por desacetilação ácida, método que não costuma ser utilizado devido à suscetibilidade das ligações glicosídicas da molécula à hidrólise ácida (Campana & Signini, 2001). A sua estrutura molecular é muito semelhante à da celulose, diferenciando-se somente nos seus grupos funcionais (Azevedo et al., 2007).

O quitosano é um composto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, que tem ganho uma importância crescente nas últimas décadas. Tem-se tornado um produto de grande importância económica, revelando aplicabilidade em diversas áreas (agricultura, biomedicina, indústria alimentar, indústria farmacêutica, cosmética, tratamento de águas, entre outras). Para além destas potencialidades, o aproveitamento deste polímero tem também demonstrado uma importância ambiental: os resíduos dos crustáceos são abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira e o seu aproveitamento reduz o impacto ambiental causado pela sua acumulação (Shahidi, Arachchi & Jeon, 1999).

2.2.1. Características moleculares do quitosano

Em relação à estrutura molecular, o quitosano é um polímero de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose (representado na figura 2). A sua fórmula geral é $[C_6H_{11}O_4N]_n$, e é um polissacárido policationico constituído maioritariamente por glucosamina (2-amino-2-deoxi- β -D-glucose) (Shahidi et al., 1999).

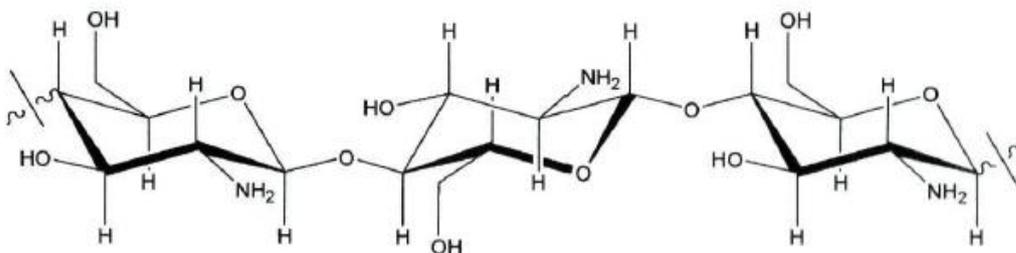


Figura 2 – Estrutura molecular do quitosano

A molécula de quitosano tem três grupos funcionais reativos: um grupo amina, na posição C-2, e dois grupos hidroxilo, nas posições C-3 e C-6. Qualquer alteração química nestes grupos confere diferentes propriedades ao composto, tornando-o adequado a um vasto leque de aplicações (Shahidi, et al., 1999). O grande número de grupos amina ao longo da sua cadeia (que são grupos

extremamente reativos), torna a molécula bastante suscetível a alterações, fazendo variar as suas características. Um evidente exemplo disso são as alterações na sua solubilidade (Nieto, 2007; Pillai, Paul & Sharma, 2009).

A solubilidade do quitosano está relacionada com o número de grupos amina que se encontram protonados. Um maior número de grupos protonados, conduz a um aumento da repulsão entre as cadeias (devido à maior quantidade de interações eletrostáticas), o que permite uma maior solvatação por parte da água (Santos, Soares, Dockal, Campana & Cavalheiro, 2003). O quitosano é considerado uma base forte, com um valor de pKa entre 6,3 e 7 (dependendo do grau de acetilação). A valores de pH baixo, os grupos amina encontram-se protonados, o que faz com que seja possível dissolver o quitosano. Formas conjugadas deste polímero (com acetato, malato, lactato, entre outros aniões) são, então, solúveis em água. Por outro lado, à medida que o pH aumenta (acima de 6,3) as aminas do quitosano tornam-se desprotonadas, o polímero perde a carga e torna-se insolúvel. A transição solúvel-insolúvel ocorre a um valor de pH correspondente ao seu pKa (Pillai, et al. 2009).

Para preparar uma solução de revestimento de quitosano, e como esta molécula no seu estado de polímero catiónico não é solúvel em água, deve ser utilizado um ácido orgânico fraco (Olivas & Cánovas, 2007). Podem ser utilizadas soluções fracas de ácido acético, ascórbico, fórmico, glutâmico, clorídrico, maleico, málico, fosfórico, sucínico ou láctico para provocar a sua dissolução. No caso de soluções pouco concentradas de ácido glutâmico, ascórbico e clorídrico é necessário algum aquecimento para a sua solubilização (Romanazzi et al., 2009).

2.2.2. Filmes e revestimentos de quitosano

Há algumas décadas atrás, o quitosano foi identificado como tendo as propriedades de um revestimento ideal para frutas e vegetais (Muzzarelli 1986 citado por Romanazzi, 2010). Um conjunto de fatores, como a sua biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e capacidade de formar filmes transparentes e resistentes, fazem com que seja particularmente adequado na formulação de revestimentos comestíveis (Nieto, 2007; Olivas & Cánovas, 2007). Vários estudos já provaram a sua efetividade no aumento da vida de prateleira de frutas e vegetais (Vargas et al., 2009).

Os filmes e revestimentos de quitosano apresentam uma permeabilidade seletiva aos gases (CO_2 e O_2) e boas propriedades mecânicas (semelhantes às da celulose) (Jeon, Kamil & Shahidi, 2002). Quer as propriedades de permeabilidade, quer as propriedades mecânicas, podem controlar-se através da seleção de diferentes pesos moleculares ou de diferentes solventes (Park, Marsh & Rhim, 2002). Outra forma de controlar estas propriedades é através da adição de agentes como plastificantes, dispersantes e compatibilizantes, mas há que ter em conta que podem afetar a atividade antimicrobiana destes revestimentos (Martínez-Camacho et al., 2010).

Considera-se que a grande limitação na utilização do quitosano para a preparação de filmes e revestimentos, é a sua elevada permeabilidade ao vapor de água. Trata-se de um aspeto essencial a controlar, visto ser desejável restringir as transferências de água na maioria dos alimentos. No

sentido de ultrapassar esta limitação, é comum incorporarem-se compostos lipídicos nos filmes (como ácidos gordos, ceras naturais, surfatantes e resinas).

2.2.3. Ação antimicrobiana do quitosano

O mecanismo de ação antimicrobiana do quitosano é ainda desconhecido, mas vários mecanismos têm sido sugeridos (Shahidi et al. 1999). Acredita-se que a carga positiva das moléculas de quitosano interaja com as membranas celulares carregadas negativamente dos microrganismos, causando uma alteração na permeabilidade celular e conseqüentemente uma fuga de constituintes celulares (Olivas & Cánovas, 2007). Outra hipótese apresentada propõe um funcionamento do quitosano como agente quelante, criando complexos a partir de vestígios de metais, essenciais para as células microbianas (Roller & Covill, 1999). Uma terceira hipótese, aponta a capacidade do quitosano de baixo peso molecular entrar no núcleo das células microbianas, interagindo com o DNA e interferindo com a síntese de RNA mensageiro. Esta hipótese afeta a síntese de proteínas e pode inibir a atividade de várias enzimas (Rabea et al., 2003).

Apesar do desconhecimento acerca do mecanismo antimicrobiano do quitosano, estudos realizados com revestimentos deste polímero em frutas e vegetais provaram uma evidente ação antimicrobiana deste composto. Esta propriedade foi demonstrada em relação aos seguintes microrganismos: *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomona fluorescens*, *Candida lambica*, *Cryptococcus humiculus* e *Botrytis cinerea* (Olivas & Cánovas, 2007).

2.2.4. Aprovação para uso alimentar do quitosano

A utilização do quitosano como aditivo alimentar goza de aprovação há já vários anos em alguns países como Japão, Coreia e Canadá. Na União Europeia e nos Estados Unidos da América, o quitosano ainda só é utilizado em suplementos alimentares e medicamentos. No entanto, está aprovado para aplicação em alimentos desde que seja garantido o seu grau de pureza.

2.3. A Cereja

2.3.1. Aspetos Botânicos

A cereja pertence à família *Rosaceae*, subfamília *Prunoideae*, género *Prunus* e espécie cultivada *Prunus avium* L.. A cerejeira é uma árvore que pode alcançar mais de 15 m, de folhas obovado-acuminadas, duplamente serradas, mais ou menos peludas na página inferior. É geralmente uma planta auto-estéril, necessitando de polinização cruzada para se reproduzir. O seu fruto é uma drupa de forma arredondada, com 2 a 3 centímetros de diâmetro. O epicarpo dos frutos pode variar de amarelo a vermelho escuro ou negro e o mesocarpo tem uma cor pálida (que pode variar de amarelado a vermelho, mais ou menos acentuado). A sua polpa é firme, sumarenta e de sabor doce (Silva & Alarcão, 1999).

2.3.2. Distribuição geográfica

A cereja é cultivada em várias zonas do globo, com predominância nas zonas de clima temperado – a partir dos trópicos até 50º de latitude Norte e Sul. O seu cultivo engloba grande parte da Europa (mediterrânica e central), Norte de África, Próximo e Extremo Oriente, Sul da Austrália, Nova Zelândia e zonas temperadas do continente americano (EUA e Canadá, Argentina e Chile) (Silva & Alarcão, 1999).

Em Portugal, o cultivo da cereja concentra-se sobretudo a norte do rio Tejo, com exceção de Portalegre (Serra de S. Mamede). As regiões com maior implantação desta cultura são: a Beira Interior (Covilhã, Fundão, Belmonte, Catelo Branco norte, Guarda e Sabugal sul) com 50% da área de produção nacional; o Douro sul (Cinfães, Resende, Lamego, Armamar e Tabuaço) e a Alfândega da Fé (em Trás-os-Montes) com 40% da área de produção nacional; os restantes 10% estão distribuídos por Montes Senhora (Proença-a-Nova), Ferrreira do Zêzere, Alenquer e Portalegre (Silva & Alarcão, 1999).

2.3.3. Aspetos Agronómicos

Relativamente às condições edafo-climáticas, a cereja apresenta uma grande capacidade de adaptação a diferentes terrenos. No entanto, os solos franco-arenosos e argilosos são os mais adequados. A época de plantação é de Outubro a Março, e a enxertia é o processo da plantação mais utilizado. A colheita dos frutos (nas latitudes Norte) realiza-se entre meados de Maio e princípios de Junho, e é feita normalmente à mão, devendo os frutos apresentar o pedúnculo inteiro. As cerejas que são colhidas mecanicamente têm tendência a sofrer amolgadelas e fendilhamento, deteriorando-se facilmente durante a conservação e transporte. Destinando-se a transporte, a apanha deve efetuar-se com 3 ou 4 dias de antecedência (Silva & Alarcão, 1999).

Cerca de 90% da cereja produzida em Portugal, destina-se ao consumo em fresco. Os restantes 10% destinam-se a transformação e outras utilizações agro-alimentares. De entre as outras utilizações, destaca-se o chá feito com os pedúnculos de cereja, o óleo proveniente da prensagem dos seus caroços. Acrescem a estes usos da cereja o aproveitamento da madeira de cerejeira, que, pela sua qualidade e beleza, é muito apreciada em marcenaria de qualidade e tornoaria (Silva & Alarcão, 1999). Outras conhecidas utilizações do fruto englobam o fabrico de doces, geleias, marmeladas, conservas. O ácido orgânico predominante é o ácido málico, no entanto podemos encontrar presentes outros ácidos, como o cítrico, o sucínico, o fumárico e o quínico. As cerejas são uma boa fonte de antioxidantes, antocianinas, compostos fenólicos e melatonina, trazendo efeitos benéficos no combate ao cancro, doenças cardíacas, artrite e gota. A composição da cereja pode ser consultada em anexo (Anexo I), numa tabela que reúne dados obtidos pelo Instituto Superior de Higiene Doutor Ricardo Jorge, pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Royal Society of Chemistry e Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Inglaterra).

2.3.4. Período pós-colheita e alguns estudos realizados na sua conservação

A cereja é um fruto extremamente perecível, pois a sua qualidade deteriora-se muito rapidamente após a colheita. Muitas vezes, não chega ao consumidor em ótimas condições de qualidade após passar pelas fases de transporte e comercialização.

Tanto o fruto como o pedúnculo são constituídos maioritariamente por água, podendo a água ser perdida bastante facilmente. Quando a hidratação diminui, verifica-se uma perda de açúcar nas células, uma alteração da textura do fruto e um escurecimento do caule (Yaman & Bayoindirli, 2002). A cereja é um fruto não climatérico com uma baixa taxa de respiração. A forma mais simples de reduzir as taxas de respiração e transpiração (e aumentar o tempo de prateleira) é refrigerar os frutos o mais rapidamente possível após a sua colheita. A cereja deve ser refrigerada idealmente a temperatura próxima dos 0°C e a humidade relativa de 90-95%, condições que devem ser mantidas durante o tempo de armazenamento (Alonso & Alique, 2004; Lim, Stathopoulos & Golding, 2011).

Outro fator de grande responsabilidade pela deterioração da cereja são as contaminações microbiológicas. A maior causa de apodrecimento é a “podridão cinzenta”, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*. Também é bastante comum os frutos serem danificados pela contaminação de *Monilinia laxa*.

Também responsáveis por grandes perdas, apesar da sua menor incidência são os fungos *Monilinia spp* (causando Brown rot), *Penicillium expansum* (blue mold) *Alternaria alternata* (*Alternaria rot*) e *Cladosporium spp.* (*Cladosporium rot*) e algumas vezes por *Rhizopus stolonifer* (*Rhizopus rot*) (Romanazzi, 2010; Romanazzi, Nigro, Ippolito, 2003).

Todos os fatores de deterioração acima mencionados podem provocar alterações evidentes no aspeto dos frutos, sendo difícil conservar a aparência brilhante e com o pedúnculo verde durante muitos dias, quando armazenados nas condições habituais. Geralmente, após serem refrigerados, os

frutos são colocados numa prateleira à temperatura ambiente, a cerca de 20°C, para comercialização. Estas condições de temperatura fazem com que as cerejas não consigam alcançar um tempo de prateleira superior a 3 ou 4 dias (Romanazzi, 2010). É extremamente importante atrasar o aparecimento dos primeiros sintomas de apodrecimento durante este período, pois a aparência é um fator determinante para a aprovação dos consumidores (Lim et al., 2011).

Do ponto de vista económico, a cereja dá um contributo importante para as economias de várias regiões produtoras, sendo que o seu apodrecimento pós-colheita pode resultar em sérias perdas económicas para essas regiões. Em muitos países não é permitida a utilização de fungicidas sintéticos durante o armazenamento dos produtos, ou têm uma lista muito restrita de ingredientes que podem ser utilizados. Este facto, conjugado com a crescente preferência dos consumidores por produtos livres de resíduos de pesticidas, estimulou o interesse no desenvolvimento de métodos que permitissem controlar o apodrecimento pós-colheita (Romanazzi, 2010). Há vários anos que é comum a utilização de alguns métodos naturais - tratamentos de água e ar quente, embalagem em atmosfera modificada, utilização de bicarbonato de sódio ou utilização de leveduras antagonistas. Muitos destes tratamentos afetam a qualidade das cerejas (principalmente os que envolvem temperaturas elevadas) (Chailoo & Asghari, 2011).

Uma prática comercial bastante comum é a embalagem em atmosfera modificada, que permite abrandar a deterioração de alguns parâmetros de qualidade, como também prevenir as perdas causadas pelo crescimento de fungos (Alonso & Alique, 2004). Este método de conservação apresenta como principais desvantagens o seu custo elevado e a necessidade de um rigoroso controlo e manutenção da temperatura (para evitar a formação de condensações dentro da embalagem) (Pavlath & Orts, 2009). Para além destas desvantagens, é importante ter em conta o facto de que a atmosfera modificada pode desencadear a produção de toxinas pela bactéria *C.Botulinum* em frutos com o pH superior a 4,8, sendo necessário um maior cuidado neste tipo de alimentos. (Olivas and Barbosa-Cánovas 2005).

Acredita-se que os revestimentos comestíveis sejam uma boa alternativa à utilização de atmosfera modificada nas cerejas, especialmente nos casos em que são comercializadas sem o pedúnculo (Drake, Kupferman & Fekkman, 1988). Foram realizados alguns estudos com revestimentos à base de ceras (Drake et al., 1988) e de ésteres de sacarose de ácidos gordos (Yaman & Bayoindirli, 2002), com o objetivo de determinar a efetividade dos revestimentos comestíveis em cerejas. Nestes estudos provou-se a eficiência no controlo da perda de massa (Drake et al., 1988) e no aumento da vida de prateleira do produto (Yaman & Bayoindirli, 2002) - ambos fatores críticos no valor comercial do produto. Contudo, estes revestimentos não foram efetivos na prevenção do aparecimento de covas e buracos na superfície dos frutos (*pitting*).

Na última década, foram testados outros revestimentos em cerejas, entre eles géis de aloé vera (Martinez-Romero *et al.*, 2006), outros derivados de ácidos gordos (Alonso & Alique, 2004; Yaman & Bayoindirli, 2002) e quitosano (Aider & Halleux, 2008). Estes revestimentos, quando aplicados sem a adição de nenhum outro tratamento, não foram suficientemente efetivos na manutenção da qualidade

destes frutos. Apesar dos resultados positivos na redução da perda de massa apresentados pela maioria dos revestimentos, nenhuma das formulações testadas conseguiu obter resultados motivadores em todos os parâmetros analisados.

Outros estudos realizados por Lim, Stathopoulos e Golding (2011) com revestimentos comestíveis de gelatina, carboximetilcelulose e proteína de soja isolada (que também foram estudados sem a adição de mais nenhum tratamento), demonstraram uma grande contribuição no controlo da perda de água na cereja. No entanto, mais investigação é necessária para otimizar o tipo de revestimento, a sua concentração, temperatura de aplicação entre outros parâmetros, e também analisar o seu efeito em atributos como o apodrecimento e a perda de firmeza (que são importantes e não foram estudados).

Um trabalho realizado por M. S. Aday e C. Caner (2010) sobre a conservação da cereja, utilizando uma solução de revestimento de quitosano (numa concentração de 3%) em 1% de ácido acético e 0,25 ml de glicerol/g de quitosano, apontou várias contribuições: este revestimento demonstrou melhorias nas propriedades de barreira e na minimização de alterações verificadas (pH, condutividade elétrica, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, teor de ácido ascórbico e firmeza dos frutos). Apesar dos resultados terem sido positivos, outros revestimentos testados neste trabalho apresentaram ainda melhores resultados (como a goma-laca), o que nos leva a acreditar que algumas características dos revestimentos de quitosano devem ainda ser otimizadas.

Apesar destes estudos realizados na última década, considerando a importância do período pós-colheita na conservação e fornecimento de cerejas para os mercados mundiais, é de surpreender que existam tão poucos estudos publicados sobre esta questão até à data, sobretudo utilizando revestimentos comestíveis (Lim et al., 2011). Também o efeito da utilização de revestimentos comestíveis à base de quitosano para conservação da cereja foi ainda pouco investigado. Este é um fator de motivação na elaboração deste trabalho, em que se irão introduzir algumas alterações aos revestimentos de quitosano testados na bibliografia consultada, e avaliar o seu desempenho na conservação da cereja.

Por se ter em conta que o maior fator de apodrecimento na cereja é a contaminação microbológica, nomeadamente a contaminação por fungos como *Botrytis cinerea* e *Monilinia laxa*, incorporou-se nos revestimentos estudados extratos de carqueja, uma planta conhecida pela atividade antimicrobiana dos seus extratos aquosos (Coelho et al., 2011). Estes extratos vêm aliar a sua propriedade antimicrobiana, às propriedades antimicrobianas do quitosano, potenciado assim a ação antifúngica do revestimento.

No ponto 2.4 deste trabalho, apresentam-se algumas características e potencialidades da carqueja, considerada como uma fonte pouco conhecida e subaproveitada na indústria alimentar.

2.4. A carqueja

A Carqueja, também conhecida por Carqueija, é uma leguminosa que cresce espontaneamente em Portugal. De nome científico *Pterospartum tridentatum*, esta planta pertence à subfamília Papilionoideae, e é muito comum nas montanhas do Norte de Portugal. É um arbusto que pode crescer espontaneamente até 100 centímetros, de flores amarelas, ramificações alternadas e caules alados. (Coelho et al., 2011).

Alguns autores referem a utilização de *Pterospartum tridentatum* na medicina tradicional para o tratamento de constipações, dores de estômago, problemas intestinais, doenças dos rins, fígado, bexiga e reumatismo. É também indicada em casos de pneumonia, bronquite, traqueite, dores de cabeça, tosse, pressão arterial elevada, colesterol, diabetes e programas de perda de peso. O seu efeito diurético, laxante, emoliente, hipotensor, hipoglicémico e digestivo, torna esta planta bastante versátil (Coelho et al., 2011). Para além das suas aplicações medicinais, é também utilizada na culinária como condimento no arroz e na carne assada.

A Carqueja é uma fonte natural subaproveitada, pois a sua utilização está pouco vulgarizada, no entanto é um recurso rico em compostos com atividade biológica, como alcalóides e flavonóides. Os extratos desta planta, apresentam um elevado rendimento de extração e um nível apreciável de compostos fenólicos totais, apresentando uma atividade antioxidante significativa. Para além disso, experiências realizadas anteriormente preveem uma atividade antimicrobiana significativa dos seus extratos sólidos contra bactérias e fungos (Coelho et al., 2011).

Considera-se, desta forma, que a Carqueja apresenta um grande potencial de utilização, principalmente como fonte de antioxidantes naturais seguros para a saúde e como conservante na indústria alimentar. Do ponto de vista industrial, outra grande vantagem é o facto de esta planta poder ser colhida em todas as estações do ano (Coelho et al., 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção da concentração dos componentes das soluções filmogénicas

3.1.1. Seleção do agente de dissolução do quitosano

O quitosano é um biopolímero natural insolúvel em água e que apenas se dissolve em solução ácida, o que também favorece a ativação das suas propriedades antimicrobianas (Romanazzi et al., 2009).

O ácido acético é o agente mais referido na bibliografia para a preparação de soluções aquosas a usar como solvente do quitosano e também o descrito como o que apresenta melhores resultados (Aday & Caner, 2010; Martínez-Camacho, 2010; Park e tal., 2002; Pillai et al., 2009; Romanazzi et al., 2003; Romanazzi et al., 2009; Romanazzi, 2010; Vargas et al., 2009). A utilização de ácido acético na formulação de revestimentos comestíveis, apresenta como grande desvantagem o aroma característico conferido aos filmes e revestimentos, que por vezes não é possível camuflar após a sua aplicação nos alimentos.

Com o objetivo de evitar a utilização de ácido acético, testaram-se outros ácidos como agentes de dissolução do quitosano e avaliou-se o comportamento dos respetivos filmes obtidos. Após a consulta de bibliografia onde foram realizados testes semelhantes (Romanazzi et al., 2009), selecionaram-se cinco ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido tartárico e ácido láctico), que se usaram em diferentes concentrações, para dissolver diferentes concentrações de quitosano - com a adição/ausência de outros componentes (ácido cítrico e glicerol).

As formulações testadas encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Os resultados obtidos foram pouco favoráveis em todas as formulações testadas (esses resultados encontram-se apresentados no capítulo “Apresentação e Discussão dos Resultados”). Este facto, levou-nos a rejeitar todas estas hipóteses e a optar pela solução inicial de utilizar uma solução de ácido acético a 1% como dissolvente do quitosano (o tratamento considerado como mais efetivo na bibliografia consultada).

Tabela 1 – Soluções testadas para dissolução do quitosano

	Concentração de quitosano (m/m solução)	Solvente	Concentração de Glicerol (m/m CH)	Concentração de Ácido Cítrico (m/m CH)
a)	2%	Solução de ácido cítrico a pH = 2,57 *	50%	-
b)	2%	Solução de ácido ascórbico a pH = 2,57 *	50%	50%
c)	2%	Solução de ácido tartárico a pH = 2,57 *	50%	-
d)	2%	Solução de ácido láctico a 0,5% (pH = 2,46)	50%	50% e sem A.C.
e)	1% e 1,5%	Solução de ácido láctico a 0,5% (pH = 2,46)	50%	50% e sem A.C.
f)	2%	Solução de ácido láctico a 1% (pH = 2,4)	-	50% e sem A.C.
g)	2%	Solução de ácido láctico a 0,5% (pH = 2,46)	-	50% e sem A.C.
h)	1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%	Solução de ácido láctico a 0,5% (pH = 2,46)	50%	50% e sem A.C.
i)	1% e 2%	Solução de ácido málico a 1% (pH = 2,3)	50%	50% e sem A.C.

* pH correspondente à solução de ácido acético a 1%

** Filmes elaborados após a centrifugação da solução, de forma a eliminar o excesso de quitosano que não dissolveu

3.1.2. Estudo do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol

O estudo do efeito das concentrações de ácido cítrico e glicerol nas propriedades dos filmes, nomeadamente na sua resistência à água (solubilidade, *swelling* e permeabilidade ao vapor de água), foi realizado usando um desenho de experiências composto central rotativo com a metodologia de superfície de resposta. Com o objetivo de selecionar a gama de valores das variáveis independentes (concentrações de glicerol e de ácido cítrico), foram efetuados alguns ensaios preliminares.

3.1.2.1. Ensaios preliminares

Em primeiro lugar, foram testadas oito concentrações diferentes de ácido cítrico (0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 100%, 200%, 300%), em relação à quantidade de polímero existente na solução que se manteve constante (2% de quitosano).

Os filmes obtidos foram submetidos a uma medição da cor e a um teste de perfuração, de forma a avaliar qual a gama de concentrações de ácido cítrico mais funcionais.

Tendo em conta a gama de concentrações de ácido cítrico selecionadas prosseguiu-se com os ensaios preliminares de modo a selecionar a gama de concentrações de glicerol que, em conjunto com o ácido cítrico, possibilitavam a obtenção de filmes íntegros e passíveis de serem caracterizados. Estes últimos ensaios foram realizados para duas concentrações de quitosano. Nestes filmes, apenas se avaliou a aparência e a solubilidade em água. Os valores das variáveis testadas estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições estudadas nos ensaios preliminares.

	1,5% CH	2% CH
Teste 1	35,36% A.C. 17,7% Gly	35,36% A.C. 17,7% Gly
Teste 2	85,36% A.C. 42,7% Gly	85,36% A.C. 42,7% Gly
Teste 3	100% A.C. 25% Gly	100% A.C. 25% Gly
Teste 4	50% A.C. 0% Gly	50% A.C. 0% Gly
Teste 5	10% A.C. 30% Gly	10% A.C. 30% Gly
Teste 6	65% A.C. 10% Gly	65% A.C. 10% Gly
Teste 7	85% A.C. 0% Gly	85% A.C. 0% Gly
Teste 8	10% A.C. 50% Gly	10% A.C. 50% Gly
Teste 9	70% A.C. 50% Gly	----

3.1.2.2. Delineamento experimental

O planejamento de experiências foi efetuado segundo um delineamento experimental do tipo composto central rotativo. Neste estudo, as variáveis independentes correspondem à concentração de ácido cítrico e concentração de glicerol (Tabela 3). As variáveis dependentes correspondem às características dos filmes obtidos, designadamente: solubilidade e capacidade de absorção de água; permeabilidade ao vapor de água; tensão de rutura, alongamento na rutura e Módulo de Young, obtidos nos testes de extensão; tensão e alongamento de rutura, obtidos nos testes de perfuração.

O delineamento experimental realizado (Tabela 3) permite comparar os filmes obtidos, perceber a influência das variáveis independentes nas variáveis de resposta, assim como optar pelas formulações que apresentam melhores propriedades mecânicas e de barreira para prosseguir o estudo.

Tabela 3 - Delineamento experimental usado para a otimizar a quantidade de Ácido Cítrico e Glicerol a adicionar à solução filmogénica de quitosano.

	% Ácido Cítrico	% Glicerol	
Run 1	35,4%	27,3%	Desenho factorial
Run 2	85,4%	27,3%	
Run 3	35,4%	62,7%	
Run 4	85,4%	62,7%	
Run 5	50%	45%	Ponto central
Run 6	50%	45%	
Run 7	50%	45%	
Run 8	0%	45%	Pontos axiais
Run 9	100%	45%	
Run 10	50%	20%	
Run 11	50%	70%	

3.1.3. Estudo do efeito da concentração de um lípido (cera/óleo)

Para estudar o efeito da concentração de um composto lipídico nos filmes de quitosano, foram adicionadas diferentes concentrações de lípido à formulação selecionada no ponto 3.1.3. (50% de ácido Cítrico e de glicerol em relação à massa de quitosano). A concentração de surfatante utilizada foi de 0,15% (m/m de solução), pelo motivo de ter sido a concentração mais encontrada na literatura consultada e de ter apresentado um bom resultado nesta situação.

Neste sentido, testaram-se as formulações apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Formulações testadas para a otimizar a concentração de lípido a adicionar à solução filmogénica de quitosano.

Solução-Base selecionada em 3.1.3.	Surfatante (m/m solução)	Lípido (m/m CH)
2% Quitosano, 50% Ácido Cítrico (m/m CH), 50% Glicerol (m/m CH)	0,15% Tween 80	5% Óleo Alimentar
		5% Ácido Oleico
		5% Cera de Abelha
		10% Cera de Abelha

Para estas formulações, realizaram-se as seguintes análises: inspeção visual do aspeto dos filmes, comportamento quando mergulhados 24 horas em água (solubilização/ não solubilização).

3.2. Preparação das soluções filmogénicas

3.2.1. Soluções de quitosano, glicerol e ácido cítrico

Num balão de vidro, preparou-se uma solução de ácido acético a 1%. Mediu-se a quantidade de quitosano correspondente a 2% da massa total da solução a preparar e adicionou-se gradualmente à solução de ácido acético. Agitou-se durante algumas horas até à dissolução total do quitosano. Mediu-se a massa e adicionou-se a quantidade de glicerol e ácido cítrico de acordo com as formulações a testar, apresentadas na Tabela 3. Agitou-se novamente a solução até à dissolução completa do ácido cítrico e incorporação do glicerol. Colocou-se a solução na estufa de vácuo durante alguns minutos, com o objetivo de remover bolhas de ar que se formaram durante a agitação.

3.2.2. Soluções filmogénicas com óleo

Procedeu-se aos mesmos passos que em 3.2.1. mas com adição de Tween 80 e Óleo de girassol à solução filmogénica. O tween 80 foi adicionado no momento da adição do glicerol e do ácido cítrico, enquanto que o óleo foi adicionado no final sob agitação elevada. O óleo foi adicionado em quantidade variável, de acordo com as formulações a testar, apresentadas na Tabela 4. As concentrações de ácido cítrico e glicerol usadas foram as selecionadas a partir do desenho de experiências descrito na secção 3.1.2.2. (50% de ácido cítrico e de glicerol em relação à massa de quitosano).

3.2.3. Soluções filmogénicas com cera de abelha

Procedeu-se aos mesmos passos que em 3.2.1. com o acrescento da adição de Tween 80 e Cera de Abelha à solução filmogénica.

O tween 80 foi adicionado no momento da adição do glicerol e do ácido cítrico, enquanto que a cera de abelha foi adicionada no final, necessitando de agitação e aquecimento a 70 °C (a sua temperatura de fusão) até à homogeneização da solução.

3.3. Caracterização reológica das formulações selecionadas

As quatro soluções que foram utilizadas para revestir as cerejas foram submetidas a uma caracterização reológica. Os testes foram realizados em um reómetro HAAKE MARS (Modular Advanced Rheometer System), equipado com um cone (diâmetro de 35 mm, ângulo 2º) e uma geometria de prato. Cada uma das amostras foi colocada em quantidade suficiente sobre o prato

(cerca de 1 ml), e coberta com parafina líquida para evitar a evaporação de água. Para cada formulação, foram elaboradas as curvas de escoamento da solução, fazendo variar a taxa de deformação entre 0.01 e 700 s⁻¹, a 20 °C e 40 °C.

3.4. Filmes à base de quitosano

3.4.1 Método de preparação

Uma vez obtidas as soluções filmogénicas, tornou-se possível a elaboração de filmes. Para tal, verteu-se 20g de solução em placas de petri com 60mm de diâmetro e colocou-se na estufa a 40 °C durante cerca de 48h (período necessário à formação de um filme). Para cada ensaio, prepararam-se cerca de 10 placas de petri de forma a obter filme suficiente para realizar todos os testes de caracterização.

3.4.2. Corte e identificação

Após a total secagem dos filmes, retiraram-se cuidadosamente das placas de petri e cortaram-se:

- Dez quadrados de cada formulação com as dimensões de 2 cm x 2 cm para o ensaio de perfuração.
- Quatro a seis retângulos com as dimensões de 7 cm x 2 cm para o ensaio de extensão.
- Três quadrados com as dimensões de 2 cm x 2cm para os ensaios de solubilidade e capacidade de absorção de água.
- Três círculos com 5 cm de diâmetro para o ensaio de permeabilidade ao vapor de água.

Após o corte, todos os pedaços foram numerados e identificados com a formulação respetiva.

3.4.3. Medição da espessura

A espessura dos filmes foi determinada com um micrómetro eletrónico (Mitutoyo Lda, Andover, Reino Unido), realizando-se um diferente número de medições consoante os pedaços de filme cortados. Nos pedaços de menor dimensão (quadrados de 2 cm x 2 cm) realizou-se apenas uma medição; nos pedaços de maior dimensão realizaram-se duas medições (nos retângulos de 2 cm x 7 cm) ou três medições (nos círculos de 5cm de diâmetro) em diferentes zonas do filme. Entre cada medição calibrou-se o equipamento.

3.4.4. Caracterização

3.4.4.1. Propriedades óticas

Medição da cor

Para a determinação da cor, utilizou-se um colorímetro (Minolta CTR-300, USA) que fornece parâmetros da cor (L^* , a^* e b^*). Antes de se efetuarem as medições, calibrou-se o colorímetro com um padrão branco e foram efetuadas três medições em cada amostra de revestimento nas mesmas condições de luminosidade (luz artificial). Inicialmente, determinaram-se os parâmetros da cor de três folhas de diferentes cores (amarelo, verde e vermelho) e depois nas amostras de filme sobre as quatro diferentes folhas.

O modelo utilizado foi o CIELAB que define três coordenadas tridimensionais: L^* , a^* e b^* . O L^* diz respeito à luminosidade (varia entre 0 e 100, correspondendo o 0 ao preto e o 100 ao branco). O a^* e o b^* dizem respeito ao cromatismo (o seu valor varia entre -60 e +60): o a^* indica-nos o valor associado ao vermelho/verde e o b^* o valor associado ao amarelo/azul.

Este modelo tridimensional pode ser representado esquematicamente como se apresenta na Figura 3: o L^* encontra-se representado no eixo vertical, enquanto que o a^* e o b^* se encontram representados nos eixos horizontais. O ponto central (0,0,0) representa a cor cinzento.

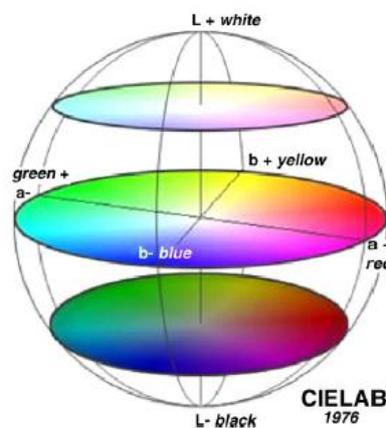


Figura 3 – Representação esquemática do modelo CIELAB (Quek, Chok & Swedlund, 2007)

Podemos ainda obter outros dois parâmetros a partir deste modelo: o C^* (saturação da cor) e o h^o (matiz da cor).

$$C^* = (a^{*2} - b^{*2})^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

$$h^o = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2)$$

O que se determina neste ensaio é a variação da cor entre as cartolinas coloridas e as cartolinas coloridas com os filmes sobrepostos. A variação da cor obtém-se pela diferença dos parâmetros L^* , a^* e b^* entre as duas cores, como demonstra a equação:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Quando ΔE apresenta valores baixos (inferiores a 6) consideramos que a diferença entre as cores é pouco significativa, apesar de que para valores superiores a 3 as diferenças já são detetadas pelo olho humano.

3.4.4.2. Microscopia eletrónica de varrimento (MEV)

A microscopia eletrónica de varrimento é um tipo de microscopia eletrónica que permite a obtenção de imagens de alta resolução da superfície de uma amostra.

Para a análise dos filmes estudados, utilizou-se um microscópio Jeol JSM-7001F, *Field emission scanning electron microscope*. Este equipamento permite a observação e a caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos heterogêneos numa escala nanométrica (nm) e micrométrica (μm). Para além das imagens de superfície das amostras, este método permite também obter uma visualização da secção de corte dos filmes, através da inclinação das amostras a aproximadamente 45° .

O princípio deste tipo de microscopia assenta na incidência de um feixe de eletrões na superfície da amostra, que produz uma resposta que podem ser eletrões secundários, eletrões retrodifundidos, raios-x, entre outros. Neste caso, os eletrões libertados pelo feixe colidem com a superfície da amostra previamente tratada e libertam eletrões secundários, através dos quais se obtém a imagem. O feixe de eletrões primário é móvel e faz um varrimento da superfície, o que permite obter uma imagem completa da amostra. Para esta análise, utilizou-se um feixe de 5 kV.

Para a preparação das amostras, cortam-se os filmes a analisar em quadrados de 1 cm^2 com a utilização de azoto líquido, o que permite obter um corte perfeito (sem que ocorra a deformação na zona do corte). Para além disso, as amostras analisadas têm que ser condutoras e, por este motivo, aplicou-se uma fina camada de ouro na sua superfície antes de se proceder à sua observação.

3.4.4.3. Propriedades higroscópicas

Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água determinou-se gravimetricamente.

Para cada formulação preparada, cortaram-se três amostras de dimensões circulares com 5 cm de diâmetro. Colocaram-se as amostras num exsiccador durante 72 horas a temperatura e humidade

controladas (21 °C e humidade relativa de 80). Terminado este período, selaram-se as amostras ao topo de caixas de vidro com 5 cm de diâmetro (com o auxílio de silicone), nas quais se verteu previamente 9 ml de uma solução salina de brometo de potássio ($a_w = 0,80$). De forma a imobilizar as amostras sobre as caixas de vidro, colocou-se por cima um anel de vidro, com o auxílio de silicone.

Colocaram-se as caixas dentro dum exsiccador (Figura 4), com uma solução salina de nitrato de magnésio hexa-hidratado ($a_w = 0,534$). No interior do exsiccador, foi colocada uma ventoinha que tem como finalidade minimizar a resistência à transferência de massa acima do filme, produzida pela camada de ar (Alves, Costa & Coelho, 2010). As condições de temperatura e humidade foram monitorizadas usando um termohigrómetro (Hanna Instruments, USA).

O fluxo de vapor de água foi determinado através da pesagem das caixas em intervalos de 2 horas (até se obterem no mínimo 4 medições).

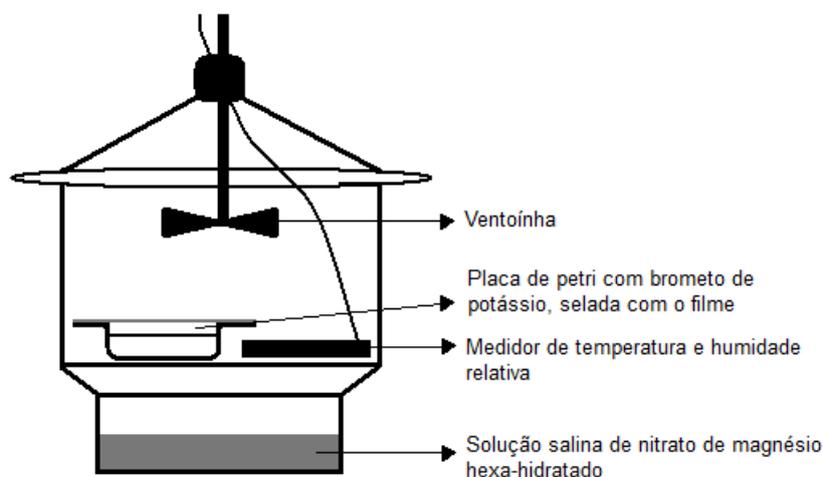


Figura 4 – Montagem experimental utilizada para medir a permeabilidade ao vapor de água.

Solubilidade e capacidade de absorção de água

Para este ensaio cortaram-se 3 réplicas de dimensões 2 cm x 2 cm de cada formulação a analisar. Procedeu-se sequencialmente da seguinte forma:

- 1) Colocaram-se os pedaços de filme durante 24 horas num exsiccador contendo sílica gel, de forma a retirar a humidade residual e a estabilizar os filmes em iguais condições;
- 2) Mergulharam-se os filmes em água destilada durante 24 horas;
- 3) Transferiram-se os filmes para a estufa a uma temperatura de 40 °C durante 24 horas, com a finalidade de retirar toda a humidade contida na sua estrutura;
- 4) Colocaram-se novamente no exsiccador durante 24 horas;

Pesaram-se os pedaços de filme antes da sua colocação em água (m_1), logo após terem sido retirados de água (m_2) e no final do procedimento (após as 24 horas finais no exsiccador) (m_3). Com os dados das pesagens procedeu-se aos cálculos da Solubilidade e da Capacidade de Absorção de Água (CAA), de acordo com as equações:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{m_1 - m_3}{m_1} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{CAA (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_3} \times 100 \quad (5)$$

3.4.4.4. Propriedades mecânicas

Extensão

Para o teste de extensão, cortaram-se 4 a 6 réplicas de filme de cada formulação, com forma retangular de dimensões 2cmx7cm. Colocaram-se num exsiccador a 50% de humidade relativa e a 22 °C, durante 72 horas, de forma a estabilizar as amostras. Terminado este período, utilizou-se um texturómetro TA-XT2 da Stable Micro System, UK para realizar os testes de extensão. Fixaram-se as amostras pela extremidade a uma sonda de gancho de tração e esticaram-se a uma velocidade constante de 0,5 mm/s até à sua rutura.

Este teste permite obter a força exercida em função da distância percorrida e do tempo, o que permite calcular a força na rutura e a deformação na rutura. Através destes dados, pode obter-se a tensão na rutura (σ), o alongamento na rutura (ε) e o módulo de Young (E).

A tensão na rutura (N/m^2) corresponde ao quociente da força de rutura (N) pela área da secção reta do filme (m^2)

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (6)$$

O alongamento na rutura (%) corresponde ao quociente do alongamento do filme (diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial) pelo seu comprimento inicial.

$$\varepsilon = \frac{l_f - l_i}{l_i} \times 100 \quad (7)$$

onde ε é o alongamento na rutura (%), l_f o comprimento final (m) e l_i o comprimento inicial (m).

O módulo de Young (E) corresponde ao quociente entre a tensão de rutura e a deformação, indicando a resistência que o filme oferece à deformação.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (8)$$

onde σ é a tensão de rutura e ε a deformação.

Neste teste, obtém-se o módulo de Young através dos gráficos da tensão de rutura em função da deformação (Anexo II).

Perfuração

Os testes de perfuração foram realizados num texturómetro TA-XT2 da Stable Micro System, UK, com uma sonda de 2 mm de diâmetro montada sobre uma plataforma com um orifício de 10 mm de diâmetro. Para a realização destes testes, cortaram-se dez quadrados de 2 cm x 2 cm de filmes, para cada uma das formulações analisadas.

Imobilizaram-se as amostras sobre o orifício da plataforma do texturómetro e perfuraram-se a uma velocidade constante de 1,0 mm/s. Este teste permite obter a força exercida para perfurar o filme em função da distância percorrida e do tempo. É possível obter a tensão de perfuração (σ_p) através da equação:

$$\sigma_p = \frac{F_p}{S_p} \quad (9)$$

onde F_p é a força de perfuração (em N) e S_p a área de secção reta da sonda (em m^2).

A deformação (ε), pode ser obtida através da equação:

$$\varepsilon_p = \frac{L_f - L_i}{L_i} \times 100 \quad (10)$$

onde L_i representa o comprimento inicial e L_f o alongamento do filme, calculado com base na distância percorrida pela sonda, como ilustra a Figura 5:

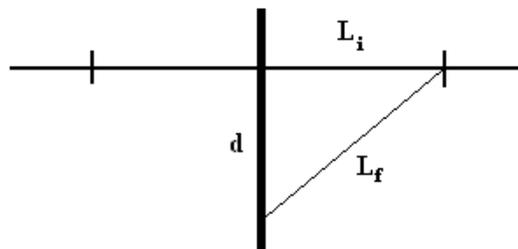


Figura 5 - Esquema representativo do cálculo da deformação na rutura num ensaio de perfuração.

Desta forma, L_f corresponde à hipotenusa da soma da distância inicial (L_i) e da distância percorrida pela sonda (d):

$$L_f = \sqrt{L_i^2 + d^2} \quad (11)$$

3.4.5. Análise Estatística

Os procedimentos estatísticos foram realizados com o recurso ao Software StatisticaTM v.8.0 da Statsoft (2007).

Os resultados obtidos no estudo de optimização das formulações filmogénicas que apresentam melhores propriedades mecânicas e de barreira foram tratados pelo Método de

Superfície de Respostas (RSM) com utilização do modelo empírico de regressão polinomial quadrática (Eq. 12) para estimar as respostas individuais.

Para cada resposta em estudo (variável dependente Y), os respectivos resultados experimentais foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem (Eq. 12) e submetidos à análise de regressão multivariada (ANOVA) para avaliar a qualidade dos modelos.

$$Y = b_0 + b_1x + b_{11}x^2 + b_2z + b_{22}z^2 + b_{12}xz \quad (12)$$

b_n : coeficientes de regressão

x; z: variáveis independentes, concentrações de ácido cítrico e glicerol

Na avaliação da significância e validade dos modelos foram tidos em conta os coeficientes de regressão múltipla (r^2 e r^2_{ajust}). Na avaliação destes coeficientes (r^2 e r^2_{ajuste}) utilizou-se o critério em que a diferença entre ambos deverá distar menos de uma décima de unidade (Montgomery, 1997).

A análise ANOVA foi realizada partindo dos seus pressupostos básicos: as amostras são aleatórias e independentes, as populações têm distribuição normal e as variâncias populacionais são iguais.

Para a caracterização das soluções que foram aplicadas como revestimento aos frutos, realizou-se um teste post-hoc de Tukey ($p\text{-value} < 0,05$) para comparação de médias, nos diferentes parâmetros estudados.

3.5. Aplicação dos revestimentos comestíveis em cereja

3.5.1. Método de aplicação

Prepararam-se as soluções de revestimento apresentadas na Tabela 5 de forma idêntica à descrita no subcapítulo 3.2., na quantidade de 2500 ml para cada formulação. De salientar que foram aplicadas soluções filmogénicas com e sem incorporação de uma fase lipídica (óleo de girassol ou cera). Adicionalmente, as formulações com fase lipídica foram complementadas com extrato aquoso de carqueja (Coelho e tal., 2011), de modo a produzir revestimentos bioativos.

Por cada formulação selecionada, revestiu-se 1 kg de cereja.

Após a obtenção da solução filmogénica, revestiram-se as cerejas através da sua imersão na solução e posterior secagem em estufa. Foi utilizada uma estufa Binder KB-115 a uma temperatura de 4 °C com circulação de ar forçada. Deixou-se a porta da estufa entreaberta para promover a renovação de ar, evitando-se elevados níveis de humidade que dificultariam a secagem. Como se observa na Figura 6, penduraram-se os frutos em 2 níveis separados por um tabuleiro.



Figura 6 – Secagem do revestimento aplicado nos frutos.

Tabela 5 – Soluções utilizadas para revestimento da cereja

Formulação	Quitosano (m/m solução)	Ácido Acético (v/v solução)	Ácido Cítrico (m/m CH)	Glicerol (m/m CH)	Tween 80 (m/m solução)	Cera de Abelha (m/m CH)	Óleo de Girassol (m/m CH)	Carqueja (m/m solução)
CT	-	-	-	-	-	-	-	-
C+T	2%	1%	50%	50%	1,5%	5%	-	-
C+T+CA	2%	1%	50%	50%	1,5%	5%	-	1%
OI+T	2%	1%	50%	50%	1,5%	-	5%	-
OI+T+CA	2%	1%	50%	50%	1,5%	-	5%	1%

Após a secagem, armazenaram-se as cerejas revestidas em ambiente refrigerado a 4 °C.

A duração do ensaio de conservação foi de 28 dias, realizando-se 8 observações espaçadas, nos dias 1,7,10,15,20, 22 e 28. Alguns testes analíticos foram realizados aos frutos durante este período: perda de massa, brix, textura e também análise sensorial e quantificação de bolores e leveduras presentes. Determinou-se, ainda, a cor dos frutos antes e depois da aplicação do revestimento.

Por cada dia de observação, preparou-se um lote de amostra com 10 cerejas por cada revestimento a testar (CT, C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA), para serem utilizadas nos testes analíticos - com exceção da avaliação da perda de massa, em que se utilizou a mesma amostra desde o início do ensaio.

3.5.2. Controlo analítico dos frutos

3.5.2.1. Perda de massa

Durante o ensaio de conservação foi determinada a perda de massa por pesagem de uma amostra identificada de cada revestimento a testar (CT, C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA) em diferentes dias. A perda de massa foi expressa como a percentagem de perda em relação à massa inicial. Para esta determinação utilizou-se uma balança analítica Precisa Instruments BJ-11000.

3.5.2.2. Teor de sólidos solúveis

Para a determinação do teor de sólidos solúveis utilizou-se um refratómetro (modelo digital Atago PAL-1) com uma precisão de $\pm 0,2\%$ para um espectro de grau Brix entre 0% a 53% a 25 °C. Triturou-se uma amostra de 10 cerejas de cada lote e colocou-se uma gota na superfície de leitura do refratómetro. Foram efetuadas três medições por amostra em cada dia de observação durante o ensaio de conservação.

3.5.2.3. Cor

Para a determinação da cor, utilizou-se um colorímetro (Minolta CTR-300, USA) que fornece parâmetros da cor (L^* , a^* e b^*). Para cada um dos revestimentos aplicados, foram efetuadas medições em 10 cerejas (uma medição por cada cereja). As medições foram realizadas antes da aplicação do revestimento e logo após a sua secagem, nas mesmas cerejas. Este procedimento permitiu avaliar as alterações na cor após a aplicação dos revestimentos.

3.5.2.4. Firmeza

Para o estudo do efeito dos revestimentos aplicados nas propriedades mecânicas das cerejas foi avaliada a sua textura. A firmeza das cerejas foi medida como uma força de resistência oferecida pelas cerejas à sua penetração. Neste ensaio utilizou-se um texturómetro (TA-XT2 da Stable Micro System, UK).

Realizou-se um ensaio destrutivo de perfuração das cerejas, utilizando uma sonda de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro e uma plataforma com um orifício de 10 mm de diâmetro. Colocaram-se as cerejas sobre o orifício da plataforma e foram perfuradas pela sonda a uma velocidade constante de 1,0 mm/s, até se atingir o caroço. Neste teste utilizaram-se 10 cerejas (selecionadas aleatoriamente) de cada lote, por cada dia de observação durante o ensaio de conservação.

Neste teste obtém-se a força aplicada durante a perfuração das cerejas, em que a força máxima aplicada corresponde ao momento em que a sonda perfura a pele do fruto. A partir do valor da força máxima calculou-se a tensão de perfuração usando a equação:

$$\sigma_p = \frac{F_p}{S_p} \quad (13)$$

em que F_p corresponde à força de perfuração (em N) e S_p à área de secção reta da sonda (em m^2).

3.5.2.5. Análise de bolores e leveduras

Com o objetivo de avaliar o efeito dos revestimentos na conservação das cerejas, foi realizado uma análise microbiológica de contagem bolores e leveduras. Para tal, foi utilizada a técnica de sementeira em meio de cultura apropriado (Meio de Cooke Rose Bengal) a 25 °C durante 5 dias e posterior contagem das respetivas colónias. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Norma Portuguesa NP 3277-1. Neste trabalho, efetuou-se a contagem de bolores e leveduras no dia 7 e no dia 22 do ensaio de conservação.

Para a realização desta análise microbiológica, adicionaram-se 10 g de cereja por cada lote a analisar a 90 ml de uma solução de triptona sal e triturou-se durante um minuto e meio no Stomacher. Realizaram-se três diluições da amostra (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e adicionou-se 100 ml de solução a placas contendo meio de cultura preparado previamente. Incubaram-se as placas durante 5 dias à temperatura de 25 °C e terminado este período procedeu-se à contagem das colónias formadas e ao cálculo do número provável de unidades formadoras de colónia por grama de produto (UFC/g).

3.5.2.6. Análise sensorial

Durante o ensaio de conservação, foram realizadas duas avaliações sensoriais às cerejas, com o objetivo de avaliar a perceção sensorial dos revestimentos aplicados e a sua contribuição na conservação e apreciação global dos frutos. Para isso, recorreu-se a um painel de 10 provadores semi-treinados, com idades compreendidas entre os 22 e os 63 anos, que avaliaram várias características. As provas sensoriais foram realizadas nos dias 1 e 11 do ensaio de conservação, de forma a permitir avaliar a evolução sensorial dos frutos.

Os atributos avaliados relacionam-se com o aspeto visual dos frutos (homogeneidade e intensidade da cor, perceção do revestimento e brilho), gosto (doce, ácido e estranho), apreciação global e intenção de compra. Estes atributos foram classificados numa escala de 1 a 6 (escala de intensidade).

A ficha de prova utilizada encontra-se em anexo (Anexo III).

3.5.2.7. Análise Estatística

Este estudo avaliou o efeito combinado de revestimentos (cinco tratamentos, incluindo o controle) e do tempo de armazenamento nas propriedades das cerejas.

Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) a cada um dos parâmetros estudados, sendo utilizado o teste *post-hoc* de Tukey (p -valeu $<0,05$) para comparação das médias. A análise ANOVA foi realizada partindo dos seus pressupostos básicos: as amostras são aleatórias e independentes, as populações têm distribuição normal e as variâncias populacionais são iguais.

Efetou-se uma análise multivariada a todos os parâmetros físico-químicos e sensoriais estudados durante o armazenamento das cerejas com os cinco tratamentos diferentes, em que foi realizada uma análise de componentes principais (às amostras analisadas nos dias 4 e 10) e uma análise de dendrograma (*cluster analysis*).

Os procedimentos estatísticos foram executados com o recurso ao Software Statistica™ v.8.0 da Statsoft (2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5. Otimização da solução filmogénica

4.5.1. *Seleção do agente de dissolução do quitosano*

Na Tabela 1 encontram-se apresentadas as formulações testadas na etapa de escolha do solvente a utilizar para o quitosano.

Os resultados obtidos em todas as formulações testadas, identificadas de a) a i), encontram-se apresentados em seguida:

a) Num período de 24 horas, o quitosano não se dissolveu na solução de ácido cítrico (pH=2,57), nem com o auxílio de agitação e aquecimento. Por este motivo, abandonou-se esta hipótese e testou-se uma solução de outro ácido.

b) Verificou-se a dissolução do quitosano na solução de ácido ascórbico apenas com o auxílio de agitação e aquecimento. Durante o aquecimento observou-se o escurecimento da solução, traduzindo-se na formação de filmes com um tom alaranjado.

c) O quitosano apresentou-se insolúvel na solução de ácido tartárico a pH=2,57.

d) Nas soluções em que foram adicionadas as concentrações de 1,5% e 2% de quitosano a uma solução de ácido láctico a 0,5%, um excesso de polímero ficou por dissolver, pelo que não foi possível elaborar de filmes.

e) Ocorreu a total dissolução do quitosano na solução de ácido láctico e elaboraram-se filmes com e sem a adição de ácido cítrico como agente modificador do quitosano. Obtiveram-se filmes com uma espessura muito reduzida e, quando colocados em água, dissolveram-se em poucas horas.

f) Observou-se a dissolução do quitosano na solução de ácido láctico. No entanto, abandonou-se a hipótese pelo facto dos filmes obtidos se terem dissolvido após poucos minutos em água. Esta situação verificou-se para todos os filmes, com e sem a presença de ácido cítrico como agente modificador do quitosano.

g) Após a centrifugação da solução, elaboraram-se filmes com a solução resultante. Desta forma, assegurou-se que os filmes formados contêm a máxima quantidade de quitosano que é possível dissolver numa solução de ácido láctico a 1,5% (v/v).

Ao colocar os filmes em água, ocorreu a dissolução de todos. Observou-se que os filmes sem a adição de ácido cítrico demoraram mais tempo a dissolver-se.

h) Nas concentrações mais elevadas de quitosano, visualizou-se um excesso de polímero por dissolver, embora os filmes formados não apresentem um aspeto muito rugoso.

Poucas horas depois de se colocarem em água, verificou-se a dissolução de todos os filmes (1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5% de quitosano). Observou-se também uma tonalidade amarelada nas formulações em que se adicionou ácido cítrico.

i) Com o objetivo de ultrapassar as limitações apresentadas pelos filmes de ácido láctico, testou-se uma solução de ácido málico a 1% (v/v) como dissolvente do quitosano, usando 2 concentrações de polímero: 1% e 2%. Obtiveram-se resultados muito semelhantes aos da utilização do ácido láctico, em que os filmes formados se dissolveram rapidamente em contacto com a água.

Os resultados obtidos na etapa de escolha do solvente a utilizar, encontram-se sintetizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos pelos diferentes solventes testados.

Solvente	Problema apresentado
Solução de Ácido Cítrico	Dificuldade em dissolver a quantidade desejada de quitosano
Solução de Ácido Ascórbico	Filmes formados apresentam tom laranja
Solução de Ácido Málico	Filmes formados dissolveram-se passado poucas horas em água
Solução de Ácido Tartárico	Dificuldade em dissolver quitosano na solução
Solução de Ácido Láctico	Filmes formados dissolveram-se passado poucas horas em água

As limitações apresentadas por todas estas hipóteses, levaram a optar-se pelo ácido acético como dissolvente do quitosano. Embora este ácido confira um aroma característico aos filmes formados, foi o que apresentou melhores resultados em termos de dissolução do polímero e características dos filmes formados. Optou-se, então, por utilizar uma solução de ácido acético a 1% (v/v) (pH=2, 57), correspondendo ao solvente vulgarmente utilizado para o polímero em causa (Pillai, et al. 2009).

4.5.2. Estudo do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol

4.5.2.1. Ensaio preliminares

Para otimizar a concentração de ácido cítrico a utilizar, foram testadas oito concentrações de ácido cítrico (0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 100%, 200%, 300%, em relação à massa de quitosano na solução). O aspeto dos filmes obtidos pode ser consultado em anexo (Anexo IV). Todos os filmes apresentaram uma coloração ligeiramente amarelada. As concentrações extremas testadas (0%, 100%, 200% e 300% de ácido cítrico) apresentaram maior brilho que as restantes.

Verificou-se que o aumento da concentração de ácido cítrico resultou num aumento da plasticidade dos filmes, obtendo-se filmes bastante difíceis de manusear com as concentrações de 200% e 300% (m/m CH). Este facto levou à eliminação destas concentrações para prosseguir com os restantes testes preliminares ao delineamento experimental.

Nos restantes ensaios precedentes à elaboração dos filmes estabelecidos no delineamento experimental (Tabela 2), avaliou-se o aspeto dos filmes formados e a sua solubilização/insolubilização quando colocado durante 24 horas num copo com água.

Tabela 7 – Resultados obtidos nos ensaios preliminares: aspeto e resistência à solubilização (filme que não solubilizou-✓; filme que solubilizou-✗).

Aparência		Resistência à solubilização (24h)	
		1,5% CH	2% CH
Teste 1	Filme muito quebradiço; enrugado	✓	✓
Teste 2	Bom aspeto; maleável, mas resistente	✗	✗
Teste 3	Bom aspeto; maleável, mas resistente	✗	✗
Teste 4	Tal como o Teste 1 muito quebradiço e enrugado; ambos estavam descolados da placa	✓	✓
Teste 5	Enrugado, mas flexível	✓	✓
Teste 6	Amarelado, muito quebradiço	✗	✗
Teste 7	Amarelado, muito quebradiço	✗	✗
Teste 8	Enrugado, mas flexível	✓	✓
Teste 9		✓	----

Em termos de aspeto, não se verificaram grandes diferenças entre as concentrações de 1,5% e 2% de polímero, para a mesma concentração de ácido cítrico e glicerol. A única diferença observada relaciona-se com a espessura: os filmes com 2% de quitosano ficaram mais espessos e consequentemente menos maleáveis; os de 1,5% de quitosano mais frágeis. As imagens dos filmes realizados nos pré-testes podem consultar-se no Anexo V e a descrição do seu aspeto na Tabela 7.

Através da observação da Tabela 2 e da Tabela 7 conclui-se que filmes com aspeto semelhante correspondem a concentrações de ácido cítrico e glicerol semelhantes.

Em relação à solubilidade dos filmes formados, os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 7. Verifica-se que as formulações Teste 1, Teste 4, Teste 5, Teste 8 e Teste 9 resistiram à solubilização, característica que é desejável nos revestimentos desenvolvidos neste trabalho.

Após a análise dos resultados obtidos nos pré-testes, ajustaram-se as seguintes concentrações para prosseguir com o delineamento experimental: 2% de quitosano, 20% a 70% de glicerol e 0% a 100% ácido cítrico. A concentração de quitosano escolhida foi de 2%, visto que os filmes de 1,5% resultaram com pouca espessura e resistência. A concentração de glicerol foi ajustada entre 20% e 70%, pois a concentrações inferiores a 20% os filmes tornaram-se quebradiços e, embora não tenha sido testado neste trabalho, sabe-se que a concentrações elevadas de glicerol ficariam extremamente plásticos, sendo difícil retirá-los da placa de petri.

Nesta etapa do trabalho foram obtidos filmes com um aspeto transparente e brilhante, como é possível observar nos exemplos apresentados de seguida na Figura 7. No Anexo IV e no Anexo V encontram-se imagens de todas as amostras testadas nos ensaios preliminares.

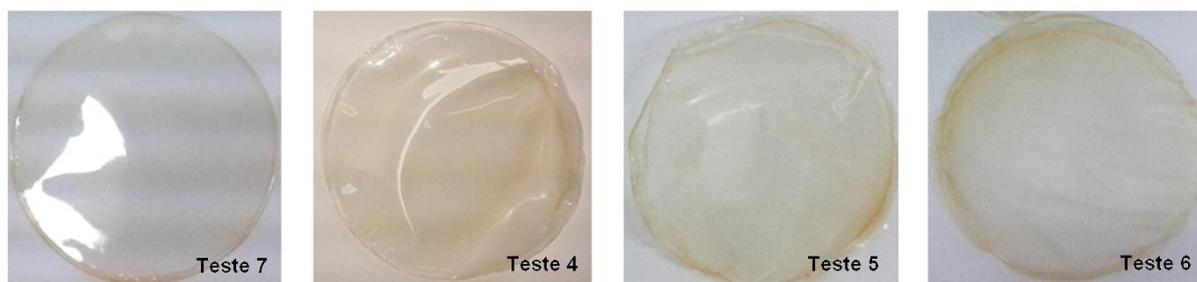


Figura 7 – Imagens de filmes obtidos nos ensaios preliminares.

4.6. Otimização da concentração de ácido Cítrico e glicerol

4.6.1. Propriedades óticas

Cor

Para o estudo da cor das formulações analisadas, e por se ter obtido resultados bastante semelhantes neste parâmetro, optou-se por se analisar apenas o ponto central do delineamento experimental (apresentado na Tabela 3 do capítulo 3), correspondente à Run 5, Run 6 e Run 7.

O modelo de cores $L^*a^*b^*$ permite estudar a diferença de cor provocada pelos filmes nas cartolinas coloridas. A Tabela 8 apresenta os valores da diferença de cor (ΔE) entre as cartolinas coloridas e as amostras de filme sobre as cartolinas.

Tabela 8 – Diferença de cor (ΔE) entre as cartolinas padrão e os filmes sobre as cartolinas e valores de saturação (C^*) e matiz (h°) da cor dos filmes sobre as cartolinas padrão.

Run 5, Run 6 e Run 7 (ponto central)			
	ΔE	C^*	h°
Branco	15	10	103
Amarelo	12	63	93
Verde	4	44	134
Vermelho	13	45	32

Através da análise da Tabela 8, é possível concluir que os filmes obtidos revelaram alterações da cor detetáveis pelo olho humano ($\Delta E > 3$), sobre as cores estudadas. Os valores de ΔE são superiores a 6 em quase todas as cores testadas, logo pode concluir-se que os filmes alteram significativamente a cor das cartolinas (com exceção da cor verde).

Para uma melhor interpretação dos resultados, apresenta-se de seguida um gráfico (Figura 8) das amostras analisadas (Run 5, Run 6 e Run 7) no plano a^*b^* . Nesta figura, observa-se que, à exceção da cor verde, os pontos correspondentes aos filmes analisados sobre as cartolinas afastam-se um pouco dos pontos correspondentes às cartolinas padrão. Tal facto vem confirmar as conclusões de que os filmes alteram significativamente a cor das cartolinas.

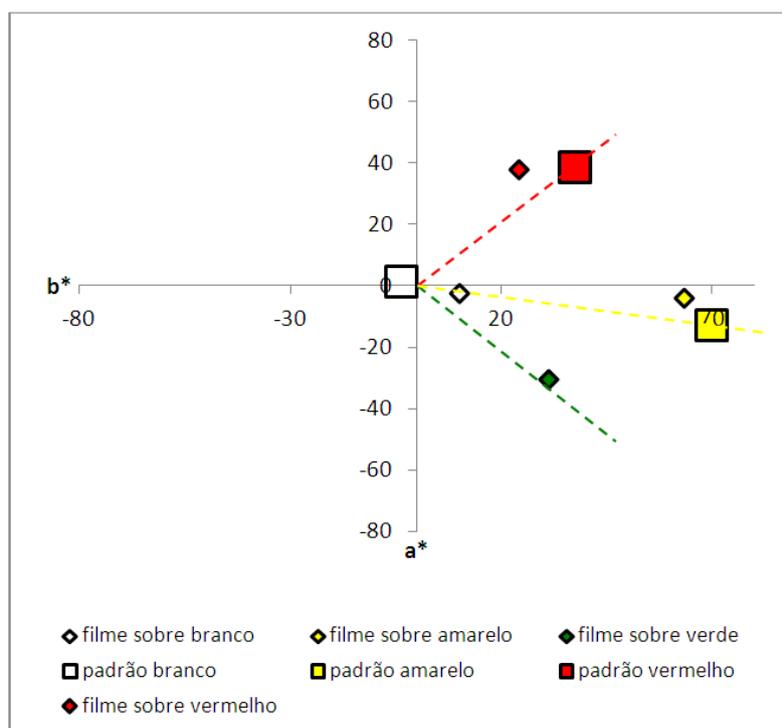


Figura 8 – Representação gráfica dos resultados experimentais do plano a^*b^* das amostras estudadas (Run 5, Run 6 e Run 7 - ponto central).

Também através da observação da Figura 8, pode verificar-se que todas as cores dos filmes sobre as cartolinas apresentam um valor de saturação (C^*) inferior ao valor de saturação das cartolinas padrão, pois existe uma aproximação dos pontos à origem do gráfico (à exceção da cor branca). Este facto denuncia uma redução na intensidade das cores após a aplicação dos filmes sobre as cartolinas amarela, vermelha e verde. Na Tabela 39 Tabela 48 (Anexo VI) encontram-se apresentados os valores de p -value do teste post-hoc de Anova, Tukey, em que são comparadas as médias dos valores de saturação (C^*) das cartolinas padrão com as médias dos valores de saturação dos filmes sobre as cartolinas correspondentes. Através dos valores de p -value apresentados na tabela, é possível confirmar que a redução na saturação das cores após a aplicação dos filmes sobre as cartolinas é significativa, para as quatro cores.

Na Figura 8, verifica-se também que o ângulo h° é alterado, indicando uma modificação da matiz da cor com a aplicação do filme. Na Tabela 40 (Anexo VI) encontram-se apresentados os valores de p -value do teste post-hoc de Anova, Tukey, em que são comparadas as médias dos valores da matiz da cor (h°) das cartolinas padrão com as médias dos valores de h° dos filmes sobre as cartolinas correspondentes. Nesta tabela, observa-se que todos os p -values apresentados são menores a 0,05, concluindo-se, assim, que as diferenças na matiz da cor após a aplicação dos filmes nas quatro cartolinas são significativas (para o nível de significância considerado, 5%).

4.6.2. Propriedades higroscópicas

4.6.2.1. Solubilidade e capacidade de absorção de água

Solubilidade

A solubilidade de um filme é uma característica importante em termos de proteção e integridade do produto.

Foi testada a solubilidade em água das onze formulações analisadas, cujos resultados se encontram apresentados graficamente na Figura 9. Neste ensaio, as amostras Run 2, Run 8 e Run 9 solubilizaram-se totalmente.

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na solubilidade (%) dos filmes obtidos com as formulações testadas, foi realizada uma análise estatística Anova aos efeitos destas variáveis. Os resultados desta análise encontram-se apresentados na Tabela 9. Através da observação dos p -value obtidos, conclui-se que apenas a concentração de ácido cítrico afeta significativamente a solubilidade em água dos filmes testados.

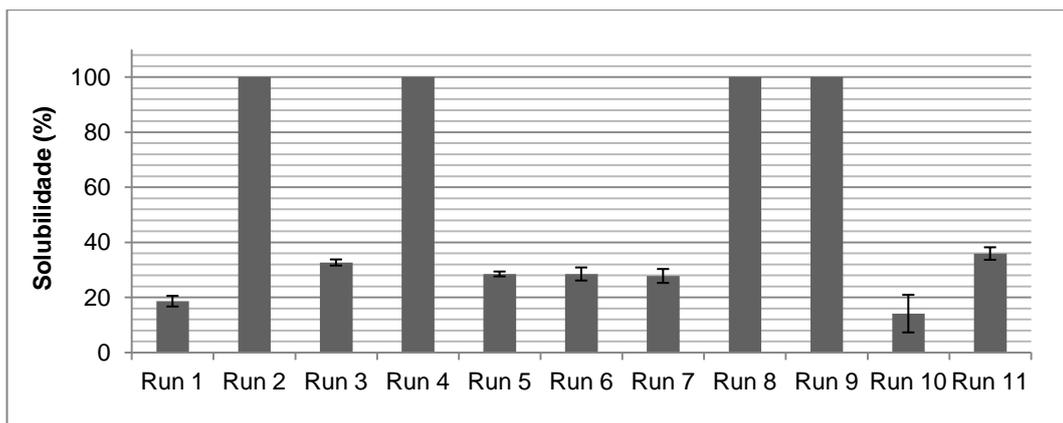


Figura 9 – Solubilidade (%) dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.

Tabela 9 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na permeabilidade ao vapor de água com a equação que traduz a superfície de resposta (AC- Concentração de ácido cítrico, Gly – Concentração de glicerol).

Factor	p-value
(1)AC (L)	0,006
AC (Q)	0,003
(2)Gly (L)	0,489
Gly (Q)	0,758
1L by 2L	0,650
R-sqr	0,891
R-Adj	0,783
Equação	$Solubilidade = 72,81 - 2,58 \times AC + 0,033 \times AC^2 + 0,11 \times Gly + 0,008 \times Gly^2 - 0,009 \times AC \times Gly$

Na Tabela 9, pode observar-se que houve um ajustamento razoável da função quadrática que define a superfície de resposta, e que se apresenta na Figura 9.

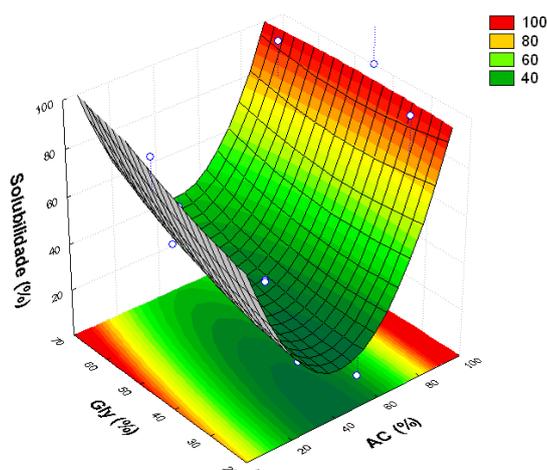


Figura 10 - Efeito da concentração de ácido cítrico (g AC/ gCH) e da concentração de glicerol (g Gly/ g CH) na solubilidade (%) dos filmes de quitosano.

Observando a Figura 10, verifica-se que a solubilidade atinge valores menores para concentrações de ácido cítrico próximas de 50%. A variação da solubilidade com a concentração de ácido cítrico pode ser explicada pela existência de uma concentração de ácido cítrico em que existe um máximo de ligações amida entre as moléculas de quitosano e de ácido cítrico (próximo da concentração de 50% de AC), que provoca uma solubilidade menor. Quanto maior o número de grupos amina da molécula de quitosano reagirem com o ácido cítrico, formando uma ligação amida, maior estabilidade terá a matriz do filme, dificultando a sua solubilização.

No caso de elevadas concentrações de ácido cítrico, o excesso deste composto que não reagiu não foi retirado (os filmes não foram lavados depois de secos). Quando em excesso, o ácido cítrico pode apresentar uma ação contrária sobre os filmes: as moléculas que não reagiram posicionam-se entre as cadeias de polímero, afastando-as e por consequência diminuindo as suas interações. Nesta situação, o efeito negativo sobrepõe-se ao positivo, e a solubilidade dos filmes é facilitada, atingindo-se uma solubilidade total para a maior concentração de ácido cítrico testada.

Há que ter em consideração outro fenómeno na determinação da solubilidade dos filmes. O ácido cítrico é uma molécula de baixo peso molecular. Ao colocar os filmes em água, este composto tem grande facilidade em transferir-se da matriz do filme para a água, sobretudo quando não reagiu com o polímero. Ao determinar a solubilidade há que considerar que parte da massa que se perde diz respeito ao ácido cítrico que passa para a água e não à quantidade de quitosano que se solubiliza.

No que diz respeito ao efeito da concentração de glicerol, os resultados indicam que não tem um efeito significativo na solubilidade. Este facto pode dever-se à sua única função, de plastificante, não reagindo com o quitosano.

Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água (CAA) foi determinada através da diferença entre a massa do filme após vinte e quatro horas em água e a massa do filme seco após imersão em água.

Os resultados obtidos para as formulações testadas estão representados graficamente na Figura 11. Ao colocar em água os filmes da Run 2, Run 8 e Run 9, estes desintegraram-se totalmente, não tendo sido possível concluir o ensaio para estas formulações.

A CAA dos filmes analisados considera-se relativamente elevada, o que pode ser justificado em parte pela hidrofiliabilidade característica dos filmes de quitosano.

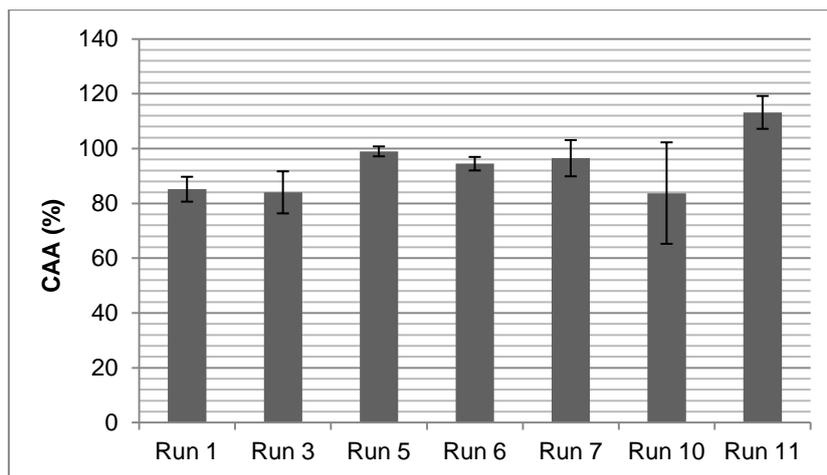


Figura 11 – Capacidade de absorção em água (%) dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na CAA dos filmes estudados, realizou-se uma análise estatística Anova ao efeito das variáveis. Na Tabela 10 estão indicados os *p-values* resultantes dessa análise estatística.

Tabela 10 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na capacidade de absorção de água (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).

Factor	<i>P-value</i>
(1)AC (L)	0,022
(2)Gly (L)	0,037
Gly (Q)	0,465
1L by 2L	0,030
R-sqr	0,99
R-Adj	0,96
Equação	$CAA = 127,29 - 1,02 \times AC - 1,8 \times Gly + 0,0029 \times Gly^2 + 0,04 \times AC \times Gly$

Através da observação da Tabela 10, pode concluir-se que a concentração de ácido cítrico e glicerol afetam significativamente a capacidade de absorção de água dos filmes de quitosano estudados (*p-value* < 0,05). É também possível verificar que se obteve um bom ajustamento do modelo quadrático através da observação dos valores de R-sqr e R-Adj.

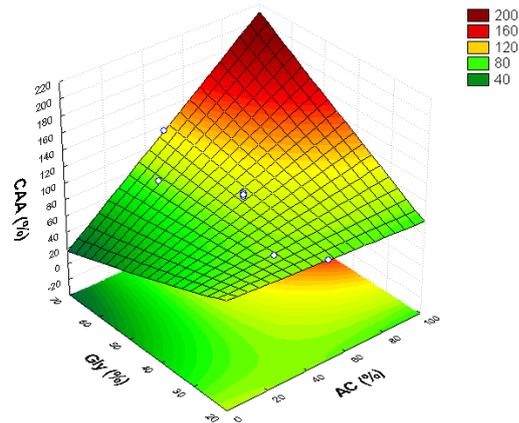


Figura 12 - Efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na capacidade de absorção de água dos filmes de quitosano.

Na Figura 12 apresenta-se um gráfico do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na CAA dos filmes obtidos. É possível verificar que a CAA é maior para concentrações de glicerol e ácido cítrico elevadas, e visivelmente menor quando as concentrações destas duas variáveis diminuem.

Quando existe uma elevada concentração de ácido cítrico, existe um excesso de moléculas que não reagem com o polímero e que não são eliminadas. Este excesso fica disponível para funcionar como plastificante e estabelecer ligações com as moléculas de água. O excesso de ácido cítrico em conjunto com uma elevada concentração de glicerol, que é um composto hidrofílico, favorecem a entrada de água na matriz do filme, levando ao aumento da CAA verificado na Figura 12.

4.6.2.2. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) é considerada uma propriedade fundamental nos filmes utilizados como revestimentos comestíveis. No caso de revestimentos para frutos como a cereja, é desejável que apresentem uma baixa PVA, possibilitando retardar a perda de água dos frutos.

Para os filmes analisados, os valores de permeabilidade ao vapor de água obtidos encontram-se representados graficamente na Figura 13. Na Figura 13, observa-se que a permeabilidade ao vapor de água varia entre $1,45 \times 10^{-11}$ mol.m/m²sPa (Run 10) e $4,8 \times 10^{-11}$ mol.m/m²sPa (Run 1).

Para avaliar o efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na PVA, foi realizada uma análise estatística Anova às variáveis (Tabela 41 apresentada no Anexo VII). Nesta tabela, é visível que não se obteve um bom ajustamento do modelo quadrático. As diferentes espessuras apresentadas pelos filmes analisados podem ter contribuído para este mau ajustamento. Existem evidências experimentais que confirmam a hipótese da permeabilidade ao vapor de água variar com a espessura do filme. Este efeito deve-se à absorção de água pelo filme, consequência das forças atrativas entre

o polímero e a água. Com a absorção de água, a estrutura do filme altera-se, afetando a sua permeabilidade. No interior dos filmes, a água atua como plastificante, facilitando o seu transporte (Marques, 2012).

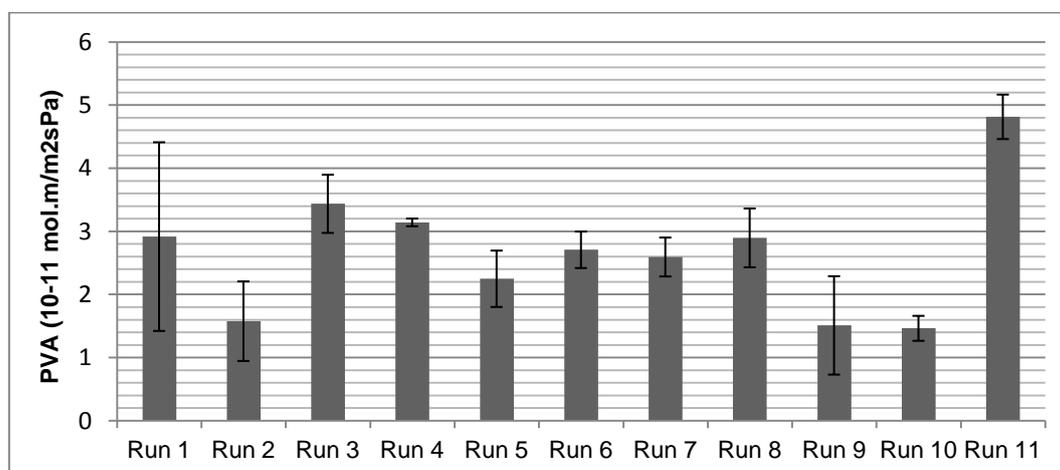


Figura 13 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.

No entanto, é possível verificar o efeito das variáveis independentes comparando os resultados obtidos nas Runs em que uma das variáveis se manteve constante. Para isso, selecionaram-se as Runs com uma concentração média de glicerol (na situação em que se manteve o glicerol constante) ou concentração média de ácido cítrico (na situação em que se manteve o ácido cítrico constante), de forma a avaliar o efeito da variação da outra variável. (Tabela 11).

Tabela 11- Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de PVA (10-11 mol.m/m²sPa) de algumas Runs.

Amostras	PVA (10 ⁻¹¹ mol.m/m ² sPa)	Espessura (mm)	P-value
Run 8 (0% AC, 45% Gly)	2,9 ± 0,5	0,081 ± 0,014	0,163
Run 9 (100% AC, 45% Gly)	1,5 ± 0,8	0,114 ± 0,037	
Run 10 (50% AC, 20% Gly)	1,5 ± 0,2	0,092 ± 0,028	0,001
Run 11 (50% AC, 70% Gly)	4,8 ± 0,4	0,154 ± 0,026	

Através da observação da Tabela 11, é evidente o efeito do glicerol na permeabilidade ao vapor de água dos filmes analisados. A PVA é significativamente superior para concentrações superiores de glicerol. Este resultado justifica-se pela capacidade do glicerol se interpor entre as cadeias de quitosano tonando a rede polimérica menos coesa, o que facilita a permeação da água através do filme. Também a hidrofiliçidade das moléculas de glicerol pode ter contribuído para o aumento da PVA, pois constituem pontos de interação para as moléculas de água, favorecendo a sua mobilidade através do filme. Já a concentração de ácido cítrico não apresentou um efeito significativo na PVA dos filmes com uma concentração média de glicerol. Este resultado pode dever-se ao facto de, com 100% de ácido cítrico, o efeito plastificante devido ao excesso deste composto compensar o seu

efeito como agente promotor de maior hidrofobicidade da matriz por reação com os grupos amina do quitosano, resultando numa influência não significativa no valor de PVA.

4.6.3. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos revestimentos comestíveis são características essenciais para manter a integridade estrutural dos revestimentos e a proteção física dos alimentos.

Neste trabalho, realizaram-se testes extensão e testes de perfuração aos filmes obtidos, de forma a conhecer melhor as suas propriedades mecânicas, e como se comportarão quando aplicados como revestimentos.

4.6.3.1. Teste de extensão

No teste de extensão, os filmes analisados sofreram um alongamento considerável até a força exercida pelas sondas de tração ser suficiente para quebrar o filme. Esta condição verificou-se para todas as amostras analisadas com exceção da Run 10, cuja força da sonda não foi suficiente para provocar a quebra do filme.

Na Figura 14 pode verificar-se que os valores de tensão no ponto de rutura variaram entre 4,5 MPa (Run 4) e 34,3 MPa (Run 1). Os valores obtidos têm como média $13,9 \pm 8,6$ MPa, valores próximos da generalidade dos valores encontrados na bibliografia para os filmes de quitosano (Vargas et al., 2009; Caner et al., 1988).

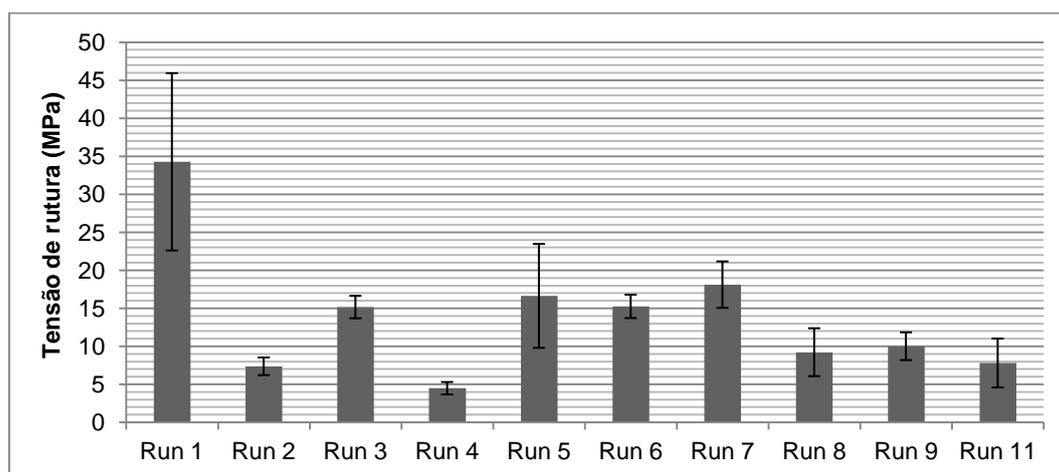


Figura 14 – Tensão de rutura dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.

Na Tabela 42 do Anexo VII estão indicados os *p-values* resultantes da análise estatística realizada ao efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na tensão de rutura dos filmes analisados. O ajuste da equação de superfície de resposta apresentado na tabela não é satisfatório.

No entanto, é possível verificar o efeito das variáveis independentes comparando os resultados obtidos nas Runs em que uma das variáveis se manteve constante. Nesta situação não foi possível comprar as Runs com uma concentração média de ácido cítrico, visto que a força da sonda não foi suficiente para provocar a rutura da Run 10. Optou-se, por isso, por comparar as Runs com uma concentração mais baixa de ácido cítrico (Run 1 e 3) e as Runs com uma concentração mais elevada (Run 2 e 4), permitindo avaliar o efeito da variação da concentração de glicerol nestas duas condições (Tabela 12).

Tabela 12- Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de tensão na rutura (MPa) de algumas Runs.

Amostras	Tensão de Rutura (MPa)	P-value
Run 8 (0% AC, 45% Gly)	9,2 ± 3,2	0,690
Run 9 (100% AC, 45% Gly)	10,0 ± 1,8	
Run 1 (35% AC, 27% Gly)	34,3 ± 11,7	0,020
Run 3 (35% AC, 63% Gly)	15,2 ± 1,5	
Run 2 (85% AC, 27% Gly)	7,4 ± 1,2	0,022
Run 4 (85% AC, 63% Gly)	4,5 ± 0,8	

Na Tabela 12, verifica-se que a concentração de glicerol tem um efeito significativo na tensão de rutura dos filmes testados. A tensão necessária à rutura dos filmes é significativamente inferior para concentrações superiores de glicerol. Este resultado pode ser justificado pelo efeito plastificante do glicerol, que tem a capacidade de se interpor entre as cadeias do polímero que formam a rede polimérica tridimensional, diminuindo as forças intermoleculares. Este efeito diminui a resistência dos filmes, sendo necessária uma menor tensão para que ocorra a sua rutura.

A concentração de ácido cítrico não apresentou um efeito significativo na tensão de rutura dos filmes com uma concentração média de glicerol (45%). Este resultado pode dever-se ao facto de, com 100% de ácido cítrico, o efeito plastificante devido ao excesso deste composto se sobrepor à maior resistência mecânica promovida pela reacção de algumas das suas moléculas com os grupos amina do quitosano, resultando numa influência não significativa no valor da tensão de rutura.

Na Figura 15, apresentam-se os valores de alongamento no ponto de rutura (%) dos filmes testados. Observa-se que os filmes apresentaram valores de alongamento até quebrarem inferiores a 50,0%. Os valores obtidos têm como média 23,2 ± 13,7%, encontrando-se dentro dos valores consultados na bibliografia para filmes de quitosano (Vargas et al., 2009; Caner et al., 1988).

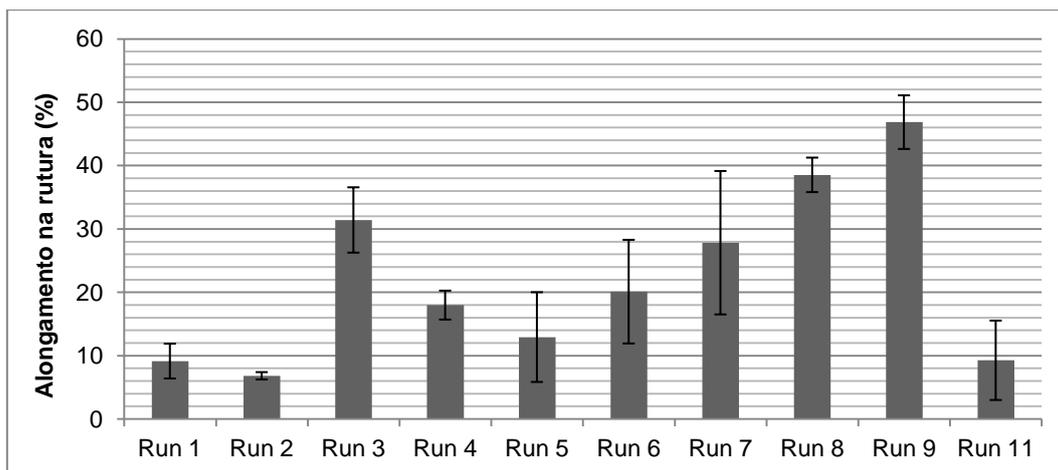


Figura 15 – Alongamento na rutura dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.

Na Tabela 43 do Anexo VII estão indicados os *p-values* resultantes da análise estatística realizada ao efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol no alongamento na rutura dos filmes analisados. O ajuste da equação de superfície de resposta apresentada nesta tabela não é satisfatório.

Compararam-se os resultados obtidos nas Runs em que uma das variáveis se manteve constante, tal como se realizou para a tensão de rutura.

Tabela 13- Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de alongamento na rutura (%) de algumas Runs.

Amostras	Alongamento (%)	P-value
Run 8 (0% AC, 45% Gly)	38,5 ± 2,7	0,032
Run 9 (100% AC, 45% Gly)	46,9 ± 4,2	
Run 1 (35% AC, 27% Gly)	9,1 ± 2,7	0,001
Run 3 (35% AC, 63% Gly)	31,4 ± 5,2	
Run 2 (85% AC, 27% Gly)	6,8 ± 0,4	0,003
Run 4 (85% AC, 63% Gly)	18,0 ± 2,3	

Na Tabela 13, verifica-se que tanto a concentração de ácido cítrico como a concentração de glicerol têm um efeito significativo no alongamento na rutura dos filmes testados. O alongamento no ponto de rutura é significativamente superior para concentrações superiores de glicerol e ácido cítrico. O plastificante escolhido (glicerol) tem a capacidade de se interpor entre as cadeias do polímero que formam a rede polimérica tridimensional, diminuindo as forças intermoleculares e aumentando a mobilidade das cadeias de polímero. Quanto maior a concentração de glicerol presente, maior a elasticidade do filme e consequentemente maior o alongamento necessário para a rutura dos filmes. Concentrações muito elevadas de ácido cítrico podem apresentar um efeito semelhante na matriz do filme. Quando existem moléculas de ácido em excesso, que não reagem com o quitosano, estas

posicionam-se entre as cadeias de polímero, afastando-as e por consequência diminuindo as suas interações. Quando em excesso, o ácido cítrico apresenta um efeito semelhante ao do glicerol, aumentando a elasticidade dos filmes e consequentemente o alongamento antes de ocorrer a sua rutura.

O módulo de Young traduz a resistência que o filme oferece à deformação, correspondendo ao quociente entre a tensão e a deformação na rutura.

Na Figura 16 encontram-se representados os valores médios dos módulos de Young obtidos a partir das curvas de tensão/deformação dos filmes de quitosano, com diferentes concentrações de glicerol e ácido cítrico. Na figura, observa-se que o módulo de Young varia entre 21,4 MPa (Run 9) e 380,4 MPa (Run 1), para os filmes analisados. A maioria dos valores de Módulo de Young obtidos forma inferiores a 100 MPa, bastante inferiores aos valores encontrados na bibliografia consultada para filmes de quitosano (Vargas et al., 2009; Caner et al., 1988).

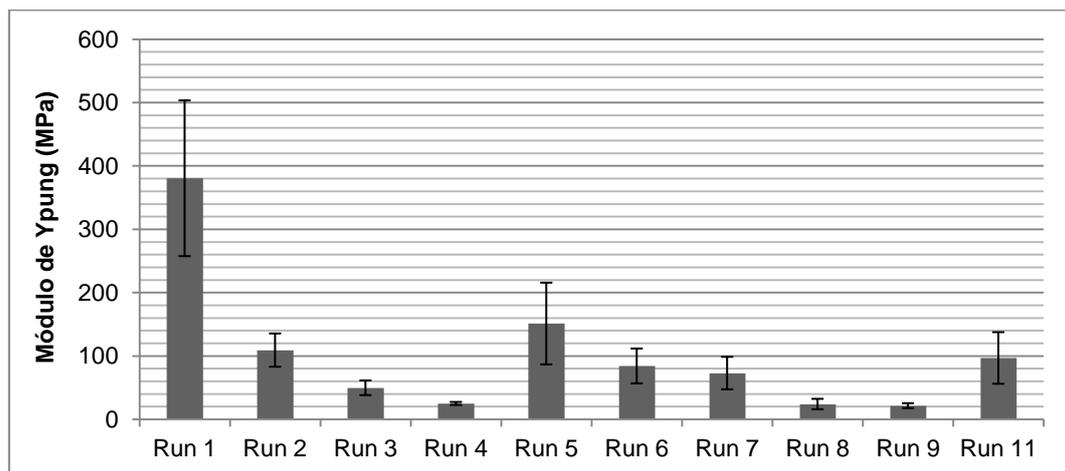


Figura 16 – Módulo de Young dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.

Na Tabela 14 estão indicados os *p-values* resultantes da análise estatística ao efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol no módulo de Young. Através da análise dos *p-values* verifica-se que o módulo de Young é apenas afetado significativamente pela concentração de glicerol.

Tabela 14 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis no módulo de Young (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).

Factor	P-value
(1)AC (L)	0,208
AC (Q)	0,284
(2)Gly (L)	0,011
Gly (Q)	0,027
1L by 2L	0,172
R-sqr	0,89
R-Adj	0,78
Equação	$M. Young = 1914337731 - 4989890 \times AC - 46041 \times AC^2 - 63298832 \times Gly + 475521 \times Gly^2 + 190922 \times AC \times Gly$

Para melhor compreender a forma como o módulo de Young é afetado pelas variáveis, apresenta-se na Figura 17 um gráfico do módulo de Young em função da concentração de ácido cítrico e da concentração de glicerol.

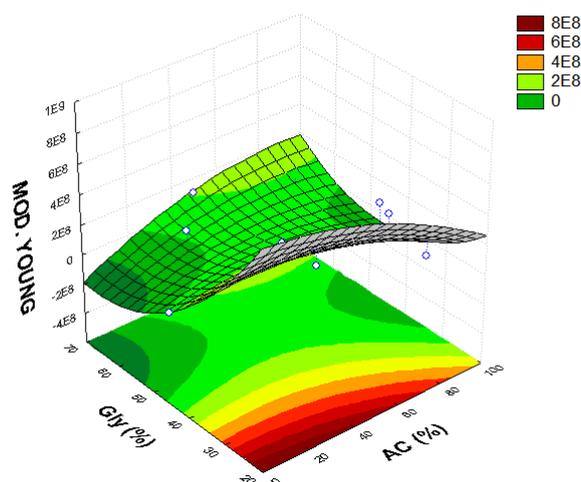


Figura 17 - Gráfico de superfície do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol no módulo de Young dos filmes de quitosano.

Na Figura 17, observa-se que os valores do módulo de Young diminuem com o aumento da concentração de plastificante (glicerol), como seria esperado. A capacidade plastificante do glicerol provoca uma diminuição nas interações entre as cadeias do polímero, o que diminui a sua resistência à deformação.

Para elevadas concentrações de ácido cítrico, é também esperado que os valores do módulo de Young sejam menores. Nesta situação, existe um excesso de moléculas deste composto que não reagiram e que contribuem para a diminuição das forças de coesão entre as cadeias poliméricas, como explicado em 4.6.2.1.

4.6.3.2. Teste de perfuração

No teste de perfuração, os filmes analisados sofreram um alongamento considerável até à força exercida pela sonda ser capaz de os perfurar.

Na Figura 18 encontram-se apresentados os valores de tensão (MPa) necessária para se realizar a perfuração de cada Run testada. Verifica-se que os valores de tensão de perfuração variaram entre 2,74 MPa (Run 3) e 8,47 MPa (Run 2), apresentando como média $4,83 \pm 1,61$ MPa. Os valores obtidos encontram-se bastante próximos da generalidade dos valores de tensão de perfuração consultados em trabalhos realizados anteriormente com filmes de quitosano, no Instituto Superior de Agronomia (Cordeiro, 2010; Fonseca, 2012).

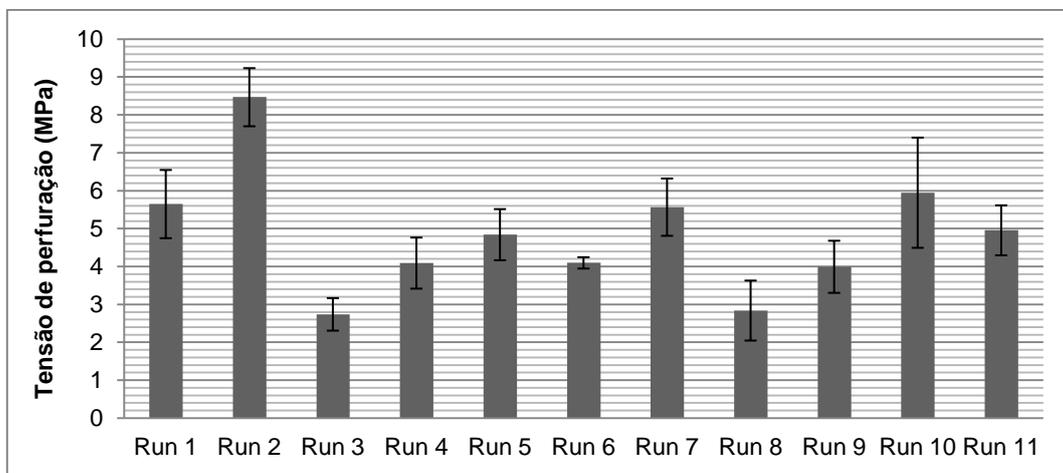


Figura 18 – Tensão de perfuração dos filmes obtidos com as diferentes formulações testadas.

Para estudar os efeitos da concentração de ácido cítrico e glicerol na tensão de perfuração dos filmes analisados, foi realizada uma análise estatística Anova, cujos resultados se encontram apresentados na Tabela 44 do Anexo VII. O ajuste da equação de superfície de resposta apresentada nesta tabela não é satisfatório.

Comparam-se os resultados obtidos nas Runs em que uma das variáveis se manteve constante. Para isso, selecionaram-se as Runs com uma concentração média de glicerol (na situação em que se manteve o glicerol constante) ou concentração média de ácido cítrico (na situação em que se manteve o ácido cítrico constante), de forma a avaliar o efeito da variação da outra variável (Tabela 15).

Na Tabela 15, verifica-se que a concentração de ácido cítrico tem um efeito significativo na tensão de perfuração dos filmes testados. A tensão de perfuração é significativamente superior para concentrações superiores de ácido cítrico. Este facto pode ser justificado pela maior espessura do filme com 100% de ácido, tornando-o mais resistente aquando da acção de perfuração.

A concentração de glicerol não apresentou um efeito significativo na tensão de perfuração dos filmes, para uma concentração de 50% de ácido cítrico.

Tabela 15 - Valores de p-value obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às comparações de médias dos valores de tensão de perfuração (MPa) de algumas Runs.

Amostras	Tensão de Perfuração (MPa)	Espessura (mm)	P-value
Run 8 (0% AC, 45% Gly)	2,8 ± 0,8	0,089 ± 0,027	0,007
Run 9 (100% AC, 45% Gly)	4,0 ± 0,7	0,127 ± 0,041	
Run 10 (50% AC, 20% Gly)	5,9 ± 1,5	0,108 ± 0,025	0,068
Run 11 (50% AC, 70% Gly)	5,0 ± 0,7	0,159 ± 0,035	

A Figura 19 apresenta os valores de deformação de rutura (%) dos filmes de quitosano analisados nos testes de perfuração. Os filmes testados sofreram uma deformação bastante variável, entre 5,32% (Run 10, formulação com a maior concentração de ácido cítrico) e 48,18% (Run 9, formulação com a menor concentração de glicerol), até ocorrer a sua perfuração. A média dos valores obtidos é de 21,91%±12,81%, valores próximos dos encontrados em trabalhos realizados com filmes de quitosano, no Instituto Superior de Agronomia (Cordeiro, 2010; Fonseca, 2012).

De forma a estudar o efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na deformação de rutura dos filmes, realizou-se uma análise estatística Anova, cujos resultados se encontram apresentados na Tabela 16.

Pela análise da Tabela 16, conclui-se que a concentração de ácido cítrico e a concentração de glicerol afetam significativamente a deformação nos ensaios de perfuração.

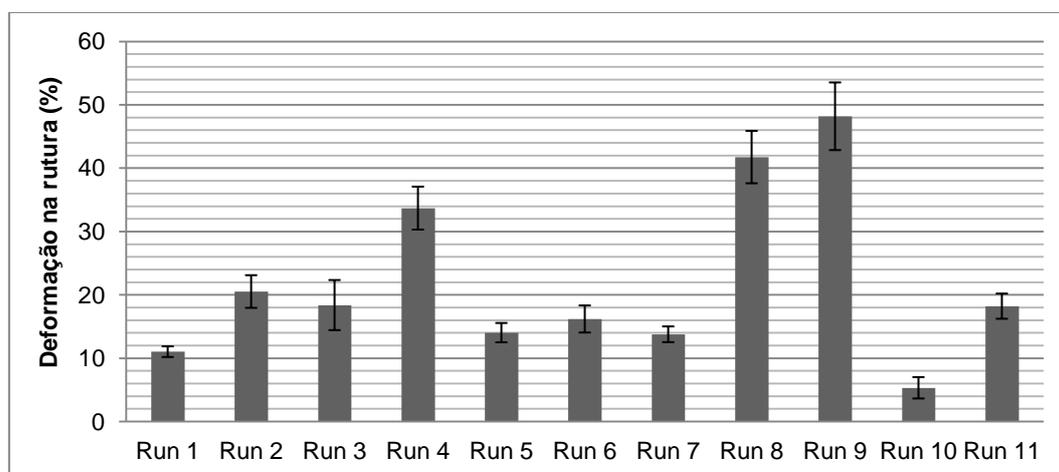


Figura 19 – Representação gráfica dos valores de deformação na rutura (%).

Tabela 16 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na deformação de rutura (%) (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).

Factor	P-value
(1)AC (L)	0,00005
AC (Q)	0,000008
(2)Gly (L)	0,0006
Gly (Q)	0,060
1L by 2L	0,153
R-sqr	0,99
R-Adj	0,98
Equação	Deformação = 0,26 -0,0128×AC + 0,00012×AC ² + 0,0064×Gly -0,000061×Gly ² + 0,000033×AC×Gly

Para uma melhor compreensão do efeito das variáveis estudadas na deformação de rutura dos filmes, apresenta-se na Figura 20 um gráfico do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na deformação dos filmes. Observa-se que a deformação varia sobretudo com a concentração de ácido cítrico. No entanto, também se verifica que os valores de deformação são um pouco maiores para concentrações mais elevadas de glicerol, facto que era esperado devido ao efeito plastificante deste composto.

A diminuição da deformação com a concentração de ácido cítrico pode ser explicada pela existência de um ponto máximo de ligações amida entre as moléculas de quitosano e de ácido cítrico, formando uma estrutura mais coesa (o que dificulta a deformação do filme). Quando a concentração de ácido cítrico aumenta, as moléculas em excesso posicionam-se entre as moléculas de polímero, diminuindo as interações entre as cadeias poliméricas (tal como explicado em 4.6.2.1) – facilitando a deformação. No caso da concentração de ácido cítrico ser insuficiente, verifica-se outro fenómeno semelhante: o número de ligações amida é baixo, tornando a matriz do filme mais frágil e mais suscetível a deformar.

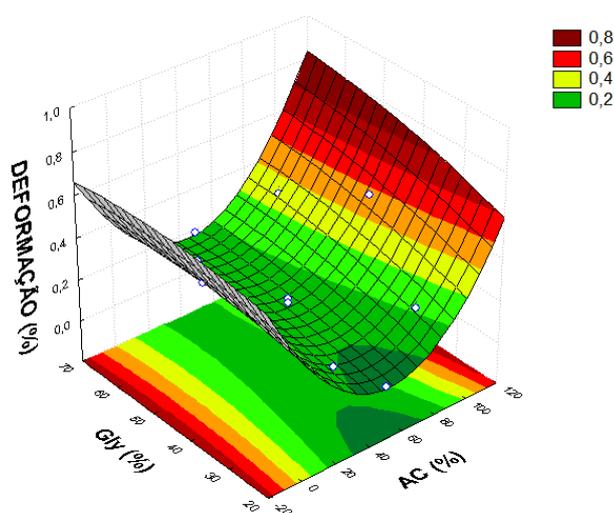


Figura 20 - Gráfico de superfície do efeito da concentração de ácido cítrico e glicerol na deformação de rutura dos filmes de quitosano.

4.7. Seleção do tipo e concentração de lípido

Para otimização da concentração de lípido, elaboraram-se filmes com 4 formulações diferentes (5% óleo de girassol, 5% ácido oleico, 5% e 10% de cera de abelha, mantendo a concentração de surfatante constante).

O aspeto dos filmes obtidos é apresentado na Figura 21. Realizaram-se as análises: inspeção visual do aspeto dos filmes e a sua resistência à solubilização. Os resultados obtidos nesta fase encontram-se sintetizados na Tabela 17.

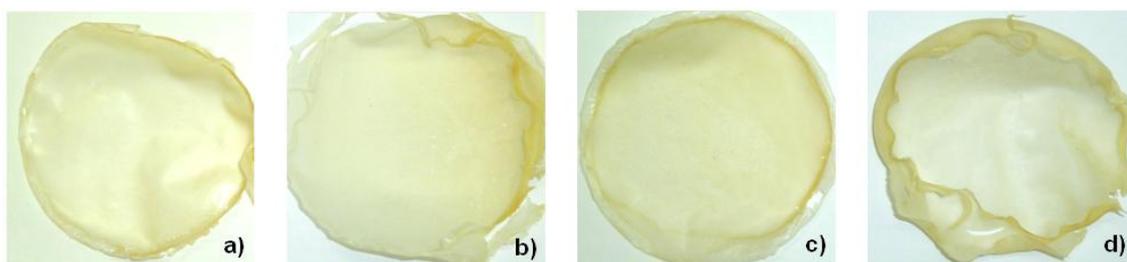


Figura 21 – Aspeto dos filmes obtidos após a adição de um lípido

(a) 5% óleo de girassol, b) 5% ácido oleico, c) 5% cera de abelha d) 10% cera de abelha).

Tabela 17 – Aspeto e resistência à solubilização (filme que não solubilizou - ✓; filme que solubilizou - ✗) das formulações testadas para otimização da concentração de lípido (cera de abelha/óleo de girassol).

Formulação	Aspeto	Resistência à solubilização (24h)
5% óleo de girassol + 0,15% Tw80	Filmes um pouco opacos e com algumas manchas brancas.	✓
5% ácido oleico + 0,15% Tw80	Filmes opacos e com manchas brancas. Brilhantes, a gordura é perceptível ao toque.	✓
5% cera de abelha + 0,15% Tw80	Filme com uma coloração pouco homogénea, perceptível a presença de cera	✓
10% cera de abelha + 0,15% Tw80	Filme com uma coloração muito pouco homogénea, muito perceptível a presença de cera	✓

Os resultados apresentados na Tabela 17 foram suficientes para prosseguir com o trabalho, pois alguns dos filmes obtidos apresentaram características adequadas à sua utilização como revestimento comestível para aplicação à cereja. Dado o seu aspeto mais homogéneo e a sua resistência à solubilização após 24 horas em água, foram selecionadas as formulações de 5% óleo de girassol + 0,15% Tw80 (OI+T) e 5% cera de abelha + 0,15% Tw80 (C+T) para prosseguir com o trabalho. A cada uma destas soluções foi adicionado o extrato aquoso de carqueja (CA), tendo-se obtido quatro soluções de revestimento para aplicação à cereja (OI+T, OI+T+CA, C+T, C+T+CA).

Seguidamente, realizou-se a caracterização das quatro formulações selecionadas em termos de viscosidade, bem como da morfologia, das propriedades óticas, higroscópicas e mecânicas dos respectivos filmes.

4.8. Soluções filmogénicas para os revestimentos

4.8.1. Análise reológica das soluções

Este teste teve como objetivo efetuar uma caracterização reológica das quatro formulações selecionadas de revestimento para aplicação à cereja (OI+T, OI+T+CA, C+T, C+T+CA). Estes testes visam entender as propriedades de escoamento das soluções na altura de aplicação aos frutos.

Para a análise reológica das soluções filmogénicas, foi realizado um teste de escoamento, com o objetivo de analisar a viscosidade das soluções quando submetidas a uma gama de taxas de deformação entre 0 s^{-1} e 800 s^{-1} . A Figura 22 e a Figura 23 representam graficamente as curvas de escoamento das soluções analisadas a 20°C e 40°C , respetivamente. Foram utilizadas estas temperaturas para a realização do ensaio, com o intuito de perceber o comportamento das soluções à temperatura ambiente (temperatura de aplicação dos revestimentos) e à temperatura de secagem dos filmes. Para além das quatro soluções de revestimento selecionadas, foi também analisada a viscosidade de uma solução-base (2% de quitosano (m/v), 50% ácido cítrico (m/m CH) e 50% glicerol (m/m CH)), sem a adição do componente lipídico.

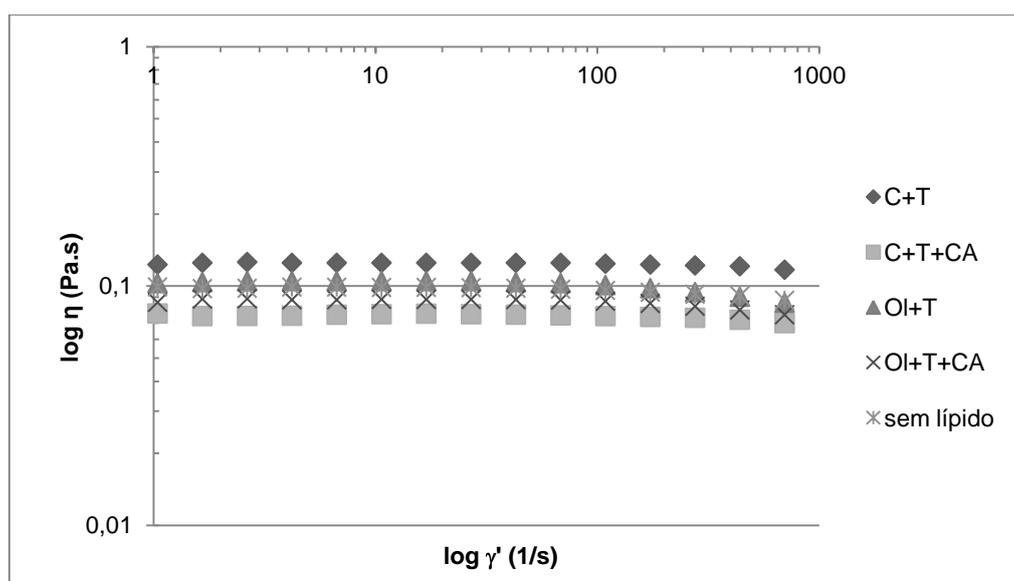


Figura 22 – Curvas de escoamento das cinco soluções analisadas a 20°C

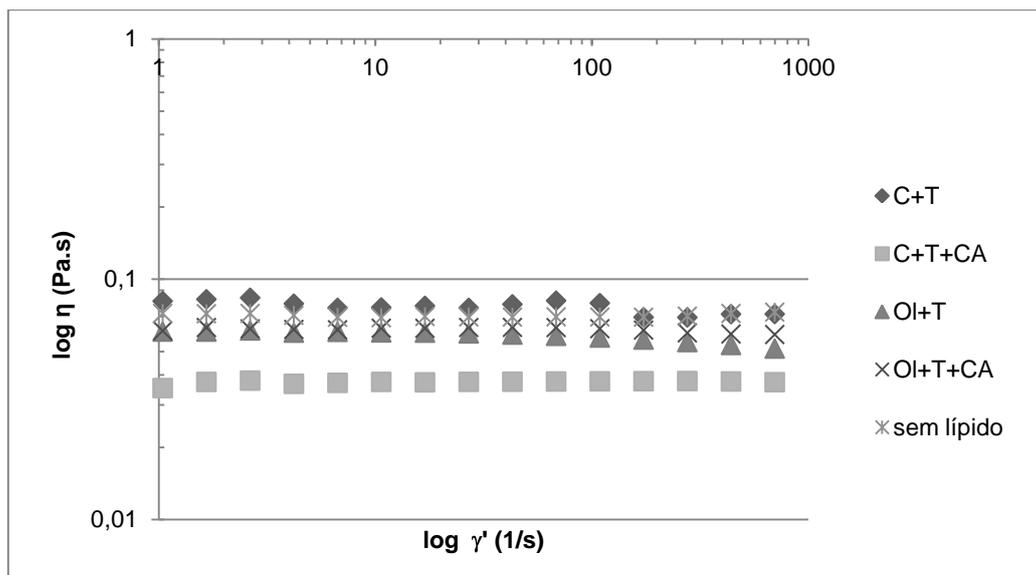


Figura 23 – Curvas de escoamento das cinco soluções analisadas a 40°C

Na Figura 22 e na Figura 23 verifica-se que todas as formulações analisadas apresentaram valores de viscosidade baixos, adequados à aplicação na superfície dos frutos. Tal como esperado, a viscosidade é menor a temperatura mais elevada (40°C), em todas as soluções analisadas.

Através da observação das curvas de escoamento, pode concluir-se que as soluções analisadas apresentam um comportamento praticamente newtoniano, pois a sua viscosidade pouco variou com a taxa de deformação (nas taxas de deformação estudadas). As curvas de escoamento apresentadas são praticamente lineares para taxas de deformação entre 0 s^{-1} e 800 s^{-1} .

Através da comparação das curvas de escoamento da solução sem líquido, com as restantes soluções, conclui-se que a presença de um componente lipídico não afetou de forma expressiva a viscosidade. Relativamente à presença de carqueja, verifica-se que a sua adição provocou uma ligeira diminuição da viscosidade para a maioria das soluções.

4.8.2. Análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) dos filmes obtidos

Para estudar a morfologia dos filmes, foi realizada uma análise SEM à superfície e secção de corte dos filmes.

Na Figura 24 são apresentadas as imagens da superfície dos filmes com uma ampliação de 1000x.

Através da observação da figura, é possível verificar que todas as amostras apresentam uma superfície semelhante. As linhas que se observam na superfície dos filmes correspondem a sulcos já existentes nas placas de Petri que foram utilizadas para a sua secagem. Observa-se que a amostra 1 (sem líquido) apresenta um aspeto um pouco mais homogéneo que as restantes; Na amostra 2, as áreas mais escuras são provavelmente depressões, possivelmente resultantes de gotículas de óleo que se encontravam a superfície e evaporaram.

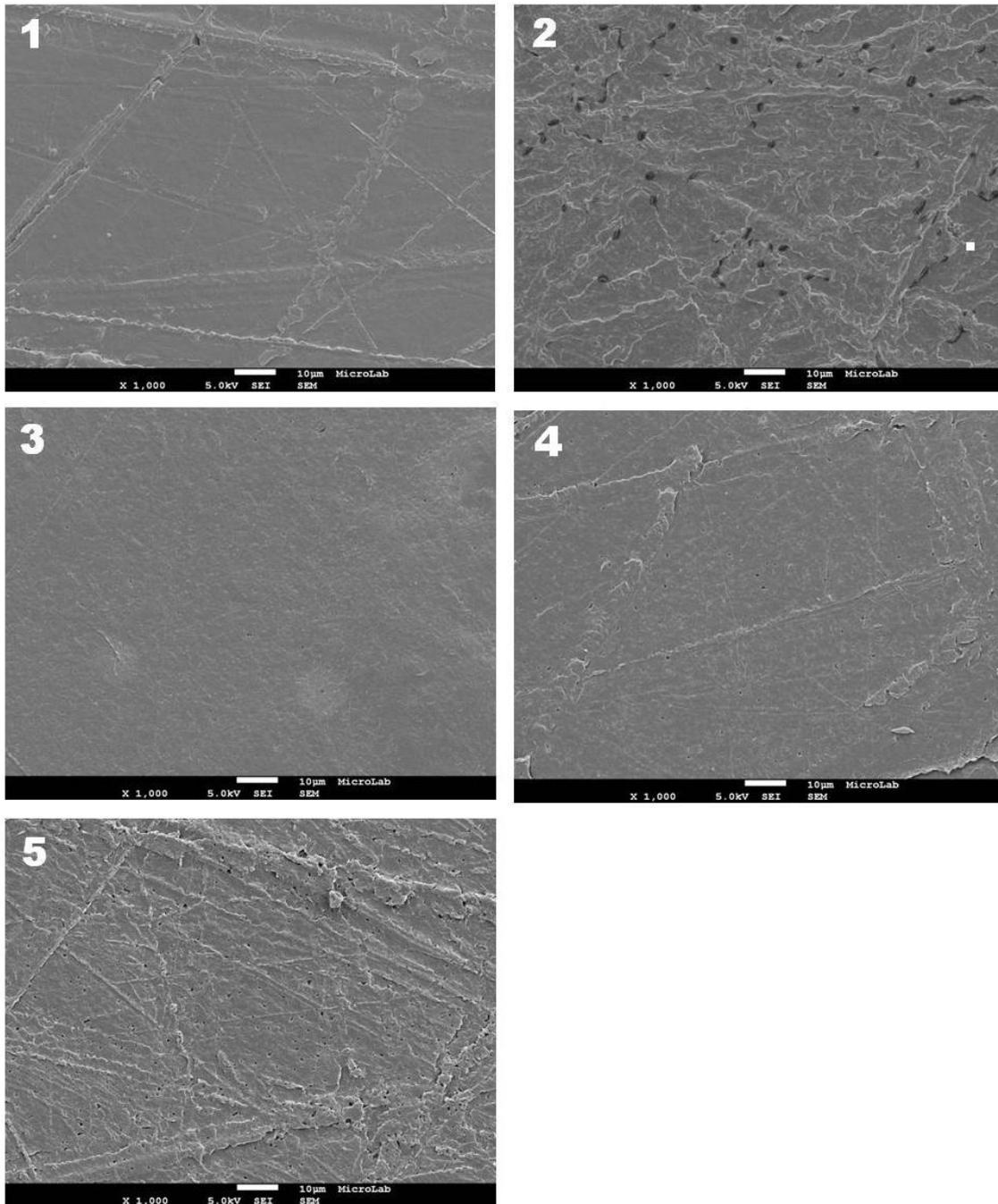


Figura 24 – Imagens da superfície dos filmes obtida por microscopia eletrônica de varrimento, com uma ampliação de 1000x (1: amostra sem lípido; 2: OI+T; 3: OI+T+CA; 4: C+T; 5: C+T+CA)

A presença de extrato de carqueja (amostras 3 e 5) não é visível na superfície dos filmes.

Na Figura 25 apresentam-se imagens da secção de corte dos filmes com uma ampliação de 700x. O corte dos filmes realizou-se com azoto líquido para preservar a estrutura dos filmes.

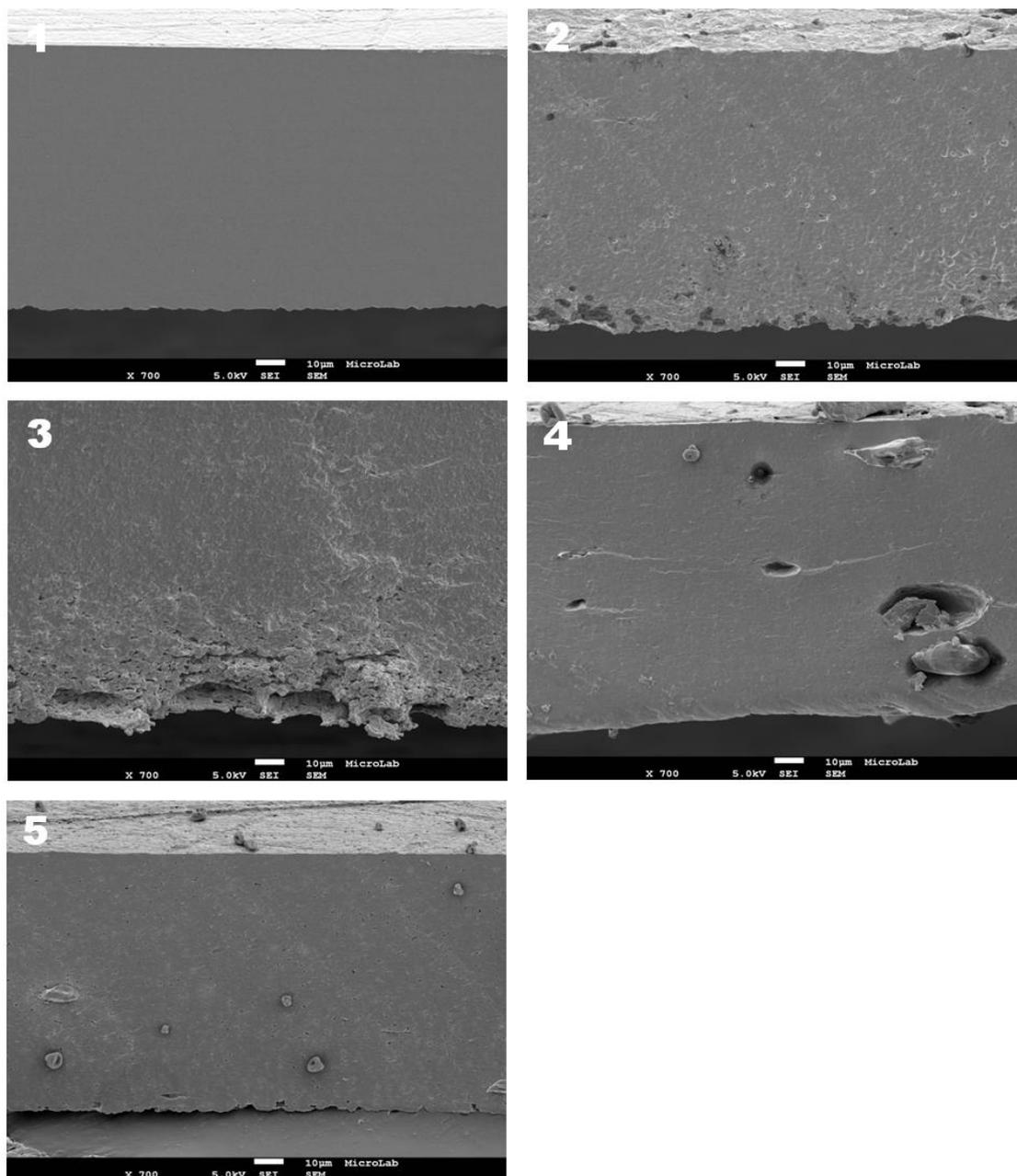


Figura 25 – Imagens da secção de corte dos filmes obtida por microscopia eletrónica de varrimento, com uma ampliação de 700x (1: amostra sem lípido; 2: OI+T; 3: OI+T+CA; 4: C+T; 5: C+T+CA)

Na Figura 25, observa-se um aspeto mais distinto das amostras entre si, em relação à perspetiva apresentada na Figura 24.

A amostra 1 (amostra sem lípido) apresenta uma estrutura bastante densa e homogénea, enquanto que as amostras com lípido na sua composição (óleo de girassol ou cera de abelha) mostram algumas irregularidades. Quanto mais baixo o ponto de fusão do lípido, mais fácil a emulsão e as gotículas são mais pequenas – o que se verifica nas amostras 2, 3, 4 e 5. As amostras 2 e 3 com óleo de girassol (líquido à temperatura ambiente) apresentam gotículas de pequenas dimensões seu interior, enquanto que as amostras 4 e 5 com cera de abelha (sólida à temperatura ambiente) apresentam partículas sólidas de cera de maior dimensão.

A formação de gotículas de lípido e o seu desenvolvimento durante a secagem do filme, pode prejudicar o aspeto e a funcionalidade do filme, pois cria uma descontinuidade na matriz polimérica e consequentemente aumenta a heterogeneidade interna e de superfície.

Novamente a presença de extrato de carqueja não é visível (amostras 3 e 5), o que leva a concluir que esteja completamente dissolvido.

4.8.3. Propriedades óticas dos filmes obtidos

4.8.3.1. Cor

O modelo de cores $L^*a^*b^*$ permite estudar a diferença de cor provocada pelos filmes nas cartolinas coloridas. A Tabela 18 apresenta os valores da diferença de cor (ΔE) entre as cartolinas coloridas e as amostras de filme sobre as cartolinas.

Tabela 18 – Diferença de cor (ΔE) entre as cartolinas padrão e os filmes sobre as cartolinas.

	ΔE		
	Amarelo	Verde	Vermelho
OI+T	14	10	13
OI+T+CA	21	16	12
C+T	12	7	12
C+T+CA	13	9	7

Através da análise da Tabela 18, é possível concluir que os filmes obtidos revelaram alterações da cor detetáveis pelo olho humano ($\Delta E > 3$), sobre as cores estudadas. Os valores de ΔE são superiores a 6 em todas as cores testadas, logo pode concluir-se que os filmes alteram significativamente a cor das cartolinas.

Tabela 19 – P-values obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativo aos valores de ΔE obtidos pelos vários filmes analisados sobre as cartolinas de 3 cores (amarelo, verde e vermelho).

Comparação de médias dos valores de ΔE	P-value		
	Amarelo	Verde	Vermelho
Com/sem composto lipídico	0,558	0,230	0,556
Com/sem carqueja	0,257	0,207	0,196
Óleo de girassol/cera de abelha	0,293	0,254	0,360

Após a realização de um teste de comparação de médias de Tukey, em que se compararam os valores de ΔE obtidos em 4.6.1.e neste ponto do trabalho, e cujos resultados se apresentam na Tabela 19, conclui-se que: nem a incorporação de um lípido nos filmes testados, nem a adição de extracto de carqueja, alteraram significativamente os valores de ΔE para as três cores testadas.

Comparando os valores de ΔE obtidos para filmes com óleo de girassol e para filmes com cera de abelha, conclui-se que as diferenças também não são significativas.

Para uma melhor interpretação dos resultados, apresenta-se um gráfico das amostras analisadas (C+T e C+T+CA, OI+T e OI+T+CA) no plano a^*b^* . Na Figura 26, pode observar-se que os pontos correspondentes aos filmes analisados sobre as cartolinas afastam-se um pouco dos pontos correspondentes às cartolinas padrão. Tal facto vem confirmar as conclusões de que os filmes alteram a cor das cartolinas.

É possível verificar que a aplicação de carqueja às formulações, alterou de forma mais abrupta a cor das amostras com óleo (OI+T) que a cor das amostras com cera (C+T). Entre as amostras com cera (C+T) e as amostras com óleo (OI+T) verifica-se que apresentam valores de a^* e de b^* bastante distintos, aproximando-se com a introdução da carqueja nos dois casos (C+T+CA e OI+T+CA).

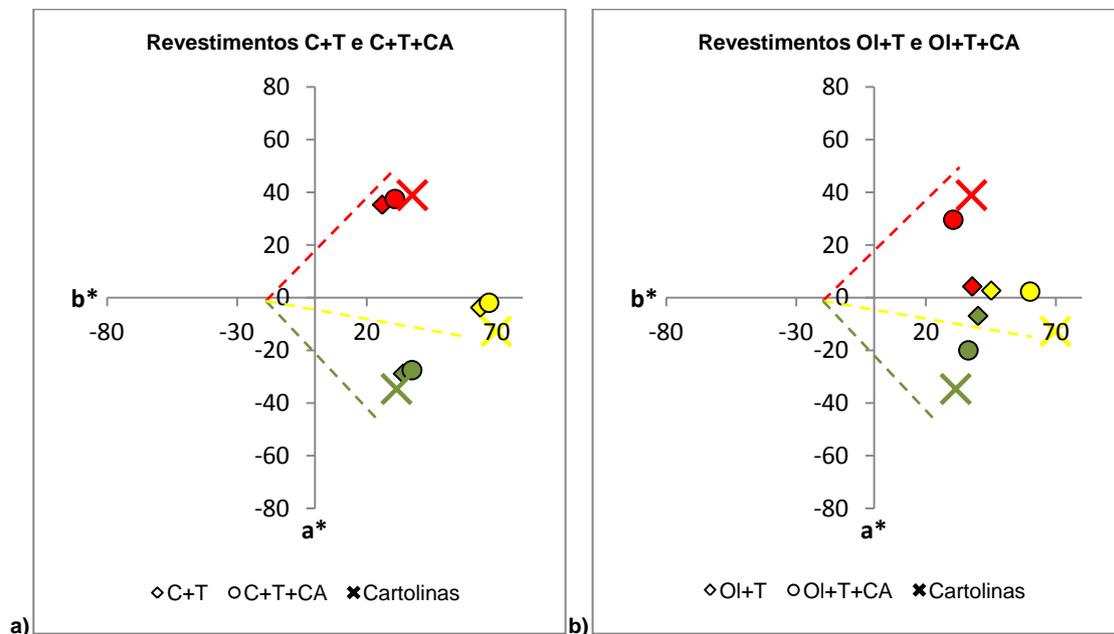


Figura 26 – Representação gráfica dos resultados experimentais do plano a^*b^* das amostras a) C+T e C+T+CA e b) OI+T e OI+T+CA.

4.8.4. Propriedades higroscópicas dos filmes obtidos

4.8.4.1. Solubilidade e capacidade de absorção de água

Na Figura 27, encontram-se apresentados os valores médios de solubilidade (%) das amostras testadas, quando colocadas 24 horas em água. Na figura, verifica-se que as amostras que mais se solubilizaram foram as que contêm cera na sua composição (C+T e C+T+CA). Verifica-se também um efeito da carqueja adicionada no aumento da solubilidade dos filmes. Uma hipótese que explica este

resultado é que a carqueja terá facilidade em abandonar a matriz do filme e a passar para a água, quando o filme é colocado em água. A cera terá também uma maior facilidade em passar para a água, pois as suas partículas encontram-se menos dispersas no interior do filme que no caso do óleo (tal como comentado em 4.8.2.).

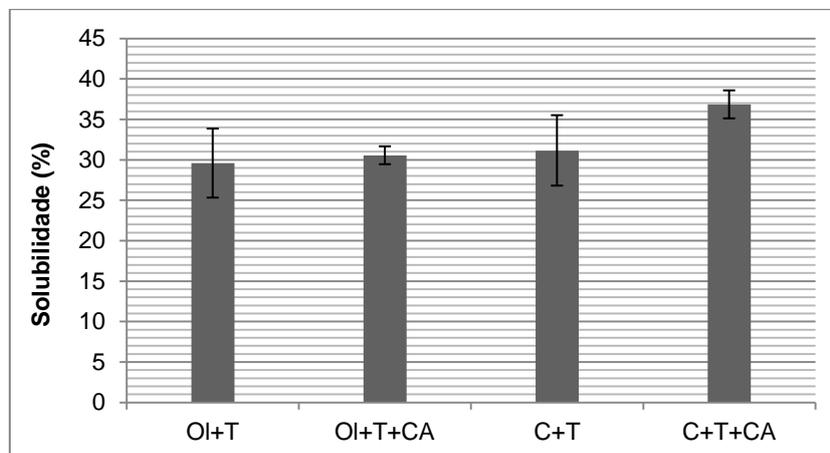


Figura 27 – Solubilidade das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

Consultando a Tabela 20, observa-se que os diferentes filmes analisados não apresentaram diferenças significativas em relação à solubilidade. Pode concluir-se que o tipo de lípido incorporado e a presença e ausência de carqueja não provocam diferenças significativas na solubilidade dos filmes.

Tabela 20 - Resumo dos valores médios de solubilidade, desvios padrão e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	Solubilidade (%)	p-value
OI+T	29,6 ± 4,3	0,982
OI+T+CA	30,5 ± 1,1	
C+T	31,1 ± 4,4	0,212
C+T+CA	36,8 ± 1,7	
OI+T	29,6 ± 4,3	0,930
C+T	31,1 ± 4,4	
OI+T+CA	30,5 ± 1,1	0,156
C+T+CA	36,8 ± 1,7	

Comparando estas amostras com as amostras analisadas em 4.6.2.1. (sem a incorporação de um composto lipídico) é notório que a solubilidade dos filmes aumentou com a incorporação de um lípido nas formulações (sem considerar as amostras que se solubilizaram totalmente no ponto 4.6.2.1.). Observando o *p-value* (relativo ao teste estatístico de comparação de médias de Tukey) apresentado na Tabela 22, um pouco mais à frente, verifica-se que esta diferença nos valores de solubilidade é significativa. Em geral, devido à natureza hidrofóbica dos lípidos, estes tendem a provocar uma diminuição na solubilidade do filme. No entanto, a adição de um lípido à formulação filmogénica pode introduzir descontinuidades na matriz de quitosano, enfraquecendo a matriz e facilitando a desintegração do filme em água. Esta situação é ainda mais evidente no caso da cera de

abelha, pois esta encontra-se menos dispersa no interior do filme, criando descontinuidades ainda maiores na matriz. Esta hipótese permite explicar o aumento de solubilidade verificado nos filmes de quitosano com a adição de um composto lipídico.

Na Figura 28 verifica-se que todas as amostras testadas apresentam uma capacidade de absorção de água (CAA) semelhante, embora a amostra C+T+CA tenha apresentado valores significativamente superiores, como se pode comprovar na Tabela 21.

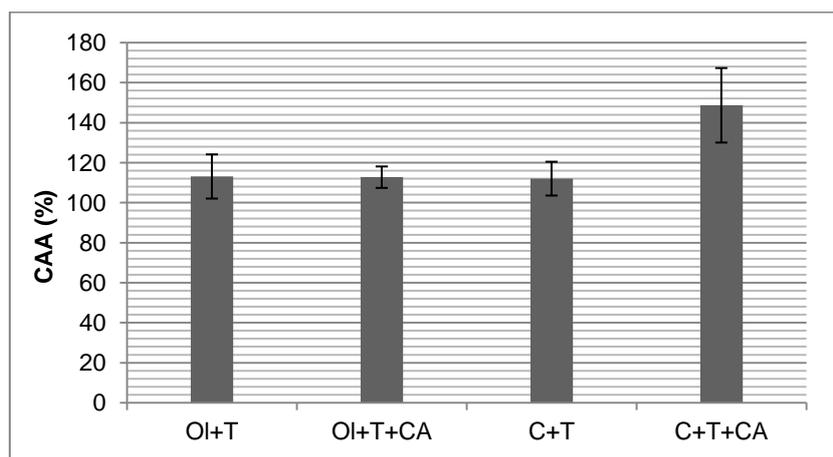


Figura 28 – Representação gráfica dos valores médios da capacidade de absorção de água (%) das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

Verifica-se que a amostra C+T+CA apresentou uma capacidade de absorção de água significativamente superior às restantes amostras (Figura 28 e Tabela 21). Tal resultado poderá estar relacionado com o facto da cera de abelha e da carqueja introduzirem descontinuidades na matriz de quitosano, sendo mais fácil as moléculas de água penetrarem na matriz e fixarem-se nessas descontinuidades.

Tabela 21 - Resumo dos valores médios de capacidade de absorção de água, desvios padrão e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	CAA (%)	<i>p-value</i>
OI+T	113,1 ± 11,0	0,999
OI+T+CA	112,8 ± 5,4	
C+T	112,1 ± 8,5	<i>0,023</i>
C+T+CA	148,7 ± 18,6	
OI+T	113,1 ± 11,0	0,999
C+T	112,1 ± 8,5	
OI+T+CA	112,8 ± 5,4	<i>0,025</i>
C+T+CA	148,7 ± 18,6	

Comparando estes resultados com os obtidos em 4.6.2.1. (sem a presença de um composto lipídico), verifica-se que a capacidade de absorção de água dos filmes de quitosano é

significativamente superior quando existe um lípido incorporado (como se observa na Tabela 22). Este resultado poderá estar relacionado com a hipótese apresentada anteriormente, de que a adição de um lípido à formulação filmogénica poderá introduzir maiores descontinuidades na matriz, facilitando a entrada de água no filme e a sua fixação nessas descontinuidades.

Tabela 22 – Comparação da solubilidade e capacidade de absorção de água (CAA) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

	Sem da incorporação de um componente lipídico	Após a incorporação de um componente lipídico	<i>P-value</i>
Solubilidade	26,6 ± 7,7%	32,0 ± 4,0%	<i>0,034</i>
CAA	96,63 ± 3,9%	121,7 ± 18,0	<i>0,047</i>

4.8.4.2. Permeabilidade ao vapor de água

Com o intuito de diminuir a permeabilidade ao vapor de água dos revestimentos a aplicar à cereja, foi incorporado um composto lipídico na sua formulação. Comparando os valores obtidos no ponto 4.6.2.2. deste trabalho (permeabilidade ao vapor de água dos filmes sem um lípido incorporado), com os valores obtidos neste ponto (após a incorporação de um composto lipídico na formulação), é visível que a PVA aumentou após a incorporação do lípido - tal resultado vem contrariar o esperado. Uma possível explicação para os resultados obtidos relaciona-se com espessura dos filmes. Após a incorporação do lípido, a espessura dos filmes aumentou consideravelmente. Como comentado anteriormente neste trabalho (ponto 4.6.2.2.), pensa-se que a PVA aumenta com o aumento da espessura dos filmes. Observando o valor de *p-value* relativo ao teste estatístico de comparação de médias de Tukey, apresentado na Tabela 23, confirma-se que essa diferença é significativa.

Outra possível explicação para o aumento da PVA com a introdução de um lípido, é o facto da presença do lípido provocar zonas de maior difusão em redor das partículas do mesmo. Estas zonas maior difusão podem compensar o aumento do caminho de difusão provocado pelas partículas de lípidos impermeáveis, resultando numa maior PVA (Alves et al., 2010).

Tabela 23 – Comparação dos valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

	PVA (10^{-11} mol.m/m ² sPa)	Espessura (mm)	<i>P-value</i>
Sem da incorporação de um componente lipídico	2,5 ± 0,4	0,085 ± 0,018	<i>0,009</i>
Após a incorporação de um componente lipídico	3,9 ± 1,4	0,125 ± 0,047	

Na Figura 29, observam-se os valores médios de permeabilidade ao vapor de água obtidos para as amostras correspondentes aos revestimentos que se aplicaram à cereja. Na Figura 29, é possível observar que as amostras com cera na sua composição (C+T e C+T+CA) apresentam valores mais elevados de permeabilidade.

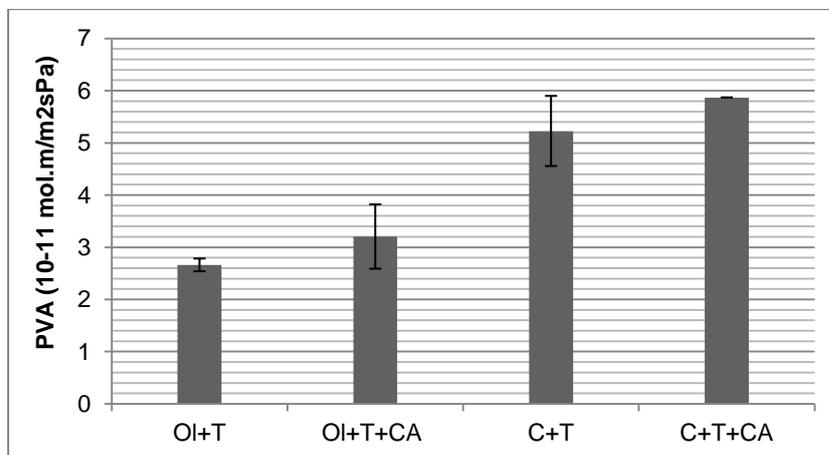


Figura 29 – Representação gráfica dos valores médios de permeabilidade ao vapor de água, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

Consultando a Tabela 24, onde são apresentados os p-values obtidos no teste de comparação de médias de Tukey, confirma-se que a diferença observada na PVA entre os filmes com cera de abelha e óleo de girassol é significativa. Este resultado poderá estar relacionado com o resultado observado em 4.8.4.1., de que os filmes com cera de abelha apresentam uma maior capacidade de absorção de água. Como comentado anteriormente neste ponto, uma maior absorção de água pelos filmes provoca um aumento no seu coeficiente de difusão, tornando o filme mais permeável à água.

Tabela 24 - Resumo dos valores médios de permeabilidade ao vapor de água, desvios padrão e respetivos p-values, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	PVA (10 ⁻¹¹ mol.m/m ² sPa)	Espessura (mm)	p-value
OI+T	2,7 ± 1,2	0,124 ± 0,04	0,620
OI+T+CA	3,2 ± 0,6	0,156 ± 0,07	
C+T	5,2 ± 0,6	0,142 ± 0,04	0,731
C+T+CA	5,9 ± 0	0,202 ± 0,07	
OI+T	2,7 ± 0,1	0,124 ± 0,04	0,004
C+T	5,2 ± 0,7	0,142 ± 0,04	
OI+T+CA	3,2 ± 0,6	0,156 ± 0,07	0,019
C+T+CA	5,9 ± 0	0,202 ± 0,07	

4.8.5. Propriedades mecânicas dos filmes obtidos

4.8.5.1. Teste de extensão

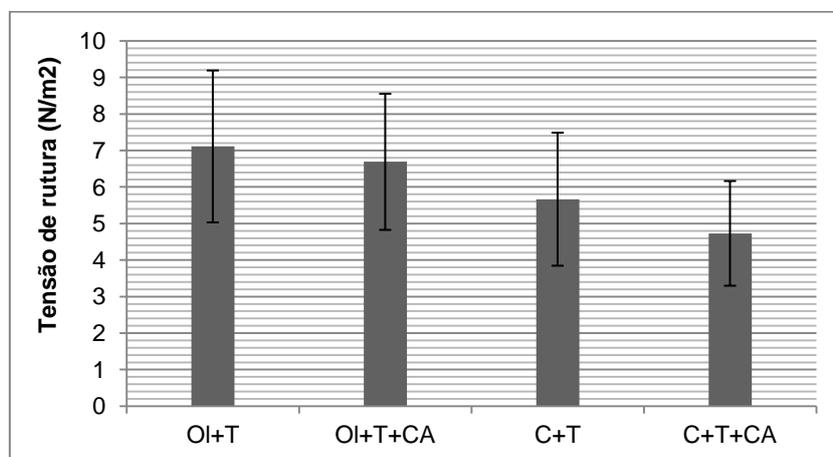


Figura 30 – Representação gráfica dos valores médios de tensão de rutura no teste de extensão, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

Na generalidade, os filmes de quitosano são bastante frágeis, dada a sua reduzida espessura. Na Figura 30, verifica-se que as amostras em que a componente lipídica utilizada foi o óleo, exigiram uma maior tensão para provocar a sua rutura do que os filmes em que foi utilizada a cera. Apesar disso, através da observação dos *p-values* apresentados na Tabela 25, conclui-se que essa diferença não é significativa. Também não se verificaram diferenças significativas nos casos em que se adicionou extrato de carqueja às formulações.

Estes resultados permitem concluir que o tipo de lípido incorporado (cera ou óleo) e a presença ou ausência de carqueja, não conferem grandes diferenças na tensão de rutura dos filmes.

Tabela 25 - Resumo dos valores médios de tensão de rutura na extensão, desvios padrão e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	Tensão de Rutura (MPa)	p-value
OI+T	7,1 ± 2,1	0,978
OI+T+CA	6,7 ± 1,9	
C+T	5,7 ± 1,8	0,891
C+T+CA	4,7 ± 1,4	
OI+T	7,1 ± 2,1	0,632
C+T	5,7 ± 1,8	
OI+T+CA	6,7 ± 1,9	0,388
C+T+CA	4,7 ± 1,4	

Na Figura 31 estão apresentados os valores de alongamento no ponto de rutura dos filmes analisados. Todas as amostras apresentaram valores de alongamento não muito elevados, no entanto é visível que as amostras com óleo (OI+T e OI+T+CA) apresentaram valores de alongamento

superiores. Para além disso, a maioria das amostras apresentaram valores de alongamento variáveis, o que é visível através dos elevados desvio-padrão apresentados.

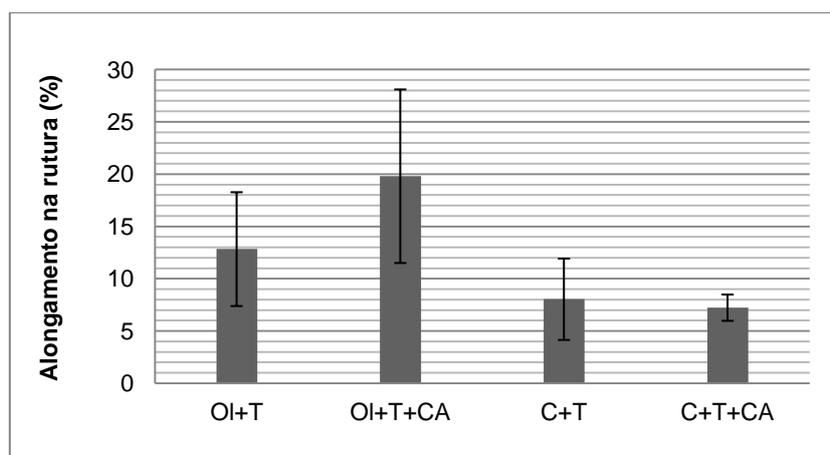


Figura 31 – Representação gráfica dos valores médios de alongamento no ponto de rutura (%) das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

Na Tabela 26, estão indicados os valores médios de alongamento na rutura, respetivos desvios-padrão e *p-values* resultantes do teste de *Tukey* de comparação de médias. Da análise da Tabela 26, pode concluir-se que apenas as amostras OI+T+CA e C+T+CA apresentam valores médios de alongamento na rutura significativamente diferentes. No entanto, a amostra OI+T+CA apresentou um valor de alongamento significativamente superior e a amostra C+T+CA um valor significativamente inferior às restantes amostras analisadas.

Tabela 26 - Resumo dos valores médios de alongamento na rutura, desvios padrão e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	Alongamento na Rutura (%)	p-value
OI+T	12,8 ± 5,4	0,204
OI+T+CA	19,8 ± 8,3	
C+T	8,0 ± 3,9	0,997
C+T+CA	7,2 ± 1,3	
OI+T	12,8 ± 5,4	0,591
C+T	8,0 ± 3,9	
OI+T+CA	19,8 ± 8,3	0,019
C+T+CA	7,2 ± 1,3	

Na Figura 32 apresentam-se os valores médios do módulo de Young no ponto de rutura, para as amostras analisadas. Nesta figura, observa-se que os valores mais elevados foram obtidos pelas amostras que continham cera (C+T e C+T+CA).

É possível verificar se esta diferença é significativa através da análise dos *p-values* apresentados na Tabela 27, obtidos num teste de comparação de médias de *Tukey*. Como nenhum *p-value* apresentado é menor que 0,05, considera-se que as diferenças nos valores do módulo de Young das diferentes amostras não são significativas (para o nível de significância considerado).

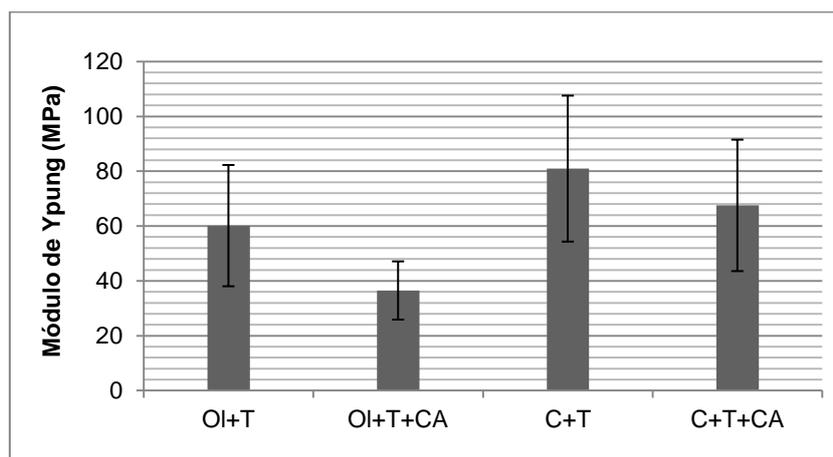


Figura 32 – Representação gráfica dos valores médios do Módulo de Young no ponto de rutura, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

Tabela 27 - Resumo dos valores médios do Módulo de Young no ponto de rutura, desvios padrão e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	Módulo de Young (MPa)	p-value
OI+T	60,2 ± 22,1	0,276
OI+T+CA	36,5 ± 10,6	
C+T	81,0 ± 26,6	0,821
C+T+CA	67,6 ± 24,0	
OI+T	60,2 ± 22,1	0,473
C+T	81,0 ± 26,6	
OI+T+CA	36,5 ± 10,6	0,164
C+T+CA	67,6 ± 24,0	

Comparando estes resultados com os obtidos em 4.6.3.1. (sem a incorporação de um composto lipídico), verifica-se que todos os parâmetros analisados neste teste (tensão, alongamento de rutura e módulo de Young) diminuíram consideravelmente com a incorporação de um lípido nos filmes. Ao consultar os *p-values* apresentados na Tabela 28, confirma-se que esta diminuição é significativa. Estes resultados permitem concluir que a adição de um composto lipídico à solução filmogénica traduz-se na obtenção de filmes menos coesos e menos resistentes à deformação.

Tabela 28 – Comparação dos parâmetros obtidos no teste de extensão (tensão, alongamento de rutura e Módulo de Young) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

	Sem da incorporação de um componente lipídico	Após a incorporação de um componente lipídico	<i>P-value</i>
Tensão de rutura	16,7 ± 4,2 Mpa	6,2 ± 2,0 MPa	0,0001
Alongamento de rutura	20,3 ± 10,4 %	12,8 ± 7,4 %	0,017
Módulo de Young	102,7 ± 53,1 MPa	62,3 ± 29,5 MPa	0,012

4.8.5.2. Teste de perfuração

Na Figura 33, observa-se que todas as amostras testadas apresentaram valores de tensão de perfuração bastante próximos.

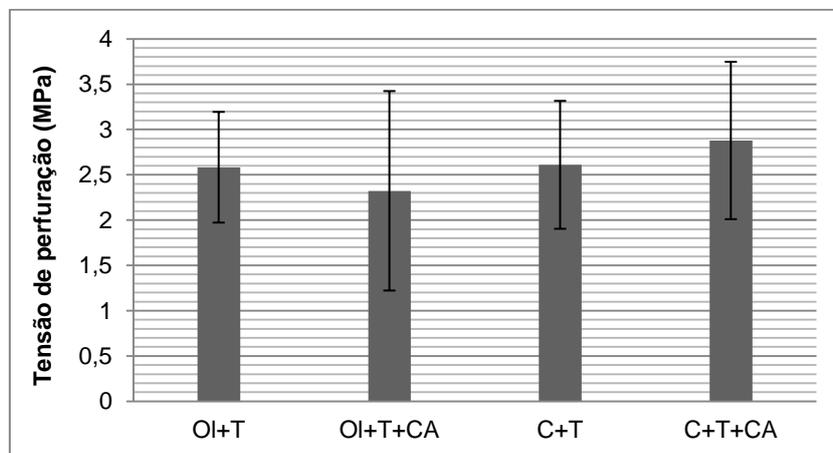


Figura 33 – Representação gráfica dos valores médios de tensão de perfuração (MPa), das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

As amostras que contêm cera na composição (C+T e C+T+CA) apresentaram valores de tensão de perfuração ligeiramente mais elevados, no entanto, tais diferenças não são significativas (como se pode observar através dos *p-values* na Tabela 29). Em relação à adição de carqueja à solução filmogénica, verifica-se que também não conferiu diferenças significativas à tensão necessária à perfuração dos filmes (o que também se pode confirmar através da observação dos *p-values* apresentados na Tabela 29).

Tabela 29 - Resumo dos valores médios de tensão de rutura no teste de perfuração, desvios padrão e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	Tensão de Rutura (MPa)	p-value
OI+T	2,6 ± 0,6	0,912
OI+T+CA	2,3 ± 1,1	
C+T	2,6 ± 0,7	0,890
C+T+CA	2,9 ± 0,9	
OI+T	2,6 ± 0,6	0,999
C+T	2,6 ± 0,7	
OI+T+CA	2,3 ± 1,1	0,484
C+T+CA	2,9 ± 0,9	

Estes resultados permitem concluir que o tipo de lípido incorporado e a presença de carqueja nos filmes, não implicam grandes diferenças na tensão necessária à perfuração dos filmes.

Na Figura 34 encontram-se apresentados os valores médios de deformação no ponto de rutura para as amostras analisadas. Através da observação da figura, verifica-se que os valores obtidos para as diferentes amostras foram bastante semelhantes.

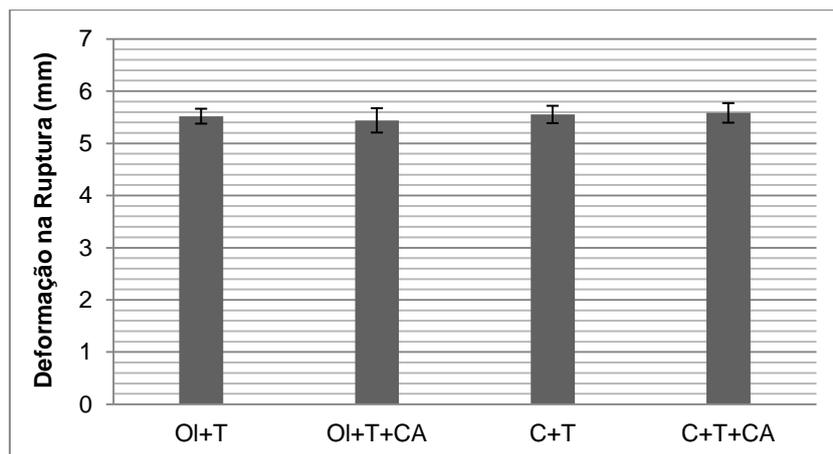


Figura 34 – Representação gráfica dos valores médios de deformação (%) no teste de perfuração, das amostras de filmes das formulações aplicadas à cereja.

Pela observação dos *p-values* apresentados na Tabela 30, conclui-se que apenas as amostras OI+T+CA e C+T+CA apresentaram diferenças significativas entre si, em relação à deformação provocada no teste de perfuração. No entanto, observando os valores de alongamento na ruptura (%) obtidos para estas amostras e os respectivos desvios-padrão, conclui-se que esta diferença não é relevante.

Tabela 30 - Resumo dos valores médios de deformação no teste de perfuração, desvios padrão e respectivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

Formulação	Alongamento na Ruptura (%)	p-value
OI+T	5,5 ± 0,1	0,317
OI+T+CA	5,4 ± 0,2	
C+T	5,6 ± 0,2	0,972
C+T+CA	5,6 ± 0,2	
OI+T	5,5 ± 0,1	0,873
C+T	5,6 ± 0,2	
OI+T+CA	5,4 ± 0,2	0,026
C+T+CA	5,6 ± 0,2	

Considera-se, então, que o alongamento na ruptura obtido no teste de perfuração não é significativamente influenciado pelo tipo de componente lipídico adicionado (cera de abelha ou óleo de girassol), nem pela presença ou ausência de carqueja nas formulações.

Comparando estes resultados com os obtidos em 4.6.3.2. (sem a incorporação de um composto lipídico), verifica-se que, quer a tensão de ruptura, quer a deformação na ruptura, diminuíram significativamente com a incorporação de um lípido nos filmes (*p-values* da comparação estatística apresentados na Tabela 31). Estes resultados vêm confirmar o que facilmente se observa ao manusear as amostras: a incorporação de um componente lipídico torna os filmes mais rígidos e conseqüentemente menos resistentes à deformação, quebrando com mais facilidade.

Tabela 31 – Comparação dos parâmetros obtidos no teste de perfuração (tensão e deformação de rutura) com e sem a adição de um componente lipídico à formulação e respetivos *p-values*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey.

	Sem da incorporação de um componente lipídico	Após a incorporação de um componente lipídico	<i>P-value</i>
Tensão de rutura	4,8 ± 0,85 MPa	2,6 ± 0,82 MPa	0,0001
Deformação de rutura	14,7 ± 1,9 %	5,5 ± 0,2 %	0,0001

4.9. Estudo sobre o impacto da aplicação dos revestimentos selecionados na conservação da cereja

Após a seleção das quatro formulações de revestimento com as características mais apropriadas para aplicação à cereja (OI+T, OI+T+CA, C+T, C+T+CA), e da sua respetiva caracterização, prosseguiu-se à aplicação das formulações aos frutos sobre a forma de revestimento. De seguida, foi realizado um ensaio de conservação durante 28 dias, avaliando-se o efeito da aplicação dos revestimentos à cereja, assim como a sua contribuição para a conservação deste fruto (durante os 28 dias de conservação). Para isso avaliaram-se os parâmetros de cor, perda de massa, textura e teor de sólidos solúveis, ao longo do tempo de conservação (cujos resultados são apresentados em seguida). Realizou-se também, em duas datas diferentes, uma contagem de bolores e leveduras e uma análise sensorial aos frutos, de modo a perceber se os diferentes revestimentos contribuem positivamente para a conservação dos frutos, assim como a sua aceitabilidade pelo consumidor.

Ao longo deste capítulo serão, então, apresentados os resultados obtidos durante o ensaio de conservação realizado às cerejas após a aplicação dos revestimentos OI+T, OI+T+CA, C+T e C+T+CA.

4.9.1. Cor (antes e depois da aplicação do revestimento)

A Tabela 32 apresenta os valores da diferença de cor (ΔE) entre as amostras de cereja antes da aplicação dos revestimentos e depois da aplicação. Em todas as amostras verificaram-se alterações detetáveis pelo olho humano ($\Delta E > 3$), após a aplicação dos revestimentos.

Os valores de ΔE são também superiores a 6 em todas as amostras analisadas, logo conclui-se que a aplicação dos revestimentos nas cerejas altera significativamente a sua cor.

Tabela 32 – Diferença de cor (ΔE) entre as amostras revestidas e antes da aplicação dos revestimentos.

Amostra	ΔE
C+T	8
C+T+CA	8
OI+T	12
OI+T+CA	7

Na Figura 43 (Anexo VIII), encontra-se uma representação gráfica no plano a^*b^* das amostras de cereja analisadas, antes e depois da aplicação dos revestimentos (C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA). Através da análise da figura, é possível verificar que existem diferenças nos valores de a^* e de b^* para a mesma amostra, antes e depois da aplicação dos revestimentos.

Na Tabela 45 e

Tabela 46 (Anexo VIII), apresentam-se os valores de *p-value* obtidos no teste de comparação de médias de Tukey relativamente aos parâmetros a^* e b^* da cor, respetivamente. Nestas tabelas observa-se que a única amostra que apresenta diferenças significativas dos parâmetros a^* e b^* após a aplicação dos revestimentos, é a amostra OI+T.

É também possível verificar, através da análise da Figura 43 em conjunto com a Figura 45, que todas as amostras apresentam um valor de saturação da cor (C^*) menor depois da aplicação dos revestimentos, à exceção da amostra OI+T. Na Tabela 48 (Anexo VIII), apresentam-se os *p-values* obtidos no teste de comparação de médias de Tukey relativamente ao parâmetro saturação da cor (C^*). Através da observação dos valores, conclui-se que a única amostra que apresentou diferenças significativas na saturação após a aplicação dos revestimentos, foi a amostra OI+T.

Em relação à matiz da cor (h°), pode observar-se na Figura 43 em conjunto com a Figura 46, que todas as amostras apresentaram uma pequena diminuição no valor deste parâmetro, depois de terem sido aplicados os revestimentos. Na Tabela 49 (Anexo VIII), apresentam-se os *p-values* obtidos no teste de comparação de médias de Tukey relativamente à matiz da cor (h°). Através da observação da tabela conclui-se que nenhuma das amostras apresentou diferenças significativas na matiz da cor, após a aplicação dos revestimentos.

Outro parâmetro da cor, a luminosidade (L^*), foi também analisado nas amostras. Na Figura 44 (Anexo VIII), observa-se que todas as amostras apresentaram diferenças na luminosidade após a aplicação dos revestimentos, com exceção da amostra C+T+CA, em que o valor deste parâmetro diminuiu. Na Tabela 47 (Anexo VIII), apresentam-se os *p-values* obtidos no teste de comparação de médias de Tukey relativamente a este parâmetro. A única amostra que apresentou diferenças significativas após a aplicação dos revestimentos, foi a amostra OI+T+CA.

4.9.2. Perda de massa

Os valores de perda de massa (%) obtidos para as cerejas sem revestimento (CT) e com revestimentos (C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA), em ambiente refrigerado, estão representados graficamente na Figura 35.

Pela análise da Figura 35, pode observar-se que a perda de massa (%) ao longo dos 28 dias do ensaio não é muito elevada, o que foi evidente através observação do aspeto das cerejas no vigésimo oitavo dia do ensaio de conservação.

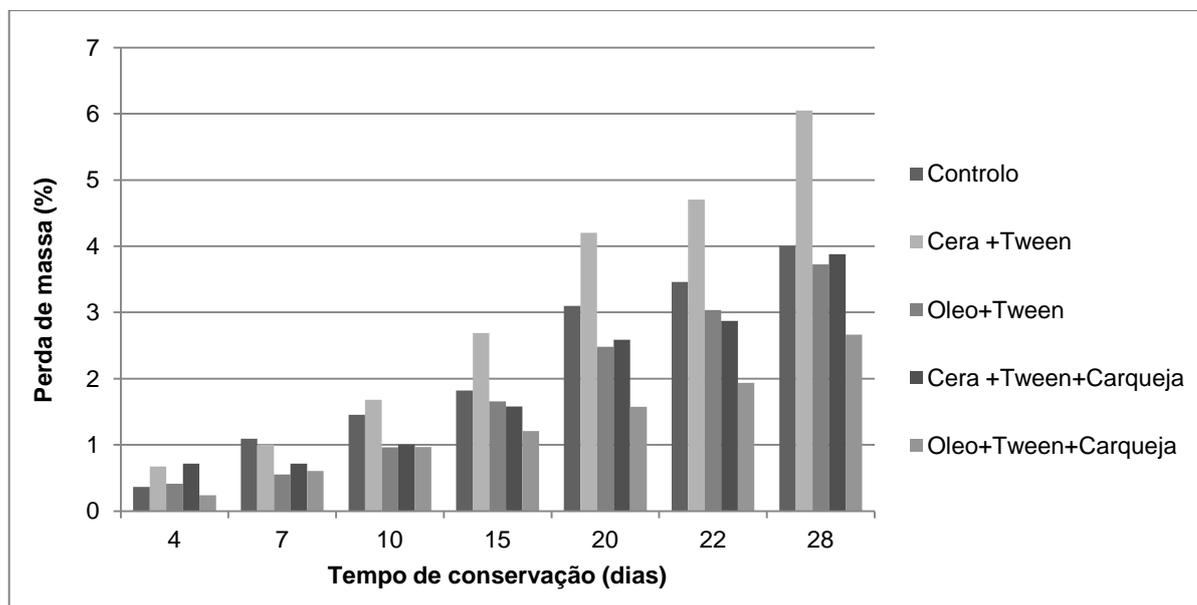


Figura 35 - Representação gráfica dos valores de perda de massa (%) obtidos para as amostras de cereja sem revestimento (controlo) e com revestimentos comestíveis.

Observa-se que a perda de massa é menor no caso dos revestimentos que contêm carqueja (C+T+CA, Ol+T+CA), face ao mesmo revestimento sem carqueja (C+T, Ol+T). Uma possível justificação para este resultado é o facto de a carqueja apresentar um efeito bioativo protetor, contribuindo para o controlo do desenvolvimento microbológico. Ao estarem menos expostos a uma maior atividade microbiana, os frutos apresentam uma menor degradação e conseqüentemente uma menor perda de massa.

As cerejas que apresentaram maior perda de massa foram, ao contrário do que se esperava, as cerejas revestidas com cera (C+T). Tal facto não se esperava, pois a incorporação de cera de abelha nos revestimentos tem como função proporcionar uma barreira ao vapor de água, prevenindo a desidratação dos frutos. Este facto poderá estar relacionado com o efeito da difusão através do revestimento ser favorecida nas formulações com cera (C+T e C+T+CA), como explicado anteriormente no ponto 4.8.4.2.

A maior parte das cerejas revestidas (C+T+CA, Ol+T, Ol+T+CA) registou menores perdas de massa (%) que as cerejas sem revestimento (CT), embora os valores obtidos não difiram muito para todas as amostras analisadas. Face a estes resultados, pode concluir-se que a maioria dos revestimentos testados contribuiu para o controlo da perda de massa (%) das cerejas em ambiente refrigerado e, mais evidente ainda, que a presença de carqueja nos revestimentos aumentou o efeito positivo no controlo da perda de massa. Há que ter em conta que o reduzido número de repetições neste ensaio possa comprometer a validade das conclusões efetuadas.

4.9.3. Textura

Com o objetivo de avaliar as alterações de textura na cereja ao longo do tempo de conservação, foi realizado um teste de perfuração, de forma a medir a força de resistência oferecida pelas cerejas à sua penetração.

Os valores médios da tensão de perfuração (MPa) obtidos para a cereja sem revestimento (controle - CT) e revestida (C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA) estão representados graficamente na Figura 36.

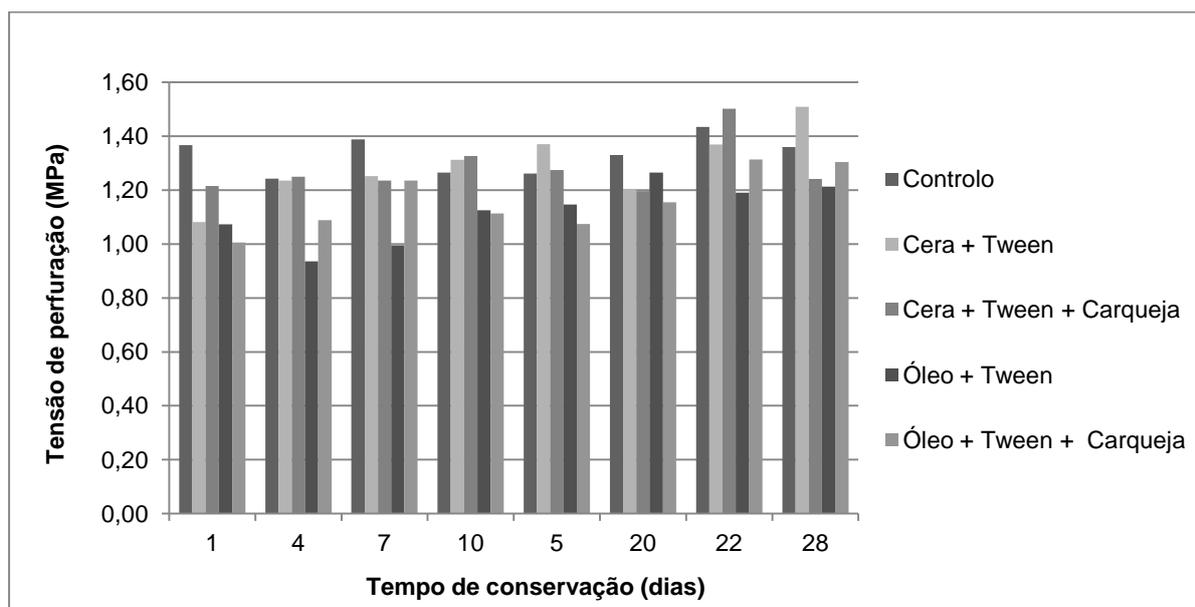


Figura 36 - Valores médios da tensão de perfuração (kPa) das amostras de cerejas.

Pela observação da Figura 36 verifica-se que os valores médios da tensão de perfuração (MPa) foram relativamente heterogêneos durante o tempo do ensaio. Pode observar-se que a partir do vigésimo segundo dia de conservação os valores médios da tensão de perfuração registaram valores ligeiramente mais elevados.

Ao longo do ensaio de conservação, registaram-se valores de tensão de perfuração entre 1,2 MPa e 1,5 MPa. Pode observar-se na figura que o valor mínimo registado corresponde à amostra OI+T e o máximo registado à amostra C+T.

A Tabela 50 (Anexo IX) apresenta o resumo dos valores de *p-value*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores médios da tensão de perfuração. Pela análise dos *p-values* apresentados, verifica-se que não se registaram diferenças significativas nos valores médios de tensão de perfuração dos diferentes revestimentos ao longo dos dias de observação do ensaio.

Pode concluir-se que a aplicação de revestimentos de quitosano à cereja não afetou significativamente a tensão de perfuração. Relativamente ao tipo de lípido incorporado ou da

incorporação de carqueja aos revestimentos utilizados, não se pode afirmar que tenham afetado significativamente a tensão de perfuração, pois não é apresentada nenhuma evidência estatística que o comprove. Estes resultados levam a concluir que nenhum dos revestimentos aplicados influenciou a firmeza das cerejas ao longo do ensaio de conservação.

4.9.4. Teor de sólidos solúveis

Os valores médios do teor de sólidos solúveis, obtidos para as amostras de cerejas durante o ensaio de conservação, estão apresentados graficamente na Figura 37.

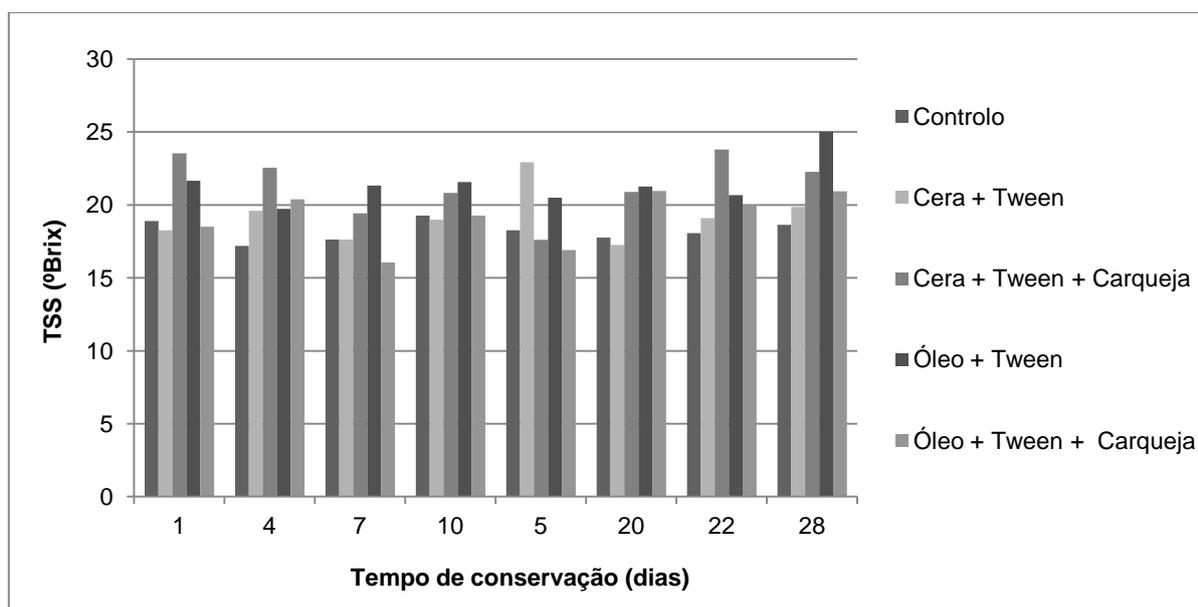


Figura 37 - Grau brix das amostras de cerejas (CT, C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA) ao longo do tempo de conservação (dias).

Verifica-se que ao longo de todo o ensaio não houve grandes alterações ao nível do teor de sólidos solúveis para as diferentes amostras.

Os valores médios de grau brix (%) registados variam entre 16,1% e 25,0% ao longo dos 28 dias do ensaio. O valor mínimo registado ($^{\circ}\text{Brix} = 16,1\%$), verifica-se para a amostra de cerejas revestidas com óleo e carqueja incorporada (OI+T+CA), no sétimo dia do ensaio de conservação. O valor máximo ($^{\circ}\text{Brix} = 25,0\%$) corresponde à amostra de cerejas revestidas com óleo (OI+T), ao fim de 28 dias de conservação.

Seria de esperar um aumento mais evidente do grau brix (%) ao longo do ensaio de conservação, para todas as amostras, dado que verificou-se alguma perda de massa ao longo dos 28 dias. Esta perda de massa corresponde sobretudo a água perdida pelos frutos, o que pressupõe um aumento do seu teor de sólidos solúveis, traduzido por graus brix (%).

A Tabela 51 (Anexo IX) apresenta o resumo dos valores de *p-value*, obtidos no teste post-hoc de Anova de Scheffé, relativamente à determinação do grau brix (%). Neste caso, optou-se pela

realização de um teste de Scheffé em vez de um teste de Tukey, devido ao baixo número de repetições para cada amostra (três repetições).

Observando os *p-values* apresentados na Tabela 51 (Anexo IX), verifica-se que todos os revestimentos aplicados apresentam diferenças de grau brix (%) significativas, em algum momento do ensaio de conservação. Uma possível explicação para os resultados obtidos (um pouco confusos e contraditórios) é que o efeito da grande variabilidade da matéria-prima sobrepõe-se ao efeito do tempo de conservação, no qual o grau de desidratação registado foi bastante reduzido, correspondente a uma perda de água abaixo dos 6% (Figura 35).

4.9.5. Crescimento de Bolores e Leveduras

A Tabela 33 apresenta os valores relativos ao cálculo do número provável de colónias por grama de produto

Tabela 33 – Resumo do número provável de bolores e leveduras por grama de produto obtidos na determinação efetuada no dia 7 e no dia 22 do ensaio de conservação.

Amostra	dia 7	dia 22
CT	$4,0 \times 10^2$ UFC/g	$1,1 \times 10^4$ UFC/g
C+T	<100 UFC/g	<100 UFC/g
C+T+CA	<100 UFC/g	$2,0 \times 10^2$ UFC/g
OI+T	<100 UFC/g	$1,9 \times 10^3$ UFC/g
OI+T+CA	<100 UFC/g	<100 UFC/g

Na Tabela 33, pode constatar-se o efeito antifúngico dos revestimentos aplicados. No primeiro dia de contagem (sétimo dia do ensaio de conservação), apenas a amostra sem revestimento (CT) apresentava a presença de colónias nas placas de contagem. No vigésimo segundo dia do ensaio de conservação, para além da amostra controlo (CT), também as amostras revestidas OI+T e C+T+CA mostravam a presença de colónias, embora em número menor.

Estes resultados permitem ainda tirar algumas conclusões sobre o efeito antifúngico da carqueja: as amostras que continham carqueja não apresentaram presença de bolores e leveduras significativa (à exceção da amostra C+T+CA no segundo dia de contagem, que apresentou um valor baixo, próximo do limite de deteção do método).

4.9.6. Análise Sensorial

A Figura 38 representa graficamente as classificações médias de cada uma das amostras, em relação aos atributos analisados nas provas sensoriais, realizadas nos dias 1 e 11 do ensaio de conservação.

O resumo dos resultados obtidos nas provas sensoriais, em relação aos atributos estudados para todas as amostras, pode ser consultado na Tabela 52 do Anexo X.

Observando a Figura 38 verifica-se que relativamente à “homogeneidade de cor”, a amostra de cerejas sem revestimento (CT) foi a que obteve uma classificação mais elevada no primeiro dia de prova. A classificação mais baixa verificou-se para a amostra OI+T+CA. Os provadores classificaram de forma semelhante as amostras nos dois dias em que se realizaram as provas (dia 1 e no dia 10), com exceção da amostra CT em que se verificou uma diminuição no valor atribuído ao parâmetro “homogeneidade da cor”.

Relativamente à “intensidade da cor”, verifica-se que as amostras obtiveram classificações bastante semelhantes (entre 3 e 4), com exceção da amostra controlo (CT) que foi classificada como tendo uma cor bastante intensa (5,3) no dia 1 do ensaio de conservação.

Relativamente à “perceção do revestimento”, verifica-se que a amostra controlo (CT) obteve uma classificação notoriamente mais baixa que no caso das cerejas revestidas, o que permite concluir que a existência de revestimento é facilmente detetada pelos provadores. Entre os revestimentos aplicados, não se verificam grandes diferenças nas classificações em relação ao parâmetro em causa (no entanto a amostra C+T+CA foi a classificada como a mais perceptível).

Quanto ao atributo “brilho”, as amostras sem revestimento (CT) obtiveram classificações visivelmente superiores. Entre as amostras revestidas não se verificaram grandes diferenças na pontuação, para o mesmo dia de análise. No entanto, para as amostras revestidas, verifica-se um aumento na classificação do brilho ao longo do ensaio de conservação (do dia 1 para o dia 10).

Verificou-se que em relação ao parâmetro “acidez” todas as amostras analisadas obtiveram classificações semelhantes na prova sensorial. Poderiam esperar-se valores mais elevados nas amostras revestidas, devido à presença de ácido acético na sua composição, mas tal não se verificou.

Quanto ao atributo “sabor estranho”, a classificação média registada é baixa, sendo a amostra controlo a que obteve as classificações mais reduzidas (entre 1,2 e 1,4). Todas as amostras revestidas obtiveram classificações entre 1,5 e 2,1.

Os parâmetros “apreciação global” e “intenção de compra” obtiveram classificações bastante semelhantes para as mesmas amostras, o que traduz a sua forte relação. As amostras controlo (CT) obtiveram classificações notavelmente superiores às amostras revestidas, nos dois parâmetros em causa. Em relação à amostra controlo (CT), notou-se uma diminuição da “apreciação global” e da “intenção de compra” à medida que o tempo de conservação aumentou (do dia 1 para o dia 10). Verificou-se o contrário na maioria das amostras revestidas (com exceção da OI+T), em que a classificação nestes parâmetros foi menor no dia 10. De entre os revestimentos aplicados, as classificações pouco diferiram, tendo obtido valores entre 2,6 e 3,7.

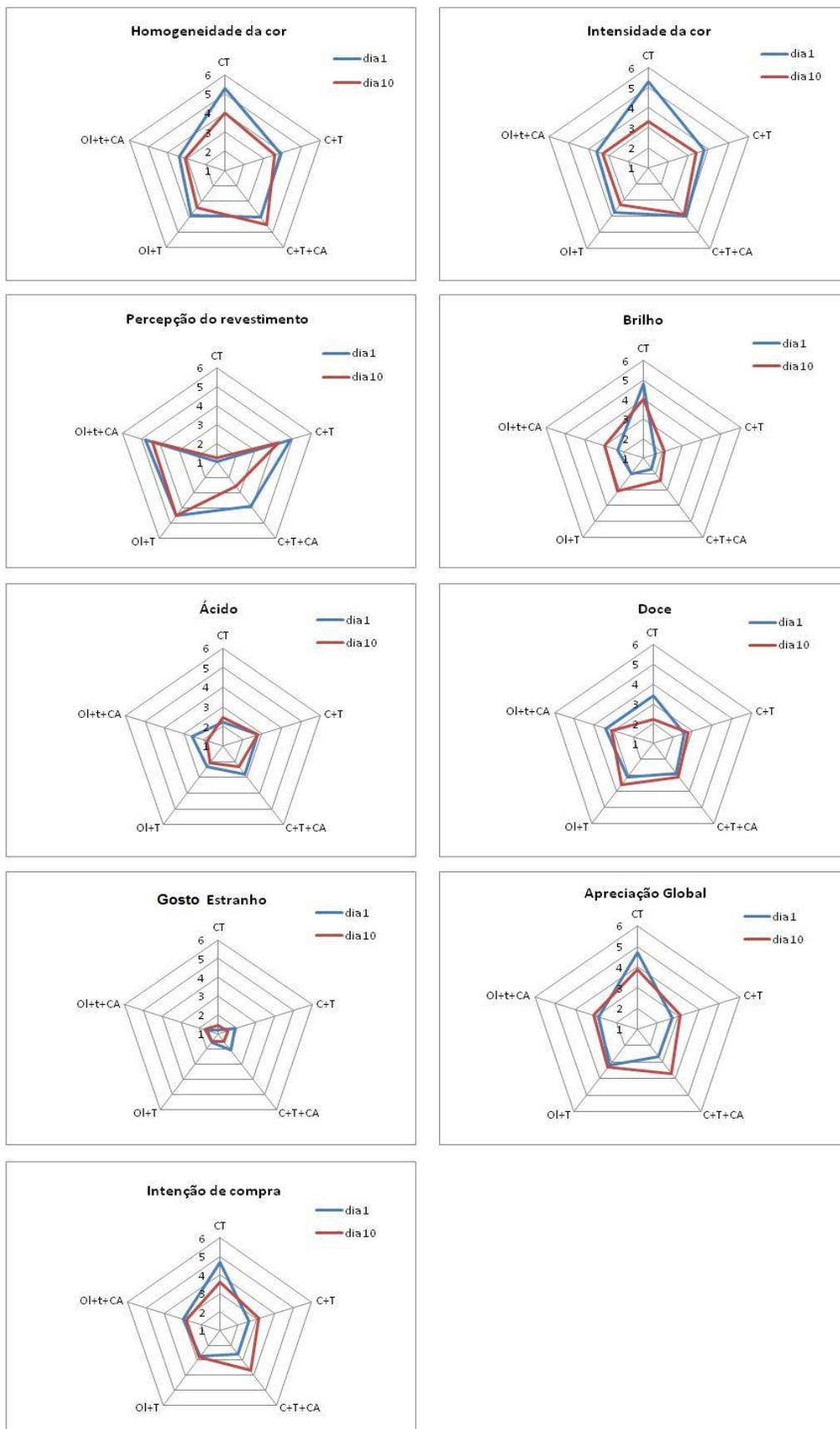


Figura 38 - Representação gráfica das classificações médias dos atributos estudados nas provas sensoriais realizadas para todas as amostras de cerejas revestidas.

A Tabela 34 e a Tabela 35 apresentam os *p-values*, obtidos no teste post-hoc de Anova, Tukey, relativamente às classificações atribuídas nos parâmetros “apreciação global” e “intenção de compra” das amostras.

Tabela 34 - Resumo dos valores de p-value obtidos a partir do teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às classificações médias atribuídas à “apreciação global” das amostras.

Amostras		<i>P-values</i>	
		Tempo de Conservação (dias)	
		1	10
CT	C+T	<i>0,007</i>	0,867
	C+T+CA	<i>0,007</i>	0,999
	OI+T	0,119	0,976
	OI+T+CA	<i>0,025</i>	0,867
C+T	C+T+CA	1,000	0,976
	OI+T	0,993	0,999
OI+T	OI+T+CA	0,999	0,999

Pela análise da Tabela 34, verifica-se que, à exceção do primeiro dia de provas (dia 1), as amostras não registaram diferenças significativas nos valores médios das classificações atribuídas à “apreciação global”. Relativamente à prova efetuada no primeiro dia do ensaio de conservação, verifica-se que a amostra de uvas controlo (CT), obteve uma classificação significativamente superior na apreciação global relativamente à maioria das outras amostras de uvas.

Pela análise dos *p-values* apresentados na Tabela 35, verifica-se que, à exceção do primeiro dia de provas (dia 1), as amostras também não registaram diferenças significativas nos valores médios das classificações atribuídas à “intenção de compra”.

Tabela 35 - Resumo dos valores de p-value obtidos a partir do teste post-hoc de ANOVA, Tukey, às classificações atribuídas à “intenção de compra” das amostras.

Amostras		<i>P-values</i>	
		Tempo de Conservação (dias)	
		1	10
CT	C+T	<i>0,012</i>	0,997
	C+T+CA	<i>0,012</i>	1,000
	OI+T	<i>0,022</i>	0,919
	OI+T+CA	0,093	0,919
C+T	C+T+CA	1,000	0,997
	OI+T	1,000	0,999
OI+T	OI+T+CA	0,999	1,000

No primeiro dia de prova, a amostra de uvas controlo (CT) obteve uma classificação significativamente superior no parâmetro “apreciação global” relativamente à maioria das outras amostras de uvas.

Conclui-se, então, que se verificaram diferenças significativas nas classificações da “apreciação global” e da “intenção de compra” no primeiro dia de prova, mas não no segundo (décimo dia do ensaio de conservação). Tal resultado poderá resultar do facto de no primeiro dia do ensaio de conservação, as cerejas controlo apresentarem um aspeto “fresco”, tendo sido classificada com valores elevados. No décimo dia do ensaio de conservação, as cerejas controlo apresentavam um aspeto menos “fresco”, pelo que o painel de provadores classificou com valores mais baixos a sua apreciação global e a sua intenção de compra, não se distinguindo significativamente das classificações dadas às cerejas revestidas nestes parâmetros.

4.9.7. Análise Multivariada

Com vista a uma análise global dos resultados, submeteram-se a uma análise multivariada os parâmetros físico-químicos e sensoriais estudados anteriormente, mais especificamente a uma análise de componentes principais e uma análise de cluster.

Na Tabela 37 apresentam-se os valores próprios para as diferentes variáveis em análise. A análise de componentes principais permite observar que as duas primeiras componentes justificam mais de 80% variabilidade total. Como se pode observar na Tabela 37, a primeira componente é explicada pela homogeneidade da cor (HC), intensidade da cor (IC), perceção do revestimento (Prev), brilho (Bri), sabor estranho (Estranho), apreciação global (ApG) e intenção de compra (InCom). Considera-se que a segunda componente está relacionada com o sabor ácido (Ac) e com a perda de massa (PM), que embora não tenham valores próprios em módulo superiores a 0,7, apresentam valores muito próximos.

Tabela 36 – Eigenvalues da matriz de correlações e estatísticas relacionadas (variáveis ativas apenas)

	<i>Eigenvalue</i>	% Total - variance	Cumulative - Eigenvalue	Cumulative - %
	5,32980	59,22004	5,32980	59,22000
	1,88295	20,92170	7,21276	80,14170
	1,11684	12,40937	8,32960	92,55110
	0,41019	4,55763	8,73979	97,10870
	0,16281	1,80904	8,90260	98,91780
	0,07910	0,87888	8,98170	99,79670
	0,01647	0,18297	8,99817	99,97960
	0,00183	0,02036	9,00000	100,00000
	0,00000	0,00001	9,00000	100,00000

Optou-se por se realizar a análise de componentes principais às amostras analisadas no quarto e no décimo dia do ensaio de conservação, de forma a reunir os resultados obtidos nos dois dias de análise sensorial com todos os outros parâmetros estudados (exceto a contagem de bolores e leveduras).

Tabela 37 - Valores próprios das variáveis.

Variáveis	Factor 1	Factor 2
PM	0.130025	-0.641344
HC	-0.807688	0.540831
IC	-0.718039	0.631207
Prev	0.898388	0.051101
Bri	-0.880866	-0.412647
Ac	0.196532	0.670612
Estranho	0.776494	0.362083
ApG	-0.983132	-0.163981
InCom	-0.976634	0.010359
*Brix	0.275021	0.109296
*Doce	-0.108835	0.024321

A Figura 39 apresenta uma projeção das variáveis (figura a) e das amostras (figura b) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais. Na Figura 39a, é possível observar que a maioria das variáveis é explicada de forma mais notável pela primeira componente. Apenas as variáveis perda de massa e sabor ácido são explicadas pela segunda componente.

Na Figura 39b, verifica-se a presença de quatro grupos homogêneos. Em relação às variáveis explicadas pela primeira componente, as amostras controlo (CT4 e CT10) encontram-se associadas a uma melhor aceitação do consumidor (maior apreciação global e maior intenção de compra) e a um maior brilho. As amostras revestidas (C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA) encontram-se associadas a uma maior perceção do revestimento e ao sabor estranho. Este facto permite concluir que a aplicação de revestimentos comestíveis de quitosano às cerejas é facilmente detetada pelo consumidor e não apresenta uma mais-valia na melhoria do sabor e aspeto dos frutos.

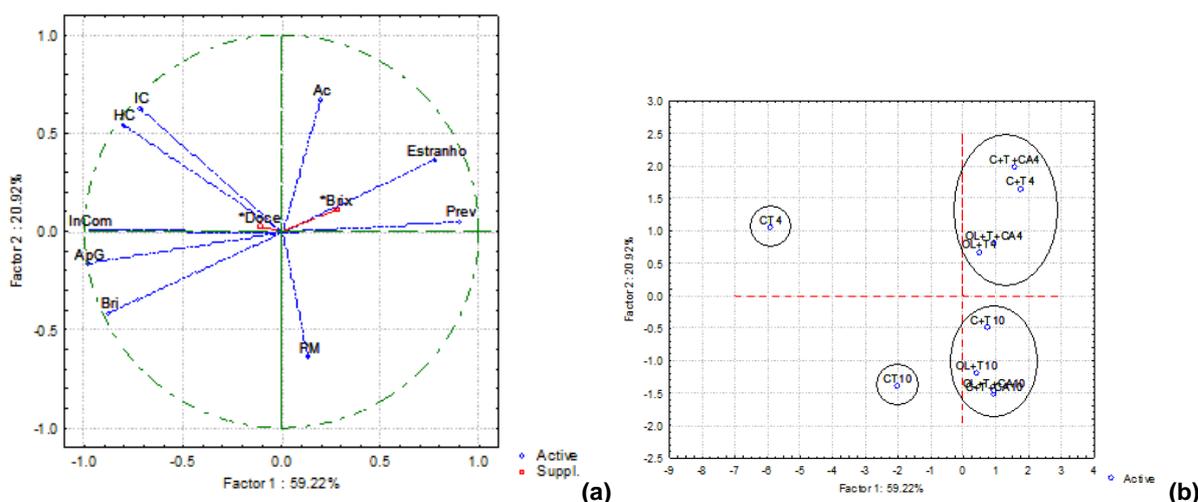


Figura 39 - Projeção das variáveis (a) e das amostras (b) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

Em relação à perda de massa, variável explicada pela segunda componente, verifica-se apenas uma divisão entre o quarto dia e o décimo dia (como seria previsto, o décimo dia foi o que apresentou uma maior perda de massa). Neste caso, não se verifica uma distinção entre as amostras revestidas e as não revestidas. Pode concluir-se, então, que os revestimentos aplicados não apresentaram influência relativamente a este parâmetro. O mesmo se verifica em relação ao sabor ácido, pois as amostras do dia 10 apresentam um sabor menos ácido que as do dia 4, não havendo distinção entre as revestidas e as não revestidas. Tal facto seria previsível, pois ao longo do tempo de conservação ocorreu o amadurecimento das cerejas, logo uma diminuição do seu sabor ácido.

Através da análise de componentes principais, pode concluir-se de forma global que os revestimentos de quitosano testados não tiveram uma boa aceitação pelo consumidor.

Ainda relativamente à análise multivariada, realizou-se também uma análise de dendrograma (*cluster analysis*), que veio confirmar os resultados obtidos através da análise de componentes principais.

A Figura 40 apresenta um dendrograma relativo às amostras de cereja analisadas (CT, C+T, C+T+CA, OL+T, OL+T+CA), no quarto e no décimo dia do ensaio de conservação.

Nesta análise, verifica-se a formação de dois grupos a uma distância euclidiana de cerca de 8, separando apenas a amostra CT4 de todas as restantes. A restante amostra controlo (CT10) é separada das amostras revestidas a uma distância euclidiana de 5, o que permite concluir que as amostras revestidas não são muito diferentes entre si.

A distâncias euclidianas inferiores (cerca de 4) as amostras separam-se novamente, agrupando-se de acordo com o dia de análise (dia 4 ou dia 10). Só a uma distância euclidiana de cerca de 3 é que ocorre a separação das amostras de acordo com o tipo de composto lipídico incorporado, óleo ou cera de abelha. A separação das amostras cujo revestimento contém carqueja das que não contêm este componente, ocorre a valores muito baixos, a uma distância euclidiana de 1 (ou valores inferiores).

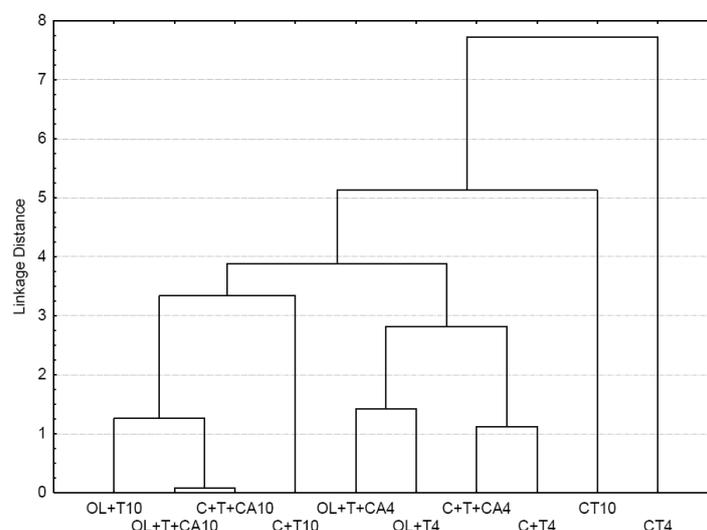


Figura 40 - Dendrograma das amostras de cereja no quarto e décimo dia do ensaio de conservação.

A análise de cluster confirma o que foi observado na análise de componentes principais: verificou-se que os parâmetros estudados foram mais influenciados pelo dia de análise que pelo tipo de revestimento aplicado às cerejas.

Com o objetivo de entender o efeito da carqueja nos parâmetros analisados, realizou-se uma nova análise de dendrograma incluindo mais dias de observação na análise (dia 1, 4, 10, 22 e 28).

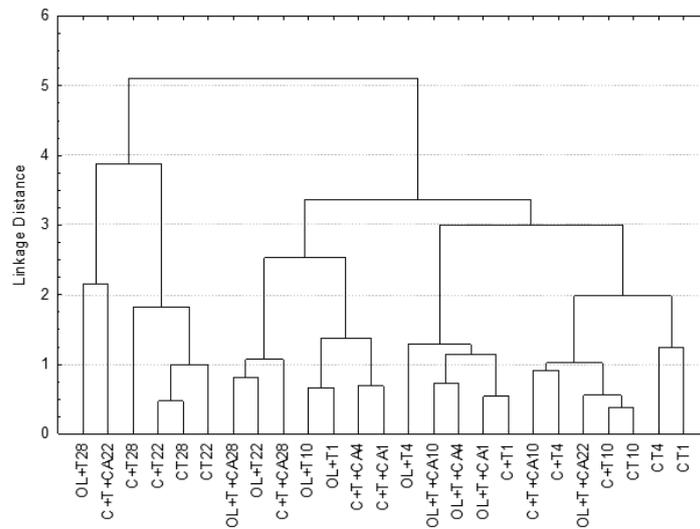


Figura 41 - Dendrograma das amostras de cereja no dia 1, 4, 10, 22 e 28 do ensaio de conservação.

A Figura 41 permite observar a influência da carqueja nos parâmetros estudados, pois as únicas amostras do vigésimo oitavo dia que não são agrupadas no primeiro grupo, são as que contém carqueja (OL+T+CA28 e C+T+CA28). Este facto permite concluir que a presença de carqueja nos revestimentos estudados confere efeitos benéficos na conservação da cereja.

5. CONCLUSÕES

Numa fase preliminar, foram testados cinco ácidos diferentes como solvente para o quitosano. Verificou-se que a solução de ácido acético a 1% (v/v) (pH=2, 57) apresentou os melhores resultados em termos de dissolução do polímero e características dos filmes formados, tendo sido a selecionada para prosseguir com o estudo.

Os resultados do ensaio de otimização das concentrações de ácido cítrico e de glicerol nas soluções permitiram selecionar as concentrações de 50% de ácido cítrico e de 50% de glicerol para prosseguir com o estudo. Selecionaram-se estas concentrações por corresponderem à situação em que se apresentaram características mais apropriadas nos filmes estudados: reduzida solubilidade, reduzida CAA e melhores propriedades mecânicas.

Os estudos do tipo e concentração de lípido a adicionar à solução filmogénica conduziram à escolha das seguintes formulações:

- (i) cera de abelha (5%), surfatante (0,15% de tween80 (m/m)) e 1% de extrato de carqueja;
- (ii) óleo de girassol (5%), surfatante (0,15% de tween80 (m/m)) e 1% de extrato de carqueja.

Os resultados obtidos relativamente aos respectivos filmes obtidos permitiram concluir:

- A presença de um lípido nos filmes provocou uma alteração significativa na maioria dos parâmetros estudados.
- Contrariamente ao que seria esperado, a presença de um lípido aumentou a solubilidade, a capacidade de absorção de água e a permeabilidade ao vapor de água. Tais resultados poderão ser explicados pelo aumento da espessura dos filmes (na presença de um composto lipídico) e pela forma como o lípido se encontra distribuído na matriz do filme.
- A presença de um lípido nos filmes diminuiu a resistência à extensão e perfuração, os filmes ficaram menos plásticos e mais quebradiços.
- A presença de extracto de carqueja não implicou alterações significativas nas características estudadas

A aplicação de revestimentos compósitos bioactivos com as formulações referidas anteriormente permitiram diminuir a perda de massa e o desenvolvimento de bolores e leveduras durante a conservação sob condições de refrigeração a 4°C durante 28 dias.

A incorporação de extratos de carqueja nos revestimentos comestíveis de quitosano foi positiva no controlo do desenvolvimento de bolores e leveduras na cereja.

No entanto, a presença dos revestimentos foi detetada pelos provadores, que os consideram uma desvantagem na aparência dos frutos (diminuição do brilho e da homogeneidade da cor). Sendo a aparência um fator decisivo na compra dos alimentos, teriam que se realizar algumas alterações na aplicação e secagem dos revestimentos para que fosse vantajosa a sua utilização à escala industrial.

6. PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

Em síntese, este trabalho contribuiu para um melhor entendimento dos filmes de quitosano no que diz respeito às suas propriedades de cor, higroscópicas, mecânicas, reológicas e estruturais. Seria porém interessante estudar os seguintes aspectos em trabalhos futuros:

- Estudar se o ácido cítrico não desempenha alguma função reticulante quando adicionado a filmes de quitosano;
- Testar outros métodos de secagem dos revestimentos nos alimentos;
- Testar outros componentes lipídicos que proporcionem uma melhor barreira ao vapor de água;
- Estudar o comportamento destes revestimentos em outros frutos;
- Estudar o efeito da incorporação de outros componentes antifúngicos nos revestimentos de quitosano.

7. BIBLIOGRAFIA

Aday, M.S.; Caner, C. (2010). Understanding the effects of various coatings in the storability of fresh cherry. *Packaging Technology and Science*, 23: 441–456.

Aider, M.; Halleux, D. (2008). Production of concentrated cherry and apricot juices by cryoconcentration technology. *LWT- Food Science and Technology*, 41: 1768-1775

Alonso, J.; Alique, R. (2004). Influence of edible coating on shelf life and quality of “Picota” sweet cherries. *Eur. Food Res. Technol.*, 218: 535–539.

Alves, V. D.; Costa, M.; Coelho, I. M. (2010). Barrier properties of biodegradable composite films based on Kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 69: 269-276.

Azevedo, V.V.C.; Chaves, S.A.; Bezerra, D.C.; Fook, M.V.L.; Costa, A.C.F.M. (2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2.3: 27-34.

Baldwin, E.A. (2007). Surface Treatments and Edible Coatings in Food Preservation. In: M. S. Rahman (Ed.), *Handbook of Food Preservation, Second Edition*, CRC Press, Florida: 477-507.

Campana, S.P.; Signini, R. (2001). Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, São Carlos- SP, 11: 169-173.

Caner, C., Vergano, P.J., & Wiles, J. L. (1988). Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer and storage. *Journal of Food Science*, 68(6): 1049-1053.

Chailoo, M.J.; Asghari, M.R. (2011). Hot water and chitosan treatment for the control of postharvest decay in sweet cherry (*Prunus avium* L.) cv. Napoleon (Napolyon). *Journal of Stored Products and Postharvest Research* Vol.2(7): 135-138.

Coelho, M.T.; Gonçalves, J.C.; Alves, V.; Moldão-martins, M. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal. *Procedia Food Science*, 1 (2011): 1454-1458.

Coelho, C.M.S. 2010. *Desenvolvimento de filmes bioativos a partir do quitosano*. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia -Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 77 p.

Cui, Z.; Beach, E.S.; Anastas, P.T. (2011). Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance. *Green Chemistry Letters and Reviews*, Vol.4, No.1 : 35-40

Debeaufort, F.; Voilley, A. (2009). Lipid-Based Edible Films and Coatings. In K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*, New York: Springer: 135-168

Drake, S.R., Kupferman, E.M., Fellman, J.K. (1988). Bing sweet cherry (*Prunus avium* L.) quality as influenced by wax coatings and storage temperature. *Journal of Food Science*, 53: 124-126. → ENCONTRAR ARTIGO

Fonseca, J.M.C.G.Q. (2012). *Revestimentos comestíveis à base de quitosano e cera de abelha: aplicação na conservação da uva de mesa*. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia -Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 94 p.

Guilbert, S.; Gontard, N.; Gor, L. G.M. (1996). Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings, *LWT - Food Science and Technology*, 29 (1-2): 10-17.

Jeon, Y. J.; Kamil, J. Y. V. A.; Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5167–5178.

Kupferman, E.; P. Sanderson (2001). Temperature Management and Modified Atmosphere Packing to Preserve Sweet Cherry Quality. *Acta Horticulturae*.

Lim, R.; Stathopoulos, C.E.; Golding, J.B. (2011). Effect of edible coatings on some quality characteristics of sweet cherries. *International Food Research Journal*, 18(4): 1237-1241.

Lin, D.; Zhao, Y.Y. (2007). Innovations in the development and applications of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3): 60-75.

Marques, S.C.P. (2012). *Edible Coatings Based on Chitosan-Besswax Emulsions*. Tese de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 48 p.

Martínez-Camachoa, A.P.; Cortez-Rochaa, M.O.; Ezquerria-Brauera, J.M.; Graciano-Verdugob, A.Z.; Rodriguez-Félix, F.; Castillo-Ortegac, M.M.; Yépez-Gómez, M.S.; Plascencia-Jatomeaa, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82,: 305–315.

Martínez-Romero, D.; Albuquerque, N.; Valverde, J.M.; Guillén, 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.

Mencarelli, F.; Saltveit, M.E.; Massantini, R. (1989). Lightly processed foods: ripening of tomato slices. *Acta Horticulturae*, 244 : 193 – 200.

Montgomery, D.C. (1997). *Design and analysis of experiments*, 4ªed. Wiley, New York.

Nieto, M.B. (2007). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. In K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*, New York: Springer: 57-112.

Olivas, G.I.; Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). Edible coatings for fresh cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 657 – 670.

Olivas, G.I.; Barbosa-Cánovas, G. (2009). Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. In K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*, New York: Springer: 211-244.

Park, S. Y.; Marsh, K. S.; Rhim, J. W. (2002). Characteristics of different molecular weight chitosan films, affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*, 67(1): 194–197.

Pavlath, A.E.; Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What and How?. In K.C. Huber, M.E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*, New York: Springer: 1-23.

Pérez-Gago, M.B.; Serra, M.; Alonso, M.; Mateos, M.; Del Río, M.A. (2003). Effect of solid content and lipid content of whey protein isolate-beeswax edible coatings on color change of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 68 (7): 2186 – 2191.

Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34: 641-678.

Quek, S.Y.; Chok, N.K.; Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing* 46: 386-392.

Rabea, E. I.; El Badawy, M.; Stevens, C. V.; Smaghe, G.; Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6): 1457–1465.

Roller, S.; Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 66–77.

Romanazzi, G., Gabler, F.M., Margosan, D., Mackey, B. E., and 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.

Romanazzi, G.; Nigro, F.; Ippolito, A. (2003). Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reduction storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biol. Technol.*, 29: 73-80.

Romanazzi, G. (2010). Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries. In D. Sivakumar (Ed.), *Fresh Produce – Special Issues: New Trends in Postharvest Management of Fresh Produce*, 4 (1). Global Science Books, Ltd, UK: 111-115.

Santos, J.E.; Soares, J.P.; Dockal, E.R.; Campana Filho, S.P.; Cavalheiro, E.T.G. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13: 242-249.

Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V. ; Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 37-51.

Silva, M.L.A.; Alarcão, A. (1999). Características físico-químicas e utilizações agro-alimentares da cereja e da ginja. *Revista de Ciências Agrárias*, Vol. XXII, nº3: 127-152.

Toivonen, P.M.A.; DeEll, J.R. (2002). Physiology of fresh-cut fruits and vegetables . In: Olusola Lamikanra (Ed.), *Fresh-cut fruits and vegetables*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 91 – 123.

Vargas, M.; Pastor, C.; Chiralt, A.; McClements, D. J.; González-Martínez, C. (2008). Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 496–511.

Vargas, M., Albors, A., Amparo, C., González-Martínez, C., 2009. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23: 536-547.

Yaman, Ö; Bayoindirli, L. (2002). Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 146–150

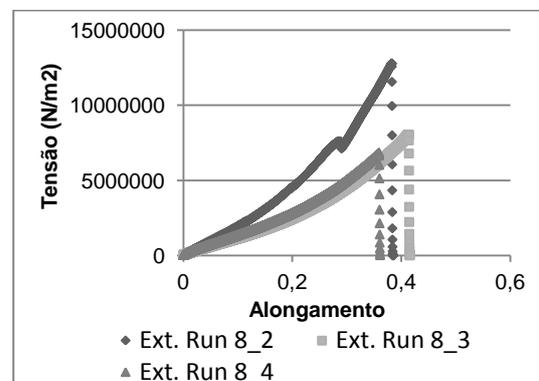
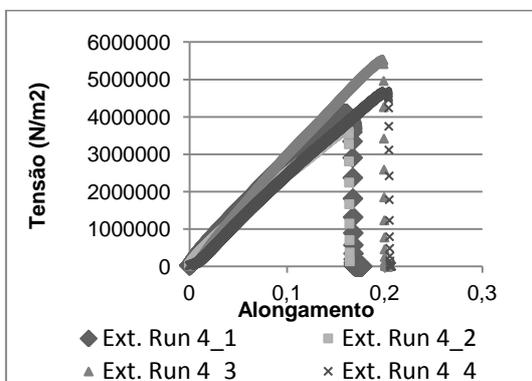
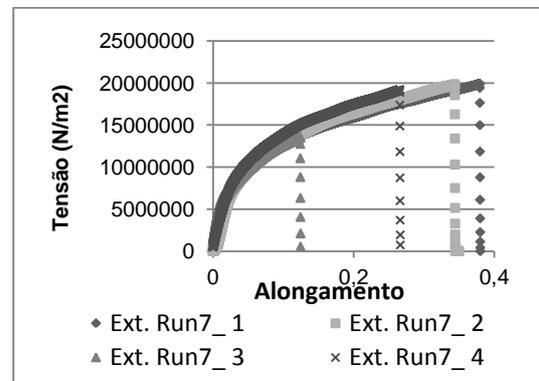
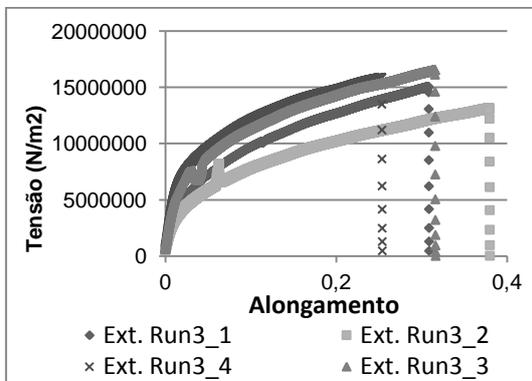
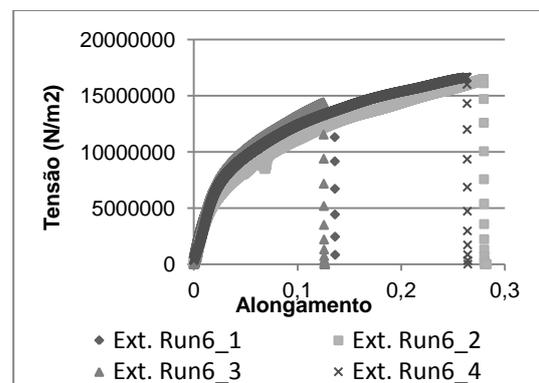
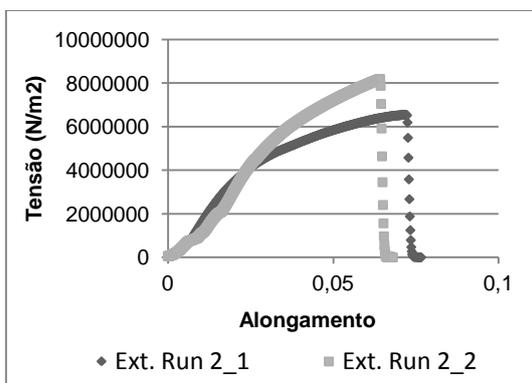
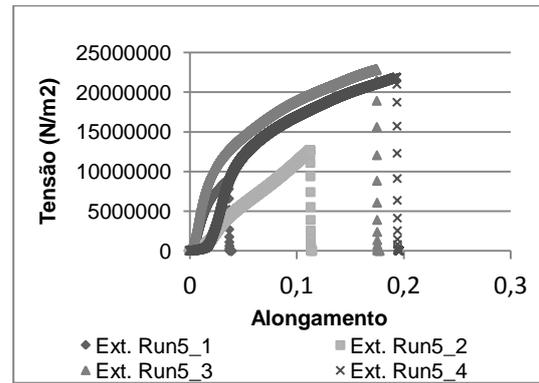
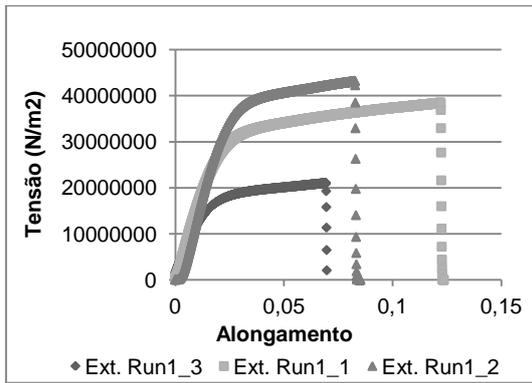
8. ANEXOS

Anexo I: Composição da cereja

Tabela 38 – Composição da cereja (*Prunus avium L.*) (adaptado de Silva & Alarcão, 1999)

Composição	100g da parte edível					
	Tabelas Inglesas (1992)	Variedades Portuguesas (1963)				Tabelas da FAO (1949/54)
		Espanhola	Francesa	Fundão	Italiana	
Parte edível	100	90	85	76	87	
Água	82,8	80	84,2	83,7	82,7	83,4
Azoto total	0,14					
Proteína	0,9	0,8	0,9	0,9	0,8	1,1
Gordura	0,1	0,8	0,8	0,4	0,7	0,4
Glúcidos	11,5	14,5	12	13,7	13	
Valor Energético (Kcal)	48	70	60	63	63	60
Amido	0					
Glucose	5,9					
Frutose	5,3					
Sacarose	0,2					
Maltose	0					
Lactose	0					
Celulose	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,5
Lenhina	Vest.					
Cinza total		0,5	0,46	0,43	0,45	0,5
<u>Minerais:</u>						
Sódio	1					
Potássio	210					
Cálcio	13	12	12	16	16	18
Magnésio	10					
Fósforo	21					
Ferro	0,2					
Cobre	0,07					
Zinco	0,1					
Enxofre	7					
Cloro	Vest.					
Manganês	0,1					
Selénio	-1					
Iodo	Vest.					
<u>Vitaminas:</u>						
Retinol	0					
Caroteno	25	Vest.	65	208	250	372
Vitamina D	0					
Vitamina E	0,13					
Tiamina/B1	0,03	0,033	0,041	0,032	0,05	0,05
Riboflavina/B2	0,03	0,055	0,067	0,042	0,063	0,06
Niacina/PP	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4
Triptofano	0,1					
Vitamina B6	0,05					
Vitamna B12	0					
Folato	5					
Pentotenato	0,26					
Biotina	0,4					
Vitamina C	11	2	2	1	0,5	8

Anexo II: Curvas de tensão - deformação, durante a extensão dos filmes



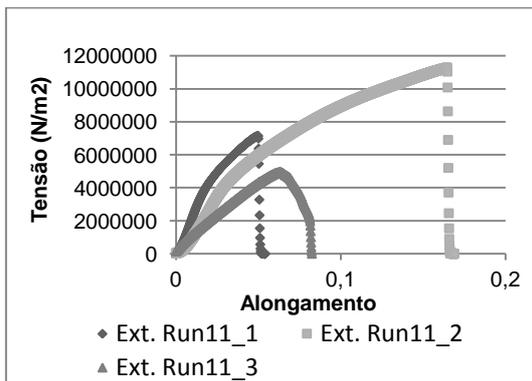
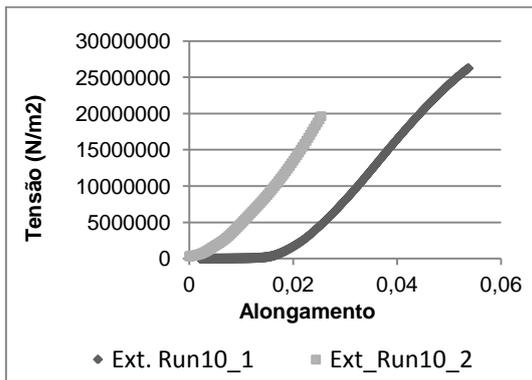
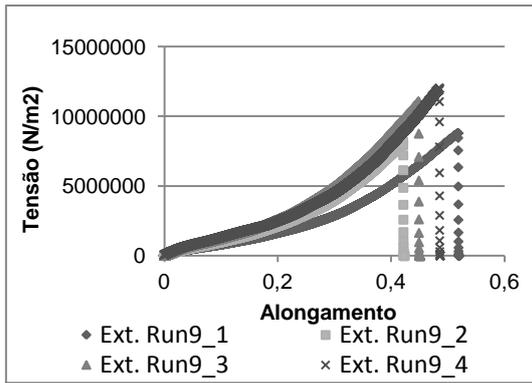


Figura 42 – Gráficos da tensão em função do alongamento, durante a extensão das amostras analisadas (11 Runs)

Anexo III: Ficha de prova de análise sensorial

Análise Sensorial de Cerejas

Ficha De Prova

Amostra: _____

Avalie os seguintes parâmetros de acordo com a escala de ordem crescente:

1 = Nada intenso

2 = Ligeiro

3 = Moderado

4 = Forte

5 = Intenso

6 = Muito intenso

ATRIBUTO: Aspeto geral

- Homogeneidade da cor

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

- Intensidade da cor

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

- Perceção do Revestimento

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

- Brilho

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

ATRIBUTO: GOSTO

- Ácido

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

- Doce

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

- Estranho

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

- Apreciação global

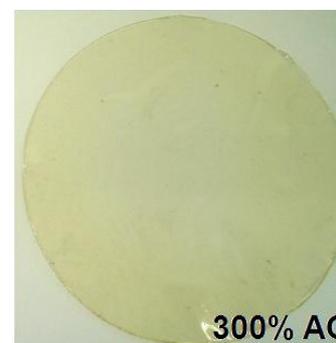
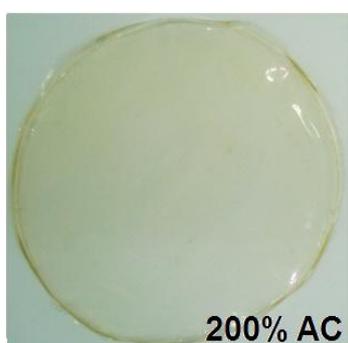
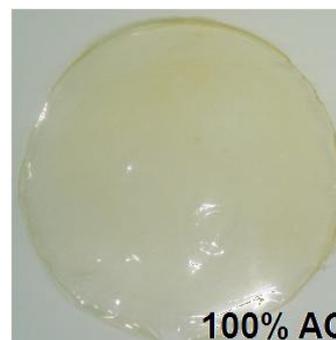
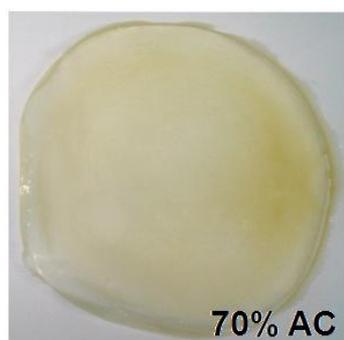
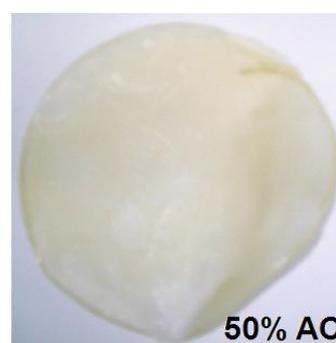
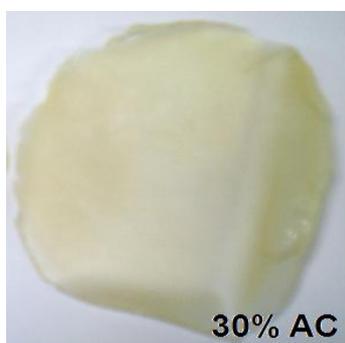
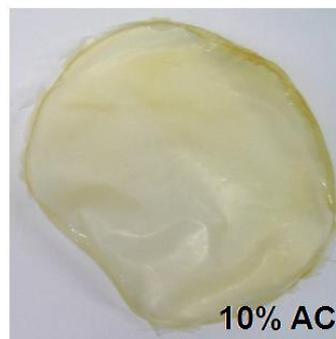
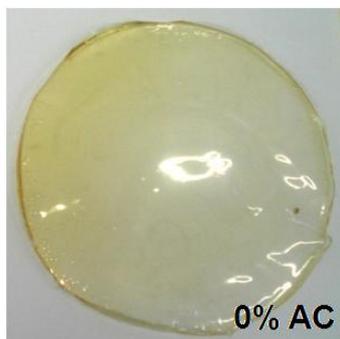
<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

- Intenção de compra

<input type="text"/>					
1	2	3	4	5	6

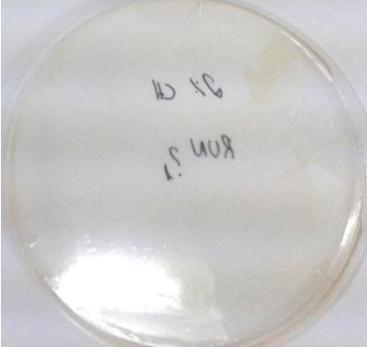
Observações: _____

Anexo IV: Imagens dos filmes obtidos com diferentes concentrações de ácido cítrico adicionado



Anexo V: Aspeto dos filmes obtidos nos ensaios preliminares ao delineamento experimental

	1,5% CH	2% CH
Teste 1		
Teste 2		
Teste 3		
Teste 4		

Teste 5		
Teste 6		
Teste 7		
Teste 8		

Anexo VI: Resultados da análise estatística realizada a alguns parâmetros da cor (Runs centrais)

Tabela 39 – P-values do teste post-hoc de Anova, Tukey, em que são comparadas as médias dos valores de saturação (C*) das cartolinas padrão com as médias dos valores de saturação dos filmes (Runs centrais) sobre as cartolinas correspondentes.

Amostra	<i>p-value</i>
Filme sobre branco	<i>0,0005</i>
Padrão branco	
Filme sobre amarelo	<i>0,0007</i>
Padrão amarelo	
Filme sobre vermelho	<i>0,003</i>
Padrão vermelho	
Filme sobre verde	<i>0,0006</i>
Padrão verde	

Tabela 40 – P-values do teste post-hoc de Anova, Tukey, em que são comparadas as médias dos valores da matiz da cor (h°) das cartolinas padrão com as médias dos valores de saturação dos filmes (Runs centrais) sobre as cartolinas correspondentes.

Amostra	<i>p-value</i>
Filme sobre branco	<i>0,0005</i>
Padrão branco	
Filme sobre amarelo	<i>0,0005</i>
Padrão amarelo	
Filme sobre vermelho	<i>0,0005</i>
Padrão vermelho	
Filme sobre verde	<i>0,002</i>
Padrão verde	

Anexo VII: Resultados da análise estatística ANOVA realizada a alguns parâmetros para otimização da concentração de ácido cítrico e glicerol

Tabela 41 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na permeabilidade ao vapor de água com a equação que traduz a superfície de resposta (AC- Concentração de ácido cítrico, Gly – Concentração de glicerol).

Factor	P-value
(1)AC (L)	0,101
AC (Q)	0,268
(2)Gly (L)	0,908
Gly (Q)	0,620
1L by 2L	0,875
R-sqr	0,58
R-Adj	0,07
Equação	$PVA = -0,000000006 - 0,0000000005 \times AC + 0,00000000014 \times AC^2 + 0,0000000002 \times Gly - 0,000000000023 \times Gly^2 - 0,000000000064 \times AC \times Gly$

Tabela 42 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na tensão de rutura (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).

Factor	P-value
(1)AC (L)	0,169
AC (Q)	0,139
(2)Gly (L)	0,115
Gly (Q)	0,868
1L by 2L	0,258
R-sqr	0,74
R-Adj	0,42
Equação	$\text{TensãoExt.} = 56879553 - 100476 \times AC - 4148 \times AC^2 - 1081883 \times Gly + 2000 \times Gly^2 + 9480 \times AC \times Gly$

Tabela 43 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis no alongamento na rutura (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).

Factor	P-value
(1)AC (L)	0,535
AC (Q)	0,105
(2)Gly (L)	0,547
Gly (Q)	0,096
1L by 2L	0,636
R-sqr	0,76
R-Adj	0,47
Equação	$\text{Alongamento} = -0,69 - 0,0051 \times AC + 0,000072 \times AC^2 + 0,042 \times Gly - 0,00038 \times Gly^2 - 0,000057 \times AC \times Gly$

Tabela 44 – Tabela ANOVA do efeito das variáveis na tensão de perfuração (AC – ácido cítrico, Gly – Glicerol).

Factor	P-value
(1)AC (L)	0,296
AC (Q)	0,398
(2)Gly (L)	<i>0,0388</i>
Gly (Q)	0,435
1L by 2L	0,328
R-sqr	0,73
R-Adj	0,45
Equação	TensãoPerf. = 4629072 + 126018×AC - 381×AC ² - 110395×Gly + 1401×Gly ² -1398×AC×Gly

Anexo VIII: Parâmetros da cor antes e depois de aplicados os revestimentos à cereja

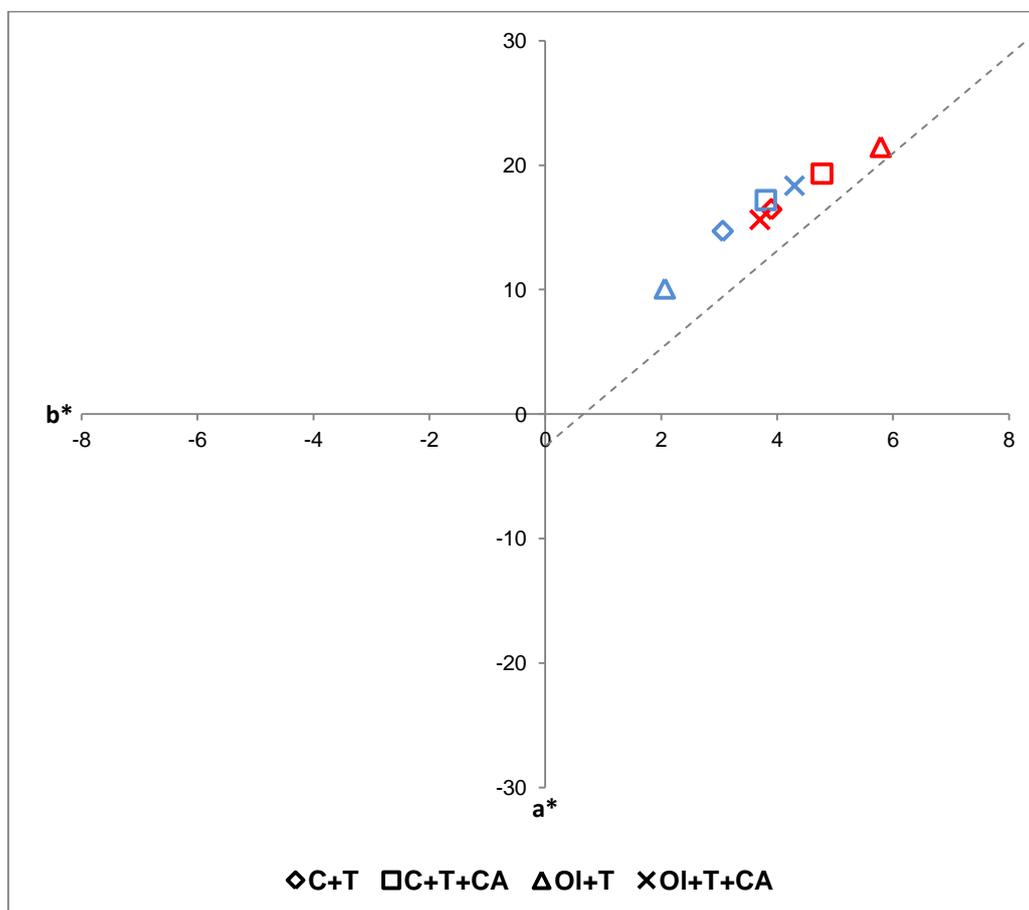


Figura 43 – Representação gráfica dos resultados experimentais do plano a^*b^* das amostras de cereja antes da aplicação dos revestimentos (a vermelho) e depois da aplicação dos revestimentos (a azul).

Tabela 45 - Resumo dos valores de p -value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise do parâmetro a^* da cor.

Amostra	p -value
C+T antes da aplicação	0,997
C+T depois da aplicação	
C+T+CA antes da aplicação	0,991
C+T+CA depois da aplicação	
OI+T antes da aplicação	<i>0,0008</i>
OI+T depois da aplicação	
OI+T+CA antes da aplicação	0,961
OI+T+CA depois da aplicação	

Tabela 46 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise do parâmetro b* da cor.

Amostra	p-value
C+T antes da aplicação	0,997
C+T depois da aplicação	
C+T+CA antes da aplicação	0,991
C+T+CA depois da aplicação	
OI+T antes da aplicação	0,0008
OI+T depois da aplicação	
OI+T+CA antes da aplicação	0,961
OI+T+CA depois da aplicação	

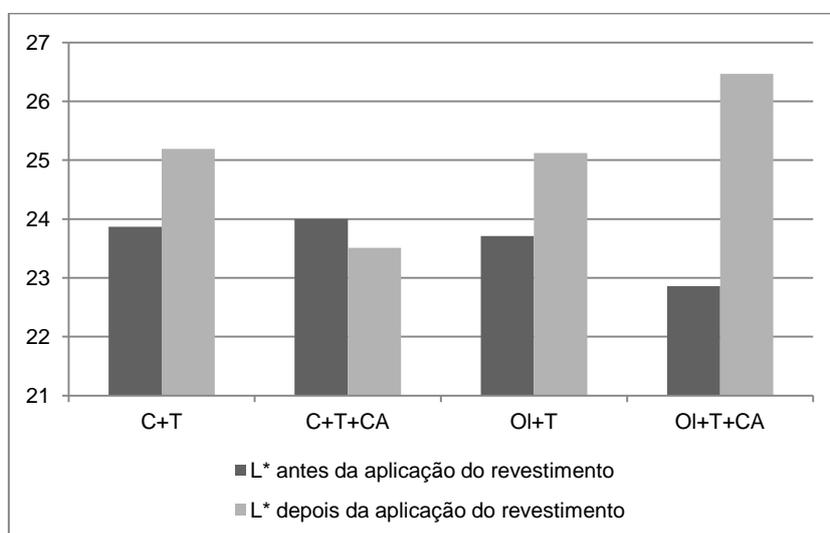


Figura 44 - Luminosidade (L) das amostras de cereja antes e depois da aplicação dos quatro revestimentos (C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA).

Tabela 47 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores de luminosidade (L).

Amostra	p-value
C+T antes da aplicação	0,527
C+T depois da aplicação	
C+T+CA antes da aplicação	0,996
C+T+CA depois da aplicação	
OI+T antes da aplicação	0,446
OI+T depois da aplicação	
OI+T+CA antes da aplicação	0,0002
OI+T+CA depois da aplicação	

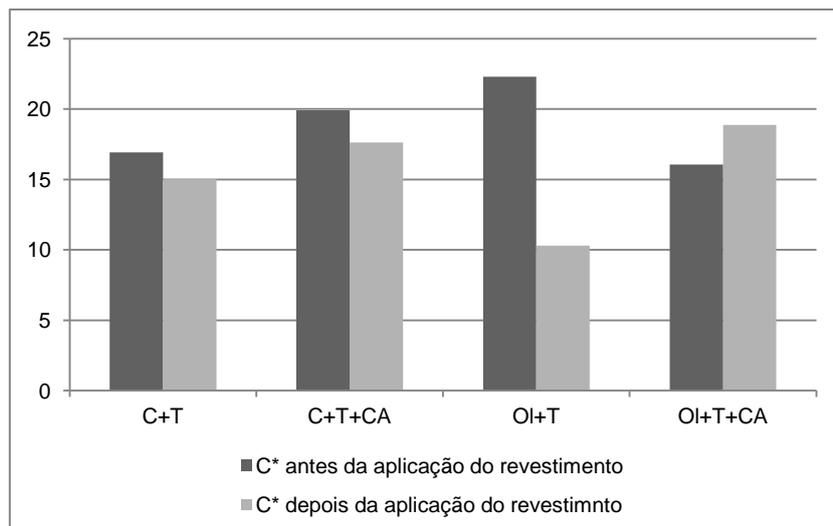


Figura 45 - Saturação da cor (C^*) das amostras de cereja antes e depois da aplicação dos quatro revestimentos (C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA).

Tabela 48 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores de saturação da cor (C^*).

Amostra	<i>p-value</i>
C+T antes da aplicação	0,997
C+T depois da aplicação	
C+T+CA antes da aplicação	0,989
C+T+CA depois da aplicação	
OI+T antes da aplicação	0,001
OI+T depois da aplicação	
OI+T+CA antes da aplicação	0,967
OI+T+CA depois da aplicação	

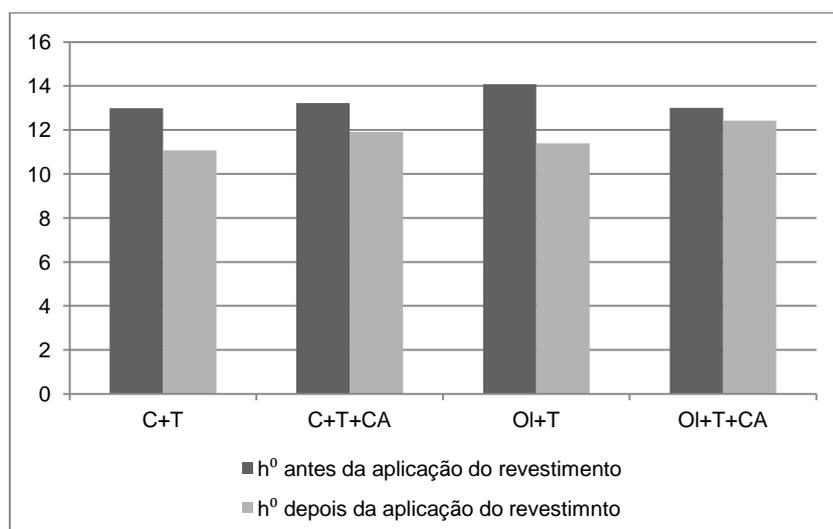


Figura 46 - Valores de matiz de cor (h°) das amostras de cereja antes e depois da aplicação dos quatro revestimentos (C+T, C+T+CA, OI+T, OI+T+CA).

Tabela 49 - Resumo dos valores de p-value, obtidos no teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores de matiz da cor (h°).

Amostra	<i>p-value</i>
C+T antes da aplicação	0,516
C+T depois da aplicação	
C+T+CA antes da aplicação	0,884
C+T+CA depois da aplicação	
OI+T antes da aplicação	0,131
OI+T depois da aplicação	
OI+T+CA antes da aplicação	0,999
OI+T+CA depois da aplicação	

Anexo IX: Resultados da análise estatística realizada a alguns parâmetros avaliados durante e o ensaio de conservação da cereja

Tabela 50 - Resumo dos valores de *p-value* obtidos a partir do teste post-hoc de ANOVA, Tukey, relativamente à análise dos valores médios de tensão de perfuração (MPa).

		<i>P-value</i>							
Amostras		Tempo de Conservação (dias)							
		1	4	7	10	15	20	22	28
CT	C+T	0,623	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,999
	C+T+CA	0,999	1,000	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	OI+T	0,766	0,673	0,124	1,000	1,000	1,000	0,973	1,000
	OI+T+CA	0,271	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	1,000	1,000
C+T	C+T+CA	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,834
	OI+T	1,000	1,000	0,946	0,999	0,993	1,000	0,999	0,640
OI+T	OI+T+CA	1,000	0,999	0,979	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabela 51 – Resumo dos valores de *p-value*, obtidos no teste post-hoc de ANOVA de Scheffé, relativamente à determinação do grau brix (%).

		P-values							
Amostras		Tempo de Conservação (dias)							
		1	4	7	10	15	20	22	28
CT	C+T	1,000	0,263	1,000	1,000	0,000	0,000	0,994	0,913
	C+T+CA	0,000	0,006	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
	O+T	0,000002	0,006	0,088	0,088	0,001	0,000	0,00002	0,0000
	O+T+CA	1,000	0,000002	0,370	0,370	0,741	0,000	0,039	0,001
C+T	C+T+CA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,990
	O+T	0,000	1,000	0,088	0,088	0,0001	0,000007	0,370	0,000
O+T	O+T+CA	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,999	0,000

Anexo X: Resumo dos resultados obtidos na prova sensorial

Tabela 52 - Resumo dos valores médios atribuídos pelos provadores às amostras de cereja para os diferentes atributos, nos dias 1 e 10 do ensaio de conservação.

Aspetto Geral								
	Homogeneidade da cor		Intensidade da cor		Percepção do revestimento		Brilho	
	dia 1	dia 10	dia 1	dia 10	dia 1	dia 10	dia 1	dia 10
OI+T	3,4	3,9	3,3	3,8	4,5	4,5	3,1	2,0
OI+T+CA	3,1	3,4	3,3	3,6	4,4	4,8	3,0	2,3
C+T	3,6	3,9	3,4	3,8	4,3	4,9	2,1	1,6
C+T+CA	4,5	4,0	3,9	4,0	2,6	3,9	2,4	1,7
CT	4,0	5,3	3,3	5,3	1,2	1,0	4,0	4,8

Gosto						
	Ácido		Doce		Estranho	
	dia 1	dia 10	dia 1	dia 10	dia 1	dia 10
OI+T	2,1	2,3	3,6	3,1	1,5	1,6
OI+T+CA	1,8	2,6	3,1	3,4	1,7	1,6
C+T	2,8	2,8	2,8	2,6	1,5	1,9
C+T+CA	2,3	2,8	3,1	2,9	1,5	2,1
CT	2,4	2,2	2,2	3,4	1,4	1,2

Outros				
	Apreciação Global		Intenção de compra	
	dia 1	dia 10	dia 1	dia 10
OI+T	3,3	3,2	2,8	2,7
OI+T+CA	3,1	2,9	2,8	3,0
C+T	3,1	2,7	3,1	2,6
C+T+CA	3,7	2,7	3,7	2,6
CT	3,9	4,7	3,6	4,7