

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA UTILIZANDO
DIFERENTES SOLVENTES**

Camila dos Santos Oliveira

Orientador: Enio Nazaré Oliveira Junior

Ouro Branco

Dezembro/2014

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA UTILIZANDO
DIFERENTES SOLVENTES

Camila dos Santos Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João Del-Rei.

Orientador: Enio Nazaré Oliveira Junior

Ouro Branco

Dezembro/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA UTILIZANDO
DIFERENTES SOLVENTES**

Camila dos Santos Oliveira

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Enio Nazaré Oliveira Junior – Orientador

Bruna Mara Aparecida Carvalho

Marília Magalhães Gonçalves

Ouro Branco, __/__/__

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por me guiar a todo o momento, permitindo conquistar essa vitória. Aos meus pais Alípio e Eliana, por acreditarem em mim e ser a minha base. Ao meu irmão Fábio pelos momentos de alegria e amizade. Ao meu namorado Guilherme pelo amor, atenção e incentivo nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Enio pelos ensinamentos, paciência, confiança e principalmente pela enorme contribuição para a realização deste trabalho.

À Banca Examinadora, pela leitura atenta, cuidados e disponibilidade com que conduziram a conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de curso por compartilharem o conhecimento, as vitórias e dificuldades durante toda a minha trajetória; especialmente aos meus amigos Jessica, Débora, Juliana, Diego, Rita, Tatiana, Thayane e Augusto.

Aos amigos que fiz em Ouro Branco pela amizade.

À toda a minha família, vós, tios, primos, em especial o Tio Lúcio e minha prima Paula que não mediram esforços em me ajudar no TCC. À Dindinha pela atenção e carinho. À Vó Maria pelas orações.

Às meninas da República Relicário pelas conversas, apoio, amizade, enfim, por se tornarem irmãs de coração.

Às minhas amigas de Entre Rios, Ana Paula, Elissa e Lívia, que mesmo distantes se fazem presentes.

Ao Samuel, Paula, Priscila, Wesley, Gicele, José Luiz, Thamara e Rafael pela valiosa ajuda.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar filmes de quitosana utilizando diferentes solventes, ácido acético, ácido cítrico e ácido láctico, além de realizar o teste in vivo dos revestimentos de quitosana em laranjas. Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, sólidos totais, permeabilidade ao vapor d'água e propriedades mecânicas. Posteriormente, aplicou-se os revestimentos de quitosana em laranjas e avaliou-se a perda de massa fresca e o crescimento de micro-organismos. A propriedade antimicrobiana dos revestimentos de quitosana não pôde ser observada uma vez que a metodologia não considerou que o *Penicilium digitatum* infecta os frutos por meio de ferimentos, assim, este não se desenvolveu em laranjas sadias. Os filmes de quitosana produzidos com ácido cítrico apresentaram maiores valores de espessura e sólidos totais, os quais influenciaram na diminuição da permeabilidade ao vapor d'água. Quanto às propriedades mecânicas, os filmes de ácido acético se mostraram mais resistentes que os de ácido láctico, seguidos pelos de ácido cítrico e os filmes de ácido láctico mostraram-se mais plásticos seguidos dos filmes de ácido cítrico e ácido acético, respectivamente. Assim como na cinética de permeabilidade ao vapor d'água, no teste in vivo o filme de ácido cítrico se destacou, uma vez que proporcionou uma menor perda de massa fresca das laranjas. Porém, cada filme apresentou características particulares que podem ser interessantes para diferentes aplicações, ou seja, não há como determinar qual o melhor filme sem realizar uma análise detalhada específica para determinado fruto. Enfim, pode-se dizer que o solvente utilizado na produção de filmes de quitosana influencia nas características destes, merecendo uma atenção especial.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura da quitina e da quitosana.....	13
Figura 2 – Fórmula estrutural do ácido cítrico.....	16
Figura 3 – Fórmula estrutural do ácido acético.....	16
Figura 4 – Fórmula estrutural do ácido láctico.....	17
Figura 5 – Bolor verde.....	20
Figura 6 – Fotomicrografia de bolor <i>Penicillium digitatum</i> mostrando conidióforos e esporos.....	21
Figura 7 – Cultivares de laranja.....	23
Figura 8 – Soluções de quitosana com os diferentes ácidos, ácido acético, ácido cítrico e ácido láctico.....	24
Figura 9 – Filme de quitosana após a secagem.....	25
Figura 10 – Experimento de permeabilidade ao vapor d'água montado.....	26
Figura 11 – Laranjas utilizadas no experimento.....	28
Figura 12 – Laranjas recobertas com filme de quitosana.....	29
Figura 13 – Laranjas penduradas para a secagem do revestimento de quitosana.....	30
Figura 14 – Disposição das laranjas em bandejas após a secagem.....	31
Figura 15 – Cinética de permeabilidade ao vapor d'água realizada durante 3 dias. As figuras a, b, c e d mostram, respectivamente, os dias 0, 1, 2 e 3.....	34
Figura 16 – Laranjas revestidas com o filme de quitosana produzido com ácido láctico no dia 0 (a) e após 15 dias (b).....	36

Figura 17 – Cinética de perda de massa fresca.....	36
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparativo das características associadas aos revestimentos comestíveis	15
Tabela 2 – Características da amostra de quitosana utilizada no experimento.....	24
Tabela 3 – Características dos filmes de quitosana utilizando diferentes solventes.....	32
Tabela 4 – Propriedades mecânicas dos filmes de quitosana utilizando diferentes solventes.....	34
Tabela 5 – Perda de massa fresca.....	37

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivo Geral	11
2.1.Objetivo específico.....	11
3. Revisão Bibliográfica	12
3.1.Quitina e quitosana.....	12
3.2.Revestimentos comestíveis.....	14
3.3.Solventes utilizados para a produção de filmes de quitosana.....	15
3.4.Quitosana no biocontrole de micro-organismos fitopatógenos.....	17
3.5.Senescência e respiração em frutos.....	19
3.6.Bolor verde.....	21
3.7.Laranja.....	23
4. Metodologia	24
4.1.Amostra de quitosana.....	24
4.2.Produção de filmes de quitosana.....	24
4.3.Espessura do filme.....	25
4.4.Sólidos totais.....	26
4.5.Permabilidade ao vapor de água.....	26
4.6.Propriedades mecânicas.....	27
4.7.Teste in vivo.....	28
5. Resultados e discussão	32
6. Conclusão	38
7. Referências Bibliográficas	39

1. Introdução

A quitosana é um biopolímero obtido da quitina, a qual é o maior componente estrutural dos exoesqueletos de invertebrados e da parede celular de fungos. Esta pode ser encontrada também, em maior abundância, em carapaças de crustáceos, como camarão e caranguejo (PAGNONCELLI, 2008). A produção de quitosana se baseia na desacetilação da quitina por hidrólise básica, ou seja, o que diferencia a quitosana da quitina é o grau de acetilação (JANEGITZ *et al.*, 2007). O termo quitosana se refere a copolímeros formados por unidades monoméricas de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicose (ou D-glicosamina), ligadas linearmente por ligações glicosídicas β -1,4, em diferentes graus de polimerização e acetilação (PAGNONCELLI, 2008);(ASSIS, 2010).

O que torna a quitosana tão atrativa é seu amplo espectro antimicrobiano, que juntamente com suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, se mostra particularmente interessante para aplicações na agricultura, medicina, meio ambiente e alimentos (ASSIS, 2010). Ela pode atuar como agente antimicrobiano, conservante alimentício (filmes comestíveis), material médico e biomédico, promotor do crescimento de plantas, membranas de separação, adsorventes em cromatografia de afinidade, adsorventes de metais, dentre outros (PAGNONCELLI, 2008).

A solubilidade da quitosana se dá apenas em pHs próximos ao seu pKa ($\sim 6,3$), formando um polímero catiônico pela protonação dos grupos amino que, ao ser vertido sobre uma superfície apolar, resulta em filmes de quitosana após a evaporação do solvente. Esses filmes apresentam razoáveis propriedades mecânicas, sendo avaliados como potenciais materiais para revestir frutos e hortaliças, formar cartilagens e tecidos artificiais e como membranas de separação e complexação de íons de metais tóxicos em meio aquoso (ASSIS, 2010). Uma vez que cada fruta ou hortaliça apresenta características próprias de amadurecimento, a aplicação de diferentes tipos de revestimento, bem como a concentração ideal, vem sendo muito pesquisada com o intuito de desenvolver o revestimento mais favorável ao aumento da vida de prateleira (LUVIELMO; LAMAS, 2012). Diversos trabalhos, como (BARBOSA, 2012) e (LUVIELMO; LAMAS, 2012), mostram um aumento do tempo de armazenamento de frutos e hortaliças após serem revestidos por filmes de quitosana, promovendo a

regulação de trocas gasosas e redução de perdas por transpiração. Esses fatores retardam o amadurecimento dos frutos e hortaliças.

No caso de frutas não climatéricas, como exemplo a laranja, o amadurecimento só ocorre se o fruto estiver ligado à planta. Assim, após a colheita, ocorre o aumento da atividade respiratória, de forma reversível, sem reflexo no amadurecimento (CAVALINI, 2008). Nesses tipos de fruta, a utilização de revestimentos comestíveis de quitosana pós-colheita não irá influenciar no amadurecimento, porém, pode atuar no controle de micro-organismos fitopatógenos, uma vez que a quitosana apresenta propriedades antimicrobianas.

Antes de testes *in vivo* é importante observar as características dos filmes de quitosana. Estes podem ser caracterizados quanto a diversos parâmetros, como por exemplo, espessura, sólidos totais, permeabilidade ao vapor d'água e propriedades mecânicas. A espessura é um parâmetro que influencia nas propriedades dos filmes. Ela é utilizada para avaliar a homogeneidade, para definir a uniformidade dos materiais, para a repetibilidade das medidas das propriedades e validade das comparações entre estas (RIGO, 2006). Os sólidos totais também são essenciais para a reprodutibilidade dos resultados. Quanto à permeabilidade, os filmes precisam apresentar valores menores uma vez que muitos produtos requerem embalagens que sejam barreira ao vapor de água para evitar ganho ou perda de umidade, visto que a migração de vapor é um dos principais fatores de alteração da qualidade sensorial, características organolépticas, microbiológicas e físico-químicas, bem como da estabilidade de estocagem. (CHEN, 1995). Para descrever as propriedades mecânicas dos filmes, a resistência à tração (RT) e alongamento são parâmetros mais frequentemente utilizados. A RT é a força de tensão máxima que um filme pode sustentar. O alongamento mostra a capacidade que o filme possui de esticar antes do rompimento (ASTM, 2008). Então, para encontrar um filme ideal, é necessário um estudo detalhado, observando todos esses parâmetros.

2. Objetivo Geral

Estudar, produzir e caracterizar filmes de quitosana utilizando diferentes solventes: ácido cítrico, láctico e acético. Realizar o teste *in vivo* em laranjas.

2.1. Objetivo específico

Caracterizar os filmes de quitosana quanto à espessura, sólidos totais, permeabilidade ao vapor d'água e propriedades mecânicas. Avaliar os revestimentos de quitosana nas laranjas, analisando a perda de massa fresca e a incidência do mofo verde causado pelo fungo *Penicillium digitatum*.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Quitina e Quitosana

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Ela pode ser encontrada no exoesqueleto de invertebrados, na parede celular de fungos e, principalmente, na carapaça de crustáceos. Por ser a biodegradação da quitina um processo lento, o acúmulo de descartes do processamento de crustáceos se tornou um problema para indústrias que processam produtos marinhos, uma vez que é preciso descartar esses resíduos sem prejudicar a natureza. Para contornar este problema, um dos meios de agregar valor à quitina é a produção da quitosana, a qual é um biopolímero muito atrativo para diversos processos industriais (PAGNONCELLI, 2008).

A quitosana é um polissacarídeo linear de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicose (ou D-glicosamina) obtido através da desacetilação da quitina (Figura 1). Durante a reação de obtenção da quitosana, os grupamentos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a quitosana (COSTA, 2009). Então, pode-se dizer que o diferencial da quitosana em relação à quitina é a presença de grande quantidade de grupamentos amino disponíveis para reações químicas. Tais grupamentos podem adquirir carga positiva ao entrar em contato com soluções ácidas, possibilitando a solubilização da quitosana em ácidos orgânicos (MOURA *et al.*, 2006).

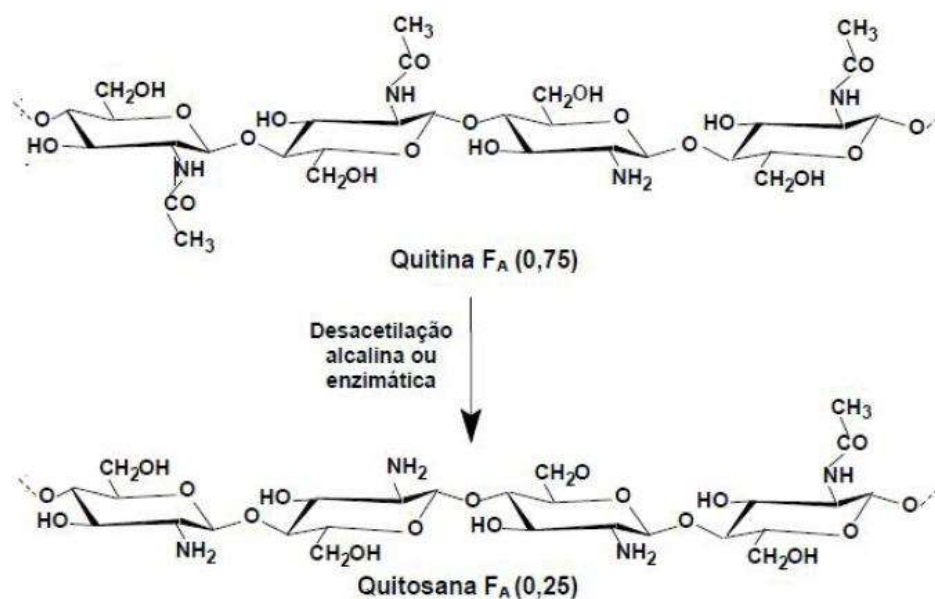


Figura 1 – Estrutura da quitina e da quitosana (COSTA, 2009).

A quitosana é o único polímero catiônico pseudonatural com capacidade de ser empregue como gel, solução, fibra ou filme. Associado a estas características, podem-se enumerar diversas propriedades deste biopolímero, como: formação de estruturas porosas, função de barreira, atividade antimicrobiana, bioatividade, hidrofiliçidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, compatibilidade biológica e propriedades de adsorção (BARROS, 2008).

Uma vez que apresenta inúmeras propriedades interessantes, a quitosana pode ser aplicada em uma gama de processos, sendo as principais áreas de atuação: agricultura (mecanismos defensivos, adubo para plantas), tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, redução de odores), indústria alimentícia (fibras dietéticas, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, hidratante capilar, creme dental) e área biomédica (suturas cirúrgicas, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos, encapsulamento de materiais) (AZEVEDO *et al.*, 2007).

3.2.Revestimentos comestíveis

Pesquisas que visam o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para a redução das perdas pós-colheita são fundamentais para a economia nacional, uma vez que elevam a competitividade e procuram atender às qualidades de um mercado cada vez mais exigente. No Brasil, a taxa de perdas pós-colheita de frutas e hortaliças está em torno de 35 – 40%, sendo uma das maiores do mundo. São aproximadamente 10 milhões de produtos colhidos e não consumidos. Os procedimentos de conservação pós-colheita estão centrados na cadeia de frio e em boas práticas de armazenamento. Contudo, um novo segmento tecnológico vem se destacando nesta área, é o desenvolvimento de coberturas comestíveis protetoras que são aplicadas diretamente sobre o fruto, ocasionando um aumento do tempo de prateleira (ASSIS; BRITO; FORATO, 2009).

Os revestimentos comestíveis atuam principalmente como barreira a gases e vapor de água, modificando a atmosfera interna dos frutos, diminuindo a degradação e aumentando a vida de prateleira dos mesmos, além de atuarem também como carreadores de compostos antimicrobianos, antioxidantes, entre outros. O revestimento ideal para alimentos não deve interferir na aparência natural da fruta, deve possuir boa aderência a fim de evitar sua remoção facilmente no manuseio e não podem provocar alterações nas características organolépticas do produto. As propriedades mecânicas dos revestimentos comestíveis são tão importantes como as de barreira. Eles devem apresentar resistência à quebra e abrasão, para proteger a estrutura do alimento, e flexibilidade para se adaptar à possível deformação do alimento sem se romper. Além dessas características, os revestimentos são biodegradáveis, ajustando-se ao ecossistema e evitando a poluição ambiental. Os compostos mais utilizados na elaboração de revestimentos comestíveis são proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares), polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato e carragena), lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou a combinação destes compostos, o que permite utilizar vantajosamente as distintas características funcionais de cada classe (LUVIELMO; LAMAS, 2012). A Tabela 1 apresenta as características de diferentes revestimentos comestíveis.

Tabela 1 – Comparativo das características associadas aos revestimentos comestíveis.

Revestimentos a base de	Tipos	Características
Polissacarídeos	Fécula de mandioca	Boa resistência às trocas gasosas
	Alginato	Boa resistência a danos mecânicos
	Quitosana	Manutenção da integridade da parede celular
		Retenção de Vitamina C
Lipídios		Barreira à incorporação de solutos
		Propriedades fungicidas e fungiestáticas
Proteínas	Óleo de Girassol	Redução na perda de massa
	Cera de Carnaúba	Aumento do tempo de armazenamento
	Gelatina	Manutenção sensorial e propriedades físico-químicas
	Proteínas do soro de leite	Redução do escurecimento enzimático

Fonte: (LUVIELMO; LAMAS, 2012).

3.3.Solventes utilizados para a produção de filmes de quitosana

O ácido cítrico, acético e láctico são considerados seguros, em determinadas concentrações, para serem aplicados como aditivo alimentar de acordo com a FDA (Food and Drug Administration) (FDA). O ácido cítrico (ácido 2-Hidroxi-1,2,3–propanotricarboxílico), $C_3H_5O(COOH)_3$, é um sólido cristalino branco, inodoro, de sabor levemente ácido, massa molecular 192,13 g/mol, ponto de fusão 153 °C e

temperatura de decomposição térmica de 175 °C. Uma vez que é um ácido orgânico fraco, encontrado em frutas cítricas, é usado como conservante natural (antioxidante). O ácido cítrico é um acidulante versátil e tem como características alta solubilidade, ação sequestrante de íons metálicos, o que previne reações indesejáveis de oxidação, formação de cor e de aromas em produtos alimentícios (MORAIS, 2007). A Figura 2 apresenta a fórmula estrutural do ácido cítrico.

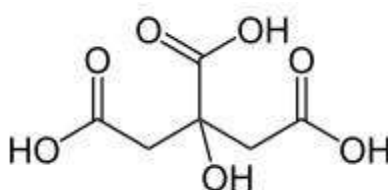


Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido cítrico.

O ácido acético, também chamado de ácido etanóico, $C_2H_4O_2$, é um líquido incolor em temperatura ambiente. Ele apresenta um cheiro característico, é solúvel em água, sendo o ácido carboxílico mais conhecido. Seu ponto de fusão é 16,7°C, ponto de ebulição 118,1 °C e massa molar 60,05 g/mol. Ele é produzido geralmente por meio de fermentação, isto é, por meio da oxidação do etanol na presença de bactérias. O ácido acético é um ácido fraco empregado em diversas áreas, como: produção de tempero, tinturaria, perfumaria, produção de corantes, dentre outros. Vale ressaltar, que este ácido também é o principal componente do vinagre (FOGAÇA, 2014). Sua formula estrutural está apresentada abaixo na Figura 3.

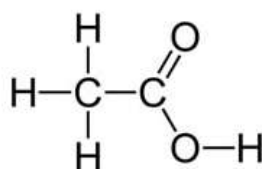


Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido acético.

O ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico), $C_3H_6O_3$, é um dos ácidos mais amplamente distribuídos na natureza e um dos principais ácidos formados durante os processos fermentativos naturais (SCANDOLARA et. al., 2012). Possui cor cristalina e é solúvel em água. Seu ponto de fusão é $16,8^{\circ}C$, seu ponto de ebulição $122^{\circ}C$ e sua massa molar $90,08\text{ g/mol}$. A sua produção se dá através da fermentação da lactose pela bactéria *Streptococcus lactis*. Devido à sua propriedade acidulante, este ácido é muito utilizado na indústria alimentícia e de bebidas. Ele também é conhecido pela sua propriedade umectante, sendo requisitado na indústria de cosméticos. Além disso, possui aplicações na medicina, fabricação de polímeros, indústria de tecidos, dentre outros (CARDOSO, 2014). A Figura 4 mostra sua fórmula estrutural.

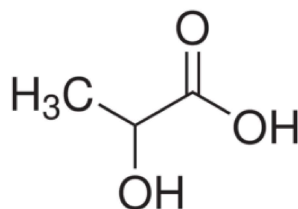


Figura 4 – Fórmula estrutural do ácido láctico.

3.4. Quitosana no controle de micro-organismos fitopatógenos

Os frutos durante o final do seu desenvolvimento e após o período de colheita apresentam reduzida resistência natural ao ataque de patógenos, sendo susceptíveis a manifestação de infecções quiescentes e ao aumento da incidência e severidade das doenças. Esse declínio da resistência natural pode ser consequência do aumento dos requerimentos nutricionais do patógeno, da diminuição na produção dos compostos antifúngicos pré-formados e de fitoalexinas e do aumento da ativação dos fatores de patogenicidade dos fungos (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Os fungos fitopatógenos são responsáveis por consideráveis perdas pós-colheita, uma vez que os frutos apresentam um ambiente favorável a ação destes micro-organismos, devido ao seu baixo pH, elevado teor de umidade e composição de

nutrientes. Os fungos patógenos que se destacam por causar doenças superficiais e destruição dos tecidos são: *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e *Colletotrichum gloeosporioides*. O ataque destes fungos a frutos reduz a qualidade e vida em prateleira, tornando-os menos atrativos ou não comercializáveis (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Para reduzir as perdas, métodos físicos, químicos e biológicos vêm sendo empregados. A aplicação de fungicidas sintéticos (método químico) é a principal medida para reduzir a incidência de doenças pós-colheita em frutos. Os pesticidas também são muito utilizados durante a pré-colheita, e, são eficientes na redução de podridões pós-colheita. Entretanto, o uso destes compostos provoca a resistência por parte dos fungos. Uma alternativa emergente tem sido o uso de protetores naturais, como a quitosana (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

A quitosana pode aumentar a síntese de compostos antifúngicos na planta como fitoalexinas e enzimas hidrolíticas como quitinases e glucanases, induzindo a resistência natural das plantas. Além disso, ela é capaz de formar um filme semipermeável que pode aumentar a vida útil pós-colheita de frutas e hortaliças. Esse filme possui ação antifúngica e antibacteriana, modifica a atmosfera ao redor do produto vegetal, regula a perda de umidade, a respiração do produto, atrasa o seu amadurecimento, induz a capacidade antioxidante e mantém o conteúdo fenólico final do fruto, melhorando a sua preservação pós-colheita (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

O mecanismo de ação da quitosana sobre os micro-organismos não está completamente elucidado, mas há várias teorias. Uma delas relaciona a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície negativamente carregada dos micro-organismos, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana, o que resulta na perda de componentes intracelulares com consequente inibição microbiana (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). Também se sugere que a quitosana induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células dos fungos causando estresse oxidativo e, consequentemente danos aos principais componentes da célula (proteínas, lipídios, DNA e outros). A interação da quitosana com o DNA da célula fúngica também é uma hipótese, o que pode alterar a conformação do DNA e inibir a síntese de mRNAs e proteínas (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Camilli et al. (2007) confirmaram que *Botrytis cinerea*, agente causal do Mofo Cinzento em uvas, foi afetado pela quitosana em testes *in vitro*, a qual reduziu a germinação de esporos, alterou a morfologia do tubo germinativo e diminuiu o crescimento miceliano do fungo em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Benhamou (2004) relatou que frutos cítricos tratados com quitosana com posterior inoculação de *Penicilium digitatum*, apresentaram o desenvolvimento da doença marcadamente reduzido comparando com a amostra controle (sem quitosana). Observações histológicas confirmaram a restrição da colonização pelo patógeno e pronunciada desorganização de sua hifa, tornando-a completamente destorcida e agregada.

3.5.Bolor verde

As doenças de pós-colheita podem ser separadas em duas categorias de acordo com sua infecção inicial. Para as frutas cítricas, as infecções quiescentes ou de pré-colheita incluem as podridões pedunculares, antracnose e podridão negra; e infecções típicas de pós-colheita incluem o bolor verde, bolor azul e podridão azeda. A ocorrência e severidade das podridões estão diretamente relacionadas ao clima, variedades, práticas culturais e práticas pós-colheita (FISCHER, 2007).

O bolor verde, Figura 5, é a principal doença pós-colheita dos citros e está disseminada em todos os países produtores, afetando todas as espécies e cultivares cítricas (TOFFANO, 2005). Danos em pós-colheita decorrentes de *P. digitatum* e *P. italicum* podem representar mais de 90% do total durante as fases de transporte, armazenamento e comercialização (FISCHER, 2007).



Figura 5 – Bolor verde.

O bolor verde é uma podridão mole dos frutos com posterior cobertura da lesão pelo micélio branco e por uma grande quantidade de esporos verdes produzidos pelo fungo, que chegam a cobrir todo o fruto. O primeiro estágio da doença é caracterizado pelo surgimento de uma mancha circular mole de aspecto encharcado e pela ligeira descoloração da superfície afetada. O segundo estágio compreende o aparecimento do micélio branco na superfície do fruto e o desenvolvimento, no centro do micélio, de uma massa de esporos verdes. Em temperaturas favoráveis, em torno de 24°C, em menos de 2 dias a lesão alcança as vesículas de suco. Ao redor dos esporos verdes, há uma faixa de micélio branco e, externamente a ela, uma região enrugada na casca de consistência macia. Os esporos maduros se soltam facilmente do fruto, sendo dispersos com facilidade pelo manuseio, agitação ou exposição dos frutos a correntes de ar. Em condições de baixa umidade, os frutos murcham e mumificam e sob condições de alta umidade, outros fungos e bactérias desenvolvem-se na lesão e o fruto apodrece rapidamente (FISCHER, 2007).

O *Penicilium digitatum* é o fungo causador do bolor verde. Os conídios, esporos assexuais, são produzidos em cadeia, sendo denominados esporos catenulados, variando na forma e no tamanho, mesmo sendo originários do mesmo cordão de esporos. Este fungo produz enzimas capazes de dissolver a lamela média dos tecidos infectados de frutos, provocando podridão mole. Eles sobrevivem, saprofiticamente, em pomares e outros ambientes, sobre vários tipos de substratos orgânicos na forma de conídios e infectam os frutos por meio de ferimentos (TOFFANO, 2005). A Figura 6 apresenta uma micrografia do fungo *Penicillium digitatum*.



Figura 6 – Fotomicrografia de bolor *Penicillium digitatum* mostrando conidióforos e esporos (BRAUN, 2014).

3.6.Senescência e respiração em frutos

O processo de respiração é fundamental no amadurecimento dos frutos, pois várias reações acopladas a ele dão origem a pigmentos, compostos fenólicos e fito hormônios, além de influenciarem na longevidade das frutas pós-colheita (CAVALINI, 2008). Frutos e vegetais, após serem colhidos, continuam a respirar, transpirar e produzir hormônios de amadurecimento, alterando o equilíbrio inicial, ou seja, ocorre uma variação das concentrações de dióxido de carbono, oxigênio, água e etileno ao longo da estocagem. Sob condições ideais, a maioria das plantas, incluindo os frutos, respira aerobicamente, promovendo a quebra de carboidratos advindos da fotossíntese. A queima desses compostos ricos em energia constitui atividades metabólicas conhecidas e são usadas na formação de ATP. O processo respiratório das plantas consiste na utilização do oxigênio da atmosfera como aceptor de elétrons no processo de fosforilação e consequente liberação de dióxido de carbono. Após a colheita do fruto, ocorre uma interrupção neste balanço gasoso, onde há alto influxo de oxigênio com Proporcional perda do CO₂. Nesta condição, as células internas param de ser renovadas

e a respiração aumenta, resultando em uma queda metabólica que leva o fruto a um gradual amadurecimento (ASSIS; BRITO; FORATO, 2009).

Os revestimentos formam uma cobertura parcial dos estômatos e lenticelas e assim, reduzem a transpiração e a respiração. No início da maturação, ocorre considerável aumento na produção de etileno, no qual o O_2 faz parte da reação, ou seja, reduzindo-se a permeação de oxigênio para o interior do fruto diminuirá a produção de etileno, permitindo a prolongar o tempo de prateleira deste. Deve-se atentar que uma redução de entrada de O_2 pode possibilitar o crescimento de organismos anaeróbios. Portanto, os revestimentos precisam apresentar permeabilidade ao oxigênio, mesmo que pouca. Esse dado varia de acordo com o fruto empregado (ASSIS; BRITO; FORATO, 2009).

Os frutos podem ser classificados em climatéricos e não climatéricos, de acordo com o padrão de sua respiração e produção de etileno durante o processo de amadurecimento (SANTELLI, 2005). Frutos climatéricos são caracterizados por apresentarem aumento na produção de CO_2 acompanhado de um pico autocatalítico de produção de etileno, sendo este necessário para coordenar e completar o amadurecimento (CAVALINI, 2008). Estes frutos às vezes são colhidos ainda verdes, podendo ser armazenados sob refrigeração para retardar o amadurecimento e aumentar o seu período de conservação. Formas de armazenamento que diminuam a temperatura ou aumentem a concentração de CO_2 ou diminuam a concentração de O_2 no ambiente são capazes de reduzir a produção de etileno e suprimir o pico de respiração climatérica, aumentando a vida após a colheita dos frutos. Já os frutos não climatéricos não apresentam picos de evolução de CO_2 e etileno (SANTELLI, 2005). Estes frutos só amadurecem se estiverem ligados a planta (CAVALINI, 2008). Um exemplo são as frutas cítricas (*Citrus spp.*), como laranjas, limas e limões, elas são capazes de responder ao estímulo do etileno exógeno com um aumento reversível da sua taxa de respiração, porém este não é necessário para o amadurecimento dos frutos. A sequência do amadurecimento destes frutos é lenta e, normalmente, sua respiração se mantém em declínio até a senescência, ou seja, a intensidade de sua respiração é alta após a colheita do fruto e vai diminuindo com o tempo (SANTELLI, 2005).

3.7.Laranja

Dentre os cítricos, a laranja é a fruta mais popular e pode ser dividida em dois grupos: laranjas doces e as amargas, sendo as primeiras as mais consumidas em todo o mundo. Os tipos mais comuns são laranja-pera, laranja-bahia, laranja-da-terra, laranja-lima e laranja-seleta, esses e outros cultivares estão apresentadas na Figura 7. O fruto apresenta formato variável de acordo com a variedade, casca de coloração alaranjada, envolvendo uma polpa aquosa de coloração que pode variar a amarelo-clara a vermelha. As sementes são arredondadas e achatadas, de coloração verde esbranquiçada (SOARES, 2006).

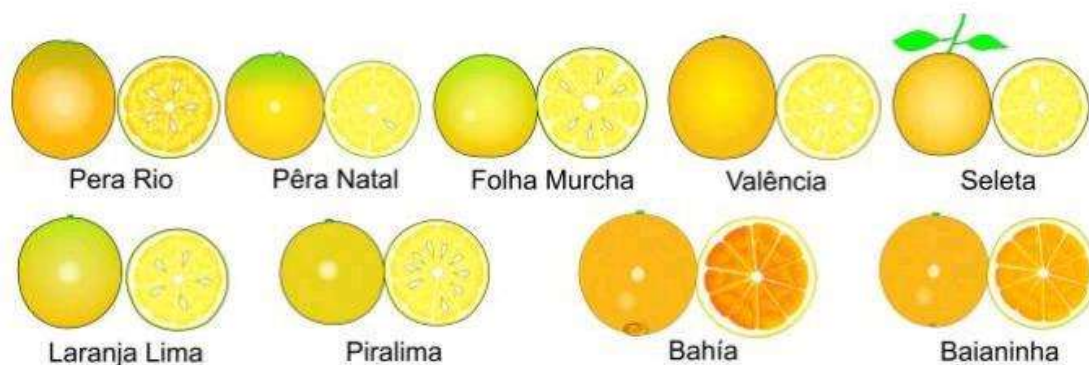


Figura 7 – Cultivares de laranja (TEZZOTO; SOUZA; FILHO, 2014).

Apesar da variedade, o conteúdo nutricional é muito próximo entre os diferentes tipos de laranja, elas são ricas em vitamina C, fontes de potássio e magnésio, além de betacaroteno. Esses nutrientes têm ação antioxidante e ajudam a prevenir problemas cardiovasculares e câncer (NESTLE, 2014).

A laranja é uma fruta não climatérica, assim, deve permanecer na planta até atingir a fase de maturação, uma vez que não ocorrem modificações nos parâmetros físicos e químicos pós-colheita (SANTELLI, 2005).

4. Metodologia

4.1. Amostra de quitosana

A amostra de quitosana, cedida pela empresa PRIMEX, apresentou as seguintes características conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Características da amostra de quitosana utilizada no experimento.

Lote	Viscosidade (cP)	Grau de desacetilação (%)
TM3425	463	92

4.2. Produção de filmes de quitosana

As soluções de quitosana 1% foram preparadas utilizando, respectivamente, solução de ácido acético 1%, solução de ácido láctico 1% e solução de ácido cítrico 1% (Figura 8).



Figura 8 - Soluções de quitosana com os diferentes ácidos, ácido acético, ácido cítrico e ácido láctico.

Após o preparo das soluções de quitosana estas foram filtradas sob vácuo utilizando papel de filtro. Para a produção dos filmes, 180 mL de cada solução foram depositados em placas de vidro retangulares. Os filmes foram mantidos em repouso à temperatura ambiente até secarem completamente, Figura 9. Todos os três experimentos foram realizados em triplicata.



Figura 9 - Filme de quitosana após a secagem.

4.3.Espessura do filme

A espessura dos filmes de quitosana foi medida aleatoriamente em 5 posições dos mesmos, com o auxílio de um micrômetro. A espessura dos filmes foi a média dessas medidas, as quais foram analisadas com o teste de média de Tukey com 95 % de confiança.

4.4. Sólidos totais

Os filmes produzidos foram cortados em tamanhos conhecidos e pesados em balança analítica. As massas obtidas foram divididas pela área do filme em questão, obtendo-se os teores de sólidos totais em $\text{g} \times \text{m}^{-2}$. Após a obtenção destes valores, realizou-se o teste de média de Tukey com 95% de confiança.

4.5. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos foi determinada através de um método gravimétrico. Em frascos de 50 mL colocou-se 10 g de sílica gel azul, lacrou-se com os filmes de quitosana e estes foram pesados em uma balança analítica. Os frascos foram depositados dentro de um dessecador no qual continha 200 mL de solução salina de cloreto de cálcio 10% (m/v), juntamente com um termohigrômetro para a medição da umidade e temperatura (Figura 10).



Figura 10 - Experimento de permeabilidade ao vapor d'água.

O dessecador foi mantido em uma BOD a temperatura de 30°C. A umidade dentro do dessecador foi de 75%. Durante três dias os frascos foram retirados e pesados. Após a obtenção dos dados, calculou-se a taxa de permeabilidade ao vapor d'água das amostras, dividindo-se a diferença da massa pelo número de dias e pela área do vidro, obtendo os valores em $\text{g} \times \text{dia}^{-1} \times \text{m}^{-2}$. O diâmetro do vidro é igual a 20,9 mm. Para encontrar a permeabilidade ao vapor d'água, utilizou-se a seguinte equação:

$$PVA = \frac{TPVA \cdot e}{p \cdot \frac{UR_e}{100}}$$

Onde:

PVA = Permeabilidade ao vapor d'água ($\text{g} \times \mu\text{m} \times \text{m}^{-2} \times \text{dia}^{-1} \times \text{mmHg}^{-1}$);

TPVA = Taxa de permeabilidade ao vapor d'água ($\text{g} \times \text{dia}^{-1} \times \text{m}^{-2}$);

e = Espessura do filme (μm);

p = Pressão de vapor de água pura a 30 °C (mmHg);

UR_e = Umidade relativa (75%).

Realizou-se o teste de média de Tukey com 95% de confiança utilizando os valores da taxa de permeabilidade ao vapor d'água e os valores de permeabilidade ao vapor d'água.

4.6. Propriedades mecânicas

As propriedades de tração e alongamento dos filmes foram medidas conforme o método padrão D882-02 (ASTM, 2002) em um analisador de textura (Stable Microsystems, modelo TATX2i, Inglaterra) com célula de carga de 1 kN. Primeiramente, cortou-se as amostras em tiras (100 x 25 mm) e a separação inicial entre as garras foi de 50 mm com velocidade de 50 mm/min. A resistência a tração foi calculada dividindo a carga máxima pela área da seção transversal do filme. Já o

alongamento na ruptura foi calculado pela relação percentual entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial padrão, na ruptura. Testaram-se cinco corpos de prova para cada filme em duplicata. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Embalagens do Departamento de Ciência de Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras.

4.7. Teste *in vivo*

Para a realização do teste *in vivo* utilizaram-se laranjas Pera, as quais foram cultivadas sem defensivos agrícolas. Todas as laranjas foram colhidas com pedúnculo para facilitar a imersão no filme, conforme mostrado na Figura 11. Primeiramente as laranjas foram lavadas com água. Depois foram deixadas de molho em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 20 minutos para a desinfecção. E então foram lavadas com água novamente.



Figura 11 - Laranjas utilizadas no experimento.

Preparou-se 200 mL de cada solução de quitosana 1% (m/v) utilizando, respectivamente, solução de ácido acético 1% (v/v), solução de ácido láctico 1% (v/v) e solução de ácido cítrico 1% (m/v). As laranjas foram imersas nas soluções e suspensas pelo pedúnculo em uma grade para a secagem, conforme mostrado nas Figuras 12 e 13.



Figura 12 – Laranjas recobertas com filme de quitosana.



Figura 13 – Laranjas suspensas para a secagem do revestimento de quitosana.

Quarenta laranjas foram utilizadas para a realização dos experimentos *in vivo*, sendo que 10 laranjas foram tratadas com quitosana (1% m/v) em ácido acético (1% v/v), 10 laranjas com quitosana (1% m/v) em ácido láctico (1% v/v), 10 laranjas com quitosana (1% m/v) em ácido cítrico (1% v/v) e 10 laranjas sem tratamento (controle). Após a secagem, as laranjas foram retiradas da grade e dispostas em bandejas, como mostrado na Figura 14. As laranjas foram numeradas e pesadas.



Figura 14 – Disposição das laranjas em bandejas após a secagem.

Para avaliar os efeitos dos revestimentos de quitosana contra os fitopatógenos, inoculou-se 10 μL de uma suspensão de esporos do fungo *Penicillium digitatum* na casca de todas as laranjas. A cepa do fungo foi gentilmente cedida pela mestrande Thamara Carvalho Coutinho. O inóculo foi feito próximo à numeração das laranjas para facilitar a observação do desenvolvimento do fungo. As laranjas foram mantidas em uma BOD a 25°C e observadas durante 25 dias para analisar se os filmes foram eficazes na inibição do fungo. As laranjas também foram pesadas durante 15 dias para a obtenção da perda de massa.

5. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da caracterização dos filmes de quitosana quanto aos sólidos totais, a espessura e a permeabilidade ao vapor d'água são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Características dos filmes de quitosana utilizando diferentes solventes.

Filmes	Sólidos Totais (g x cm ⁻²)	Espessura (mm)	Taxa de permeabilidade ao vapor d'água (g x dia ⁻¹ x m ⁻²)	Permeabilidade ao vapor d'água (g x µm x m ⁻² x dia ⁻¹ x mmHg ⁻¹)
Ácido cítrico	0,0074 ± 0,00063 ^a	0,055 ± 0,004 ^a	507,44 ± 19,71 ^a	1.118,40 ± 95,24 ^a
Ácido acético	0,0037 ± 0,00055 ^b	0,035 ± 0,0005 ^b	597,70 ± 13,71 ^b	834,94 ± 15,87 ^b
Ácido láctico	0,0045 ± 0,0012 ^b	0,050 ± 0,0013 ^c	606,86 ± 8,43 ^b	1.201,60 ± 26,92 ^a

^{a-c} Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Os filmes de quitosana produzidos com ácido cítrico apresentaram maiores valores de espessura, $0,055 \pm 0,004$ mm, seguido dos filmes produzidos com ácido acético ($0,035 \pm 0,0005$ mm) e ácido láctico ($0,050 \pm 0,0013$ mm). Assim como a espessura, o teor de sólidos totais é essencial para a reprodutibilidade dos experimentos e, de acordo com os resultados, os filmes de quitosana produzidos com ácido cítrico apresentaram o maior valor de sólidos totais ($0,0074 \pm 0,00063$ g x cm⁻²). O teor de sólidos totais dos filmes produzidos com ácido láctico foi em média $0,0045 \pm 0,0012$ g x cm⁻² e o com ácido acético foi de $0,0037 \pm 0,00055$ g x cm⁻².

De acordo com Mali *et al.* (2004), a taxa de permeabilidade dos filmes biodegradáveis está associada à disponibilidade de grupos hidroxilas para ligação com a

água e quanto maior for a disponibilidade maior será a permeabilidade dos mesmos. Os filmes produzidos com ácido láctico apresentaram maior valor de taxa de permeabilidade ao vapor d'água, $606,86 \pm 8,43 \text{ g x dia}^{-1} \text{ x m}^{-2}$, este comportamento pode ser explicado devido ao fato de o ácido láctico possuir uma hidroxila a mais em sua estrutura se comparado com o ácido acético, e a sua não volatilidade faz com que ele permaneça na estrutura do filme atuando como um plastificante, contribuindo, conseqüentemente, para o aumento da TPVA (Cuq et al., 1997). Moura *et al.* (2013), também observou que filmes produzidos com ácido láctico apresentaram maiores valores de TPVA se comparado com os filmes preparados com ácido acético. Mas no presente experimento os valores de TPVA foram próximos de acordo com o teste de média de Tukey. Já os filmes produzidos com ácido cítrico, $(507,44 \pm 19,71 \text{ g x dia}^{-1} \text{ x m}^{-2})$, não apresentaram esse comportamento mesmo possuindo um maior número de hidroxilas disponíveis, o que foi ocasionado provavelmente pelos maiores valores de espessura e sólidos totais deste filme, os quais influenciam diretamente na taxa de permeabilidade ao vapor d'água. A permeabilidade ao vapor d'água considera a espessura dos filmes, pressão de vapor, umidade relativa e a taxa de permeabilidade ao vapor d'água, assim, os filmes de ácido cítrico apresentaram um valor médio de $1.118,40 \pm 95,24 \text{ g x } \mu\text{m x m}^{-2} \text{ x dia}^{-1} \text{ x mmHg}^{-1}$, que é bem próximo do valor encontrado para os filmes de ácido láctico $1.201,60 \pm 26,92 \text{ g x } \mu\text{m x m}^{-2} \text{ x dia}^{-1} \text{ x mmHg}^{-1}$, considerando o erro. Os filmes de ácido acético apresentaram baixa permeabilidade ao vapor d'água se comparado com os outros filmes, $834,94 \pm 15,87 \text{ g x } \mu\text{m x m}^{-2} \text{ x dia}^{-1} \text{ x mmHg}^{-1}$. A Figura 15 ilustra experimento de permeabilidade ao vapor d'água, no qual se pode observar a mudança de coloração da sílica gel, indicando o aumento da umidade (quanto mais rosa, mais umidade permeou o filme).

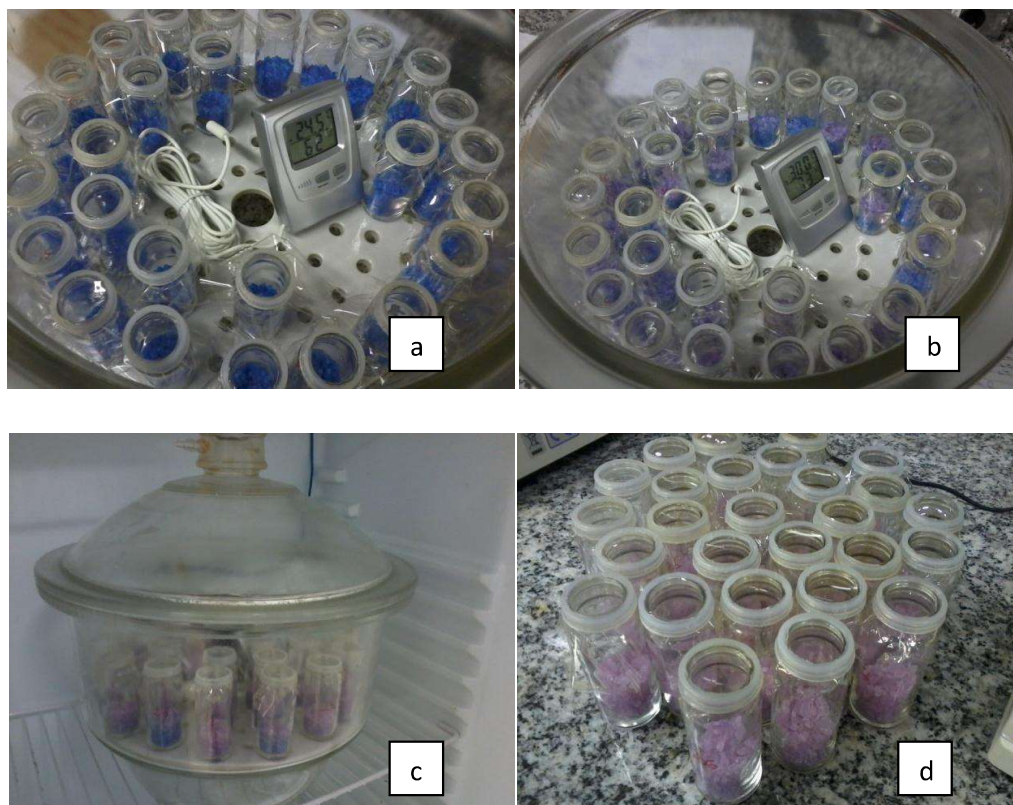


Figura 15 – Experimento de permeabilidade ao vapor d’água realizado durante 3 dias.

As Figuras a, b, c e d mostram, respectivamente, os dias 0, 1, 2 e 3.

Os resultados obtidos nos testes mecânicos dos filmes estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Propriedades mecânicas dos filmes de quitosana utilizando diferentes solventes.

Amostra	Resistência a tração (MPa)	Alongamento (%)
Ácido cítrico	$30,84 \pm 6,14^c$	$6,86 \pm 3,35^c$
Ácido acético	$121,35 \pm 19,70^a$	$3,46 \pm 0,69^a$
Ácido láctico	$64,93 \pm 20,69^b$	$10,76 \pm 3,69^b$

^{a-c} Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Os filmes de quitosana produzidos com ácido acético apresentaram maior RT ($121,35 \pm 19,70$ MPa) comparativamente aos filmes de quitosana produzidos com ácido láctico ($64,93 \pm 20,69$ MPa) e ácido cítrico ($30,84 \pm 6,14$ MPa), que apresentaram diferença significativa a $p \leq 0,05$. Quanto à propriedade de alongamento (AL), pode-se observar na Tabela 4 que os filmes produzidos com ácido láctico ($10,76 \pm 3,69\%$), estiraram mais que os filmes de ácido cítrico ($6,86 \pm 3,35\%$), seguidos pelos filmes de ácido acético ($3,46 \pm 0,69\%$). Os resultados mostraram que os filmes de ácido acético são mais resistentes que os de ácido láctico, seguidos pelos de ácido cítrico. Quanto a plasticidade, os filmes de ácido láctico mostraram maiores valores, seguido dos filmes de ácido cítrico e ácido acético, respectivamente. Moura *et al.* (2013) também observou essa diferença na resistência e plasticidade de filmes com ácido acético e láctico. Dependendo da aplicação do filme, sobretudo na área de alimentos, pode-se usar um tipo de filme ou outro dependendo do tipo de alimento a ser tratado ou dependendo da resistência ou plasticidade que se deseja.

As laranjas foram observadas durante 25 dias e não houve crescimento de fungos. Ao analisar a literatura, observou-se que o *Penicilium digitatum* infecta as laranjas por meio de ferimentos e isso não foi considerado no experimento (as laranjas não apresentavam ferimentos), assim, este fato explica a ausência do bolor verde nas laranjas após este tempo.

A cinética de perda de massa foi realizada durante 15 dias. A Figura 16 apresenta o antes e depois das laranjas revestidas com filme de quitosana produzido com ácido láctico e a Figura 17 apresenta as curvas obtidas para cada grupo de laranjas.

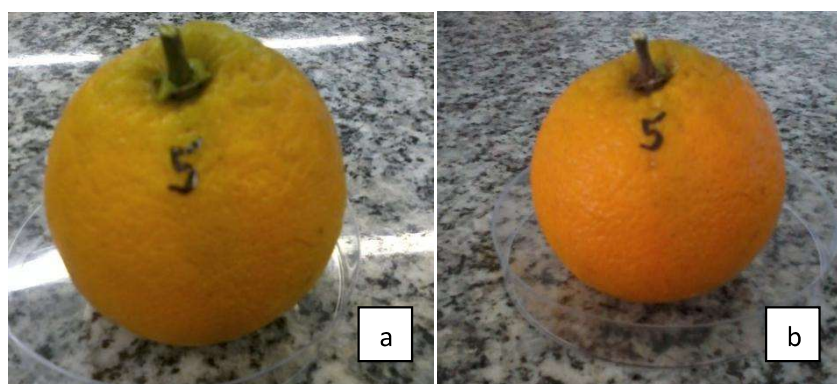


Figura 16 – Laranjas revestidas com o filme de quitosana produzido com ácido láctico no dia 0 (a) e após 15 dias (b).

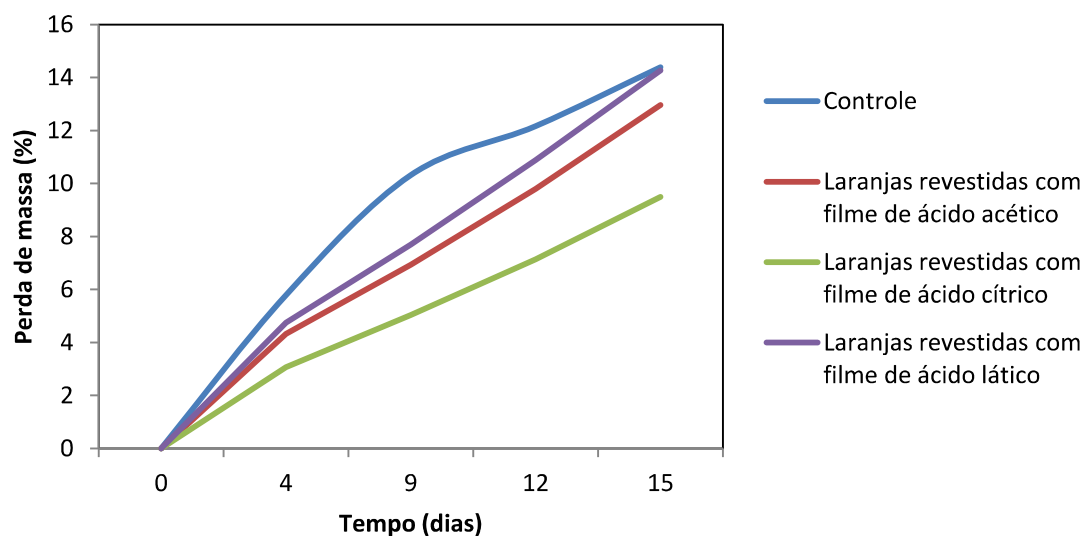


Figura 17 – Perda de massa (%) em função do tempo (dias) de armazenamento.

Na Tabela 5 se encontram os resultados, em porcentagem, da perda de massa de laranjas após 15 dias de análise.

Tabela 5 – Perda de massa (%) após 15 dias de armazenamento.

Amostra	Perda de massa fresca (%)
Controle	$14,4 \pm 1,4$
Ácido cítrico	$9,5 \pm 2,5$
Ácido acético	$12,9 \pm 2,5$
Ácido láctico	$14,3 \pm 1,9$

O experimento *in vivo* de perda de massa apresentou um comportamento similar ao experimento *in vitro* de permeabilidade ao vapor d'água. As amostras controle apresentaram uma maior perda de massa ($14,4 \pm 1,4\%$), seguida pelas laranjas revestidas com filme de ácido láctico ($14,3 \pm 1,9\%$), ácido acético ($12,9 \pm 2,5\%$) e ácido cítrico ($9,5 \pm 2,5\%$). Visualmente, a perda de massa fresca foi imperceptível, as laranjas da Figura 16, assim como as outras, apenas apresentaram mudança na coloração no decorrer destes dias. Ao se analisar os parâmetros, pode-se dizer que o filme de

quitosana que apresentou características mais interessantes para a redução de perda de massa fresca foi o filme produzido com ácido cítrico, uma vez que este se mostrou mais espesso, com um teor maior de sólidos totais, o que influenciou diretamente na diminuição da sua permeabilidade. Assim, ao utilizar este filme, foi possível diminuir aproximadamente 5% da perda de massa de laranjas. Esse valor pode parecer pouco, mas para feirantes, que deixam muitas laranjas em bancas por alguns dias até sua venda, pode fazer diferença na qualidade e na massa das laranjas tratadas. Porém, para a escolha do revestimento ideal para um determinado fruto é necessário realizar análises mais detalhadas como acidez titulável, teor de vitamina C, dentre outros. Assim, não temos dados suficientes para escolher um filme que seja bom em todos os aspectos para aplicar em laranjas, entretanto, conforme descrito anteriormente, o filme a base de citrato de quitosana mostrou-se mais interessante no que diz respeito a diminuição da PVA.

6. Conclusão

Conclui-se que o tipo de ácido utilizado como solvente influenciou nas propriedades dos filmes de quitosana. Quanto à espessura, sólidos totais e taxa de permeabilidade ao vapor d'água, o filme produzido com ácido cítrico apresentou valores maiores e assim, ao revestir as laranjas, proporcionou uma menor perda de massa se comparado com os ácidos láctico e acético. Quanto às propriedades mecânicas, os filmes de ácido acético e ácido cítrico se destacaram. Os filmes de ácido acético se mostraram mais resistentes que os de ácido láctico e ácido cítrico. Já os filmes de ácido láctico foram mais elásticos, seguidos dos filmes de ácido cítrico e ácido acético. Como cada fruto apresenta características particulares de amadurecimento, é necessário realizar análises pós-colheita mais detalhadas, para selecionar um revestimento que aumente o tempo de prateleira do fruto em questão. Mas, considerando apenas as propriedades de barreira, o filme de ácido cítrico é mais indicado na diminuição da perda de massa de laranjas. A propriedade antimicrobiana dos filmes não pôde ser observada, uma vez que a metodologia não considerou que o *Penicilium digitatum* infecta os frutos por meio de ferimentos, assim, este não se desenvolveu em nenhuma das laranjas controle e tratadas.

7. Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, R. B.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C. M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.10, n.5, p. 260 -274, fev./mai., 2009.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*, ASTM 882-02. Philadelphia, 2002.

ASSIS, O. B. G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de hmds. *Química Nova*. São Paulo, v. 33, n. 3, p. 603 – 606, 2010.

ASSIS, O. B. G.; BRITO, D.; FORATO, L.A. O Uso de Biopolímeros como Revestimentos Comestíveis Protetores Para Conservação de Frutas in natura e Minimamente Processadas. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 1º Ed, 23 f. 2009.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: Aplicações como biomateriais. *Revista eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, n. 3. P 27 – 34, nov./dez., 2007.

B. BRAUN. Disponível em:
<http://www.terapiainfusionalsegura.com.br/cps/rde/xchg/hc-terapiainfusionalsegura-pt-br/hs.xsl/7249.html>. Acesso em: 12 de novembro de 2014.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.12, n.4, p. 195 – 215, fev./jun., 2011.

BARBOSA, J. Q. *Conservação pós-colheita de mamão ‘sunrise solo’ com uso de quitosana*. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco. 2012.

BARROS, M. C. G. *Revestimentos Funcionais de base quitosano – Desenvolvimento de aplicações para a indústria do calçado*. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Bragança. 2008.

BENHAMOU, N. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the casual agent of Green mold: a comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology*, Lancaster, v.94, n.7, p. 693 – 705, 2004.

CAMILI, E.C. BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, p. 215-221, 2007.

CARDOSO, M. L. Ácido láctico. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/quimica/acido-latico/>>. Acesso em: 07 de novembro de 2014.

CAVALINI, F. C. *Fisiologia do amadurecimento, senescência e comportamento respiratório de goiabas 'Kumagai' e 'Pedro Sato'*. 2008. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

CHEN, H. Functional properties and application of edible films made of Milk protein. *Journal of Dairy Science*, Savoy. v. 78, n. 11, p. 2563 – 2583, 1995.

COSTA, C. S. *Coberturas à base de quitosana na qualidade pós-colheita de morangos cv. Aromas*. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2009.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 622-626, 1997.

FDA. Disponível em: <<http://www.fda.gov/default.htm>>. Acesso em: 05 de novembro de 2014.

FISCHER, I. H. *Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica em packinghouses e na ceagesp-SP*. 2007. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

FOGAÇA, J. R. V. Ácido acético. Disponível em: <<http://www.alunosonline.com.br/quimica/acido-acetico.html>>. Acesso em: 07 de novembro de 2014.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de água residuárias. *Química Nova*, São Carlos, v. 30, n. 4, p. 879 – 884, 2007.

LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 8 – 15, 2012.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 56, n. 2, p. 129-135, 2004.

MORAIS, A. S. *Cristalização de ácido cítrico: Otimização operacional*. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2007.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. *Vetor*, v. 16, p. 37 – 45, 2006.

MOURA, J.M.; RODRIGUES, D.A.S.; FARIAS, B.S.; DIAS, J.S.; MOURA, C.M.; PINTO, L.A.A. Avaliação de filmes de quitosana produzidos com diferentes solventes. In: Encontro Nacional de Tecnologia Química, 6., 2013, Maceió. *Resumos...* Maceió: Centro de Convenções, 2013.

NESTLE. Disponível em:
<<https://www.nestle.com.br/Site/cozinha/enciclopedia/ingredientes/laranja.aspx>>.
Acesso em: 10 de novembro de 2014.

PAGNONCELLI, M. G. B. *Estudo do mecanismo de produção de oligossacarídeos com atividades nutracêuticas a partir da quitosana por hidrólise enzimática com processo fermentativo simultâneo*. 2008. 118 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2008.

RIGO, L. N. *Desenvolvimento e Caracterização de filmes comestíveis*. 2006. 130 f. Dissertação (Engenharia de alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2006.

SANTELLI, P. *Fisiologia pós-colheita de frutos das palmeiras Syagrus oleracea (Mart.) Becc. E Mauritia vinifera Mart.* 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 2005.

SCANDOLARA, A.; GIONGO, R.; MARAN, M. H. S.; CARLI, E.M.; PALEZI, S. C. Descontaminação de carcaças suínas com ácidos orgânicos comerciais, solução salina acidificada e luz ultravioleta. *Unoesc & Ciência* – ACET, v. 3, n. 2, p. 157 – 166, jul./dez. 2012.

SOARES, B. P. A. S. Manejo do bolor verde em laranja com uso de quitosana. Janaúba, 2006.

TEZZOTO, J. V.; SOUZA, L. T. FILHO, B. B. Variedades de laranja de mesa comercializadas na CEAGESP. Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br/jnw/images/stories/servicodealimentacao/variedades/laranja.pdf>>. Acesso em: 10 de novembro de 2014.

TOFFANO, L. *Doenças pós-colheita em citros: potencial do Lentinula edodes, Agaricus blazei, ácido jasmônico, albedo (Citrussinensis var. Valência) e flavedo (Citrus aurantifolia var. Tahiti) no controle e na indução de resistência*. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.