



RODRIGO MARTINS FRÁGUAS

**TRATAMENTO PÓS-COLHEITA DE
GOIABAS PEDRO SATO COM QUITOSANAS**

LAVRAS - MG

2016

RODRIGO MARTINS FRÁGUAS

**TRATAMENTO PÓS-COLHEITA DE GOIABAS PEDRO SATO COM
QUITOSANAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Celeste Maria Patto Abreu

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Fráguas, Rodrigo Martins.

Tratamento pós-colheita de goiabas pedro sato com quitosanas /
Rodrigo Martins Fráguas. – Lavras: UFLA, 2016.
88 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Celeste Maria Patto Abreu.

Bibliografia.

1. Quitosana. 2. Revestimentos de Quitosna. 3. Pós-colheita. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

RODRIGO MARTINS FRÁGUAS

**TRATAMENTO PÓS-COLHEITA DE GOIABAS PEDRO SATO COM
QUITOSANAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 fevereiro de 2016.

Dra. Belami Cassia da Silva	IFSULDEMINAS
Dra. Denise Alvarenga Rocha	UFLA
Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima	UFLA
Dr. Paulo Sergio Castilho	UFLA

Dra. Celeste Maria Patto Abreu
Orientadora

LAVRAS – MG

2016

Ao meu amigo Henrique Patto e minha irmã Gisele
Sem vocês eu não teria voltado

Aos meu país por todo apoio e dedicação incondicional,
com vocês tive os melhores exemplos.

A minha orientadora, minha mãe Celeste, obrigado por ter aceitado o desafio de
me orientar, de puxar a minha orelha quando necessário e por sempre me apoiar
nos meus mais altos voos. Obrigado!

Aos meus queridos amigos, da minha cidade, de Ribeirão Vermelho, de Minas
Gerais, de Rondônia, do Rio de Janeiro, de Roma, do mundo!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo nos momentos difíceis, por me dar forças para superar as dificuldades, me mostrar o caminho certo e por suprir todas as minhas necessidades.

À professora Dra. Celeste Patto que, confiou em mim, me ensinou tantas coisas, me deu apoio, carinho e sempre esteve pronta a me ajudar. Não tenho palavras nem como demonstrar a minha imensa gratidão pela ótima convivência durante todos esses anos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida para a concretização deste curso.

Aos professores das disciplinas cursadas na UFLA, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e de Pós-graduação, que durante quatro anos sempre me apoiaram e estiveram prontos a ajudar sempre que precisei.

A amiga Xulita, ex-funcionária do laboratório de bioquímica pelo carinho que sempre me tratou, pelos ensinamentos e por toda a convivência, você sempre será inesquecível no laboratório de Bioquímica.

Finalmente, a CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa de estágio no exterior.

Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Muito obrigado!

Deus abençoe a todos!

RESUMO

A goiaba é uma das mais completas e equilibradas frutas no que diz respeito ao valor nutritivo. Altamente perecível, devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, tem vida útil que pode chegar de 3 até 5 dias sob temperatura ambiente. Vários métodos vêm sendo testados para prolongar o tempo de prateleira deste fruto, visto que hoje o Brasil é o maior produtor mundial de goiaba vermelha. Ela tem grande aceitabilidade no mercado europeu. Devido a sua útil curta, várias pesquisas têm sido realizadas, tentando aumentar seu tempo de armazenamento deste o fruto. A quitosana é um biopolímero que pode ser utilizada em revestimentos comestíveis de frutos na pós-colheita. Ela tem apresentado efeitos importantes em vegetais, tais como: controle de microrganismos patogênicos, ativações de várias respostas de defesa induzindo e/ou inibindo diferentes atividades bioquímicas durante a interação planta-patógeno e aumento do tempo de armazenamento de vegetais frescos, devido às suas propriedades filmogênicas. O presente trabalho produziu e caracterizou filmes produzidos a partir de 3 quitosanas que foram cedidas gentilmente pela Primex. Para a produção dos filmes os materiais foram caracterizados, por cromatografia de permeação em gel, grau de acetilação, análise térmica. Com os filmes prontos, estes foram submetidos análise de espessura, permeação de vapor de água, quantidade de sólidos por centímetro quadrado e resistência aparente. Foram utilizadas três quitosanas de diferentes massas molares, e os filmes foram produzidos na concentração de 0,25%, 0,5%, 1% e 1,5%, para cada quitosana. Após a caracterização dos filmes, as concentrações de 0,5 e 1%, foram escolhidas por apresentarem os melhores resultados e facilidade de manuseio, além dos resultados satisfatórios nos testes de permeação de vapor de água. Os frutos de goiabas foram então imersos em soluções de quitosana, na concentração de 0,5 e 1%, colocadas, para secar presas pelo pedúnculo e armazenadas por 8 dias em temperatura ambiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo utilizadas repetições de 9 frutos por tratamento. Os frutos tratados com quitosana apresentaram menor perda de massa, uma maior firmeza, menores quantidades de pectinas totais e pectinas solúveis, os tratamentos provocaram uma diminuição na atividade da enzima PME. A manutenção da coloração verde e aparência dos frutos foram sensivelmente observadas nos frutos revestidos em maior concentração. Menores teores de vitamina C, licopenos e beta-carotenos, compostos fenólicos totais, também foram observados, resultados sempre comparados ao grupo testemunha.

Palavras-chave: Quitosana. Revestimentos de Quitosna. Pós-colheita.

ABSTRACT

Guava is one of the most complete and balanced fruits, with respect to nutritional value. Highly perishable, due to its intense metabolism during ripening, it has a useful life that can reach 3 to 5 days at room temperature. Several methods have been tested to extend the shelf life of this product, since Brazil is currently the world's largest red guava producer. The European market receives the fruit with large acceptance rates, and research in this field has been trying to increase the useful life of this fruit. This study aimed to test edible coatings produced from chitosan. Chitosan is a biopolymer which has shown triple effect in the control treatment of pathogenic microorganisms, activation of various defense responses, inducing and/or inhibiting different biochemical activities during plant-pathogen interactions, and increase in plant storage time, due to filmogenic properties. This study produced and characterized films produced from 3 chitosans, which were kindly provided by Primex. For the production of films, the materials were characterized by gel permeation chromatography, degree of acetylation and thermal analysis. The films were then subjected to thickness analysis, water vapor permeation, amount of solids per square centimeter and apparent strength. Three chitosans with different molecular weights were used, and the films were produced at concentrations of 0.25%, 0.5%, 1% and 1.5% for each chitosan. The results of this study have already been published. With the results of the characterization of films, the concentrations 0.5 and 1%, were chosen, since they had the best results and ease of handling, in addition to satisfactory results in water vapor permeation tests. The guava fruit were then immersed in chitosan solutions, at concentrations of 0.5 and 1%, kept to dry by the peduncle and stored for 8 days at room temperature. The experimental design was completely randomized, and replicates of 9 fruits per treatment were used. The fruits treated with chitosan showed better results for texture, color, firmness, total pectin and soluble pectin, always with lower values than the control fruit.

Keywords: Chitosan. Chitosan coatings. Postharvest.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
	APRESENTAÇÃO	9
1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Objetivo geral	11
1.2	Objetivos específicos	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Aspectos Gerais da goiaba	13
2.2	Generalidades sobre o fruto da goiabeira	14
2.3	Filmes e revestimentos comestíveis	15
2.4	Quitina e quitosana	17
2.5	Atividade antimicrobiana de quitosanas e quitoligômeros	19
2.6	Quitosana como indutor dos mecanismos de respostas em plantas ...	21
2.7	Efeito de quitosana na qualidade pós-colheita de produtos vegetais ..	24
	REFERÊNCIAS	27
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	34
	ARTIGO 1 Preparo e Caracterização de Filmes Comestíveis de Quitosana	34
	ARTIGO 2 Storage of pedro sato guavas coated with low molecular weight chitosans	50
	ARTIGO 3 Changes in chemical and nutritional composition during storage of guavas coated with chitosan-based film	68

PRIMEIRA PARTE

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item “artigos” subsequente .

Cada artigo está estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão ou publicação do mesmo.

1 INTRODUÇÃO

O consumo *in natura* de goiaba (*Psidium guajava* L.) se justifica pelo seu valor nutritivo como fonte de vitamina C, fibras, minerais, sabor e aroma. A variedade Pedro Sato apresenta frutos grandes, de polpa vermelha, levemente ovalados, com casca rugosa e de cor amarelada quando madura, sendo considerado um fruto climatérico.

Por ser um fruto de intensa atividade metabólica, seu amadurecimento e senescência se dá em torno de 5 a 8 dias após a colheita. Essa característica acaba resultando em períodos muito curtos para comercialização, já chegando ao mercado um fruto pouco atraente. Por esse fato, é importante o estudo e adoção de técnicas que venham minimizar o intenso metabolismo desta fruta, visando à redução de perdas pós-colheita.

Dentro deste contexto, quitina e quitosana, derivados e quitoligômeros têm sido amplamente estudados e a existência de inúmeras patentes ou aplicações de patentes registradas, assim como o grande número de artigos científicos que têm sido publicados na literatura, refletem o grande potencial de aplicações destes polímeros, derivados e oligômeros. Levando em consideração a tendência mundial de preferência dos consumidores por alimentos sem defensivos agrícolas, a quitosana, entre outros compostos naturais, mostra-se uma substância alternativa no combate de fungos e bactérias, embora defensivos agrícolas sejam ainda usados extensivamente no controle destes microrganismos, sobretudo os fungicidas, empregados no controle de doenças pós-colheita de frutos. Quitosana comercial “ChitoClear®” produzido pela Primex ehf na Islândia é indicada pelo fabricante como produto antimicrobiano comestível usado como revestimento de frutos, cujos os tempos de armazenamento são prolongados. O produto “ChitoClear®” também é indicado no tratamento pré-colheita de plantas atuando na indução de respostas de defesa

das plantas e no tratamento de águas como floculante. Estudos pré e pós-colheita de vegetais têm mostrado que o versátil polímero quitosana apresenta triplo efeito no tratamento destes: controle de microrganismos patogênicos, ativações de várias respostas de defesa induzindo e/ou inibindo diferentes atividades bioquímicas durante a interação planta-patógeno e aumento do tempo de armazenamento de vegetais frescos, devido às propriedades filmogênicas da quitosana.

No presente trabalho foram produzidos e caracterizados filmes a partir de quitosanas de diferentes massas molares. Goiabas, do cultivar Pedro Sato, foram revestidas com as soluções das quais os filmes foram produzidos e suas alterações físicas e físico-químicas foram avaliadas por oito dias de armazenamento. O experimento foi conduzido à temperatura ambiente.

1.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar filmes de quitosanas de diferentes massas molares, para serem utilizados como revestimento comestível em goiaba cv. Pedro Sato, armazenados por 8 dias a temperatura ambiente, alterações físicas, físico-químicas e enzimática das goiabas revestidas foram avaliadas neste período.

1.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterização das amostras de quitosana;
- a) Determinação das massas molares médias viscosimétricas (M_v) e massas molares médias (M_w) por cromatografia de permeação em gel (GPC).
- b) Determinação dos graus de acetilação por titulação potenciométrica.

- c) Análise elementar
- d) Espectroscopia na região do infravermelho
- e) Análise térmica

2) Caracterização das propriedades dos filmes produzidos a partir de três amostras de quitosanas de diferentes massas molares;

- a) Produção dos filmes
- b) Determinação da espessura
- c) Espectroscopia na região do infravermelho
- d) Sólidos totais
- e) Permeabilidade ao vapor de água.

3) Monitoramento das modificações pós-colheita de goiabas do cultivar “PEDRO SATO”, tratadas com três amostras de quitosanas de diferentes massas molares em duas concentrações para cada amostra.

- a) Análises físicas (perda de massa, coloração da casca e firmeza)
- b) Análises físico-químicas e químicas (sólidos solúveis totais, acidez total titulável, Brix, pH, licopeno, beta-caroteno, fenólicos totais, vitamina C, pectina total e solúvel, IC. da PME)

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos Gerais da goiaba

A goiabeira é originária das Américas Central e do Sul e é caracteristicamente um fruto tropical, porém altamente adaptável a vários tipos de clima. Pertence à família *Myrtaceae*, que é composta por mais de 70 gêneros e 2.800 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e na Austrália (TODA FRUTA, 2013).

Atualmente, a goiaba é cultivada em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. O Brasil apresenta imensas áreas de clima e solo favoráveis à produção comercial da goiabeira, sendo esse aspecto importante não apenas pelo valor nutritivo da fruta, mas, também, pela perspectiva que representa no incremento da produção agrícola, na ampliação da atividade industrial e no potencial de exportação (TODA FRUTA, 2013).

O Brasil é maior produtor mundial de goiabas vermelhas; em 2012, a área ocupada com a cultura da goiabeira foi de 15.2 mil hectares, com uma produção de 345.747 toneladas. Dessa produção, 56% destinaram-se às indústrias e 44%, ao mercado de fruta “*in natura*”; a exportação é da ordem de 700 toneladas de produtos derivados da goiaba (MENDONÇA et al., 2007).

A produção concentrou-se principalmente nas Regiões Sudeste e Nordeste, sendo os Estados de São Paulo e Pernambuco os maiores produtores. Minas Gerais ocupa a terceira posição, com um aumento de 4% na produção, correspondendo a 15,513 quilogramas por hectare. As regiões Zona da Mata e Central de Minas Gerais, respondem juntas por 56% do volume produzido no estado.

A cultura da goiabeira no Brasil tem grande importância socioeconômica dada às suas amplas e variadas formas de utilização. É

produzida principalmente para o suco, polpa, geleia, conservas, sorvete, entre outros. Também é considerada uma fruta bastante atraente em razão de sua cor delicada e aroma agradável, além de ser uma das mais completas e balanceadas frutas (ABREU, et. al., 2012).

2.2 Generalidades sobre o fruto da goiabeira

Produtora do fruto chamado goiaba, folhas obovadas, utilizadas como antidiarreicas e de que se extrai óleo essencial, suas flores são pequenas e brancas. Seu fruto é em forma de bagas verdes ou amarelas, com polpa aromática, branca, rósea, avermelhada ou arroxeada, sendo muito consumidas *in natura* ou em compotas, doces, sorvetes e geleias. Também é conhecido pelos nomes de araçá-guaçú, araçaiá, araçá-mirim, araçauaçu, goiaba, goiabeira-branca, goiabeira-vermelho, guaiaba, guaiava, guava, guiba, mepera e pereira. É conhecida por ter muita vitamina C, apresentando a goiaba vermelha níveis dessa vitamina de 4 a 5 vezes superiores aos da laranja, possuindo também quantidades razoáveis de vitaminas A e do complexo B, além de sais minerais, como cálcio, fósforo e ferro (COLÉGIO SÃO FRANCISCO, 2010).

A goiaba é uma fruta que apresenta rápido amadurecimento após a colheita, sendo altamente perecível. Sua vida de prateleira pode variar entre 2 a 8 dias em temperatura ambiente (ABREU et al., 2012; CARVALHO, 1994; DURIGAN, 1997; GONATTI NETTO; GARCIA; ARDITO, 1996). Os principais fatores depreciadores da qualidade pós-colheita de goiabas são a rápida perda da coloração verde da casca (JACOMINO et al., 2000) e a elevada incidência de podridões (ALI; LAZAN, 1997), além de murchamento, perda de brilho e do amolecimento excessivo (BASSETO, 2002).

O amolecimento relacionado ao amadurecimento dos frutos é geralmente associado à desestruturação da lamela média e da parede celular

primária, que é composta por rígidas microfibrilas de celulose mantidas juntas por meio de redes de hemiceluloses e pectinas (PEREZ et al., 2011)

Há vários estudos relacionados à mudança nos teores de pectina durante o amadurecimento de goiaba, no entanto, as quantidades de pectinas (em torno de 2,4%) não parecem condizentes com a responsabilidade principal de manter a firmeza dos frutos (ABREU et al., 2012). São citados também na literatura, muitos estudos relacionados às enzimas envolvidas na degradação da parede celular de goiabas, entre as quais, pectinametilesterase e poligalacturonase. Na goiaba, a atividade dessas duas enzimas é bastante contraditória, havendo relatos tanto de aumento da atividade enzimática quanto de diminuição e também ausência de poligalacturonase (ABREU, 2010).

2.3 Filmes e revestimentos comestíveis

O uso de filmes ou coberturas comestíveis sobre a superfície de frutos para aumentar a conservação é uma técnica que data do século XIII, quando chineses aplicavam ceras para conservar cítricos em viagens marítimas. A partir de 1930, as ceras de abelha, parafina e carnaúba e os óleos mineral e vegetal foram usados na conservação de frutas. Já na década de 60, o uso de polissacarídeos solúveis em água se tornou mais estudado e opção comercial para o uso em coberturas comestíveis de frutos com a função de aumentar a vida útil destes (VILLADIEGO et al., 2005).

Os revestimentos ou coberturas não substituem as embalagens sintéticas não comestíveis, mas podem atuar como coadjuvantes, reduzindo o uso de embalagens descartáveis. Os materiais utilizados nas formulações podem ser comestíveis ou não, e são usados como filmes, os quais são pré-formados e aplicados sobre o produto ou são usados como cobertura, aplicada diretamente sobre o produto, formando uma camada fina e superficial (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Com a aplicação de revestimentos em frutas, tem-se a formação de uma cobertura com preenchimento parcial dos estômatos e lenticelas, reduzindo, dessa forma, a transferência de umidade (transpiração) e as trocas gasosas (respiração). Como o início do processo de maturação está estreitamente associado ao aumento na produção de etileno e, considerando que o O₂ é necessário para a sua produção, a redução da permeação do O₂ para o interior do fruto gerará uma correspondente redução na produção do etileno (responsável pelo amadurecimento), o que permite, em princípio, prolongar a vida do fruto (LUVIELMO; LAMAS, 2012).

O uso de revestimentos comestíveis podem apresentar vantagens, como reduzir a perda de água e o murchamento do fruto, retardar o amadurecimento, reduzir os danos causados pelo frio no armazenamento refrigerado, reduzir os danos mecânicos causados pelo manuseio e transporte, reduzir a deterioração, proporcionar brilho ou polimento aos frutos e ainda podem servir de veículo para ingredientes úteis, como compostos antimicrobianos, antioxidantes, absorvedores de etileno, corantes e aromatizantes (TOGRUL; ARSLAN, 2004).

As matérias primas dos revestimentos podem ser classificadas em:

- a) Polissacarídeos: amido e seus derivados, celulose e seus derivados, gomas, pectinas, entre outras;
- b) Proteínas: gelatina, caseína, glúten de trigo, entre outras;
- c) Lipídeos: ceras e ésteres de ácidos graxos, entre outras;
- d) Ou combinação dos mesmos.

Uma grande vantagem que também cabe salientar é a biodegradabilidade dos revestimentos comestíveis. Para que um material seja chamado de biodegradável, ele deve ser degradado completamente por microrganismos em compostos naturais, como CO₂, água, metano, hidrogênio e biomassa. Dessa forma, a utilização de revestimentos biodegradáveis poderá contribuir na redução do uso de fontes não renováveis, ajustando-se

perfeitamente no ecossistema e evitando a poluição ambiental (VILLADIEGO et al., 2005).

2.4 Quitina e quitosana

Os polímeros quitina e quitosana e quitoligômeros têm sido bastante estudados devido ao elevado potencial de aplicações em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas e na agricultura. As aplicações desses compostos em várias áreas, sobretudo a aplicação de quitosana, justifica-se pelo baixo custo de produção, a qual é produzida a partir dos descartes do processamento de crustáceos, fonte abundante e renovável. Em geral, quitosanas comerciais estão disponíveis nas faixas de massas molares entre 50 e 2.000 kDa e graus de acetilação (GA) entre 0,1 a 0,4 (REGE; BLOCK, 1999).

Os polímeros quitina e quitosana (Figura 1) são aminoglicopiranas compostas dos monômeros N-acetil-D-glicosamina (GlcNac) e D-glicosamina (GlcN) (Figura 2). Os polímeros podem ser caracterizados por suas solubilidades em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v). Quitina, contendo um número $\geq 40\%$ de GlcNac ($GA \geq 0,4$) é insolúvel, visto que os polímeros solúveis são chamados de quitosana (PETER, 2002a). Quitosana é composta de três grupos funcionais reativos, um grupo amino e dois grupos hidroxilas primário e secundário nas posições dos carbonos C-2, C-3 e C-6, respectivamente (FURUSAKI et al., 1996). Processos químicos e biotecnológicos estão sendo atualmente investigados para a produção de quitosana. Industrialmente a quitosana é produzida a partir da desacetilação alcalina de quitina (hidrólise alcalina), porém também pode ser obtida a partir da desacetilação enzimática de quitina, processo este investigado em pesquisas laboratoriais (Figura 1).

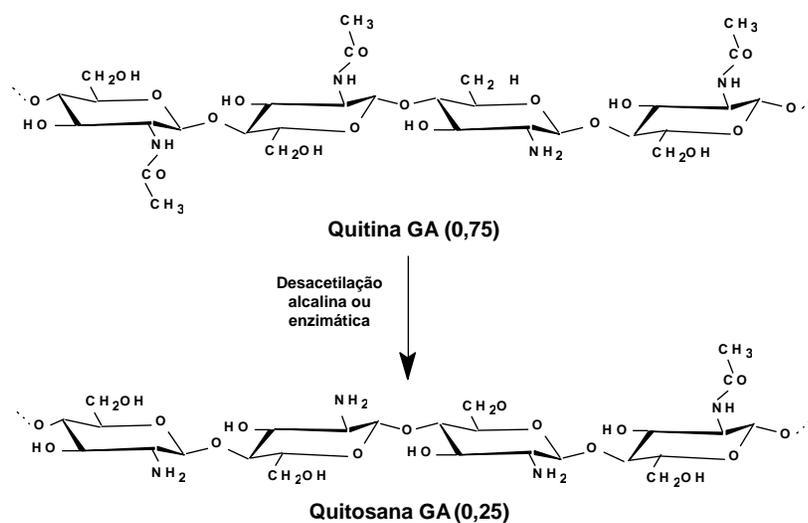


Figura 1 Estrutura de quitina e quitosana

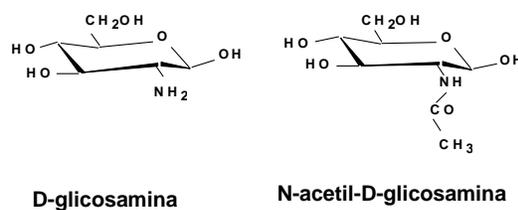


Figura 2 Estrutura dos monômeros D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina

O polímero quitina é também largamente encontrado em fungos, ocorrendo em *Basidiomicetos*, *Ascomicetos* e *Ficomcetos*, sendo um componente da parede celular e estrutural das membranas micelianas, hastes e esporos (PETER, 2002b). Os teores variam entre traços até 45% da fração orgânica e o restante é composto majoritariamente por proteínas, glucanas e mananas (ROBERTS, 1992). Porém, nem todos os fungos contêm quitina, a qual pode estar ausente em algumas espécies próximas a outras que contenham quitina como componente da parede celular (PETER, 2002b).

2.5 Atividade antimicrobiana de quitosanas e quitoligômeros

Após a descoberta da atividade antimicrobiana de quitosana e seus derivados por Allan e Hadwiger (1979), Kendra e Hadwiger (1984) e Uchida, Izume e Ohtakara (1989), muitos pesquisadores têm realizado estudos neste campo. Neste contexto, a atividade antimicrobiana de quitina, quitosana e seus derivados contra diferentes grupos de micro-organismos como bactérias gram-positivas e gram-negativas (CHANG et al., 1989; DARMADJI; IZUMIMOTO, 1994; DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004; LIU et al., 2004; NO et al. 2002; PAPINEAU et al., 1991; QI et al., 2004; SIMPSON et al., 1997; UCHIDA; IZUME; OHTAKARA, 1989; WANG, 1992; XIE et al., 2002) e fungos (Tabela 1) receberam considerável atenção.

Tabela 1 Efeitos da quitosana *in vitro* na inibição do crescimento de fungos

Fungo	Concentração de quitosana (% m/v)	Efeito	Autor
<i>A. alternata</i> , <i>B. cinerea</i> e <i>R. stolonifer</i>	0,075 a 0,6	Diminuição do crescimento radial	El Ghaouth et al. (1992a)
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,05 a 0,6	Redução do crescimento	Wade e Lamondia (1994)
<i>F. solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	1,2	Inibição completa	Hadwiger e Beckman (1980)
<i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	1,8	Inibição completa	Kendra e Hadwiger (1984)
<i>F. oxysporum</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>Penicillium digitatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	3	Inibição completa	Bautista-Baños et al. (2003) e Bautista-Baños, Hernández-López e Bosquez-Molina (2004)
<i>Mucor racemosus</i>	0,2	Redução de 73% do crescimento	Roller e Covill (1999)
<i>A. alternata</i>	0,01 a 0,08	Inibição completa	
<i>B. cinerea</i>	0,04 a 0,1	Inibição completa	Oliveira Junior (2006)
<i>P. expansum</i>	0,08	Redução do crescimento	Oliveira Junior et al. (2012) <i>In press</i>
<i>R. stolonifer</i>	0,01 a 0,02	Inibição completa	

Tabela 2 Efeito do revestimento de quitosana formado na superfície de frutos e hortaliças imersas pós-colheita^a em soluções ácidas de quitosana ou de frutos e plantas pulverizadas pré-colheita^b com quitosana. Os frutos, plantas e hortaliças foram inoculados com seus respectivos fungos patogênicos

Fruto, hortaliça ou planta	Fungo	Concentração de quitosana (% m/v)	Efeito (redução da doença%)	Autor
Morango ^a	<i>B. cinerea</i>	1,0 e 1,5	77	El Ghaouth et al. (1991b)
Morango ^a	<i>B. cinerea</i> e <i>R. stolonifer</i>	1,5	60	El Ghaouth et al. (1992b)
Cenoura ^a	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2,0 e 4,0	68	Cheah e Page (1997)
Planta de pepino ^b	<i>B. cinerea</i>	0,1	65	Ben-Shalom et al. (2003)
Morango ^b	<i>B. cinerea</i>	0,2 a 0,6	45 a 62	Bhaskara Reddy et al. (2000)
Mamão ^b	<i>C. gloeosporioides</i>	1,5	60	Bautista-Baños et al. (2003)

Na Tabela 2 são listados alguns estudos nos quais foram avaliados os efeitos dos revestimentos de quitosanas *in vivo* na superfície de frutos, hortaliças e plantas no controle de fungos fitopatogênicos.

2.6 Quitosana como indutor dos mecanismos de respostas em plantas

As ativações de várias respostas de defesa, induzindo e/ou inibindo diferentes atividades bioquímicas durante a interação planta-patógeno é outra importante propriedade do polímero quitosana. Os oligossacarídeos indutores mais estudados são os oligômeros de glucano, quitina, quitosana e de ácidos galacturônicos. Quando uma planta é atacada por um patógeno, rapidamente mecanismos de defesa são ativados no sítio infectado e uma variedade de respostas de defesas bioquímicas ocorre ao redor das células mortas. Dentre as respostas de defesas bioquímicas incluem-se, a produção de oxigênio reativo,

mudanças estruturais na parede celular, acúmulo de proteínas relacionadas à defesa e biossíntese de fitoalexinas (RABEA et al., 2003).

As habilidades estimuladoras de quitosanas nas respostas naturais de defesa de plantas foram extensivamente estudadas. Mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem em plantas, devido ao estímulo por quitosana, foram descritas em inúmeros estudos (BENHAMOU; LAFONTAINE; NICOLE, 1994; BENHAMOU; KLOEPPER; TUZUN, 1998; BENHAMOU; THÉRIAULT, 1992; BOHLAND et al., 1997; EL GHAOUTH et al., 1994, 1997; LA FONTAINE; BENHAMOU, 1996; PEARCE; RIDE, 1982; VANDER et al., 1998). Mudança fisiológica primária foi observada em plantas tratadas com quitosana, cujas aberturas dos estômatos foram diminuídas, o que dificulta o acesso fúngico no interior dos tecidos das folhas. Lee et al. (1999) observaram que células guarda em folhas de plantas, produzem H_2O_2 , que é um composto mediador do estímulo promovido por quitosana, que induz a diminuição das aberturas estomatais (Figura 3).

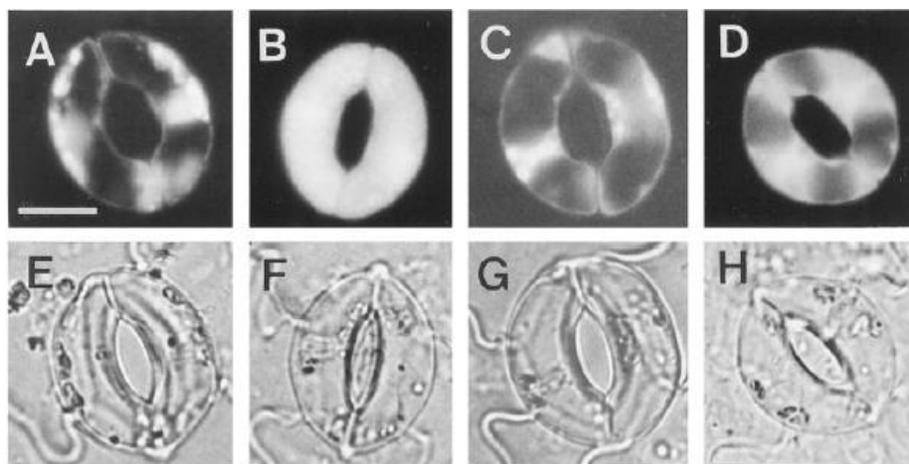


Figura 3 Indução da produção de H_2O_2 por quitosana nas células guarda em folhas de tomate. Pedacinhos epidérmicos de folhas de tomate sem quitosana (controles A e E) ou com tratamentos de 30 minutos somente com quitosana (B e F), com quitosana e catalase (C e G), ou com quitosana e ácido ascórbico (D e H). Microscopia de fluorescência são mostradas nas Figuras de A a D e microscopia óptica são mostradas nas Figuras de E a H. A barra em A é de $10\mu m$, e se aplica a todas as Figuras. Reproduzido de Lee et al. (1999)

Oligossacarídeos de quitosana estimularam o acúmulo de lignina, calose, fitoalexinas, e/ou inibidores de proteases em vários tecidos de plantas. O mecanismo de ação pelo qual quitosana induz esta lignificação tem sido estudado em diferentes tipos de plantas (LESNEY, 1990; VANDER et al., 1998).

Indução a várias enzimas relacionadas ao processo de defesa de plantas tem sido estudada. Estas enzimas participam dos mecanismos de defesa iniciais e previnem a infecção por patógenos. Oligômeros de quitina e quitosana foram associados ao estímulo de outros sistemas envolvidos na resistência, como as atividades de lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase e a formação de lignina em folhas de trigo (BOHLAND et al., 1997; VANDER et al., 1998).

2.7 Efeito de quitosana na qualidade pós-colheita de produtos vegetais

Produtos vegetais têm o tempo de armazenamento estendido quando revestidos com quitosana. A quitosana forma um filme semipermeável que regula as trocas gasosas e reduz as perdas por transpiração, conseqüentemente o amadurecimento do fruto é retardado. Diferentes frutos revestidos com quitosana, geralmente têm suas taxas de respiração e perdas de água reduzidas, dentre os quais, tomates, morangos, “longan”, maçãs, mangas, bananas e pimentas tipo sino “bell peppers” (DU; GEMMA; IWAHORI, 1997, 1998; EL GHAOUTH et al., 1991a,1992c; JIANG; LI, 2001; KITTUR; KUMAR; THARANATHAN, 2001). A eficácia de quitosana na redução da produção de CO₂ interno é descrito em tomates e pêras (DU et al., 1997; EL GHAOUTH et al., 1992c). Revestimentos de quitosana associado à temperatura de armazenamento podem estar associados com a redução da produção de CO₂. Pepinos e pimentas tiveram menores taxas de respiração a 13°C do que a 20°C (EL GHAOUTH et al., 1991a). Além da inibição de CO₂ resultante do revestimento de quitosana, a produção de etileno em frutos é também reduzida. Ambos os efeitos inibitórios foram observados em pêssegos e tomates revestidos com quitosana (EL GHAOUTH et al., 1992c; LI; YU, 2000). Frutos como morangos, framboesas, tomates, pêssegos, mamões e outros tiveram suas perdas de firmeza retardadas durante o armazenamento quando tratados com quitosana (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; EL GHAOUTH et al., 1991b, 1992c; LI; YU, 2000). Pulverizações de quitosana pré-colheita nas concentrações 2, 4 e 6 g/L⁻¹, em morangueiros não causaram fitotoxicidade e os frutos tratados com o tempo e temperatura de armazenamento se tornaram mais firmes que os não tratados (BHASKARA REDDY et al., 2000). Em geral, a degradação de antocianinas em frutos tratados com quitosanas é retardada, a qual foi demonstrada em lichia, morango e framboesa (LI; CHUNG, 1986; ZHANG;

QUANTICK, 1997, 1998). Porém, outro estudo relatou um efeito oposto ao descrito anteriormente, no qual é mencionado haver síntese de antocianinas em morangos tratados com quitosana (EL GHAOUTH et al., 1991b). Morangos, tomates e pêssegos tratados com quitosana após armazenamento, apresentaram maior acidez titulável comparada à dos frutos controle, enquanto outros frutos como mangas e “longan” tiveram acidez titulável reduzida lentamente (EL GHAOUTH et al., 1992c; LI; YU, 2000; JIANG; LI, 2001; SRINIVASA et al., 2002). Sólidos solúveis totais de frutos armazenados e tratados com quitosana diferiram de acordo com o tipo de fruto. Mangas e bananas revestidas com quitosana apresentaram menores teores de sólidos solúveis totais que os frutos não tratados, todavia maiores teores foram relatados em pêssegos tratados com quitosana. Em outro estudo foi observado não haver diferença nos teores de sólidos solúveis totais de mamões tratados e não tratados com quitosana (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; DU et al., 1997; KITTUR; KUMAR; THARANATHAN, 2001; SRINIVASA et al., 2002). Os teores de açúcar redutor de frutos é também afetado pelo revestimento de quitosana: menores teores de açúcar redutor foram observados em bananas tratadas com quitosana quando comparados a frutos não tratados, no final do período de armazenamento (KITTUR; KUMAR; THARANATHAN, 2001). Porém, relatos contraditórios a respeito dos teores de açúcar redutor de mangas tratadas com quitosana foram descritos na literatura. Uma provável explicação para isto poderia estar relacionado ao modo de aplicação de quitosana na superfície do fruto. No primeiro estudo, os frutos de mangueira foram embalados em caixas de papelão e cobertos com filme de quitosana, neste caso os teores de açúcares redutores foram maiores que os dos frutos controle, enquanto que no segundo estudo, os frutos de manga foram imersos em uma solução de quitosana, e estes frutos tiveram menores teores de açúcares redutores que os frutos controle (KITTUR; KUMAR; THARANATHAN, 2001; SRINIVASA et al., 2002) indicando que os

frutos imersos tiveram redução do metabolismo comparados aos frutos não tratados com quitosana. O teor de ácido ascórbico em mangas e pêssegos tratados com quitosana também foi avaliado (LI; YU, 2000; SRINIVASA et al., 2002). Nestes estudos, o teor desta vitamina em mangas tratadas decresceu gradualmente durante o período de armazenamento e foi menor que em frutos não tratados. Porém, em pêssegos, os teores de ácido ascórbico foram maiores nos frutos tratados com quitosana que os dos frutos controle e também tratados com fungicida Prochloraz, depois de doze dias de armazenamento. Embora poucos estudos relatem o efeito da quitosana nos atributos sensoriais dos produtos vegetais tratados, geralmente, o sabor e gosto permanecem inalterados. Mangas e morangos tratados com quitosana obtiveram maiores pontuações nos atributos sensoriais comparados com os frutos não tratados armazenados por 21 e 15 dias, respectivamente (KITTUR; KUMAR; THARANATHAN, 2001; LI; CHUNG, 1986). Em outros estudos morangos revestidos com quitosana e armazenados por 12 dias a 7°C tiveram um gosto levemente amargo somente no dia zero (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004).

Os resultados dos estudos anteriormente citados têm mostrado que o versátil polímero quitosana, apresenta triplo efeito nos tratamentos pré e pós-colheita de vegetais: controle de microrganismos patogênicos, ativações de várias respostas de defesa induzindo e/ou inibindo diferentes atividades bioquímicas durante a interação planta-patógeno e aumento do tempo de armazenamento de vegetais frescos, devido às propriedades filmogênicas que apresenta.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. R. et al. Histochemistry and morphoanatomy study on guava fruit during ripening. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p.179-186, 2012.
- ABREU, J. R. **Monitoramento de alterações físicas, químicas e fisiológicas durante o amadurecimento de goiabas cv “PEDRO SATO”**. 2010. 94 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- ALI, Z. M.; LAZAN, H. Guava. In: MITRA, S. K. (Ed.). **Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits**. Wallingford: CAB, 1997. Cap. 6, p. 145-165.
- ALLAN, C. R.; HADWIGER, L. A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell composition. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 3, p. 285-287, 1979.
- BASSETO, E. **Conservação de goiabas “Pedro Sato” tratadas com 1-metilciclopropeno: concentrações e tempos de exposição**. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.
- BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 1087–1092, 2003.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. **Mexican Journal of Phytopathology**, México, v. 22, p. 178–186, 2004.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta** Berlin, v. 204, p. 153–168, 1998.
- BENHAMOU, N.; LA FONTAINE, P. J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1432–1444, 1994.

BENHAMOU, N.; THÉRIAULT, G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 34–52, 1992.

BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 285-290, 2003.

BHASKARA REDDY, M. V. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, p. 39-51, 2000.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 34, p. 330-334, 1962.

BOHLAND, C. et al. Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharades, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114, p. 679–685, 1997.

CARVALHO, V. D. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 179, p. 48-54, 1994.

CHANG, D. S. et al. A development of food preservation with the waste of crab processing. **Bulletin Korean Fish Society**, Yeosu, v. 22, p. 70-78, 1989.

CHEAH, L. H.; PAGE, B. B. C. Chitosan coating for inhibition of selerotinia rot of carrot. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science** Wellington, v. 25, p. 89-92, 1997.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.

COLÉGIO SÃO FRANCISCO. 2010. Disponível em: <<http://www.Portalsao francisco.com.br/alfa/goiaba/goiaba-3.php>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, Barking, v. 38, p. 243-254, 1994.

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

DU, J.; GEMMA, H.; IWAHORI, S. Effects of chitosan coating on the storability and on the ultrastructural changes of ‘Jonagold’ apple fruit in storage. **Food Preservation Science**, [S. l.], v. 24, p. 23–29, 1998.

DURIGAN, J. F. Colheita, conservação e embalagens. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA GOIABEIRA, 1., 1995, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 149-158.

EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on post harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations on *Rhizopus stolonifer*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, p. 769-779, 1992a.

EL GHAOUTH, E. A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 398-402, 1992b.

EL GHAOUTH, A. et al. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, p. 183–194, 1997.

EL GHAOUTH, A. et al. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, p. 1618-1620, 1991b.

EL GHAOUTH, A. et al. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. **HortScience**, Alexandria, v. 27, p. 1016–1018, 1992c.

EL GHAOUTH, E. A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, p. 417-432, 1994.

EL GHAOUTH, A. et al. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 15, p. 359-368, 1991a.

FURUSAKI, E. et al. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 9, p. 29-34, 1996.

GONGATTI NETO, A.; GARCIA, A. E.; ARDITO, E. F. G. **Goiaba para exportação**: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: Embrapa, 1996. 35 p.

HADWIGER, L. A.; BECKMAN, J. M. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 66, p. 205–211, 1980.

JACOMINO, A. P. et al. Armanejamento de goiabas “Kumagiai” sob diferentes temperaturas de refrigeração. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 3, p. 165-169, 2000.

JIANG, Y. M.; LI, Y. B. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, Barking, v. 73, p. 139-143, 2001.

KENDRA, D. F.; HADWIGER, L. A. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation by *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*. Orlando, v. 8, p. 276–281, 1984.

KITTUR, F. S.; KUMAR, K. R.; THARANATHAN, R. N. Functional packaging of chitosan films. **Z. Lebensmitteluntersuchung und forschung A**, Berlin, v. 206, p. 44–47, 2001.

LA FONTAINE, P. J.; BENHAMOU, N. Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 6, p. 11–124, 1996.

LEE S. et al. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, n. 1, p. 147-52, 1999.

LESNEY, M. S. Polycation-like behavior of chitosan on suspension-culture derived protoplasts of slash pine. **Phytochemistry**, New York, v. 29, n. 4, p. 1123-1125, 1990.

LI, C. F.; CHUNG, Y. C. The benefits of chitosan to postharvest storage and the quality of fresh strawberries. In: MUZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GRAHAM, G. W. (Ed.). **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum, 1986. p. 908–913.

LI, H.; YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 81, p. 269–274, 2000.

LIU, H. et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p. 147-155, 2004.

LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, São Leopoldo, v. 8 n. 1, p. 8-15, jan./jun. 2012.

MENDONÇA, D. R. et al. Características físicas e químicas de goiabas cordibel 1' e cordibel 4' armazenadas em condições ambientais. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 685-692, 2007.

NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, p. 65-72, 2002.

PAPINEAU, A. M. et al. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, New York, v. 5, p. 45-57, 1991.

PEARCE, R. B.; RIDE, J. P. Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 20, p. 119–123, 1982.

PEREZ, A.A. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces surface adsorption behaviour of Milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air-water interface saturation. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 85, p. 306-315, 2011.

PETER, M. G. Chitin and Chitosan from animal sources. In: STEINBÜCHEL, A. et al. (Ed.). **Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002a. v. 6, p. 481-574.

- PETER, M.G. Chitin and Chitosan in fungi. In: STEINBÜCHEL, A. (Ed.). **Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002b. v. 6, p. 123-157.
- QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 2693–2700, 2004.
- RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, p. 1457-1465, 2003.
- REGE, P. R.; BLOCK, L. H. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 321, n. 3/4, p. 235-245, 1999.
- ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: Macmillan, 1992. 350 p.
- ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 67-77, 1999.
- SIMPSON, B. K. et al. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp *Pandalus borealis*. **Food Biotechnology**, New York, v. 11, p. 25-44, 1997.
- SRINIVASA, P. C. et al. Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 215, p. 504–508, 2002.
- TODA FRUTA. **Característica da goiaba**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=156>. Acesso em: 10 out. 2013.
- TOGRUL, H.; ARSLAN, N. Extending shelf-life of peach and pear by using CMC from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 215–226, Mar. 2004.
- UCHIDA, Y.; IZUME, M.; OHTAKARA, A. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. (Ed.). **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London: Elsevier, 1989. p. 373-382.

VANDER, P. et al. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 118, n. 4, p. 1353-1359, 1998.

VILLADIEGO, A. M. D. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 53, p. 221-244, 2005.

WADE, H. E.; LAMONDIA, J. A. Chitosan inhibits *Rhizoctonia fragariae* but not strawberry black root rot. **Advances Strawberry Research**, State College, v. 13, p. 26–31, 1994.

WANG, G. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, p. 916-919, 1992.

XIE, W. M. et al. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 50, n. 1, p. 35-40, 2002.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, London, v. 73, p. 763–767, 1998.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, p. 195–202, 1997.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Preparo e Caracterização de Filmes Comestíveis de Quitosana

Rodrigo M. Fráguas¹, Anderson A. Simão¹, Paula V. de Faria², Estela R. Queiroz¹, Enio N. de Oliveira Junior², Celeste M. P. de Abreu¹

PUBLICADO: Revista Polímeros Ciência e Tecnologia.

Artigo redigido conforme norma da revista. Este artigo é uma versão final, considerando que o conselho editorial da revista já aceitou o artigo para publicação.

ABSTRACT: The objective of this study was to characterize three commercial samples of chitosan, as well as the preparation and characterization of edible films from these samples, aiming for the subsequent application of these films in fruit coating. The samples were characterized by molar mass, degree of acetylation, elemental analysis, infrared spectroscopy and thermal analysis, while the film was characterized by thermal analysis, infrared spectroscopy, total solids and water vapor permeability. The commercial samples showed different molar masses, which ranged from 132 to 245 kDa, degrees of acetylation from 5.8 to 6.3% and presented an elemental analysis next to the formula $C_6H_{11}O_4N$ for the repeating unit. The films produced had thicknesses from 3.7 to 6.8 \cdot m, total solids from 2.0 to 6.3 $\times m^{-2}$ and water vapor permeability from 170.1 to 180.2 $g \times day^{-1} \times m^{-2}$. The chitosan films with a higher content of solids and a lower molar mass were less permeable to water vapor. For infrared and

thermogravimetric analyses, the same functional groups and similar decomposition curves were observed, respectively, for the samples and for the film produced from sample A.

KEYWORDS: Chitosan, edible films, characterization.

Introdução

Os polímeros quitina e quitosana têm sido bastante estudados devido ao elevado potencial de aplicações em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas e na agricultura^[1-3]. Esses polímeros são aminoglucopiranas compostas dos monômeros N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina e, podem ser distinguidos por suas solubilidades em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v). Quitina, contendo um número $\geq 40\%$ de N-acetil-D-glicosamina é insolúvel, visto que os polímeros solúveis são chamados de quitosana^[4].

As aplicações desses compostos em várias áreas, sobretudo a aplicação de quitosana, justificam-se pelo baixo custo de produção, a qual é produzida a partir dos descartes do processamento de crustáceos, fonte bastante abundante, sendo as características dos produtos a base de quitosana dependentes da origem da matéria prima e da metodologia empregada para sua produção^[5].

Industrialmente a quitosana é produzida a partir da desacetilação alcalina de quitina (hidrólise alcalina), porém, a quitosana também pode ser obtida a partir da desacetilação enzimática de quitina, processo este investigado em pesquisas laboratoriais^[6]. A quitosana é uma fibra animal que apresenta propriedades biológicas, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, além de apresentar efeito antifúngico, antibacteriano e induzir respostas de defesa em frutos tratados^[7,8]. Devido a essas características e a de fácil formação de géis e filmes, a quitosana tem sido considerada há décadas como um composto de interesse nas mais diversas áreas.

Revestimentos à base de quitosana apresentam potencial para controlar perdas causadas por podridões pós-colheita e para prolongar o tempo de armazenamento de frutos. Vários produtos vegetais como tomates^[9], pêssegos^[10], maçãs^[11], cajus^[5] e lichias^[12], entre outros frutos, têm o tempo de armazenamento estendido quando revestidos com quitosana, devido à formação de um filme semipermeável que regula as trocas gasosas e reduz as perdas por transpiração, retardando o amadurecimento dos frutos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras comerciais de quitosana, bem como a preparação e caracterização de filmes comestíveis dessas amostras, com vistas à aplicação dos mesmos em revestimento de goiabas, entre outros frutos, e sua utilização em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas e na agricultura.

Experimental

As amostras de quitosana (nome comercial Chitoclear®) foram gentilmente cedidas pela Primex ehf da Islândia, em três lotes diferentes: 3493, 3529 e 3142, e codificadas, respectivamente, como A, B e C. Na Tabela 1 estão descritos os valores das viscosidades das amostras fornecidas pelo fabricante.

Tabela 1. Viscosidade, grau de acetilação (GA) e massa molar absoluta (Mw) de amostras de quitosana

Amostra	Viscosidade (mPa × s) ¹	GA (%)	Mw (kDa)
A	5	5,9±0,1	132±1,0
B	520	5,8±0,1	228±9,0
C	1.300	6,3±0,1	245±2,0

¹Informação cedida pelo fabricante (Primex ehf).

Determinação da massa molar média absoluta por cromatografia de permeação em gel

Para a determinação da massa molar média absoluta as amostras de quitosana foram dissolvidas em tampão acetato de sódio pH 4 na proporção 1:100 (m/v), filtradas em filtros 0,45 μm e, em seguida, submetidas a cromatografia de permeação em gel. A análise foi realizada utilizando duas colunas em série Ultrahydrogel™ Linear 7,8 x 300 mm, um injetor Viscotek GPCmax VE 2001 Solvent/SAMPLE MODULE, detector Viscotek TDA302 Triple Detector Array, tendo como fase móvel tampão acetato de sódio pH 4. O volume injetado foi de 100 μL a uma vazão de 0,8 mL min^{-1} e o equipamento é dotado dos seguintes detectores: índice de refração (IR), viscosidade (DP) e espalhamento de luz (RALS).

Determinação do grau de acetilação

O grau de acetilação (GA) das amostras de quitosana foi determinado pelo método de titulação potenciométrica segundo metodologia descrita por Raymond et al.^[13]. As amostras foram dissolvidas em HCl 0,1 mol L^{-1} na proporção 1:100 (m/v), e titulou-se com solução padrão de NaOH 0,1 mol L^{-1} sob agitação contínua. Os valores de GA foram calculados através da Equação (1):

$$GA = \frac{(V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{qu}}) \times 100}{(1.000 \times M_{\text{NaOH}} \times m_{\text{qu}})} \quad (1)$$

onde, GA = grau de acetilação de quitosana (%); m_{qu} = massa de amostra de quitosana (g); M_{qu} = massa molar da unidade de glicosamina (161 g mol^{-1}); V_{NaOH} = volume da solução de NaOH (0,1 mol L^{-1}) usado para neutralizar os grupos amino livres protonados (mL) e M_{NaOH} = concentração molar real da solução de NaOH (mol L^{-1}).

Análise elementar

Para a determinação da análise elementar, 2 mg de cada amostra de quitosana foram secas em estufa a $103\pm 2^\circ\text{C}$ e posteriormente acondicionadas em analisador elementar Vario Micro Cube. Desta forma, foram obtidos os teores em nitrogênio, carbono, hidrogênio, enxofre e, por diferença, o teor em oxigênio. A temperatura do tubo de combustão foi de 1200°C e a temperatura do tubo de redução de 850°C , sendo utilizado o hélio como gás de arraste e o oxigênio como gás oxidante.

Produção dos filmes de quitosana

Para o preparo dos filmes das amostras de quitosana seguiu-se o procedimento descrito por Yoshida et al.^[14]. As amostras foram dissolvidas em soluções de ácido acético na proporção 1:100 (m/v) nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5%. As soluções foram homogeneizadas em agitador magnético (Fisatom, modelo 711) em temperatura ambiente por 24 horas até completa dissolução. Em seguida, foram filtradas em filtro de $11\ \mu\text{m}$ sob vácuo e 10 mL do filtrado foi adicionado em placas de Petri de poliestireno de 8 cm de diâmetro. Os filmes foram secos à temperatura ambiente.

Espectroscopia na região do infravermelho

A análise de infravermelho foi realizada nas amostras de quitosana e no filme produzido a partir da amostra A na concentração de 1% (m/v em ácido acético 1%). Aproximadamente 1,5 mg das amostras foram secas em estufa a vácuo por 15 horas a 60°C . Após este período, 100 mg de KBr foram adicionados e a mistura homogeneizada em almofariz de ágata. As pastilhas foram preparadas e deixadas em estufa a vácuo a 110°C por 20 horas. Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT-IR, MB 102.

Análise Térmica

A análise térmica foi feita nas amostras de quitosana e no filme produzido a partir da amostra A na concentração de 1% (m/v em ácido acético 1%). As curvas termogravimétricas foram obtidas em um módulo termogravimétrico TGA 2050, acoplado a um analisador térmico TA 2000 da TA instruments. A atmosfera empregada foi de N₂st, com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ até a temperatura de 400°C e o fluxo de gás de 30 mL min⁻¹.

Espessura do filme

As espessuras dos filmes das amostras de quitosana A, B e C preparadas, respectivamente, nas concentrações 0,5, 1 e 1,5% (m/v em ácido acético 1%), foram medidas através de micrômetro (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Kawasaki, Kanagawa, Japão). As medidas foram realizadas aleatoriamente em cinco posições diferentes dos filmes e a espessura do filme foi a média dessas medidas.

Sólidos totais

Os filmes produzidos a partir das amostras de quitosana A, B e C preparadas, respectivamente, nas concentrações 0,5, 1 e 1,5% (m/v em ácido acético 1%), foram pesados em balança analítica e as massas obtidas foram divididas pela área da placa de petri de 8 cm de diâmetro, que é de 0,005 m². Os teores de sólidos totais dos filmes em g × m⁻² foram determinados dividindo a massa obtida para cada filme em gramas pela área de 0,005 m².

Cinética de permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes das amostras de quitosana A, B e C preparadas, respectivamente, nas concentrações 0,5, 1 e 1,5% (m/v em ácido acético 1%), foram determinadas pelo método gravimétrico

padrão E96-95^[15]. Em frascos de 50 mL foram colocados 10 g de sílica gel azul (Synth) e os mesmos foram lacrados com os filmes de quitosana e colocados dentro de um dessecador no qual continha 200 mL de solução salina de cloreto de cálcio 10% (m/v). Após este procedimento foi feito vácuo dentro do dessecador e o mesmo foi levado a uma BOD (Novatecnica, NT 705) a temperatura de 25°C e durante cinco dias as amostras eram retiradas e pesadas e um novo vácuo realizado.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Origin Pro 8 e as diferenças entre as médias obtidas a partir de triplicatas foram analisadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

Massa molar e grau de acetilação

As propriedades da quitosana não dependem apenas do seu grau de acetilação (GA), mas, também da distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal, além da sua massa molar^[15]. Como muitas propriedades da quitosana estão intimamente relacionadas a estes parâmetros, torna-se imprescindível a determinação dos mesmos.

Os resultados das massas molares e dos GA das amostras de quitosana estão apresentados na Tabela 1. As massas molares médias obtidas pela técnica de cromatografia de permeação em gel para três amostras de quitosana codificadas como A, B e C, foram respectivamente 132, 228 e 245 kDa. Assim como era esperado, com o aumento dos valores das viscosidades das amostras de quitosanas A, B e C fornecidos pelo fabricante, respectivamente 5, 520 e 1.300 mPa × s, também houve aumento dos valores das massas molares médias.

Apesar da tendência de aumento observado nos dois métodos, viscosimétrico e cromatográfico, não se observou um aumento proporcional entre os valores, tendo em vista que os princípios de detecção dos dois métodos são distintos. Um método se baseia na determinação da viscosidade (viscosimétrico) e o método de cromatografia de permeação em gel avançado se baseia na combinação de três detectores (índice de refração, viscosidade e espalhamento de luz) através do qual se determina o valor da massa molar média.

Os GA obtidos pela técnica de titulação potenciométrica para três amostras de quitosana codificadas como A, B e C, foram respectivamente 5,9, 5,8 e 6,3%. O GA obtido pelo método de titulação potenciométrica é bastante confiável quando as soluções de HCl e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ são padronizadas e quando as amostras de quitosana são totalmente solúveis na solução de HCl e ambas situações foram observadas neste estudo.

Raymond et al.^[13] observaram que a titulação potenciométrica é um método indicado para amostras de quitosana com baixos valores de GA conforme foi o caso deste estudo. Em outro estudo do nosso grupo, cujos resultados ainda serão publicados, comparamos os resultados de GA obtidos por titulação e por RMN ^1H (ressonância magnética nuclear de próton) e observamos que não houve diferença entre os métodos para quitosana com GA que variaram entre 8 e 22%. Desta maneira, o método de titulação potenciométrica mostra-se um método simples, barato e bastante confiável na determinação do GA de quitosana, desde que se tomem os cuidados anteriormente citados.

Análise elementar

Os dados de análise elementar apresentados na Tabela 2 são próximos da fórmula $C_6H_{11}O_4N$ para a unidade de repetição, quando se desconta o teor de água presente na amostra.

A hidratação se deve ao fato de que a quitosana tem forte afinidade pela água e, no estado sólido, as macromoléculas podem apresentar estruturas distorcidas, que são facilmente hidratadas^[17]. Em adição, deve-se considerar que a análise elementar é um método conveniente para análise de quitosana somente na ausência de proteína residual^[6,18].

Tabela 2. Análise elementar das amostras de quitosana.

Amostra	Composição (%)		
	N ¹	C ²	H ³
A	8,1±0,8	38,4±3,7	6,9±0,5
B	10,3±0,5	38,0±3,3	6,9±0,4
C	9,7±0,9	37,2±2,2	6,5±0,5

¹Nitrogênio; ²Carbono; ³Hidrogênio.

Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho das amostras de quitosana e do filme produzido a partir da amostra A na concentração 1% são apresentados na Figura 1. As principais bandas observadas nos espectros das amostras de quitosana e do filme foram: banda de estiramento axial de OH entre 3440 a 3480 cm^{-1} , a qual aparece sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação axial de C = O de amida I (entre 1661 a 1671 cm^{-1}); deformação angular de N-H (entre 1583 a 1594 cm^{-1}); deformação angular simétrica de CH₃ (entre 1380 a 1383 cm^{-1}); deformação axial de -CN de amida (por volta de 1425 cm^{-1}) e

deformação axial de -CN de grupos amino (entre 1308 a 1380 cm^{-1}), além de bandas de estruturas polissacarídicas na região de 890 – 1156 cm^{-1} .

Todas as bandas características são muito semelhantes às aquelas escritas por Brugnerotto et al.^[18] e estão presentes em todas as amostras investigadas e no filme, mostrando que todas apresentam basicamente os mesmos grupos funcionais.

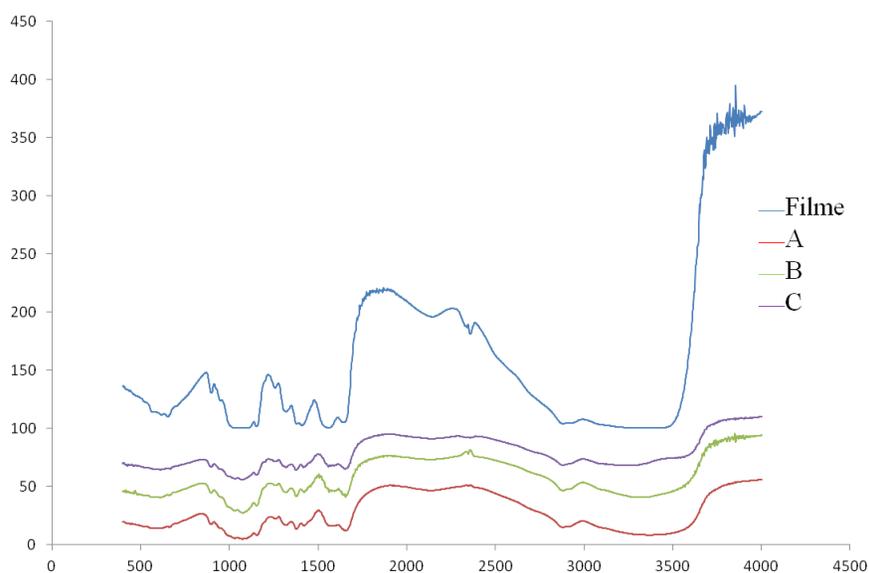


Figura 1. Espectros de infravermelho das amostras de quitosana A, B e C e do filme produzido a partir da amostra A na concentração de 1% (m/v em ácido acético 1%).

Análise termogravimétrica

As curvas de termogravimetria das amostras de quitosana e do filme produzido a partir da amostra A na concentração 1% são mostrados na Figura 2. Os termogramas das quitosanas e do filme apresentaram somente duas etapas de decomposição.

O primeiro estágio, próximo a 100 °C se refere ao desprendimento de água adsorvida ao biopolímero, e o segundo estágio, cujo patamar final encontra-se indefinido, se refere à degradação da cadeia polimérica, porém, como a atmosfera é a de um gás inerte, esta perda de massa está relacionada mais ao efeito térmico propriamente dito do que ao efeito reacional.

Para a amostra do filme nota-se que o padrão da curva se manteve semelhante ao das amostras com uma menor resistência ao calor, tal fato pode ser relacionado com a menor concentração de quitosana, visto que o filme foi preparado usando apenas 1% de amostra. É importante frisar também que os materiais analisados, em atmosfera inerte (N₂), apresentaram boa estabilidade térmica até a temperaturas próximas de 300°C [19].

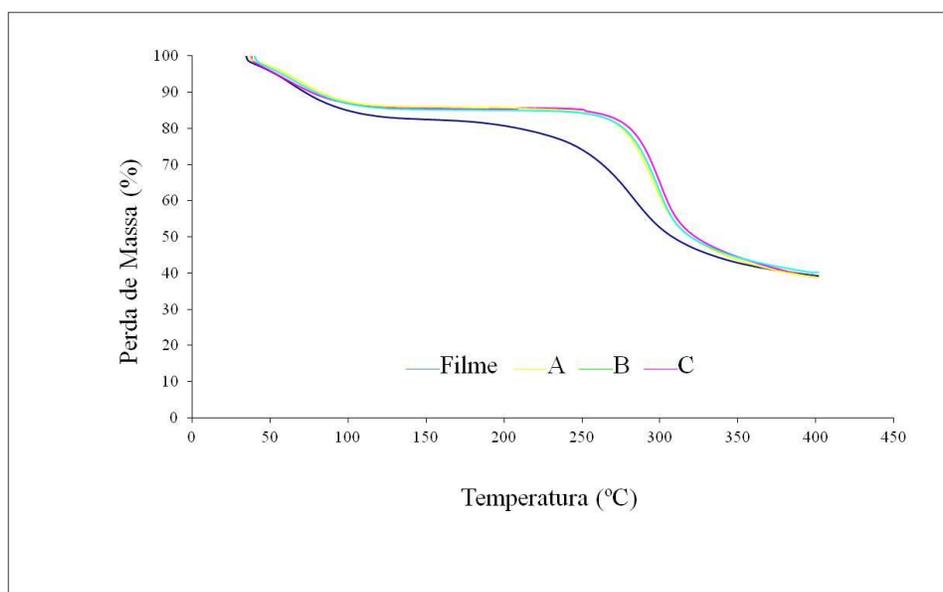


Figura 2. Termograma das amostras de quitosana A, B e C e do filme produzido a partir da amostra A na concentração de 1% (m/v em ácido acético 1%).

Filmes de quitosana

As concentrações empregadas para as amostras de quitosana (0,5, 1,0 e 1,5%) revelaram a formação de filmes homogêneos, finos, transparentes e flexíveis. Exceto para a concentração 0,25% que formou filmes extremamente frágeis que proporcionaram grandes dificuldades de manuseio, desta maneira, foram analisados somente os filmes obtidos a partir da concentração 0,5%.

Observou-se aumento significativo ($p \leq 0,05$) da espessura dos filmes com o aumento da concentração da solução de quitosana para todas as amostras (Tabela 3), entretanto, pode-se observar que com o aumento das massas molares das amostras de quitosana (132 a 245 kDa), apesar de se observar uma tendência de aumento das espessuras dos filmes, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores das espessuras dos filmes produzidos nas mesmas concentrações.

Tabela 3. Propriedades das amostras de quitosana e de seus respectivos filmes produzidos.

Amostra	Propriedades das quitosanas		Propriedades dos filmes		
	Massa molar (kDa)	Concentração % (m/v)	Espessura (μm)	Sólidos totais ($\text{g} \times \text{m}^{-2}$)	PVA ¹ ($\text{g} \times \text{dia}^{-1} \times \text{m}^{-2}$)
A	132	0,5	3,7 ^a	2,0 ^c	176,6 ^f
		1,0	4,5 ^a	4,0 ^{de}	173,2 ^f
		1,5	6,0 ^{ab}	7,3 ^e	170,2 ^f
B	228	0,5	4,6 ^a	2,0 ^c	179,6 ^{fg}
		1,0	6,0 ^{ab}	3,5 ^{cd}	176,8 ^f
		1,5	6,1 ^{ab}	6,3 ^e	170,1 ^f
C	245	0,5	4,5 ^a	2,2 ^c	180,2 ^{fg}
		1,0	5,3 ^a	4,3 ^{de}	174,5 ^f
		1,5	6,8 ^{ab}	4,8 ^{de}	175,3 ^f

¹PVA: permeabilidade ao vapor de água. ^{a-f} Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

À medida que o volume da solução utilizada foi mantida constante (10 mL), os filmes obtidos tinham seu teor de sólidos totais por unidade de área aumentado com o aumento das concentrações das soluções (Tabela 3). Exceto para a amostra C, cujos teores de sólidos totais nas concentrações 1,0 e 1,5% não variaram significativamente ($p \leq 0,05$).

Isto se deve ao fato da amostra C ser muito viscosa, 1.300 mPa×s, e quanto maior a concentração, maior a retenção de amostra durante a filtração em filtro de vidro sinterizado, que no caso da concentração de 1,5% a retenção foi de 10%. O filme com maior teor de sólidos por área que foi de $7,3 \text{ g} \times \text{m}^{-2}$ foi obtido a partir da amostra A de menor viscosidade (5 mPa×s), o que justifica o maior teor de sólidos devido não ter havido retenção de sólidos durante a filtração.

Não foi observado a formação de bolhas de ar incorporadas às matrizes dos filmes com maior massa por área como descrito por Yoshida et al.^[14].

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes obtidos a partir das amostras de quitosana (Tabela 3) mostraram que houve uma tendência de diminuição da permeabilidade com o aumento dos sólidos totais por metro quadrado de filme para uma mesma amostra de quitosana. Para a amostra A (viscosidade 5 mPa × s), a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosana produzidos a partir das concentrações 0,5, 1,0 e 1,5% foram respectivamente, 176,6, 173,2 e 170,2 $\text{g} \times \text{dia}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, e se mostraram menos permeáveis ao vapor de água durante cinco dias de análise comparados aos outros filmes produzidos a partir das amostras B e C.

Comparando-se os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos a partir da solução de concentração 1,5%, pode-se notar que os valores obtidos para as amostras A e B não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$), sendo respectivamente, 170,2 e 170,1 $\text{g} \times \text{dia}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, porém, estes foram significativamente diferentes do valor de permeabilidade do

filme obtido a partir da amostra C que foi de $175,3 \text{ g} \times \text{dia}^{-1} \times \text{m}^{-2}$. Esse resultado está de acordo com o estudo realizado por Yoshida et al.^[14] que também observaram redução da permeabilidade de filmes produzidos a partir de amostras de quitosana com menor massa molar.

O estudo da permeabilidade de filmes de quitosana se justifica para inúmeras aplicações, e no caso deste estudo, se trata de uma seleção de filmes cujas propriedades sejam ideais para recobrimentos de frutos e aumentem seus tempos de prateleira. No momento, estamos testando as mesmas amostras de quitosana utilizadas neste estudo como recobrimento de goiabas e avaliaremos as alterações pós-colheita durante o amadurecimento dos frutos.

Além das técnicas descritas neste estudo, também estamos analisando as propriedades mecânicas dos filmes, tensão ao estiramento e alongação dos filmes, cujos resultados ainda serão publicados.

Conclusões

As amostras comerciais de quitosana analisadas apresentam diferentes massas molares e graus de acetilação e análise elementar próxima à fórmula $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$ para a unidade de repetição. As bandas observadas no infravermelho revelam que todas as amostras e o filme produzido a partir da amostra A apresentam basicamente os mesmos grupos funcionais, assim como a análise térmica que mostra curvas semelhantes de decomposição para as amostras e o filme.

Os filmes de quitosana produzidos a partir da concentração 0,5% mostraram-se homogêneos, finos, transparentes e flexíveis. As espessuras dos filmes não variaram com as massas molares, entretanto, observou-se aumento das espessuras destes com o aumento das concentrações das soluções de quitosana de 0,5 a 1,5% (m/v). Os filmes com maior teor de sólidos e menor massa molar foram menos permeáveis ao vapor de água.

Os resultados deste estudo mostram que quando se deseja produzir um filme de quitosana menos permeável ao vapor de água é necessário a utilização de amostras de quitosana com baixas massas molares em soluções mais concentradas.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CAPES, for the doctoral grant, and FAPEMIG, for the financial support.

Referencias Bibliográficas

1. Gonsalves, J. K. M. C.; Costa, A. M. B.; Sousa, D. P.; Cavalcanti, S. C. H. & Nunes, S. R. – Scie. Plena, 5, p.111102 (2009).
2. Oliveira-Jr, E. N.; El Gueddari, N. E.; Moerschbacher, B. M. & Franco, T. T. - Braz. J. Microbiol., 43, p.800 (2012).
3. Santana, M. C. C. B.; Machado, B. A. S.; Silva, T. N. & Nunes, I. L. – Ciênc. Rural, 43, p.544 (2013).
4. Assis, O. B. G. & Da Silva, V. L. - Polímeros, 13, p.223 (2003).
5. De Oliveira, B. S. & Nunes, M. L. – Scie. Plena, 7, p.041501 (2011).
6. Dos Santos, E. J.; Soares, P. J.; Dockal, R. E.; Filho, C. P. S. & Cavalheiro, G. T. E. - Polímeros, 13, p.242 (2003).
7. Dutta, P. K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. K. & Dutta, J. – Food Chem., 114, p.1173 (2009).
8. Guerra-Sánchez, M. G.; Vega-Pérez, J.; Velázquez-Del Valle, M. G. & Hernández-Lauzardo, A. N. - Pestic. Biochem. Physiol., 93, p.18 (2009).
9. Costa, T. L. E.; Oliveira, T. A.; Santos, F. K. G.; Aroucha, M. M. & Leite, R. H. L. - Revista Verde, 7, p.12 (2012).
10. Santos, C. A. A.; Castro, J. A.; Picolo, A. A. & Rolim, G. S. - Rev. Bras. Frutic., 30, p.88 (2008).

11. Botelho, R. V.; Maia, A. J.; Rickli, E. H.; Leite, C. D. & Faria, C. M. D. R. - *Rev. Bras. de Agroecologia*, 5, p.200 (2010).
12. Hojo, E. T. D.; Durigan, J. F. & Hojo, R. H. - *Rev. Bras. Frutic.*, 33, p.377 (2011).
13. Raymond, L.; Morin, F. G. & Marchessault, R. H. - *Carbohydr. Res.*, 246, p.331 (1993).
14. Yoshida, C. M. P.; Oliveira-JR, E. N. & Franco, T. T. - *Packing Technol. Sci.*, 22, p.161 (2009).
15. ASTM. Standard Test Methods for Determining Gas Permeability Characteristics of Plastic Film and Sheeting. ASTM Book of Standards. ASTM committee on publications: Philadelphia, PA, 1995.
16. Pacheco, N.; Larralde-Corona, C. P.; Sepulveda, J.; Trombotto, S.; Domard, A. & Shirai K. - *Int. J. Biol. Macromol.*, 43, p.20 (2008).
17. Rinaudo, M.; Desbrières, J.; Dung, P. L.; Binh Thuy, P. & Dong, N. T. - *Carbohydr. Polym.*, 46, p.339 (2001).
18. Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, W.; Argüelles-Monal; Desbrières, J. & Rinaudo, M. - *Polym.*, 42, p.3569 (2001).
19. Brito, D. & Campana Fo. - *Thermochimica Acta*, 465, p.73 (2007).

ARTIGO 2**STORAGE OF PEDRO SATO GUAVAS COATED WITH LOW
MOLECULAR WEIGHT CHITOSANS**

Rodrigo Martins Fráguas^{1*}; ¹Estela de Rezende Queiroz¹; Denise Alvarenga
Rocha¹, Enio Nazaré Oliveira²; Celeste Maria Pato Abreu¹.

*1 Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras,
MG, Brazil*

*2 Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos,
Universidade Federal de São João del-Rey – UFSJ, Campus Alto Paraopeba,
Ouro Branco, MG, Brazil*

**rodrigofraguas1@hotmail.com*

Artigo Submetido a Revista Polímeros Ciência e Tecnologia

Resumo

A goiaba é um fruto climatérico com alto valor nutricional que apresenta curta vida pós-colheita, uma vez que sofre perda de firmeza poucos dias após ter sido colhida. O presente trabalho objetivou estudar o amaciamento de goiabas submetidas ao tratamento com biofilmes de quitosana de diferentes massas molares em duas concentrações cada. Para tanto foram avaliadas a perda de massa, firmeza, pectinas e a atividades da enzima hidrolítica: pectinametilesterase, durante oito dias de armazenamento à temperatura ambiente. Os resultados mostraram que, os frutos tratados com a quitosana 3142, na concentração de 1,5% apresentaram menores teores de perda de massa e pectinas solúveis, maior firmeza e maior teor de pectina total, quando comparado com os demais tratamentos. O tratamento com a quitosana 3142 na

concentração de 0,5% resultou em menores atividades de enzimas hidrolíticas analisadas, quando comparados com a testemunha. Os tratamentos com quitosana, nas diferentes concentrações mostraram-se eficientes em manter a qualidade pós- colheita da goiaba, estendendo sua vida útil por 8 dias.

Palavras-chave: quitosana; goiaba; armazenamento.

•

Abstract

Guava is a climacteric fruit with high nutritional value that presents short postharvest life, as it suffers loss of firmness a few days after being harvested. This study investigated the softening of guavas subjected to treatment with chitosan biofilms of different molecular weights, at two concentrations each. Therefore, the loss of mass, firmness, pectins and activities of hydrolytic enzymes: pectinmethylesterase were evaluated for eight days of storage at room temperature. The results showed that the product treated with chitosan 3142, at a concentration of 1.5% showed a lower weight loss and soluble pectin content, as well as greater firmness and content of total pectin, compared to the other treatments. The treatment with chitosan 3142 at a concentration of 0.5% resulted in lower activities of the hydrolytic enzymes analyzed. When compared with the control, treatments with chitosan at different concentrations were effective in maintaining postharvest quality of guavas, extending their life for eight days

Keywords: chitosan; guava; storage.

1. Introduction

For many years, packages were developed with the purpose of food protection, without presenting any interaction with it. Currently, there is great interest in developing new types of packaging, such as those active, which

interact intentionally with food, extending their useful life or giving desirable sensory and/or nutritional characteristics^[1]. The use of natural products for the development of biodegradable packaging is of great interest to the food industry and society, since it benefits the food and the environment.

The use of edible coatings which, when applied to food, form a barrier that attenuates gas exchange and further improve appearance, structural integrity and mechanical properties of foods, is noteworthy^[2]. In this context, chitosan is an amino-polysaccharide obtained from the deacetylation of chitin. It is an animal fiber, biodegradable and non-toxic^[3], considered one of the most abundant natural polymer in living organisms, such as crustaceans, insects and fungi. When used as a coating, chitosan interferes directly in pathogen growth and activates various defense responses in plant tissue, thus helping in the control of the the onset of postharvest diseases^[3,4]. The production of guava in Brazil was 345.3 thousand tons in 2014, and the production in Minas Gerais was 15.9 thousand tons. This fact places Brazil as the world's largest producer of red guava^[5]. Among the most cultivated varieties in the country are the cultivars Paluma and Pedro Sato. Guava is a highly perishable climacteric fruit, due to its rapid metabolism during ripening and senescence. This phenomenon limits the period of transport and storage, making it difficult or even impossible to send the guava fruit to more distant consumer centers, due to the irreversible losses that occur during transport^[6]. For a long time, most of the production was intended for the domestic market. However, major European centers are currently discovering guava and the market is expanding, mainly for table guava^[5,7]. The expansion of the consumer market of fresh guava is conditional on fruit quality and increased shelf life. Various coating methods are being studied to extend the life of guava. These treatments modify the surrounding air within the fruit, reducing the levels of O₂ and increasing CO₂ levels. Consequently, they reduce plant metabolism, delaying senescence^[8,9].

The ripening of guava is a complex process, highly coordinated in various metabolic levels correlated to its development in the plant. The knowledge of changes occurring during this process is important to clarify and establish the scientific basis that enables the development of new postharvest conservation technologies, thus increasing the useful life of this fruit^[10]. Given the above, the present study aimed to determine the effect of edible chitosan coatings on the quality maintenance of guava cv. Pedro Sato for eight days of storage at room temperature.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of chitosan solutions with different molecular weights

Chitosan samples (trade name Chitoclear®) with different molar weights were kindly provided by Primex ehf Iceland, in three different batches: 3493, 3529 and 3142. They were used in the preparation of solutions and coded respectively as A, B, C, D, E and F, according to Table 1.

For the preparation of chitosan solutions, the procedure described by Yoshida et al.^[11] was followed. Samples were dissolved in acetic acid solutions at the ratio 1:100 (w/v), at concentrations of 0.5 and 1.5%. The solutions were homogenized on a magnetic stirrer (Fisatom 711) at room temperature for 24 hours until complete dissolution. They were then filtered using a 11- μ m filter under vacuum.

2.2 Preparation of guavas

Guavas (*Psidium guajava* L.) from cv. Pedro Sato (350 fruits) were manually picked early in the morning at the half-mature ripening stage (light green coloration) in a commercial orchard located in the municipal district of Lavras, Minas Gerais, altitude 845 m, latitude 21.15° S and longitude 45.22° W. They were placed in previously sterilized polyethylene boxes and transported to

the Biochemistry Laboratory, in the Chemistry Department of Universidade Federal de Lavras, MG.

The fruits were selected based on size, color and absence of physiological and mechanical injuries, washed in tap water and separated into 7 groups of 9 fruits for the composition of the treatments. All fruits were immersed in a 0,1% sodium hypochlorite solution at room temperature for 5 minutes for disinfection. After drying the hypochlorite solution, the fruits were numbered and treated with the different chitosan solutions. Therefore, the fruits were immersed in chitosan solutions for 10 seconds and then placed to dry in backrests, by the peduncle. The concentrations of the prepared solutions, viscosity and molecular weight of the chitosan samples used are given in Table 1.

Table 1. Chemical characteristics and concentration of chitosans used in the preparation of the coatings of the groups studied in the experiment.

Group	Coating/ concentration	Molar Weight Mw (kDa)*	Viscosity (mPa × s) ^{1*}
Control	No coating	xx	Xx
Group A	Chitosan 3493 concentration 5%	132±1.0	5
Group B	Chitosan 3493 concentration 1.5%		
Group C	Chitosan 3529 concentration 5%		
Group D	Chitosan 3529 concentration 1.5%	228±9.0	520
Group E	Chitosan 3142 concentration 5%		
Group F	Chitosan 3142 concentration 1.5%	245±2.0	1,300

*Information provided by the manufacturer (Primex ehf).

After drying of the coating, the fruits were placed on a steel shelf in the laboratory and kept for a period of eight days at relative temperature and humidity (RH) of $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and $53\% \pm 1\%$, respectively.

The samples were prepared for analyses on the day of harvest and every other day until the end of the storage period (day 8). Therefore, nine fruits of each treatment were taken every day during the analysis. They had the endocarps removed and the pulp chopped into pieces of approximately 1cm^3 . The pieces were manually homogenized, stored in plastic pots and placed in a freezer (-20°C) for subsequent analyses.

2.3 Experimental design

A completely randomized design (CRD) was used factorial scheme (7×5), with seven treatments (groups control, A, B, C D and F) and 5 storage times (day 0, 2, 4, 6, and 8). The experimental portion consisted of 3 fruits with 3 replications for each treatment. The results were submitted to the variance analysis using the software SISVAR. When significant, data were subjected to regression analysis.

2.4 Physical analyses

Firmness

Three equidistant readings were taken in the equatorial region of the fruit, using a digital penetrometer (53205, TR Turoni), with an 8-mm probe.

Weight loss

The fruits were weighed in a Plus OHAUS scale and the loss of fresh weight during storage was determined according to the equation $M = (M_0 - M_n / M_0) \times 100$, where M is the mass of fruits, M_0 the mass at the initial time (day 0) of storage and M_n is the mass for subsequent days of analysis ($n = 8$).

2.5 Chemical and biochemical analyses

Total pectin and soluble pectin

Total and soluble pectin were extracted according to the technique standardized by McCready and McCoomb^[12], and quantified by carbazole reaction, according to Bitter and Muir^[13]. The results were expressed in g galacturonic acid.100g⁻¹ pulp.

Activity of pectin methylesterase

The activity of pectin methylesterase (PME) was determined according to the technique described by Jen and Robinson^[14]. A 1% citrus pectin solution was used as a substrate in 0.2N NaCl, pH=7.0, at room temperature. The demethylation rate of pectin added to the enzyme extract was measured by titration of the reaction mixture with 0.01N NaOH, keeping the pH=7.0 for 10 minutes. One unit of enzyme activity (UEA) was defined as the enzyme's ability to catalyze the pectin demethylation corresponding to a micromol NaOH per minute under the assay conditions. The results were expressed as U.g⁻¹ fresh weight (UEA).

3. Results and Discussions

The onset of diseases in fruits treated with chitosan and symptoms that would compromise the appearance of the fruit, were not observed at the end of storage. During eight days of storage at room temperature (22.6°C and ± 75% RH), the fruits treated by immersion in different chitosan solutions, especially at a concentration of 1.5%, had lower weight losses compared with the control, (Figure 1). The chitosan that provided the lowest weight loss in the coated fruits was 3142. The fruits covered with this material at concentrations of 1.5% and 5%, showed a lower weight loss, 16.88% and 18.20%, respectively, compared with the control (T) (22.81%), at the end of storage. The results for weight loss

were followed by the fruits treated with chitosan 3529, with a loss of 19.42% and chitosan 3493, with a loss of 22.58%. In all treatments, the weight loss percentages observed were lower than those reported for guavas suitable for consumption^[16].

Guavas 'Kumagai'^[17] stored for eight days at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\% \text{RH}$ coated with 6% chitosan, had a lower mass loss, of 5.67% on the eighth day, when compared with other chitosan concentrations, other treatments and the control, which showed a loss of 8.00% on the eighth day. This difference may be related to the increased chitosan concentration, in addition to the different characteristics of the material used to prepare the film. LINHARES; SANTOS; ABREU^[15] analyzed the mass loss of guavas 'Pedro Sato' after 25 days of refrigeration, and found that the mass loss for the control fruits was 21.80%; for other fruits treated with calcium chloride, it was 21.13 %, and 18.60% for fruits treated with 1-MCP.

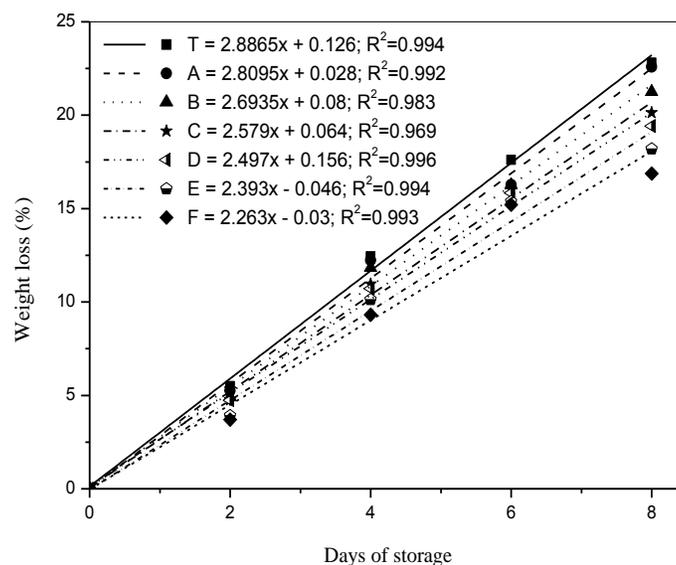


Figure 1. Weight loss in guava Pedro Sato coated and not coated with chitosans for 8 days of storage.

Most weight loss presented by the fruits without coating with chitosan film is probably due to water loss resulting from transpiration rates, while smaller losses in coated fruits can be explained, since coating mitigates water loss to the external environment, reaching equilibrium in the micro environment, by the change of atmosphere. At the end of storage, the group treated with chitosan 3142 showed an excellent aspect, since the fruits that did not receive any type of treatment were inappropriate, at an advanced stage of senescence (Figure 2).



Figure 2. Appearance of the control group and group F at the end of storage.

The regression analysis for firmness (Figure 3) showed that the best results have also been achieved by the coated fruits, at the highest chitosan concentration (1.5%). The percentages of firmness loss at the end of storage were 61% for group D, 59.5% for group E and 70% for group C. The loss of firmness in guava is one of the most important changes that occur in the ripening process^[18]. All treatments were efficient and had a higher firmness, when compared to the control group at the end of storage, the eighth day of storage showed a firmness loss of 80.4%, compared to the beginning of storage. The behavior of the coated fruits at higher chitosan concentrations may be associated with their higher viscosities, producing “sticky” solutions. The reduction in firmness during ripening has been attributed to chemical modifications and degradation of cell wall components^[19], as well as to the decrease in the integrity

of the fruit^[8]. The decrease in fruit firmness contributes to a higher susceptibility to the attack by microorganisms and to a lower impact resistance.

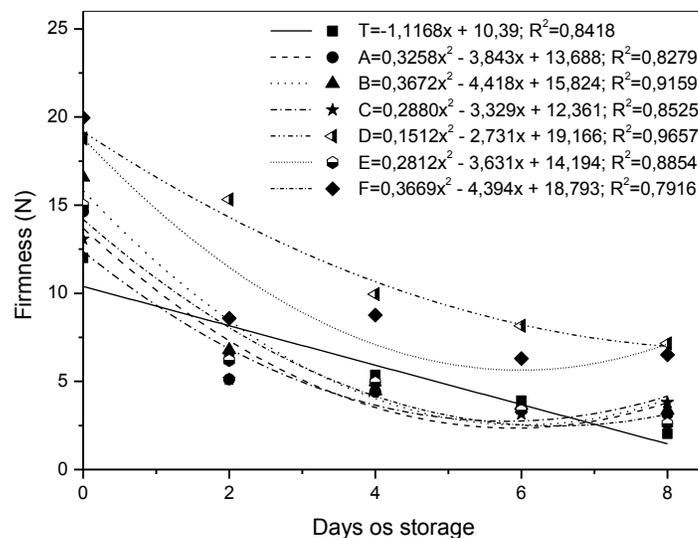


Figure 3. Firmness of guava Pedro Sato coated and not coated with chitosans for 8 days of storage.

Total pectins are important for the postharvest conservation of fruits^[19], since they are structural components of the cell wall and middle lamella, and influence their texture. It is observed that, during storage, there was an increase in the contents of total pectin for all treatments analyzed (Figure 4). This may be due to water loss during storage for all treatments, resulting in a higher concentration of this pectin. It is observed that, at the beginning of storage, the fruits had similar contents of total pectin. At the end of storage, the fruits with smaller weight losses (coated with chitosan 3142) also presented the lowest contents of total pectin. These results of the agreement to those reported by Vila^[21] e Linhares; Santos; Abreu^[15]

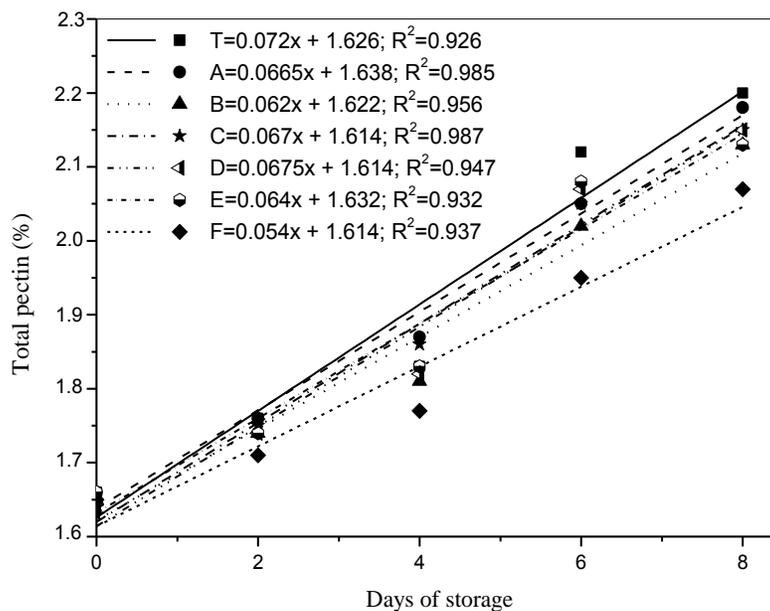


Figure 4. Contents of total pectin in guava Pedro Sato coated and not coated with chitosans for 8 days of storage.

In Figure 5 it is observed that, throughout ripening, an increase in the contents of soluble pectin, which is usually accompanied by a decrease in protopectin, occurred for all treatments. This is due to the action of proteolytic enzymes that degrade protopectins, transforming them into soluble pectins, causing softening in fruits. The fruits coated with chitosan 3142 were those who had lower contents of soluble pectin (2%) at the end of storage, when compared to the fruits of other treatments (0,65%), these groups also presented greater firmness on the eighth day of storage (Figure 3), unlike the fruits that received no coating, which had the lowest texture and the highest content of soluble pectin at the end of the storage, indicating a higher metabolism in relation to the

coated fruits. Coating decreased gas exchange with the environment by slowing the ripening process, with subsequent maintenance of the quality of the fruit.

The results of soluble pectin comply with Reyes^[22] which determined the pectinic content from different parts of guava at different stages of maturity, they observed a content in the pulp and inner cavity PS values around 0.56 and 1.07 mg.100g⁻¹. Xisto^[6] found pectin soluble levels between 0.09 to 0.39% of galacturonic acid, which is consistent to that observed by Vila^[21], who also observed an increase in PS levels and protopectin.

Linhares^[15] analyzing guavas 'Pedro Sato' treated postharvest with calcium chloride and 1-methylcyclopropene and stored under refrigeration, observed that the soluble pectin content increased with maturity pointing out the fruits treated with calcium chloride and with 1-MCP, which showed lower levels and percentage of slower solubilization, which possibly contributed to the softening of the fruit was less pronounced, indicating that these treatments can influence and reducing or slowing the activity of pectic enzymes

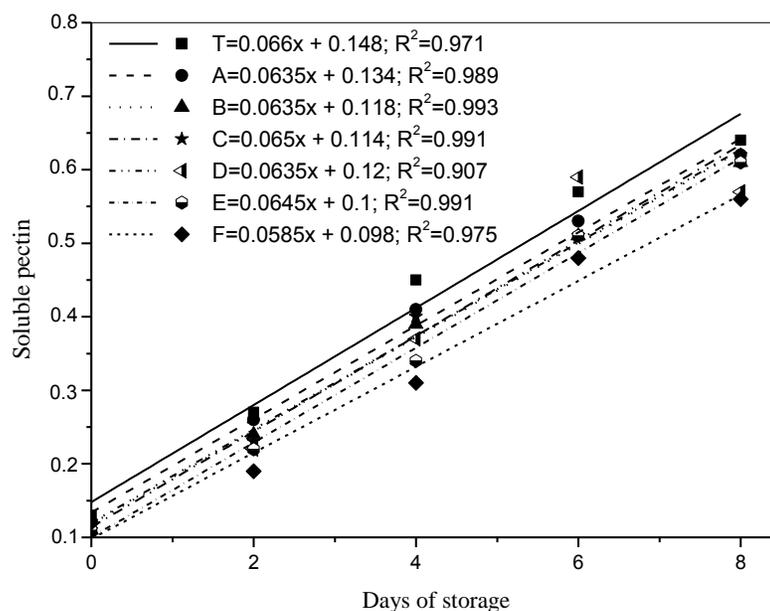


Figure 5. Contents of soluble pectin in guava Pedro Sato coated and not coated with chitosans for 8 days of storage.

Various chemical transformations, primarily related to the content of carbohydrates, organic acids and pectins, occur during fruit ripening and are commonly associated with the action of specific enzymes, such as: pectin methylesterase (PME) and polygalacturonase (PG), enzymes capable of degrading pectic substances, found in the cell wall and middle lamella of parenchyma cells of various fruits and vegetables^[8]. However, in guava, the activity of PG is not observed^[15]; it may be very low^[10,15] making the information on the activity of these enzymes contradictory, and the mechanisms that control ripening not clearly defined.

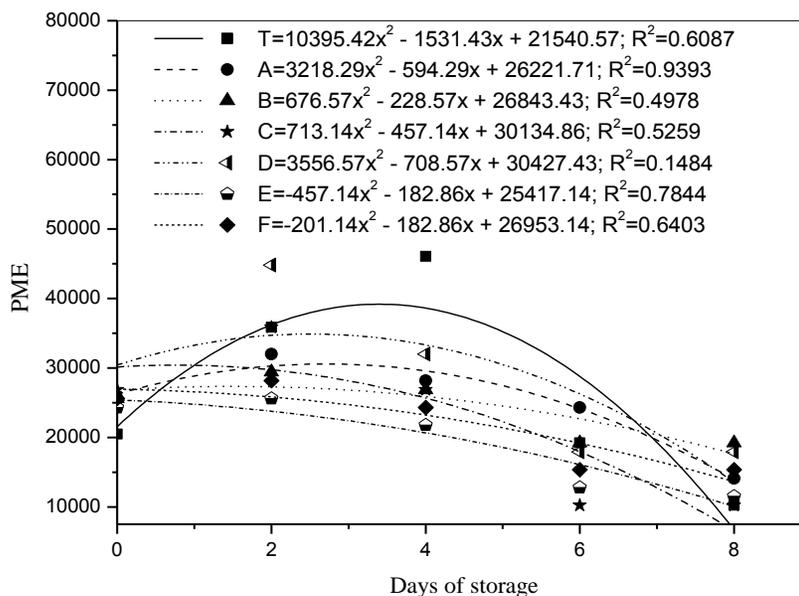


Figure 6. Variation in the activity of pectin methylesterase during storage.

All treatments showed the same behavior at the end of storage. The peak activity of PME, 460.8 (U.g⁻¹ fresh weight), was observed in the control group, on the fourth day of storage (Figure 5); it decreased from this point, indicating that the substrate of this enzyme (methylated pectins) was already reduced, and the enzymes that degrade pectins in the middle of the chain were already active. The increase in the activity of PME followed by a decrease was observed for the other treatments, but with lower intensities, when compared with the fruits of the control treatment. The lower activity of this enzyme at the end of storage was observed in groups T and C, both with 102.4 (U. g⁻¹ fresh weight). In the study cultivar, the highest activity on day 0 was observed in group C (268.8 U. g⁻¹ fresh weight) and the lowest activities at the end of storage were observed in groups T and C (102.4 U g⁻¹ fresh weight).

4. Conclusions

All treatments used in this study were effective in extending the quality of the fruits of Pedro Sato guava, compared with the fruits of the control treatment. At a concentration of 1.5%, chitosan 3142 showed the best results in quality maintenance during 8 days of storage, being suitable for consumption. Treatments with different concentrations of chitosan have extended the quality of the fruit for over four days, since the fruits with no treatment showed unfit for consumption from the fourth day of storage.

5. Acknowledgments

The authors would like to thank CNPq, Capes and FAPEMIG.

6. References

1. Dantas, A.,E.; Costa, S. S.; Cruz, S., L.; Bramont, B. W.; Costa. S., A.; Padilha, F., F.; Druzian, I., J.; Machado, S., A., B. (2015). Caracterização e avaliação das propriedades antioxidantes de filmes biodegradáveis incorporados com polpas de frutas tropicais. *Ciência Rural*,45 (1), 142-148. doi:10.1590/0103-8478cr20131458.
2. Ribeiro, V. G.; Assis, J. S.; Silva, F. F.; Siqueira, P.P.X.; Vilaronga, C. P. P. (2005). Armazenamento de goiabas 'Paluma' sob refrigeração e em condição ambiente, com e sem tratamento com cera de carnaúba. *Revista brasileira de fruticultura*,.27 (2), 203-206. doi: 10.1590/S0100-29452005000200005.
3. Guerra-Sánchez, M. G.; VegA-Pérez, J.;Velázquez-Del Valle, M. G. & Hernández-Lauzardo, A. N. (2009) Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pestic. Biochem.Physiol.*,93,18-22. doi:10.1016/j.pestbp.2008.09.001.
4. Agrawal, A. A.; Conner, K. J.; Johnson, T. J.; Wallsgrove, R. (2002). Ecological Genetics of an induced plant defense against herbivores: additive genetic variance and costs of phenotypic plasticity. *Evolution*. 56(11),2206-2213.doi:10.1554/0014-3820(2002)056[2206:EGOAIP]2.0.CO;2.

5. Vieira, S. M. J., Raga, A., Benedetti, B. C., Oliveira, R. A., Dimarco, P. G., Scarponi, A. P. T. (2014). Effect of ultraviolet-C radiation on “Kumagai” guavas infested by *Ceratitiscapitata* (*Diptera—Tephritidae*) and on physical parameters of postharvest. *Scientia Horticulturae*. 165, 295-302. doi.org/ 10.1016 /j.scienta. 2013.11.015
6. Xisto, A. L. R. P., Abreu, C. M. P., Corrêa, A. D., Santos, C. D.(2004). Texture of “Pedro Sato” guavas submitted to the application of calcium chloride. *Ciência e Agrotecnologia*. 28 (1), 113-118.
7. Oliveira, G., C., A. Zanão, P., F., C. (2006). Conservação pós-colheita de goiaba branca kumagai por irradiação gama: aspectos físicos, químicos e sensoriais. *B.Ceppa*. v.24(2),375-396.
8. Chitarra, M. I. F., Chitarra, A. B. (2005). *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo*. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
9. Pereira, L.; M. (2003). Vida de prateleira de goibas minimamente processadas acondicionadas em embalagens com atmosfera modificada. *Cienc. Tecnol. Aliment*. v.23(3),427-433.
10. Abreu, J. R., Santos, C. D., Abreu, C. M. P., Castro, E. M. (2012a). Histochemistry and morphoanatomy study on guava fruit during ripening. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.32 (1), 179-186.doi:10.1590/S0101-20612012005000019.
11. Yoshida, C. M. P.; Oliveira-JR, E. N. & Franco, T. T. (2008) Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. *Packing Technol. Sci*. 22, 161 – 170.doi: 10.1002/pts.
12. Mccready, R. M.,Mccoomb, E. A.(1952). Extraction and determination of total pectic materials in fruits.*Analytical Chemistry*. 42(12), 1586-1588.
13. Bitter, T.; Muir, H. M.A.(1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*. New York, 34 (4), 330-334.
14. Izzar, k Nur.; Awang, Y. (2015) Antioxidant, Polygalacturonase, Pectin Methylesterase and Polyphenol Oxidase Activities of Fresh-Cut Wax Apple (*Syzygium samarangense*) Treated with Organic Acids. *Asian Journal of Plant Sciences* 14(2), 72-77
15. Linhares, L. A., Santos, C. D., Abreu, C. M. P., Corrêa, A. D. (2007).

Chemical, physical and enzymatic transformations of guavas 'Pedro Sato' treated at postharvest with calcium chlorite and 1-methylcyclopropene and stored under refrigeration. *Ciência e Agrotecnologia*. 31 (3), 829-841.

16. Manica, I.; Icuma, I.M.; Junqueira, N.T.V.; Salvador, J.O.; Moreira, A.; Malavolta, E. (2000). *Goiaba*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 374p.
17. CERQUEIRA, T. S. et al. Recobrimento de goiabas com filmes protéicos e de quitosana. *Bragantia*, Campinas, v. 70, n. 1, p. 216-221, 2011.
18. Pinto, P. M., J. A. P., Cavalini, F. C., Cunha-junior, L. C., Inouell, K. N. (2010). Maturity stages of Kumagai and Pedro Sato"guava fruits for fresh cut. *Ciencia Rural*, 40 (1), 37-43.
19. Vilas Boas, B. M., Alves, A. P., Alves, J. A., Rodrigues, L. J., Alves, T. C., Vilas Boas, E. V. B. (2013). Physical, chemical and biochemical characterization of pequi fruit harvested at different stages of development. *Ciência Rural*. 43 (12), 2285-2290.
20. AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n. 2, p. 139-145, feb. 2004.
21. VILA, M. T. R. Chemical and biochemical characterization of guavas stored under refrigeration and modified atmosphere. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1435-1442, Sept/Oct. 2007
22. REYES, F. G.; MARTIN, M. S.; BOLANÕS, M. A. Determinação de pectina na goiaba (*Psidium guajava L.*), *Revista Brasileira de Tecnologia*, Brasília, v.7, n.3, p.313-315, 1976

ARTIGO 3**CHANGES IN CHEMICAL AND NUTRITIONAL COMPOSITION
DURING STORAGE OF GUAVAS COATED WITH CHITOSAN-BASED
FILM**

Rodrigo Martins Fráguas^{1*},
Paulo Rogério Siriano Borges³,
Enio Nazaré de Oliveira²,
Celeste Maria Patto Abreu¹

¹Laboratório de Bioquímica, Departamento de Química, universidade Federal de Lavras, 37200-00, Lavras, Minas Gerais; ²Departamento de Química, Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de São João Del Rey - Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco, Minas Gerais; ³Department of Food Science, Federal University of Lavras, MG, Brazil
**rodrigofraguas1@hotmail.com*

Abstract - The objective of this study was to evaluate the effects of chitosan-based coatings on the postharvest of guavas Pedro Sato under room conditions. (27°C ± 1°C) For this purpose, chitosans were used, as well as two concentrations, 0.5% and 1.5%, to which guavas were manually applied by immersion. Fruits without the application of chitosans were used as a control. The experimental design was completely randomized with seven treatments, 3 replications and 9 fruits per plot. Guavas were characterized immediately after harvest and evaluated at 2, 4, 6 and 8 days after treatment application. The treatments had little effect on total soluble solids, titratable acidity and ascorbic acid. However, they were efficient in delaying peel color changes and the levels

of lycopene and beta-carotene. The treatments with chitosan 3529 and 3142 have potential for use in guavas.

Keywords: Guavas, Chitosan, Conservation

1. Introduction

Guava (*Psidium guajava* L.) is a fruit native to Brazil and its cultivation is currently important for a lot of countries of tropical and subtropical regions, due to its capacity for growth, production (Hong, 2012) and excellent acceptance for fresh consumption (Martínez, 2012; Bashir, 2003). Thus, its consumption has increased internationally, and Brazil is the world's largest producer of red guava today (Zambrano-Zaragoza, 2013; Vieira et al., 2014).

Guava stands out for its nutritional value, being one of the best sources of vitamin C and carotenoids among cultivated fruit trees, with lycopene as the predominant carotenoid (Dantas et al., 2015). Its high perishability and nutritional value instigate studies in an attempt to extend their shelf life (Xisto, 2004). Among the strategies used to extend their shelf life, coating methods are widely studied in guava (Assis et al., 2014). The treatments used in these methods modify the circulating air inside the fruit, reducing the levels of O₂ and increasing CO₂ levels. Consequently, they reduce the metabolism of the fruit, slowing senescence.

Among these coatings, chitosan stands out as an edible biopolymer, non-toxic, soluble in dilute solutions of acetic acid, with an excellent filmogenic capacity, enabling its application by immersion in fruits (Santana, 2013). Therefore, this study aimed to determine the effect of an edible chitosan coating in maintaining the quality of guavas cv. Pedro Sato for eight days of storage at room temperature.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of chitosan solutions

Chitosan samples (Chitoclear) with different molar weights were kindly provided by Primex Ehf (Siglufjörður, Iceland), in three different batches: 3493, 3529 and 3142. They were used in the preparation of treatments and coded according to Table 1. For the preparation of chitosan solutions, the procedure described by Yoshida et al. (2009) was followed. The samples were dissolved in acetic acid solutions at the ratio 1:99 (v/v), at concentrations of 0.5 and 1.5%. The solutions were then homogenized on a magnetic stirrer (Fisatom-711) at room temperature ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) for 24 hours until complete dissolution. They were then filtered using a 11- μm filter under vacuum.

2.2 Preparation of guavas

Guavas (*Psidium guajava* L.) from cv. Pedro Sato (350 fruits) were manually picked early in the morning at the half-mature ripening stage, with light green coloration (Abreu et al., 2012a), in a commercial orchard located in the municipality of Lavras, Minas Gerais, Brazil, altitude 845 m, latitude 21.15° S and longitude 45.22° W. They were placed in previously sterilized polyethylene boxes and transported to the Biochemistry Laboratory, in the Chemistry Department of Universidade Federal de Lavras, MG. The fruits were selected based on size, color and absence of visual injuries, washed in tap water and separated into 7 groups of 9 fruits for the composition of the treatments. All fruits were immersed in a 0,1% sodium hypochlorite solution at room temperature for 5 minutes for disinfection. After drying the hypochlorite solution, the fruits were numbered and treated with chitosan in the respective solutions (Table 1) for 10 seconds and then placed to dry in backrests, by the peduncle. The concentrations of the prepared solutions, viscosity and molecular weight of the chitosan samples used are given in Table 1.

Table 1: Physicochemical characteristics and concentration of chitosans used in six treatments (A, B, C, D, E, F) of guava (*Psidium guajava* L., cv. Pedro Sato) coatings, and a control.

Tratamentos	Chitosan	Molar Weight (kDa)*	Viscosity (mPa × s) ^{1*}	Concentração utilizada (%)
Testemunha	-	-	-	-
A	3493	132±1.0	5	0,5
B	3493	132±1.0	5	1,5
C	3529	228±9.0	520	0,5
D	3529	228±9.0	520	1,5
E	3142	245±2.0	1300	0,5
F	3142	245±2.0	1300	1,5

* Information provided by the manufacturer (Primex Ehf - Siglufjörður, Iceland)

After drying of the coating, the fruits were stored for a period of eight days at $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of $53\% \pm 1\%$. The samples were prepared for analyses on the day of harvest and every other day until the end of the storage period (day 8). Therefore, three fruits of each plot were taken every day during the analysis. They had the endocarps removed and the pulp chopped into pieces of approximately 1cm^3 . The pieces were manually homogenized and stored in plastic pots capped at -20°C for subsequent analyses.

2.3 Experimental design

A completely randomized design (CRD) was used in a factorial scheme (7x5), with seven treatments (Control, A, B, C D, E, F) and 5 storage times (day 0, 2, 4, 6 and 8), with three replications for each treatment. The experimental portion consisted of 3 fruits. Data was submitted to variance analysis by the F test at 5% probability. When significant, data were subjected to regression analysis. When a significant effect of the applied treatments was observed, the means were grouped by the Tukey test at 5% probability and, in case of a significant effect of time, regression analysis was used.]

2.4 Analytical procedures

2.4.1 Hydrogen potential (pH)

Ten grams of the fruit were homogenized with 40 mL water and filtered through filter paper. For the determination of the pH of the samples, a potentiometer (Gehaka TG1800, São Paulo, Brazil) previously calibrated with standard solutions of pH 4.0 and 7.0.

2.4.2 Total Soluble Solids (SS)

Total soluble solids were determined by adding 2 drops of the filtrate obtained in the pH analysis in a PR-100 digital refractometer (ATAGO, Ribeirao Preto, Brazil), with automatic temperature compensation at 25°C. The results were expressed in g/100g fresh weight (AOAC, 2002).

2.4.3 Total Titratable Acidity (TA)

Total titratable acidity was determined in the filtrate described for pH; 3 drops of 1% phenolphthalein were added to the filtrate, which was then titrated with NaOH solution (0.1M) until the turning point. The results were expressed in g citric acid/100g⁻¹ fresh weight (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.4.4 Ratio

The ratio was calculated by the quotient between total soluble solids and total titratable acidity.

2.4.5 Coloration

The values of L* (lightness), C* (chroma) and h° (hue angle) were determined as recommended by McGuire (1992), using a CR-400 Minolta colorimeter (Konica Minolta, Tokyo, Japan) in three readings in the peel of each fruit. The equipment was calibrated with illuminant D65 (6900 K), opening of

10°, equivalent to daylight, angular transmission, calibrated with white porcelain plate (C6299 Hunter color Standard).

2.4.6 β -carotene and lycopene

The carotenoids were extracted in a mixture of acetone and hexane (40:60 v/v), in the absence of light. The obtained extracts were used for reading absorbances in a Varian Cary 50 spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, US) at four wavelengths: 435; 505; 645 and 663 nm. The results were expressed in mg of β -carotene or lycopene 100 g⁻¹ fresh weight (NAGATA; YAMASHITA, 1992).

2.4.6 Vitamin C

Vitamin C was extracted with an aqueous solution of oxalic acid (0.5:99.5 w/v), cold (5°C), under stirring, according to Hernandez et al. (2006), and quantified by the spectrophotometric method described by Strohecker and Henning (1967), using a calibration curve prepared with ascorbic acid and spectrophotometric reading at 520 nm. The results were expressed in mg 100g⁻¹ fresh weight.

2.4.7 Total phenolics

The extraction of phenolic compounds was performed with 50% methanol at reflux for three consecutive times at 80°C; the extracts were combined and evaporated to 25 mL (GOLDSTEIN & SWAIN, 1963). The extracts were subjected to dosage of phenolic compounds, using the Folin-Denis reagent, which is reduced by phenols to a blue complex in alkaline solution. The absorbance was measured at 760 nm in a spectrophotometer (AOAC, 2005) and the results were expressed in mg tannic acid 100 g⁻¹ fresh weight.

3. Results and Discussions

No significant interaction between treatment and time was observed, as well as isolated effects of treatment for pH ($p < 0.05$) (Figure 1).

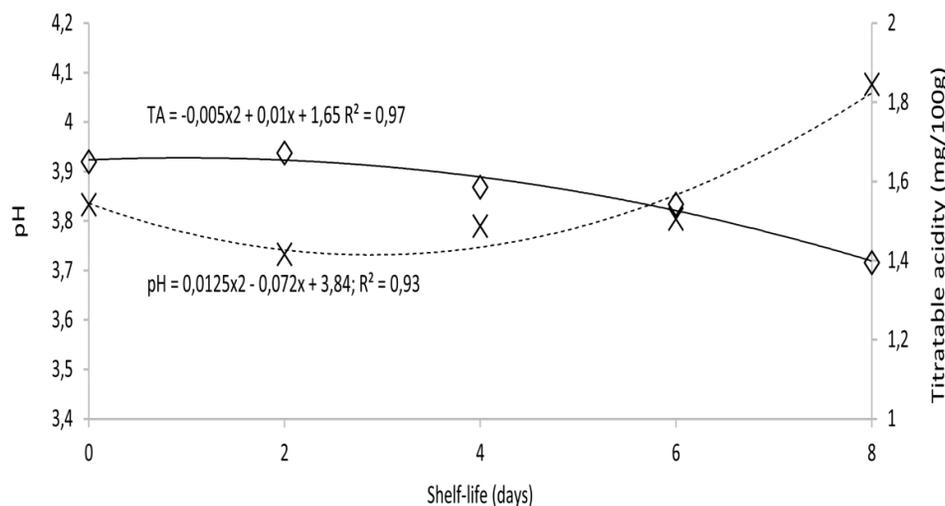


Figure 1 – pH of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

A significant effect of time was observed with the increase in pH ($p < 0.01$) during storage. The same was true for titratable acidity ($p < 0.01$), with a response inverse to pH, as expected, once they are inversely proportional scales (NASCIMENTO et. al., 1991b). The films did not influence the parameters pH and acidity of guava fruits during storage. The pH of the fruits on day 0 was 3.83 and, at the end of storage, it reached 4.1. The results are in agreement with those reported by Sato (2004), who worked with fresh guava.

A significant interaction between time and treatment was observed for soluble solids ($p < 0.05$). On the eighth day of storage, treatments A, B, C, D and the control were superior to the others, with values closer to the initial storage conditions (Figure 2).

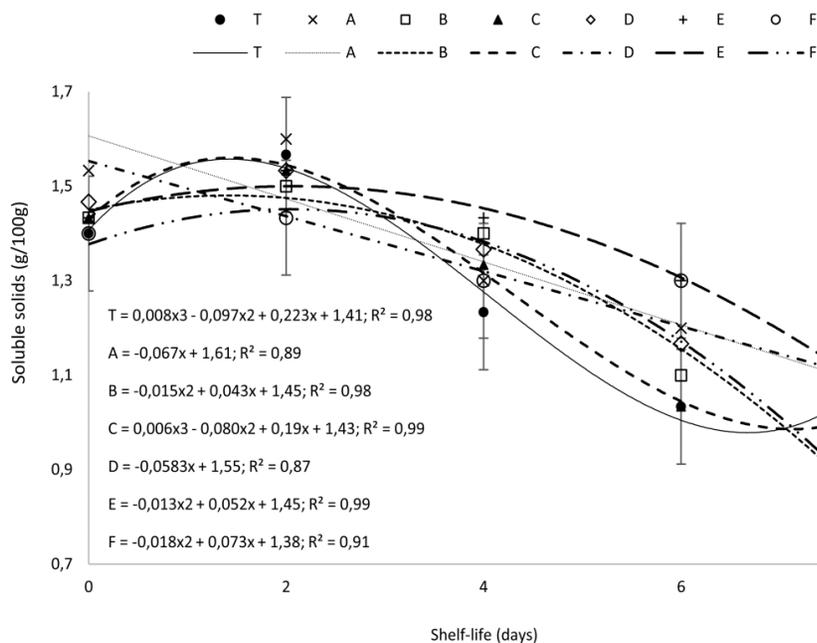


Figure 2 – Soluble solids of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

The control (T) showed the lowest SS values on the sixth day of storage, with an increase at the end of the period. The drop in SS of the control fruits from the 4th day, is due to the fact that these fruits are entering senescence, occurring degradation of sugars into organic acids. Treatments E and F presented the lowest drops in SS, indicating lower senescence in these fruits. The response of total soluble solids with guava ripening consists mainly of starch conversion into simple sugars, such as glucose, fructose and sucrose, consequently causing flavor changes, such as the increase in sweetness (Esteves and Carvalho, 1982; Abreu, 2012b). The values found are similar to those observed by Jacomino (2007), Xisto et al. (2004) and Lima et al. (2000).

A significant interaction between time and treatment was observed for the ratio. The highest ratio values were observed in treatment A (Figure 3), on

the second day of storage. The control showed the highest value at the end of the storage period, indicating an advanced ripening process. The ratio serves as an indication of fruit sweetness; thus, values lower than those presented by group T give an indication of the efficiency of coatings in slowing the ripening of the studied fruits.

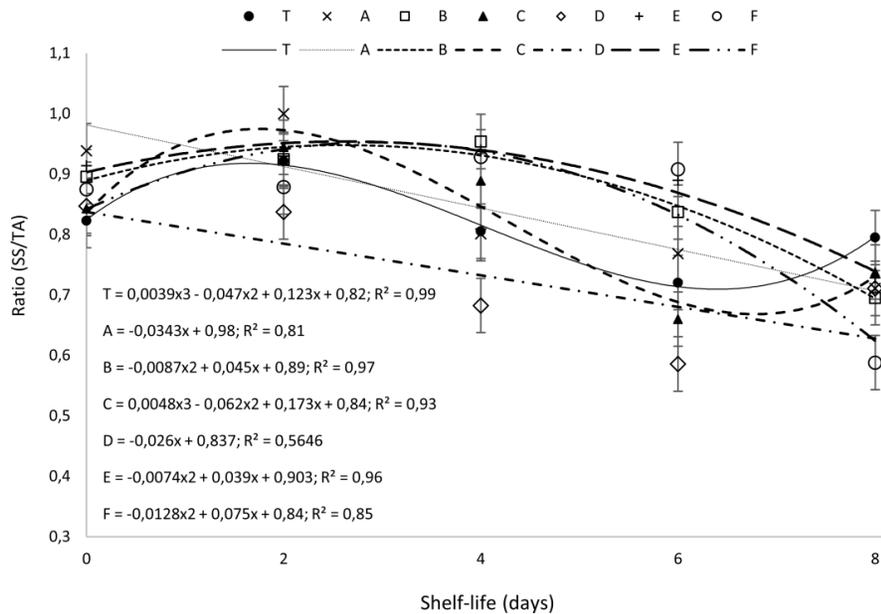


Figure 3 – ratio.

A significant interaction between treatment and time was observed for hue ($p < 0.01$). The skin color showed a decrease in the hue angle for treatments A, B, C, E, F and control during storage, indicating the switch from green to yellow (Figure 4).

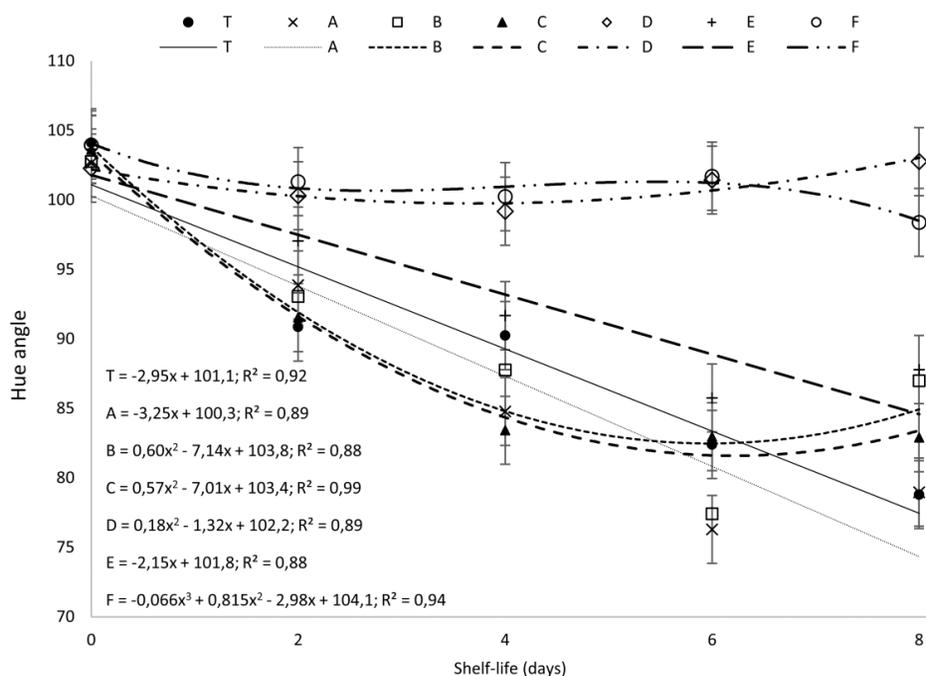


Figure 4 – Hue angle of guavas cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

The lowest color loss was observed at a concentration of 1.5% with chitosan 3529 (Treatment D), followed by the concentration of 1.5% with chitosan 3142 (Treatment F). At the end of storage, they presented hue values closer to those in the beginning of storage, thus indicating a lower loss of the green color. The hue angle (°h) significantly expressed differences in skin color, allowing an accurate view of color changes caused by ripening (Figure 4).

The best visual response for color was shown by Treatments F and D which, at the end of storage, showed colors closer to the beginning of storage (Figure 5).



Figure 5 – External appearance of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

Treatments T and A had similar colors, indicating an advanced stage of senescence, when compared with the other treatments. Treatments B, C and E, had a less intense green color; when compared to the best results (D and F), its fruits showed symptoms of decay, a characteristic which was not observed in treatments D and F.

The color of the fruit is the first criterion used by the consumer at the time of purchase. The main processes involved in the loss of the green color of the fruit during ripening are chlorophyll degradation and the synthesis of other pigments, such as carotenoids (Cross, 1987). Consequently, the decrease in the green color and the appearance of the yellow color are characteristic in various climacteric fruits, including guava (Azzolini, 2004; Abreu, 2012b). The values of the h° angle found in this study for guavas cv. Pedro Sato corroborate those reported by Mercado-Silva et al. (1998) and Azzolini (2004).

There was a significant interaction between time and treatment ($p < 0.01$) for lightness. On the first day of storage, the values of the control (T) and treatment A were higher than the other groups (Figure 6).

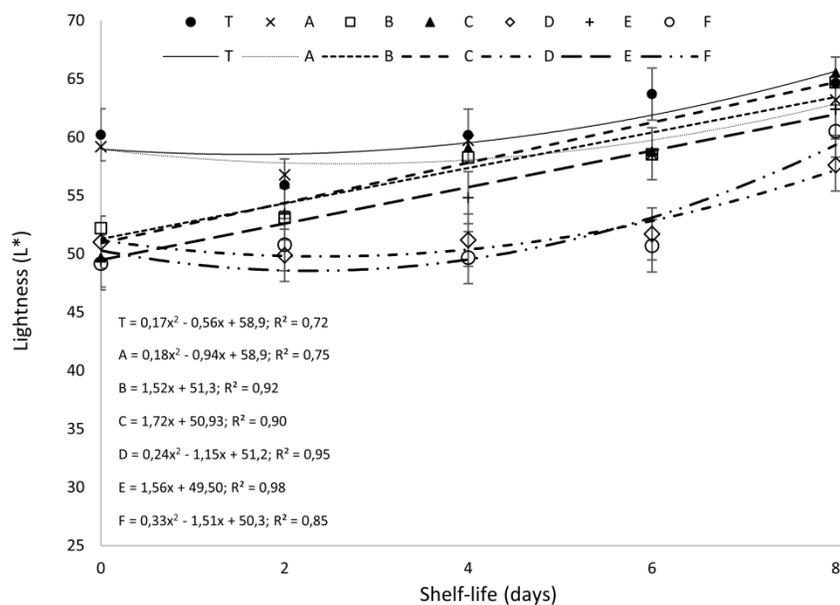


Figure 6 – Lightness of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

Treatment D showed the best lightness at the end of storage, followed by treatment F. In general, all treatments showed an increase in the values of L during storage. The increase in lightness values found in the seven treatments can be attributed to the light coating film formed by chitosan applied in the fruits (JACOMINO et al., 2007). On the other hand, Ribeiro et al. (2007) found no increase in lightness for strawberry coated with starch, carrageenan and chitosan. Lightness and appearance are important attributes in fruits and vegetables, making it interesting to use efficient edible films to increase lightness which, in combination with other characteristics, can favor consumer acceptance (Amariz, 2010).

There was a significant interaction between time and treatment for lycopene ($p < 0.01$), and all treatments had the same behavior. An increase in the content of lycopene during storage was observed for all treatments, and the largest increase was observed in treatment T (control) (Figure 7). The other groups reached the end of storage with similar contents.

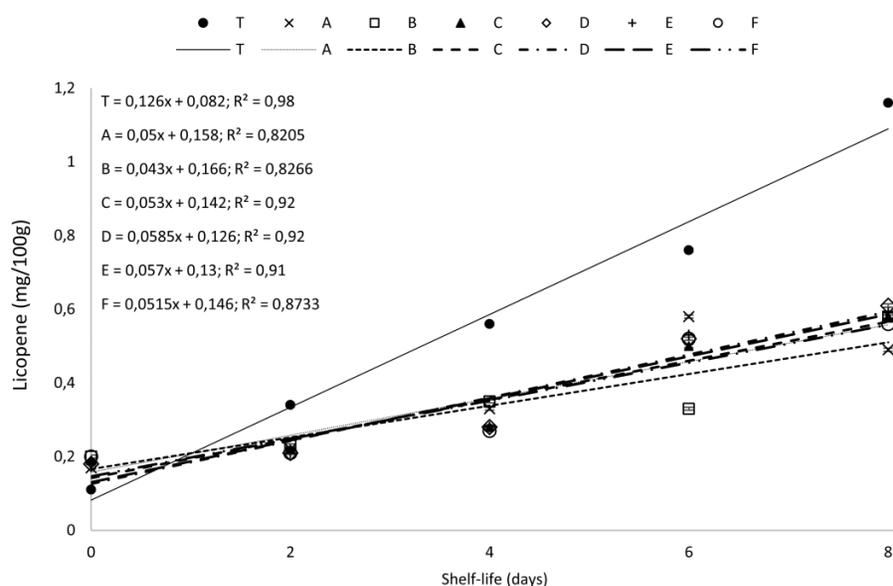


Figure 7 – Lycopene of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

The highest lycopene levels observed in the control on the last day of storage is an expected result, since lycopene is the pigment responsible for the red color in guavas, indicating advanced ripening. These results indicate the preservation of the initial characteristics of fruits treated with chitosan (A, B, C, D, E and F), confirming the results found for the hue angle (Figure 4). Lycopene can be found in fruits of common consumption, such as papaya, tomato and guava. Lycopene is easily incorporated into the liver and prostate, due to its acyclic structure, leading to the prevention and also reversal of oxidative

changes associated with the emergence of chronic degenerative diseases (CLINTON, 1998).

There was no significant interaction between time and treatment for β -carotene, as well as isolated effects of treatment (Figure 8) ($p < 0.05$).

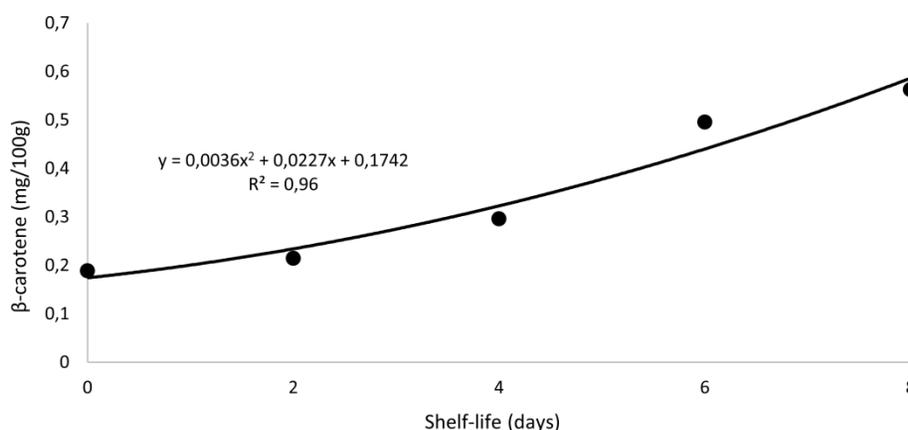


Figure 8 – β -carotene of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

There was an increasing trend in β -carotene levels for all treatments ($p < 0.01$); this result was expected, since this pigment is responsible for the orange color, characteristic of a ripe fruit (Silva, 2014; Mendonça, 2007). The values found at the end of storage are in accordance with those reported by Freire (2012).

For vitamin C (Figure 9), a significant interaction between time and treatment ($p < 0.01$) was observed. The general behavior was to increase the content of vitamin C during storage.

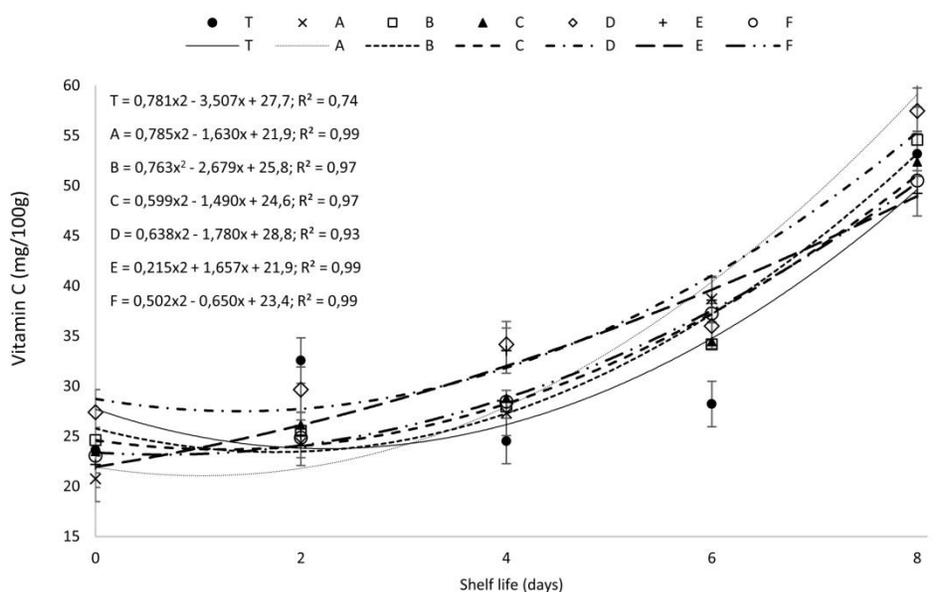


Figure 9 – Vitamin C of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

Treatment E reached the end of the storage period with a smaller amount of vitamin C (49.25 mg/100g), followed by F (50.52 mg/100g). Treatments D (57.48 mg/100g) and B (60.1 mg/100g) showed amounts of vitamin C higher than those found in treatment T (53.18 mg/100g), at the end of storage. The contents found are in agreement with those observed by McCook-Russell (2012), Freire (2012), Azzoline (2004) and Nascimento (1991 a, b).

There was a significant interaction between time and treatment for total phenolics ($p < 0.01$) (Figure 10).

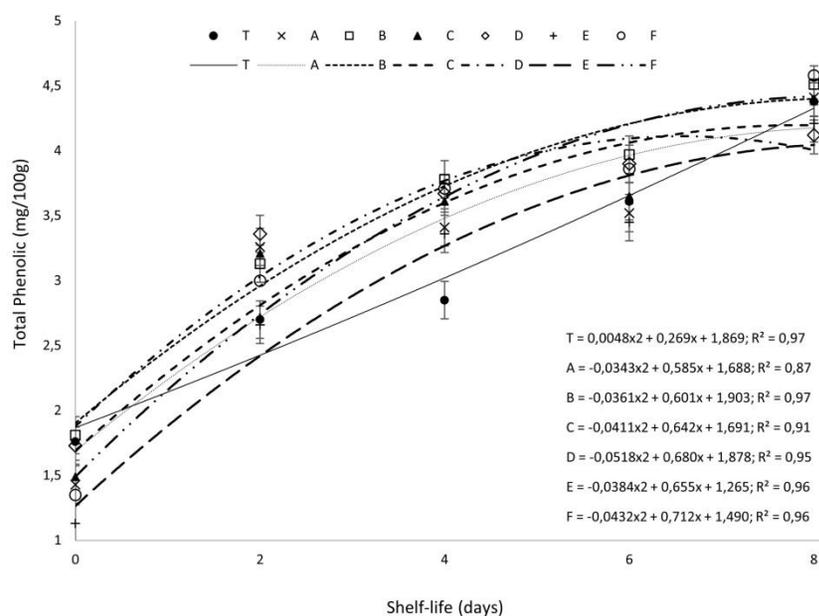


Figure 10 – Total phenolics of guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Pedro Sato coated with chitosans, and the control, for eight days.

The content of total phenolics at the end of storage increased for all treatments studied. Values lower than those observed in group T were found in treatments D, E and C on the eighth day, indicating loss of phenolic compounds in later ripening stages. The observed values are in agreement with those reported by Melo (2011) and Kuskosk (2012). Phenolic compounds are the most responsible for the antioxidant activity in fruits (Heim et al., 2002). Although vitamin C is considered by some authors as the major contributor to antioxidant activity in guavas, Sun et al. (2002) and Vieira et al. (2011) demonstrated that the contribution of vitamin C to the determination of antioxidant activity of 11 fruits, including guava, is low, and it is said that the greatest contribution to the total antioxidant activity of fruits is due to the composition of phenolic compounds. Fruits with a greener color have a higher amount of phenolic compounds of lower molecular weight and, as ripening occurs, phenolics

undergo a polymerization process. The technique used in this study detects phenolics of lower molecular weight; therefore, the fruits of the control had lower levels of phenolic compounds, due to their faster ripening.

4. Conclusions

The three chitosans used at different concentrations, helped in maintaining fruit peel color. All treatments led to the maintenance of lycopene contents at the end of storage. The best results were observed for treatment D, maintaining characteristics similar to the beginning of storage for all studied variables, except vitamin C.

5. Acknowledgments

The authors would like to thank Capes for the financial support.

6. References

ABREU, J. R. ;et al. ; Sugar fractionation and pectin content during the ripening of guava cv. "pedro sato". **Ciência e tecnologia de alimentos, campinas**, v. 32, n.1, p. 156-162, 2012b.

ABREU, J. R.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; CASTRO, E. M., 2012a.histochemistry and morphoanatomy study on guava fruit during ripening. **Ciência e tecnologia de alimentos**.32 (1), 179-186.

ANDRADE, S. A. C.; GUERRA, T. M. B.; RIBEIRO, M. A.; GUERRA, N. B., Emprego de revestimentos comestíveis de alginato e pectina de baixa metoxilação em alimentos: revisão. **B.ceppa**, curitiba, v. 26, p. 41-50, 2008

AMARIZI, M.; LIMA, M. A. C.; TRINDADE, D. C. G.;SANTOS A. C. N.; RIBEIRO, T. P., Recobrimentos à base de carboximetilcelulose e dextrina em

mangas 'tommy atkins' armazenada sob refrigeração. **Ciência rural**, v.40, n.10, out, 2010

ASSIS, G. B. O. **Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações**. Campinas, v. 17, n. 2, p. 87-97, abr./jun. 2014

AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U., Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estágios de maturação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 2, p. 139-145, fev. 2004.

AZZOLINI, M.; JACOMINO, P.A.; BRON, U. I., Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estágios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.2, p.139-145, fev. 2004

CLINTON, S. K., Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Revista. Nutrição**., Campinas, v. 56, p. 35-51, 1998.

CROSS, J. Pigments in fruit. **London: academic**, 1987. 303p.

DANTAS, A.,E.; COSTA, S. S.; CRUZ, S., L.; BRAMONT, B. W.; COSTA, S., A.; PADILHA, F., F.; DRUZIAN, I., J.; MACHADO, S., A., B. (2015). Caracterização e avaliação das propriedades antioxidantes de filmes biodegradáveis incorporados com polpas de frutas tropicais. **Ciência rural**, Santa Maria. V.45,n.1, p.142-148.

ESTEVES, M.T. DA C.; CARVALHO, V.D. de. Modificações nos teores de amido, açúcares e grau de doçura de seis cultivares de goiabeira (psidium guajava l.) Em diferentes estágios de maturação. **Ciência e prática**, v.6, p.208-218, 1982.

FREIRE, M. J.; ABREU, P. M. C.; CORREA, D. A.; SIMÃO, A. A. Avaliação de compostos funcionais e atividade antioxidante em farinhas de polpa de goiabas. **Revista Brasileira. Fruticultura**., Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 847-852, setembro 2012

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, oxford, v. 2, p.371-383,

HERNANDEZ, Y., LOBO, M. G., & GONZALEZ, M. (2006). Determination of vitamin c in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. **Food chemistry**, 96(4), 654-664.

HIND A. BASHIR, ABU-BAKR A. ABU-GOUKH. Compositional changes during guava fruit ripening. **Food chemistry** 80 (2003) 557–563.

JACOMINO, A.P. et al. Conservação de goiabas tratadas com emulsões de cera de carnaúba. **Revista brasileira de fruticultura**, v.25, n.3, p.401-405, 2003.

JACOMINO, A.P.; CAVALINI, F.C.; ARRUDA, M.C.DE; PINTO, P.M.; PINHEIRO, A.L.; athiê, s.m. goiaba e frutas cítricas: opções para o processamento mínimo. In: lobo, g.m.; gonzáles, m. (ed.). *Processado mínimo de frutas*. **Cartagena**: gráficas sabater, 2007. P. 55 – 69.

KAYANNE P; MCCOOK-RUSSELL; MURALEEDHARAN G. NAIR; PETREA C. FACEY CAMILLE S. Bowen-forbes. Nutritional and nutraceutical comparison of jamaican psidium cattleianum (strawberry guava) and psidium guajava (common guava) fruits. **Food chemistry** 134 (2012) 1069–1073.

KEQIAN HONG, JIANGHUI XIE, LUBIN ZHANG, DEQUAN SUN, DEQIANG GONG. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (psidium guajava l.) Fruit during cold storage. **Scientia horticulturae** 144 (2012) 172–178.

KONOZY, E. H. E., CAUSSE, M., FAUROBERT, M. Cell wall glycosidase activities and protein content variations during fruit development and ripening in three texture contrasted tomato cultivars. **Saudi journal of biological sciences**. 19 (3), 277-283. 2012

SILVA L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, R. I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry** 143 (2014) 398–404

LIMA, M.A.; DURIGAN, J.F. conservação de goiabas ‘pedro sato’ associando-se refrigeração com diferentes embalagens. **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v.22, p.232-236, 2000.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; MERCADO-SILVA, P.; RAMIREZ-ZAMORANO, M.A.; CORNEJO-VILLEGAS, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, D.; QUINTANAR-GUERRERO. Use of solid lipid nanoparticles (slns) in edible coatings to increase guava (psidium guajava L.) **Shelf-life. Food research international** 51 (2013) 946–953

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **Horticultural science**, Beltsville, v. 27, n. 12, p. 1254-1255, dec. 1992.

MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; MACIEL, M. I. S.; CAETANO, A. C. S.; LEAL, F. L. L.; **Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. Brazilian journal of food technology**, Campinas, v. 9, n.2, p. 89-94, 2006.

MENDONÇA, D. R.; FERREIRA, S. K.; DE SOUZA, M. L.; MARINHO, S. C.; TEIXEIRA, L. S.; **características físicas e químicas de goiabas cordibel 1’ e cordibel 4’ armazenadas em condições ambientais. Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.685-692, 2007.

MERCADO-SILVA, E.; BENITO-BAUTISTA, P.; GARCÍAVELASCO, M.A.; **fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico postharvest biology and technology**, v.13, n.2, 143-150, 1998

NASCIMENTO, L.M. DO; SANTOS, R.R. DOS; RIBEIRO, I.J.A.; MARTINS, F.P.; YOTSUYANAGI, K.; COUTINHO, J.R.; **caracterização físico-química**

dos frutos de 22 cultivares de goiabeiras (*psidium guajava* l.) Durante o processo de maturação. **Revista brasileira de fruticultura, cruz das almas**, v.13, p.35-42, 1991b

NASCIMENTO, L.M. DO; SANTOS, R.R. DOS; RIBEIRO, I.J.A.; MARTINS, F.P.; YOTSUYANAGI, K.; COUTINHO, J.R.; caracterização físico-química dos frutos de 23 cultivares de goiabeiras (*psidium guajava* l.) Durante o processo de maturação. **Revista brasileira de fruticultura, cruz das almas**, v.13, p.25-34, 1991a.

RAMOS, A. M.; FREITAS, G. B.; NEVES, E. G. F.; FREITAS, L. M. S.; Goiaba: boas práticas agrícolas para produção destinada à agroindústria.ed. **Suprema**, viçosa, mg, 2010. 90p.

MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M.A.; FIGUEIROA, J. G.; PÉRES-ÁLVARES, J. A.; VIUDA-MARTOS, M.; Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food chemistry** 135 (2012) 1520–1526.

SANTANA, M. C. C. B.; MACHADO, B. A. S.; SILVA, T. N. & NUNES, I. L.; **Ciênc. Rural**, 43, p.544 (2013).

VIEIRA, S. M. J., RAGA, A., BENEDETTI, B. C., OLIVEIRA, R. A., DI MARCO, P. G., SCARPONI, A. P. T.; 2014. Effect of ultraviolet-c radiation on “kumagai” guavas infested by *ceratitis capitata* (*diptera—tephritidae*) and on physical parameters of postharvest. **Scientia horticulturae**. 165, 295-302

XISTO, A. L. R. P.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; 2004. Texture of “pedro sato” guavas submitted to the application of calcium chloride. **Ciência e agrotecnologia**. 28 (1), 113-118.

SATO, A. C. K.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CUNHA R. L.; AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E SENSORIAL DE PREFERÊNCIA DE GOIABAS EM CALDA INDUSTRIALIZADAS. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(4): 550-555, out.-dez. 2004