

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA,  
MICROSCÓPICA E SENSORIAL DA N-CARBOXIMETILQUITOSANA  
EM SOLUÇÃO E FILME

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias  
da Universidade Federal de Santa Catarina como  
requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência  
dos Alimentos.

Orientadora: Profª Dra Evanilda Teixeira  
Co-orientador: Profº Dr Clóvis Antonio Rodrigues

MARIA ENÓI DOS SANTOS MIRANDA

Florianópolis – SC

Novembro / 2004

MIRANDA, Maria Enói dos Santos

Caracterização físico-química, bioquímica, microscópica e sensorial da N-carboximetilquitosana em solução e filme. Maria Enói dos Santos Miranda. Florianópolis, 2004.

151p.:Graf.; fig.; 29 cm

Anexos

Tese Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004.

Orientadora: Dra. Evanilda Teixeira

Banca Examinadora: Dra. Evanilda Teixeira, Dr. Clóvis Antonio Rodrigues, Dr. César Augusto Tischer, Dra. Alicia de Francisco, Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dr. Ernani Sebastião Sant´Anna.

Bibliografia

1. N-carboximetilquitosana. 2. Quitosana. 3. Biofilme.

## AGRADECIMENTOS

À Deus

À minha filha amada, você é tudo para mim.

Ao Alex pelo incentivo e apoio.

À minha família que é meu porto seguro, minha eterna gratidão.

À professora Dra. Evanilda Teixeira por mais uma vez me aceitar como sua orientada, pelo carinho, compreensão, dedicação, amizade e confiança.

Ao Clóvis A. Rodrigues, meu co-orientador, pelo apoio técnico e principalmente por estar sempre disposto a ajudar a todos, você é um exemplo.

À UNIVALI e a UFSC pela oportunidade concedida para o aprimoramento da minha formação acadêmica.

Ao colega Rilton A. de Freitas, pela colaboração e pela amizade. Amigo você é um grande professor e pesquisador, continue assim, vale a pena.

Ao colega e amigo José R. Bresolin, muito obrigado pelo apoio, incentivo e aprendizado.

Às minhas amigas guerreiras Regina C. S. Andreazza e Magali B. Schuhmacher, obrigado por tudo, sempre serei grata a vocês.

Ao grupo de degustadores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

A EPAGRI – São Joaquim, pela atenção e apoio dispensados durante o trabalho.

As amigas Elza M. Meinert e Renata D. M. C. Amboni, pelo apoio nas análises sensoriais e amizade.

Aos meus colegas e amigos Roberto Della Vecchia, Cristiani Burger, Fatima C. Buzzi, Angela Malheiros, Cesar A. Tischer e Rivaldo Niero pelo companherismo e apoio.

Aos amigos Johnson e Cristina pela força e energia, valeu.

Aos meus alunos que são uma fonte inesgotável de energia e incentivo para a busca do conhecimento.

Aos amigos Maria Luiza e Armando, vocês são especiais para mim, obrigada por tudo.

A grande amiga e companheira de todas as horas Adriana Bramorski, pode contar comigo sempre.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização desta pesquisa.

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da quitina e da quitosana.....	19
FIGURA 2	Representação gráfica dos comportamentos de fluxo Plástico (A), Pseudoplástico (B) e Newtoniano (C).....	49
FIGURA 3	Definição de viscosidade instantânea e viscosidade aparente.....	50
FIGURA 4	Representação do regime diluído, semidiluído e concentrado.....	53
FIGURA 5	Determinação gráfica da viscosidade intrínseca.....	54
FIGURA 6	Reação de obtenção da NCMQ.....	65
FIGURA 7	Modelo de ficha para a quantificação dos atributos sensoriais de maçãs, cultivar Catarina.....	77
FIGURA 8	Curva de titulação condutivimétrica da NCMQ.....	80
FIGURA 9	Perfil de eluição da NCMQ analisada por cromatografia de exclusão estérica acoplado a detector de índice de refração e espalhamento de luz.....	81
FIGURA 10	Curva da viscosidade intrínseca $[\eta]$ de NCMQ em KCl 0,1 M.....	83
FIGURA 11	Curva da viscosidade intrínseca $[\eta]$ de NCMQ em NaCl 0,1 M....	84
FIGURA 12	Curvas de viscosidade de NCMQ 2% (m/v) em água e em NaCl 0,1 M.....	85
FIGURA 13	Curvas de viscosidade de NCMQ em NaCl 0,1M .....	86
FIGURA 14	Viscosidade específica obtida em em <i>shear</i> zero em função da concentração polimérica da NCMQ em NaCl 0,1 M.....	87
FIGURA 15	Viscosidade específica de NCMQ obtida em <i>shear</i> zero em função do parâmetro de recobrimento.....	87
FIGURA 16	Gráfico de Arrhenius de NCMQ em NaCl 0,1 M, na velocidade de cisalhamento de $80 \text{ s}^{-1}$ ,.....	88
FIGURA 17	Curva $\log a_t$ versus $1/T$ de soluções de NCMQ a 2 % em diferentes temperaturas ( $t=20,30$ e $40^\circ\text{C}$ ), com $t_0 = 20^\circ\text{C}$ .....	89
FIGURA 18	Gráfico de $\ln/a$ versus o recíproco da temperatura ( $^\circ\text{K}$ ) para solução de NCMQ 2 % em NaCl 0,1 M.....	89
FIGURA 19	Curva de perda de peso da quitosana e NCMQ a $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob fluxo de $\text{N}_2$ a $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .....	90
FIGURA 20	Curva de perda de peso derivada (dTG) sobreposta a $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ sob fluxo de $\text{N}_2$ a $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ da quitosana e NCMQ.....	91
FIGURA 21	Velocidade de aquecimento ( $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) em função da recíproca da temperatura absoluta.....	92
FIGURA 22	Energia de ativação ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) em função do fator de conversão (á %) da quitosana e NCMQ.....	93
FIGURA 23	Constante de velocidade ( $\text{min}^{-1}$ ) em função do fator de conversão (á %) da quitosana e da NCMQ a $100^\circ\text{C}$ . .....	94
FIGURA 24	Micrografia panorâmica da superfície de filmes de NCMQ (a) e de quitosana (b) por MEV (1500 x). .....	99
FIGURA 25	Micrografia da seção transversal de filmes de NCMQ (a) e de quitosana (b) por MEV (70 x).....	100
FIGURA 26	Micrografia da seção transversal de filmes de NCMQ (a) e de quitosana (b) por MEV (600 x).....	101

FIGURA 27	Armazenagem (símbolos cheios) e módulo de perda (símbolos abertos) da quitosana (símbolo circular) e NCMQ (símbolo quadrado).....	104
FIGURA 28	Valor médio de bactérias mesófilas determinadas em amostras de maçã cultivar Catarina com e sem filme de NCMQ, refrigerada e a temperatura ambiente.....	106
FIGURA 29	Valor médio de bolores e leveduras determinadas em amostras de maçã cultivar Catarina com e sem filme de NCMQ, refrigerada e temperatura ambiente.....	106
FIGURA 30	Fruto recoberto com filme de NCMQ evidenciado sua ruptura após um mês de armazenamento.....	107
FIGURA 31	Perfil sensorial de maçãs cultivar Catarina armazenadas a temperatura ambiente e refrigeradas com e sem filme de NCMQ, nos períodos analisados.....	109

## ÍNDICE DE TABELAS E QUADRO

TABELA 1	Principais fontes de quitina.....	15
QUADRO 2	Principais características dos frutos dos cultivares EPAGRI 402-Catarina, Fuji e Gala. Estação Experimental de São Joaquim, SC – 1996.....	62
TABELA 3	Composição das dietas para o ensaio biológico (g/Kg).....	71
TABELA 4	Descrição dos atributos sensoriais utilizados para avaliar a maçã cultivar Catarina, adaptados de Karlsen et al. (1999). ....	76
TABELA 5	Conteúdo de umidade, cinzas, proteínas e carboidratos da quitosana e da NCMQ.....	79
TABELA 6	Valores de viscosidade relativa, específica e reduzida para soluções de NCMQ (m/v), em KCl 0,1 M*.....	82
TABELA 7	Valores de viscosidade relativa, específica e reduzida de NCMQ (m/v), em NaCl 0,1 M*.....	84
TABELA 8	Temperatura de degradação e porcentagem de perda de peso da quitosana e NCMQ a velocidade de aquecimento de 4°C.min <sup>-1</sup> .....	90
TABELA 9	Média de consumo alimentar e ganho de peso dos animais nas diferentes dietas.....	95
TABELA 10	Efeito das diferentes dietas sobre a excreção de gordura fecal.	95
TABELA 11	Concentração plasmática de colesterol, frações e triglicerídios no início e no 28 <sup>o</sup> dia de experimento em animais alimentados com diferentes dietas.....	97
TABELA 12	Variação das médias dos níveis de colesterol plasmático, frações e triglicerídios em ratos da linhagem Wistar.....	97
TABELA 13	Comparação de valores de tensão máxima e deformação na ruptura de vários filmes.....	103
TABELA 14	Escores médios conferidos aos atributos sensoriais de maçãs cultivar Catarina com e sem filme de NCMQ à temperatura ambiente e refrigerada, nos diferentes períodos avaliados. ....	108

## RESUMO

A N-carboximetilquitosana (NCMQ) é um polieletrólito com cargas negativas, formada a partir da carboximetilação da quitosana. A derivatização consiste na reação do grupo amino livre da quitosana com ácido glioxílico, produzindo um gel solúvel com grupamentos imino que sofrem redução com borohidreto de sódio. Neste trabalho foi obtida a NCMQ com grau de substituição de 20,88 % . A NCMQ foi analisada por cromatografia de exclusão estérica acoplado a detector de índice de refração e espalhamento de luz (*light scattering*), para avaliação da distribuição de massa molecular. A determinação da viscosidade  $[\eta]$  foi realizada a 25 °C, medindo-se inicialmente os tempos de escoamento de soluções de NCMQ de 0,02-0,1 % (m/v), contendo diferentes sais (NaCl e KCl), na concentração de 0,1 M. Os resultados indicam que pode haver uma influência do sal na determinação da  $[\eta]$ , provavelmente resultante da mudança conformacional do polímero devido a distintas interações dos cátions com os grupos aniônicos do polímero. A solução aquosa de NCMQ 2 % (m/v) apresentou comportamento tipo pseudoplástico, relativamente discreto, caracterizado pela diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento. O comportamento típico de polieletrólito foi observado ao comparar as viscosidades do polímero, maiores em água do que em NaCl 0,1 M. É evidente a influência da concentração no aumento da viscosidade das soluções de NCMQ, apresentando valor de  $c^*[\eta] \approx 2,0$ , considerando-se a transição do regime diluído para o semidiluído. Na degradação térmica da NCMQ foi possível observar dois eventos: o primeiro a ~250 °C e o segundo evento que ocorreu a  $T_m$  de ~602 °C. Analisando a NCMQ, a  $E_a$  aumentou a uma velocidade constante (k) e diminuiu em função do fator de conversão ( $\alpha$  %), indicando um lento processo de degradação a 100 °C. No experimento com ratos Wistar machos adultos, divididos em quatro grupos recebendo dieta controle (1), dieta hiperlipídica (2), dieta hiperlipídica suplementada com 5 % de quitosana (3) e dieta hiperlipídica suplementada com 5 % NCMQ, não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso e consumo alimentar entre os diferentes grupos. A dieta suplementada com quitosana foi a que apresentou maior capacidade de excreção fecal comparado com o grupo NCMQ. As dietas controle, hiperlipídica e suplementada com quitosana não apresentaram diferenças significativas quanto aos níveis séricos de colesterol, LDL e HDL-colesterol, demonstrando pequenas alterações. Porém, os níveis de colesterol total e LDL foram significativamente mais elevados no grupo NCMQ. Os níveis séricos de triglicerídios não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O filme de NCMQ possui maior resistência mecânica e alto valor de  $E'$ , em relação ao filme de quitosana, esta propriedade provavelmente foi gerada pela orientação das fibras no filme se apresentarem nos dois sentidos, horizontal e vertical, sugerindo um entrecruzamento entre elas. Fato este observado pela microscopia eletrônica de varredura. A ruptura prematura do filme de NCMQ aplicado nas maçãs cultivar Catarina pode ser devido à ausência de um plastificante. A aplicação do filme de NCMQ em maçãs, cultivar Catarina, não alterou propriedades sensoriais como odor, sabor e suculência, tanto nas amostras armazenadas a temperatura ambiente ou mantidas sob refrigeração. Cor e brilho da casca e dureza das amostras refrigeradas receberam escores superiores, independente da aplicação do filme de NCMQ.

## ABSTRACT

N-carboximethylchitosan (NCMQ) is a polyelectrolyte with positive charge, formed from chitosan's carboximethylation. Derivatization consists of the reaction of chitosan's free amino group with glyoxilic acid, producing a soluble gel with imino groupings that undergo reduction with sodium borohydrate. In the present work NCMQ with a substitution degree of 20.88% was obtained. NCMQ was analyzed by an esteric exclusion chromatograph coupled with a refraction index detector and light scattering, for the evaluation of the molecular mass distribution. The viscosity  $[\eta]$  determination was accomplished at 25°C, initially measuring the flowing off time of 0.02-0.1% (m/v) NCMQ solutions containing different salts (NaCl and KCl) at a 0.1M concentration. Results indicate there could be an influence of the salt in  $[\eta]$  determination, probably from the resulting polymers conformational change due to distinct interactions with the anionic polymer's groups. The 2% (m/v) NCMQ aqueous solution presented a relatively discreet pseudoplastic type behavior, characterized by a decrease in viscosity with the increase of the splitting velocity. A typical polyelectrolyte behavior was observed when polymer's viscosities were compared, higher in water than in NaCl 0,1M. The influence of the concentration on the viscosity increase of the NCMQ solutions is evident, presenting a value of  $c^*[\eta] \approx 2.0$ , considering the transition from a diluted to a semidiluted regimen. At the thermal degradation of NCMQ two events could be observed: the first at ~250°C and the second occurred at a  $T_m$  of ~602°C. Analyzing the NCMQ, the  $E_a$  increased at a constant velocity (k) and decreased due to the conversion factor ( $\alpha$  %), indicating a slow degradation process at 100°C. At the experiment with male adult Wistar rats, divided into four groups which received control diet (1), hyperlipid diet (2), hyperlipid diet supplemented with 5% chitosan (3) and hyperlipid diet supplemented with 5% NCMQ, no significant differences were observed in weight gain and food consumption among different groups. The chitosan supplemented diet presented the higher fecal excretion capacity when compared with the NCMQ group. Control, hyperlipid and chitosan supplemented diets presented no significant differences regarding to cholesterol, LDL and HDL-cholesterol serum levels, showing small changes. However, total and LDL-cholesterol levels were significantly higher on NCMQ group. Triglycerides serum levels presented no significant differences among groups. The NCMQ film has a higher mechanical resistance and higher  $E'$  value with regard to the chitosan film, this propriety probably being generated by fibers orientations on film which presented themselves on directions both horizontal and vertical, suggesting an intertwining between them. This fact was observed by scanning electronic microscopy. The premature rupture of the NCMQ film applied to the Catarina cultivar apples may be due to the absence of a plastificant. The NCMQ film application on Catarina cultivar apples did not change sensory properties like odor, flavor or juiciness, much the same in samples stored at room or refrigerated temperatures. Color and brightness of apple skin and hardness of refrigerated samples received higher scores, regardless of NCMQ film application.

## SUMÁRIO

	ÍNDICE DE FIGURAS	
	ÍNDICE DE TABELAS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
	SUMÁRIO	
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	EMBASAMENTO TEÓRICO.....	14
2.1	Quitina e quitosana.....	14
2.1.1	Síntese e purificação.....	19
2.1.2	Solubilidade.....	21
2.1.3	Degradação térmica.....	24
2.1.4	Grau de desacetilação.....	25
2.1.5	Aplicações.....	27
2.1.5.1	Tratamento de águas e efluentes.....	27
2.1.5.2	Processamento do papel.....	28
2.1.5.3	Aplicações médicas e farmacêuticas.....	28
2.1.5.4	Indústria de alimentos e agricultura.....	35
2.1.5.5	Indústria de cosméticos.....	37
2.1.5.6	Outras aplicações.....	37
2.1.6	Filmes de quitosana.....	37
2.1.7	N-carboximetilquitosana (NCMQ).....	43
2.1.8	Biofilmes.....	46
2.1.9	Caracterização.....	47
2.1.9.1	Reologia.....	47
2.1.9.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	55
2.1.9.3	Propriedades mecânicas.....	56
2.1.9.4	Análise sensorial.....	57
2.1.10	Maçã cultivar Catarina.....	60
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
3.1	Preparação da N-carboximetilquitosana (NCMQ).....	65
3.2	Caracterização da NCMQ.....	65
3.2.1	Grau de substituição.....	65
3.2.2	Umidade, cinzas, proteínas e carboidratos.....	66
3.2.3	Massa molecular.....	66
3.2.4	Viscosidade.....	66
3.3	Análises termogravimétricas.....	68
3.4	Análises cinéticas da termogravimetria.....	69
3.5	Ensaio biológico.....	69
3.5.1	Dietas.....	70
3.5.2	Realização do experimento.....	71
3.5.3	Coleta das amostras.....	72
3.5.3.1	Sangue.....	72
3.5.3.2	Fezes.....	72
3.6	Preparação do filme de NCMQ e quitosana.....	72
3.7	Microscopia eletrônica de varredura.....	73
3.8	Propriedades mecânicas.....	73
3.8.1	Análise de resistência mecânica.....	73

3.8.2	Análise dinâmico mecânica (DMA).....	73
3.10	Aplicação do filme de NCMQ em maçãs.....	74
3.10.1	Preparação das amostras.....	74
3.10.2	Avaliação microbiológica.....	74
3.10.3	Análise descritiva quantitativa – ADQ.....	74
3.11	Análise estatística.....	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1	Obtenção e caracterização da NCMQ.....	79
4.1.1	Grau de substituição.....	80
4.1.2	Determinação da massa molecular.....	81
4.1.3	Viscosidade.....	82
4.1.3.1	Viscosidade intrínseca $[\eta]$ .....	82
4.1.3.2	Comportamento de fluxo.....	85
4.1.3.3	Influência da concentração na viscosidade.....	86
4.1.3.4	Influência da temperatura na viscosidade.....	88
4.1.4	Análises termogravimétricas.....	90
4.1.4.1	Análises cinéticas termogravimétricas.....	92
4.1.5	Ensaio Biológico.....	94
4.1.5.1	Consumo alimentar e ganho de peso.....	94
4.1.5.2	Excreção de gordura nas fezes.....	95
4.1.5.3	Níveis plasmáticos de colesterol total, LDL, HDL colesterol e triglicerídios.....	96
4.2	Caracterização do filme de NCMQ.....	98
4.2.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	98
4.2.2	Propriedades mecânicas.....	102
4.2.2.1	Análise de resistência mecânica.....	102
4.2.2.2	Análise dinâmico mecânica.....	104
4.3	Aplicação do filme de NCMQ.....	105
4.3.1	Avaliação microbiológica.....	105
4.3.2	Avaliação sensorial.....	106
5	CONCLUSÕES.....	111
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
	ANEXO 1: Parecer consubstanciado comissão de ética em pesquisa da UNIVALI.....	128
	ANEXO 2: Tabelas dos resultados do peso dos ratos.....	130
	ANEXO 3: Tabelas dos resultados do consumo alimentar dos ratos....	132
	ANEXO 4: Tabelas de resultados de colesterol total (CT), triglicerídeos (TGL), HDL-colesterol (HDL), LDL-colesterol (LDL) no início e no final do experimento.....	134
	ANEXO 5: Tabelas de resultados de gordura fecal.....	136
	ANEXO 6: Resultado das notas atribuídas pelos julgadores para as amostras de maçã.....	139

## 1 INTRODUÇÃO

A expansão das indústrias pesqueiras, especialmente as de captura e processamento de camarão, têm gerado uma grande quantidade de resíduos não degradáveis que são preocupantes do ponto de vista ambiental, uma vez que são, efetivamente os mais poluentes. A maior parte destes resíduos, as cascas, devido ao elevado conteúdo em fibras, não se prestam para a fabricação de ração animal.

Pôr esta razão, os resíduos gerados por estas indústrias são enterrados ou na sua grande maioria jogados clandestinamente em rios ou no mar, ocasionando graves problemas de poluição, devido a elevada demanda bioquímica (DBO) que estes rejeitos produzem, além disto, em função da própria composição química deste tipo de matéria-prima, necessita-se de muitos anos para serem degradados naturalmente.

Entretanto, este mesmo resíduo, adequadamente transformado em quitina e posteriormente em quitosana, pode além de resolver o problema de poluição ambiental, ter inúmeras aplicações industriais tanto na indústria farmacêutica quanto na cosmética como: fabricação de antiácidos (KARLSEN, 1991), membranas para hemodiálise (HIRANO et al., 1980), cicatrizantes de feridas e queimaduras (PETER, 1995), biomembranas para encapsulação de medicamentos (MUZZARELLI, 1996), aplicações óticas na produção de lentes de contato (ALLAN et al., 1984), redutores de peso e colesterol em pacientes obesos (VENERONI et al., 1996), xampus e condicionadores (LI et al., 1992), na agricultura: produção de agentes antibacterianos e antivirais para o tratamento de sementes (LI et al., 1992), no tratamento de águas residuais por quelação de metais pesados (PETER, 1995), na indústria de alimentos como clarificante de bebidas, emulsificante e estabilizante (PETER, 1995).

No Brasil, a utilização de quitosana na área de alimentos tem se limitado a trabalhos acadêmicos especialmente como emulsificantes, substituindo amidos e gomas ou ainda, como fonte de fibras em biscoitos dietéticos e suplementos nutricionais. Como a quitosana tem características de solubilidade muito diferenciada, dependendo do pH do meio em que se encontra, é possível formar

filmes comestíveis com a simples adição de determinados solventes, tais como ácido glioxílico e outros (MUZZARELLI, 1988).

As propriedades da quitosana e de seus derivados, tais como ação quelante, ação antimicrobiana, formação de gel e formação de filme (RATHKE e HUDSON, 1994; PETER, 1995) têm estimulado a sua aplicação em vários segmentos industriais. Outra vantagem destes biopolímeros é a biocompatibilidade, possibilitando uma grande variedade de funções como: floculação e coagulação no processamento de alimentos; recuperação de íons de metais pesados em resíduos de água; elaboração de alimentos, cosméticos e medicamentos; aplicações biotecnológicas e biomédicas (PELUSO et al., 1994).

A N-carboximetilquitosana (NCMQ) é um polieletrólito com cargas negativas, formada a partir da carboximetilação da quitosana. A derivatização consiste na reação do grupo amino livre da quitosana com ácido glioxílico, produzindo um gel solúvel com grupamentos imino que sofrem redução com cianoborohidreto e borohidreto de sódio. Assim, é produzida a NCMQ, contendo acetil, carboximetil e grupamentos amino livres formados em proporções controladas pela reação entre a quitosana e o ácido glioxílico (MUZZARELLI et al., 1982).

Entretanto, para utilização deste derivado, e considerando a facilidade de sua obtenção, este trabalho teve como objetivo fazer a caracterização físico-química, microscópica, bioquímica e sensorial, visando assim novas aplicações.

## 2 EMBASAMENTO TEÓRICO

A indústria química e de alimentos tem investido muito no desenvolvimento de novos produtos e materiais que venham a substituir com vantagens de qualidade e custos os já existentes, visando aprimorar bens e serviços. Nos últimos anos, fontes alternativas de obtenção de novos materiais para preencher essas funções tornam-se viáveis (FURLAN, 1993).

A tendência atual a nível mundial é para a área dos plásticos de maior conteúdo tecnológico, das cerâmicas e dos polímeros, especialmente os biodegradáveis. Uma vez que os polímeros naturais possuem propriedades diferenciadas, somadas as características usuais dos plásticos, sua utilização tem sido intensificada (FURLAN, 1993).

A utilização e a importância de polímeros hidrossolúveis ocorre tanto na área da ciência básica quanto na aplicada. Seu uso está nas indústrias têxteis, de tintas e corantes, no processamento de alimentos, nas tecnologias de separação, em medicina, biotecnologia, entre outras (BURROWS, FORMOSINHO e MIGUEL, 1991).

O grande interesse por polímeros especiais advém não somente de suas propriedades, mas também pela racionalização do consumo energético, já que de modo geral, tendem a consumir menos energia por unidade de volume ou objeto fabricado do que o necessário para fabricar os mesmos produtos com metais ou plásticos (PEITER e MALDONADO, 1987).

### 2.1 Quitina e quitosana

Os resíduos de animais marinhos são despejados no mar ou são enterrados. Quando são lançados nas águas marinhas, as proteínas constituintes da casca do camarão sofrem decomposição e os produtos resultantes dessa decomposição são poluentes e altamente tóxicos, principalmente a histamina. Quando enterrados, causam problemas ambientais como odores desagradáveis e a agregação de animais transmissores de doenças ao ser humano (FREEPONS, 1997).

A recuperação de nutrientes a partir de resíduos originados na industrialização dos gêneros alimentícios pode ter utilidade na alimentação humana e animal, além de baixar o custo dos insumos principais e minimizar problemas de

poluição ambiental. O interesse no aproveitamento das cascas de camarão pode ser justificado pela presença de pigmentos, sais de cálcio, proteínas e principalmente quitina (REVAAH-MOISEEV, 1981; TENUTA FILHO, 1987).

A produção de quitina é estimada em 100 milhões de toneladas, aproximadamente, a mesma de celulose a nível mundial. A quantidade de quitina produzida pelo plâncton no Oceano Antártico é em torno de alguns bilhões de toneladas por ano. Quando este plâncton é utilizado como fonte comercial de proteína, o aproveitamento da quitina torna-se indispensável (MATHUR e NARANG, 1990).

Biomassas são fontes renováveis de energia e tem despertado grande interesse de cientistas e tecnólogos. Celulose é o polissacarídeo mais abundante produzido pela fotossíntese das plantas. A quitina é a segunda fonte de biomassa, e é produzida por uma variedade de animais marinhos, de insetos e de fungos (MATHUR e NARANG, 1990).

A quitina é uma poliamina acetilada e atóxica (KARLSEN, 1991), considerada o principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos aquáticos, além de ser um componente do exoesqueleto de insetos e parede celular de levedura e fungo. Foi relatado, que cerca de 50 – 80 % da composição orgânica das cascas de crustáceos e da cutícula de insetos consiste de quitina, enquanto na levedura e fungo a quantidade relativa está na faixa de 30 a 60 % (PETER, 1995). As principais fontes de quitina são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais fontes de quitina

Organismos	Conteúdo de quitina (%)
Crustáceo	
- Caranguejo	72,10
- Lagosta	69,80
- Camarão	69,10
Insetos	
- Borboleta	64,00
- Mosca	54,80
Fungos	
- <i>Mucor rouxii</i>	44,50
- <i>Aspergillus niger</i>	42,00

Fonte: FELT, BURI e GURNY, 1998.

A quitina tem características similares a glicosaminas (HUGUET, GHOBILLOT e NEUFELD 1994; CHANDY e SHARMA, 1993). Apresenta uma

estrutura similar a celulose, na qual os grupos hidroxilas referentes ao carbono-2 são substituídos por resíduos acetamido e por essa razão assemelha-se a esta em muitas de suas aplicações. Sua estrutura começou a ser estudada por volta de 1930 com base em sua hidrólise química e enzimática (MATHUR e NARANG, 1990).

É usada como um elemento de reforço fibroso em materiais biológicos e está quase sempre associada a proteínas, funcionando como matriz para reações essenciais, como as de coloração fenólica, no exoesqueleto de insetos e/ ou mineralização na parede de crustáceos, alguns insetos e bivalves. A quitina da cutícula de insetos e crustáceos apresenta-se na forma de microfibrilas com diâmetro de 10 - 25 nm e comprimento de 2 - 3  $\mu\text{m}$  (PETER, 1995).

A quitina existe em três diferentes formas polimórficas, dependendo da sua estrutura cristalina, da disposição de suas cadeias e da presença de moléculas de água (RATHKE e HUDSON, 1994). Três modificações estruturais, as quais diferem na orientação das cadeias do polissacarídeo, chamadas de  $\alpha$  - (antiparalela),  $\beta$  - (duas paralelas e uma antiparalela) e  $\gamma$  - (orientação ao acaso). A forma mais abundante é a  $\alpha$ -quitina (PETER, 1995).

O desenvolvimento de tecnologias baseadas na utilização de quitina e seus derivados são causados por suas propriedades de polieletrólito, a presença de grupos funcionais reativos, habilidade de formar gel, alta capacidade de adsorção, biodegradabilidade, bacteriostática, antifúngica e influência antitumor (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003).

Devido a sua estrutura e arranjos complexos a quitina é menos atacada pelos reagentes químicos que a celulose, ou seja, é quimicamente mais estável. Este polímero é um sólido cristalino ou amorfo, insolúvel em água, em solventes orgânicos, em ácidos diluídos e em álcalis. Pode ser dissolvida em ácidos minerais concentrados com simultânea degradação do polímero (MATHUR e NARANG, 1990).

Para obtenção da quitina bruta, a parede dos crustáceos é desmineralizada à temperatura ambiente com ácido forte diluído, seguido por lavagem com água até neutralização e, posteriormente, desproteïnizada com hidróxido de sódio diluído. Os pigmentos, como os carotenóides, podem ser extraídos com solventes orgânicos apropriados (PETER, 1995).

A viabilidade econômica das indústrias que produzem quitina e quitosana a partir de resíduos (cascas) de crustáceos está diretamente relacionada com a abundância e baixo custo da matéria prima. Nos países produtores, a matéria prima é fornecida pelas indústrias que produzem alimentos processados (MUZZARELLI, LLARI e PETRARULO, 1994). Nos países do terceiro mundo, esses resíduos não são normalmente aproveitados, acarretando em impacto ambiental já citado (p.3).

A síntese anual deste polissacarídeo em água fresca e ecossistemas marinhos é estimada entre 600 e 1600 milhões de toneladas, respectivamente. Associado as melhores características de origem da quitina estão as carapaças de peixe (incluindo camarão, caranguejo, lagosta), ostra e lula, que na safra anual coleta-se 29,9, 1,4 e 0,7 milhões de toneladas, respectivamente (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003).

A quitosana é um derivado hidrolisado da quitina (THANOO, SUNNY e JAYAKRISHNAN, 1991; LEE, PARK e HÁ, 1996). É a forma desacetilada desta, composta principalmente de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucose), possuindo diferentes classes de desacetilações. São produzidas, a partir do polissacarídeo inicial (quitina) por uma reação de desacetilação (LEE, , PARK e HÁ, 1996; SRINIVASA et al., 2002). Uma de suas principais características é a insolubilidade em água e também em outros solventes orgânicos (THANOO, SUNNY e JAYAKRISHNAN, 1991).

A quitosana apresenta em maior proporção na cadeia polimérica unidades de  $\beta$  - (1 - 4) - 2 - amino - 2 - desóxi - D - glicose, e um menor número de unidades  $\beta$  - (1 - 4) 2 - acetamido - 2 - desóxi - D - glicose da quitina. Possui semelhança na sua estrutura química com a celulose, porém exibe propriedades bastante diferentes desta, sendo quimicamente mais versáteis devido à presença dos grupos amino (BADE, 1997).

A quitina é um co-polímero linear composto de aproximadamente 70 - 90 % de N-acetil-D-glucosamina e 10 - 30 % de unidades de D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1→4). A maior parte das quitosanas contém 75 - 95 % de glucosamina e 5 - 25 % de unidades de N-acetilglucosamina (DOMSZY e ROBERTS, 1985). A massa molecular destes polissacarídeos pode ser tão altas quanto  $10^6$  a menos que algum tratamento especial seja usado para degradá-los. Resultados de experiências baseado em reações de degradação com lisozimas, monitoradas por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia (IR)

sugeriram que as duas unidades diferentes estão distribuídas ao acaso (MAGHAMI e ROBERTS, 1988).

A quitosana tem sido tradicionalmente usada no Oriente para o tratamento de queimaduras e na América para cicatrização de feridas (ALLAN et al., 1984), sendo considerado um bom biomaterial, com propriedades de biocompatibilidade (CHOU et al., 2003)

Para a produção de quitosana, a quitina bruta é desacetilada com hidróxido de sódio 40 – 50 % a 110 –115 °C (PETER, 1995). As qualidades e propriedades da quitosana obtida, tais como pureza, viscosidade, grau de desacetilação, peso molecular e estrutura polimorfa, podem variar amplamente, porque muitos fatores no processo, como temperatura, tempo de reação e composição dos reagentes, podem influenciar nas características do produto final (KURITA et al.,1977; BOUGH et al., 1978).

Embora a estrutura da quitosana seja representada como um homopolímero, o processo de desacetilação é raramente completo e a maioria dos produtos comerciais é de copolímeros compostos de unidades repetidas de quitosana e unidades de quitina repetidas ao acaso (CHANDY e SHARMA, 1993; RATHKE e HUDSON, 1994).

Os maiores produtores mundiais de quitina e quitosana, Estados Unidos da América e Japão, têm aumentado nos últimos anos a produção desses polímeros naturais, em consequência do aumento da sua utilização nos diferentes campos de aplicações, principalmente na indústria de alimentos, quelação de metais e membranas simétricas para separação de gases (EIDEM et al., 1980).

A Figura 1 apresenta a estrutura química da quitina e da quitosana, onde se observa a diferença estrutural entre os dois polímeros, que está nos grupos acetamido e amino substituintes na cadeia polissacarídica.

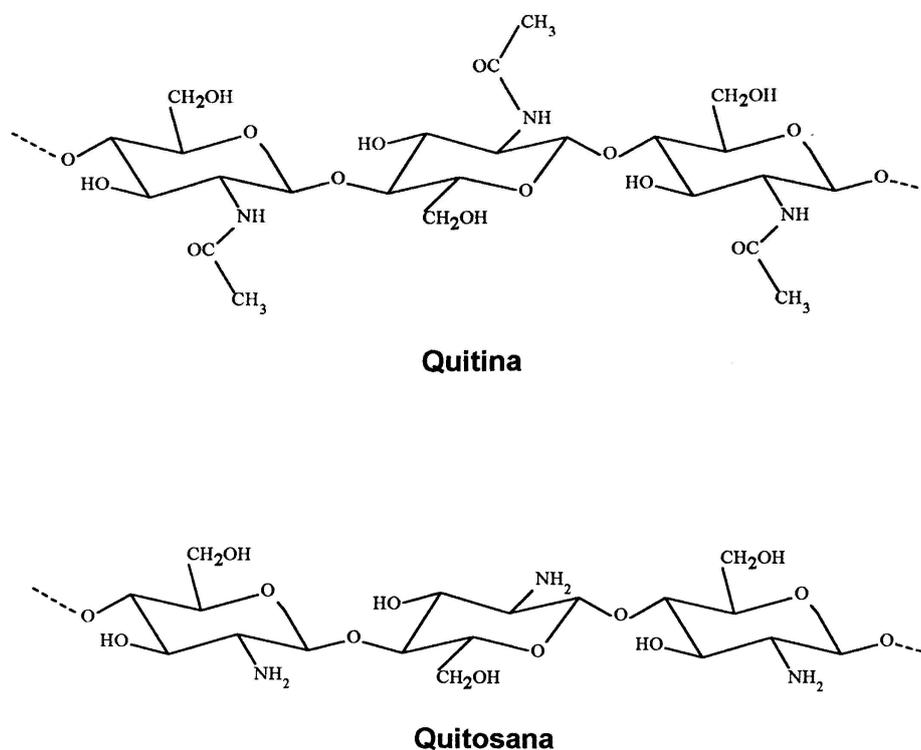


Figura 1. Estrutura química da quitina e da quitosana.

### 2.1.1 Síntese e purificação

O método mais utilizado está baseado na utilização da quitina pré-purificada imersa em solução de NaOH a 50 % na proporção aproximada de 1:4 (p/v) com agitação mecânica e aquecimento a 80 °C por três horas, deixada esfriar por doze horas, filtrada, novamente tratada com NaOH a 50 % (p/v) na mesma proporção, aquecida e agitada por mais três horas, deixada esfriar por mais doze horas, filtrada, lavada com água e secada em estufa a temperatura de no máximo 60 °C (MUZZARELLI et al, 1989).

O peso molecular da quitina bruta é geralmente maior que um milhão enquanto que o da quitosana comercial diminui para valores entre 100.000 e 1.200.000 Dalton. Durante o processo de manufatura, condições severas como altas

temperaturas, oxigênio dissolvido e pressão podem conduzir à degradação da quitosana (MUZZARELLI et al, 1982).

Preparações comerciais têm valores de peso molecular entre  $10^4$  e  $10^5$  Da. Do ponto de vista ecológico, a produção de quitina e quitosana traz menos problemas do que a produção de celulose por requerer produtos químicos relativamente menos perigosos e os produtos obtidos secundariamente à sua extração, como acetato de sódio, carbonato de cálcio e pigmentos podem ser reaproveitados (PETER, 1995).

A quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico moderadamente básico ( $pK_a = 6,3$ ) formando sal com ácidos. Isto é, definitivamente, uma vantagem em comparação com a celulose, a qual, para exibir propriedades de troca iônica, precisa ser convertida quimicamente em derivados contendo grupamentos químicos apropriados. Além disso, a presença de grupos amino primários na quitosana oferece maiores possibilidades de modificações, tais como N-acilação e N-alquilação. A quitina e a quitosana são comercialmente importantes devido à sua alta porcentagem de nitrogênio (6,89 %), comparando-se com a celulose substituída sinteticamente (1,25 %) (RATHKE e HUDSON, 1994; PETER, 1995).

Para se determinar às características de quitosana visando correlacioná-las às propriedades que possam resultar em aplicações é necessário que o polissacarídeo seja purificado. De fato, no contexto de algumas aplicações de quitosana, tais como em dispositivos para a liberação controlada de drogas, um elevadíssimo grau de pureza é requerido. A purificação de quitosanas na forma neutralizada, solúvel em meios de acidez moderada, é bastante prática do ponto de vista do tempo, materiais e equipamentos necessários à sua execução. Porém, a solubilidade restrita das amostras purificadas limita as suas caracterizações a determinadas condições e, de certa forma, dificulta a comparação de quitosana com outros polieletrólitos (SIGNINI e CAMPANA FILHO, 1998).

Usualmente, a quitosana é preparada utilizando-se soluções extremamente concentradas de hidróxido de sódio, o que costuma promover reações de degradação do polímero. Esta reação de hidrólise pode remover alguns ou todos os grupos acetila da quitina, liberando grupos amino que impõem a natureza catiônica da quitosana resultante, que consiste de uma mistura de polímeros de diferentes tamanhos. A distribuição de massa molar, ou seja, a polidispersão (PD), é influenciada por vários parâmetros, tais como: tempo, temperatura, concentração e

condições atmosféricas empregadas na reação de N-desacetilação. Assim, amostras de quitosanas podem ter características diferentes quanto ao grau de desacetilação (G.D.), viscosidade e distribuição de massa molar, que irão influenciar na performance final do polímero. Alguns estudos foram conduzidos de forma a observar a influência de modificações das condições reacionais, tais como temperatura, concentração da base e número de etapas de reação na obtenção de quitosana de baixo grau de acetilação. A reação inversa – acetilação – tem sido usada para obtenção de amostras de quitosana com grau de acetilação em torno de 50 %, que apresentam solubilidade em água. Na presença de soluções aquosas diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como polieletrólito, causando o surgimento de interações repulsivas eletrostáticas entre os grupos amino ionizados ao longo da cadeia polimérica (CANELLA e GARCIA, 2001).

A purificação da quitosana como cloridrato, solúvel em solventes aquosos sem excesso de ácido, apresenta uma vantagem importante em comparação com a metodologia em que amostras na forma neutralizadas são obtidas. Nesse sentido, cloridrato de quitosana tem sido estudado em soluções aquosas sem excesso de ácido e contendo diferentes concentrações de NaCl, possibilitando a determinação da rigidez da cadeia que, é muito próxima daquela de carboximetilcelulose, o que é coerente com a interpretação que, ao menos para graus de acetilação relativamente baixos, a rigidez intrínseca da cadeia glicosídica determina a rigidez desses polieletrólitos (SIGNINI e CAMPANA FILHO, 1998).

Exemplo dessas dificuldades é a comparação de quitosana com polieletrólitos aniônicos no que diz respeito a comportamento viscosimétricos. Em geral, os polieletrólitos aniônicos são purificados em suas formas salinas, solúveis em solução aquosa 0,1 mol/L de NaCl, entretanto, quitosanas purificadas na forma neutralizada não são solúveis nesse meio (SIGNINI e CAMPANA FILHO, 1998).

### 2.1.2 Solubilidade

Embora as estruturas moleculares da quitina e da quitosana pareçam semelhantes, as reações químicas que elas sofrem e as propriedades físicas são surpreendentemente distintas. Ambas as combinações possuem hidroxila reativa e grupos aminos primários, mas a quitosana normalmente é menos cristalina que a quitina o que a torna mais acessível para ser utilizada como reagente, e

apresentando uma concentração maior de grupos amino primários, o que a torna mais nucleofílica e básica. A quitina e a quitosana podem ser consideradas bases fracas, podendo sofrer reações de neutralização típicas de combinações alcalinas. A presença de um par de elétrons no grupo amina primária ou nas unidades de glucosamina permitem a aceitação de prótons. Assim, os grupos amino primários tornam-se catiônicos (WINTEROWD e SANDFORD, 1995).

Segundo o mesmo autor a quitosana é insolúvel em solução aquosa neutra ou alcalina e é solúvel em soluções ácidas. Presumivelmente o grande número de sítios catiônicos ao longo da cadeia permite a solubilidade em água por aumentar tanto a polaridade do composto quanto o grau de repulsão eletrostática entre unidades do polímero. Evidentemente a quitina possui uma porcentagem insuficiente de unidades de glucosamina para permitir solubilidade em água, até mesmo em condições ácidas. Esta característica de solubilidade é talvez a principal diferença entre estas duas estruturas.

A presença de grupos aminos livres ao longo da cadeia principal da quitosana favorece modificações químicas destes grupos com objetivo de gerar novos derivados solúveis em água (DELBEN e MUZZARELLI, 1989).

A presença do par de elétrons no grupo amina primário faz com que a quitosana seja um potente nucleofílico, reagindo com a maioria dos aldeídos formando iminas (KURITA, ISHIGURO e KITAJIMA, 1988). O grupamento amina primário da quitina também tem um potencial para participar de reações eletrofílicas, mas em muitos casos são inacessíveis devido à natureza cristalina e intratável da quitina (WINTEROWD e SANDFORD, 1995).

Embora a maioria das reações destas macromoléculas envolvam os grupamentos aminos primários, é possível modificar seletivamente os grupos hidroxila. Isto pode ser realizado protegendo o grupo amina pela formação do acetato de polissacarídeo e reação subsequente do sal com um eletrófilo (MUZZARELLI, 1977). O grupamento hidroxila ligado C-6 é mais reativo que aquele ligado C-3 e é então preferencialmente derivatizado. Esta reação também pode ocorrer igualmente com a quitina (WOLFROM e SHEN-HAN, 1959).

A quitosana é insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos, a pH inferior a 6,0. Os ácidos acético e fórmico são os mais usados para a dissolução da quitosana. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico,

podem também ser usados para preparar uma dispersão de quitosana, mas somente após prolongada agitação e aquecimento. Misturas como dimetilformamida com tetróxido de dinitrogênio numa proporção de 3:1 também parecem ser bons solventes (RINAUDO, MILAS e DESBRIÈRES, 1997).

Segundo KURITA (1997) quitosanas com um grau de desacetilação em torno de 50 % são solúveis em água quando obtidas em condições homogêneas, e insolúveis quando obtidas em condições heterogêneas. Esse efeito na sua solubilidade é provavelmente devido à diferença na estrutura do polímero, causada por diferentes condições de reação.

A quitosana obtida por hidrólise homogênea apresenta uma estrutura com unidades de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina distribuídas ao acaso na cadeia polimérica. Já o produto da hidrólise heterogênea parece apresentar uma estrutura em blocos, isto é, blocos de unidades N-acetil-D-glucosamina e blocos de unidades de D-glucosamina formando a cadeia. Essa diferença na seqüência das unidades monoméricas também está relacionada com a menor cristalinidade do polímero obtido em condições homogêneas (FELT, BURI e GURNY, 1998).

Poucos são os estudos de conformação molecular da quitosana apresentados até o momento, porém, uma análise do espectro de difração da quitina e da quitosana revela semelhanças estruturais entre os dois polímeros, sugerindo que a conformação da quitosana seja similar à da quitina (BADE, 1997).

A quitina é um sólido cristalino ou amorfo, insolúvel em água, em solventes orgânicos, em ácidos diluídos e em álcalis. Dissolve-se em ácidos minerais concentrados com simultânea degradação do polímero. Um dos solventes mais utilizados para a quitina é N,N-dimetilacetamida contendo 5 % de cloreto de lítio. Contudo, a quitina também pode ser dispersa em uma solução concentrada e quente de tiocianato de lítio e assim, proceder a sua reprecipitação em álcool, acetona ou água (MATHUR e NARANG, 1990).

Sua solubilidade em alguns solventes está relacionada com o tipo de matéria-prima utilizada para sua obtenção. A  $\beta$ -quitina obtida das cascas de siri, camarão, caranguejo, etc., é solúvel em solventes do tipo hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetona e é completamente solúvel em cloroálcoois associados a soluções aquosas de ácidos minerais ou determinados ácidos orgânicos (CHANDY e SHARMA, 1993).

Devido à presença de grupos aminos, a quitosana é considerada mais versátil quimicamente do que a celulose. Esse grupo confere a quitosana solubilidade em uma faixa específica de pH (aproximadamente 6,0), em solventes tais como ácidos orgânicos diluídos (acético e fórmico) e ácidos inorgânicos, para originar soluções viscosas. Confere também propriedades como polieletrólito e agente quelante, tem-se também uma grande possibilidade de formação de filmes, fibras e membranas (MATHUR e NARANG, 1990).

A quitosana possui um peso molecular na ordem de  $1,5 \times 10^5$  Dalton, grau de polimerização de 600 a 1800 e uma extensão de 60 - 80% de desacetilação; sendo em solução 1 % de ácido acético apresenta uma viscosidade de 250 – 2500 cps (RINAUDO, MILAS e DESBRIÈRES, 1997).

Quitina e quitosana são degradadas por várias lisozimas, as quais estão amplamente distribuídas em plantas e animais. Um número residual de grupos acetila (grau de acetilação  $\geq 16$  %) e o grupo hidroxil livre no C-3 da unidade de açúcar são necessários para observar-se considerável taxa de hidrólise (FREEPONS, 1997).

### 2.1.3 Degradação térmica

Quando polímeros são aquecidos a temperaturas mais elevadas, várias mudanças físicas e químicas podem ocorrer, como formação de gases, líquidos, mudanças de cor, etc. A degradação térmica é uma reação que envolve a ruptura das ligações da cadeia principal, bem como em cadeias laterais. A habilidade do polímero em resistir a decomposição química causada pelo aquecimento a altas temperaturas é chamada de estabilidade térmica (TAGER, 1978).

A estabilidade térmica é geralmente caracterizada pela temperatura na qual a decomposição do polímero se torna perceptível, isto é, pela formação de produtos e pela cinética do processo. Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica do polímero é a energia das ligações da cadeia principal (LIM e WAN, 1995).

A ligação C-C é uma das mais resistentes a degradação térmica, sendo especialmente estável no diamante. A presença de átomos de hidrogênio na molécula do polímero (macromolécula) diminui a energia da ligação C-C, motivo pelo qual os hidrocarbonetos de alta massa molecular e seus derivados possuem

comparativamente baixa estabilidade, sendo facilmente degradados com o aquecimento a temperaturas mais altas (TAGER, 1978).

Quitina e quitosana, quando aquecidas a temperaturas mais elevadas, sofrem degradação. Os termogramas da quitina e quitosana realizados por calorimetria de análise térmica diferencial e termogravimétrica, mostraram um efeito endotérmico a 60 °C (água absorvida), seguido por fortes efeitos exotérmicos a 280 °C e 480 °C. A estabilidade térmica da quitina aumenta com o aumento do grau de acetilação, isto é, quando a forma acetilada prevalece, o efeito exotérmico aparece em 320 °C, enquanto que na forma desacetilada o efeito ocorre a 280 °C (PENICHE-COVAS e JIMÉNEZ, 1988).

#### 2.1.4 Grau de desacetilação

O grau de desacetilação é uma das características mais importantes da quitosana, ele determina o conteúdo de grupos amino livres no polissacarídeo, diferenciando-o da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade. A quitina é insolúvel em ácidos diluídos, enquanto a quitosana forma dispersão viscosa (PETER, 1995), pode variar de 70 - 95 %, dependendo do método usado. (LI et al., 1992).

O grau de desacetilação pode variar de 70 a 95 %, dependendo do método usado. A maioria das publicações usa o termo quitosana quando o grau de desacetilação é maior que 70 %. A desacetilação da quitina em atmosfera inerte produz quitosana com maior viscosidade do que a desacetilação ao ar. (Li et al., 1997).

A literatura descreve vários métodos para avaliar o conteúdo de grupos aminos livres na quitosana. Lowy (1909) apud Muzzarelli (1996) utilizou aldeído salicílico e tratamentos prolongados com solução concentrada de NaOH, obtendo assim uma completa N-desacetilação, mas com degradação do produto. Rigby (1936) apud Muzzarelli (1996), apresentou um tratamento da quitina com 40 % de NaOH por 4 horas a 110°C.

Broussignac (1970) apud Hayes e Davies (1985) desenvolveu um método potenciométrico em que o polímero é dissolvido em um excesso de HCl 0,3 M e diluído num grande volume de água destilada para permitir uma boa dispersão do precipitado formado após ter sido efetuada a titulação com hidróxido de sódio.

A curva de titulação apresentada dois pontos de inflexão sendo que o primeiro é a neutralização do HCl utilizado na dissolução do polímero e o segundo a desprotonação dos grupos amino, e a diferença entre os volumes corresponde à quantidade de hidróxido de sódio necessária para desprotonar os grupos aminos. A obtenção de quitosana a partir da quitina foi estudada por Von Furth e Russo (1977) apud Hayes e Davies (1985), os quais afirmaram que 3 de cada 4 grupos acetila podem ser removidos da quitina. Hayes e Davies (1985) titularam soluções com indicador de fenolftaleína, ou potenciométricamente para se determinar o ponto final da titulação. Moore e Roberts (1980) reagiram os grupos amino livres de polímero com aldeído salicílico na proporção 3:1, isto é, 3 mol de aldeído por mol de  $\text{NH}_2$ .

A quantidade de aldeído salicílico consumido foi determinada por análise espectroscópica da solução inicial e final, determinando assim o conteúdo dos grupos amino. Domszy e Roberts (1985), propuseram a técnica de espectroscopia de infravermelho para determinação do grau de N-acetilação da quitosana.

Métodos para detectar a remoção dos grupos acetila na quitosana incluem espectroscopia de infravermelho (DOMSZY e ROBERTS, 1985; SABNIS e BLOCK, 1997), titulação potenciométrica, cromatografia gasosa, reação colorimétrica com ninhidrina (ALBA, 1990) e adsorção de corantes. Muzzarelli, Baldassare e Conti (1988) sugeriram que a primeira derivada da espectrofotometria de UV a 199 nm seria o melhor método para determinar o grau de desacetilação em amostras de quitosana. Com esta técnica, a leitura de absorbância de N-acetilglicosamina foi linearmente dependente da concentração e não foi influenciada pela presença de ácido acético.

O conteúdo de acetila pode ser determinado por espectroscopia (RMN ou infravermelho), potenciométrica, titulação química ou enzimática e por cromatografia gasosa. O próton do grupo N-acetila permite, através da espectroscopia de RMN, a determinação do grau de desacetilação, mas para baixos conteúdos de acetila este método não é adequado. O método da titulação apresenta certas dificuldades para quitina parcialmente insolúvel, com alto conteúdo de N-acetila, devido à demora na destruição do polímero. A análise espectroscópica do infravermelho parece ser mais adequada devido a sua rapidez e eficiência (MOORE e ROBERTS, 1980; DOMARD e RINAUDO, 1983).

Através da técnica de espectroscopia do infravermelho, podemos determinar o grau de desacetilação da quitosana, usando a relação entre a absorbância da banda da amida primária a  $1655\text{ cm}^{-1}$ . A banda de absorção do grupo hidroxila a  $3450\text{ cm}^{-1}$  foi escolhida como padrão de referência interno, para compensar as diferenças de espessura do filme de quitosana, ou da concentração da quitosana (quando usada na forma de pó com KBr). Esta escolha também se deve ao fato desta banda de absorção ser bem visível e relativamente isolada, fatores estes que úteis quando é utilizado o método de linha de base. A intensidade desta banda é aproximadamente constante, para quitosana e quitina (MOORE e ROBERTS, 1980; DOMARD e RINAUDO, 1983).

## 2.1.5 Aplicações

### 2.1.5.1 Tratamento de águas e efluentes

Desde que a maioria das impurezas coloidais na água transporta uma carga negativa, polímeros catiônicos são geralmente usados para o tratamento de águas e efluentes industriais. A capacidade que a quitosana apresenta para complexar metais de transição pode ser uma alternativa para os processos tradicionais de tratamento de águas, é também um polímero apropriado para ser utilizado na remoção de metais pesados de águas naturais e industriais (MATHUR e NARANG, 1990; PETER, 1995).

Os grupos amino na cadeia polimérica servem como sítios de quelação para íons metálicos e permitem que um polímero atue como um polieletrólito sendo o ponto de partida para muitas modificações químicas. O nitrogênio e o oxigênio podem ser acilados para obter derivados formila, acetila e benzoíla. Podem também ser esterificados com ácido monocloroacético, obtendo-se carboximetilquitosana ou reagir com glutaraldeído e epícloridrina para formar um material insolúvel reticulado (MATHUR e NARANG, 1990).

Devido à capacidade quelante apresentada pela quitosana, pode ser empregada para purificação de resíduos tóxicos e extração de metais de transição da água do mar e resíduos industriais. A capacidade que a quitosana apresenta para complexar metais de transição pode ser uma alternativa para os processos

tradicionais de tratamento de águas e uma maneira de prevenir a poluição da água por mercúrio, cobre e outros metais pesados. (INOUE, YOSHIZUKA e BABA, 1994).

Também foi demonstrado que a quitina e seus derivados tem a capacidade de absorver ou acumular determinados ânions, como nitrito, ferricianeto, permanganato, entre outros (RODRIGUES et al, 1992).

Devido à alta densidade dos grupos amino na cadeia polimérica, a quitosana é um excelente agente coagulante e floculante. Tais grupos podem interagir com substâncias carregadas negativamente. A capacidade de quelação seletiva da quitosana por materiais como colesterol, gorduras, íons metálicos, proteínas e células tumorais tem sido aplicada em áreas de preparação de alimentos, cosméticos, saúde, purificação de água e farmacêutica. A quitosana tem também apresentado afinidade por proteínas, tais como a glutinina de germe de trigo e tripsina (MUZZARELLI et al, 1989).

#### 2.1.5.2 Processamento do papel

A possibilidade da utilização da quitosana como aditivo na indústria de papel foi considerada a partir de 1970. O polímero é utilizado principalmente como aditivo de superfície para o papel. Deste modo, obtém-se uma folha de papel de alta qualidade, mais resistente, proporcionando uma superfície lisa que melhora a qualidade de impressão (MATHUR e NARANG, 1990).

Tratando a superfície de vários tipos de papel com solução de quitosana a 1 %, verificou-se que a resistência a ruptura aumenta e o papel se torna mais resistente a dobra. Há um grande número de possíveis aplicações, incluindo a restauração de manuscritos antigos. Tais tratamentos reduzem o consumo de resina para a engoma do papel e aumenta as propriedades de impressão, particularmente na manufatura de mapas (MATHUR e NARANG, 1990).

#### 2.1.5.3 Aplicações médicas e farmacêuticas

Quitooligossacarídios, como a quitosana, apresentam propriedades antimicrobianas e estimulantes do sistema imune, as quais são manifestadas na extraordinária aceleração de cicatrização de feridas (PETER, 1995). Outras propriedades que presentes na quitosana incluem: inibição de células tumorais,

efeito antifúngico, atividade antiácida e antiúlcera (KARLSEN, 1991), ação hemostática e hipocolesterolêmica (LI et al., 1997).

A afinidade da quitosana por biomoléculas tem sido utilizada para reduzir efeitos adversos de fármacos. Por exemplo, Ouchi, Banda e Fugimoto (1989) ligaram covalentemente um antineoplásico, 5-fluorouracila, com espaçador hexametileno, em testes *in vivo*, a quitosana direcionou o fármaco, exibindo um aumento no efeito inibitório contra as células tumorais sem apresentar toxicidade aparente.

A quitosana tem atraído a atenção como uma matriz para a liberação controlada de fármacos devido a sua fácil degradação por enzimas e por seus produtos de degradação não serem tóxicos. A característica de insolubilidade da quitosana em água e também em alguns solventes orgânicos limita seu uso com suporte de drogas. Segundo Muzzarelli, 1996, também está sendo utilizada para fabricação de membranas para hemodiálise, materiais dentários e biomembrana artificial para encapsulação de enzimas.

A quitosana exhibe propriedades anticolesterolêmicas, antiúlcera e antiuricêmica quando administrada oralmente, e é potencialmente apropriada para prevenção da doença celíaca. Estas propriedades são resultantes da capacidade de se ligar especificamente a ácidos graxos, bile, fosfolipídios, ácido úrico e a fração tóxica da gliadina (MUZZARELLI, 1996).

O mecanismo de blindagem de células também tem sido pesquisado. É bem conhecida a força repulsiva entre as células vermelhas do sangue devido a altas cargas negativas da membrana celular e esta predominante presença de cargas negativas é devido a resíduos ácidos neuramínicos. O processo de blindagem das células remove a alta rede de cargas negativas das células. Os pesquisadores, então, notaram que a quitosana não modifica as células do sangue e, também, determinaram que a quitosana não produz gel com as células sangüíneas. Entretanto, conclui-se que a formação de gel das células vermelhas do sangue é devido a interação das cargas positivas da quitosana com os receptores contendo resíduos de ácidos neuramínicos na superfície celular (LI et al, 1997).

A quitosana é uma molécula policatiônica que desde 1950 tem aplicação conhecida como agente de blindagem de células vermelhas do sangue. Alguns estudos mostram que polycations possuem propriedade de aglutinação celular. Nos anos 60 a quitosana foi investigada e foi descoberto que a baixas concentrações tem

a habilidade de aglutinar células vermelhas do sangue. Isto leva a considerar a este polímero como um agente homeostático (LI et al, 1997).

A aglutinação das células vermelhas do sangue por polímeros é dependente da estrutura do polímero e do seu peso molecular. Quitosana com peso molecular de 35.000 foi capaz de produzir apenas uma leve coagulação de sangue com heparina, enquanto quitosana com peso molecular de 600.000 ou mais produziu uma firme coagulação (LI et al, 1997).

Devido a sua capacidade de formação de filmes que absorvem água e são biocompatíveis, podem ser utilizados diretamente em queimadura pela aplicação de solução aquosa de acetato de quitosana. A solução, embora ácida, promove um esfriamento e uma agradável suavidade quando aplicada em feridas abertas de pacientes com queimaduras. Uma vantagem deste tratamento com quitosana é que ela permite uma excelente oxigenação dos tecidos, sendo isso importante para prevenir o aumento da ferida por privação de oxigênio. Os filmes têm a habilidade de absorver água e são naturalmente degradáveis por enzimas do corpo. Isso significa que a quitosana não precisa ser removida o que poderia aumentar o dano do tecido injuriado (LI et al, 1997).

Por não apresentar efeitos adversos após a implantação em tecidos, a quitosana é amplamente empregada em aplicações biomédicas, como pele artificial. A derme de quitosana artificial foi testada pela inserção em camundongos. Uma reação inflamatória normal foi observada após 2 dias, seguida por colonização de células após 7 dias. Quitosana com baixo peso molecular (1500 Da) foi escolhida para ser empregada no tratamento de doenças ósseas, pois aumenta a atividade da fosfatase alcalina e, conseqüentemente, acelera a formação óssea (PELUSO et al., 1994).

A atividade indutiva e estimulatória da quitosana sobre a restauração de tecidos foi demonstrada na avaliação de sua função biológica, ao ser colocada em contato com a *dura mater* ou usada como sua substituta. A quitosana pode ser usada para prevenir fibroplasia em cicatrização de feridas e para promover crescimento tissular e diferenciação celular. Ela promove uma matriz não protéica que propiciará o crescimento tissular tridimensional. Por possuir características estruturais similares a dos glicosaminoglicanos, seu comportamento funcional é mimetizado no organismo (MUZZARELLI, 1996).

A habilidade da quitosana de intumescer-se em água e adquirir uma leve consistência de gel e assemelhar-se a tecidos biológicos pode aumentar a sua biocompatibilidade e fazer dela uma boa matriz para produtos farmacêuticos hidrofílicos que permeiam em matrizes de silicone popularmente usados para liberação de drogas. Possui boa permeabilidade para fármacos, pois quando estudadas as permeações de uma série de drogas através de gel de quitosana e concluiu-se que a taxa de permeação diminuiu com o aumento do peso molecular da droga (NAKATSUKA e ANDRADY, 1992; RATHKE e HUDSON, 1994).

Tem-se usado a quitosana em solução de ácido acético para o tratamento de macacos que sofrem de dermatites causadas por infecções de ácaros. A dermatite desapareceu em dois dias e novos pêlos começaram a crescer em dez dias; ao contrário dos tratamentos tópicos convencionais, o tratamento com quitosana parece determinar uma condição de cura permanente (RATHKE e HUDSON, 1994).

Diversas aplicações farmacêuticas tal como a utilização como veículo na liberação de fármacos. Este complexo é produzido facilmente em misturas de drogas e polímeros que podem levar a forma de gotas, filmes, tubos, pós, ou outras formas. A droga geralmente é liberada da matriz da quitosana em contato com fluidos de corpo, e a cinética da taxa de liberação normalmente é ajustada com um modelo simples de difusão de Fick (ALLAN e WINTEROWD, 1991).

Efeito estimulatório sobre macrófagos na atividade tumoricida, que se dá provavelmente devido à produção de óxido nítrico; e produção de interleucina-1 devido principalmente às unidades N-acetilglucosaminas (NISHIMURA et al., 1986; PELUSO et al., 1994).

Aceleração do processo de cura de lesões por aumento da cicatrização (WILES et al., 2000).

Lentes de contato feitas a partir da quitina são mais biocompatíveis com relação às produzidas por plásticos sintéticos (MATHUR e NARANG, 1990).

A quitosana é considerada um bom aditivo para a preparação de biomateriais devido a sua aparente biocompatibilidade (PELUSO et al., 1994). Allan et al. (1984), indicaram a possibilidade de empregar quitosana em produção de lentes de contato delgadas tanto por fundição como por moldagem.

É usada também na prevenção de cáries dental, pois neutraliza o ácido láctico que se origina na boca e ataca o esmalte dos dentes. O uso de dentifrícios contendo quitosana é de grande eficácia, pois, pela sua característica básica, forma lactato de

quitosana com pH neutro, tornando-se inofensivo para o esmalte dos dentes, além do poder cicatrizante que a quitosana apresenta (MUZZARELLI, 1996).

Em termos de aplicações da quitosana, há vários estudos sobre a possibilidade da quitosana inibir ou não a absorção de ferro pela parede do intestino delgado (GORDON et. al., 1981). Alguns cientistas têm proposto usar a quitosana como um carreador de ferro, na esperança que o complexo de ferro/quitosana se dissociasse no intestino. A absorção da maioria dos nutrientes acontece no intestino delgado, onde o pH é aproximadamente 7 (FUKADA, KIMURA e AYAKI, 1991). Neste pH, a maioria dos íons ferroso livres é convertido a hidróxido ferroso, um composto insolúvel que não é absorvido pela parede de intestino delgado (YOSHIHITO, 1990; YOSHIYUKI, 1989a; YOSHIYUKI, 1989b).

Trabalhos patenteados que descrevem o uso de complexos de quitosana-ferro ou quitosana-heme foram usados para melhorar a absorção de ferro no intestino. Nestes estudos, o ferro é ligado a um agente complexante móvel e capaz de cruzar a parede do intestino delgado. Este pequeno complexo se ligaria fortemente a quitosana em baixo pH, como o existente no estômago, mas seria liberado da quitosana em pH neutro, com é o do intestino delgado. Este complexo poderia atravessar o estômago livremente, mas se dissociaria no intestino delgado e assim permitiria à porção solúvel em água atravessar a parede intestinal (WINTEROWD; SANDFORD, 1995).

Outro fator importante deve-se ao fato da quitina e a quitosana serem essencialmente não digeridas em humanos, já que nós não possuímos em nossa flora intestinal, bactérias que contenham quitinases e quitosanases (HIRANO et al., 1990; HIRANO; ITAKURA; SEINO, 1986; KONO; MATSUI; SHIMIZU, 1987). Tais enzimas estão presentes em baixas concentrações na saliva e nos fluidos estomacais humanos, degradando quitina e quitosana em pequena extensão. A degradação hidrolítica também ocorre no estômago, em pH entre 1 e 2 (FUKADA; KIMURA; AYAKI, 1991).

Com a preocupação de solucionar problemas relacionados a redução de lipídeos séricos, as alternativas foram surgindo e novas pesquisas mostram resultados a cada dia. Assim temos destacadamente o uso da quitosana na redução da obesidade (MUZZARELLI, 1996).

Na década de noventa quando falamos em fibras dietéticas, encontramos um grande número de pesquisadores interessados, pois os benefícios por elas produzidos são reconhecidos como meios atuantes na redução da densidade energética de uma dieta (BEEREBOON, 1979) e um aumento no peso e na frequência de defecações (CUMMINGS et al., 1976), servindo também como um meio de prevenção a determinadas anomalias que possam acometer o intestino (BURKITT, 1971).

As fibras dietéticas quando ingeridas atuam no metabolismo lipídico, provocando algumas alterações positivas, motivos pelos quais estudos relevantes têm sido realizados sobre as mesmas, destacam-se pesquisas envolvendo as fibras dietéticas na redução dos lipídeos séricos e hepáticos (JENNINGS et al., 1994; SUGANO et al., 1988; MARINEZ, NEWMAN e NEWMAN, 1992).

Como a quitosana constitui-se de fibras não digeríveis, não apresenta, portanto, valor calórico, independentemente da quantidade ingerida, o que é mais um atrativo para a indústria alimentar (ASSIS e LEONI, 2003).

Os efeitos dietéticos da quitina e da quitosana em animais de teste têm sido examinados em vários estudos. Coletivamente estes indicam que a toxicidade da quitosana é relativamente baixa e esta apresenta substancial atividade hipocolesterolêmica. A quitina parece ter menos efeitos tóxicos que a quitosana, no entanto não tem demonstrado consistente atividade hipocolesterolêmica. Vale enfatizar que estudos em ratos têm sugerido que grandes quantidades de quitosana (>2.5% da dieta total) são necessárias para se observar uma significativa redução do colesterol. Entretanto, o consumo de quitosana a níveis maiores que 5% podem causar efeitos adversos tais como alterações hepáticas (hepatomegalia), renais, redução nos níveis de hemoglobina, hipotrofia, diminuição dos níveis de proteínas sanguíneas, impedimento da conversão do colesterol a coprostanol, que normalmente ocorre devido à ação das bactérias da flora intestinal, etc (WINTEROWD e SANDFORD, 1995).

Moléculas de quitosana solvatadas funcionam como policátions e coagulam se a solução for adicionada a partículas ou moléculas carregadas negativamente (DRAGET, VARUM e SMIDSROD, 1991). Suspeita-se que a tendência de floculação seja a principal causa dos efeitos hipocolesterolêmicos e hipolipidêmicos observados quando são realizados testes em animais alimentados com partículas de quitosana

(FURDA, 1983). Esta provavelmente dissolve-se no estômago onde as condições são ácidas. Posteriormente, no intestino delgado os ácidos biliares auxiliam na formação de micelas ao redor dos materiais insolúveis em água, como o colesterol. Estas micelas que contém colesterol entram no intestino delgado e são absorvidas pela parede intestinal incorporando-se ao fluxo sanguíneo (MANSBACH, COHEN e LEFF, 1975). Porém, quando soluções de quitosana existentes em meio ácido, como no estômago, passam para o intestino delgado, que apresenta um pH ligeiramente alcalino, forma-se um precipitado pastoso que parece atrair as micelas que contém colesterol (WINTEROWD; SANDFORD, 1995).

Foram encontrados na revisão bibliográfica varias publicações que descrevem a redução dos níveis de colesterol e lipídio em animais de teste alimentados com partículas de quitosana em quantidades ideais. De acordo com Winterowd e Sandford (1995) esta redução nos níveis de colesterol e outros lipídeos foram observadas no soro e no fígado.

Apesar do uso da quitina e da quitosana em alimentos ser muito limitado, patentes e artigos científicos tem sido publicados sobre este assunto nos últimos anos. Dados os efeitos hipocolesterolêmicos apresentados e a recente demonstração por japoneses que a quitina pode ser incorporada em processos alimentares parece provável o seu uso como ingrediente alimentício (WINTEROWD; SANDFORD, 1995). Em relação à quitina, não parecem existir comercialmente disponíveis alimentos que a contenha como aditivo, sendo que os que utilizam a quitosana, hoje, são muitos poucos, por exemplo, alguns biscoitos dietéticos, macarrões e vinagres modificados (HIRANO et al., 1990).

A quitosana quando formulada com ácido ascórbico, tem uma melhora no seu potencial de absorver gorduras e, conseqüentemente, no aumento de sua excreção fecal. Isto acontece pelo fato das gorduras se ligarem mais facilmente ao gel de quitosana, devido à redução da viscosidade do estomago, diminuindo também a quantidade de gordura que vai para o trato gastrintestinal (KANAUCHI et al., 1994).

Em uma serie de experimentos com ratos machos, os mesmos demonstram claramente a atividade hipocolesterolêmica da quitosana dietética, com um aumento na excreção fecal do colesterol, enquanto que os ácidos biliares permanecem inalterados. Assim chegou-se a conclusão que uma suplementação adequada de

quitosana na dieta parece ser efetiva na diminuição do colesterol plasmático (SUGANO et al., 1980).

Os resultados da experiência realizada por Ventura (1996), mostraram a utilidade da introdução de uma fibra dietética (quitosana), suplementada na dieta por quatro semanas em um regime de redução de peso para o tratamento da obesidade, já que, o maior problema no tratamento da obesidade não é a redução de peso, mas a manutenção do peso reduzido. Segundo ele, mais pesquisas devem ser realizadas para examinar a possibilidade do uso da quitosana na manutenção do peso corporal no nível desejado.

Desta forma, é importante buscar tratamentos alternativos para a obesidade e suas complicações menos onerosas aos pacientes, descartando quando possível, o uso de medicamentos. Nesta perspectiva, alguns pesquisadores têm mostrado o efeito positivo da quitosana na redução de peso corporal e do colesterol plasmático e no aumento da excreção fecal de gorduras (KANAUCHI et al., 1994; MUZZARELLI, 1996).

#### 2.1.5.4 Indústria de alimentos e agricultura

Em alimentos a quitosana pode ser usada como desacidificador de frutas e vegetais, na fabricação de pães. Quitina e quitosana também podem se usadas como agentes texturizantes e estabilizantes (SOTO-PERALTA, MUELLER e KNORR, 1989).

Outro aspecto importante é que as quitosanas comerciais são solúveis somente em pHs ácidos, o que pode gerar reações com a superfície a ser revestida, alterando o aspecto e o sabor da polpa. Alterações na seqüência de desacetilação ou mudanças estruturais introduzidas na cadeia da quitosana já processada, como o derivado NCMQ, podem gerar produtos solúveis em pH neutro. De modo geral, contudo, a quitosana tem sido internacionalmente aceita como material promissor para revestimento de frutas e de alimentos diversos (ASSIS e LEONI, 2003).

Dentre outras aplicações apresentadas pela quitina e quitosana, relacionada a alimentos pode-se citar:

- utilização como agente emulsificante (HAYNES et al., 1990);

- estabilização de espumas protéicas, esta tecnologia poderia permitir o desenvolvimento de sabores para chocolates, merengues e *marshmallows*, etc (NODA, KOYATO e KOYAMA, 1991);

- formulação de géis, agentes retentores que seriam utilizados na produção de queijos e sorvetes proporcionando-lhes maiores estabilidades; e filmes os quais quando aplicados para recobrir maçãs, por exemplo, aumentaram o brilho destas e também o tempo exposição na prateleira, e conseqüentemente o tempo para consumo (HANAWA et al., 1991; OBARA et al., 1991; SUZUKI e SUGAI, 1989; TAGUCHI e SATO, 1989; YAMANE e TAKADA, 1991);

- utilização da quitosana para a preservação de alimentos, como exemplo na inibição do crescimento da *Escherichia coli*, e *Fusarium oxysporum* em meio a nutrientes. A quitina, e mais particularmente a quitosana, parece inibir o crescimento de algumas bactérias e fungos diretamente responsável pelo desperdício de alimentos. A propriedade antimicrobiana da quitosana foi utilizada na preservação de macarrões, arroz, sardinhas e carnes sem alterar o sabor dos mesmos (IZUME; USHIDA, 1987; PAPINEAU et al., 1991; WINTEROWD; SANDFORD, 1995).

Utilização para o recobrimento de sementes de trigo resultando no aumento do rendimento da colheita, já que aparentemente esta ativa uma resposta na semente que sinaliza a planta para se proteger de predadores naturais tais como fungos patogênicos (HADWIGER, FRISTENSKY e RIGGLEMAN, 1984; SANTOS et al., 1991);

Formação de filmes servindo como filtro médio em tratamentos de água para a clarificação e purificação da mesma (EPA, 1986).

Através da pirólise, gera formação de pirazinas que são compostos muito importantes como aromatizantes, entrando no processo de fabricação de muitos alimentos, através da reação de pirólise, a 900 °C (MATHUR e NARANG, 1990).

Como agentes texturizantes e estabilizantes na fabricação de sorvetes, por exemplo, na fabricação de pães com alto teor de fibras, etc. Na biomassa, a quitosana tem sido usada como coagulante polieletrólítico, como agente floculante para a recuperação de proteínas a partir do processamento de lixo de alimentos (AL ZAEMEY, MAGAN e THOMPSON, 1993).

Para prolongar o tempo de conservação de alimentos. Quitosana com peso molecular de 70.000 - 90.000 Da adicionada ao arroz, pode controlar efetivamente o crescimento de microrganismos acima de 3 dias, sem afetar adversamente as

características organoléticas. A quitosana foi também empregada na conservação de sardinha, leite, pastas protéicas de peixe e conservas de pepino (PETER, 1995; LI et al., 1997).

Devido a sua propriedade filmógena, a quitosana é utilizada para encapsulação de células vivas e sementes (LI et al, 1997). Em outro estudo, células vegetais encapsuladas com quitosana/alginato e quitosana/carragenina (KNORR, BEAUMONT e PANDYA, 1987) para a produção de metabólitos secundários, aumentaram efetivamente a concentração de oxalato no meio de cultura celular, o que pode estar relacionado com o efeito de permeabilização da quitosana. Microcápsulas de quitosana-alginato têm sido prosperamente usadas para cultura de *Bacillus*, células vegetais (KNORR, BEAUMONT e PANDYA, 1987) e células híbridas (YOSHIOKA et al., 1990).

A quitina e seus derivados podem ser aplicados na agricultura nas seguintes áreas: bioestimulação do crescimento de plantas, proteção da planta contra fungos, bactérias e viroses, e proteção pós-colheita (STRUSZCYK e POSPIESZNY, 1997).

#### 2.1.5.5 Indústria de cosméticos

A primeira aplicação da quitosana em cosméticos foi divulgada pela “*Fine Cosmetics Co. of Japan*”, em 1986. Quitina e quitosana podem entrar na composição de cremes, xampus e dentifrícios. O produto obtido pela oxidação da quitina com hipoclorito, tem propriedades cosméticas similares ao ácido hialurônico (HLA), e, portanto, tem sido usado como seu substituto (MATHUR e NARANG, 1990).

A quitosana hidrossolúvel pode facilmente entrar na formulação de cremes e géis, porque são compatíveis com a emulsão usada na fabricação dos mesmos, devido ao seu caráter estabilizante, é ainda utilizada em cosmetologia na remoção de resíduos de xampus, na preparação de pós para maquiagem, esmalte para unhas, fixadores e condicionadores para cabelo (PETER, 1995; LI et al, 1997).

Como loção com fins umectantes e seqüestrador eficiente de metais pesados que são os responsáveis por muitas alergias de contato (CÁRDENAS, RETAMAL e TAGLES, 1993).

#### 2.1.5.6 Outras aplicações

A quitina tem sido utilizada em cromatografia de camada delgada para a separação de ácidos, alguns fenóis e aminoácidos, onde é superior à sílica-gel. Pode-se concluir, que quitina e quitosana têm seu emprego como suportes sólidos para imobilização de enzimas como fosfatase ácida,  $\alpha$ -quimotripsina, glicose isomerase,  $\beta$ -galactosidase e D-glicoseoxidase (MATHUR e NARANG, 1990).

Em fotografias coloridas a quitosana tem sido utilizada como agente fixador de complexos de prata. É potencialmente importante a aplicação da quitosana, devido a sua resistência à abrasão, características ópticas e habilidade para fixar complexos de prata (MATHUR e NARANG, 1990).

#### 2.1.6 Filmes de quitosana

As mudanças nos padrões nutricionais e os benefícios creditados a uma alimentação saudável formaram a grande força impulsionadora no desenvolvimento de filmes comestíveis e têm refletido, desde então, em âmbito mundial. Uma atenção para as pesquisas de novos materiais e agentes com propriedades preservativas e bactericidas naturais que possam ser convenientemente empregados em alimentos.

Os revestimentos comestíveis sobre alimentos devem apresentar certas peculiaridades como serem invisíveis, terem aderência suficiente para não serem facilmente removidos no manuseio e não introduzirem alterações no gosto (ASSIS e LEONI, 2003).

Polissacarídios de origem animal têm sido avaliados como uma alternativa consideravelmente econômica e eficiente para esse fim, sendo a quitosana o composto mais estudado (COMA et al., 2002).

As diferentes características da quitosana comercial tornam-se um dos aspectos que tem dificultado seu pleno uso na indústria. As quitosanas disponíveis, principalmente no Brasil, são de procedências diversas e apresentam diferentes graus de pureza e densidade molar, além de não seguirem industrialmente um procedimento comum de desacetilação, o que torna os materiais comerciais consideravelmente diferentes entre si. Esse fato dificulta o estabelecimento de um processamento padrão de géis e a obtenção de filmes e revestimentos com características reprodutíveis (ASSIS e LEONI, 2003).

RIGBY (1936) patenteou um filme de quitosana, o qual foi descrito como transparente, flexível e com força de tensão 9000 psi, Muzzarelli, Llari e Petrarulo (1994) também descreveram similares características de filmes de quitosana. Segundo Averbach (1978) concluiu que o filme formado de quitosana tem qualidades dependentes da estrutura. Os dados da viscosidade não se correlacionam bem com as características de formação do filme. O mecanismo de predição do transporte de água para filmes hidrossolúveis e filmes de quitosana são extremamente complexos. A complexidade em ambos é a absorção isotérmica não linear da água e o conteúdo da água dependente.

A transmissão de vapor da água de filmes hidrofílicos varia não linearmente com a pressão parcial de vapor da água. Se os filmes são catiônicos e fortemente hidrofílicos, interações da água com a matriz do polímero aumentam a permeabilidade do vapor da água (PASCAT, 1986). Muzzarelli, Llari e Petrarulo (1994) descreveram as velocidades de transmissão do vapor da água de 1200 g/ m<sup>2</sup>/ d á 100 °F e 90 % de umidade relativa (UR) testado em diferentes membranas de quitosana com 20 µm de espessura.

Wong (1992) apud Wiles et al. (2000) mediu a permeabilidade ao vapor da água da quitosana e filmes de quitosana – lipídios com 1% de solução de quitosana (grau de desacetilação > 70 %) usando ácido fórmico. Estes filmes de quitosana apresentam uma permeabilidade ao vapor da água de 0,41g/ mm/ m<sup>2</sup>/ d/ mm Hg e foram descritos como macios sem poros ou fendas.

Pesquisas na área de embalagens comestíveis (filmes, membranas e filmes) biodegradáveis estão em primeiro lugar no interesse de ecologistas e amigos da natureza. Estes materiais possuem muitas vantagens são comestíveis, reduzem transferência de gás e aroma além de diminuir a poluição do meio ambiente por serem biodegradáveis, podendo ser utilizados em vários gêneros alimentícios incluindo produtos frescos hortifrutigranjeiros, padaria, confeitaria e outros multicomponentes de produtos alimentícios (KITTUR, KUMAR e THARANATHAN, 1998).

A preparação, propriedades e aplicações de filmes comestíveis biodegradáveis e naturais tem sido registrada por vários autores. Avaliações de filmes comestíveis de duas camadas com metilcelulose, polietilenoglicol, lipídiocelulose e outros tem sido documentados na literatura (KITTUR, KUMAR e THARANATHAN, 1998).

Estudos de embalagem e conseqüente extensão de vida-de-prateleira de gêneros alimentícios têm sido feito com pepino, pimenta, cenoura, peru cozido. Coberturas de polímeros foram desenvolvidas para melhorar a aparência de produtos e para reduzir deterioração e degradação microbiológica (KITUR, KUMAR e THARANATHAN, 1998).

Coberturas comestíveis têm sido usadas para controle de trocas gasosas ( $O_2$ ,  $CO_2$  e etileno) entre o alimento e a atmosfera e entre componentes misturados nos alimentos (KITUR, KUMAR e THARANATHAN, 1998).

Caner, Vergano e Wiles (1998) determinaram os efeitos das concentrações de ácido (acético, fórmico, láctico e propiônico), concentração de plastificante e tempo de estocagem, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor da água e oxigênio da solução teste de quitosana filme. Chegando aos seguintes resultados: permeabilidade e tensão não foram afetados pelo tempo de estocagem (mais de 9 semanas), porém o alongamento diminuiu. A solução de ácido láctico produziu uma diminuição na permeabilidade ao oxigênio e a de ácido fórmico aumentou.

Segundo Hoagland e Parris (1996), filmes de quitosana e ácido láctico foram adicionados sobre filmes de pectina com glicerol ou ácido láctico como plastificante, com propriedades mecânicas/dinâmicas similares aos filmes de quitosana somente. Para prevenir o crescimento de fungos, o ácido láctico tem sido usado em substituição do glicerol em filmes de pectina com significativa troca de propriedades mecânicas/dinâmicas. Os resultados mostraram que os módulos de estocagem e perda dos filmes de quitosana/pectina foram significativamente maiores do que os respectivos módulos de filmes de quitosana somente.

Filmes antibacterianos foram preparados dissolvendo quitosana em soluções de ácido clorídrico, fórmico, acético, láctico e cítrico, e os resultados indicaram que o uso de agentes antimicrobianos com volume molecular superior que o ácido acético produz filmes macios e podem ser usados em multifilmes. Ácido clorídrico e fórmico formam filmes duros que podem ser usados como embalagens biodegradáveis ou como suporte de filmes contendo agentes antimicrobianos (BÉGIN e VAN CARLSTEREN, 1999).

O objetivo do trabalho de Agullo et al. 1998, foi determinar a vida-de-prateleira de pré-pizzas cobertas com filmes de quitosana, com a finalidade de avaliar o crescimento de fungos. A superfície e a massa foram tratadas com sorbato de potássio e propionato de cálcio, considerando-se os níveis de temperatura (7 e 20

°C). A primeira cepa fúngica que apareceu nas amostras não tratadas foram *Penicillium*, porém nas tratadas a primeira cepa foi de *Aspergillus*. Neste último caso, a cepa apareceu depois de um tempo maior que nas não tratadas. O estudo mostra que o maior tempo de vida-de-prateleira das pré-pizzas (26 dias a mais quando armazenadas à 20°C) se deve principalmente as propriedades antifúngicas da quitosana.

De acordo com Agullo et al, (1998) filmes de metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e quitosana são flexíveis e fortes, parecendo ser o suficiente adequado para suportar um esforço mecânico razoável que tem lugar durante a distribuição dos alimentos.

O N,N-dicarboximetilquitosana quando associada à proteína morfogenética do osso (BMP) é usada para induzir ou facilitar a regeneração da cartilagem de lesões articulares. O N,N-carboximetilquitosana é útil como portador molecular ou carreador de drogas (MATTIOLI-BELMONTE et al., 1999).

Géis de N-O-carboximetilquitosana promovem um aumento da ação antinoceptiva em formulações de analgésicos opióides (TASKER et al., 1998).

O tratamento térmico de filmes de quitosana foi testado por Lim e Wan (1995), os filmes de quitosana preparados de soluções aquosas de quitosana em ácido acético 1 % v/v, foram colocados em tratamento térmico à temperaturas conhecidas e duração específica. O efeito do tratamento térmico na resistência a água dos filmes foi medido pela extensão da expansão e dissolução do filme em meio aquoso de diferentes pH.

O tratamento térmico por 1 hora reduziu a solubilidade dos filmes, a solubilidade nos meios ácidos e básicos, diminuíram proporcionalmente ao aumento da temperatura nos tratamentos. A solubilidade dos filmes de quitosana difere de acordo com o meio de dissolução usado. Os filmes são muito mais solúveis em ácido clorídrico 0,1 M e menos solúvel em tampão fosfato pH 7,4. A diferença de solubilidade dos filmes de quitosana nos três meios (ácido, básico e neutro) pode ser atribuída a ionização dos grupos amino da molécula de quitosana (LIM e WAN, 1995).

Ainda segundo Lim e Wan (1995) o calor induz a troca das características físicas do filme. O tratamento térmico aumenta a resistência à água dos filmes de quitosana mais em pH baixo do que alto. A resistência à água pode ser atribuída a formação de *crosslinks* e/ou cristais nos filmes.

Butler et al. 1996, testaram os coeficientes de permeabilidade ao oxigênio, vapor de água e etileno, força de tensão e porcentagem de alongamento em filmes de quitosana plastificados com glicerina a duas concentrações 0,25 e 0,50 mL/g de quitosana. Amostras dos filmes foram testados após 0, 2, 4, 8 e 12 semanas de estocagem. Até as primeiras 2 semanas as permeabilidades mantiveram-se constantes, depois diminuindo com o tempo. A tensão diminuiu e o alongamento aumentou com o tempo.

Declararam Butler et al. (1996) que estes filmes de quitosana são barreiras ao oxigênio extremamente boas, e tem baixas propriedades de barrar o vapor de água, por causa de sua natureza hidrofílica. Seus estudos concluíram que o aumento da concentração do plastificante tem um efeito negativo na propriedade de barreira, entretanto propiciou formação de propriedades mecânicas e de manuseio. Eles também mediram a permeabilidade ao etileno, em média os filmes de quitosana apresentaram curvas de permeabilidade ao etileno de  $1,6 \times 10^{-4}$  cc/m/d/atm com 0,25 mL/g de concentração do plasticizante e  $3,1 \times 10^{-4}$  cc/m/d/atm para concentração de 0,50 mL/g de plastificante.

Ghaouth, Arul e Ponnampalam (1991) afirmam que a dessecação e deterioração são as duas maiores causas do fim da vida comercial do pepino e pimenta. O resultado da perda de água causada pela transpiração provoca não somente o encolhimento, murcho e amolecimento do pepino e da pimenta, mas também acelera a deterioração conduzida pela senescência. Geralmente, a transpiração pode ser reduzida pela estocagem a baixa temperatura e alta umidade relativa. Mas a estocagem desta safra abaixo de 7 °C é prejudicial, pois são sensíveis ao frio.

A prevenção da perda de água por transpiração de frutos pode ser reduzida com filme de polietileno de alta densidade (plástico) ou cera. Esses métodos são efetivos para aliviar o estresse da água e retardar a senescência. O prejuízo do empacotamento com plástico na estocagem em temperaturas flutuantes causa condensação da água que promove o crescimento de fungos. A cera quando aplicada com fungicidas geralmente diminui a incidência de deterioração, porém também pode causar produção de sabor indesejável (GHAOUTH, ARUL e PONNAMPALAM, 1991).

Os resultados deste trabalho sobre o efeito de filmes (filme) de quitosana no armazenamento de pimenta e pepino estocados a 13 e 20 °C (UR 85 %) foi

determinado pelo monitoramento da perda de peso, respiração e qualidade. Filmes de quitosana reduziram a perda de peso de ambas as frutas nas 2 temperaturas. O aumento da concentração de quitosana de 1,0 para 1,5 % resultou num significativo aumento da retenção de peso das frutas, diminuiu a curva de respiração, perda de cor, murcha e infecção fúngica. O mecanismo de filmes de quitosana atrasa a senescência da pimenta e do pepino mostrando a habilidade de aliviar o estresse causado pela água (GHAOUTH, ARUL e PONNAMPALAM, 1991).

Além disso, muitas pesquisas sobre filmes de quitosana para cobrir frutas e vegetais com efeitos na permeabilidade de gases, composição interna de gases e tempo de vida útil tem sido realizadas no intuito de obter produtos frescos por mais tempo. Estes estudos indicam que filmes de quitosana têm potencial para prolongar a vida de morangos frescos estocados (GHAOUTH, ARUL e PONNAMPALAM, 1991), pêras e kiwi (DU, GEMMA e IWAHORI, 1997, apud LAZARIDOU e BILIADERIS, 2002), e tomates (GHAOUTH, ARUL e PONNAMPALAM, 1991), também inibe o crescimento de fungos, reduz a produção de etileno, aumenta os níveis de CO<sub>2</sub> e diminuiu os de O<sub>2</sub>. Makino e Hirata (1997) apud Lazaridou e Biliaderis (2002), descreveram a aplicação de laminados biodegradáveis compostos de quitosana-celulose-policaprolactina para embalagem de vegetais como brócolis, tomates e pipoca (LAZARIDOU e BILIADERIS, 2002).

#### 2.1.7 N-carboximetilquitosana (NCMQ)

Nos últimos anos, tem crescido consideravelmente, o interesse na classe dos polímeros naturais conhecidos como polissacarídeos, devido a sua abundância. Ecológicamente correto, e com potencial para substituir alguns petroquímicos, a quitina poli- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e existe nas conchas de crustáceos e insetos. A quitosana poli- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina, pode ser rapidamente obtida pela quitina a partir da desacetilação. Segundo pesquisas recentes na utilização de quitina e quitosana, a pouca solubilidade em água e em solventes orgânicos comuns tem restringido a utilização de ambas (CHEN, DU e ZENG, 2003).

A conversão da quitosana em sua forma solúvel em água pode ser adquirida pela reação de carboximetilação para obter um derivativo conhecido como

carboximetilquitosana (CMQ), que é não somente solúvel em água, mas tem também propriedades químicas, físicas e biológicas únicas assim como, alta viscosidade, grande volume hidrodinâmico, baixa toxicidade, biocompatibilidade e formação de filme, capacidade de formação de gel, fazem dela uma opção atraente para uso em produtos alimentícios e cosméticos (CHEN, DU e ZENG, 2003).

A N-carboximetilquitosana (NCMQ) é formada a partir da carboximetilação da quitosana, que consiste na reação do grupo amino livre da quitosana com ácido glioxílico, produzindo um gel solúvel com grupamentos imino que sofrem redução com cianoborohidreto. Assim, é produzida uma variedade de NCMQ, contendo acetil, carboximetil e grupamentos amino livres formados em proporções controladas pela reação entre a quitosana e o ácido glioxílico (MUZZARELLI et al., 1982).

Para sintetizar NCMQ solúvel em água, a razão molar entre o ácido glioxílico e o grupo amino devem ser equimolares. Quando um excesso de ácido glioxílico é usado obtém-se NCMQ insolúvel. Para se alcançar altos graus de substituição, não se necessita de um excesso de ácido glioxílico, isto ocorre pela presença da função aldeído que é altamente reativa (MUZZARELLI, LLARI e PETRARULO, 1994).

O ácido glioxílico ( $\text{HCOCO}_2\text{H}$ ) por possuir dois átomos de carbono na forma carbonil, é usado em síntese orgânica especialmente no campo farmacêutico (MUZZARELLI et al., 1982). Para a carboximetilação da quitosana, é preferível ácido glioxílico a ácido cloroacético, que se trata de um composto tóxico (MUZZARELLI, LLARI e PETRARULO, 1994).

Quando ácido glioxílico é adicionado a suspensão aquosa de quitosana esta é imediatamente dissolvida formando um gel com valores de pH entre 4,5 – 5,5, aumentando-se este pH com hidróxido de sódio forma-se N-(carboximedilidene) quitosana (base de Schiff), esta é reduzida com cianoborohidreto de sódio a temperatura ambiente em NCMQ, um pó branco solúvel em água a todos os valores de pH (MUZZARELLI et al., 1982).

A NCMQ também apresenta grupamentos acetatos, tendo característica de polieletrólito negativo. Esta função química pode ser comparada a glicina –  $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , portanto a NCMQ pode ser interpretada como um polissacarídeo carregado com grupos glicinas ligados ao carbono 2, e neste ponto de vista o polímero tem grande interesse nas áreas relacionadas a química biológica e química farmacêutica, cosmetologia e produtos médicos (MUZZARELLI et al., 1982, MUZZARELLI, LLARI e PETRARULO, 1994).

Chitoplex® é a forma reticulada da NCMQ, que possui maior rigidez, resistência microbiológica, alta capacidade de quelação, menor tendência de formar gel e encadeia associações. O grupamento glicina da NCMQ é o responsável pela remoção de metais tóxicos e contaminantes de água, uma vez seco é um produto insolúvel que pode ser usado na adsorção de íons metálicos de soluções aquosas (MUZZARELLI et al., 1989).

Estudos termodinâmicos da interação de NCMQ com íons de metais bivalentes indicam que a NCMQ exibe maior afinidade que a quitosana por tais íons. Na seguinte ordem,  $Cu > Cd > Pb > Ni > Co$ , sem quelar cálcio (DELBEN, LAPASIN e PRICL, 1989). Mas supõe-se que o cálcio é quelado pelo Chitoplex® por um mecanismo de absorção física fraca.

Condições de preparação moderadas (meio aquoso neutro e temperatura ambiente), reativos disponíveis (ácido glioxílico, quitosana e agente redutor), e rapidez da preparação permitem que a NCMQ seja obtida prontamente. Este é um polieletrólito moderno, e pode ser preparado a partir de uma variedade de quitosanas, de diferentes tamanhos moleculares, distribuições de peso molecular e graus de desacetilação.

As condições de preparação não degradam o polissacarídeo ou alteram o grau de acetilação, portanto a reação é rápida e completa. Todos estes fatores são vantagens que a preparação de NCMQ apresenta sobre a preparação de O-carboximetilquitosana e O-carboximetilquitina (MUZZARELLI et al., 1982).

Segundo Cuero, Osuji e Washington (1991) soluções aquosas de NCMQ suprimiu crescimento da produção de aflatoxinas (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*) em cultura submersa. Os testes do meio foram elaborados com várias concentrações de zinco (15, 30, 45 e 60  $\mu\text{M}$ ) e solução de NCMQ 0,62  $\mu\text{M}$ . Depois de 8 dias de incubação as culturas tratadas com NCMQ mostraram redução da produção de aflatoxinas e crescimento de fungos. Aumentando os níveis de Zn não superou a inibição mediada pela NCMQ do crescimento de fungos ou produção de aflatoxinas.

Um polímero que possui as funções amina e carboxi apresenta propriedades desejáveis para uma rápida e efetiva quelação e insolubilização de íons de metais de transição em água. A adição de NCMQ em soluções (0,2-0,5 mM) de íons metálicos de transição produz insolubilização imediata da NCMQ-metal (MUZZARELLI et al., 1982).

Vários trabalhos são citados na literatura cujo objetivo foi melhorar os derivados de quitosana. A Carboximetilquitosana é hidrossolúvel e foi patenteada por Hayes (1986) apud Carolan et al. (1991) que descreve a reação da fase sólida entre quitosana e ácido monocloroacético em condições alcalinas. Já Carolan et al. (1991), fizeram modificações neste processo obtendo maior rendimento e menor tempo de reação.

A eficiência da NCMQ para inibir as reações de oxidação lipídica que são catalisadas por metais e a preservação do sabor característico de caldo de carne cozida foi demonstrado por St. Angelo e Vercellotti (1992). Segundo estes autores, a NCMQ é um polissacarídeo quelante que possui alta atividade para controlar reações peculiares na carne. Os resultados de seu trabalho demonstraram que através de análises químicas e sensoriais, a carne adicionada de NCMQ apresentou uma oxidação química controlada e o sabor foi preservado. Em outros trabalhos, os dados mostraram que o resíduo que contém a NCMQ não desenvolveu sabor de deteriorado.

Por propriedades como biocompatibilidade e bioatividade, este biopolímero pode ser utilizado em uma grande variedade de funções, tais como: floculação e coagulação no processamento de alimentos; recuperação de íons de metais pesados em resíduos de água; fabricação de base para alimentos, cosméticos e medicamentos; aplicações biotecnológicas e biomédicas. Porém, para utilizar este novo derivado, é necessário designar e caracterizar estas performances, o que reflete a conformação global da macromolécula na solução (DELBEN e MUZZARELLI, 1989).

#### 2.1.8 Biofilmes

Recentemente surgiu um grande interesse pelo desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade, às preocupações ambientais sobre o descarte dos materiais não renováveis das embalagens para alimentos e às oportunidades para criar novos mercados às matérias-primas formadoras de filme, derivadas de produtos agrícolas (TANADA-PALMU, FAKBOURI E GROSSO, 2002).

Um dos materiais de interesse no processamento de filmes são os hidrocolóides, polímeros solúveis em meios aquosos, estabilizados em géis que normalmente, solidificam e formam filme por evaporação direta do solvente. Os revestimentos de hidrocolóides constituem excelente barreira aos gases, mas oferecem fraca proteção à migração do vapor de água, dada a sua natureza hidrofílica (ASSIS e LEONI, 2003).

Biofilme é um filme fino preparado de materiais biológicos, que age como barreira a elementos externos e, conseqüentemente, pode proteger o produto e aumentar a sua vida de prateleira. Algumas possíveis propriedades funcionais dos filmes incluem retardar a migração de umidade, o transporte de gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), a migração de óleo ou gordura, o transporte de solutos, oferecer uma integridade estrutural adicional aos alimentos, podendo também reter compostos aromáticos e carregar aditivos alimentícios ou componentes com atividade antibacteriana ou antifúngica, com liberação controlada sobre o produto onde foi aplicado (TANADA-PALMU, FAKBOURI E GROSSO, 2002).

Os biofilmes são geralmente produzidos com materiais biológicos, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e derivados, possuem potencial para controlar a perda de umidade e para controlar também a troca de oxigênio, etileno e dióxido de carbono do tecido de frutas; dessa forma, poderiam controlar a respiração do produto e aumentar sua vida de prateleira, funcionando como uma alternativa ao tratamento por atmosfera controlada (AVENA-BUSTILLOS e KROCHTA, 1993), alternativa essa que está sendo empregada na preservação de frutas e hortaliças, porém que apresenta alguns inconvenientes incluindo custos de processo.

Trabalhos recentes estão explorando o potencial das coberturas comestíveis de superfície para manter e estender a qualidade e a vida útil de produtos frescos e reduzir a quantidade de embalagens descartáveis não-biodegradáveis, incluindo as coberturas aplicadas em frutas, como bananas (BANKS, 1984), frutas cítricas (HAGENMAIER e BAKER, 1993), maçãs (BANKS et al., 1997), mangas (CARRILO-LOPEZ et al., 2000), pêras (AMARANTE, 1998), abacates (JOHNSTON e BANKS, 1998), morangos (GARÇÍA et al., 1998) e goiabas (OLIVEIRA e CEREDA, 1999) apud TANADA-PALMU, FAKBOURI E GROSSO, 2002. As coberturas semipermeáveis apresentam influência na fisiologia das frutas, no atraso do amadurecimento e no metabolismo pós-colheita (TANADA-PALMU, FAKBOURI E GROSSO, 2002).

## 2.1.9 Caracterização

### 2.1.9.1 Reologia

A reologia pode ser definida como a ciência do fluxo e deformação dos materiais. Para fluidos simples, o estudo da reologia envolve a medida de viscosidade, sendo que esta depende primeiramente da temperatura e pressão hidrostática. Entretanto, a reologia dos polímeros é muito complexa, pois esta propriedade depende do peso molecular, da estrutura do polímero, da concentração dos vários aditivos, da temperatura, e natureza do solvente (TAKO e NAKAMURA, 1961; KRUMEL e SARKAR, 1975).

Atualmente, os princípios fundamentais da reologia têm sido usados no estudo de cosméticos, tintas, massas, matérias de construção, laticínios e outros materiais (MARTIN, 1993). Scott-Blair (apud MARTIN, 1993) reconheceu a importância da reologia na farmácia e sugeriu sua aplicação na formulação e análises de produtos farmacêuticos, como : emulsões, pastas, supositório e comprimidos revestidos.

Entre as características reológicas mais importantes no estudo de fluidos, destaca-se a viscosidade.

A viscosidade ou fricção interna é a resistência ao movimento relativo de filmes adjacentes de líquido. No sistema CGS a viscosidade se define como a força tangencial por unidade de superfície em dinas/cm<sup>2</sup> necessária para manter uma diferença de velocidade de 1 cm /s entre duas camadas paralelas de líquido situadas a 1 cm de distância. Sua unidade é, portanto dina/cm<sup>2</sup>.seg<sup>-1</sup> ou g/cm.seg, e se chama poise. Como muitos líquidos comuns e água tem viscosidade na ordem de 1/100 poise, sua viscosidade se expressa freqüentemente em centipoises (GENNARO, 1992).

A viscosidade da quitosana em dispersão é influenciada por muitos fatores, tais como: grau de desacetilação do polímero, peso molecular, concentração, força iônica, pH e temperatura. Geralmente, com o aumento da temperatura a viscosidade da dispersão polimérica diminui. Contudo, a mudança de pH na dispersão polimérica pode levar a diferentes resultados, dependendo do tipo de ácido empregado. Com ácido acético, a viscosidade da quitosana tende a

aumentar com a diminuição do pH, enquanto que com HCl, a viscosidade diminui quando o pH é diminuído (Li et al., 1997).

Além dos fluidos considerados newtonianos, existem outros sistemas que apresentam comportamento de fluxo diferenciado, sendo chamados de não-newtonianos. Tais materiais são muito freqüentes na área farmacêutica, a qual possui dispersões líquidas e sólidas heterogêneas tais como soluções coloidais, emulsões, suspensões, pomadas entre outros (BRETAS, 1987 ; MARTIN, 1993).

Quando estes materiais não-newtonianos são analisados em viscosímetros rotacionais em função da velocidade de cisalhamento, independente do tempo de cisalhamento, e o resultado é plotado, as curvas resultantes representam basicamente 3 tipos de comportamento: plástico, pseudoplástico ou dilatante (SEVERS, 1962; SOARES, 1985; MARTIN, 1993).

Os fluidos plásticos necessitam de uma tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) mínima para começarem a fluir. Após essa tensão inicial, também chamada de tensão crítica de escoamento, o líquido escoar, mantendo uma relação constante entre tensão e velocidade de cisalhamento, comportando-se como sendo newtoniano (Figura 2). Em soluções de polímeros de alto peso molecular, muitas vezes, uma tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) mínima se faz necessária, a fim de romper as interações intermoleculares, geralmente forças de Van der Waals, só após a quebra destas ligações, ocorre o escoamento do fluido (BRETAS, 1987; MARTIN, 1993; SEVERS, 1962; SOARES, 1985). Como exemplo de fluidos plásticos podem ser citados os dentífricos e a maioria das tintas (BRETAS, 1987).

Os materiais com comportamento pseudoplástico não necessitam de uma tensão inicial mínima para escoarem. Porém, a viscosidade destes líquidos diminui de forma linear com a velocidade de cisalhamento, conforme mostra a Figura 2 curva B (GENNARO, 1992; MENJIVAR, 1986).

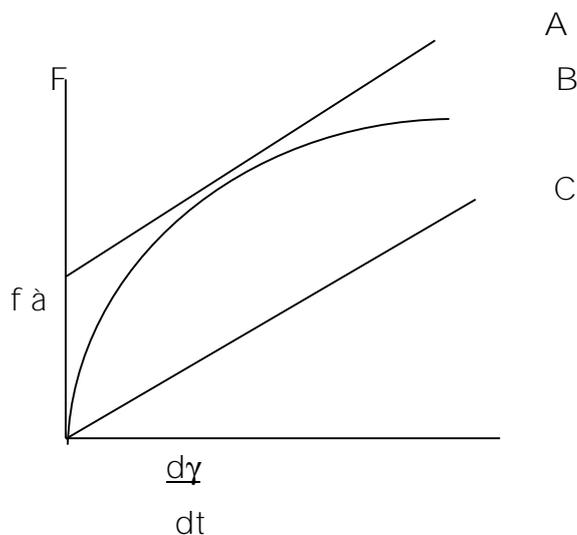


Figura 2. Representação gráfica dos comportamentos de fluxo Plástico (A), Pseudoplástico (B) e Newtoniano (C).

Fonte: CODEX PHARMACEUTICAL (1994)

É importante assinalar que, no caso de fluidos não-newtonianos, onde a relação entre a tensão e a velocidade de cisalhamento, não é linear, existem dois valores de viscosidade para cada estado do fluido, correspondentes a dois conceitos distintos: viscosidade instantânea ( $\eta_{inst}$ ) e viscosidade aparente ( $\eta_{ap}$ ) (Figura 3)

$$\text{Viscosidade instantânea} = \eta_{inst} = d\tau / d\dot{\gamma} = \text{tg } \beta$$

$$\text{Viscosidade aparente} = \eta_{ap} = \tau / \dot{\gamma} = \text{tg } \alpha$$

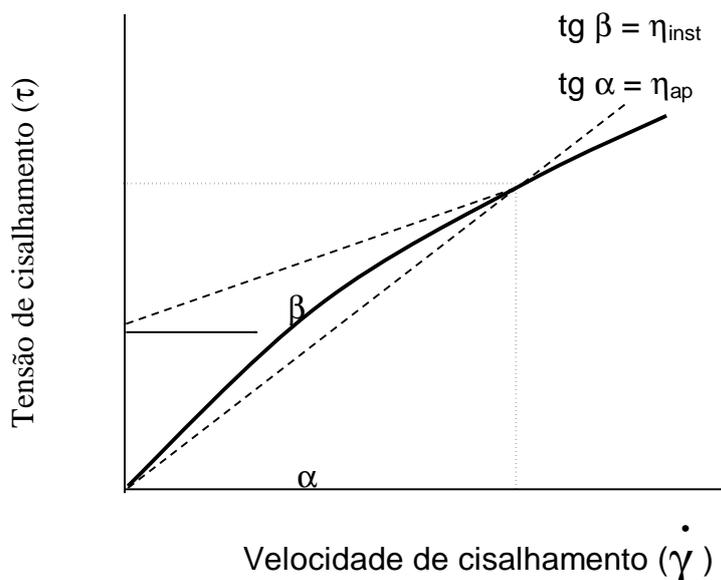


Figura 3. Definição de viscosidade instantânea e viscosidade aparente.

Fonte: BRETAS (1987); MARTIN (1993); MORRIS (1984).

Na Figura 3, que ilustra estes dois conceitos, a viscosidade instantânea é aquela dada pela inclinação da tangente (ângulo  $\beta$ ) a curva que descreve a variação da tensão com a velocidade de cisalhamento, no ponto considerado. A viscosidade aparente, por outro lado, é aquela que corresponde à inclinação da reta (ângulo  $\alpha$ ) que une o ponto considerado à origem, na mesma curva (NIELSEN, 1977; SOARES, 1985).

Um grande número de produtos farmacêuticos, incluindo gomas naturais e sintéticas, por exemplo, dispersões líquidas de tragacanto, alginato sódico, metilcelulose e carboximetilcelulose, apresentam escoamento pseudoplástico (BRETAS, 1987; MARTIN, 1993; MORRIS, 1984).

O comportamento dilatante pode ser evidenciado em suspensões altamente concentradas de partículas muito pequenas, como amido de milho em etilenoglicol/água ou soluções diluídas de poliisobuteno em polibuteno e em polímeros fundidos onde há formações de cristais durante o processo de escoamento (BRETAS, 1987; SEVERS, 1962). Nestes casos, ocorre um aumento da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento.

Existem casos onde a viscosidade dos fluidos apresenta dependência não somente com a velocidade de cisalhamento, mas também quanto ao tempo de aplicação do cisalhamento. A viscosidade, neste caso, varia com o tempo de atuação da deformação de cisalhamento, mantendo-se as outras variáveis, como temperatura, pressão e velocidade de cisalhamento, constantes. Nesta classe incluem-se os materiais denominados tixotrópicos e reopéticos (GENNARO, 1992 ; MARTIN, 1993).

O conceito de tixotropia foi desenvolvido a partir de estudos realizados com dispersões coloidais, tais como pastas de amido, soluções aquosas de gelatina, pectina e certos derivados de quitina. Sistemas desse tipo podem se apresentar como materiais sólidos, de baixo módulo de elasticidade, quando submetidos a baixas tensões. No entanto, sob agitação vigorosa, esses materiais passam a comportar-se como líquidos, permanecendo deste modo enquanto durar o movimento. Quando a agitação é interrompida e a dispersão mantida em repouso por um determinado período de tempo, observa-se que o sistema volta a adquirir sua rigidez original. Esta transformação reversível gel-sol-gel ocorre de maneira isotérmica, em contraste com a maioria das substâncias gel-sol, normalmente controladas pela temperatura (BAUER e COLLINS, 1956; MARTIN, 1993).

Por muitos anos, a expressão tixotropia esteve associada unicamente a transformação gel-sol em dispersões coloidais. Atualmente, um sistema é descrito como tixotrópico quando um decréscimo na grandeza de suas propriedades reológicas, tais como viscosidade ou módulo de elasticidade, ocorre reversível e isotermicamente com uma dependência nítida do tempo de atuação da deformação de cisalhamento (BAUER e COLLINS, 1956 ; REINER, 1956).

De modo semelhante a um fluido com propriedades dilatantes, um material reopético exibe um aumento de viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento (BAUER e COLLINS, 1956 ; MARTIN, 1993).

Outra classificação refere-se a visco-elasticidade dos materiais. Estes materiais apresentam propriedades que poderiam ser caracterizadas como intermediárias, entre as de um sólido perfeito e as de um líquido perfeito (GENNARO, 1992).

Quando um trabalho mecânico é aplicado a um sólido perfeito, este, durante a deformação, armazena todo o trabalho como energia. Quando o trabalho ou força

externa é removido, o sólido perfeito volta a sua forma original pela ação da energia nele armazenada (GRAESSLEY, 1984; TAGER, 1978).

Nos líquidos perfeitos, o trabalho mecânico gasto para produzir a deformação é dissipado instantaneamente sob a forma de calor (GRAESSLEY, 1984; VINAGRODOV e MALKIN, 1980).

Um material é descrito como visco-elástico quando em suas propriedades mecânicas, parte da energia é armazenada e outra parte é dissipada como calor (GENNARO, 1992; MARTIN, 1993).

Ressalta-se que os comportamentos reológicos mencionados não se excluem entre si. Um fluido visco-elástico, por exemplo, pode apresentar características pseudoplásticas e tixotrópicas, dependendo das condições a que é submetido (BRETAS, 1987; NIELSEN, 1977; SOARES, 1985).

Medidas de viscosidade de soluções poliméricas, além do interesse prático, fornecem informações valiosas para a caracterização molecular de polímeros. A viscosidade de soluções macromoleculares é influenciada por uma série de fatores, tais como tamanho e conformação da molécula, volume ocupado em solução, peso molecular e sua distribuição, concentração em polímero, flexibilidade da cadeia e temperatura e velocidade de cisalhamento empregada para obtenção da medida de viscosidade (MANO, 1985; VAN KREVELEN, 1972; WEILL, 1984).

No regime diluído os emaranhados entre as cadeias poliméricas são limitados e a viscosidade da solução cresce linearmente com o aumento da concentração do polímero. Emaranhados começam a ocorrer quando o número de Berry ( $c[\eta]$ ), que é o produto da viscosidade intrínseca e concentração do polímero, excede a unidade (KASAAI, CHARLET e ARUL, 2000). Conforme a concentração do polímero aumenta, a sobreposição das cadeias torna-se mais importante e a viscosidade relativa da solução aumenta significativamente com a concentração, até uma concentração crítica. Esta região, chamada de regime semidiluído, é encontrado em uma faixa de parâmetro de recobrimento ( $c[\eta]$ ) de 1,0 a 10,0. Acima da concentração crítica, o emaranhamento entre os polímeros aumenta abruptamente acompanhado pela viscosidade da solução com a concentração, sendo que isto ocorre quando  $c[\eta] > 10,0$  (KASAAI, CHARLET e ARUL, 2000). A Figura 4 mostra a representação do regime diluído (a), semidiluído (b) e concentrado (c).

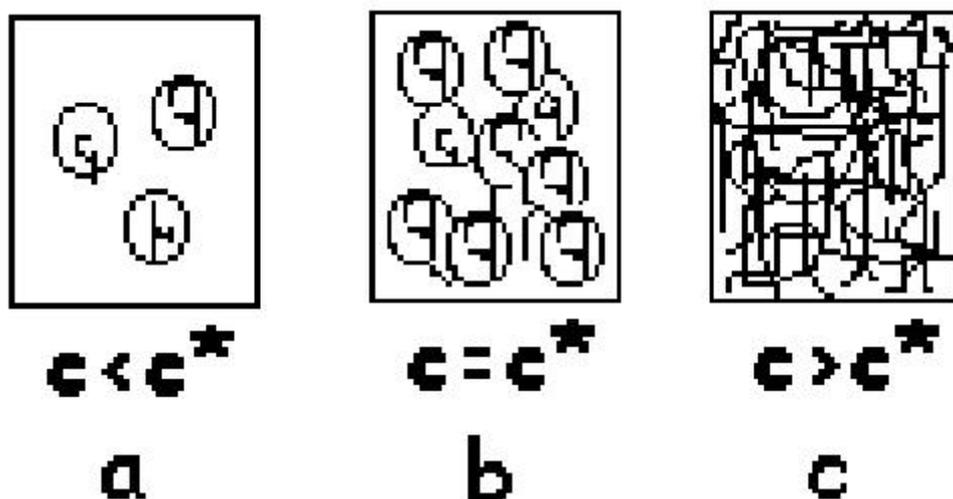


Figura 4. Representação do regime diluído, semidiluído e concentrado.  
 $c^*$  = concentração crítica

Para calcular a viscosidade intrínseca, é necessário calcular outros parâmetros anteriormente, como: viscosidade relativa, específica e reduzida. A viscosidade relativa da solução representa a razão entre a viscosidade da solução e a do solvente. A diferença entre a viscosidade ( $\eta$ ) de uma solução diluída e a do solvente ( $\eta_0$ ) é uma medida da viscosidade de moléculas individuais de soluto. A relação entre esta diferença e a viscosidade do solvente fornece a viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ). A viscosidade aumenta com a concentração de soluto e a relação entre a viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) e a concentração ( $c$ ) é chamada viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) (RICHARDS, 1980).

A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  está relacionada às dimensões moleculares (volume hidrodinâmico) de cadeias poliméricas isoladas. A determinação da viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é um dos métodos mais simples para a verificação da massa molar dos polímeros, além de permitir a obtenção de informações referentes às interações polímero-solvente (TAGER, 1978).

A  $[\eta]$  de uma solução polimérica pode ser determinada através de medidas de viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) a diferentes concentrações, em regime diluído. A variação da viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) com a concentração, quando  $C < 1\%$ , é dada por uma reta que obedece à equação de Huggins. Sendo  $K_H$  a constante de Huggins, cujo valor depende da qualidade do solvente e da conformação das moléculas (TAGER, 1978; RICHARDS, 1980).

A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  de um polímero depende de seu peso molecular. É comprovado experimentalmente que a viscosidade intrínseca (Figura 5) de compostos macromoleculares, em um dado solvente, aumenta com o peso molecular. Esta relação constitui a base do método viscosimétrico para a avaliação do peso molecular de um polímero, a partir da equação de Mark-Howink-Sakurada, em que  $M_v$  é o peso molecular viscosimétrico médio; e  $K$  e “ $a$ ” são constantes viscosimétricas que variam em função da natureza do solvente, da temperatura e da estrutura química do polímero. Os valores de  $K$  e “ $a$ ” são determinados por medida de calibração usando frações de polímeros de peso molecular conhecido. Conseqüentemente, medidas de viscosidade não estão de acordo com a determinação do peso molecular absoluto como em osmometria, light scattering e ultracentrifugação. Em virtude da simplicidade do equipamento, velocidade e exatidão das medidas, a determinação da viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é o método mais largamente, e rotineiramente utilizado para a determinação de peso molecular de polímeros (MARTIN, 1993).

Viscosidades de soluções diluídas são medidas em viscosímetro capilar de vidro. Precauções experimentais incluem procedimentos em banhos de temperatura constantes, variando entre  $\pm 0,02$  °C, com tempo de fluxo de pelo menos 200 s. O fluxo lento elimina a correção da energia cinética, minimizando efeitos finais, dando essencialmente viscosidade “zero-shear”, ou seja, o fluxo ocorre na região newtoniana mais baixa, onde a viscosidade da solução é independente do tempo de fluxo (MARTIN,1993).

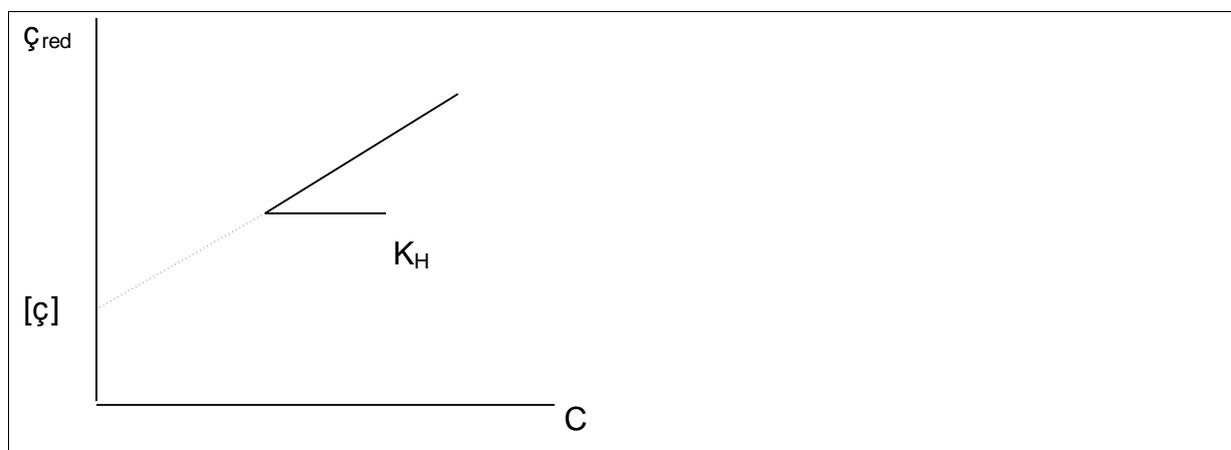


Figura 5. Determinação gráfica da viscosidade intrínseca.

Fonte: MARTIN (1993).

O valor da constante de Huggins depende da conformação e da flexibilidade da macromolécula. Normalmente,  $K$  varia entre 0,3 a 0,7 (TAGER, 1978; WEILL, 1984). Entretanto, outros valores diferentes podem ser observados. A constante de Huggins assume valores inferiores a 0,3 quando o polímero é submetido a altas taxas de deformação. Valores superiores a 0,7 podem ser obtidos decorrentes da presença de entrelaçamentos intermoleculares na solução polimérica (WEILL, 1984).

Para a maioria dos polímeros lineares flexíveis, o valor de “ $a$ ” pode variar de 0,5 a 0,8. A rigidez da molécula contribui para valores de “ $a$ ” superiores a 0,8 (WEILL, 1984).

O fabricante de cosméticos e produtos farmacêuticos deve ser capaz de produzir cremes, pomadas, loções que possuam uma certa suavidade e consistência satisfatória, e ser capaz de reproduzir estas qualidades cada vez que um novo lote for preparado (MARTIN, 1993).

Do ponto de vista científico, a falta de testes objetivos para distinguir as diferentes propriedades reológicas, afeta a qualidade final do produto. Se as características físicas individuais fossem estudadas de acordo com métodos analíticos de reologia, informações valiosas poderiam ser obtidas para uso na formulação de produtos farmacêuticos de melhor qualidade (GENNARO, 1992; MARTIN, 1993).

#### 2.1.9.2 Microscopia eletrônica de varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite o estudo de amostra de filmes em seu estado original, possibilitam a visualização de possíveis imperfeições, porosidades, separação de componentes dos filmes em camadas, estrutura da superfície e visão da estrutura da seção transversal. O microscópio eletrônico de varredura produz uma imagem a partir de um feixe de elétrons que varre a superfície da amostra e os reflete na superfície (CALLISTER, 1997).

Segundo Kalab (1993) a MEV possui grande profundidade de foco, alta resolução e permite que as amostras de filmes poliméricos sejam examinadas em seu estado original.

Barreto (2003) utilizou a MEV para elucidar possíveis diferenças nos filmes de caseinato de sódio sem e com adição de plastificante (sorbitol), observando que não existem alterações significativas na morfologia destes filmes.

Entretanto, Tanada-Palmu, Fakbouri e Grosso (2002), descrevem que a observação microscópica da superfície dos filmes pode prover informações sobre integridade, continuidade e também sobre a organização estrutural da matriz polimérica filmogênica. Avaliando as micrografias obtidas por MEV dos filmes analisados, os autores observaram que o arranjo conformacional característico do filme de gelatina em triplas hélices parece favorecer uma estrutura de matriz mais organizada e assim funcionalmente melhor. Todavia, os filmes de glúten e de gelatina individualmente ou em associação apresentaram-se mais contínuos, e os de celulose acetato fitalato, uma organização descontínua, o que poderia justificar menor resistência física observada nos ensaios mecânicos.

#### 2.1.9.3 Propriedades mecânicas

De acordo com Ward e Hadley (1998) o conhecimento das propriedades mecânicas de materiais poliméricos é de fundamental importância já que destas dependem muitas das aplicações industriais. As propriedades mecânicas são aquelas que determinam a resposta destes materiais às influências mecânicas externas. Estão associadas a capacidade de desenvolver deformações reversíveis e irreversíveis e de apresentar a resistência a ruptura e/ou fratura. Ainda, de acordo com os autores, as propriedades mecânicas são uma consequência da composição da matriz polimérica e de sua estrutura nos níveis moleculares e supramoleculares.

As características mecânicas devem ser suficientes para manter a integridade através das práticas de produção e manipulação porque qualquer dano ao filme, como perfurações e rasgos, destrói as propriedades de barreira e proteção. A quantificação de dados para as características mecânicas dos filmes é essencial para o dimensionamento e desenho dos processos de embalagem e para que se alcance características desejáveis de aplicação específica (MAUER, SMITH e LABUZA, 2000).

Outra importante propriedade dos filmes poliméricos é sua resposta a aplicação de uma força, indicada por dois tipos principais de comportamentos:

elástico e plástico. Materiais elásticos irão retornar à sua forma original desde que a força seja removida. Materiais plásticos não retomam sua forma, porque o fluxo ocorre semelhantemente a um líquido altamente viscoso. A maioria dos filmes poliméricos sintéticos demonstra uma combinação dos comportamentos elástico e plástico, apresentando comportamento plástico após o limite elástico ter sido excedido.

#### 2.1.9.4 Análise sensorial

As qualidades sensoriais dos alimentos, por serem um fenômeno psicofísico, são sistematizadas e classificadas de acordo com os sentidos humanos pelos quais os vários atributos de qualidade são percebidos pelo consumidor aparência, percebida pela visão; percebidos pelos músculos terminais também chamados quinesésicos (MEILGAARD, CEVILLE e CARR, 1991).

A avaliação sensorial é um método científico usado para evocar, medir, analisar e interpretar reações características dos alimentos e bebidas que são percebidas pelos órgãos dos sentidos (HAMPSON et al., 2000).

Segundo Cardello e Cardello (1998) os testes sensoriais, os quais utilizam os órgãos dos sentidos humanos como instrumentos, devem ser incluídos como garantia de qualidade por ser uma medida multidimensional integrada, que possui importantes vantagens, como, por exemplo, determinar a aceitação de um produto por parte dos consumidores.

De acordo com Meilgaard, Ceville e Carr (1991), análise sensorial é um campo muito importante dentro das Ciências dos alimentos e uma ferramenta imprescindível para a indústria alimentícia, já que através dela pode-se determinar a qualidade de um determinado produto, sendo utilizada para:

- avaliar e selecionar matéria-prima;
- estudar os efeitos de diferentes tipos de processos tecnológicos;
- estudar a estabilidade durante o armazenamento;
- avaliar qualidade;
- correlacionar análise físico x química;
- determinar as reações dos consumidores;

inspecionar um determinado produto antes, durante e depois do envase ou acondicionamento;

determinar a vida útil de um produto;

Os métodos subjetivos ou sensoriais são baseados em respostas aos estímulos, que pode ser definido como qualquer ativador químico ou físico que provoque resposta do receptor. O receptor para cada um dos órgãos dos sentidos é especializado em receber somente uma classe de estímulo. Os impulsos nervosos são levados pelos receptores ao cérebro, para que sejam interpretados como sensações. Um estímulo produz uma sensação cujas dimensões são: intensidade, extensão, duração, qualidade e gosto ou desgosto. O estímulo pode ser medido por métodos físicos e químicos e a sensação por processos psicológicos (MEILGAARD, CEVILLE E CARR, 1991).

Os métodos subjetivos empregam equipes de julgadores selecionados e às vezes, necessariamente treinados que se baseiam em suas próprias impressões sensoriais para julgamento de um alimento. O elemento humano é o aparelho que registra as medidas. Quando pessoas são usadas como instrumento de medida, é necessário controlar rigidamente todos os métodos e condições usadas no teste, para evitar erros causados por fatores psicológicos, podendo considerar-se como erros toda influencia estranha que prejudique o bom resultado do teste sensorial (MORI, 1987).

A complexa interação que resulta da interação dos sentidos é usada para medir a qualidade do alimento, onde uma equipe pode dar respostas que indicarão a preferência do consumidor, diferença entre as amostras, diferença e preferência entre as amostras, seleção da melhor amostra ou processo e determinação do grau ou nível de qualidade do produto (MORI, 1987; MEILGAARD, CEVILLE E CARR, 1991).

O uso de equipes de julgadores treinados que descrevem suas reações a um produto representa um meio de obter informações sobre os atributos de um produto, independentemente de qualquer influencia de preferência (STONE e SIDEL, 1993).

Um dos métodos descritivos mais conhecidos é a análise descritiva quantitativa (ADQ), que avalia todos os aspectos de todos os atributos sensoriais presentes no produto, quais sejam: aparência, aroma, sabor e textura. A ADQ é qualitativa e quantitativa e utiliza geralmente uma escala não estruturada, ancorada em seus extremos com palavras que indicam a intensidade do atributo sendo

avaliado. O julgamento é convertido em cm a partir do extremo esquerdo da escala (STONE e SIDEL, 1993).

O método da ADQ fornece descrições quantitativas dos produtos baseados nas percepções de grupos de sujeitos qualificados. Este teste apresenta vantagens de fornecer um perfil sensorial completo de um produto e de permitir análise estatística dos dados e deve ser aplicado para desenvolvimento, modificação e melhoramento de produtos; controle de qualidade; estudo da estabilidade de produtos durante armazenamento; caracterização das diferenças entre produtos; correlação entre medidas sensoriais e instrumentais (ABNT NBR 14140:1998).

As vantagens da ADQ sobre os outros métodos de avaliação são (STONE e SIDEL, 1993):

- confiança no julgamento de uma equipe composta por 10 a 12 julgadores treinados, ao invés de alguns poucos especialistas;
- desenvolvimento de uma linguagem descritiva objetiva mais próxima à linguagem do consumidor;
- desenvolvimento consensual da terminologia descritiva a ser utilizada, o que implica em maior concordância de julgamentos entre os provadores;
- na ADQ os produtos são analisados com repetições por todos os julgadores em testes à cega e os resultados estatisticamente analisados.

De acordo com Cardello e Cardello (1998), as etapas relacionadas com a aplicação de ADQ são:

- seleção de julgadores: a equipe é composta de 10 a 12 indivíduos previamente selecionados e treinados para desenvolverem habilidade em verbalizar as sensações percebidas, trabalhar em grupo e demonstrar reprodutibilidade;
- treinamento: é realizado com os próprios produtos a serem avaliados e com os materiais de referência. Após o treinamento, usualmente se procede a uma nova seleção dos julgadores, a fim de determinar os que conseguem discriminar, apresentando boa reprodutibilidade e resultados consistentes com os demais membros da equipe;
- teste sensorial: são conduzidos em condições que garantam a individualidade dos julgadores, bem como os demais requisitos necessários à avaliação;

- análise dos resultados: são avaliados por análise de variância (ANOVA) e um teste de média, normalmente o teste de Tukey, para comparação das amostras;
- os resultados são representados graficamente e a forma típica deste método é chamada de “gráfico aranha” (*spider-web*). No gráfico aranha, representa-se a intensidade média de cada atributo, tomando-se o ponto central como zero.

Estudos de caracterização sensoriais são importantes no estudo da qualidade de frutas e verduras, pois de acordo com Muñoz, Civille e Carr (1992) trabalhos desta natureza são capazes de detectar pequenas alterações perceptíveis sensorialmente, as quais muitas vezes não são detectadas através de outros procedimentos analíticos.

#### 2.1.10 Maçã cultivar Catarina

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A – EPAGRI, por meio das Estações Experimentais de São Joaquim e Caçador, vêm conduzindo o Projeto de Melhoramento Genético, com o objetivo de criar novos cultivares de macieira melhor adaptadas às condições edafoclimáticas do Estado de Santa Catarina, produtivas, com frutos de alta qualidade e que sejam resistentes às principais doenças e pragas (BONETI et al., 1996).

A cultivar Catarina originou-se do cruzamento Fuji x PWR37T133, as sementes dos frutos, oriundos deste cruzamento, foram semeadas na Estação Experimental de São Joaquim, onde as plântulas oriundas dessa progênie foram inoculadas com alta concentração de conídios de *Venturia inaequalis*. Foram inoculadas cerca de 2.000 plântulas, em casa de vegetação, das quais 1.776 plântulas foram eliminadas por serem susceptíveis (folhas com lesões esporuladas), e as 374 plântulas resistentes (ausência de lesões de sarna), foram selecionadas. Posteriormente, foram feitas outras exclusões dentre as plântulas resistentes, restando apenas 102, as quais foram enxertadas sobre a porta-enxerto EM26, para acelerar a frutificação e avaliar as características agronômicas. Destas, foram selecionadas cinco pré-seleções, dentre elas, a cultivar EPAGRI 402-Catarina, utilizada neste trabalho (BONETI et al., 1996).

Os frutos deste cultivar são de tamanho médio a grande, com peso médio entre 180 e 200 g (Quadro 2), de formato arredondado cônico, porém mais alongado

do que os da cultivar Fuji. A coloração da epiderme é vermelha rajada com fundo verde-amarelado, a cavidade peduncular é rasa, estreita, sem russeting (sinal de amadurecimento) e com pedúnculo curto e grosso. A polpa é amarela-esbranquiçada, succulenta e um pouco mais firme do que a da cultivar Fuji. O sabor é doce, com um teor de 17 % de sólidos totais (SST). Os frutos se conservam muito bem em câmara frigorífica convencional por um período de até oito meses (BONETTI et al., 1996).

Sob condições ideais, a maioria das plantas, incluídos seus frutos, respira aerobicamente. A respiração aeróbica envolve a quebra de moléculas de carboidratos obtidos durante a fotossíntese. A queima lenta desses compostos ricos em energia, dos quais um dos mais simples é a glicose, constitui atividades metabólicas bem conhecidas e são usadas na formação de adenosina trifosfatada (ATP). Durante o processo respiratório normal, a planta usa o oxigênio da atmosfera como um aceptor de elétrons no processo de fosforilação e libera dióxido de carbono (ASSIS e LEONI, 2003).

Quando o fruto é colhido, há uma interrupção no balanço gasoso, ocorrendo um alto influxo do oxigênio com proporcional perda do CO<sub>2</sub>. Nessa nova condição (alta concentração de O<sub>2</sub> com baixa de CO<sub>2</sub>), as células internas não são mais renovadas e a respiração aumenta, o que provoca uma queda metabólica levando o fruto a um gradual amadurecimento e eventual senescência. Com o revestimento ocorre entupimento parcial dos poros, reduzindo, dessa forma, a troca gasosa, ou seja, reduzindo a taxa de respiração, o que permite um prolongamento da vida do fruto (ASSIS e LEONI, 2003).

QUADRO 2. Principais características dos frutos dos cultivares EPAGRI 402-Catarina, Fuji e Gala. Estação Experimental de São Joaquim, SC – 1996.

Características	Cultivar		
	Catarina	Fuji	Gala
Cor da epiderme	Vermelho-rajado sobre fundo verde-amarelado	Vermelho-rajado sobre fundo verde-amarelado	Vermelho-rajado sobre fundo amarelado
Formato	Arredondado-cônico	Arredondado-achatado	Arredondado-cônico
Tamanho	Médio a grande	Médio a grande	Pequeno a médio
Pedúnculo	Curto e grosso	Curto e grosso	Médio
Cavidade peduncular	Rasa, estreita e sem “russeting”	Profunda, estreita e sem “russeting”	Média, estreita e sem “russeting”
Cor da polpa	Amarela-esbranquiçada	Amarela-esbranquiçada	Creme
Teor de açúcar-SST (%)	17,3	14,8	12,7
Grau de acidez titulável (AT)	4,9	6,3	5,7
Relação SST/AT	3,5	2,3	2,2
Firmeza da polpa (libra)	17,9	16,4	17,4
Textura da polpa	Média, firme e crocante	Fina, firme e crocante	Média, firme e crocante
Suculência	Média	Muito suculenta	Suculenta
Sabor	Doce	doce	Semi-doce
Conservação a frio (Atmosfera comum)	8 meses	8 meses	3 meses

Fonte: BONETI et al., 1996.

A resistência à sarna, presente na cultivar Catarina, é conferida por um gene de resistência denominado de *Vf*, oriundo da espécie de macieira *Malus floribunda*, um dos ancestrais da nova cultivar. No campo, esta cultivar tem sido mantida sem tratamentos com fungicidas por mais de dez anos e nunca foi observada a presença de lesões de sarna, tanto nas folhas quanto nos frutos. Durante este período

também se observou que a planta possuiu uma boa resistência ao oídio (*Podosphaeria leucotricha*), similar à da cultivar Fuji (BONETI et al., 1996).

Além disso, as folhas se mantêm verdes mesmo sem pulverização até o outono, indicando um bom nível de resistência às manchas foliares causadas por fungos secundários. Por outro lado, mostrou-se tão susceptível à podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*) quanto a cultivar Fuji. Ainda não se têm informações sobre a suscetibilidade a outras doenças de verão, tais como podridão amarga (*Glomerella cingulata*), fuligem (*Gloeodes pomigena*), sujeira de mosca (*Schizothyrium pomi*) e mancha de glomerella. Se as condições climáticas forem favoráveis para a ocorrência destas doenças, é necessário pulverizar as plantas com os fungicidas recomendados para cada caso (BONETI et al., 1996).

Muitos fatores têm influencia na qualidade das maçãs na pós-estocagem, incluindo maturidade na colheita e condições de estocagem. O efeito da estocagem sob refrigeração tem sido estudado, e é dependente das condições de estocagem e atmosfera modificada prolongada. (GIRARD e LAU, 1995). PARK (1999) descreve que filme comestível em frutas frescas pode ser alternativa para estocagem em atmosfera modificada por reduzir as trocas em quantidade e qualidade e o controle da atmosfera interna das frutas individualmente. O autor também recomenda que testes de avaliação sensorial sejam executados para examinar a performance e aceitabilidade dos consumidores das frutas durante a estocagem.

O uso de tratamento químico pré e pós-estocagem para retardar ou prevenir desordens fisiológicas e podridão torna-se limitado e afeta diretamente o consumidor (FALLIK et al., 2001).

Filmes comestíveis preparados usando proteínas e polissacarídeos podem auxiliar a conservar a alta concentração de preservativos na superfície de alimentos para retardar o crescimento microbiano diminuindo o tempo de vida útil de vários produtos (ASSIS e LEONI, 2003).

A pesquisa de opinião mostra boa aceitabilidade do cultivar Catarina (PEREIRA, BONETI e TSUCHIYA, 2001), mas nenhum estudo foi experimentado para determinar o perfil sensorial. Qualidade comestível e aparência das maçãs são importantes para os consumidores. Estes atributos de qualidade podem ser descritos por cor, textura, odor e sabor em acréscimo aos atributos físicos do mesmo modo que tamanho e forma (KARLSEN et al., 1999). Jaeger e Macfie (2001)

demonstraram que para um novo produto, a relação entre expectativa e performance atual do produto é crítica.

Qualidade e aparência das maçãs são importantes para os consumidores, estes atributos de qualidade podem ser descritos por cor, textura, odor e sabor em acréscimo aos atributos físicos do mesmo modo que tamanho e forma (KARLSEN et al., 1999).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação da N-carboximetilquitosana (NCMQ)

A quitosana utilizada para a preparação da NCMQ foi cedida pelo NIQFAR – Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas – Curso de Farmácia – UNIVALI – Itajaí (SC), com grau de desacetilação de 82%. Todos os outros reagentes são grau P.A.

A NCMQ desenvolvida neste trabalho foi obtida segundo a metodologia descrita por Muzzarelli et al (1982) com modificações, onde a 5g de quitosana adicionou-se 6,52 g de ácido glicóxico (solução a 50 %) e diluiu-se em 600 mL de água destilada. Esta mistura foi levada a agitação mecânica por 24 horas. A seguir com auxílio de um funil de separação, gotejou-se solução de borohidreto de sódio a 2 % sob agitação mecânica contínua durante 24 horas. À solução restante adicionou-se 3 L de álcool etílico absoluto sob agitação contínua até ocorrer precipitação. Suspendeu-se a agitação e deixou-se decantar. Retirou-se o excesso de álcool etílico absoluto e filtrou-se sob papel filtro o resíduo precipitado. Secou-se em estufa com renovação e circulação de ar a 50° C. O resíduo seco assim obtido é a NCMQ.

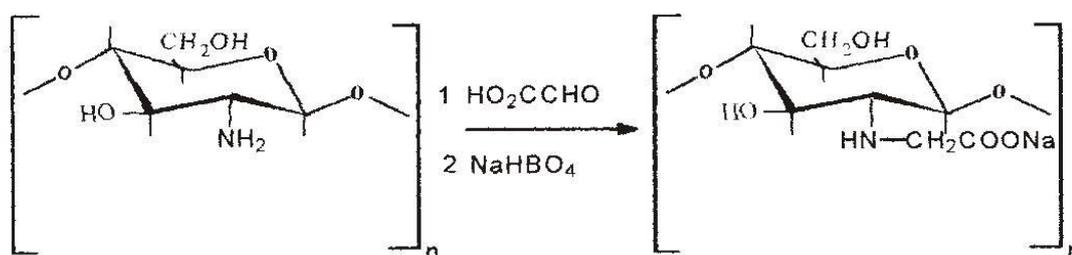


Figura 6. Reação de obtenção da NCMQ.

#### 3.2 Caracterização da NCMQ

##### 3.2.1 Grau de substituição

A determinação do grupamento carboxi em amostra de NCMQ foi realizada através do método condutivimétrico descrito por Casu e Gennaro (1975) modificado,

no qual foram dissolvidas 50 mg de NCMQ em 60 mL de água e introduzida em célula condutivimétrica e titulada com ácido clorídrico 0,1 N.

Os dados obtidos foram lançados em um gráfico de condutividade versus volume de ácido clorídrico (mL) gastos na titulação, sendo que o prolongamento das curvas descendentes e ascendentes determinam o ponto de inflexão (A), onde 5,8 equivale a massa correspondente a 0,1 mEq de  $\text{CH}_2\text{COO}^-$  e  $m$  = massa (mg) do polímero utilizada.

$$\text{CH}_2\text{COO}^- \% = A \times 5,8 \times 100 / m(\text{mg}) \quad (1)$$

### 3.2.2 Umidade, cinzas, proteínas e carboidratos

A umidade foi determinada pelo método da AACC – 4420 (1999), sendo o teor de proteína determinado pelo método de Bradford (1976), a análise de cinzas pelo método da AOAC - 938.08 (1998) e a de carboidratos obtido pela diferença entre a umidade, cinzas e conteúdo protéico.

### 3.2.3 Massa molecular

Para análise do perfil de distribuição de massa molecular e determinação de massa molecular média, as amostras foram solubilizadas em água por 4 horas a uma concentração de 1 mg / mL . Foi injetado 0,5 mL da solução após filtração em membrana de acetato de celulose 0,22  $\mu\text{m}$ , usando um *loop* de 200  $\mu\text{L}$ . Bomba injetora 515 HPLC Waters acoplada a 4 colunas de ultrahydrogel 120, 250, 500 e 2000 com limites de exclusão  $5 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^5$  e  $7 \times 10^6$ , respectivamente.

A leitura foi feita utilizando uma conexão da bomba com o injetor, as colunas, detector de espalhamento de luz (DAWN DSP) e um detector diferencial de índice de refração (Waters 2410). A massa molecular foi calculada pelo software Astra for windows, após determinação do  $dn/dc$  do alginato de sódio (WYATT, 1993).

### 3.2.4 Viscosidade

A viscosidade intrínseca da NCMQ foi determinada dissolvendo-se o polímero nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1%, descontando-se o teor de

umidade, em diferentes solventes: NaCl e KCl 0,1 M. A solubilização foi realizada sob agitação magnética, *overnight*. Cada concentração foi analisada em viscosímetro capilar, cronometrando-se o tempo de escoamento. Cada ensaio foi repetido tantas vezes quanto necessário até alcançar uma variação inferior a 0,5% (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

A partir do resultado do tempo de escoamento foi calculada a viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ ), utilizando-se a equação 2. A viscosidade relativa representa a razão entre a viscosidade da solução e a do solvente, relação esta válida somente em regime diluído.

$$\eta_{rel} = t_2/t_1 \quad (2)$$

$\eta_{rel}$ = viscosidade relativa;

$t_2$  e  $t_1$ = tempo de escoamento da amostra e do líquido de referência

A viscosidade específica  $\eta_{sp}$  (3) foi obtida a partir da razão entre a diferença da viscosidade  $\eta$  de uma solução diluída e a do solvente  $\eta_0$ .

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 \quad (3)$$

A viscosidade reduzida  $\eta_{red}$  (4), das diferentes concentrações de NCMQ analisadas foi obtida a partir da razão entre a viscosidade específica  $\eta_{sp}$  e a concentração da amostra C.

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / C \quad (4)$$

A viscosidade intrínseca foi determinada a partir da representação gráfica da relação de Huggins (5), anteriormente apresentado na figura 3, pela extrapolação da viscosidade reduzida, expressa em função da concentração do polímero (C) à concentração nula.

$$\eta_{sp}/C = K_H ( C [\eta]^2 ) + [\eta] \quad (5)$$

$[\eta]$  = coeficiente linear;  $K_H$  = coeficiente angular

A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  para a avaliação do peso molecular do polímero, foi efetuada a partir da equação de Mark-Howink-Sakurada (6).

$$[\eta] = K(M_v)^a \quad (6)$$

$M_v$  = peso molecular viscosimétrico médio;  $K$  e “ $a$ ” = constantes viscosimétricas

A avaliação do comportamento de fluxo foi efetuada em viscosímetro rotacional tipo cilindro coaxial, utilizando sensor MV1, em diferentes concentrações de NaCl 0,1 M (0,4 a 4 %) em uma faixa de temperatura de 20 - 40°C, com a velocidade de cisalhamento variando de 0 a 100s<sup>-1</sup>, sendo a dependência da viscosidade com a temperatura, expressa por uma equação análoga à equação de Arrhenius (7) (MARTIN, 1993).

$$\zeta = A e^{E/RT} \quad (7)$$

$A$  = constante de Arrhenius

$E$  = energia de ativação;  $R$  = constante dos gases;  $T$  = temperatura °K

A equação modificada de Arrhenius pode ser escrita na forma logarítmica como segue:

$$\ln \zeta = \ln A + E/R (1/T) \quad (8)$$

De acordo com esta última equação, uma regressão de  $\ln \eta$  em função de  $1/T$  forneceu a energia de ativação  $E$  a partir do coeficiente angular e o  $\ln A$  a partir do intercepto da reta.

### 3.3 Análises termogravimétricas

As análises termogravimétricas foram realizadas utilizando um analisador termogravimétrico Shimadzu 50 H (TGA), utilizando massas de amostra de  $9,9 \pm 0,1$  mg. Todas as análises foram mantidas sob atmosfera inerte de nitrogênio em um fluxo de 50 ml.min<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em cinco taxas de aquecimento 2,0; 4,0; 6,0; e 8,0 °C.min<sup>-1</sup> com aquecimento de 25°C a

600°C. Como suporte para as amostras foi utilizado um cadinho de platina (BROWN, 1988; OZAWA, 1965)

As amostras foram mantidas a 105°C por 3 h antes dos experimentos, para diminuir o conteúdo diferencial de umidade, utilizando assim a mesma massa de polissacarídeos para as análises.

### 3.4 Análises cinéticas da termogravimetria

Vários modelos teóricos e empíricos são utilizados para representar as transições de massas observadas. Em cada modelo, a velocidade de reação pode ser expressa como uma função  $f(\alpha)$ , onde  $\alpha$  é o valor de conversão, neste caso de degradação. A dependência da constante de velocidade em função da temperatura pode ser obtida pela equação de Arrhenius (Equação 9). Para determinar a energia de ativação ( $E_a$ ), o  $\ln$  das taxas de aquecimento ( $K$ ) foi plotado como uma função do recíproco da temperatura absoluta, para diferentes perdas de massa ( $\alpha\% = 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60$  e  $80\%$ ). O coeficiente angular desse gráfico fornece a razão  $-E_a/R$  onde  $R$  é a constante universal dos gases. O coeficiente linear obtido fornece o fator pré-exponencial da equação de Arrhenius ( $A$ ) (BROWN, 1988; OZAWA, 1965).

$$\ln K = \ln A - E_a / R.T \quad (9)$$

Para cada  $E_a$  e o seu valor correspondente de  $\alpha$ , a constante de velocidade foi calculada a 100°C.

### 3.5 Ensaio Biológico

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI (Anexo 1) e durante todo o experimento, os animais não sentiram dor e no último dia, foram sacrificados através da aplicação de injeção intramuscular de 50,0 mg/kg de Zoletil 50<sup>®</sup>, de acordo com as Normas Internacionais para Pesquisa Biomédica com Animais (GOLDIM, 1997).

O experimento foi realizado com duração de 28 dias, no Laboratório de Nutrição Experimental do Curso de Nutrição da UNIVALI (Campus II), Balneário

Camboriú - SC, utilizando-se 36 ratos machos adultos, linhagem Wistar, pesando de 200 a 270 g, provenientes do Biotério Central. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos contendo nove animais, assim distribuídos:

- 1) Grupo Controle (C) = dieta normal;
- 2) Grupo hiperlipídico (H) = dieta normal enriquecida com 12 % de gordura animal e 1 % de colesterol;
- 3) Grupo quitosana (Q) = dieta normal enriquecida com 12 % de gordura animal, 1 % de colesterol e 5 % de quitosana;
- 4) Grupo NCMQ (NCMQ) = dieta normal enriquecida com 12 % de gordura animal, 1 % de colesterol e 5 % de NCMQ.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em sala fechada, acondicionados individualmente em gaiolas metabólicas de aço inoxidável, com ambiente climatizado ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), iluminação artificial com ciclo claro/escuro (12/12 horas), controlada por um *timer*.

### 3.5.1 Dietas

As dietas foram preparadas de acordo com as recomendações de *American Institute of Nutrition – AIN*, 1993, considerado um consumo médio diário de 30 g por animal. A Tabela 3 apresenta os ingredientes utilizado na elaboração das diferentes dietas.

TABELA 3. Composição das dietas para o ensaio biológico (g/Kg).

INGREDIENTES	C (AIN- 93)*	HL	Q	NCMQ
Amido de milho	465	465	465	465
Amido de milho dextrinizado	155	155	155	155
Caseína	140,0	140	140	140
Sacarose	100	100	100	100
Óleo de soja	40	120	120	120
Fibra (celulose)	50	50	50	50
Mistura mineral	35	35	35	35
Mistura vitamínica	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Ter-butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008
Colesterol	-	10	10	10
Quitosana	-	-	50	-
NCMQ	-	-	-	50

Fonte: American Institute of Nutrition de 1993 (AIN – 93M).

### 3.5.2 Realização do experimento

O experimento foi realizado de acordo com o método da AOAC (43.253 – 43.256, 1998) onde os animais permaneceram em período de adaptação ao ambiente durante 3 dias, recebendo dieta comercial, fornecida pelo Biotério Central da UNIVALI. Após esta etapa os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais e receberam suas respectivas dietas e água *ad libitum*, durante as quatro semanas do experimento, as quais foram repostas regularmente nas segundas, quartas e sextas feiras. Para o registro de consumo de dieta usou-se balança semi-analítica SCIENTECH-AS 210, com capacidade para 210 g (sensibilidade 0,01 g). O controle de peso dos animais (em anexo) foi realizado três

vezes por semana, utilizando-se balança semi-analítica CF-3000, com capacidade para 3Kg (sensibilidade 0,1 g).

### 3.5.3 Coleta das amostras

#### 3.5.3.1 Sangue

Nos dias 1º e 28º do experimento, os animais foram submetidos à punção cardíaca para coleta de sangue e posterior análise de triglicerídios, colesterol plasmático total e suas frações (HDL e LDL). A coleta de sangue foi efetuada com os animais em jejum de 12 horas, sendo coletados aproximadamente 1,5 mL de sangue, centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos, transferidos para tubos de ensaio contendo anticoagulante (heparina) e mantidos em caixa de isopor com gelo para posterior análise num prazo máximo de 2 horas. As análises (em anexo) de triglicerídios (TG color – GPO/PAP AA), colesterol total (colestat – enzymatic AA) e HDL - colesterol (HDL LE, Labtest® – Diagnóstica) foram determinadas através de métodos colorimétricos enzimáticos. A fração LDL foi calculada, pela seguinte formula:  $LDL \text{ colesterol} = (\text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - \text{Triglicerídios}/5)$  (SBC, 2001).

#### 3.5.3.2 Fezes

As fezes dos animais em experimentação foram coletadas nas sextas-feiras, pesadas, dessecadas e congeladas para posterior análises do teor de gordura fecal (em anexo), de acordo com o método recomendado pela AOAC - 13.033 (1998).

### 3.6 Preparação do filme de NCMQ e quitosana

Para a preparação dos filmes de quitosana e NCMQ foram pesados 2 g do produto e diluído em 100 mL de ácido acético 0.1 M e água destilada, respectivamente, homogeneizados em agitador magnético por 2 horas. Estas soluções foram colocadas em placas de Petri e secas em estufa de circulação de ar a 50º C, por 4 horas.

### 3.7 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura modelo Philips XL 30. As amostras para a análise por MEV foram fraturadas em nitrogênio líquido, com o objetivo de evitar a mobilidade das cadeias poliméricas, o que poderia distorcer as estruturas da superfície de fratura. As amostras foram metalizadas (metalizador modelo P-S2 Diode Sputtering System fabricado por International Scientific Instruments) com uma fina camada de ouro.

### 3.8 Propriedades mecânicas

#### 3.8.1 Análise de resistência mecânica

As características de resistência mecânica dos filmes, incluindo a resistência à tração e a porcentagem de alongamento na ruptura, foram determinadas usando-se uma Máquina Universal de Ensaio Kratos operado de acordo com o método padrão ASTM D 882-95a, com distância entre as garras de 50 mm e velocidade de ensaio de 50 mm/min e célula de carga de 500 N. Os filmes testados apresentaram dimensões de 25,4 mm de largura, 0,03 mm de espessura e 100,0 mm de comprimento.

O método ASTM D 882-95a (1995) (Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Sheeting) compreende a determinação de propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, incluindo filmes (com menos de 1,0 mm de espessura). As condições de temperatura e umidade relativa do ar no laboratório onde foram efetuados os testes foram de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e  $50 \pm 5 \%$ , respectivamente.

#### 3.8.2 Análise dinâmico mecânica (DMA)

As análises dinâmico mecânicas dos filmes (dimensões dos filmes:  $50 \times 0.5 \times 0.15 \text{ mm}^3$ ) foram executadas usando o instrumento Netzsch (DMA 242). As curvas de DMA foram feitas a temperatura de  $-150$  a  $300^\circ\text{C}$ , com velocidade de  $2^\circ\text{C min}^{-1}$ . A razão da força estática para dinâmica foi mantida durante o experimento de DMA

(força estática/dinâmica = 1.6). Todas as análises foram efetuadas em modo de frequência simples de 1 Hz.

### 3.10 Aplicação dos filmes de NCMQ em maçãs

#### 3.10.1 Preparação das amostras

Aproximadamente 500 Kg de maçãs, cultivar Catarina fornecidas pela EPAGRI de São Joaquim (SC) foram selecionadas pelo tamanho e diâmetro semelhantes, sem injúrias e divididos em dois lotes. O primeiro lote foi imerso em solução de NCMQ a 2% durante aproximadamente 1 minuto para formação da camada do filme comestível, sendo a seguir colocado sobre grades para escorrer o excesso de solução, com circulação de ar constante, até a secagem completa do filme (aproximadamente 2 horas). Este lote foi subdividido em duas partes iguais, sendo que uma delas foi estocada em caixas plásticas a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e a outra mantida sob refrigeração ( $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O segundo lote permaneceu *in natura*, ou seja, sem filme de NCMQ, porém também foi subdividido em duas partes iguais seguindo o mesmo procedimento do primeiro lote.

#### 3.10.2 Avaliação microbiológica

As análises microbiológicas envolvendo as amostras de maçã nos diferentes tratamentos foram efetuadas segundo a metodologia APHA (1992). Foram realizadas quatro tomadas amostrais, nos tempos zero e nos próximos três meses, com três repetições, onde foram feitas contagem de bactérias aeróbias mesófilas (padrão), salmonela, coliformes fecais e contagem de bolores e leveduras.

#### 3.10.3 Análise descritiva quantitativa – ADQ

A metodologia utilizada para a definição do perfil sensorial da maçã cultivar Catarina com e sem filme de NCMQ estudada foi realizada através da análise descritiva quantitativa – ADQ, de acordo com Stone & Sidel (1993) e ABNT – NBR 14140 (1998), utilizando uma equipe de dez julgadores treinados do Departamento

de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

As características sensoriais relevantes que definem o perfil sensorial da maçã cultivar Catarina estudada foram adaptadas do trabalho de Karlsen et al, (1999) e obtidas por consenso, isto é, após uma série de discussões sobre os descritores apresentados. Os termos foram selecionados com base na sua objetividade e relevância. Sessões suplementares de treinamento e discussão em grupo serviram para melhor fixação dos termos descritores pela equipe sensorial.

Os quatro tratamentos (maçã com e sem filme de NCMQ a temperatura ambiente e refrigerada) foram avaliados semanalmente com 3 repetições para cada mostra, durante um mes (em anexo). A ordem em que as amostras foram avaliadas em cada sessão foi determinada através de casualização.

Os frutos de cada tratamento foram divididos ao meio, servidos sobre pratos plásticos com a superfície cortada para baixo, à temperatura ambiente, utilizando uma codificação com três dígitos aleatórios. As sessões foram realizadas em cabines individuais com iluminação artificial. Água destilada a temperatura ambiente foi oferecida aos julgadores para enxaguar a boca e eliminar gostos residuais, entre cada atributo avaliado. Na Tabela 4 estão representados os descritores estipulados com as definições dos termos que descrevem.

TABELA 4. Descrição dos atributos sensoriais utilizados para avaliar a maçã cultivar Catarina, adaptados de Karlsen et al. (1999).

Atributo	Definição
Cor da casca	Intensidade de coloração da epiderme da maçã (vermelho-rajado sobre fundo verde-amarelado). Escala: 1 = fraco, 10 = forte
Brilho da casca	Intensidade do brilho da epiderme. Escala: 1 = ausente, 10 = intenso
Aparência desidratada	Intensidade do grau de desidratação Escala: 1 = nenhum, 10 = muito
Odor característico	Intensidade do odor característico, próprio da maçã. Escala: 1 = nenhum, 10 = forte
Sabor característico	Intensidade do sabor característico, próprio da maçã. Escala: 1 = nenhum, 10 = forte
Sabor fermentado	Intensidade do sabor de decomposição enzimática. Escala: 1 = nenhum, 10 = forte
Dureza	Força necessária para romper um pedaço de maçã até finas partículas pela compressão entre os dentes. Escala: 1 = nenhuma, 10 = muita
Suculência	Liberação de suco quando se tritura a amostra durante a mastigação. Escala: 1 = nenhuma, 10 = muita

Na Figura 7 estão representados os descritores estipulados com as respectivas escalas não estruturadas de 10 cm, ancoradas nos pontos externos, à esquerda a menor intensidade da característica e a direita a maior.

NOME _____	DATA _____	AMOSTRA <input type="text"/>
Observe e prove a amostra e avalie a intensidade de cada atributo de acordo com as escalas abaixo:		
Cor da casca	— ————— —	
	fraco	forte
Brilho da casca	— ————— —	
	ausente	intenso
Aparência desidratada	— ————— —	
	ausência	muito
Odor característico	— ————— —	
	nenhum	forte
Sabor característico	— ————— —	
	nenhum	forte
Dureza	— ————— —	
	nenhuma	muita
Suculência	— ————— —	
	nenhuma	muita
Comentários:.....		
.....		
.....		
.....		

Figura 7. Modelo de ficha para a quantificação dos atributos sensoriais de maçãs, cultivar Catarina.

### 3.11 Análise estatística

No ensaio biológico os tratamentos foram comparados através do teste F (ANOVA) e do Teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welch Q Test, ao nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

Para o delineamento estatístico das avaliações sensoriais foi utilizado um fatorial com blocos casualizados, considerando os julgadores como repetições. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) para verificar as possíveis diferenças entre os tratamentos. Realizou-se ainda teste de Tukey a partir dos dados da ANOVA para comparação entre as médias obtidas ao nível de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção e caracterização da NCMQ

As alterações propostas ao método descrito por Muzzarelli et al. (1982) foram utilizar o ácido glioxílico na concentração equimolar e a substituição do cianoborohidreto de sódio pelo borohidreto de sódio, diminuindo assim a toxicidade pela eliminação do radical ciano, além da redução do tempo de reação em dois dias.

De acordo com MUZZARELI et al. (1982) condições de preparação moderadas (meio aquoso neutro e temperatura ambiente), reagentes disponíveis (ácido glioxílico, quitosana). Sendo um polieletrólito versátil, pode ser preparada a partir de uma variedade de quitosanas de diferentes tamanhos moleculares, distribuição de peso molecular e graus desacetilação. As condições de preparação não degradam o polissacarídeo ou alteram o grau de acetilação, portanto a reação é rápida e completa. Todos estes fatores são vantagens que a preparação de NCMQ apresenta sobre a preparação de O-carboximetilquitosana (OCMQ) e O-carboximetilquitina (OCMQi). O fator chave para a produção da NCMQ solúvel em água a partir da quitosana parece ser a relação molar entre o ácido glioxílico e o grupo amino os quais devem ser equimolares. Quando um excesso de ácido glioxílico é usado obtemos a NCMQ insolúvel. Excesso deste ácido parece não ser necessário para alcançar altos graus de substituição, tendo em vista da alta reatividade da função aldeído.

Depois da derivatização da amostra de quitosana, foi obtido um polissacarídeo N-modificado com 4,7 g% de umidade e 84,9 % de carboidratos. Os conteúdos de umidade, cinzas, proteínas e carboidratos da quitosana e da NCMQ estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Conteúdo de umidade, cinzas, proteínas e carboidratos da quitosana e da NCMQ.

Amostras	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)
Quitosana	5,7	1,1	0,05	93,1
NCMQ	4,7	10,4	0,03	84,9

Tal como mostra na Tabela 5, o conteúdo de cinzas na NCMQ foi muito maior, que o da quitosana. Isto, provavelmente é devido, à degradação parcial que a quitosana modificada sofreu, uma vez que a determinação de cinzas se faz a 500 °C e sua degradação total ocorre a temperaturas superiores a 800°C, sugerindo, portanto, que a NCMQ possui maior estabilidade molecular frente à degradação térmica.

#### 4.1.1 Grau de substituição

O grau de substituição determinado, ou seja, a média numérica de grupos carboxílicos por unidades monoméricas transformadas, obtidas através da curva de titulação condutivimétrica foi de 20,88 % (Figura 8), gerando um polieletrólito negativo devido à presença do grupo glioxílico adicionado à estrutura da quitosana, formando a NCMQ com carga positiva devido à presença do grupo amino protonado a pH ácido.

Segundo Muzzarelli et al. (1988) a completa reação dos grupamentos amino leva a um polímero contendo 58 % de suas unidades na forma carboximetilada e 42 % na forma original de acetamida, confirmando que a reação de glioxilato com quitosana apresenta um rendimento de 100 %. Entretanto, nas condições estudadas, substituindo o cianoborohidreto por borohidreto, o rendimento obtido foi de apenas 36 %.

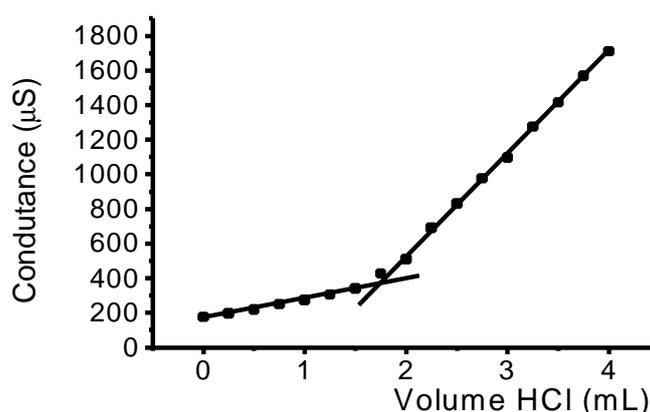


Figura 8. Curva de titulação condutivimétrica da NCMQ.

#### 4.1.2 Determinação da massa molecular

A NCMQ, analisada por cromatografia de exclusão estérica utilizando um detector de índice de refração e espalhamento de luz (*light scattering*), apresentou uma distribuição de massa molecular homogênea, como pode ser observado na Figura 9, representado por um pico único no detector de índice de refração.

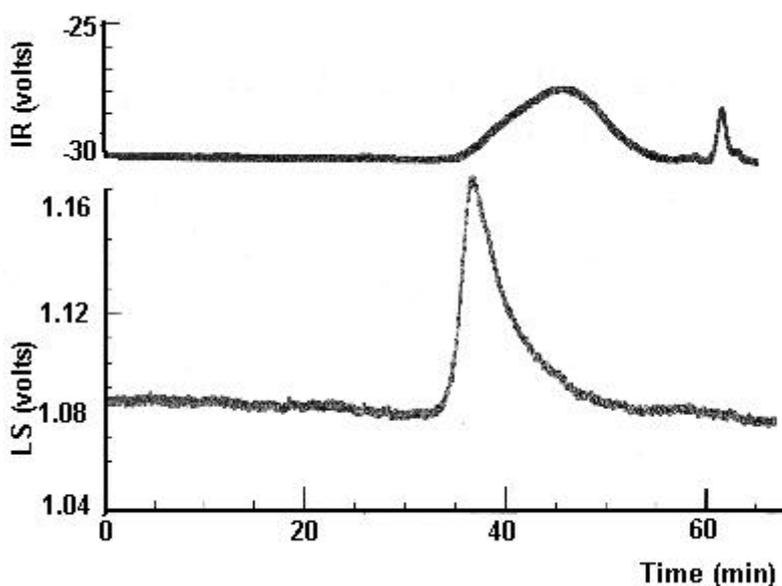


Figura 9. Perfil de eluição da NCMQ analisada por cromatografia de exclusão estérica acoplado a detector de índice de refração e espalhamento de luz.

Cabe ressaltar que o método de extração/derivatização dos polímeros ocupa um papel importante na avaliação da distribuição da massa molecular, bem como na massa molecular média. Uma das condições mais importantes nesta determinação é a obtenção de um material perfeitamente solúvel, permitindo o uso de técnicas apropriadas como é o caso da cromatografia de exclusão com multidetecção (TINLAND, MAZET e RINAUDO, 1988). Entretanto, neste trabalho foi observada visualmente a presença de grumos na solução aquosa de NCMQ, aderidos à parede do recipiente, provavelmente devido a quitosana não derivatizada que não é solúvel em pH neutro.

A massa molecular média calculada foi de 549.000 g/mol, resultado similar ao obtido por Muzzarelli et al. (1988) que foi de 545.300 g/mol. Isto corresponde à completa reação do grupo amino livre disponível, principal modificação do polímero contendo 58 % das unidades de carboximetil formadas e 42% da forma acetamido original.

#### 4.1.3 Viscosidade

##### 4.1.3.1 Viscosidade intrínseca $[\eta]$

Em regimes diluídos as dimensões das cadeias ou o volume hidrodinâmico de uma cadeia isolada, podem ser caracterizados através da determinação da viscosidade intrínseca da solução, dependente de algumas variáveis como: massa molecular, estrutura química e conformação das moléculas, qualidade do solvente, temperatura e, por vezes, da velocidade de cisalhamento. Este parâmetro foi determinado a partir da representação gráfica da relação de Huggins pela extrapolação da viscosidade reduzida, expressa em função da concentração em polímero (C), à concentração nula.

Os dados de  $[\eta]$ , usualmente empregada para caracterizar macromoléculas, a 25 °C, foi determinada medindo-se inicialmente os tempos de escoamento das soluções de NCMQ de 0,02 a 0,1 % (m/v), em diferentes sais (NaCl e KCl), na concentração de 0,1 M, estão representados nas Tabelas 6 a 7.

Tabela 6. Valores de viscosidade relativa, específica e reduzida para soluções de NCMQ (m/v), em KCl 0,1 M\*.

NCMQ (%)	Tempo de escoamento (s)	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$\eta_{red}$
0,020	54,87	1,0208	0,0208	1,0479
0,040	57,12	1,0629	0,0629	1,5884
0,059	58,30	1,0999	0,0999	1,6932
0,079	61,90	1,1516	0,1516	1,9196
0,099	69,10	1,2856	0,2856	2,8853
0,198	87,64	1,5879	0,5438	3,0852

\* Velocidade de cisalhamento = 53,74 s

A Figura 10 reproduz os dados da Tabela 6 mostrando um valor de  $[\eta]$  de  $0,874 \cdot 10^2 \text{ mL/g}$  de NCMQ em KCl 0,1 M, a qual é representada pelo coeficiente linear da equação de reta, resultante do cálculo de regressão linear. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) deste experimento foi de 0,9436, indicando boa correlação entre as variáveis. A concentração de 0,1 % foi desconsiderada dos cálculos, pois apresentou um valor não coerente com as demais concentrações, provavelmente devido à baixa solubilidade da amostra, nesta concentração. Baixa solubilidade e até mesmo agregação e precipitação, também foi observado por Thanou et al. (2001) em concentrações mais elevadas, cerca de 1,0 % ou quando o pH do meio atingiu valores em torno de 6,0, sugerindo que este fenômeno pode ser explicado pelo caráter polianfótero destes derivados. Muzzarelli et al., (1982) usando medidas de pK da NCMQ completamente substituída, observaram que quando o ponto isoelétrico deste polímero, correspondendo a 4,1 alcança o mesmo valor de pH, o fenômeno de agregação e precipitação acontece.

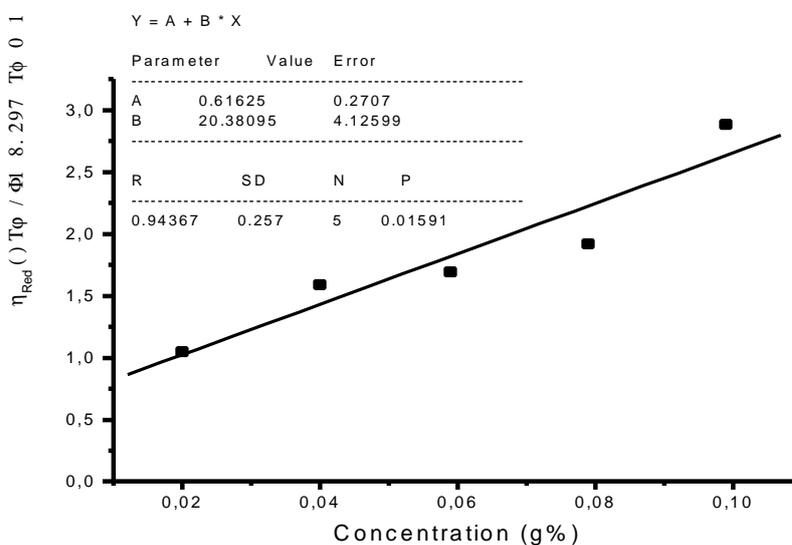


Figura 10. Curva da viscosidade intrínseca  $[\eta]$  de NCMQ em KCl 0,1 M

Os resultados da Tabela 7 estão representados na Figura 11 e mostram que a viscosidade intrínseca  $[\eta]$  em NaCl 0,1 M foi de  $2,0171 \cdot 10^2 \text{ mL/g}$ . Também neste caso, concentrações acima de 0,099 foram desconsideradas, pois da mesma forma que o ocorrido em meio de KCl, precipitações e agregações foram observadas.

Tabela 7. Valores de viscosidade relativa, específica e reduzida de NCMQ (m/v), em NaCl 0,1 M\*

NCMQ (%)	Tempo de escoamento (s)	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$\eta_{red}$
0,020	55,26	1,0421	0,0421	2,105
0,040	57,70	1,0872	0,0872	2,180
0,059	58,75	1,1198	0,1198	2,305
0,079	62,95	1,1858	0,1858	2,352
0,099	67,66	1,2766	0,2766	2,794
0,198	84,84	1,6046	0,6046	3,053

\*Velocidade de cisalhamento = 53,14 s

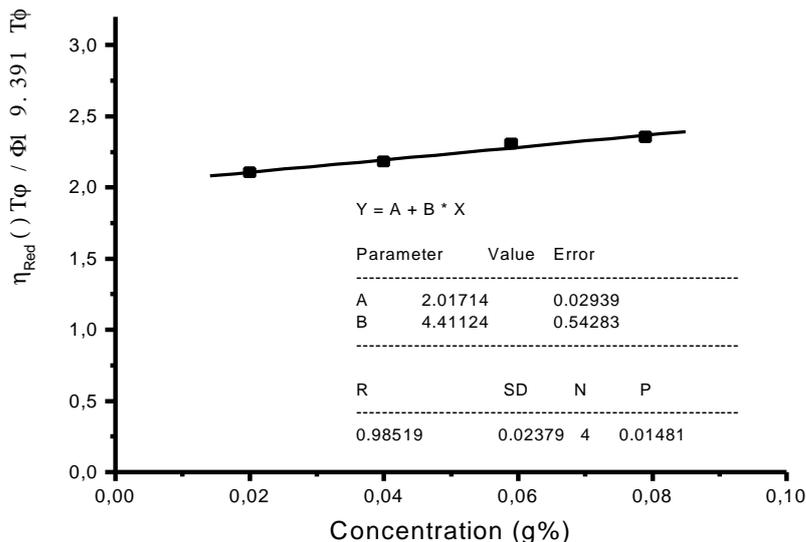


Figura 11. Curva da viscosidade intrínseca  $[\eta]$  de NCMQ em NaCl 0,1 M.

Comparando os valores de  $[\eta]$  da NCMQ no dois meios testados, observa-se que na presença de NaCl o valor obtido foi 2,3 vezes superior. Mostrando que pode haver influência do tipo de sal na determinação deste parâmetro, provavelmente devido a mudanças conformacionais do polímero em função das interações catiônicas e aniônicas no meio, bem como do diâmetro do átomo de Na, maior do que o K.

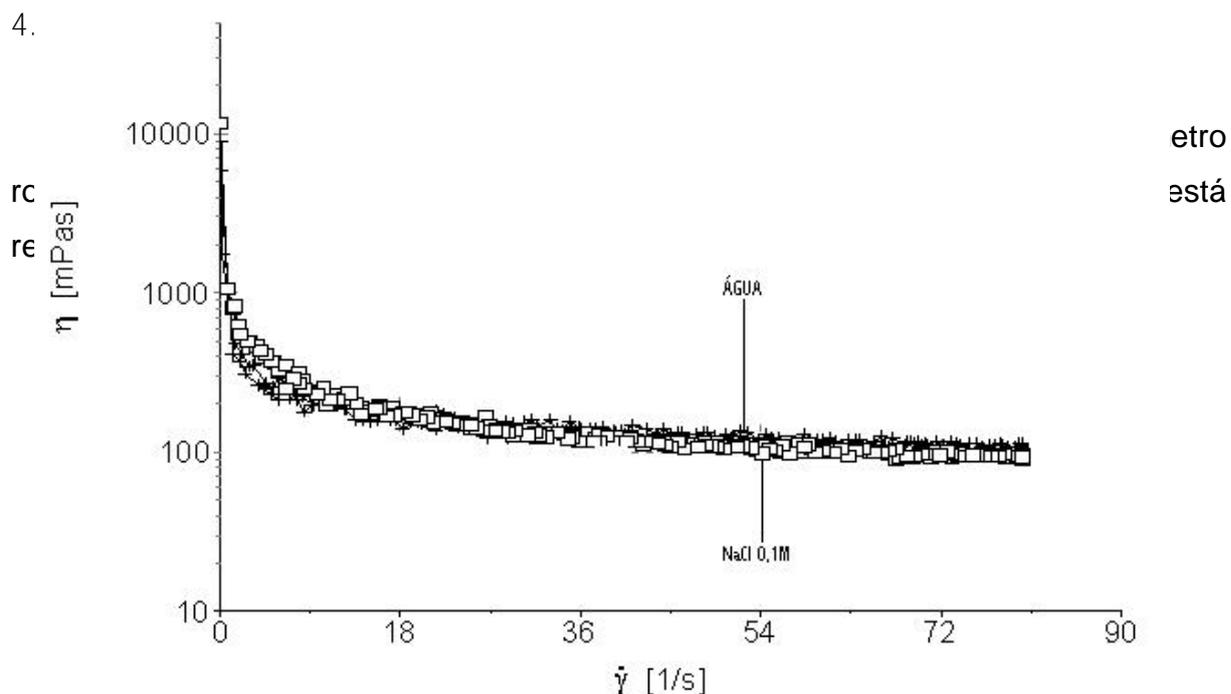


Figura 12. Curvas de viscosidade de NCMQ 2% (m/v) em água e em NaCl 0,1 M.

A solução aquosa de NCMQ 2% (m/v) apresentou comportamento tipo pseudoplástico, relativamente discreto, caracterizado pela diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento (MARTIN, 1993).

O comportamento típico de polieletrólito foi observado ao comparar as viscosidades do polímero, maiores em água do que em NaCl 0,1 M. No primeiro solvente as cargas não estão neutralizadas, ocasionando repulsão intra-cadeia e um maior estiramento da macromolécula. Em NaCl as cargas são “blindadas” diminuindo a repulsão interna e resultando em uma conformação polimérica mais flexível, com diminuição da resistência ao fluxo, ou seja, da viscosidade. Os valores de  $\eta$  a  $80 \text{ s}^{-1}$  (segundo platô newtoniano) foram de 109 e 94,6 mPa, para a solução polimérica 2% em água e em NaCl 0,1 M, respectivamente.

Muzzarelli et al. (1982), analisaram a viscosidade e o comportamento de fluxo de uma amostra de NCMQ obtida através de um processo diferente do utilizado neste trabalho, ou seja: maior tempo de reação com ácido glioxílico (6 dias), maior concentração de ácido glioxílico (185%) e uso de cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) ao invés de borohidreto de sódio ( $\text{NaHBO}_4$ ). Estes autores relataram que a amostra sintetizada apresentou comportamento reopético, com viscosidade ( $\eta$ ) igual 330 mPa a 206 rpm, em uma solução de NCMQ 0,5%, entretanto não

descrevem dados sobre a velocidade de cisalhamento  $\dot{\gamma}$  usada, para que pudesse ser comparado com os resultados deste trabalho.

Não foi possível analisar concentrações inferiores a 2% devido ao fato de serem excessivamente viscosas, incorporando bolhas de ar durante a análise, dificultando a manipulação do produto.

#### 4.1.3.3 Influência da concentração na viscosidade

A influência da concentração sobre a viscosidade do polímero foi analisada, conforme mostrado na Figura 13. Tal como pode ser observado, com o aumento da concentração, a curva de viscosidade apresenta valores constantes nas maiores velocidades

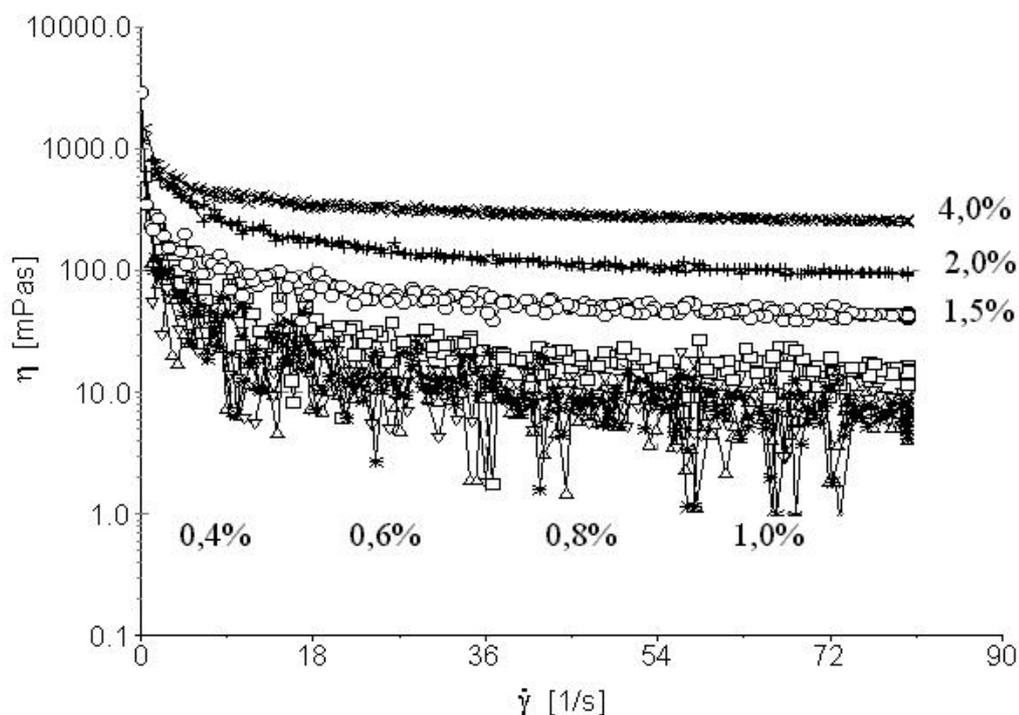


Figura 13. Curvas de viscosidade de NCMQ em NaCl 0,1M .

\* = 0,4 %; = 0,6 % = 0,8 %; = 1,0 % = 1,5 %; + = 2,0 %; x = 4,0 %

Na Figura 14, as viscosidades específicas de diferentes concentrações poliméricas foram plotadas em função da concentração de polímero, evidenciando uma relação direta entre ambas.

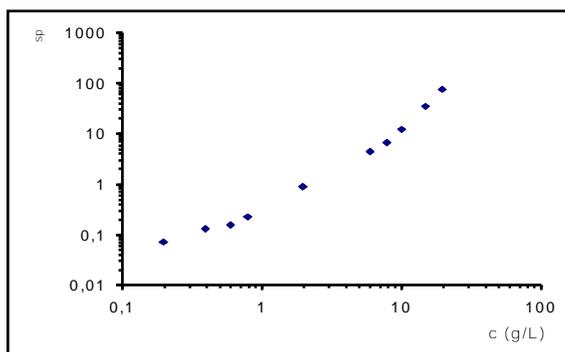


Figura 14. Viscosidade específica obtida em *shear* zero em função da concentração polimérica da NCMQ em NaCl 0,1 M.

Os valores de  $\eta_{sp}$  plotados em função do parâmetro de recobrimento –  $c[\eta]$  (*overlap parameter*) em um gráfico log-log que estão representados na Figura 15 foram obtidos através da relação de Huggins. Segundo Rinaudo (1993) esta relação é válida para cada polímero individualmente, obtendo-se curvas únicas, nas quais, a viscosidade da solução é relacionada com o produto  $c[\eta]$ , apresentando um valor crítico de  $c[\eta]$  qual ocorre

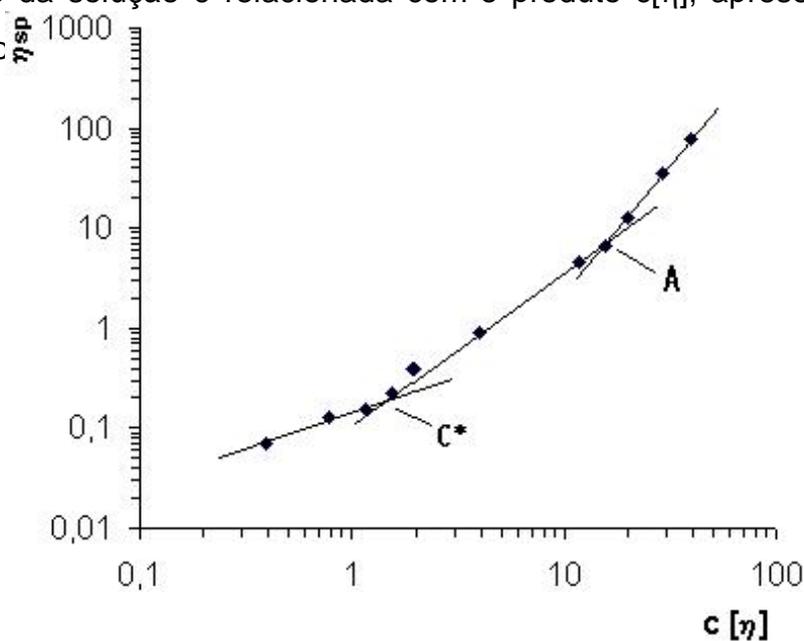


Figura 15. Viscosidade específica de NCMQ obtida em *shear* zero em função do parâmetro de recobrimento.

De acordo com Morris (1984), o parâmetro de recobrimento,  $c[\eta]$  (*dimensionless coil overlap parameter*) definido como a medida do volume do polímero em solução é independente do tipo e da massa molecular e assume valores próximos a 4 para a maioria dos polissacarídios neutros ou carregados em

conformação enovelada. A NCMQ apresentou um valor de  $c[\eta] \approx 2,0$ , considerando-se a transição do regime diluído para o semidiluído ( $c^*$ ). O ponto A, mostra a transição do regime semidiluído para o concentrado.

#### 4.1.3.4 Influência da temperatura na viscosidade

A energia de ativação calculada foi de 1,8; 1,9 e 2,1 para as concentrações de 1, 2 e 3%, respectivamente, apresentando portanto, um aumento de  $E$  em função da concentração. O gráfico de Arrhenius para a NCMQ em NaCl 0,1 M está representado na Figura 16.

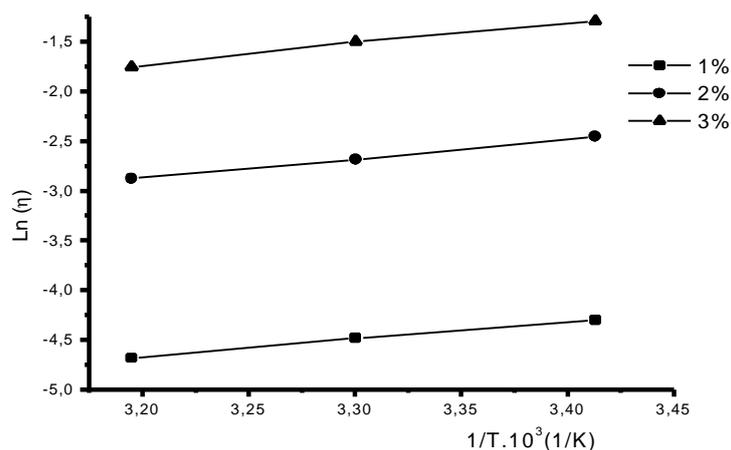


Figura 16. Gráfico de Arrhenius de NCMQ em NaCl 0,1 M, na velocidade de cisalhamento de  $80 \text{ s}^{-1}$ ,

O procedimento de *shift* utilizado para calcular as curvas *master* de viscosidade de soluções de NCMQ e sua dependência com a temperatura e concentração, representados na Figura 17, mostra que as curvas obtidas apresentaram um comportamento típico reológico, de queda vertical.

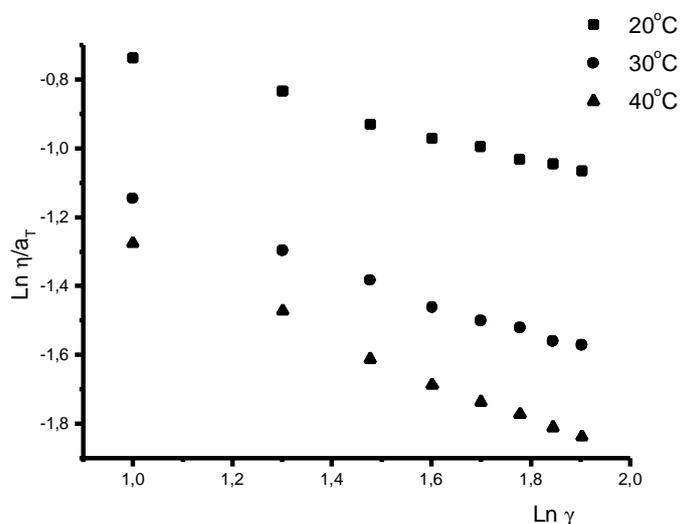


Figura 17. Curva  $\log a_t$  versus  $1/T$  de soluções de NCMQ a 2 % em diferentes temperaturas ( $t=20,30$  e  $40^\circ\text{C}$ ), com  $t_0 = 20^\circ\text{C}$ .

A Figura 18 mostra o gráfico de  $\ln a_t$  versus o recíproco da temperatura (em  $^\circ\text{K}$ ), com a correspondente equação de reta, calculada (obtido) por regressão linear simples:

$$\ln a_t = -7,9838 + 2,335/T \quad (10)$$

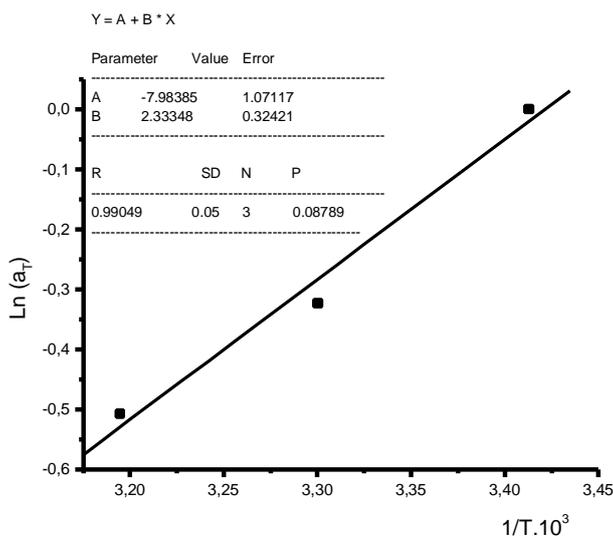


Figura 18. Gráfico de  $\ln/a$  versus o recíproco da temperatura ( $^\circ\text{K}$ ) para solução de NCMQ 2 % em NaCl 0,1 M.

Em cálculos prévios foram encontradas as seguintes relações para diferentes amostras de quitosana (DA = 78,4%, c = 1% m/v):  $\ln a_t = -12,3 + 3,600/T$  e para quitosana (DA = 73,3%, c = 2% m/v):  $\ln a_t = -11,6 + 3,406/T$  (Mucha, 1998). Porém não há dados na literatura sobre esta relação para a NCMQ.

#### 4.1.4 Análises termogravimétricas

Para avaliar a conduta de variação térmica da quitosana e de seu derivado a NCMQ, foi primeiramente analisada sua propriedade termogravimétrica, a qual pode ser visualizada na Tabela 8. A Figura 19 mostra a curvas de perda de peso em função da temperatura, para as amostras de quitosana e NCMQ numa velocidade de aquecimento de  $4^\circ\text{C min}^{-1}$ , sob fluxo de nitrogênio, iniciando de  $30^\circ\text{C}$  até  $750^\circ\text{C}$ .

Tabela 8. Temperatura de degradação e porcentagem de perda de peso da quitosana e NCMQ a velocidade de aquecimento de  $4^\circ\text{C.min}^{-1}$ .

AMOSTRA	$T_{\text{inicial}} (^\circ\text{C})$	$T_{\text{final}} (^\circ\text{C})$	$T_m (^\circ\text{C})$	Perda de peso (%)
Quitosana	175	356	250	62
NCMQ 1º evento	190	310	253	35
NCMQ 2º evento	515	642	600	25

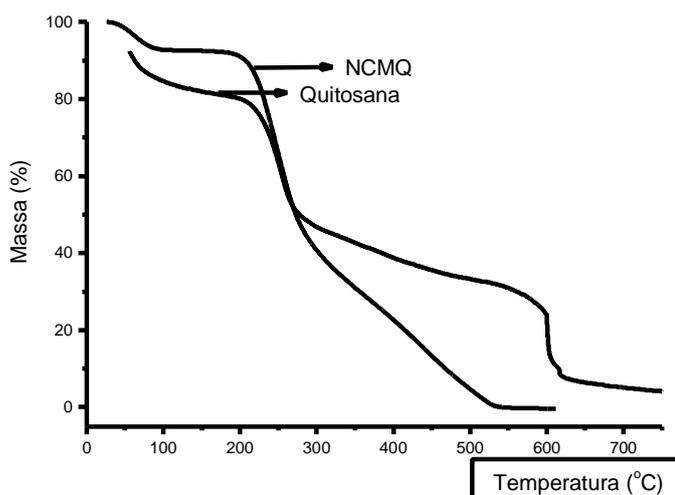


Figura 19. Curva de perda de peso da quitosana e NCMQ a  $4^\circ\text{C.min}^{-1}$ , sob fluxo de  $\text{N}_2$  a  $50 \text{ mL.min}^{-1}$ .

Analisando a Tabela 8 juntamente com a Figura 19 observa-se que:

- um novo evento de degradação pode ser visto com a modificação do polissacarídeo, a  $\sim 602^{\circ}\text{C}$ ;
- ambos, quitosana e NCMQ apresentam evento de degradação que ocorre a  $\sim 256^{\circ}\text{C}$ ;
- a temperatura inicial de degradação do primeiro evento ( $\sim 256^{\circ}\text{C}$ ), inicia com a quitosana ( $175^{\circ}\text{C}$ ), quando comparado com a NCMQ ( $190^{\circ}\text{C}$ ), indicando a baixa estabilidade térmica da quitosana;
- a degradação da quitosana no primeiro evento gera uma perda de peso de 62%. A NCMQ perdeu somente 43,5% de massa, a pequena perda de peso quando comparada a quitosana no mesmo evento de degradação, confirma a alta estabilidade térmica do derivado.

A Figura 20 mostra a curva de perda de peso derivada (dTG) sobreposta a  $4^{\circ}\text{C min}^{-1}$  da quitosana e NCMQ.

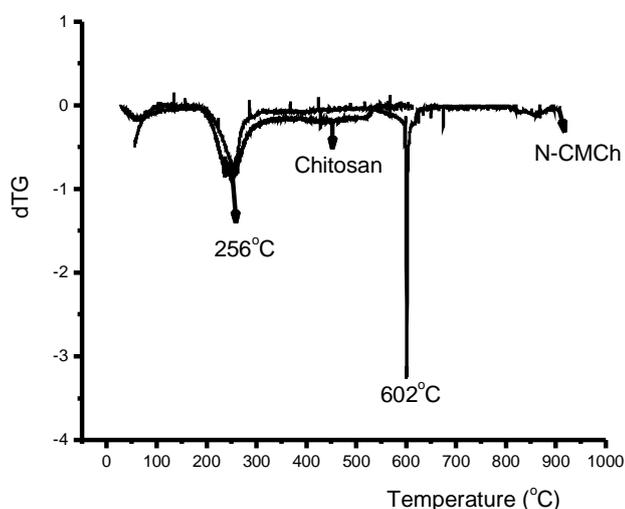


Figura 20. Curva de perda de peso derivada (dTG) sobreposta a  $4^{\circ}\text{C min}^{-1}$  sob fluxo de  $\text{N}_2$  a  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  da quitosana e NCMQ.

Freitas et al. (2004), observaram similar evento, onde a oxidação seletiva no C-6, usando agente seletivo oxidante TEMPO, gerou uma galactoxiloglucana polianiónica. O polissacarídeo neutro usado para obter o derivado foi obtido de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*). O grau de modificação mostrou aumento

da estabilidade térmica dos polissacarídios de forma dependente do grau de oxidação, devido, provavelmente a formação de compostos intermediários estáveis durante a degradação. O mesmo autor também observou, a formação de evento secundário de degradação na molécula do derivado, semelhante ao observado neste trabalho.

#### 4.1.4.1 Análises cinéticas termogravimétricas

A Figura 21 mostra a velocidade de aquecimento ( $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) em função da recíproca da temperatura absoluta. A inclinação desta reta foi utilizada para obter valores de  $E_a$  diferentes dos valores de  $\dot{a}$  (%).

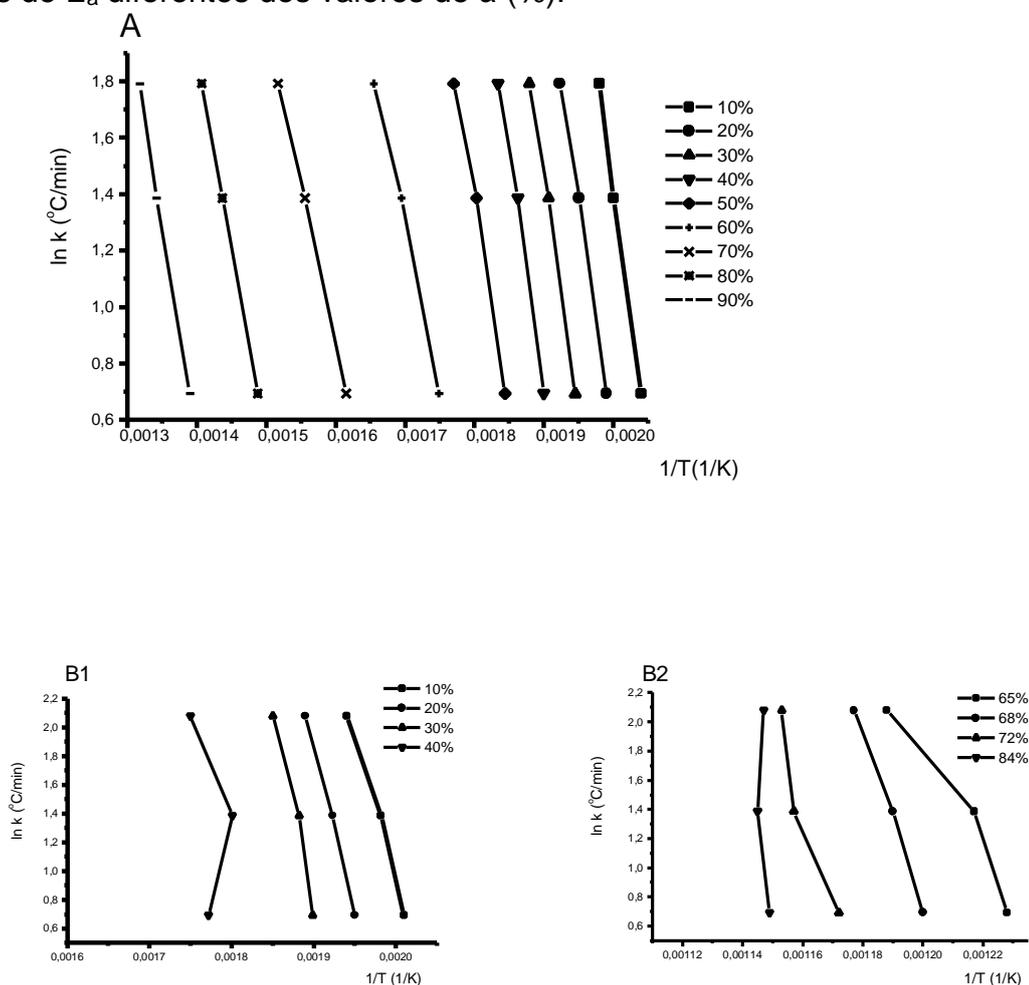


Figura 21. Velocidade de aquecimento ( $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) em função da recíproca da temperatura absoluta.

A: quitosana; B1: primeiro evento; B2: segundo evento de degradação da NCMQ. As linhas representam  $\dot{a}$  (%).

A Figura 22 apresenta a energia de ativação ( $E_a$ ) em função do fator de conversão ( $\alpha$  %). Os dados mostram um aumento da energia de ativação, dependendo do fator de conversão, no processo de degradação térmica da NCMQ. O aumento observado na energia de ativação foi pelo menos 13 vezes maior ao final do processo de degradação, quando comparado NCMQ com a quitosana. A alta energia de ativação da NCMQ confirma a estabilidade do derivado, indicando que a carboximetilação da quitosana gera um produto mais estável, quando comparado com o polissacarídeo nativo, aumentando o potencial de aplicação em produtos que precisam suportar aquecimento.

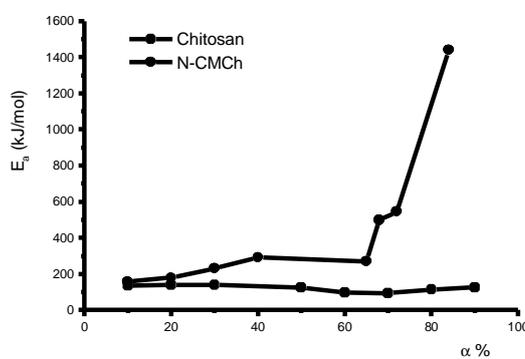


Figura 22. Energia de ativação ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) em função do fator de conversão ( $\alpha$ %) da quitosana e NCMQ.

A Figura 23 mostra a constante de velocidade da quitosana e da NCMQ a  $100^\circ\text{C}$ . Observa-se que a  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) da quitosana é constante em função do fator de conversão ( $\alpha$ %). A baixos valores de fator de conversão, os valores da constante de velocidade da quitosana e NCMQ são muito semelhantes. Com o aumento da constante de velocidade, para a quitosana modificada, uma grande diferença é observada quando comparada com a quitosana. A valores altos de fator de conversão ( $>70\%$ ), a constante de velocidade do processo de degradação mostrou praticamente nenhuma degradação nestes valores de conversão a  $100^\circ\text{C}$ . Para gerar maior degradação na NCMQ, um aumento na temperatura do sistema se faz necessário.

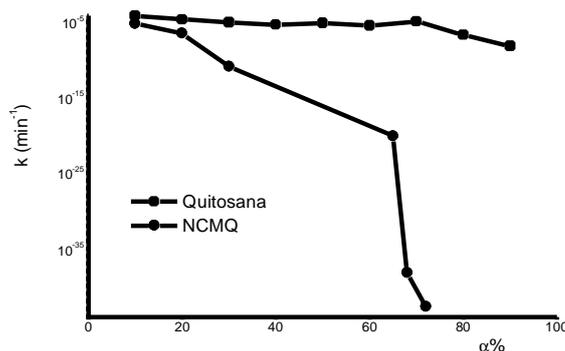


Figura 23. Constante de velocidade ( $\text{min}^{-1}$ ) em função do fator de conversão ( $\alpha\%$ ) da quitosana e da NCMQ a  $100^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.5 Ensaio Biológico

A quitosana exibe propriedades anticolesterolêmicas, antiúlcera e antiuricêmica quando administrada oralmente, e é potencialmente apropriada para prevenção da doença celíaca, bem como auxiliar na redução do peso corporal. Estas propriedades são resultantes de sua capacidade de se ligar especificamente a ácidos graxos, bile, fosfolípidios, ácido úrico e a fração tóxica da gliadina (MUZZARELLI, 1996), entretanto ainda são desconhecidos estes efeitos em relação ao seu derivado. Em função disso foi efetuado um ensaio biológico visando demonstrar se a NCMQ também possuía uma destas propriedades, especificamente ação anticolesterolêmica e redutora de peso.

##### 4.1.5.1 Consumo alimentar e ganho de peso

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que o consumo alimentar, peso final e ganho de peso não apresentaram diferenças significativas ( $p = 0,9875$ ), em ratos adultos alimentados com dietas hiperlipídicas contendo 5% de quitosana (QTS) e 5% de NCMQ respectivamente, quando comparado com a dieta controle (C) e hiperlipídica (HL). Resultados semelhantes foram descritos por Fukada, Kimura e Ayaky (1991), que após 21 dias de experimento com ratos, não encontrou diferenças significativas no consumo alimentar entre o controle e a dieta suplementada com 5% de quitosana.

Tabela 9. Média de consumo alimentar e ganho de peso dos animais nas diferentes dietas.

Grupos	Consumo alimentar médio (g)	Peso inicial médio(g)	Peso final médio (g)	Ganho de peso médio (g)
C	61,16 <sup>a</sup> ± 11,35	224.33	288.11	63.78 <sup>a</sup> ± 23.72
HL	56,32 <sup>a</sup> ± 10,26	225.33	299.00	73.67 <sup>a</sup> ± 27.77
QTS	52,61 <sup>a</sup> ± 10,59	222.78	262.56	39.78 <sup>a</sup> ± 17.72
NCMQ	55,87 <sup>a</sup> ± 13,42	222.63	271.25	48.62 <sup>a</sup> ± 24.86

C=dieta controle;HL=dieta hiperlipídica (12% lipídios,1% colesterol); QTS=dieta hiperlipídica adicionado 5% quitosana; NCMQ =dieta hiperlipídica adicionado 5% NCMQ.

Médias nas colunas com diferentes subscritos são significativamente diferentes (p<0,05) usando ANOVA e o teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welch Q test.

#### 4.1.5.2 Excreção de gordura nas fezes

Tal como mostra a Tabela 10, ratos alimentados com dieta NCMQ e QTS aumentaram a excreção de gordura nas fezes quando comparado com os demais grupos em todo o período do experimento, sugerindo a interferência da dieta suplementada com QTS e NCMQ na absorção intestinal de gordura, conseqüentemente no aumento de sua excreção.

Tabela 10. Efeito das diferentes dietas sobre a excreção de gordura fecal.

Período (dias)	Média da excreção de gordura fecal dos grupos (%)			
	C	HL	QTS	NCMQ
0	2,81 <sup>a</sup> ± 0,35	2,55 <sup>a</sup> ± 0,62	2,86 <sup>a</sup> ± 0,45	2,46 <sup>a</sup> ± 0,35
8	2,38 <sup>a</sup> ± 1,36	4,66 <sup>a,b</sup> ± 0,74	10,86 <sup>c</sup> ± 2,66	7,30 <sup>b</sup> ± 1,87
16	2,07 <sup>a</sup> ± 0,96	4,08 <sup>a</sup> ± 1,03	9,93 <sup>b</sup> ± 1,23	7,08 <sup>c</sup> ± 1,54
22	1,93 <sup>a</sup> ± 0,75	3,93 <sup>b</sup> ± 2,22	7,54 <sup>c</sup> ± 3,11	8,13 <sup>c</sup> ± 0,68
28	3,12 <sup>a</sup> ± 0,78	5,44 <sup>a</sup> ± 1,34	9,81 <sup>b</sup> ± 0,75	8,96 <sup>b</sup> ± 2,02

C = dieta controle; HL = dieta hiperlipídica (12 % lipídios, 1 % colesterol); QTS = dieta hiperlipídica adicionado 5 % quitosana; NCMQ = dieta hiperlipídica adicionado 5 % NCMQ.

Médias na horizontal com diferentes subscritos são significativamente diferentes (p<0,05) usando ANOVA e o teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welch Q test.

Comparando os resultados de excreção de gordura fecal, observa-se que no período 0 (zero) início do experimento, não houve diferenças significativas entre os grupos, indicando uma boa homogeneidade do material experimental. No oitavo dia de experimento (período 8) o grupo QTS foi significativamente superior aos demais grupos, seguido pelo grupo NCMQ, o grupo HL apresentou um ligeiro aumento (não

significativo) quando comparado ao grupo C. No período 16 o grupo QTS continua mantendo porcentagem superior de excreção fecal quando comparado aos outros grupos. A partir do 22º dia de experimento os grupos QTS e NCMQ não apresentaram diferenças entre si, permanecendo os grupos HL e C com as mesmas porcentagens.

Estudos realizados em animais e no homem apóiam a hipótese de que a fibra dietética diminui a absorção de lipídios e a reabsorção intestinal de sais biliares, aumentando sua excreção fecal e reduzindo os níveis de colesterol no sangue (HILLMAN et. al., 1985).

São diversos os mecanismos que justificam esta diminuição dos lipídios no sangue relacionados à ingestão de fibras, dentre eles, podemos citar: a) a fibra seqüestra em sua matriz, os produtos de degradação das gorduras (colesterol e triglicerídios), diminuindo subseqüentemente sua absorção; b) a fibra seqüestra sais biliares que serão eliminados nas fezes interferindo em sua circulação enterohepática, este fato acarretará uma diminuição da concentração de colesterol plasmático, visto que este será utilizado para sintetizar os sais biliares eliminados; c) o propionato e outros graxos de cadeia curta decorrente da fermentação bacteriana da fibra, são absorvidos via circulação enterohepática e podem atuar através da inibição da enzima HMG-CoA redutase, enzima limitante da síntese de colesterol endógeno, conseqüentemente redução dos níveis de colesterol sérico; d) existe um quarto mecanismo, considerado indireto, que seria a redução da absorção de carboidratos, a conseqüência deste fato seria uma diminuição da síntese hepática de lipídios (MIETTINEN, 1987; MÁRQUEZ, 2001).

#### 4.1.5.3 Níveis plasmáticos de colesterol total, LDL, HDL colesterol e triglicerídios

A quitosana comporta-se como um biopolímero fibrilar policatiônico parecido com a celulose que forma filmes com as superfícies carregadas negativamente, não sendo hidrolisada pelas enzimas digestivas do organismo humano. Nas Tabelas 11 e 12 estão apresentados os resultados dos níveis plasmáticos de colesterol total, LDL, HDL colesterol e triglicerídios.

Tabela 11. Concentração plasmática de colesterol, frações e triglicerídios no início e no 28<sup>o</sup> dia de experimento em animais alimentados com diferentes dietas.

Grupo	Período	Médias (mg/dL)			
		Colesterol Total	LDL-colesterol	HDL-colesterol	Triglicerídios
C	0	82,22 ± 13,67	53,22± 10,45	20,22 ± 4,06	44,44± 10,89
	28	93,00 ± 13,35	48,00 ± 7,64	21,57 ± 7,18	118,29± 33,50
HL	0	73,33 ± 8,94	46,67 ± 8,96	20,44 ± 5,75	31,78± 8,64
	28	86,00 ± 6,61	50,00 ± 8,34	17,78 ± 4,18	91,44± 26,42
QTS	0	77,56 ± 10,63	40,31± 8,91	27,89 ± 7,52	46,78± 11,28
	28	102,56 ± 18,96	67,11 ± 11,61	17,89 ± 2,15	88,22± 45,98
NCMQ	0	75,63 ± 10,14	48,63 ± 7,11	20,13± 8,03	34,38± 7,87
	28	227,50 ± 73,17	203,63 ± 70,98	9,25± 4,62	73,13± 49,28

C = dieta controle; HL= dieta hiperlipídica (12 % lipídios, 1 % colesterol); QTS = dieta hiperlipídica adicionado 5 % quitosana; NCMQ = dieta hiperlipídica adicionado 5 % NCMQ.

Tabela 12. Variação das médias dos níveis de colesterol plasmático, frações e triglicerídios em ratos da linhagem Wistar.

Grupos	Variação das médias dos períodos (0-28) (mg/dL)			
	Colesterol Total	LDL-colesterol	HDL-colesterol	Triglicerídios
C	6,29 <sup>a</sup>	-8,57 <sup>a</sup>	0,429 <sup>a</sup>	72,71 <sup>a</sup>
HL	12,67 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	-2,667 <sup>a,b</sup>	59,67 <sup>a</sup>
QTS	25,00 <sup>a</sup>	26,67 <sup>a</sup>	-10,000 <sup>b</sup>	41,44 <sup>a</sup>
NCMQ	151,88 <sup>b</sup>	155,13 <sup>b</sup>	-10,875 <sup>b</sup>	38,75 <sup>a</sup>

C=dieta controle; HL=dieta hiperlipídica (12% lipídios, 1% colesterol); QTS=dieta hiperlipídica adicionado 5% quitosana; NCMQ = dieta hiperlipídica adicionado 5 % NCMQ.

Médias nas colunas com diferentes subscritos são significativamente diferentes (p<0,05) usando ANOVA e o teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welch Q test.

Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas na redução dos níveis de colesterol sérico em ratos alimentados com dietas eucalórica (controle), HL e QTS. Segundo Ho et al. (2001), estudo realizado em humanos hipercolesterolêmicos e obesos, sem restrição de dieta, a suplementação com quitosana não interferiu na redução dos níveis plasmáticos de lipídios.

Entretanto, Fukada, Kimura e Ayaky (1991) demonstrou que ratos alimentados com uma dieta hipocolesterolêmica suplementada com 5 % de quitosana, apresentaram redução dos níveis séricos de colesterol. Estes dados sugerem que o efeito da suplementação de quitosana sobre a redução dos níveis séricos de colesterol parece estar relacionado com uma dieta hipocolesterolêmica,

contudo, trabalhos tem demonstrado que outros fatores podem interferir. Segundo outros pesquisadores o grau de desacetilação e/ou peso molecular e/ou viscosidade e concentração são propriedades da quitosana que também podem estar envolvidas na eficiência deste polímero na redução dos níveis séricos de colesterol (HAN, KIMURA e OKUDA, 1999; GALLAHER et.al, 2000).

Entretanto, os ratos alimentados com uma dieta rica em lipídios adicionada de NCMQ (5%) apresentaram hipercolesterolemia, representando um aumento seis vezes maior nos níveis séricos de colesterol, quando comparado com o grupo que recebeu dieta hiperlipídica adicionada de quitosana (5%).

Observa-se na Tabela 11, que os níveis séricos de colesterol total e LDL-colesterol apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) apenas no grupo NCMQ quando comparado com os demais grupos. Ambos os grupos, QTS e NCMQ apresentaram redução dos níveis séricos de HDL-colesterol, semelhantes entre si. Os grupos controle e HL não apresentaram alterações dos níveis séricos de HDL-colesterol quando comparado com os demais grupos. Com relação aos níveis séricos de triglicerídios, nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas,

conseqüentemente, semelhantes entre si, vindo de encontro com os resultados do trabalho YAO e CHIANG (2002) que comparou os efeitos da quitosana sobre níveis séricos de triglicerídios em ratos.

## 4.2 Caracterização do filme de NCMQ

### 4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) possui uma grande profundidade de foco, alta resolução e permite que amostras de filmes poliméricos sejam examinadas em seu estado original (KALAB, 1993). Assim, a observação microscópica da superfície dos filmes pode prover informações sobre a integridade, continuidade e também sobre a organização estrutural da matriz polimérica filmogênica. Essas características podem ajudar a explicar a funcionalidade dos filmes quanto à sua resistência física e às propriedades de barreira à permeação de água e gases (TANADA-PALMU, FAKBOURI e GROSSO, 2002).

A Figura 24 apresenta a micrografia panorâmica da superfície dos filmes de NCMQ e de quitosana, verificando-se que ambos apresentaram uma camada lisa e

densa, porém o filme de quitosana mostrou uma superfície menos uniforme, mais irregular quando comparado ao de NCMQ, muito mais homogêneo. Segundo Mali et al. (2002) a homogeneidade da matriz de um filme é um bom indicador da integridade de sua estrutura, bem como de suas propriedades mecânicas.

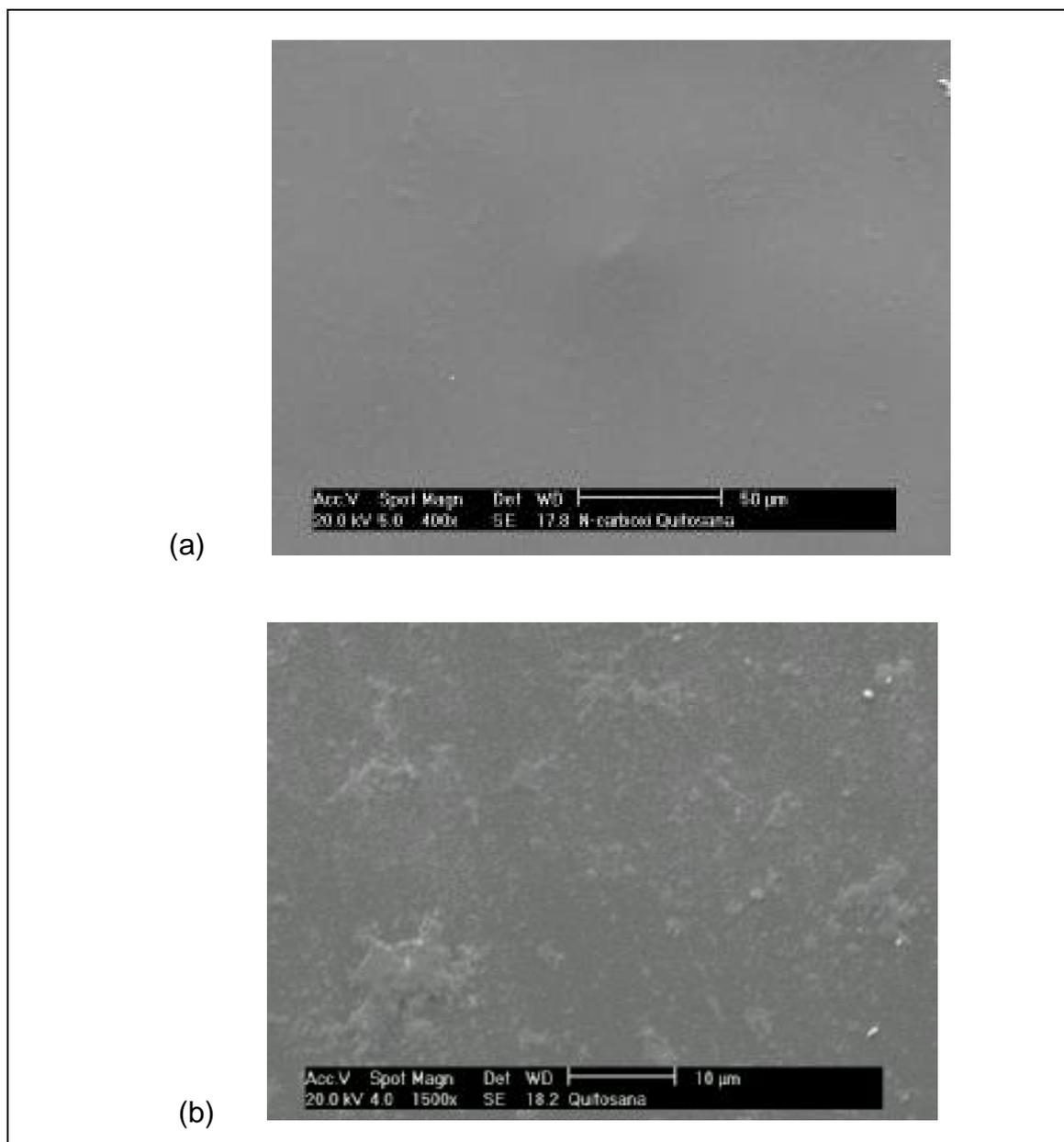


Figura 24. Micrografia panorâmica da superfície de filmes de NCMQ (a) e de quitosana (b) por MEV (1500 x).

Verifica-se através da Figura 25, a presença de poros na seção transversal tanto no filme de NCMQ, quanto no de quitosana, demonstrando uma estrutura não compacta. Cabe destacar que o filme de quitosana apresentou tendência a descamação, menos porosa, portanto, estrutura mais compacta que a NCMQ.

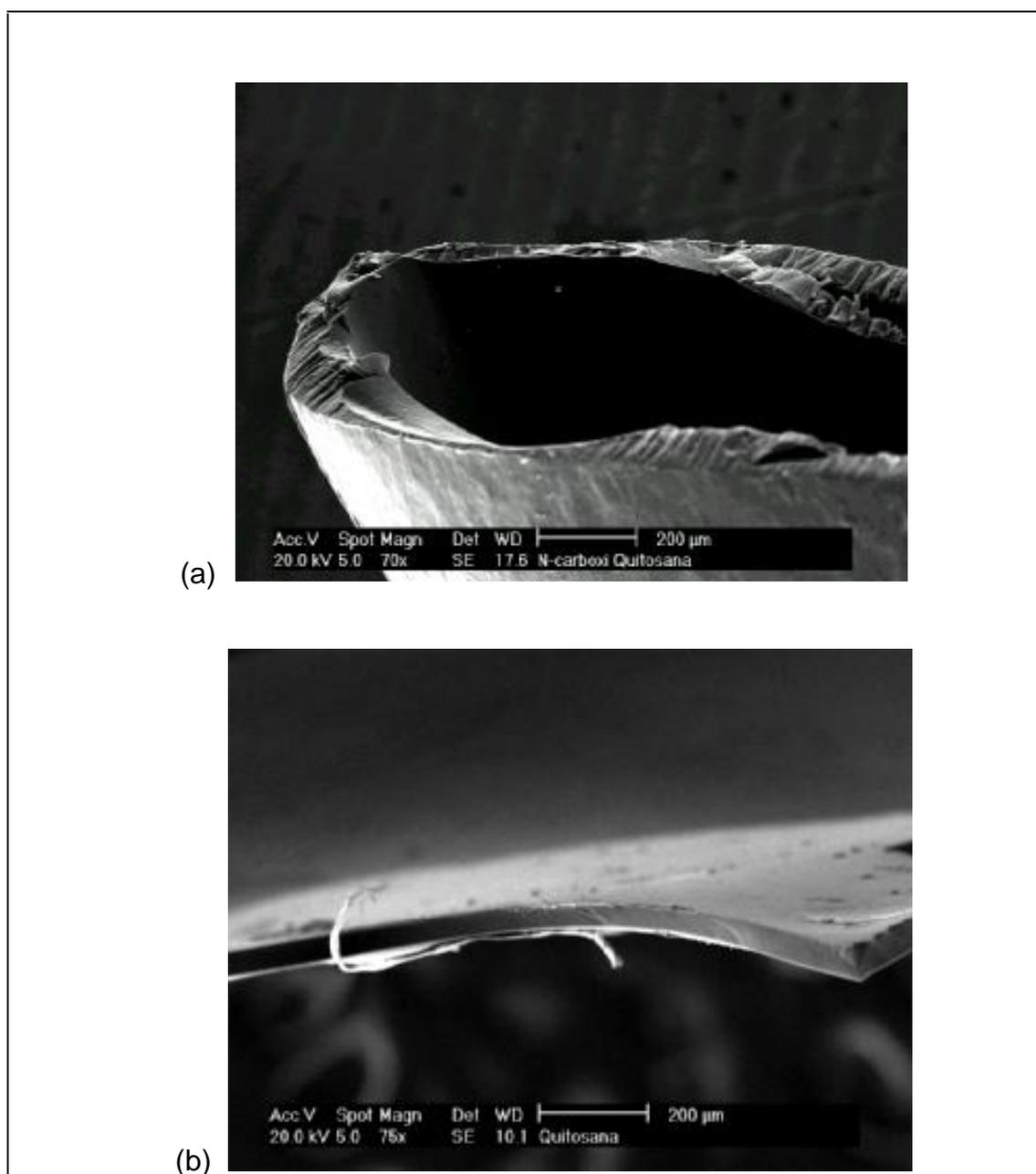


Figura 25. Micrografia da seção transversal de filmes de NCMQ (a) e de quitosana (b) por MEV (70 x).

A Figura 26 mostra que na matriz do filme de NCMQ a orientação das fibras está em dois sentidos, vertical e horizontal, sugerindo que o entrecruzamento entre elas pode ter um efeito de isolamento térmico, maior proteção (amortecimento) e maior resistência mecânica, quando comparado ao filme de quitosana, onde as fibras se apresentam apenas no sentido vertical.

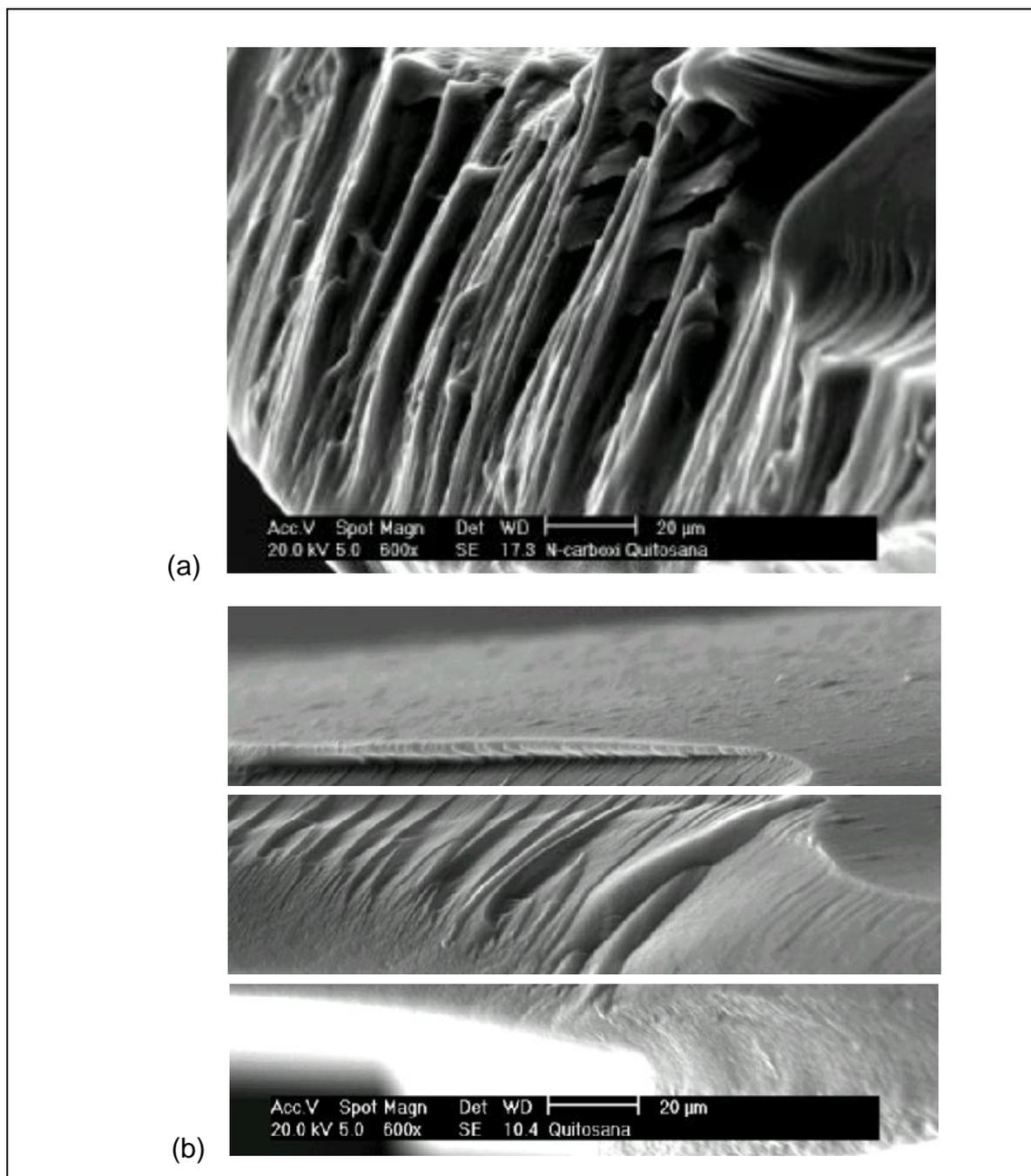


Figura 26. Micrografia da seção transversal de filmes de NCMQ (a) e de quitosana (b) por MEV (600 x).

#### 4.2.2 Propriedades mecânicas

##### 4.2.2.1 Análise de resistência mecânica

Baseando-se em parâmetros de avaliação subjetiva, estabelecidos no trabalho de Gontard, Guilbert e Cuq (1993) onde foram verificadas características como: continuidade (ausência de rupturas ou fratura após secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou bolhas visíveis ao olho nu, ou zonas de opacidade ou de cores diferenciadas) e manuseabilidade (possibilidade de utilização sem riscos de ruptura), o filme de NCMQ obtido, mostrou-se contínuo, sem fraturas ou rupturas, após secagem. No quesito homogeneidade não foram observadas partículas insolúveis, bolhas ou zonas diferenciadas. No que se refere a manuseabilidade o filme desenvolvido pode ser classificado como “bom”, ou seja, dobrado e manipulado sem risco de ruptura. Entretanto devido a pouca elasticidade não alcançou a classificação de “excelente”.

Os resultados comparativos de tensão e alongamento apresentados na Tabela 13 indicam que os valores encontrados no presente estudo foram similares aos determinados por Barreto (2003) em filme de caseinato de sódio e sorbitol a 0,2%. Dependendo das condições de estudo, os valores encontrados para o filme de NCMQ, como por exemplo, para a tensão máxima, são maiores do que os valores apresentados para os filmes de LDPE e HDPE, sugerindo a possibilidade de que o filme de NCMQ possa ter uma aplicação prática como embalagem para alimentos.

Tabela 13. Comparação de valores de tensão máxima e deformação na ruptura de vários filmes.

Tipo de Filme	Força Máxima Suportada (N)	Alongamento (%)	Referência
NCMQ	32,12	5,60	Presente estudo
Quitosana/glicerol (3/0,75)	27,0	27,0	BUTLER et al., 1996
Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,2)	44,8	6,0	BARRETO, 2003
Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,5)	1,8	49,4	BARRETO, 2003
Polietileno de baixa densidade (LDPE)	13	500	SIEW et al., 1999
Polietileno de alta densidade (HDPE)	26	300	SIEW et al., 1999
Metilcelulose	55,62	11,6	KROCHTA et al., 1994
Hidroxipropilcelulose	14,76	32,76	KROCHTA et al., 1994

Tal como pode ser observado, o filme de NCMQ apresentou uma resistência semelhante ao de quitosana/glicerol, porém com muito menos elasticidade. Isto, possivelmente pode ser explicado devido à ausência de um plastificante no estudo em questão.

O trabalho de Lazaridou e Biliaderis (2002) comparando dados de tensão, entre diferentes filmes, indicou que os elaborados com quitosana pura apresentaram menor sensibilidade sobre o efeito causado pelo plastificante, água e/ou sorbitol; isto é, a força de tensão deste filme tem sido menos afetada pela adição de 10 a 30% de sorbitol, quando comparado com os de quitosana-amido ou quitosana-pullulana.

De acordo com Monterrey e Sobral (1999), a presença de plastificantes diminui a densidade das interações proteína-proteína, aumentando a mobilidade das cadeias polipeptídicas, e conseqüentemente, tornando os filmes menos resistentes e mais elásticos. Também a variação da umidade, além de contribuir com a variabilidade da

espessura dos filmes, para uma dada gramatura de matéria seca, influencia suas propriedades mecânicas, devido ao efeito plastificante da água.

#### 4.2.2.2 Análise dinâmico mecânica

O efeito da modificação química na quitosana foi investigado por análises dinâmico mecânicas, onde o módulo de armazenamento -  $E'$  (módulo oriundo da componente da tensão resposta em fase com a deformação) e módulo de perda -  $E''$  (módulo oriundo da componente de tensão resposta  $90^\circ$  fora de fase com a deformação) em função da temperatura são mostrados na Figura 27. A curva de  $E'$  exibe uma melhora no módulo de armazenagem no polímero modificado em comparação com a quitosana sem modificação, refletido pelo aumento da rigidez e cristalinidade. O relaxamento a baixa temperatura, que corresponde à transição vítrea da quitosana ( $-29,0^\circ\text{C}$ ), muda em temperaturas altas depois da modificação química ( $-4,6^\circ\text{C}$ ), indicando uma estrutura mais cristalina e rígida.

O amplo relaxamento perto da temperatura ambiente e à  $200^\circ\text{C}$  é relativo à perda e mobilização da água, como já descrito em outros polissacarídeos (WILHELM et al., 2003). As unidades cinéticas responsáveis pelo relaxamento induzido pela água devem ser complexas e envolver associações de moléculas de água com os segmentos do polímero. Transição acima de  $200^\circ\text{C}$  está associada com degradação da cadeia principal.

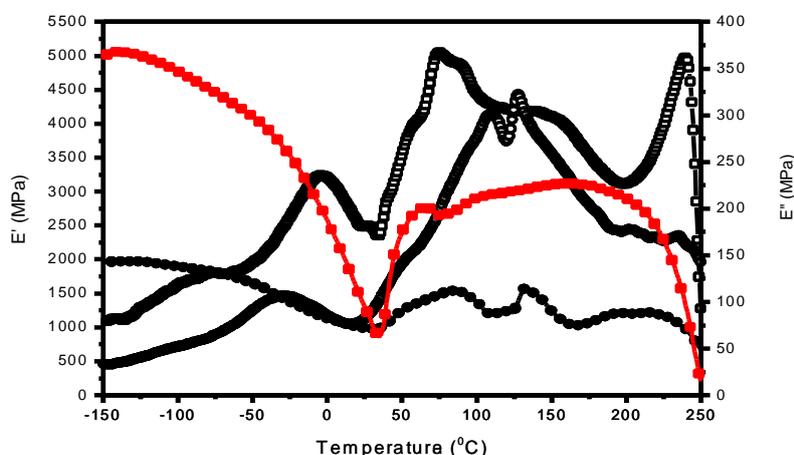


Figura 27. Armazenagem (símbolos cheios) e módulo de perda (símbolos abertos) da quitosana (símbolo circular) e NCMQ (símbolo quadrado).

### 4.3 Aplicação do filme de NCMQ

Muitas pesquisas sobre filmes de quitosana para recobrimento de frutas e vegetais com efeitos sobre a permeabilidade e composição interna de gases e tempo de vida útil tem sido realizadas com intuito de obter produtos frescos por mais tempo. Estes estudos têm indicado que filmes de quitosana têm prolongado a vida útil de morangos (GHAOUTH, ARUL e PONNAMPALAM, 1991), pêras e kiwi (DU, GEMMA & IWAHORI, 1997), tomates (GHAOUTH, ARUL e PONNAMPALAM, 1991), castanha (PEN e JIANG, 2003) e lichia (DONG et al. 2004), inibido o crescimento de fungos, reduzindo a produção de etileno, aumentando os níveis de CO<sub>2</sub> e diminuindo os de O<sub>2</sub>. No entanto, não se tem conhecimento na literatura da aplicação direta de filmes de NCMQ em frutas e de suas conseqüências. Assim sendo, foi utilizada para um estudo preliminar, sua aplicação em maçãs Catarina, um novo cultivar desenvolvido no estado de Santa Catarina, observando possíveis influências sobre propriedades sensoriais relevantes como: aparência, cor e brilho da casca, sabor e odor característicos, dureza e suculência.

#### 4.3.1 Avaliação microbiológica

Ausência dos patógenos coliformes fecais e *Salmonella* sp, como solicita a Legislação Brasileira, nas maçãs com e sem filme de NCMQ durante todo o experimento, asseguraram a qualidade microbiológica das amostras que foram degustadas pela equipe sensorial. Já o comportamento das bactérias aeróbias mesófilas e bolores e leveduras variaram ao longo do experimento, tal como o observado na Figura 28 e 29, porém independente da presença de filme ou não, mas sim influenciadas pela forma de armazenamento.

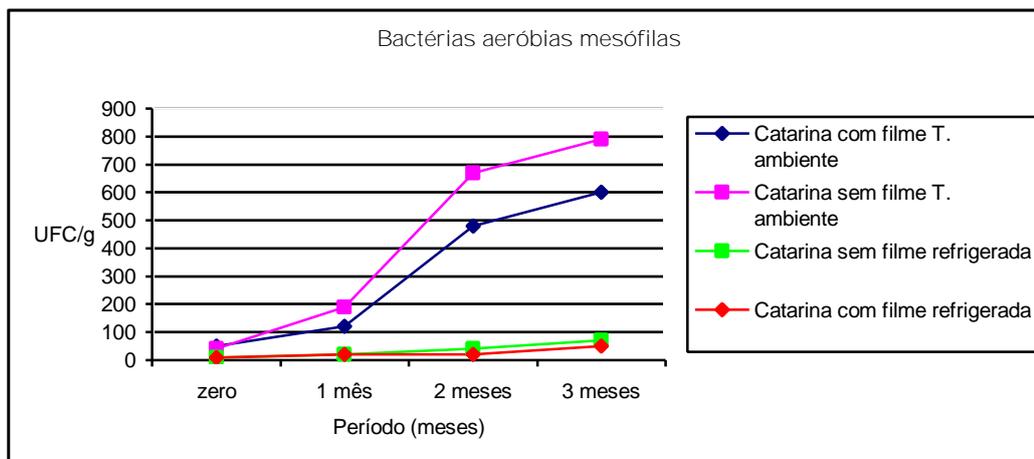


Figura 28. Valor médio de bactérias mesófilas determinadas em amostras de maçã cultivar Catarina com e sem filme de NCMQ, refrigerada e a temperatura ambiente.

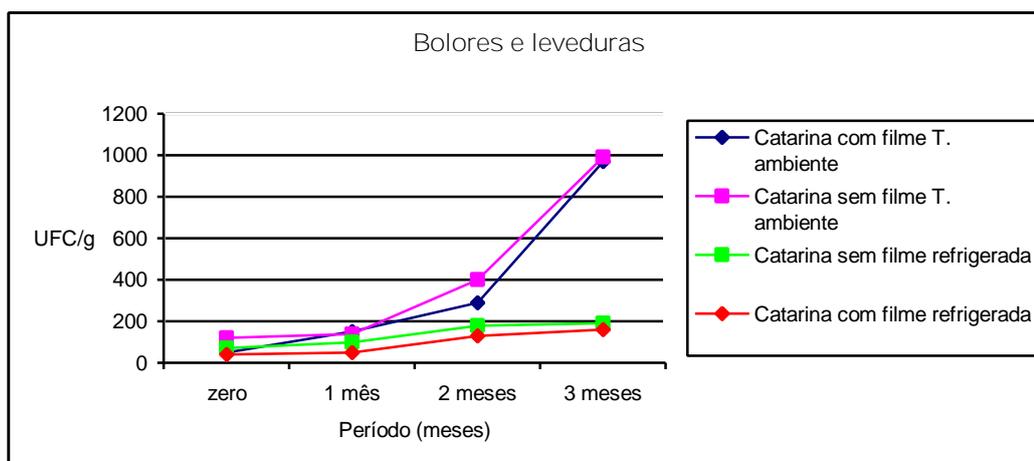


Figura 29. Valor médio de bolores e leveduras determinadas em amostras de maçã cultivar Catarina com e sem filme de NCMQ, refrigerada e temperatura ambiente.

#### 4.3.2 Avaliação sensorial

As avaliações sensoriais foram realizadas apenas no início e após um mês do experimento em função da ruptura do filme de NCMQ após este período, tanto nos frutos armazenados a temperatura ambiente quanto os mantidos sob refrigeração. Este fato pode ter ocorrido devido à falta de um plastificante no filme o qual

aumentaria sua capacidade de adesão, evitando possíveis rupturas. A Figura 30 ilustra o comportamento do filme após um mês de sua aplicação.



Figura 30. Fruto recoberto com filme de NCMQ evidenciado sua ruptura após um mês de armazenamento.

Tal como pode ser observado na figura acima, a ruptura do filme de NCMQ produziu uma aparência desagradável que além de comprometer a avaliação dos julgadores poderia influenciar outras propriedades físicas e sensoriais como textura, odor, sabor, etc., justificando com isso a interrupção do experimento após um mês de armazenamento.

A equipe sensorial aplicou a metodologia de Análise Descritiva Quantitativa utilizando os descritores adaptados de Karlsen et al. (1999): cor da casca, brilho da casca, aparência desidratada, odor característico, sabor característico, dureza e suculência, cujos resultados estão representados na Tabela 14.

Tabela 14. Escores médios conferidos aos atributos sensoriais de maçãs cultivar Catarina com e sem filme de NCMQ à temperatura ambiente e refrigerada, nos diferentes períodos avaliados.

Atributos	Tratamentos	Filme	Período*	
			zero	1 mês
Cor da casca	Refrigerada	Com	6,98 <sup>a,A</sup>	5,99 <sup>a,b,A</sup>
		Sem	7,13 <sup>a,A</sup>	5,64 <sup>a,b,B</sup>
	T. ambiente	Com	6,96 <sup>a,A</sup>	6,66 <sup>a,A</sup>
		Sem	6,83 <sup>a,A</sup>	5,20 <sup>b,B</sup>
Brilho da casca	Refrigerada	Com	5,47 <sup>a,b,A</sup>	4,84 <sup>a,c,A</sup>
		Sem	5,67 <sup>a,b,A</sup>	4,09 <sup>b,c,B</sup>
	T. ambiente	Com	5,89 <sup>a,A</sup>	5,73 <sup>a,A</sup>
		Sem	4,72 <sup>b,A</sup>	3,34 <sup>b,B</sup>
Aparência desidratada	Refrigerada	Com	1,19 <sup>a,A</sup>	1,52 <sup>a,b,A</sup>
		Sem	1,09 <sup>a,A</sup>	1,31 <sup>a,b,A</sup>
	T. ambiente	Com	1,33 <sup>a,A</sup>	1,73 <sup>a,B</sup>
		Sem	1,24 <sup>a,A</sup>	2,15 <sup>a,c,B</sup>
Odor característico	Refrigerada	Com	6,66 <sup>a,A</sup>	6,05 <sup>a,A</sup>
		Sem	6,75 <sup>a,A</sup>	5,95 <sup>a,A</sup>
	T. ambiente	Com	6,53 <sup>a,A</sup>	6,00 <sup>a,A</sup>
		Sem	6,30 <sup>a,A</sup>	5,40 <sup>a,A</sup>
Sabor característico	Refrigerada	Com	6,77 <sup>a,A</sup>	6,55 <sup>a,A</sup>
		Sem	6,74 <sup>a,A</sup>	6,54 <sup>a,A</sup>
	T. ambiente	Com	6,31 <sup>a,A</sup>	6,45 <sup>a,A</sup>
		Sem	6,89 <sup>a,A</sup>	5,98 <sup>a,A</sup>
Dureza	Refrigerada	Com	7,02 <sup>a,A</sup>	6,41 <sup>a,c,A</sup>
		Sem	7,25 <sup>a,A</sup>	6,51 <sup>a,c,A</sup>
	T. ambiente	Com	6,48 <sup>a,A</sup>	6,05 <sup>a,A</sup>
		Sem	6,70 <sup>a,A</sup>	5,14 <sup>b,B</sup>
Suculência	Refrigerada	Com	6,21 <sup>a,A</sup>	5,74 <sup>a,A</sup>
		Sem	5,75 <sup>a,A</sup>	5,82 <sup>a,A</sup>
	T. ambiente	Com	6,00 <sup>a,A</sup>	5,14 <sup>a,A</sup>
		Sem	6,02 <sup>a,A</sup>	5,16 <sup>a,A</sup>

\*Letras minúsculas em comum na mesma coluna não diferem entre si estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ), e letras maiúsculas em comum na mesma linha não diferem entre si estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ).

Seguindo-se a análise, efetuou-se a representação multidimensional, comumente chamada de gráfico aranha expressos na Figura 31.

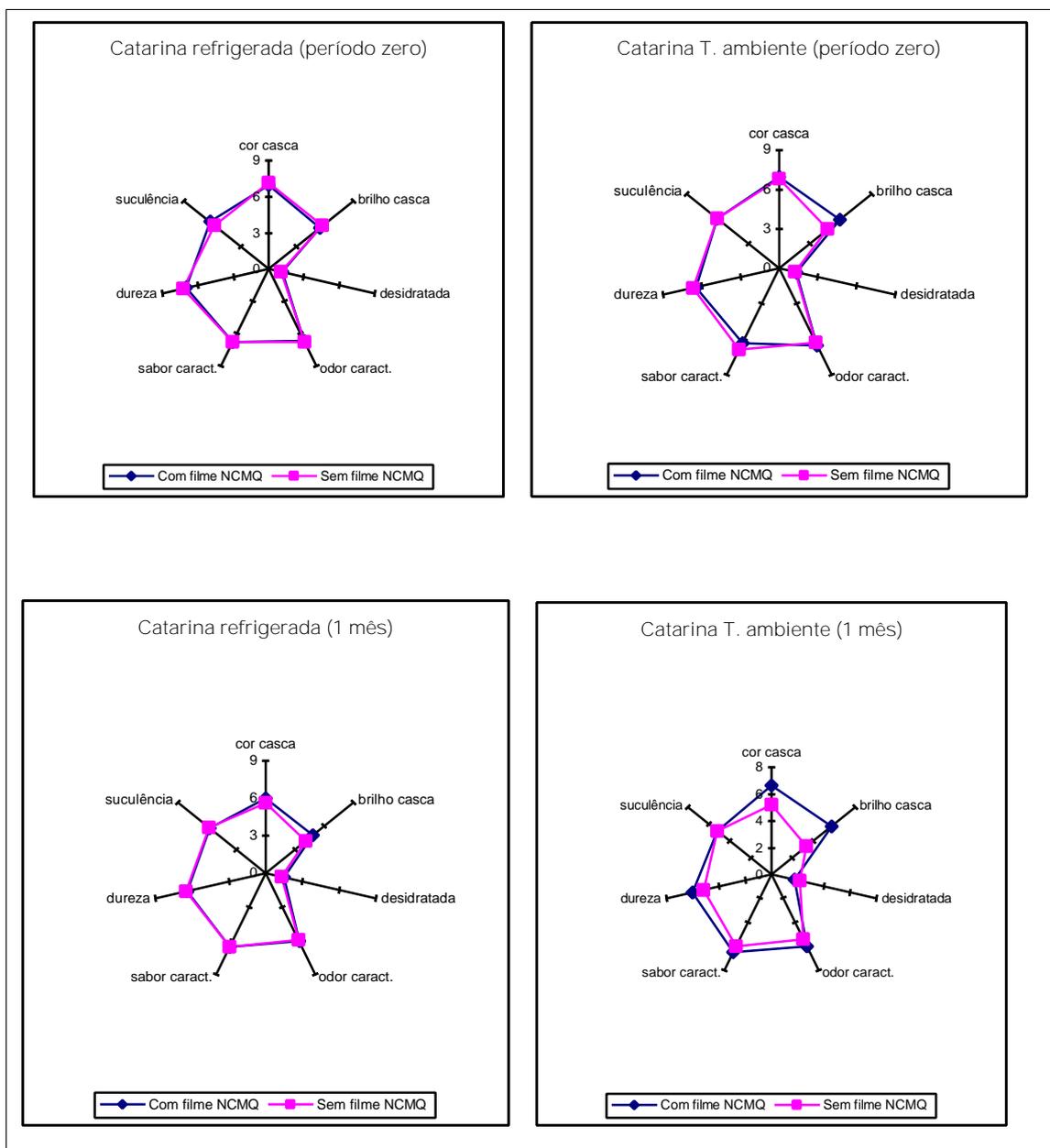


FIGURA 31. Perfil sensorial de maçãs cultivar Catarina armazenadas a temperatura ambiente e refrigeradas com e sem filme de NCMQ, nos períodos analisados.

Comparando o resultado dos períodos analisados, no tempo zero não houve diferenças significativas no atributo cor da casca nos quatro tratamentos avaliados. Porém após um mês de experimento observaram-se diferenças apenas nas amostras sem o filme de NCMQ, a um nível de significância de 5%, tanto

refrigeradas quanto às armazenadas a temperatura ambiente. Entretanto, estas diferenças, possivelmente não são devidas aos tratamentos e sim inerentes às nuances de cor do próprio cultivar, uma vez que, em nenhum momento os julgadores perceberam a presença do filme na superfície dos frutos.

Em relação ao brilho o tratamento sem filme de NCMQ a temperatura ambiente apresentou escores inferiores, estatisticamente significativos que os demais tratamentos, tanto no tempo zero quanto após 30 dias de experimento. No estudo feito por Fallik et al. (2001) com cultivar “Golden Delicious”, porém sem recobrimento, nenhuma diferença foi observada quanto ao brilho das frutas frescas ou depois de estocadas.

Os escores atribuídos para aparência desidratada das maçãs foram estatisticamente mais significativos quando armazenadas à temperatura ambiente independente da presença do filme de NCMQ, mesmo assim são valores discretos se compararmos com o valor máximo da escala de avaliação que é 9.

Não houve diferenças significativas em relação ao odor e sabor característico entre os tratamentos apresentados. Neste caso também a presença do filme de NCMQ não alterou este comportamento. O trabalho de Pereira, Boneti e Tsuchiya (2001), comparando o cultivar Catarina com outros três cultivares, registra alteração destes atributos somente após nove meses de armazenagem.

Em relação à dureza, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nas maçãs com e sem filme de NCMQ mantidas sob refrigeração. Entretanto a temperatura ambiente somente as amostras com filme tiveram comportamento similar, pois as maçãs sem filme apresentaram uma redução da dureza de aproximadamente 23% no primeiro mês de estocagem. O trabalho de YOUNG et al. (1999), utilizando cerejas tratadas com diferentes tipos de filmes mostrou que os frutos recobertos com filme de quitosana foram os que mantiveram os maiores valores de dureza, durante todo o período de estocagem.

A suculência não apresentou nenhuma alteração significativa nos quatro tratamentos, durante os dois períodos avaliados. Segundo Jaeger Macfie (2001) a suculência é um atributo importante para aceitabilidade da maçã pelo consumidor e está associado à preferência.

## 5 CONCLUSÕES

O derivado carboximetilado da quitosana obtido, a N-carboximetilquitosana (NCMQ) apresentou um grau de substituição de 20,88 % e as modificações efetuadas no método proposto por Muzzarelli et al., (1982) resultaram uma redução do tempo de reação de dois dias.

A NCMQ apresentou um perfil de distribuição de massa homogêneo, porém com presença de pequena quantidade de moléculas diferenciadas do polímero principal, de origem desconhecida.

A solução de NCMQ apresentou comportamento de fluxo tipo pseudoplástico, típico de polieletrólito, apresentando maior viscosidade em água do que em NaCl 0,1M.

A viscosidade das soluções de NCMQ aumenta com a concentração, separando o regime diluído do semiconcentrado e decresce com o aumento da temperatura.

A NCMQ apresenta maior estabilidade térmica quando comparada com a molécula de quitosana.

O filme de NCMQ possui maior resistência mecânica e alto valor de  $E'$ , em relação ao filme de quitosana, esta propriedade provavelmente foi gerada pela orientação das fibras no filme se apresentarem nos dois sentidos, horizontal e vertical, sugerindo um entrecruzamento entre elas. Fato este observado pela microscopia eletrônica de varredura.

O consumo alimentar, peso final, ganho de peso e níveis séricos de triglicerídios não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de ratos alimentados com as dietas estudadas.

Houve diferenças significativas quanto ao percentual de gordura fecal excretado, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica suplementadas com quitosana e NCMQ.

Os níveis de colesterol total e LDL-colesterol foram significativamente mais elevados no grupo que teve sua dieta suplementada com NCMQ.

A ruptura prematura do filme de NCMQ aplicado nas maçãs cultivar Catarina pode ser devido à ausência de um plastificante.

Antes de ocorrer a ruptura do filme, os degustadores não conseguiram perceber a presença do filme durante a análise, fundamental como característica sensorial.

A aplicação do filme de NCMQ em maçãs, cultivar Catarina, não alterou propriedades sensoriais como odor, sabor e suculência, tanto nas amostras armazenadas a temperatura ambiente ou mantidas sob refrigeração, com um mês de análise.

Cor e brilho da casca e dureza das amostras refrigeradas receberam escores superiores, independente da aplicação do filme de NCMQ.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGULLO, E.; GSCHAIDER, M. E.; RODRIGUEZ, M. S.; RAMOS, V. M.; PEDRONI, V. I. Efecto antifungico de películas de quitosano sobre prepizzas. *Información Tecnológica*, v. 9, n. 3, p. 123-127, 1998.

AL ZAEMEY, A. B.; MAGAN, N.; THOMPSON, A. K. Studies on the effect of fruit-coating polymers and organic acids on growth of *Colletotrichum musae* "in vitro" and on post-harvest control of anthracnose of bananas. *Mycol. Res.* v. 97, n. 12, p. 1463-1468, 1993.

ALLAN, C. G. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan. In: ZIKAKIS, J. P. *Chitin/chitosan and Related Enzymes*. New York: Academic Press, p.119-113, 1984.

ALLAN, G. G.; WINTÉOWD, J. G. The controlled release of a nerve growth factor protein from a chitosan matrix. *Atlanta: Symposium on Biopolymers*, 1991.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – AACC. *Approved Methods*. 10 ed. Saint Paul, Minnesota, 1999.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. AIN-93 Purified diet for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition AD HOC writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutrition*, v.23, n. 11, p. 1939-1991,1993.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. 3. ed. Washington, DC: American Public Health Association Inc, 1992.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL – ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. *D882-95a*. New York,1995.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. n. 30, jan/jun. 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14140. Alimentos e bebidas - Análise sensorial - teste de análise descritiva quantitativa (ADQ). Rio de Janeiro: ABNT, 1998. 5p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official methods of analysis*, 15. ed. Arlington: Virginia, 1998.

AVENA-BUSTILLOS, R. J.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking ligand and lipid content. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 4, p. 904-907, 1993.

AVERBACH, B. L. Film-forming capability of chitosan. In: Proceeding of the First International conference Chitin/Chitosan: Muzzarelli, R. A. A., PARISER, E. R. (Ed.); MIT: Cambridge, MA. p 199-209, 1978.

BADE, M. L. Structure and isolation of native animal chitins. In: Biopolymers Utilizing Nature's Advanced Materials. Symposium at the Fifth Chemical Congress of North America, Cancun: American Chemical Society. Nov, 1997.

BARRETO, P. L. M. Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol. Florianópolis, 2003. [Tese de doutorado da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC].

BAUER, W. H.; COLLINS, E. A. Tixotropy and dilatancy. In: Rheology, theory and applications. New York: Academic Press, 1956.

BEEREBOOM, J. J. Crit Rev Food Sci Nutr., v. 11, p. 401 – 413, 1979. In: DEUCHI, K. et al. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry., v. 58, n. 9, p. 1613 – 1616, 1994.

BÉGIN, A.; VAN CALSTEREN, M. R. Antimicrobial films produced from chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, v. 26, p. 63 –67, 1999.

BONETI, J. I. S.; RIBEIRO, P. A.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P.; BRIGHENTI, E.; PEREIRA, A. J. EPAGRI 402 - Catarina-Nova cultivar de macieira resistente à sarna. Agrop. Catarinense, v.9, p. 51-54, 1996.

BOUGH, W. A., SALTER, W. L., WU, A. C. M., PERKINS, B. E. Influence of manufacturing variables on characteristics and effectiveness of chitosan products. 1. Chemical composition, viscosity and molecular-weight distribution of chitosan products. Biotechnol. Bioeng., v.20, p.1931-1943, 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. n.72, p. 248-254, 1976.

BRETAS, R. S. A reologia dos polímeros para leigos e iniciados. Plástico moderno, [S.l.], n.176, p.28-35,1987.

BROWN, M. E. Introduction to Thermal Analysis-Techniques and applications. New York: Chapman and Hall, p.7-21, 1988.

BURKITT, D. Cancer, v. 28, p.3 – 13, 1971. In: DEUCHI, K. et al. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 58, n. 9, p. 1613 – 1616, 1994.

BURROWS, H. D., FORMOSINHO, S. J., MIGUEL, M. G. M. A interação entre o íon urânio e polímeros solúveis em água. Química Nova, v.14, n.4, p.257-261, 1991.

BUTLER, B. L.; VERGANO, P. J.; TESTIN, R. F.; BUNN, J. M.; WILES, J. L. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, v.61, n.5, p.952-955, 1996.

CALLISTER, W. D. *Materials Science and Engineering, an Introduction*, 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc. USA, p. 83-84, 1997.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova*, vol. 24, n. 1, p.13-17, 2001.

CANER, C.; VERGANO, P. J.; WILES, J. L. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science*, v.63, n.6, p.1049-1053, 1998.

CARDELLO, H. M.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangífera indica* L.) var. Haden, durante o amadurecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 18, n. 2, maio/julho, 1998.

CÁRDENAS, G.; RETAMAL, J.; TAGLES, L. H. Thermogravimetric studies of chitin derivatives I. *Intern. J. Polymetric Mater.*, v.21, p.137-138, 1993.

CAROLAN, C. A. et al. Carboxymethylchitosan, water-soluble derivatives end potencial green food preservative. *Trans I Chem E*, v. 69, Part A, p. 195 –196, 1991.

CASU, B.; GENNARO, U. A conductimetric metod for the determination of sulphat and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides. *Carbohydr. Res.*, v. 39, p. 168-176, 1975.

CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. *Biomaterial*, v.12, n.12, 1993.

CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan. *Carbohydr. Res.* v.338, p.333-340, 2003.

CHOU, T.; FU, E.; WU, C.; YEH, J. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem. Bioph. Res. Communic.* n. 302, p. 480-483, 2003.

CODEX PHARMACEUTICAL, *THE Principles and Practice of Pharmaceutics*, twelfth edition, London, The Pharmaceutical Press, p. 260-276, 1994.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *J. Food Sci.* v. 67, n. 3, p. 62-1169, 2002.

CUERO, R. G.; OSUJI, G.; WASHINGTON, A. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production : role of zinc. *Biotechnology Letters*, v. 13, n. 6, p. 441-444, 1991.

CUMMINGS, J. H. et al. *Am J. Clin Nutr.*, v. 29, p. 1468 –1473, 1976. In: DEUCHI, K. et al. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.*, v. 58, n. 9, p. 1613 – 1616, 1994.

DELBEN, F.; LAPASIN, R.; PRICL, S. Flow properties of N-(carboxymethyl) chitosan aqueous systems in the sol and gel domains. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.12, p. 9-13, 1989.

DELBEN, F.; MUZZARELLI, R. A. A. Thermodynamic study of the interaction of N-aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnology Letters*, v. 13, n. 6, p. 441-444, 1989.

DOMARD, A., RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.5, n.2, p.49-52, 1983.

DOMSZY, J. G., ROBERTS, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Makromol. Chem.*, v. 186, p. 1671-1677, 1985.

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

DRAGET, K. I.; VARUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Chitosan crosslinked with Mo (VI) polyoxyanions, effects of chemical composition. In: BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P. *Chitin and chitosan*. New York: Elsevier Applied Science, 1991. 604 p.

DU, J. M.; GEMMA, H.; IWAHORI, S. Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, n. 66, p. 15-22, 1997.

EIDEM, C. A. et al. Interaction of lead and chromium with chitin and chitosan. *J. Appl. Polymer Sci.* v. 25, p.1587-1588, 1980.

EPA Polyglucosamine exemption from the requirement of tolerance. *Fed. Reg.*, [S. I.], v. 51, p. 34973, 1986.

FALLIK, E., TUVIA-ALKALAI, S., FENG, X., LURIE, S. Ripening characterization and decay development of stored apples after a short pre-storage hot water rinsing and brushing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. n.2, p. 127-132 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FELT, O., BURI, P., GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Develop. Ind. Pharm.*, v.24, p.979-993, 1998.

FREEPONS, D. Enhancing food production with chitosan seed-coating technology. In: Biopolymers Utilizing Nature's Advanced Materials. Symposium at the Fifth Chemical Congress of North America, Cancun: American Chemical Society. Nov, 1997.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; PAULA, R.C.; FEITOSA, J.P.A.; SIERAKOWSKI M.-R. Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (jatobá) seeds. *Thermochimica Acta*, n.409, p.41-47, 2004.

FUKADA, Y.; KIMURA, K.; AYAKY, Y. Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipides*, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 395-399, 1991.

FURDA, I. Aminopolysaccharides-their potential as dietary fiber. In: FURDA, I. Unconventional sources of dietary fiber. Washington: ACS Symposium Series 214, 1983. 105 p.

FURLAN, L. Copolímeros graftizados de quitina e quitosana com monômeros acrílicos, estudos de adsorção de Ca(II) e aplicações na tecnologia do papel. Florianópolis, 1993. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.

GALLAHER, C. M.; MUNION, J.; HESSLINK, R.; WISE, J.; GALLAHER, D. D. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *Nutrient Metabolism*, p.2753-2759, 2000.

GENNARO, A. R. Remington: Farmácia. Buenos Aires: Med. Panamericana, 1992.

GHAOUTH, A. E.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 15, p.359-368, 1991.

GIRARD, B., LAU, O. L. Effect of maturity and storage on quality and volatile production of 'Jonagold' apples. *Food Research International*. v. 28.n. 5, p. 465-471, 1995.

GOLDIM, J.R. Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes. 3ª ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affects mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, v.58,p.206-211, 1993.

GORDON, T et. al. Lipoproteins, cardiovascular disease and death: The Farmingham Study. *Arch. Intern. Med.*, n. 141, p. 1128-1131, 1981.

GRAESSLEY, W. Viscoelasticity and flow in polymer melts and concentrated solutions. In: Physical properties of polymers. Washington: American Chemical Society, 1984.

HADWIGER, L. A.; FRISTENSKY, B.; RIGGLEMAN, R. C. Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions, increases crop yields. In: ZIKAKIS, J. P. Chitin, chitosan and related enzymes. New York: Academic Press, 1984. p. 291.

HAMPSON, C. R., QUAMME, H. A., HALL, J. W., MACDONALD, R. A., KING, M. C., CLIFF, M. A. Sensory evaluation as a selection tool in apple breeding. *Euphytica*. v. 111, n. 2, p. 79-90, 2000.

HAN, L. K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity, Japan*, n.23, p.174-179, May.1999.

HANAWA, N. et al. Fruit jellies containing chitosan, phosphates, and gelation agents and their manufacture. *Jap. Patent 03, [S. I.]*, v. 127, p. 954, 1991.

HAYES, E. R. e DAVIES, D. H. "Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan", ed. by R. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, MIT Sea Grant Report 78-7, p.406, 1978 apud Domszy, J. G. e Roberts, A. F. Evaluation of infrared spectroscopic technique for analyzing chitosan. *Makromol. Chem.*, v.186, p.1671-1677, 1985.

HAYNES, L. et al. Microwave browning compositions for foods products. *Can. Patent 2, [S. I.]*, v. 18, n. 53, 1990.

HILLMAN, L. C. et. al., The effects of the fiber components pectin, cellulose and lignin on serum cholesterol levels. *Am. Journal Clinical Nutrition*, v. 42, p. 207-213, 1985.

HIRANO, S.; TOBETTO, K.; HASEGAWA, M.; MATSUDA, N. Permeability properties of gels and membranes derived from chitosan. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.14, p.477-486, 1980.

HIRANO, S. et al. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *J. Agric. Food Chem.*, [S. I.], v. 38, p. 1214, 1990.

HIRANO, S.; ITAKURA, C.; SEINO, H. Hypocholesterolemic and hypolipidemic activities of chitosan digestible in hens and rabbits. Presentation at the International Symposium on Carbohydrate Chemistry. New York: Ithaca, 1986.

HO, S. C. et al. In the absence of dietary surveillance, chitosan does not reduce plasma lipids or obesity in hypercholesterolaemic obese asian subjects. *Singapore Medical Journal*, Singapore, v. 42, p. 006-010, Jan. 2001.

HOAGLAND, P. D.; PARRIS, N. Chitosan/pectin laminated films. *J. Agric. Food Chem.* n. 44, p. 1915-1919, 1996.

HUGUET, M. L., GROBOILLOT, A., NEUFELD, R. J. Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads. *Journal Applied Polymer Science*; v.51, p.1427-1432, 1994.

INOUE, K., YOSHIZUKA, k.; BABA, Y.. Absorption of metal ions on chitosan and chemical modified chitosan and their application to hydrometallurgy. *Biotechnology and Bioactive Polymers*, Edited by C. Gebelein and C. Carraher, Plenum Press, New York, p.35-41, 1994.

IZUME, M.; USHIDA, Y. Chitosan as a food preservative. *Jap. Patent* 62, [S. I.], v. 83, p. 877, 1987.

JAEGER, S. R.; MACFIE, H. J. H. The effect of advertising format and means-end information on consumer expectations for apples. *Food Quality and Preference.* n. 12, p. 189-205, 2001.

JENNINGS, C. D et al. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v. 189, p. 13 – 20, 1994. In: DEUCHI, K et al. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high fat diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* v. 58, n. 9, p. 1613 – 1616, 1994.

KALAB, M. Food structure and milk products. In: HUY, Y. H. *Encyclopedia of food science and technology.* New York, Wiley Interscience, p. 1170-1196, 1993.

KANAUCHI, O. et al. Increasing effect os chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion. *Biosciense, Biotechnology and Biochemistry,* n. 58, v 9, p. 1617 – 1620, 1994.

KARLSEN, A. M., AABY, K., SIVERTSEN, H., BAARDSETH, P., ELLEKJÆR, M. R. Instrumental and sensory analysis of fresh Norwegian and imported apples. *Food quality and preference,* n. 10, p. 305-314, 1999.

KARLSEN, J. Excipient properties of chitosan. *Manuf. Chem.*, June, p.18-19, 1991.

KASSAI, M. R.; CHARLET, G.; ARUL, J. Master curve for concentration dependence of semi-dilute solution viscosity of chitosan homologues: the Martin equation. *Food Research International*, 33, p. 63-67, 2000.

KING, G. J., MALIEPAARD, C., LYNN, J. R., ALSTON, F. H., DUREL, C. E., EVANS, K. M., GRIFFON, B., LAURENS, F., MANGANARIS, A. G., SCHREVEN, E., TARTARINI, S., VERHAEGH, J. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill). *Theoretical and applied genetics.* v. 100, n. 7, p. 1074-1084, 2000.

KITTUR, F. S.; KUMAR, K. R.; THARANATHAN, R. N. Functional packaging properties of chitosan films. *Z. Lebensm Unters Forsch A*, v. 206, p. 44-47, 1998.

KITTUR, F. S.; SAROJA, N.; HABIBUNNISA; THARANATHAN, R. N. Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. *Eur. Food Res. Technol.*v. 213. p. 306-311, 2001.

KNORR, D., BEAUMONT, M. D., PANDYA, Y. *Biotechnol. Food Ind., Proc. Int. Symp.*, p.389-400, 1987.

KONO, M.; MATSUI, T.; SHIMIZU, C. Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, [S. I.], v. 53, n. 1, p. 125, 1987.

KROCHTA, J. M.; BALDIWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. Edible coatings and films to improve food quality. Lancaster, Pennsylvania, USA, Technomic Publishing Co. 1994.

KRUMEL, K. L.; SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. *Food Technology*, [S.I.], v. 29, p. 36-44, 1975.

KUHN, B. F., THYBO, A. K. Sensory quality of scab-resistant apple cultivars. *Postharvest biology and technology*. v. 23, n. 1, p. 41-50, 2001.

KURITA, K. et al. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero and homogeneous hydrolyses. *Macromol. Chem.*, v.178, p. 3197-3202, 1977.

KURITA, K.; ISHIGURO, M.; KITAJIMA, T. Studies on Chitin. Introduction of long chain alkylidene groups and the influence of properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, [S. I.], v. 10, p. 124, 1988.

KURITA, K. Chemical modifications of chitin and chitosans. In: *Chitin in Nature and Technology*. Ed. Plenum Press: New York. P.287-293, 1997.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate polymers*, 48, p. 179-190, 2002.

LEE, K. Y.; PARK, W. H.; HA, W. S. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 63, p. 425-432, 1996.

LI, O., DUNN, E. T., GRANDMAISON, E. W., GOOSEN, M. F. Applications and properties of chitosan. *J Bioact. Compat. Polym.*, v.7, p.370-397, 1992

LI, Q. et al. In: GOOSEN, M.F.A. (Ed). Applications of chitin and chitosan. Basel: Technomic Publishing Co, p. 3 – 29, 1997.

LIM, L.Y. & WAN, S.C. Heat treatment of chitosan films. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 21, n.7, p. 839-846, 1995.

MAGHAMI, G. G., ROBERTS, G. A. F. Studies on the adsorption of anionic dyes on chitosan. Makromoli Chem., v. 189, p.2239-2243, 1988.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. Carbohydrate Polymers, n.50, p. 379-386, 2002.

MANO, E. B. Fatores que afetam as propriedades dos polímeros. In: Introdução a polímeros. São Paulo: Edgard Blücher, 1985.

MARINEZ, V. M.; NEWMAN, R. K.; NEWMAN, C. W. J. Nutr., v. 122, p. 1070 – 1076, 1992. In: DEUCHI, K et al. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 58, n. 9, p. 1613 – 1616, 1994.

MÁRQUEZ, L.R. A fibra terapêutica. 2. ed. São Paulo: Byk Química, 2001.

MARTIN, A. N. Physical Pharmacy: physical chemistry principles in the pharmaceutical science. 4. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993.

MANSBACH, C. M.; COHEN, R. S.; LEFF, P. B. Isolation and properties of mixed lipid micelles present in intestinal content during fat digestion in man. J. Clin. Invest., v. 56, p. 781, 1975.

MATHUR, N. K., NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. J. of Chem. Educ., v. 67, n.11, p. 938-942, 1990.

MATTIOLI-BELMONTE, M. et al. N, N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for boné morphogenetic protein in the repair of articular cartilage. Medical & biological Engineering & computing. [S. 1.], v. 37, p. 130-134, 1999.

MAUER, L. J.; SMITH, D. E.; LABUZA, T. P. Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible  $\alpha$ -casein films. International Dairy Journal, v. 10, p. 353-358, 2000.

MEILGAARD, M.; CEVILLE, G. V.; CARR, B. T. Sensory evaluation techniques. Boca Raton, Florida: CRC Press, INC. Cap.12, 1991.

MENJIVAR, J. A. Use of gelation theory to characterize metal cross-linked polymer gels. In: Water soluble polymers: ACS advances in Chemistry Series, 1986.

MIETTINEN, T. A. et al. Dietary fiber and lipids. Am. Journal Clinical Nutrition, v. 45, p. 1237-1242, 1987.

MIWA, A.; ICHIBE, A.; NACANO, M.; YAMAHIRA, T.; ITAI, S.; JINNO, S.; KAWAHARA, H. Development of Novel Chitosan Derivatives as Micellar Carriers of Taxol. *Pharmaceutical Research*, [S. 1.], v. 15, n. 12, p. 1844-1850, 1998.

MONTERREY, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo usando uma metodologia de superfície-resposta. *Ciênc.Tecnol. Alimen.*, Campinas, 19 (2): 294-301, 1999.

MOORE, G. K., ROBERTS, G. A. E. Determination of the degree of acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.2, p.1 15-116, 1980.

MORI, E. E. M. Análise sensorial dos alimentos. ITAL, Campinas, 1987. 184 p.

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids In: G. O. PHILLIPS; D. J. WEDLOCK; P. A. WILLIAMS. *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, Oxford: Pergamon Press, v. 2, p. 57, 1984.

MUCHA, M. Rheological properties of chitosan blends with poly(ethylene oxide) and poly (vinyl alcohol) in solution. *React. Functional Polym*, v. 38, p. 19-25, 1998.

MUÑOZ, A. M.; CEVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory evaluation in quality control*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240 p.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. *Elsevier Science*, v. 29, p. 309 – 316, 1996.

MUZZARELLI, R. A. A., BALDASARRE, V., CONTI, F. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials*, v.9, p.247-252, 1988.

MUZZARELLI, R. A. A.; LLARI, P.; PETRARULO, M. Solubility and structure of N-carboxymethylchitosan. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 16, n. 4, p. 177-180, 1994.

MUZZARELLI, R. A. A.; TANFANI, F.; EMANUELLI, M.; MARIOTTI, S. N-(carboxymethylidene) Chitosans: Novel Chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. *Carbohydrate Research*, v. 107, p. 199-214, 1982.

MUZZARELLI, R. A. A.; WECKY, M.; FILIPPINI, O.; SIGON, F. Removal of Trace Metal Ions from Industrial Waters, Nuclear Effluents and Drinking Water, with the Aid of Cross-Linked N-Carboxymethyl Chitosan. *Carbohydrate polymers*, v. 11, p. 293-306, 1989.

MUZZARELLI, R. A. A. Carboxymethylated chitins and chitosans. *Carbohydrate Polymers*, n.8, p.1-21, 1988.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitin, 1.ed., Oxford, Pergamon Press LTD., p.97, 1977.

NAKATSUKA, S.; ANDRADY, A. L. Permeability of vitamin B-12 in chitosan membranes. effect of crosslinking and blending with poly (vinyl alcohol) on permeability. J. Applied Polymer Science, v.44, p.17-28, 1992.

NIELSEN, L. E. Polymer rheology. New York: Marcel Dekker, 1977.

NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S.; SF0, H.; NISHI, N.; TOKURA, S.; AZUMA, L. Macrophage activation with multiporous beads prepared from partially deacetylated chitin. Biomed. Mater. Res., v.20, p. 1359-1372, 1986.

NODA, M.; KOYATA, K.; KOYAMA, J. Stable whipping cream substitutes containing chitosan. Jap. Patent 03, [S. I.], v. 143, p. 364, 1991.

OBARA, K. et al. Manufacture of cheese that maintains its shape in cooking. Jap. Patent 03, [S. I.], v. 19, p. 649, 1991.

OUCHI, T.; BANDA, T.; FUGIMOTO, M. Synthesis and antitumor-activity of chitosan carrying 5-fluorouracils. Makromol. Chem., v.190, p.1817-1825, 1989.

OZAWA, T. Bulletin of the Chemical Society of Japan. n. 38, p.1881-1886, 1965.

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

PAPINEAU, A. M. et al. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. Food Biotechnol., New York, v. 5, n. 1, 1991.

PASCAT, B. Study of some factors affecting permeability. In Mathlouthi, M., editor. Food Packaging and Preservation: Theory and Practice. London: Elsevier Applied Science., 1986, 7p.

PEITER, C. C.; MALDONADO, J.. Novos Materiais Poliméricos, Inf. Int, v.19, n.38, p.13-15, jan/abr. 1987.

PELUSO, G.; PETILLO, O.; RANIERI, M.; SANTIN, M.; AMBROSIO, L.; CALABRO, D.; AVALLONE, B.; BALSAMO, G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. Biomaterials, v. 15, p. 1215-1220, 1994.

PEN, L. T.; JIANG, Y. M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, n. 36, p. 359-364, 2003.

PENICHE-COVAS, C.; JIMÉNEZ, M. S. Characterization of silver-binding chitosan by thermal analysis and electron impact mass spectrometry. *Carbohydr. Polym.*, v.9, p.249-256, 1988.

PEREIRA, A.; BONETI, J. I. S.; TSUCHIYA, S. Sarna nunca mais. *Cultivar HF.* /jul, 2001.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J. M. S. Pure Appl. Chem.*, v.32, p.629-640, 1995.

RATHKE, T. O.; HUDSON, S. M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *J. Macromol. Sci. - Rev. Macromol. Chem. Phys.*, v.34, p. 375-437, 1994.

REINER, M. Phenomenological macrorheology. In: *Rheology theory and applications.* New York: Academic Press, 1956.

REVAAH – MOISEEV, S. Conversion of the enzymatic hidrolysate of shelfish waste chitin to single – cell protein. *Biotec. Biogen.*, v.23, p.1067-1078, 1981.

RICHARDS, E. G. Polyelectrolytes. In: *An introduction to the physical properties of large molecules in solution.* New York: Cambridge University Press, p. 235, 1980.

RIGBY, G.W. Chemical products and process of preparing the same. p.771, 1936.

RINAUDO, M. Polysaccharide characterization in relation with some original properties. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium.* v. 52, p. 11, 1993.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DESBRIÉRES, J. Characterization and solution properties of chitosan and chitosan derivatives. In: *Biopolymers Utilizing Nature's Advanced Materials. Symposium at the Fifth Chemical Congress of North America, Cancun:* American Chemical Society. Nov, 1997.

RODRIGUES, C. A.; STADLER, E.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE V. T. Pre-concentration of anions on poly (N-acetyl-D-glucosamine) derivatives modified carbon paste electrode. *J. B.C. S.*, v.3, n.3, 1992.

RORRER, G. L.; HESIEn, T. Y. Synthesis of Porous-Magnetic Chitosan Beads for Removal of Cadmium Ions from Waste Water. *American Chem. Society, Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 32, p.2170-2178, 1993.

SABNIS, S.; BLOCK, L. H. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polym. Bull.*, v.39, p.67-71, 1997.

SANTOS, P. M. et al. Nerve growth factor: Increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *Otolaryngology-Head and Neck surgery, [S. l.]*, v. 105, n. 1, p. 12, 1991.

SBC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGÍA. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose. Brasília, 2001.

SEVERS, E. T. Introduction to rheology. In: Rheology, of polymers. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1962.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food Applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science & Technology, 10, p. 37-51, 1999.

SIEW, D.C.W.; HEILMANN, C.; EASTEAL, A.J.; COONEY, R.P. Solution and film properties of sodium caseinate/glycerol and sodium caseinate/polyethylene glycol edible coating systems. Journal of Agriculture Food Chemistry, v. 47, p. 3432-3440, 1999.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. Polímeros: Ciência e Tecnologia. Out/dez, p. 63-68, 1998.

SOARES, A. M. Comportamento reológico de suspensões concentradas de perclorato de amônio em polibutadieno líquido hidroxilado. Rio de Janeiro, 1985. Tese de doutorado. Instituto de macromoléculas, Universidade do Rio de Janeiro.

SONG, Y.; ONISHI, H.; NAGAI, T. Synthesis and Drug-Release Characteristics of the Conjugates of Mitomycin C with N-Succinyl-chitosan and Carboxymethyl-chitin. Chem. Pharm. Bull., v. 40, n. 10, p. 2822-2825, May, 1992.

SONG, Y.; ONISHI, H.; NAGAI, T.; MACHIDA, Y. Drug release and antitumor characteristics of N-succinyl-chitosan-mitomycin C as na implant. Journal of Controlled release, v. 42, p. 93-100, 1996.

SOTO-PERALTA, N. V.; MUELLER, H.; KNORR, O. Effects of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. J. Food Sci., v.54, p.495-496, 1989.

SRINIVASA, P. C.; BASKARAN, R.; RAMESH, M. N.; PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N. Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. Eur. Food Res. Technol. n. 215, p.504-508, 2002.

ST.ANGELO, A. J.; VERCELLOTTI, J. R. Preparation and use of food grade N-carboxymethylchitosan to prevent meat flavor deterioration. G. Charalambous (Ed.), Food Science and Human Nutrition: Elsevier, p.711-722, 1992.

STONE, H., SIDEL, J. Descriptive analysis. In: TAYLOR, S. L. Sensory evaluation practices. London: Academic Press Inc. p. 216-235, 1993.

STOW, J., GENGE, P. The effects of storage conditions on the keeping quality of 'Gala' apples. Journal of horticultural science and biotechnology, v. 75, n. 4, p. 393-399. 2000.

STRUSZCZYK, H.; POSPIESZNY, H. New applications of chitin and its derivatives in plant protection. In: Biopolymers Utilizing Nature's Advanced Materials. Symposium at the Fifth Chemical Congress of North America, Cancun: American Chemical Society. Nov, 1997.

SUGANO, M. et al. A novel use of chitosan as a hypcholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr.*, v. 33, p. 787 – 793, 1980. In: HIRANO, S.; AKIYAMA, Y. Absence of a hypcholesterolemic action of chitosan in high-serum-cholesterol rabbits. *J Sci Food Agric.*, v. 69, p. 91 – 94, 1995.

SUGANO, M. et al. Hypcholesterolemic action of chitosan with different viscosity in rats. *Lipids*, v. 3, p. 187 – 191, 1988. In: HIRANO, S.; AKIYAMA, Y. Absence of a hypcholesterolemic action of chitosan in high-serum-cholesterol rabbits. *J. Sci Food Agric.*, v. 69, p. 91 – 94, 1995.

SUZUKI, T.; SUGAI, T. Coating agents for fruits and vegetables. *Jap Patent 01*, [S. I.], v. 13, p. 946, 1989.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Rev. Food Scien. Nutr.*n.43, v.2, p.145-171, 2003.

TAGER, A. Physical chemistry of polymers. 2.ed. Moscou: Mir Publishers, 1978.

TAGUCHI, T.; SATO, I. Chitosan-treated paper for casings. *Jap. Patent 01*, [S. I.], v. 174, p. 699, 1989.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Gelation mechanism of macromolecules. **New York: Wiley**, 1961.

TANADA-PALMU, P.; FAKBOURI, F. M.; GROSSO, C. R. F. Filmes biodegradáveis. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.26, p. 12-17, 2002.

TASKER, R. R.; CONNELL, B. J.; ROSS, S. J.; ELSON, C. M. Development of an injectable sustained-release formulation of morphine: antinociceptive properties in rats. *Laboratory Animals*, [S. 1.], v. 32, p. 270-275, 1998.

TEIXEIRA, E. Análise físico-sensorial.apostila da disciplina de análise sensorial, ministrada no curso de pós-graduação do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

TENUTA FILHO, A. Cefalotórax de camarão-rosa, VI. Caracterização químico-nutricional do resíduo obtido após recuperação da proteína. *SBCTA*, v.21, n.314, p.163-169, 1987.

THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked chitosan microspheres preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.44, p.283-286, 1991.

THANOU, M.; NIHOT, M. T.; JANSEN, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Mono-N-carboxymethylchitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.90, n.1, p. 38-46, 2001.

TINLAND, B. MAZET, J. e RINAUDO, M. Characterization of water-soluble polymers by multidetection size-exclusion chromatography. *Makromol. Chem.* v. 2, p. 69, 1988.

TRAUTWEIN, E. A.; JÜRGENSEN, U.; ERBERSDOBLER, H. F. Cholesterol-lowering and gallstone-preventing action of chitosans with different degrees of deacetylation in hamsters fed cholesterol-rich diets. *Nutrition research*, v.17, n.6,p. 1053-1065, 1997.

VAN KREVELEN, D. W. Viscosity of polymers solutions. In: *Properties of polymers*. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1972.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. E. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

VENERONI, G.; VENERONI, F.; CONTOS, S.; TRIPODI, S.; DE BERNARDI, M.; GUARINO, C.; MARLETTA, M. Effect of new chitosan on hyperlipidemia and overweight in obese patients. *Chitin Enzymology*, v. 2, p. 63-67, 1996.

VENTURA, P. Lipid lowering activity of chitosan, a new dietary integrator. *Chitin, Enzymology*. v. 2, 1996.

VINAGRODOV, G. V. ; MALKIN, A. Basic concepts of rheology. In: *Rheology of polymers*. Moscou: Mir Plublishers, 1980.

WARD, I.M.; HARDLEY, D.W. An introduction to the mechanical porperties of solid polymers. Ed. John Wiley & Sons, Great Britain, 1998.

WEILL, G. Relation between molecular structure and the viscosity in solution. *Interational Workshop on Plant Polisaccharides, Structure and Function (CNRS-INRA, Proceedings)*, Nantes, 1984.

WILES, J.L.; VERGANO, P.J.; BARRON, F.H.; BUNN, J.M.; TESTIN, R.F. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *Journal of Food Science*, v. 65, n.7, p.1175-1179, 2000.

WILHELM, H-M.; SIERAKOWSKI, M. R.; SOUZA, G. P. ; WYPYCH, F. *Carbohyd. Polym.*, v. 52, p. 101-110, 2003.

WINTEROWD, I. G.; SANDFORD, P. A. Chitin and Chitosan. In: \_\_\_\_\_. *Food Polysaccharides and their application*. New York: Elsevier Applied Science, p. 441-462, 1995.

WOLFROM, M. L.; SHEN-HAQN, T. M. The sulfonation of chitosan. J. Am. Chem. Soc., [S. I.], v. 81, p. 1764, 1959.

WYATT, J. P. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. Anal. Chim. Acta, v. 272, p. 1-40, 1993.

YAMANE, H.; TAKADA, K. Frozen desserts with good shape-retaining property and their manufacture with chitosan. Jap. Patent 03, [S. I.], v. 76, p. 537, 1991.

YAMASHITA, F., BENASSI, M. de T. Influência de diferentes embalagens de atmosfera modificada sobre a aceitação de goiabas brancas de mesa (*Psidium guajava* L., var. *Kumagai*) mantidas sob refrigeração. Alimentos e nutrição, n. 9, p. 9-16. 1998.

YAO, H.; CHIANG, M. Plasma lipoprotein cholesterol in rats fed a diet enriched in chitosan and cholesterol. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. v.48, n.5, 2002.

YOSHIHITO, N. Foods or beverages containing polysaccharides, chitin (derivatives), and calcium and iron compounds. Jap. Patent 02, [S. I.], v. 283, p. 261, 1990.

YOSHIOKA, I., HIRANO, R., SHIOYA, I., KAKO, M. Encapsulation of mammalian-cell with chitosan CMC capsule. Biotechnol. Bioeng., v.35, p.66-72, 1990.

YOSHIYUKI, C. Manufacture of breads containing chitosan-treated heme iron. Jap. Patent 01, [S. I.], v. 179, p. 638, 1989a.

YOSHIYUKI, C. Iron-enriched confectioneries containing chitosan-treated heme. Jap. Patent 01, [S. I.], v. 91, p. 745, 1989b.

YOUNG, Y. et al. Effect of various films on shelf life of sliced strawberry fruit. Acta-horticulture, v.9, n.483, p.283-289, 1999.





## RESULTADOS DO PESO DOS RATOS

	12/fev	14/fev	17/fev	19/fev	21/fev	24/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/mar
	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P 11	P12	Pfinal
5	203	207	224	237	240	252	262	260	261	271	264
4	251	250	264	273	276	277	280	279	287	294	287
9	256	265	278	282	291	298	303	305	307	306	306
8	247	249	236	224	252	266	280	285	283	284	295
7	244	261	270	282	285	294	298	301	317	318	313
4	236	248	254	256	251	266	270	279	275	273	277
3	226	231	230	228	227	244	256	261	253	249	262
4	239	247	263	269	277	276	283	294	266	268	279
9	277	292	295	298	291	312	315	322	304	330	325
	242,11	250,00	257,11	261,00	265,56	276,11	283,00	287,33	283,67	288,11	289,78

## animais

	12/fev	14/fev	17/fev	19/fev	21/fev	27/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/mar
	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P 11	P12	Pfinal
	216	229	232	250	259	257	266	270	263	276	275
	239	251	262	286	291	291	296	292	304	307	301
	265	277	286	285	288	286	286	289	266	292	287
	242	237	251	273	293	286	304	317	325	338	335
	250	263	274	277	284	288	288	290	300	311	300
	243	242	252	259	262	266	269	277	234	214	237
	237	251	263	261	277	283	293	302	289	280	270
	261	269	282	282	288	298	310	313	321	328	325
	285	295	307	312	317	327	330	333	341	345	343
	248,67	257,11	267,67	276,11	284,33	286,89	293,56	298,11	293,67	299,00	297,00

animais

12/fev	14/fev	17/fev	19/fev	21/fev	24/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/mar
P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P 11	P12	Pfinal
223	220	211	216	225	227	235	242	214	247	243
240	252	261	258	251	277	282	285	275	277	270
224	228	230	253	265	277	283	290	264	294	279
224	256	253	246	245	271	250	279	265	250	273
219	226	237	248	262	271	284	293	284	295	294
238	242	252	253	257	260	269	263	249	236	223
222	218	226	225	232	243	253	244	227	214	209
223	243	246	248	262	269	280	282	255	292	288
250	252	246	240	255	249	253	273	245	258	251
229,22	237,44	240,22	243,00	250,44	260,44	265,44	272,33	253,11	262,56	258,89

a) – Peso dos animais

12/fev	14/fev	17/fev	19/fev	21/fev	24/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/mar
P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P 11	P12	Pfinal
211	227	221	252	271	278	284	292	262	236	216
257	278	278	270	282	283	303	303	267	239	270
277	280	277	293	294	295	303	300	263	240	271
244	262	272	282	285	286	289	287	294	293	289
243	252	267	276	288	295	310	312	316	329	338
233	233	242	232	216	246	263	270	258	277	272
245	266	268	261	239	238	286	294	264	240	266
282	301	303	310	322	326	332	336	313	316	331
249,00	262,38	266,00	272,00	274,63	280,88	296,25	299,25	279,63	271,25	281,63

DADOS DO CONSUMO ALIMENTAR DOS RATOS

o alimentar

17/fev	19/fev	21/fev	24/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/03/03
C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
72,19	54,94	50,44	74,28	58,77	44,13	80,61	60,66	40,67
79,77	55,9	52,9	62,92	46,19	42,46	69,62	70,27	40,05
80,03	56,48	51,32	80,71	52,75	47,76	68,3	49,68	38,89
53,3	21,57	49,1	80,83	69,67	65,55	77,35	47,01	47,64
80,9	65,63	51,38	78,54	55,41	53,14	75,79	56,02	33,67
68,97	54,92	50,73	80,81	53,48	53,83	59,87	44,2	39,63
79,78	42,13	37,11	71,13	54,88	52,37	59,31	36,97	37,82
79,29	57,03	55,71	69,09	58,53	59,79	49,95	30,37	36
80,13	56,03	48,74	82,57	58,99	51,75	63,31	62,42	46,08
74,93	51,63	49,71	75,65	56,52	52,31	67,12	50,84	40,05

sumo alimentar

17/fev	19/fev	21/fev	24/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/03/03
C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
62,62	55,15	50,11	57,22	44,46	45,22	54,92	47,51	37,26
80,8	70,95	51,67	59,63	44,83	36,24	67,83	47,55	32,14
79,47	47,24	45,52	59,06	40,84	45,79	44,31	51,52	37,36
61,31	61,88	65,45	65,45	63,48	58,55	77,67	67,74	35,57
72,67	45,01	45,49	64,27	43,94	42,11	65,61	55,12	30,86
70,45	46,21	47,22	65,4	47,73	51,43	35,64	17,75	34,03
79,05	42,35	48,98	65,51	46,37	43,71	53,64	26,78	21,55
76,8	47,44	48,17	72,66	57,7	51,06	75,46	56,83	41,27
80,59	53,68	54,56	74,98	51,79	50,29	74,55	54,75	41,37
73,75	52,21	50,80	64,91	49,02	47,16	61,07	47,28	34,60

umo alimentar

17/fev	19/fev	21/fev	24/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/03/03
C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
40,27	38,09	30,38	59,29	49,64	50,54	42,18	55,12	43,45
70,8	47,37	36,55	71,3	48,96	48,08	56,26	37,07	32,63
72,03	66,81	63,44	77,21	49,09	45,12	47,45	49,91	34,34
73,92	41,18	36,3	77,68	33,47	46,71	65,29	27,75	40,32
74,51	54,52	60,14	78,33	64,67	63,29	69,7	47,39	39,25
69,54	44,56	46,2	63,36	51,2	44,87	61,71	27,81	18,54
68,98	42,15	50,3	66,24	48,77	36,39	45,51	25,57	26,15
77,62	45,82	56,26	69,68	53,52	47,05	55,54	60,81	42,32
55,46	39,22	50,33	55,77	48,91	60,96	64,69	37,96	22,22
67,01	46,64	47,77	68,76	49,80	49,22	56,48	41,04	33,25

uitosana) - Consumo alimentar

17/fev	19/fev	21/fev	24/fev	26/fev	28/fev	03/mar	05/mar	07/03/03
C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
58,58	70,96	66,85	80,02	57,56	51,21	47,69	11,86	10,43
78,97	44,35	45,88	70,65	60,34	50,23	42,69	4,72	39,07
61,56	57,5	48,42	72,04	47,3	44,31	34,41	10,32	41,95
81,26	57,16	47,13	66,93	45,31	42,35	60,86	49,51	33,75
77,14	54,58	56,62	77,03	50,91	49,75	70,23	50,82	53,14
70,49	37,54	17,64	66,91	58,41	46,94	45,23	51,81	34,84
81	47,58	18,47	42,31	69,06	67,92	49,89	11,23	45,96
77,46	56,58	64,48	80,25	58,38	54,3	57	33,21	45,52
73,31	53,28	45,69	69,52	55,91	50,88	51,00	27,94	38,08

RESULTADOS DE COLESTEROL TOTAL (CT), TRIGLICERÍDEOS (TGL),  
 HDL-colesterol (HDL) NO INÍCIO E NO FINAL DO EXPERIMENTO

CT final	TGL início	TGL final	HDL início	HDL final	LDL início	LDL final
116	44	121	27	32	68	60
94	61	111	25	20	59	52
84	46	137	18	21	58	36
94	37	157	16	16	49	47
94	41	150	18	22	62	42
	35		19		50	
	46		15		33	
72	61	65	22	11	45	48
97	29	87	22	29	55	51

perlipídico)

CT final	TGL início	TGL final	HDL início	HDL final	LDL início	LDL final
84	40	82	23	9	34	59
97	46	135	13	16	54	54
97	42	81	23	19	47	62
87	26	124	33	19	43	43
83	31	82	18	18	42	49
79	26	59	15	15	44	52
82	25	66	20	20	66	49
81	28	114	20	24	43	34
84	22	80	19	20	47	48

Quitosana)

CT final	TGL início	TGL final	HDL início	HDL final	LDL início	LDL final
107	47	109	14	19	50	66
103	38	91	34	21	25	64
85	59	90	38	14	36	53
133	34	157	22	17	37	85
124	65	145	25	16	49	79
109	47	52	36	20	52	79
77	37	31	30	18	31	53
104	37	93	26	19	42	66
81	57	26	26	17	42	59

Q (N-carboximetilquitosana)

CT final	TGL início	TGL final	HDL início	HDL final	LDL início	LDL final
152	49	14	37	8	44	141
159	33	58	11	5	45	142
188	31	51	13	5	55	173
143	23	112	23	11	45	110
277	36	172	18	17	60	226
304	29	50	23	7	55	287
300	41	44	17	6	39	285
297	33	84	19	15	45	265

ANEXO 5: TABELAS DE RESULTADOS DE GORDURA FECAL

05/02/03	
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 1 a 3	3,31
Amostra 1 a 3	2,65
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 4 a 6	2,96
Amostra 4 a 6	2,64
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 7 a 9	2,98
Amostra 7 a 9	2,30
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 10 a 12	2,66
Amostra 10 a 12	3,66
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 13 a 15	1,99
Amostra 13 a 15	2,48
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 16 a 18	2,59
Amostra 16 a 18	1,94
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 19 a 21	2,88
Amostra 19 a 21	2,98
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 22 a 24	2,64
Amostra 22 a 24	3,62
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 25 a 27	2,26
Amostra 25 a 27	2,77
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 28 a 30	2,28
Amostra 28 a 30	2,61
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 31 a 33	2,27
Amostra 31 a 33	1,99
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 34 a 36	2,97
Amostra 34 a 36	2,66

13 e 14/02/2003	
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 1 a 3	1,92
Amostra 1 a 3	1,58
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 4 a 6	2,61
Amostra 4 a 6	2,27
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 7 a 9	4,92
Amostra 7 a 9	1,00
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 10 a 12	4,61
Amostra 10 a 12	3,58
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 13 a 15	5,63
Amostra 13 a 15	5,22
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 16 a 18	4,79
Amostra 16 a 18	4,14
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 19 a 21	10,96
Amostra 19 a 21	8,87
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 22 a 24	10,26
Amostra 22 a 24	7,33
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 25 a 27	13,35
Amostra 25 a 27	14,39
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 28 a 29	7,25
Amostra 28 a 29	9,42
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 31 a 33	4,15
Amostra 31 a 33	7,45
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 34 a 36	6,59
Amostra 34 a 36	8,92

21 e 22/03/2003	
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 1 a 3	1,87
Amostra 1 a 3	0,94
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 4 a 6	2,84
Amostra 4 a 6	1,57
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 7 a 9	1,63
Amostra 7 a 9	3,58
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 10 a 12	4,83
Amostra 10 a 12	4,83
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 13 a 15	2,83
Amostra 13 a 15	4,72
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 16 a 18	4,60
Amostra 16 a 18	2,68
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 19 a 21	9,61
Amostra 19 a 21	10,15
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 22 a 24	11,77
Amostra 22 a 24	10,64
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 25 a 27	8,22
Amostra 25 a 27	9,19
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 28 a 29	8,22
Amostra 28 a 29	6,85
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 31 a 33	4,37
Amostra 31 a 33	7,37
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 34 a 36	8,81
Amostra 34 a 36	6,87

27 e 28/02/2003	
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 1 a 3	2,96
Amostra 1 a 3	1,87
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 4 a 6	1,92
Amostra 4 a 6	1,91
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 7 a 9	0,65
Amostra 7 a 9	2,28
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 10 a 12	6,38
Amostra 10 a 12	1,31
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 13 a 15	2,84
Amostra 13 a 15	2,83
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 16 a 18	3,30
Amostra 16 a 18	6,93
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 19 a 21	9,65
Amostra 19 a 21	9,86
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 22 a 24	7,53
Amostra 22 a 24	8,71
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 25 a 27	1,46
Amostra 25 a 27	8,01
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 28 a 29	9,13
Amostra 28 a 29	8,80
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 31 a 33	7,50
Amostra 31 a 33	7,82
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 34 a 36	7,96
Amostra 34 a 36	7,54

06/03/03	
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 1 a 3	3,95
Amostra 1 a 3	3,97
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 4 a 6	2,32
Amostra 4 a 6	2,84
GRUPO CONTROLE	% Gordura Fecal
Amostra 7 a 9	3,39
Amostra 7 a 9	2,22
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 10 a 12	4,76
Amostra 10 a 12	3,45
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 13 a 15	7,48
Amostra 13 a 15	5,59
GRUPO HIPERLIPÍDICO	% Gordura Fecal
Amostra 16 a 18	6,00
Amostra 16 a 18	5,38
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 19 a 21	10,63
Amostra 19 a 21	9,86
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 22 a 24	9,07
Amostra 22 a 24	9,20
GRUPO QUITOSANA	% Gordura Fecal
Amostra 25 a 27	9,33
Amostra 25 a 27	10,79
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 28 a 29	11,61
Amostra 28 a 29	11,50
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 31 a 33	7,95
Amostra 31 a 33	7,39
GRUPO NCMQ	% Gordura Fecal
Amostra 34 a 36	7,92
Amostra 34 a 36	7,40

ANEXO 6: RESULTADO DAS NOTAS ATRIBUÍDAS PELOS JULGADORES PARA AS AMOSTRAS DE MAÇÃ

Maçã cultivar Catarina com filme temperatura ambiente (avaliação - 11 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	6,00	6,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
2	9,00	8,00	1,00	2,50	1,00	6,00	6,00
3	7,00	7,00	3,00	1,00	4,00	3,00	6,00
4	3,50	3,50	2,00	7,00	6,00	6,50	6,50
5	7,50	3,50	1,50	1,50	1,50	6,00	6,00
6	2,00	2,00	2,00	6,00	5,00	7,50	7,00
7	8,50	5,50	1,00	7,50	7,50	7,00	6,00
8	3,00	2,00	1,50	1,00	1,00	7,00	8,00
9	9,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 11 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	5,50	3,50	2,00	7,00	6,00	4,00	6,00
2	8,00	4,50	1,00	7,00	1,00	7,50	5,00
3	8,00	8,00	4,00	1,50	2,00	3,00	4,50
4	8,00	8,00	1,50	7,00	6,50	7,50	6,00
5	6,00	4,50	1,50	1,50	4,00	6,00	6,00
6	5,00	3,00	1,00	6,00	5,00	7,00	6,50
7	8,00	8,00	1,00	5,00	8,00	7,00	8,00
8	6,00	6,00	2,00	8,00	8,50	8,50	5,00
9	9,00	1,00	1,00	2,00	1,00	4,00	1,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 11 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	5,00	5,00	1,00	5,50	6,50	7,00	5,50
2	7,00	3,00	1,00	3,50	8,00	8,00	3,00
3	5,00	9,00	2,00	1,00	5,00	3,50	6,50
4	8,00	4,50	2,00	5,00	7,00	6,00	6,00
5	8,00	4,50	2,00	5,00	7,00	6,00	6,00
6	6,00	3,00	2,50	5,50	6,00	6,50	5,00
7	2,00	2,00	1,00	4,00	7,50	8,00	5,00
8	8,50	1,50	1,50	8,00	8,50	8,00	7,00
9	9,00	1,00	1,00	5,00	5,00	2,00	1,00

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 11 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	7,50	5,00	2,00	7,50	7,00	4,00	6,00
2	3,50	2,50	1,00	6,50	8,00	6,50	3,00
3	9,00	7,00	2,50	1,50	2,00	3,00	5,00
4	4,00	2,50	1,50	7,50	6,00	5,00	7,00
5	7,00	5,50	1,50	1,50	6,00	7,00	5,50
6	9,00	7,00	1,00	7,00	6,00	8,00	5,00
7	9,00	7,00	1,00	6,00	7,50	5,00	6,00
8	1,50	1,50	1,00	8,00	6,00	7,50	4,00
9	6,00	1,00	1,00	1,00	1,00	7,00	1,00

Maçã cultivar Catarina com filme temperatura ambiente (avaliação - 18 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	1,00	4,50	1,00	6,00	7,00	7,00	7,00
2	7,00	7,00	1,00	7,00	1,00	8,50	4,00
3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00
4	5,00	5,00	1,00	7,50	6,00	7,00	7,50
5	6,00	3,00	1,00	7,00	6,00	6,00	4,00
6	3,00	3,00	1,00	6,50	6,50	4,50	4,50
7	7,00	6,50	1,00	4,00	3,00	8,50	3,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	3,00	4,00	1,50	8,00	8,00	8,00	8,00
11	8,50	6,00	1,00	2,00	1,50	4,50	4,50
12	1,50	2,00	1,50	3,00	4,00	3,00	5,00

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 18 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,00	5,00	1,00	8,00	8,00	7,00	7,00
2	5,00	4,00	1,00	7,00	6,00	9,00	2,00
3	4,50	1,00	2,00	2,00	4,00	7,00	4,50
4	6,50	4,00	1,00	6,00	6,00	1,00	1,00
5	7,00	5,00	1,00	6,50	6,00	7,00	4,00
6	8,50	4,00	1,00	7,00	6,00	8,00	8,00
7	7,00	6,00	1,00	7,50	7,00	7,00	2,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	9,00	8,00	1,00	9,00	9,00	9,00	9,00
11	6,00	6,00	1,00	7,50	6,00	6,50	6,00
12	4,00	3,00	1,00	6,50	5,00	6,00	5,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 18 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	6,00	6,00	1,00	5,00	6,00	5,00	6,00
2	6,00	4,00	1,00	5,00	1,00	1,00	3,00
3	7,00	1,00	5,00	2,00	4,50	5,50	5,00
4	8,00	2,00	1,00	6,00	6,00	8,50	7,50
5	4,00	4,00	1,00	6,00	5,50	8,00	5,00
6	6,00	2,00	1,00	6,00	6,50	6,00	6,00
7	3,00	3,00	1,00	7,00	9,00	8,00	8,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	9,00	5,00	1,00	8,00	9,00	9,00	9,00
11	7,00	5,00	1,00	7,00	7,00	7,00	5,00
12	8,50	2,00	1,00	3,50	6,00	2,00	1,00

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 18 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,50	5,50	1,00	5,00	5,00	7,00	4,00
2	7,50	5,00	1,00	3,50	1,00	8,50	2,00
3	5,00	5,00	5,00	5,50	5,00	5,00	5,00
4	8,00	6,00	1,00	6,00	7,00	8,00	6,50
5	8,00	5,00	1,00	7,50	6,00	8,00	5,00
6	7,00	4,00	1,00	6,50	6,50	6,50	7,00
7	9,00	5,00	1,00	7,00	8,50	7,00	4,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	8,00	7,00	1,00	8,00	9,00	9,00	1,00
11	6,00	6,00	1,00	7,00	7,00	8,00	6,00
12	3,00	3,00	1,00	8,00	5,00	5,50	4,00

Maçã cultivar Catarina com filme temperatura ambiente (avaliação - 24 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,50	6,00	1,00	6,50	7,00	7,00	6,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	3,00	5,00	1,00	1,00	5,00	5,00	5,00
4	7,00	6,00	1,00	8,00	8,00	8,50	8,50
5	2,00	4,00	3,00	5,00	4,50	4,50	5,00
6	6,00	2,50	2,00	7,00	4,50	3,00	1,00
7	9,00	5,50	1,50	6,00	6,00	6,00	5,50
8	9,00	2,50	1,00	1,00	7,00	6,50	6,00
9	,	,	,	,	,	,	,
10	7,00	6,00	1,00	8,50	8,00	7,50	8,00
11	6,00	5,50	1,00	8,50	7,00	8,50	6,00
12	7,00	5,00	1,00	2,50	1,00	2,00	5,00

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 24 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	7,00	5,50	1,00	6,00	6,00	7,00	4,50
2	,	,	,	,	,	,	,
3	3,00	3,50	1,00	5,50	5,00	6,00	4,00
4	8,50	6,00	1,00	8,00	8,50	8,50	8,50
5	4,00	5,00	1,00	5,50	6,00	5,00	5,00
6	7,00	3,00	1,00	7,00	6,00	7,00	6,50
7	9,00	4,00	1,50	6,00	8,50	8,00	3,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	9,00	1,00	1,00	1,00	7,00	1,00	8,00
10	7,00	5,50	1,00	7,50	9,00	9,00	8,50
11	7,50	7,00	1,00	7,00	7,50	8,50	7,50
12	7,50	1,00	1,00	6,00	6,00	6,50	5,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 24 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	6,00	5,00	1,50	6,50	8,00	5,00	7,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	8,00	2,00	1,00	5,00	6,00	5,00	4,00
4	7,50	4,00	1,50	7,50	7,50	5,00	6,00
5	7,00	4,00	3,00	5,00	4,50	5,00	5,00
6	4,00	2,50	2,00	6,00	5,00	6,50	7,00
7	8,00	3,00	1,00	8,50	8,50	5,00	4,00
8	7,00	2,50	1,00	1,00	1,00	8,00	8,00
9	,	,	,	,	,	,	,
10	5,00	3,00	7,00	6,50	9,00	8,50	8,50
11	8,50	2,50	1,00	8,00	7,00	8,50	6,50
12	1,50	1,00	1,00	7,50	7,00	3,00	5,00

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 24 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	7,50	1,00	1,00	6,50	6,50	7,00	6,50
2	,	,	,	,	,	,	,
3	6,00	3,00	1,00	5,00	4,50	5,00	4,50
4	8,00	7,50	1,50	8,00	8,50	8,00	8,00
5	3,00	4,50	1,00	5,50	6,00	5,00	5,00
6	6,00	4,00	1,00	7,50	6,00	7,00	7,00
7	7,00	7,00	1,00	5,50	5,50	8,50	2,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	9,00	3,00	1,00	6,50	1,00	1,00	1,00
10	7,00	6,00	1,00	8,00	9,00	8,00	9,00
11	8,00	7,00	1,00	7,50	8,00	8,50	7,00
12	3,00	1,00	1,00	7,50	7,00	6,00	4,50

Maçã cultivar Catarina com filme temperatura ambiente (avaliação - 26 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,00	6,50	1,00	8,00	7,50	6,50	6,00
2	7,50	8,00	1,00	5,50	5,50	9,00	2,00
3	4,00	6,00	1,00	5,00	5,00	5,50	5,50
4	8,00	7,00	1,50	8,00	7,00	8,00	8,00
5	3,00	3,00	4,00	4,50	5,00	4,50	3,00
6	,	,	,	,	,	,	,
7	3,00	3,00	1,00	1,00	2,00	6,50	5,00
8	8,50	7,00	1,00	6,00	7,00	5,00	7,00
9	2,00	3,00	1,00	3,00	1,00	4,00	1,00
10	,	,	,	,	,	,	,
11	5,00	7,50	1,00	8,00	7,00	8,00	5,50
12	1,00	3,00	1,00	1,00	1,00	5,00	5,50

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 26 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	6,00	5,50	1,00	7,50	7,50	6,00	7,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	5,50	5,00	1,00	5,00	5,00	6,50	5,50
4	8,00	7,00	1,00	8,00	8,00	8,00	8,00
5	5,50	5,50	1,00	4,50	5,00	5,00	4,00
6	4,00	2,00	2,00	7,00	7,00	5,00	6,00
7	6,00	3,00	1,00	6,00	5,00	7,00	4,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	6,50	3,50	1,00	3,00	3,00	2,00	1,00
10	,	,	,	,	,	,	,
11	,	,	,	,	,	,	,
12	6,00	3,00	1,00	5,00	7,00	6,50	5,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 26 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	6,00	6,00	1,00	8,00	8,00	7,00	7,00
2	4,00	6,00	1,00	5,00	6,50	8,00	6,00
3	6,00	1,00	1,00	5,00	5,00	3,50	4,50
4	6,00	2,00	2,00	7,50	7,50	5,50	5,50
5	7,50	5,50	1,00	5,50	5,50	5,50	5,00
6	,	,	,	,	,	,	,
7	7,00	3,00	1,00	8,00	8,50	7,00	4,00
8	6,00	1,00	5,00	3,00	8,00	8,80	3,00
9	7,00	2,00	1,00	6,00	6,00	1,00	3,00
10	,	,	,	,	,	,	,
11	8,00	3,00	1,00	6,50	7,50	8,00	7,00
12	1,00	1,00	1,00	7,50	7,00	5,50	5,50

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 26 de abril)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,00	6,00	1,00	7,00	7,00	7,00	6,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	6,00	6,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,50
4	6,00	4,00	1,00	7,50	6,50	8,00	7,50
5	6,00	5,50	1,00	5,00	5,50	6,00	5,00
6	7,50	4,00	3,00	7,00	6,50	5,00	6,00
7	7,00	3,00	1,00	8,00	7,00	7,00	3,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	3,00	1,50	1,00	3,00	3,50	2,00	1,00
10	,	,	,	,	,	,	,
11	,	,	,	,	,	,	,
12	7,50	2,00	1,00	6,00	4,00	6,00	4,00

Maçã cultivar Catarina com filme temperatura ambiente (avaliação - 02 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,00	5,00	1,00	8,00	8,00	7,00	7,00
2	9,00	8,00	1,00	5,00	7,00	9,00	5,00
3	,	,	,	,	,	,	,
4	7,00	5,00	6,00	7,00	7,00	6,00	6,00
5	7,00	6,00	2,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	7,00	6,00	3,00	6,00	5,00	3,00	2,00
7	3,00	3,00	7,00	6,00	8,00	3,00	3,00
8	5,00	5,00	1,00	3,00	6,00	6,00	5,00
9	2,00	1,00	2,00	3,00	1,00	1,00	3,00
10	8,00	7,00	2,00	8,00	8,00	7,00	6,00
11	6,00	7,00	1,00	7,00	6,00	8,00	5,00
12	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 02 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	1,00	2,00	1,00	7,00	6,50	5,00	8,00
3	,	,	,	,	,	,	,
4	,	,	,	,	,	,	,
5	3,00	4,00	1,00	6,00	6,00	5,00	5,00
6	3,00	3,00	2,00	7,00	8,00	6,50	7,50
7	2,00	3,00	3,00	7,00	3,00	7,00	3,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,00	1,00
10	3,00	3,00	1,00	8,50	8,50	8,50	8,50
11	6,00	6,00	1,00	8,50	8,50	8,50	8,00
12	2,00	1,00	1,00	7,50	6,00	7,00	6,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 02 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	7,00	7,00	1,00	7,00	7,50	7,00	7,00
2	8,00	3,00	1,00	5,00	8,00	8,00	4,00
3	,	,	,	,	,	,	,
4	6,00	2,00	5,00	7,00	7,00	6,00	6,00
5	3,00	2,00	6,00	5,00	6,00	4,00	4,00
6	3,00	1,00	4,00	5,00	6,00	3,00	3,00
7	8,00	2,00	1,00	3,00	9,00	3,00	2,00
8	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	6,00	7,00
9	2,00	1,00	1,00	4,00	1,00	1,00	6,00
10	5,00	3,00	5,00	7,00	8,00	6,00	8,00
11	8,00	2,00	1,00	5,00	7,00	8,00	7,00
12	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 02 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	9,00	2,00	1,00	5,00	8,00	9,00	2,00
3	,	,	,	,	,	,	,
4	,	,	,	,	,	,	,
5	6,00	6,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	7,00	3,00	2,00	7,50	8,00	7,00	7,50
7	8,00	3,00	1,00	8,50	6,50	7,00	3,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	6,00	1,00	1,00	4,00	3,00	3,00	1,00
10	8,50	5,50	1,00	7,00	5,00	8,00	6,00
11	8,50	6,00	1,00	7,00	7,00	9,00	8,00
12	8,00	1,00	1,00	6,50	8,00	7,00	1,00

Maçã cultivar Catarina com filme temperatura ambiente (avaliação - 04 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	2,00	2,00	1,00	5,00	1,00	6,00	5,00
3	7,00	6,00	5,00	5,00	5,00	5,00	4,00
4	4,00	6,00	2,00	8,00	8,00	8,00	7,00
5	8,00	6,00	2,00	5,00	5,00	5,00	5,00
6	,	,	,	,	,	,	,
7	8,50	3,00	2,00	3,00	9,00	4,00	4,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	7,00	5,00	6,00	8,00	7,00	6,00	5,00
11	5,00	7,00	1,00	7,00	6,00	8,00	7,00
12	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 04 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	4,00	6,00	1,00	8,00	8,00	6,00	6,50
2	4,00	4,00	1,00	5,00	5,00	7,00	6,00
3	6,00	5,00	1,00	6,00	5,00	7,00	5,00
4	8,00	6,00	2,00	8,00	8,00	8,00	7,00
5	5,00	6,00	1,00	7,00	7,00	6,00	6,00
6	3,00	2,00	2,00	6,00	7,00	4,00	7,00
7	6,00	6,00	1,00	7,00	9,00	8,50	3,00
8	8,00	6,00	1,00	5,00	5,00	8,00	6,00
9	,	,	,	,	,	,	,
10	6,00	6,00	1,00	8,00	8,50	8,50	9,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	8,00	5,00	1,00	6,00	5,00	5,00	5,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 04 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	5,00	2,00	1,00	5,00	7,00	8,00	8,00
3	6,00	4,00	3,00	4,00	4,00	5,00	5,00
4	8,00	2,00	2,00	7,00	7,00	5,00	6,00
5	6,00	6,00	2,00	6,00	6,00	5,00	5,00
6	,	,	,	,	,	,	,
7	9,00	2,00	2,00	3,00	7,00	3,00	3,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	6,00	5,00	6,00	8,00	8,00	6,00	6,00
11	7,00	5,00	1,00	8,00	8,00	8,00	8,00
12	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 04 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,00	7,00	1,00	8,00	7,00	6,00	5,00
2	3,00	2,50	1,00	1,00	5,00	7,00	5,00
3	6,00	4,00	1,00	6,00	6,00	7,00	6,00
4	6,00	5,00	1,00	8,00	8,00	8,00	8,00
5	5,00	5,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	2,00	1,00	1,00	6,00	6,00	4,00	5,00
7	5,00	4,00	1,00	8,00	9,00	7,00	4,00
8	9,00	6,00	1,00	7,00	8,00	7,00	8,50
9	,	,	,	,	,	,	,
10	8,00	6,00	2,00	7,50	9,00	8,50	7,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	3,00	1,00	1,00	6,50	6,50	6,00	4,00

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 08 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,00	7,00	2,00	6,00	7,00	7,00	7,00
2	2,00	4,00	1,00	5,00	5,00	8,00	4,00
3	6,00	3,00	1,00	1,00	6,00	5,00	6,00
4	,	,	,	,	,	,	,
5	5,00	4,00	1,00	7,00	7,00	6,00	6,00
6	7,00	5,00	2,00	6,00	7,00	7,00	7,00
7	,	,	,	,	,	,	,
8	8,00	7,00	1,00	7,00	6,00	7,00	8,00
9	4,00	4,00	1,00	4,00	1,00	1,00	1,00
10	4,00	5,00	1,00	7,00	8,00	8,00	6,00
11	9,00	7,00	2,00	7,00	8,00	8,50	7,00
12	,	,	,	,	,	,	,
13	2,00	2,00	1,00	3,00	7,00	5,00	8,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 08 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	6,00	5,00	5,00	4,00	5,00	5,00	7,00
2	8,00	2,00	1,00	2,00	6,00	7,00	5,00
3	6,00	1,00	1,00	7,00	7,00	3,00	5,00
4	,	,	,	,	,	,	,
5	5,00	3,00	2,00	5,00	5,00	4,00	4,00
6	2,00	1,00	2,00	5,00	3,00	2,00	5,00
7	,	,	,	,	,	,	,
8	2,00	1,00	1,00	6,00	3,00	6,00	5,00
9	6,00	3,00	1,00	5,00	1,00	1,00	1,00
10	2,00	2,00	2,00	7,00	7,00	6,00	8,00
11	7,00	2,00	2,00	7,00	7,00	8,00	6,00
12	,	,	,	,	,	,	,
13	5,00	2,00	1,00	3,00	5,00	7,00	6,00

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 08 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	5,00	5,00	1,00	8,00	8,00	7,00	7,00
2	6,00	3,00	1,00	5,00	4,00	6,00	5,00
3	3,00	2,00	1,00	6,00	6,00	7,00	7,00
4	,	,	,	,	,	,	,
5	4,00	4,00	1,00	6,00	7,00	6,00	6,00
6	2,00	2,00	2,00	7,00	7,00	6,00	7,00
7	,	,	,	,	,	,	,
8	5,00	2,00	1,00	3,00	6,00	8,00	8,00
9	4,00	3,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	4,00	3,00	2,00	7,00	8,00	7,00	8,00
11	6,00	4,00	1,00	8,00	8,50	8,00	7,00
12	,	,	,	,	,	,	,
13	8,00	5,00	1,00	8,00	9,00	8,00	8,00

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 15 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	,	,	,	,	,	,	,
3	6,00	4,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
4	,	,	,	,	,	,	,
5	6,00	5,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	3,00	2,00	6,00	6,00	3,00	3,00	7,00
7	2,00	2,00	2,00	3,00	5,00	5,00	4,00
8	8,00	8,00	1,00	7,00	7,00	7,00	5,00
9	3,00	2,00	1,00	5,00	5,00	4,00	1,00
10	9,00	5,00	2,00	6,00	7,00	7,00	8,50
11	7,00	8,00	1,00	7,00	8,00	7,00	8,50
12	3,00	1,00	1,00	6,00	6,00	5,00	5,00
13	6,00	2,00	2,00	7,00	7,00	6,00	5,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 15 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	,	,	,	,	,	,	,
3	5,00	3,00	5,00	5,00	5,00	5,00	4,00
4	2,00	2,00	5,00	7,00	7,00	7,00	6,00
5	3,00	2,00	4,00	5,00	6,00	4,00	5,00
6	7,00	3,00	6,00	5,00	7,00	3,00	6,00
7	,	,	,	,	,	,	,
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	1,00	1,00	5,00	5,00	7,00	2,00	3,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	,	,	,	,	,	,	,
13	5,00	2,00	3,00	5,00	6,00	6,00	6,00

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 15 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	,	,	,	,	,	,	,
3	6,00	6,00	1,00	6,00	4,00	6,00	5,00
4	,	,	,	,	,	,	,
5	5,00	5,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	5,00	1,00	3,00	7,00	6,00	3,00	7,00
7	7,00	4,00	1,00	2,00	9,00	7,00	3,00
8	3,00	2,00	1,00	7,00	7,00	8,00	8,00
9	1,00	1,00	1,00	3,00	4,00	1,00	1,00
10	2,00	3,00	3,00	7,00	7,00	7,00	6,00
11	6,00	6,00	1,00	8,00	8,00	7,00	8,00
12	2,00	1,00	1,00	7,00	7,00	6,00	5,00
13	2,00	1,00	3,00	5,00	5,00	5,00	4,00

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 23 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	4,00	3,00	1,00	1,00	6,00	7,00	1,00
3	6,00	6,00	5,00	5,00	5,00	3,00	3,00
4	8,00	2,00	6,00	7,00	8,00	5,00	5,00
5	6,00	6,00	1,00	7,00	7,00	6,00	6,00
6	,	,	,	,	,	,	,
7	4,00	4,00	1,00	3,00	6,00	6,00	2,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	5,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	4,00	2,00	4,00	5,00	5,00	4,00	4,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	6,00	2,00	1,00	7,00	7,00	6,00	6,00
13	5,00	2,00	3,00	2,00	6,00	7,00	3,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 23 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	2,00	3,00	1,00	8,00	8,00	6,00	8,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	3,00	5,00	5,00	4,00	5,00	5,00	3,00
4	5,00	5,00	6,00	8,00	8,00	6,00	5,00
5	6,00	5,00	1,00	6,00	6,00	5,00	5,00
6	2,00	2,00	7,00	6,00	5,00	2,00	4,00
7	8,00	2,00	2,00	3,00	8,00	7,00	5,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	3,00	1,00	3,00	1,00	4,00	3,00	1,00
10	3,00	2,00	3,00	4,00	4,00	4,00	3,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	1,00	1,00	4,00	5,00	6,00	3,00	4,00
13	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 23 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	,	,	,	,	,	,	,
2	3,00	2,00	1,00	1,00	1,00	7,00	2,00
3	6,00	2,00	1,00	5,00	5,00	6,00	6,00
4	8,00	6,00	1,00	8,00	8,00	8,00	7,00
5	4,00	4,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	,	,	,	,	,	,	,
7	5,00	2,00	2,00	4,00	8,50	4,00	3,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	3,00	1,00	1,00	4,00	1,00	3,00	1,00
10	8,00	6,00	5,00	5,00	5,00	6,00	5,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	1,00	1,00	1,00	6,00	7,00	7,00	5,00
13	2,00	2,00	7,00	7,00	8,00	7,00	3,00

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 25 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	3,00	3,00	1,00	8,00	7,00	7,00	6,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	7,00	5,00	3,00	3,00	3,00	5,00	5,00
4	8,00	7,00	2,00	8,00	8,00	7,00	7,00
5	6,00	5,00	1,00	7,00	7,00	6,00	6,00
6	6,00	2,00	1,00	7,00	7,00	7,00	7,00
7	9,00	6,00	1,00	2,00	5,00	7,00	6,00
8	6,00	5,00	2,00	5,00	8,00	7,00	5,00
9	,	,	,	,	,	,	,
10	3,00	3,00	6,00	5,00	7,00	4,00	4,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	,	,	,	,	,	,	,
13	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 25 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	3,00	3,00	2,00	8,00	8,00	6,00	6,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	3,00	3,00	1,00	5,00	4,00	2,00	3,00
4	8,00	3,00	7,00	8,00	8,00	6,00	4,00
5	5,00	5,00	2,00	5,00	7,00	3,00	4,00
6	4,00	3,00	4,00	5,00	4,00	2,00	2,00
7	6,00	2,00	1,00	1,00	6,00	3,00	4,00
8	6,00	5,00	1,00	7,00	6,00	5,00	4,00
9	,	,	,	,	,	,	,
10	7,00	6,00	8,00	4,00	7,00	6,00	6,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	,	,	,	,	,	,	,
13	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 25 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	8,00	8,00	1,00	8,50	8,50	6,00	7,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	5,00	5,00	1,00	5,00	4,00	6,00	6,00
4	3,00	6,00	2,00	8,00	8,00	7,00	7,00
5	6,00	6,00	1,00	7,00	7,00	6,00	6,00
6	8,00	4,00	1,00	8,00	7,00	6,00	7,00
7	6,00	5,00	1,00	2,00	8,00	8,00	5,00
8	8,00	6,00	1,00	5,00	7,00	7,00	7,00
9	,	,	,	,	,	,	,
10	3,00	4,00	3,00	3,00	7,00	5,00	5,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	,	,	,	,	,	,	,
13	,	,	,	,	,	,	,

Maçã cultivar Catarina com filme refrigerada (avaliação - 29 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	9,00	5,00	1,00	8,00	8,00	8,00	7,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	7,00	5,00	2,00	5,00	5,00	5,00	5,00
4	6,00	4,00	6,00	8,00	8,00	7,00	6,00
5	7,00	5,00	1,00	6,00	6,00	5,00	5,00
6	6,00	2,00	1,00	6,00	6,00	6,00	6,00
7	7,00	3,00	3,00	2,00	7,00	6,00	2,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	2,00	2,00	3,00	3,00	6,00	4,00	4,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	3,00	1,00	1,00	8,00	7,00	6,00	6,00
13	3,00	6,00	6,00	2,00	7,00	7,00	6,00

Maçã cultivar Catarina sem filme temperatura ambiente (avaliação - 29 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	4,00	3,00	1,00	8,00	8,00	7,00	8,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	6,00	5,00	2,00	4,00	5,00	5,00	5,00
4	6,00	2,00	5,00	8,00	8,00	7,00	7,00
5	3,00	3,00	2,00	6,00	6,00	2,00	3,00
6	3,00	2,00	7,00	5,00	5,00	2,00	3,00
7	2,00	2,00	4,00	2,00	6,00	3,00	4,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	3,00	2,00	7,00	5,00	4,00	3,00	3,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	,	,	,	,	,	,	,
13	2,00	2,00	5,00	2,00	7,00	5,00	3,00

Maçã cultivar Catarina sem filme refrigerada (avaliação - 29 de maio)							
Cod.Aval.	cor casca	brilho	ap.desid.	od.caract.	s.caract.	dureza	suculência
1	3,00	2,00	1,00	8,00	8,00	8,00	7,00
2	,	,	,	,	,	,	,
3	6,00	5,00	1,00	5,00	6,00	5,00	6,00
4	8,00	6,00	3,00	8,00	8,00	8,00	6,00
5	8,00	6,00	1,00	7,00	7,00	6,00	6,00
6	7,00	2,00	1,00	7,00	7,00	7,00	7,00
7	7,00	2,00	2,00	3,00	7,00	8,00	7,00
8	,	,	,	,	,	,	,
9	,	,	,	,	,	,	,
10	3,00	3,00	4,00	7,00	8,00	8,00	5,00
11	,	,	,	,	,	,	,
12	5,00	3,00	1,00	8,00	7,00	6,00	4,00
13	8,00	2,00	5,00	2,00	7,00	6,00	5,00