

Filmes Comestíveis de Quitosana

Ação biofungicida sobre frutas fatiadas

Odílio B. G. Assis, Dr.
Embrapa Instrumentação Agropecuária
odilio@cnpdia.embrapa.br

Ariane Maria Leoni
Bióloga - Estagiária,
Embrapa Instrumentação Agropecuária
ariane@cnpdia.embrapa.br

Ilustrações: Embrapa Instrumentação Agropecuária

Introdução

Usar revestimentos e coberturas em frutas e vegetais com o objetivo de aumentar seu período de preservação não consiste em prática recente. Segundo Hardenburg (1967), emulsões derivadas de óleos minerais têm sido empregadas desde o século 13 na China, na conservação de frutos cítricos e em outros produtos que eram transportados por longas distâncias por via marítima. Na década de 1950, a cera de carnaúba foi introduzida para esse fim, mas, devido à aparência fosca resultante de sua aplicação, foram misturados com polietileno e parafina. Nos anos de 1960, ceras e vernizes processados a partir de gomas solúveis em água se tornam populares no revestimento de cítricos e frutas em geral.

As coberturas denominadas “comestíveis” como hoje conhecemos são mais recentes, e datam das décadas finais do século passado, quando os produtores tiveram seu interesse por elas aumentado devido à expansão da oferta de produtos processados. A indústria dos chamados alimentos *minimamente processados* foi inicialmente desenvolvida com o objetivo de suprir restaurantes, hotéis e instituições similares. Nas últimas décadas, contudo, em função das conveniências da vida moderna, os produtos processados experimentaram uma significativa expansão, com oferta de opções no varejo e facilidade de escolha para o consumo direto.

As mudanças nos padrões nutricionais e os benefícios creditados a uma alimentação saudável formaram a grande força impulsionadora desses produtos 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.

Em particular os seguimentos de “fresh-cut” e “ready-to-eat” são os que requerem uma tecnologia específica para a manutenção apropriada de suas qualidades nutricionais (Wiley, 1997).

De acordo com Clemente (1999), frutas e vegetais minimamente processados foram timidamente introduzidos no Brasil no início da década de 1990 em São Paulo. Estima-se hoje um crescimento na taxa de, pelo menos, 20% ao ano, tendo movimentado, em 1998, cerca de R\$ 450 milhões, só no mercado nacional de vegetais minimamente processados (Fares & Nantes, 2001).

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.

Embora atributos de qualidade sejam os objetivos principais de um revestimento, dá-se uma ênfase natural às características visuais. Como dados apresentados nos trabalhos de Ahvenainen (1996) e de Nassu et al., (2001), a principal preocupação dos consumidores está em adquirir produtos com aparência de frescos,

cor aceitável e razoavelmente livres de defeitos.

O principal papel de uma cobertura comestível, no entanto, é atuar como uma barreira à perda de umidade, controlar a respiração do fruto e evitar contaminações microbiológicas e químicas. Durante a respiração, a glicose é metabolizada em dióxido de carbono (CO_2) por meio da interação do ácido tricarbóxico, o que gera o amadurecimento e deterioração natural do fruto. A atmosfera modificada criada pelo revestimento gera um aprisionamento físico do CO_2 dentro do fruto. Se a permeação de oxigênio (O_2) para seu interior é reduzida, ocorrerá um prolongamento do tempo de maturação. Além disso, os revestimentos comestíveis têm a vantagem da biodegradabilidade que os torna "ambientalmente corretos".

Lipídios, polissacarídeos e proteínas são os produtos comumente empregados na formação das coberturas comestíveis sobre frutas, com vantagens e desvantagens específicas de cada material (Baldwin et al., 1995). Têm sido tentativas recorrentes na pesquisa de superfícies ativas a deposição de multicamadas ou de estruturas compostas e combinações destes ou adição de demais materiais.

Respiração em Frutos

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.

Quando o fruto é colhido, há uma interrupção no balanço gasoso, ocorrendo um alto influxo do oxigênio com proporcional perda do CO_2 . Nessa nova condição (alta concentração de O_2 com baixa de CO_2), as células internas não são mais reno-

vadas 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.

Revestimentos Hidrocolóides

Um dos materiais de interesse no processamento de coberturas são os hidrocolóides. Hidrocolóides são 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.

Os hidrocolóides utilizados na preparação de filmes comestíveis podem ser classificados segundo a sua composição, massa molecular e solubilidade. De acordo com Donhwe e Fennema (1994), os filmes hidrocoloidais mais utilizados são os glucídicos e os protéicos. Os glucídicos mais utilizados são os derivados de celulose, os alginatos, as pectinas, a goma-arábica e o amido ou amido modificado. A proteína de soja, o glúten, a zeína e o soro de leite são algumas das proteínas frequentemente utilizadas na preparação de revestimentos comestíveis.

Polissacarídeos 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).

A quitosana

A quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, atrás apenas da celulose. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) e apresenta uma cadeia polimérica quimicamente similar à da celulose, conforme expressa na Figura 1. Devido a suas características atóxicas e de fácil formação de géis, a quitosana tem sido considerada há décadas como um composto de interesse industrial e especialmente de uso farmacêutico (Campana-Filho & Desbrières, 2000). Recentemente, contudo, uma série de estudos tem sido publicada caracterizando o uso da quitosana como cobertura de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados (Shahidi et al., 1999; Coma et al., 2002). Esses trabalhos enfocam, essencialmente, as propriedades antifúngicas e antibacterianas da quitosana, conforme demonstrado por No et al., (2002), indicando por conseguinte o seu uso potencial sobre superfícies cortadas ou sobre frutos com alta taxa de maturação pós-colheita. 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.

As diferentes características do produto comercial tornam-se um dos aspectos que têm dificultado seu pleno uso na indústria alimentícia. 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 desa-

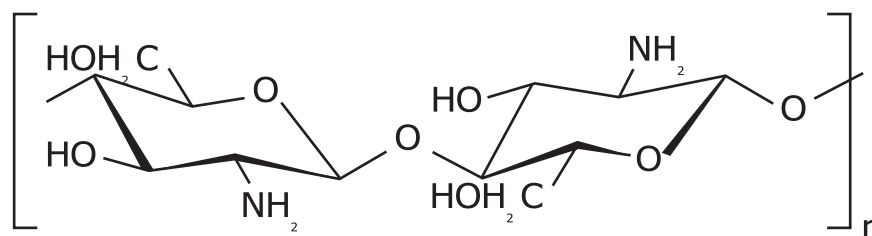


Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização.

cetilação, 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 & Alves, 2002). 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 N-carboximetilquitosana, podem gerar produtos solúveis em pH neutro. De um modo geral, contudo, a quitosana tem sido internacionalmente aceita como material promissor para revestimento de frutas e de alimentos diversos.

Metodologia para Formação de Géis e Revestimento

A quitosana empregada nesta avaliação foi obtida em farmácias de manipulação, sendo, segundo informação inscrita, procedente da purificação de quitinas extraídas de cascas de camarão. Esse material apresenta aspecto granular, ligeiramente amarelado e pode ser classificado como de média massa molar (Signini & Campana-Filho, 1998).

Os géis foram preparados por dissolução sob agitação moderada em ácido acético 0,5 M até equilíbrio em pH próximo a 3. Estudos preliminares indicaram que os melhores resultados na formação de filmes são conseguidos com soluções com concentrações de quitosana próximos a 20 g/L (Assis & Pessoa, 2003). São necessários períodos superiores a 12 horas de agitação para obter uma total homogeneização da solução. Para simplificar o processo, todo o procedimento foi realizado sob temperatura ambiente.

Frutos comerciais de maçãs da cv. Gala, foram seccionadas ao meio, dois procedimentos de revestimento adotados: i) as amostras foram imersas com a ajuda de um suporte metálico na solução filmogênica e ii) as amostras foram revestidas por nebulização, com

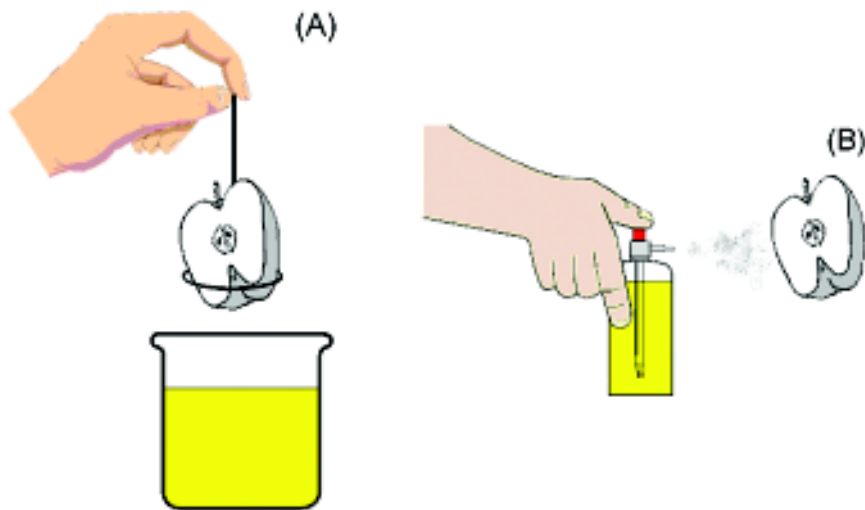


Figura 2 – Procedimentos de revestimento adotados.

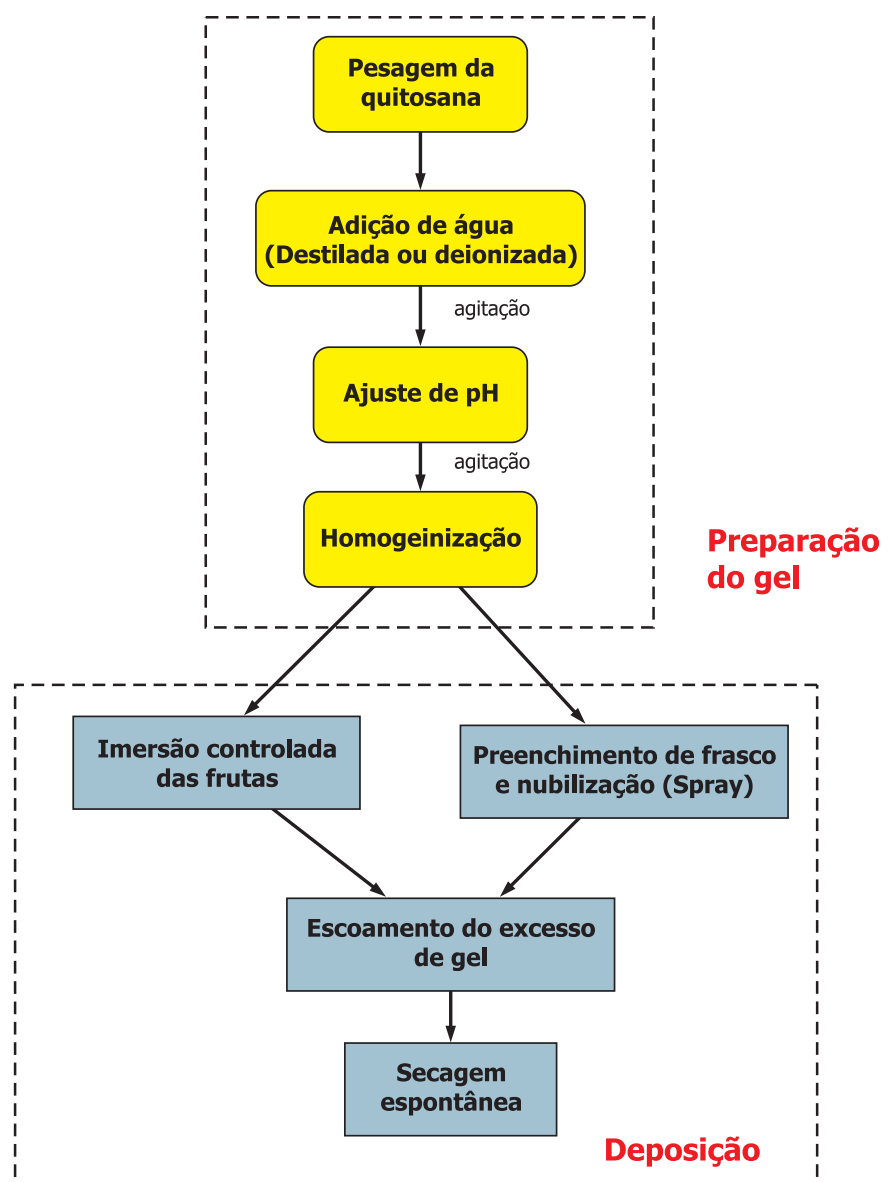


Figura 3. Seqüência empregada para processamento de gel e depósito.

sistema de pressão manual (spray). A consecução de uma nebulização perfeita e a de forma manual são dependentes, evidentemente, da viscosidade da solução empregada.

Após o escoamento do excesso de gel, foram deixadas secar em condição ambiente. A cura (polimerização) do filme dá-se espontaneamente como consequência da evaporação do solvente. A Figura 2 ilustra os procedimentos adotados, cuja seqüência está esquematizada na Figura 3.

Como resultado da aplicação, é observada uma ligeira mudança na coloração da superfície cortada, em ambos os processos, com tendência a um tom tirante a amarelo ou a verde suave. Após a secagem, os filmes

resultantes apresentam boa aderência, sendo totalmente transparentes.

As maçãs naturalmente apresentam um escurecimento superficial sob as faces cortadas, em função da ação enzimática da polifenoloxidase (PPO), em diferentes intensidades, como medido por Sapers e Douglas em 1987. Contudo, em meio ácido, que é necessário para que a quitosana se dissolva em condição não-alterada, essa reação é potencializada. No entanto, foi observado que o tempo de imersão das amostras (de 3 a 8 segundos) aparentemente não afeta a coloração final resultante. A extensão dos danos provocados pela ação ácida pode ser, em princípio, atenuada pelo uso de agentes alcalinos

que, misturados ao gel, ajustam o pH em níveis menos agressivos ou que, por alterações estruturais prévias da quitosana, que a torna solúvel em pHs mais alcalinos. Um revestimento polimérico ideal para uso em alimentos, evidentemente deve ser completamente inerte, com ausência de impacto sobre a polpa ou introdução e alteração de cores na casca ou nas demais partes do fruto.

Têm sido conduzidas análises detalhadas dos filmes, tanto por microscopia eletrônica de varredura (MEV) como por microscopia de força atômica (AFM), (Assis, et al., 1999; Assis, et al, 2002) indicando estruturas descontínuas, que caracterizam certa porosidade residual no filme formado, conforme imagens típicas apresentadas na Figura 4, obtidas por AFM (sistema TopoMetrix Discover - imagens geradas por programa SPIP 2.1 - Scanning Probe Image Processor). Os filmes apresentam espessuras variáveis, dependente da posição no fruto, mas de uma forma geral, são extremamente finos, não superiores a 1,5 μm . Como citado, coberturas totalmente densas e impermeáveis são indesejáveis para coberturas de frutos, pois é necessário que haja nos revestimentos a manutenção de uma respiração mínima.

A literatura tem mostrado que polímeros hidrofílicos, especialmente os altamente polares como a quitosana, podem, em função da umidade relativa do ar, mudar significativamente sua permeabilidade a gases. Resultados apresentados por McHugh & Krochta, em 1994, mostraram que, para uma porosidade específica, a permeação é sensivelmente reduzida com o abaixamento da concentração de água adsorvida pela película. Na realidade, a permeabilidade do filme pode ser alterada devido, não somente à umidade ambiental, mas, principalmente, pela incorporação de elementos aquosos celulares oriundos da polpa da fruta (Baldwin et al, 1996).

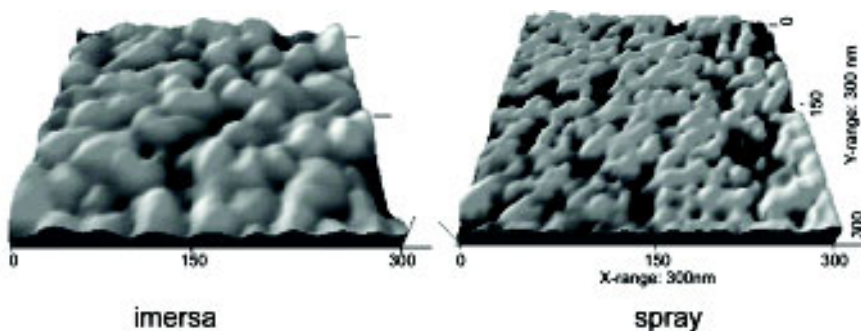


Figura 4. Imagens típicas de filmes de quitosana, obtido por microscopia de força atômica. O aspecto microscópico dos filmes formados indica estrutura descontínua com porosidade residual, mais acentuada para os revestimentos obtidos por nebulização.

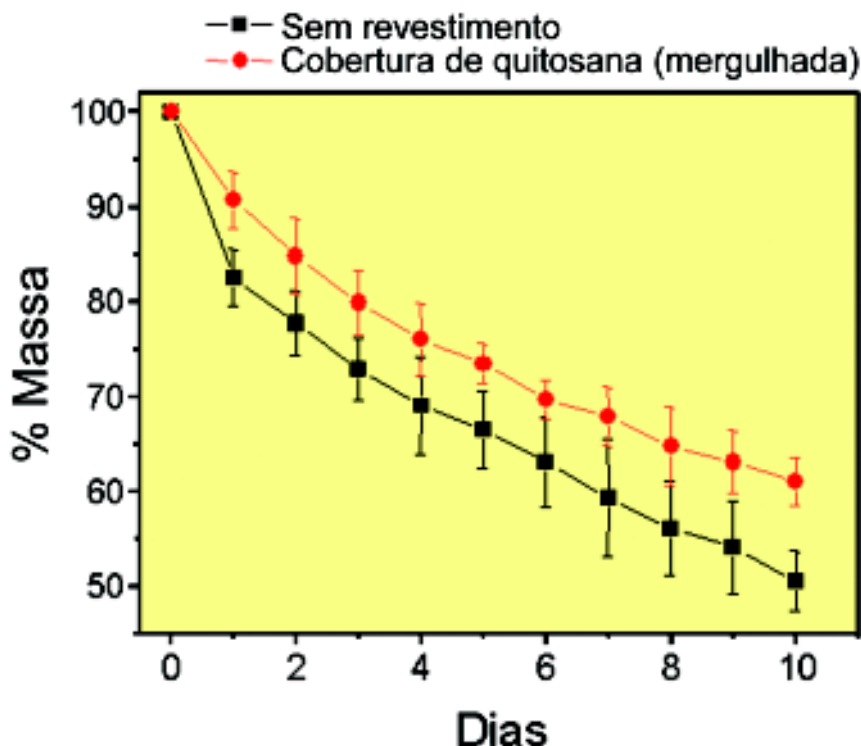


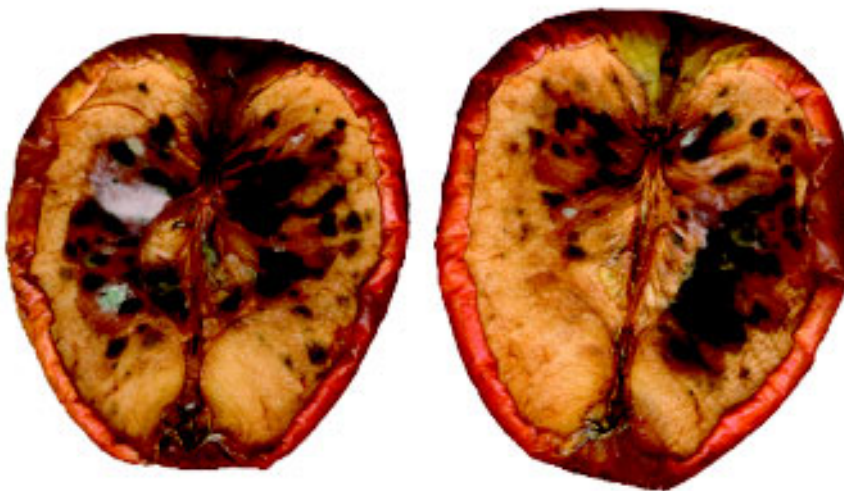
Figura 5. Perda relativa de massa em função do tempo de armazenamento em condições não controladas. Amostras fatiadas e revestidas por imersão.

Características Protetoras

Com respeito à ação protetora dos revestimentos de quitosana, é observada pouca diferença como re-



Com cobertura de quitosana



Sem cobertura

Figura 6. Aspecto genérico das faces cortadas (revestidas e não-revestidas) após o oitavo dia de armazenamento.

sultado dos processos de deposição. A Figura 5 apresenta a perda de massa relativa, obtidas em amostras cobertas por imersão, para 10 dias de armazenamento em condições não controladas (temperaturas entre 25°C -30°C em ambiente com iluminação natural). Ao final desse período, temos uma preservação média de massa superior a 10% para as amostras recobertas. Os dados referem-se a medidas realizadas diariamente para valores estimados pela média de 8 amostras.

Worrell et al., (2002) demonstram que uma das principais características de um filme protetor na redução de perda de massa é o estabelecimento de uma boa diferença nos valores de pressão de vapor entre o fruto e sua vizinhança. Apesar da quitosana ser um material hidrofílico com significativa taxa de absorção de água (Assis & Silva, 2003) o efeito redutor da perda de massa é efetivo e claramente observado. Resultados similares foram coletados para as amostras revestidas por spray.

O caráter antifúngico da quitosana foi avaliado qualitativamente através do acompanhamento fotográfico de colônias espontaneamente crescidas sobre as superfícies cortadas. Embora não tenha sido realizado um acompanhamento rigoroso das culturas e das espécies de fungos, de modo geral, os filmes apresentaram boa ação antifúngica. Fica visualmente clara essa ação na comparação das maçãs revestidas com as não-revestidas. Faces não recobertas apresentam proliferação de fungos a partir do quinto dia, com progressão significativa nos períodos seguintes. A Figura 6 apresenta exemplo da aparência das faces após o oitavo dia de estocagem.

O efeito fungicida da quitosana é atribuído à ação de enzimas quitonolíticas, como a quitinase, que degradam as paredes celulares dos fungos e provocam a extração de agentes antimicrobianos como a fitoalexina e a pisatina (Hirano & Nagao, 1989, Coma et al., 2002). A quitinase pertence a uma família de proteínas denominada proteínas relacionadas com a patogênese (conhecidas como proteínas de defesa) ou proteínas PR (Pathogenesis Related proteins). Essas proteínas formam um grupo estrutural e funcionalmente heterogêneo que são capazes de inibir o crescimento da hifa.

Essas atividades antifúngicas são frequentemente influenciadas pelo pH local. Estudos conduzidos por Sudarshan e colaboradores (1992) indicaram que a interação entre quitosana positivamente carregada (o que ocorre em meio ácido) e resíduos ou superfícies microbianas negativamente carregadas são fundamentais para uma efetiva ação inibitória do crescimento de microorganismos. Feng et al., 1994, também mostraram que a atividade microbiana da quitosana aumenta com o percentual de desacetilação, que, normalmente, se encontra entre 65% a 85%. Jung, et al., (1999) resumem as atividades antimicrobianas da quitosana em dois principais mecanismos: i) A natureza catiônica da quitosana, que

favorece ligações com o ácido siálico nos fosfolípidios, e conseqüentemente, restringe o movimento de substâncias microbiológicas; e ii) A penetração através da parede celular que impede a transformação do DNA em RNA. Ou seja, a atividade antimicrobiana se dá por interação dos grupos amino livres da cadeia polimérica da quitosana.

O uso de substâncias polissacarídeas abundantes e bioativas como a quitosana, que, além de atóxicas, reduzem a maturação e atuam ou induzem defesas a microorganismos, são potencialmente interessantes para aplicações em biotecnologia e merecem ser mais bem avaliadas como potencial material para revestimentos comestíveis de uso genérico.

Referências

- ASSIS, O.B.G., ALVES, H.C. (2002) Metodologia Mínima Para a Produção de Filmes comestíveis de quitosanas e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas. Comunicado Técnico – Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP., 5p.
- ASSIS, O.B.G., PESSOA, J.D.C. (2003) Chitosan thin-film preparation for use as edible and fungi growth inhibitor coating on sliced fruits. Submetido ao Brazilian J. of Food Tech.
- ASSIS O B. G., SILVA, V. L. (2003) Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecn.*, **13**[4] p.223-228.
- ASSIS O. B. G., VIEIRA, D. C., BERNARDES-FILHO R., CAMPANA-FILHO, S. P. (2002) AFM characterization of chitosan self-assembled films. *Intern. J. Polymer Mat.*, **51**[7] p. 633-638.
- ASSIS, O. B. G., VIEIRA, D.C., BERNARDES-FILHO, R. (1999) Surface Evaluation of Self-Assembled Multilayered Organic Films by AFM. *SCANNING - J. Scanning Microscopy*, **21**[2] p. 71-72.
- BALDWIN, E.A., NISPEROS-CARRIEDO, M.O., (1995) Baker, R.A. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, **30**[1] p 35-38
- BALDWIN, E. A., NISPEROS, M. O., CHEN, X.; HAGENMAIER, R. D. (1996) Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Tech.*, **9** p. 151-163.
- CAMPANA-FILHO, S. P., DESBRIÈRES, J. (2000) Chitin, chitosan and derivatives. in *Natural polymers and agrofibers composites*. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária,. p. 41-71.
- CLEMENTE, E.S. (1999) O Mercado de vegetais minimamente processados. Seminário sobre hortaliças minimamente processadas. ESALQ-USP, Piracicaba, SP.
- COMA, V., MARTIAL-GROS, A., GARREAU, S.; COPINET, A., SALIN, F., DESCHAMPS, A. (2002) Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *J. Food Sci.*, **67** [3], p. 1162-1169.
- DONHWE, G., FENNEMA, O. (1994) Edible Filmes and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions and Testing Methods, in *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, (Krochta et al., eds), Technomic Publ. Co., Lancaster, PA, p.1-24.
- FARES, C.B., NANTES, J.F.D. (2001) Transações comerciais entre a indústria de vegetais minimamente processados e o setor varejista. In IV Congresso Internacional de Economia e Gestão de Redes Agroalimentares.
- FENG, S.W., LI, C.F., SHIH, D.Y.C. (1994) Antifungal activity of Chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *J. of Food Prot.*, **61** p.136-140.
- HARDENBURG, R.E. (1967) Wax and related coatings for horticultural products. A bibliography. *Agr. Res. Bulletin* 51-15. US. Dept of Agriculture. Washington, DC.
- HIRANO, D., NAGAO, N. (1989) Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agr. Biol. and Chem.*, **53** p. 3065-3071.
- JUNG, B.O., KIM, C.O., CHOI, K.K., LEE, Y.M., KIM, J.J. (1999) Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *J. Appl. Polym. Sci.*, **72**p. 1713-1719.
- MCHUGH, T. H., KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films. In: *Edible coatings and films to improve food quality*. (Kochta, J.M. et al. Eds.). Lancaster: Technomic Publishing, 1994. p. 139-187.
- NASSU, R. T., LIMA, J. R., SOUZA-FILHO, M.S.M. (2001) Consumer's acceptance of fresh and combined methods processed melon, mango and cashew apple. *Revista Bras. de Fruticultura*. **23**[3] p. 551-554.
- NO, H. K., PARJ, N. Y., LEE, S. H., MEYERS, S.P. (2002) Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *Intern. J. Food Microbiology*, **74** p. 65-72.
- SAPERS, G.M., DOUGLAS, F.W. (1987) Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. *J. Food Sci.*, **52** p.1258-1262.
- SHAHIDI, F., ARACHCHI, J. K. V., JEON, Y.J. (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Sci. Tech.*, **10** p. 37-51.
- SIGNINI, R., CAMPANA-FILHO, S.P. (1998) Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Polímeros: Ciência e Tecn.*, **8** [4] p. 63-68.
- SUDHARSHAN, N.R., HOOVER, D.G., KNORR, D. (1992) Antibacterial action of chitosan. *Food Biotech.*, **6** p.257-272.
- WILEY, R.C. (1997) Métodos de conservación de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. In: *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. (Wiley, R. C. Ed.). Zaragoza: Editorial Acibia, p.65-129.
- WORRELL, D.B., CARRINGTON, C.M.S., HUBER, D.J. (2002) The use of low temperature and coating to maintain storage quality of breadfruit, *Artocarpus altilis* (Parks.) Fosb. *Postharvest Biology and Techn.*, **25** p. 33-40. 