



*Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para  
produtos de IV gama*

**Ana Luísa de Sousa Augusto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos  
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Susana Filipa  
Jesus Silva e co-orientação do Doutor Rui Pedrosa

2013

Título: Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para produtos de IV gama

Copyright © Ana Luísa de Sousa Augusto

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar- Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2013

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Agradeço:

À Professora Doutora Susana Silva pelo tempo, sabedoria, competência e paciência que generosamente dedicou a esta tese transmitindo-me todos ensinamentos necessários para a concretização deste meu trabalho. Acima de tudo, obrigada pelo voto de confiança e oportunidade dada.

Ao Professor Doutor Rui Pedrosa pela sua inteira disponibilidade de recursos e pela orientação sábia e notória em pontos fulcrais na presente tese. Obrigada também pelo voto de confiança.

À Professora Doutora Maria Jorge Campos pela sua inteira disponibilidade em prestar a sua ajuda na execução deste meu trabalho.

À Professora Doutora Susana Mendes pela sua ajuda estatisticamente significativa neste trabalho.

À minha família, por me fazerem sentir orgulhosa do meu trabalho, por me apoiarem incondicionalmente, apesar da distância sei que estiveram sempre presentes.

Aos meus amigos que de todas as maneiras sempre me apoiaram, não vou descrever nomes, eles sabem quem são.

Ao Tiago, que me apoiou incondicionalmente, mesmo em alturas difíceis, alturas de ansiedade mas que sempre insistiu para que olhasse em frente e acreditasse na luz ao fundo do túnel. É muito mais fácil trabalhar e estar, contigo por perto. Obrigada.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação e na concretização deste trabalho, e que me estimularam intelectual e emocionalmente.



## RESUMO





## Resumo

O sector dos produtos hortofrutícolas prontos a consumir está em constante crescimento devido a uma procura emergente dos consumidores por produtos inovadores. Novas técnicas para manter a qualidade dos produtos minimamente processados (PMP) ou de IV gama são exigidas em todas as etapas da cadeia de produção e distribuição de PMP.

A maçã minimamente processada caracteriza-se por apresentar um elevado nível de escurecimento enzimático e alterações de textura ao longo do tempo de armazenamento. Dada a importância da produção de maçã minimamente processada com qualidade e com um tempo de prateleira de maior duração, o presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um revestimento alimentar de origem biológica para aplicação em maçãs de IV gama.

Para o efeito foram utilizados quatro revestimentos formulados com adição de extratos de algas (0,5%; *Fusucs spiralis*, *Bifurcaria bifurcata*, *Codium tomentosum* e *Codium vermilara*), um revestimento com adição de ácido cítrico (0,5%) e um controlo (água destilada). Os revestimentos foram aplicados por imersão, utilizando maçã Fuji minimamente processada (fatiada). Ao longo de 20 dias de armazenamento a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  foram efetuadas várias análises físicas e químicas às maçãs para poder avaliar o efeito dos revestimentos na manutenção da qualidade do produto.

O revestimento que apresentou melhores resultados revelou ser a formulação com extrato da alga *Codium tomentosum*. A aplicação deste revestimento permitiu menores alterações das características físicas e químicas das fatias de maçã, principalmente na manutenção da cor, impedindo um índice de escurecimento significativo.

O extrato da alga *Codium tomentosum* foi depois incorporado em dois filmes edíveis, um com 1% de alginato e outro com 1% de quitosano, aos quais foram testadas características físicas e antibacterianas. Os filmes formulados por quitosano e extrato de alga foram os que apresentaram melhores características físicas, nomeadamente maior resistência à perfuração, elevada elasticidade e ainda baixa absorção de água.

A aplicação futura de filmes e/ou revestimentos de quitosano e extrato de alga em PMP poderá assim apresentar-se como uma alternativa vantajosa para a conservação deste tipo de produtos.

**Palavras-chave:** produtos minimamente processados; maçã; revestimento comestível; filme edível; algas edíveis alginato; quitosano.



## **ABSTRACT**

---



## Abstract

Minimally processed products are one of the major growing segments due to an emerging demand of consumers for innovative food products. New techniques to maintain the quality of minimally processed products (MP) are required at all stages of the production chain and distribution of MP.

Fresh cut apples are characterized by having a high level of enzymatic browning and texture changes during the storage time. All of this agrees with the view of the use of minimally processed apple production both with high quality and high shelf life periods. The, main objective of the present work was the development of a coating food source for biological application in minimally processed apples.

For this purpose it was used four coatings formulated with seaweed extracts (0,5% *Fucus spiralis*, *Bifurcaria bifurcata*, *Codium tomentosum* and *Codium vermilara*), one coating with citric acid (0,5%) and control (distilled water). The coatings were applied by dipping using MP Fuji apples (slices). Over 20 days of storage at  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  were carried out several physical and chemical analyses to assess the effect of the coatings in maintaining product quality.

The coating that showed better results was formulated with *Codium tomentosum* seaweed extract. The application of this coating allowed minor changes in physical and chemical apple slices, especially in color maintaining, blunt a significantly brown index of samples.

The seaweed *Codium tomentosum* extract was then incorporated in two edible films, one with alginate 1% and another with chitosan 1%. Their physical characteristics and antibacterial properties were tested

The films made with chitosan and seaweed extract presented better physical characteristics, especially greater puncture resistance, high elasticity and lower water absorption.

The future application of films and/or coatings of chitosan with algae extract in minimally processed products can be an attractive alternative for the conservation of this type of products.

**Key words:** minimally processed products, apple, edible coating, edible film, edible seaweeds, alginate, chitosan.



## ÍNDICE GERAL

---

---



# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	IX
ÍNDICE GERAL	XII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Enquadramento .....	3
1.2. Objetivos .....	4
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
2.1. Maçã .....	7
2.2. Produtos Minimamente Processados .....	9
2.2.1. Principais mecanismos de perda de qualidade dos PMP durante o armazenamento .....	12
2.2.1.1. Síntese de etileno .....	12
2.2.1.2. Taxas de respiração .....	13
2.2.1.3. Escurecimento enzimático .....	13
2.2.1.4. Alterações químicas .....	16
2.2.1.5. Alterações de textura .....	16
2.2.1.6. Microbiologia .....	17
2.2.1.7. Alterações nutricionais .....	17
2.2.1.8. Alterações sensoriais .....	18
2.2.2. Processos de preparação de hortofrutícolas minimamente processados .....	18
2.2.2.1. Temperatura .....	19
2.2.2.2. Embalagem em atmosfera modificada .....	20
2.2.2.3. Filmes/Revestimentos edíveis .....	21
2.2.3. Revestimentos e filmes edíveis baseados em polissacarídeos ...	24
2.2.3.1. Alginato .....	24
2.2.3.2. Quitosano .....	25
2.2.4. Algas comestíveis .....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. Recolha e tratamento de algas .....	31
3.2. Obtenção do extrato etanólico das algas .....	31
3.3. Formulação de soluções de revestimento de extrato de algas: Preparação .....	32

3.3.1. Quantificação de polifenóis totais (QTP) .....	32
3.3.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH .....	32
3.3.3. Quantificação de azoto total (Proteína) .....	33
3.3.4. Avaliação da cor das soluções de extratos .....	34
3.3.5. Avaliação do pH das soluções de extratos .....	34
3.3.6. Avaliação da capacidade de inibição da atividade enzimática das soluções de revestimento .....	34
3.4. Avaliação da eficácia dos extratos como revestimentos alimentares em maçãs de IV gama .....	35
3.4.1. Preparação da matéria-prima e aplicação do revestimento .....	35
3.4.2. Alterações de cor em maçãs processadas e homogeneizado de maçã .....	37
3.4.3. Alterações de características físico-químicas de maçãs processadas .....	38
3.4.3.1. Determinação da percentagem de peso perdido .....	38
3.4.3.2. Determinação do teor de humidade .....	38
3.4.3.3. Determinação do teor de sólidos solúveis .....	38
3.4.3.4. Avaliação do pH .....	38
3.4.3.5. Avaliação da firmeza e atributo crocante .....	39
3.4.3.6. Avaliação da cor .....	39
3.4.3.7. Avaliação da atividade enzimática das enzimas polifenol oxidase e polifenol peroxidase .....	39
3.5. Caracterização de Filmes Comestíveis .....	40
3.5.1. Preparação de filmes de alginato e quitosano enriquecidos com extrato etanólico de <i>Codium tomentosum</i> .....	40
3.5.2. Avaliação das propriedades físicas dos filmes .....	41
3.5.2.1. Solubilidade dos filmes .....	41
3.5.2.2. Espessura dos filmes .....	42
3.5.2.3. Absorção de luz e transparência dos filmes .....	42
3.5.2.4. Propriedades mecânicas: testes de tensão/perfuração e de ruptura dos filmes .....	42
3.5.2.5. Permeabilidade ao vapor de água (WVP) .....	43
3.5.2.6. Isotérmicas de sorção de humidade dos filmes .....	44
3.5.2.7. Microbiologia: Difusão em disco .....	45
3.6. Tratamento estatístico .....	45
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>

4.1.	Caracterização das soluções de revestimento com extratos de algas .....	49
4.2.	Avaliação do efeito das soluções de revestimento em maçã fatiada e homogeneizado de maçã à temperatura ambiente .....	51
4.3.	Avaliação do efeito da introdução dos extratos de origem marinha na formulação de revestimentos em maçã de IV gama ..	54
4.3.1.	Alterações físico-químicas de maçãs revestidas com soluções de revestimento .....	55
4.3.2.	Alterações de textura: Firmeza .....	57
4.3.3.	Avaliação da cor .....	58
4.3.4.	Atividade enzimática .....	61
4.3.4.1	Atividade enzimática da polifenol oxidase .....	61
4.3.4.2.	Atividade enzimática da peroxidase .....	62
4.4.	Avaliação de propriedades físicas dos filmes de alginato e quitosano enriquecidos com extrato de alga Q1 .....	64
4.4.1.	Solubilidade dos filmes .....	64
4.4.2.	Espessura e transparência dos filmes .....	65
4.4.3.	Características mecânicas dos filmes .....	67
4.4.4.	Permeabilidade ao vapor de água .....	69
4.4.5.	Isotérmicas de sorção de água dos filmes .....	71
4.4.6.	Capacidade antimicrobiana dos filmes .....	73
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>



## **1. INTRODUÇÃO**

---

---



# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento

A proteção conferida ao organismo humano pelo consumo de fruta e hortícolas tem sido evidenciada pela comunidade científica devido à elevada riqueza nutricional e protetora que estes alimentos apresentam. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de 400 g de fruta e vegetais por dia (Ahern et al., 2013). Os hortofrutícolas são componentes importantes de uma alimentação saudável pois possuem baixa densidade energética e são fonte de micronutrientes, fibras e outros componentes com propriedades funcionais. Graças a todos os seus componentes são produtos muito procurados e consumidos (Rico et al., 2007). Apesar dos muitos esforços investidos por parte dos governos da União Europeia (UE) na promoção do consumo deste tipo de alimentos, ainda é visível um consumo abaixo do recomendado, principalmente nas faixas etárias mais baixas, podendo trazer consequências para a saúde futura das crianças europeias (Ahern et al., 2013). Ahern e colaboradores (2013) sugerem que é necessário aumentar o gosto das crianças pelas frutas e vegetais, aumentando o seu consumo e implementando hábitos de consumo saudáveis que perdurem até à idade adulta.

Para além do consumo de hortofrutícolas aquém do recomendado, existem alguns entraves na disponibilização deste tipo de produtos, nomeadamente no que se refere a perdas de biomassa. Durante a colheita, preparação e consumo estima-se que haja uma perda entre 25 a 80% dos produtos devido à putrefação. Este facto resulta assim num enorme desperdício económico em países desenvolvidos e em países tropicais assume proporções devastadoras (Wills et al., 1981). A maçã Fuji (*Malus domestica* Borkh) é um exemplo de um fruto largamente comercializado. Tratando-se de um fruto bastante sensível à foto-degradação e muitas vezes sujeito a macerações que aceleram o seu apodrecimento. Têm vindo a ser desenvolvidas técnicas que permitem manter uma maior qualidade do fruto até ao seu consumo (Feliciano et al., 2010; Iglesias et al., 2012).

Nas últimas décadas têm vindo a ser desenvolvidas novas técnicas que permitem a extensão do tempo de prateleira de produtos hortofrutícolas frescos sem comprometer as suas características organolépticas e nutricionais. Por outro lado, o desenvolvimento de estratégias para a apresentação de produtos fáceis de consumir, que apelam a um maior consumo, é também uma das áreas que tem sido estudada. O desenvolvimento destas técnicas baseia-se, fundamentalmente, num melhor conhecimento do processo respiratório dos frutos e, principalmente, no armazenamento destes em atmosferas

controladas. O recurso à embalagem em atmosfera modificada é utilizado em conjunção com outras barreiras tecnológicas à degradação física, química e microbiológica destes produtos. A aplicação de revestimentos comestíveis é uma das tecnologias mais eficazes e com uma razão custo/benefício mais vantajosa para o produtor (Park 2000; Bourtoom 2008).

## **1.2. Objetivos**

A maçã minimamente processada é um produto que se degrada com facilidade, daí a necessidade de desenvolvimento de técnicas que permitam manter a qualidade do fruto após o seu processamento até ao consumidor final. A aplicação de revestimentos e/ou filmes edíveis é uma alternativa muito utilizada e que permite manter os padrões de qualidade organoléptica exigidos.

O objetivo principal do presente trabalho consistiu no desenvolvimento de um revestimento alimentar de origem biológica marinha para aplicação em maçãs de IV gama.

Para a concretização do objetivo foram estabelecidas e seguidas as seguintes tarefas:

- Seleção de algas da costa de Peniche com potencial aplicação na formulação de revestimentos comestíveis.
- Extração etanólica dos compostos de interesse.
- Caracterização química dos extratos.
- Aplicação dos extratos em maçã Fuji de IV gama e avaliação da sua qualidade durante 20 dias de armazenamento.
- Incorporação de um extrato selecionado numa matriz polimérica e avaliação de parâmetros físicos e microbiológicos dos filmes formulados.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

---



## 2.1. MAÇÃ

A maçã é o fruto da macieira (nome comum), possui uma pele fina e impermeável, sabor agridoce a ácido e uma polpa homogénea. É um fruto rico em água (aproximadamente 85% em massa), e sofre grandes transformações bioquímicas durante o seu amadurecimento (Sacilik e Elicin, 2006). As maçãs são um dos frutos mais consumidos por todo o mundo. Estima-se que existam entre 5 a 20 mil variedades de maçã das quais três a quatro mil são cultivadas, em maior ou menor escala, em diferentes partes do mundo. As maçãs são um dos frutos mais populares nas zonas climáticas temperadas. Em Inglaterra a maçã assumiu uma tal relevância no hábito alimentar que originou uma expressão bastante utilizada no século XIX que refere a sua importância: “An apple a day keeps the doctor away”<sup>1</sup> (Konopacka et al., 2010). Este fruto apresenta uma composição bastante equilibrada, é moderadamente energético, principalmente no que respeita à quantidade de calorias, apresentando um sabor agradável proporcionado por um equilíbrio entre o teor de açúcar e a acidez (Feliciano et al., 2010). De acordo com a FAOSTAT, em 2009, foram consumidos uma média de 28,1 kg de maçã *per capita* em Portugal (Faostat, 2009), mostrando a sua importância na dieta Portuguesa (Feliciano et al., 2010).

As principais características físicas que diferenciam a maçã dos restantes frutos são a sua forma globulosa ou deprimida, com uma pequena depressão no ponto de inserção do pedúnculo que o prende aos ramos, a sua coloração pode variar entre o verde, amarelo e o vermelho. Apresenta textura firme, elevada acidez que varia durante os vários estágios de maturação e uma cor branca-amarelada da polpa (Córdova, 2006). Segundo o Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge (INSA), a maçã é um fruto com 80% de parte edível e a porção unitária recomendada por dia são 160 g. Segundo o mesmo, o principal fator energético são os hidratos de carbono (89%) (tabela 1.). O facto de possuir um alto teor de potássio e elevadas quantidades de fibras, faz da maçã uma fruta associada à prevenção de doenças cardíacas, redução dos níveis de colesterol no sangue, e para dietas alimentares de emagrecimento, pois devido à sua textura e teor em fibra provoca uma sensação de saciedade (“Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge,” 2010.; Córdova, 2006).

---

<sup>1</sup> “Uma maçã por dia mantém o médico longe”.

**Tabela 1.** Distribuição energética (%) na maçã. (Fonte: Instituto Nacional Ricardo Jorge, 2010)

Álcool	0 % *
Total de Hidratos de Carbono	89 % *
Gordura Total	8 % *
Proteína	1 % *
Ácidos orgânicos	1 % *

\* por porção edível de maçã

Entre os açúcares presentes na maçã encontram-se a frutose, a sacarose e a glicose. Hemiceluloses, celulose e substâncias pectínicas fazem parte da fração fibrosa dos hidratos de carbono que contribuem para a capacidade de retenção de água dos produtos da maçã. Os teores de proteína da maçã são baixos (1%), sendo a maior parte enzimas envolvidas no metabolismo dos frutos durante o desenvolvimento, maturação e pós-colheita. Quanto aos ácidos orgânicos, predomina o ácido málico, seguido pelo ácido cítrico e outros ácidos, presentes em quantidades pouco significativas. O ácido málico, juntamente com os açúcares, ésteres e aldeídos são os principais responsáveis pelo aroma e sabor característico da maçã (Córdova, 2006).

Uma das cultivares que tem vindo a demonstrar elevado interesse por parte de agricultores e consumidores é a variedade Fuji. A elevada popularidade mundial desta variedade é devida às suas qualidades distintivas: sabor (suave), textura (crocante e sumarenta), cor (vermelha) (figura 1), odor (frutado) e uma excelente qualidade quando devidamente armazenada, proporcionando ao consumidor uma experiência sensorial bastante agradável (Varela et al., 2005; Iglesias et al., 2012; Kevany et al.). O calibre desta variedade obedece às normas vigentes nos países da UE (Regulamento (CE) nº 85/2004; Faostat, 2009).



**Figura 1.** Imagem representativa maçãs cultivar Fuji (a) maçã antes da colheita (b) e maçã fatiada pronta a consumir (c) Fonte: “triPortugal.pt” e Campotec®

Uma vez que o consumo de maçã apresenta bastantes benefícios para a saúde é importante manter a qualidade da fruta de maneira a satisfazer todos os padrões de

qualidade exigidos pelos consumidores. Em virtude do processo de globalização e das alterações no estilo de vida dos consumidores, têm surgido novas necessidades ao nível das características dos produtos hortofrutícolas. O melhoramento de tecnologias, tanto de produção quanto de armazenamento e as facilidades de transporte possibilitaram o atendimento à procura de produtos industrializados. A preferência dos consumidores por produtos prontos a consumir ou de muito fácil preparação favoreceu a comercialização de frutas já lavadas, descascadas e fatiadas, denominados de produtos de IV gama ou produtos minimamente processados (PMP) (Buckley et al., 2007). Um exemplo do aproveitamento de todos os benefícios da maçã é a comercialização de maçã fatiada e embalada, pronta a consumir, realizada pela empresa Campotec S.A., através da marca Maçã de Alcobaça (figura 1). Para que a comercialização deste tipo de produtos seja possível é necessário o desenvolvimento e aplicação de um conjunto de tecnologias que mantenham todas as suas características estáveis desde a colheita até ao consumidor final.

## **2.2. PRODUTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS**

O estilo de vida das sociedades ocidentais urbanas dos dias de hoje é muito diferente do que era há 20 ou mesmo 10 anos atrás, havendo uma procura crescente do consumidor por produtos prontos a consumir. O desenvolvimento de novas tecnologias, evolução das estruturas domésticas, sociedades multiculturais, bem como mudança de normas e valores sociais resultaram num aumento do nível de vida das populações e numa maior consciencialização dos consumidores relativamente ao valor nutricional dos alimentos. Com todos estes fatores, a exigência dos consumidores aumentou, levando à necessidade de adaptação da indústria alimentar na disponibilização de novos produtos saudáveis e de elevada conveniência (Buckley et al., 2007). Os consumidores atuais preferem alimentos que preservem o seu valor nutricional, e essencialmente a cor natural, uma textura e sabor de elevada qualidade e o mais semelhante ao produto fresco, tendo preferência pela reduzida adição de aditivos sintéticos ou pela sua substituição por ingredientes naturais com propriedades semelhantes (Ohlsson, 2003; Rico et al., 2007).

Estas alterações nos requisitos de qualidade dos produtos alimentares criam a oportunidade de desenvolvimento de novos produtos alimentares que proporcionem uma dieta equilibrada e ao mesmo tempo prática, com benefícios para a saúde. Neste contexto, procuram-se desenvolver produtos inovadores que cumpram requisitos legais e elevados padrões de qualidade. Como resposta a estes novos requisitos dos consumidores foram lançados na década de 90 no mercado os **Produtos Minimamente**

Processados (PMP), também denominados por produtos de IV gama (Buckley et al., 2007; Rico et al., 2007). A designação de IV gama é de origem francesa e prende-se com o facto deste tipo de produtos resultarem de uma determinada fase do desenvolvimento do mercado por produtos agro-industriais e não com o grau de transformação das matérias-primas (Schlimme e Rooney, 1994). Os produtos minimamente processados são uma tentativa de combinar frescura com utilidade ao ponto de embalar e comercializar frutas, vegetais ou outros produtos tradicionalmente frescos como produtos minimamente transformados. No mercado nacional encontram-se hoje em dia diversos produtos de IV Gama tais como: cenoura ripada, às rodela ou em cubos, alface lavada e ripada, maçã fatiada e misturas para saladas e sopas (Santos et al., 2012).

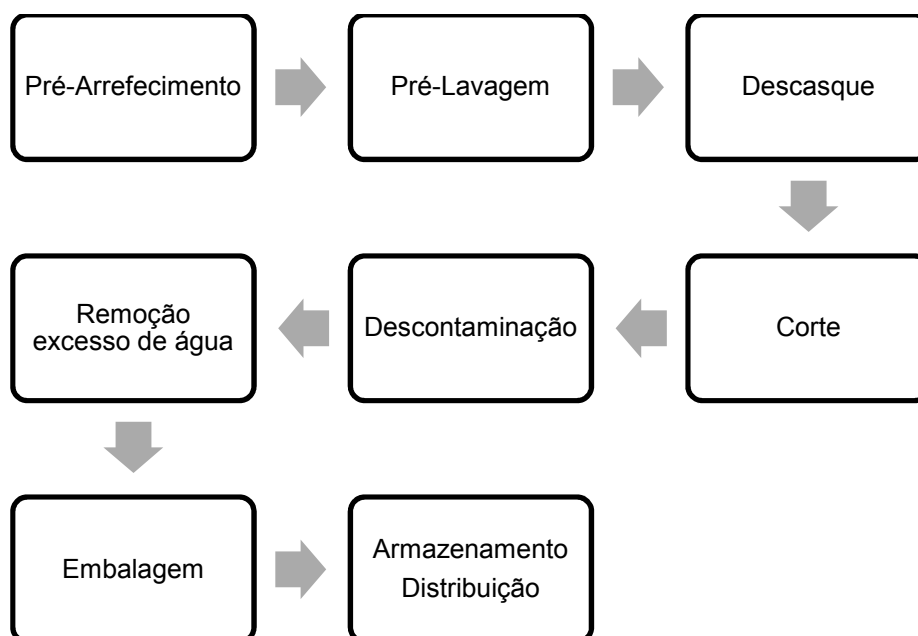
Os principais passos do processamento deste tipo de produtos são a colheita, lavagem, desinfecção, corte e embalagem com posterior comercialização e consumo (Shewfelt, 1987; Tapia de Daza et al., 1996; Barbosa-Cánovas et al., 2003). Segundo Tapia de Daza e colaboradores (1996) e Chien e colaboradores (2007), o conceito amplamente aceite de PMP envolve a ideia de tecidos vivos que respiram. Estes são tecidos vivos que sofreram um leve processamento de modo a retirar as partes não edíveis, possuem frescura e mantêm a sua qualidade embora não apresentem a mesma resposta fisiológica do produto que lhes deu origem. No entanto, o facto de terem sido submetidos a processamento pode levar a uma rápida senescência dos produtos e/ou variações de qualidade, principalmente nas etapas de corte ou redução da dimensões dos alimentos (Chien et al., 2007). Nestes produtos, os mecanismos primários da deterioração são o crescimento microbiano e as alterações fisiológicas e bioquímicas. No entanto, na maioria dos casos, os PMP apresentam um tempo de vida útil superior à matéria-prima que lhes deu origem (Tapia de Daza et al., 1996). As principais desvantagens associadas à comercialização destes PMP são o prazo de validade curto, tipicamente de alguns dias, limitando a área geográfica onde podem ser comercializados e o custo elevado associado à sua produção.

O maior segmento de mercado ativo, nesta área, são os produtos hortofrutícolas, alimentos refrigerados ou prontos a comer, normalmente comercializados em pacotes individuais, projetados para atender às necessidades de conveniência e simplicidade. Os produtos hortofrutícolas constituem uma componente importante da dieta humana e podem ser apresentados ao consumidor sob diversas formas, e com diferentes graus de transformação. Para além de constituírem uma fonte de energia e de vitaminas na alimentação, os produtos hortofrutícolas são ricos em fibras que são de extrema importância para a saúde (Ragaert et al., 2004). Assim, a finalidade dos produtos hortofrutícolas minimamente processados é oferecer ao consumidor final frutas ou

hortícolas com segurança alimentar e com as características nutricionais da matéria-prima que o originou, o processamento mínimo contribui para a redução do tempo necessário e da mão-de-obra despendida na preparação de hortofrutícolas. Trazem ainda vantagens ecológicas pois ao serem preparados num único local, o volume de resíduos acumulados pode ser facilmente canalizado para outros fins, como por exemplo o fabrico/produção de ração animal (Tapia de Daza et al., 1996).

Os PMP englobam uma vasta gama de tecnologias e métodos de conservação/preservação de alimentos durante o seu transporte desde a colheita até ao consumidor. Os métodos de processamento visam uma minimização das alterações aos atributos inerentes ao produto fresco, e a uma maximização do período de vida do produto, permitindo a garantia da qualidade no percurso do prado ao prato (Soliva-Fortuny e Martín-Belloso, 2003).

Os produtos hortofrutícolas prontos a cozinhar, a comer e a utilizar requerem muitas operações de preparação. A preparação de produtos minimamente processados pode resumir-se em apenas 15 pontos principais: colheita, transporte, receção, pré-arrefecimento, escolha, calibração, lavagem, higienização, escorrimento, secagem, pesagem, acondicionamento, conservação, expedição e distribuição para o retalhista (figura 2). Todas estas etapas de pós-colheita têm o potencial de manter a qualidade do produto final (Soliva-Fortuny e Martín-Belloso, 2003).



**Figura 2.** Diagrama tipo de produção de hortofrutícolas minimamente processados. Adaptado de Soliva-Fortuny e Martín-Belloso (2003).

## **2.2.1. Principais mecanismos de perda de qualidade dos PMP durante o armazenamento**

### **2.2.1.1. Síntese de etileno**

O etileno é uma hormona de crescimento das plantas e ocorre naturalmente, tendo vários efeitos sobre o crescimento, o desenvolvimento e a duração da conservação de muitos frutos, vegetais e plantas ornamentais. A síntese de etileno difere durante as fases de maturação ou de vida das plantas, bem como com os fatores bióticos e abióticos envolventes. O etileno tem implicações bem marcadas na qualidade dos produtos hortofrutícolas frescos. Algumas destas são benéficas para os produtos tais como: estimular o amadurecimento dos frutos, promover o desenvolvimento da cor nos frutos, estimular a senescência dos frutos, favorecer a abscisão dos frutos e promover a floração em bromeliáceas (Bapat et al., 2010).

A produção de etileno pelos produtos hortofrutícolas também pode ser prejudicial, pois com a produção de etileno o amadurecimento é mais rápido, levando à senescência e a um célere apodrecimento (Toivonen e Brummell, 2008). Estudos indicam que uma produção excessiva de etileno pode promover a destruição de clorofilas (no caso da alface) (Saltveit, 1999) ou no amarelecimento dos tecidos de brócolos, couve-flor e espinafres (Asoda et al., 2009). No que diz respeito ao efeito do etileno na textura, este aumenta a permeabilidade das membranas e conseqüentemente altera as estruturas celulares e a integridade da membrana (Saltveit, 1999).

O inibidor de etileno mais utilizado em hortofrutícolas, principalmente em maçãs é o *1-methylcyclopropene* (1-MCP), este inibidor retarda a maturação e/ou processos de senescência das frutas, vegetais e produtos ornamentais. Este tem tido um maior impacto na indústria da maçã, onde é muito utilizado para manter a qualidade da fruta (Jung e Watkins, 2011). O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) também é utilizado como inibidor de etileno. Estudos afirmam que o CO<sub>2</sub> pode inibir a produção de etileno em vários frutos e vegetais (Wild et al., 2005). Níveis elevados de CO<sub>2</sub> podem ainda impedir os processos dependentes de etileno. Ao longo do tempo tem vindo a ser assumido que os produtos expostos a altas concentrações de CO<sub>2</sub>, por um longo período de tempo, competem com o etileno no local de ligação do recetor inibindo a biossíntese de etileno (Wild et al., 2005). Uma alternativa ecológica para a inibição do etileno, e que tem vindo a ser estudada, é o tratamento com radiação UV-C (100-280 nm). Este tipo de radiação interfere na sinalização hormonal, alterando os processos de amadurecimento e da acumulação de metabolitos responsáveis pela deterioração (Tiecher et al., 2013).

#### 2.2.1.2. Taxas de respiração

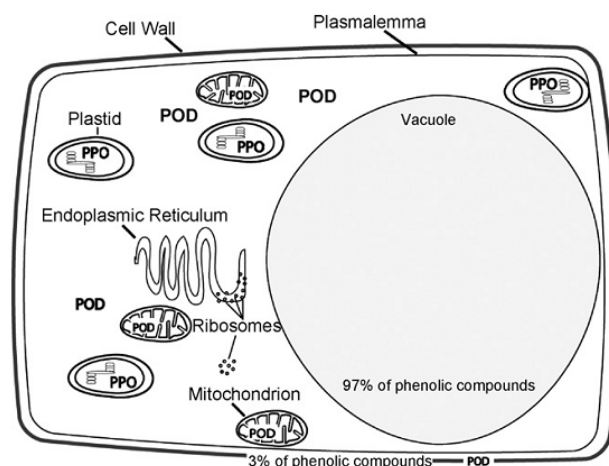
Tal como foi dito anteriormente, os frutos e hortícolas minimamente processados são tecidos vivos que continuam a respirar, pelo que as suas taxas de respiração variam ao longo do tempo e consoante as agressões de que estão a ser alvo (Chien et al., 2007). A respiração neste tipo de produtos é um processo metabólico que fornece energia aos processos bioquímicos de manutenção da organização celular e da integridade das membranas (Sacilik e Elicin, 2006).

A respiração é um dos processos metabólicos mais importantes nos PMP. Esta pode ser descrita como o processo oxidativo que conduz à quebra de macromoléculas presentes nas células (como por exemplo o amido, açúcares e ácidos orgânicos) em moléculas mais simples como o dióxido de carbono e água com a libertação de energia que podem ser usadas pela célula noutras reações de síntese (Fonseca et al., 2002). Os substratos orgânicos quebrados neste processo podem incluir hidratos de carbono, lípidos e ácidos orgânicos. O processo consome oxigénio ( $O_2$ ) numa série de reações enzimáticas, pelo que, diminuindo a disponibilidade de  $O_2$  no meio, haverá uma menor atividade enzimática e conseqüentemente menores taxas de respiração (Fonseca et al., 2002; Bulens et al., 2012). A taxa de respiração dos produtos hortofrutícolas é inversamente proporcional à capacidade de conservação dos mesmos, sendo a sua determinação um dado essencial na previsão do tempo de prateleira deste tipo de produtos. Na etapa de corte, a taxa de respiração dos produtos hortofrutícolas pode aumentar 3 a 5 vezes, tornando os PMP's bastante perecíveis caso não sejam adicionadas barreiras tecnológicas à sua degradação (refrigeração, embalagem em atmosfera modificada, revestimentos) (Qi et al., 2011).

#### 2.2.1.3. Escurecimento enzimático

O escurecimento enzimático é uma das principais causas de deterioração dos PMP's. Na degradação oxidativa dos compostos fenólicos existem duas enzimas que são de importância relevante em termos de qualidade alimentar que levam à produção de compostos castanhos, a polifenol oxidase (PPO) e a polifenol peroxidase (POD) (Tomás-Barberán e Espín, 2001; Jang e Moon, 2011).

Enquanto as reações de escurecimento enzimático são importantes para perceber os mecanismos bioquímicos, também é importante conhecer a localização celular das enzimas responsáveis pelo escurecimento. A figura 3 fornece alguns detalhes em relação à localização das enzimas que interagem com os compostos fenólicos causando o escurecimento.



**Figura 3.** Localização interna e externa dos compostos fenólicos e enzimas de oxidação (polifenol oxidase e polifenol peroxidase) numa célula vegetal típica. Modelo publicado por Toivonen e Brummell (2008). POD: polifenol peroxidase PPO: polifenol oxidase.

A síntese de compostos fenólicos está associada com o retículo endoplasmático. As proteínas envolvidas na sua síntese são incorporadas na membrana do retículo endoplasmático ou estão associadas a ele (Toivonen, 2004; Toivonen e Brummell, 2008). Uma vez formados, estes compostos são glicosilados e depois excretados através de vesículas de transporte formadas a partir da membrana do retículo endoplasmático. Estas vesículas são o veículo pelo qual os compostos fenólicos são transportados do vacúolo para a parede celular. Os compostos fenólicos encontrados nos cromoplastos, citoplasma e mitocôndrias estão presentes em quantidades ínfimas e estão associados a funções metabólicas específicas (Toivonen e Brummell, 2008). Segundo Toivonen (2004), o início dos processos de escurecimento oxidativo estará associado à rutura das membranas dentro das células dos tecidos vegetais. Com a rutura das membranas, a consequência será a mistura dos substratos polifenólicos com a polifenol oxidase e/ou polifenol peroxidase (Degl'Innocenti et al., 2005; Jang e Moon, 2011). Alguns autores sugerem ainda que a estabilidade da membrana é, potencialmente, o maior fator para controlar as taxas de escurecimento, o que é difícil de evitar em PMP sujeitos a cortes (Cantos et al., 2002).

As reações de escurecimento têm vindo a ser relacionadas diretamente como uma consequência da ação da PPO em polifenóis. No entanto, alguns autores têm vindo a atribuir uma participação parcial neste escurecimento por parte da ação da polifenol peroxidase (POD) (Cantos et al., 2002; Jang e Moon, 2011). A enzima polifenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1) é uma enzima que contém ferro e que pode estar ativa ou latente em plantas. É aceite como a enzima que catalisa duas reações diferentes na presença de oxigénio molecular: a hidroxilação de monofenolases a *o*-difenois (cede uma molécula de  $O_2$ ) e a oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas (cede uma molécula de  $O_2$ ) seguindo-se uma

formação não enzimática de melaninas responsáveis pela cor preta, castanha ou vermelha característica do escurecimento enzimático (Tomás-Barberán e Espín, 2001; Soliva-Fortuny e Martín-Belloso, 2003; Mayer, 2006; Oms-Oliu et al., 2010).

A enzima polifenol peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) é um indicador da deterioração da qualidade, tais como a perda de sabor e várias reações de biodegradação (Jang e Moon, 2011). Alguns autores afirmam que poderá também contribuir para o escurecimento enzimático com a oxidação de doadores de hidrogénio na presença de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Tomás-Barberán e Espín, 2001; Degl'Innocenti et al., 2005; Oms-Oliu et al., 2010). A peroxidase aceita uma vasta gama de doadores de hidrogénio, incluindo polifenóis envolvidos no escurecimento enzimático em frutas (Nicolas et al., 1994). A participação da POD no escurecimento enzimático ainda não é completamente conhecida, pelo que tem vindo a ser questionável por duas razões: a elevada afinidade da PPO pelo seu substrato natural e os baixos níveis de peróxido de hidrogénio nos tecidos vegetais (Degl'Innocenti et al., 2005; Oms-Oliu et al., 2010; Jang e Moon, 2011).

Apesar dos muitos esforços realizados com a utilização de tratamentos físicos que permitam a inibição da atividade enzimática da PPO e POD, sem a adição de agentes químicos estes não são suficientemente eficientes (Kumar et al., 2012). A inativação das enzimas pode ser realizada através de tratamentos térmicos, no entanto estes levam a alterações de textura do produto, com consequente perda de qualidade do mesmo (Cantos et al., 2002; Altunkaya e Gökmen, 2009). O tratamento dos PMP por imersão após o corte é a maneira mais comum para controlar os fenómenos de escurecimento. Para o efeito podem ser utilizadas várias soluções, sendo as mais comuns: ascorbato e cálcio, compostos que contêm grupos tiol, ácido carboxílico, ácido fenólico e sulfitos (Cantos et al., 2002; Del Caro et al., 2004; Oms-Oliu et al., 2010). Kumar e colaboradores (2012) verificaram, na preservação de líchias, um menor escurecimento enzimático quando combinaram técnicas de imersão e de radiação.

Estudos têm vindo a ser dirigidos para a inibição do escurecimento enzimático utilizando ácido ascórbico e baixas temperaturas. No entanto o ácido ascórbico é destruído ao longo do processo (Degl'Innocenti et al., 2005). O ácido ascórbico inibe a atividade da PPO porque reduz as o-quinonas formadas enzimaticamente, reduzindo a severidade do escurecimento. A sua utilização é útil em produtos minimamente processados que apresentem uma taxa de escurecimento bastante elevada (Degl'Innocenti et al., 2005; Oms-Oliu et al., 2010).

#### 2.2.1.4. Alterações químicas

A nível das propriedades químicas dos hortofrutícolas minimamente processados também ocorrem algumas modificações. Del Caro e colaboradores (2004) observaram que em citrinos minimamente processados, após 12 dias de conservação a 4°C, a maioria dos parâmetros químicos analisados não apresentavam alterações, apesar do valor de ácido ascórbico ter diminuído significativamente. Tal facto foi também observado por Cocci e colaboradores (2006), onde maçãs minimamente tratadas apresentaram uma diminuição do ácido ascórbico e de polifenóis totais.

Estudos em manga minimamente processada, após 10 dias de conservação a 5°C apresentavam um incremento no teor de sólidos solúveis comparativamente com os valores de referência (Dea et al., 2010). O incremento verificado será devido à contínua maturação do produto, convertendo o amido residual em açúcares.

Oms-Oliu e colaboradores (2008) observaram que o conteúdo em vitamina C e em fenóis em fatias de pera diminuíram após 4 dias de armazenamento, protegidas da luz. Contrariamente, nas fatias revestidas com alginato, gelano e pectina, incluindo *N*-acetilcisteína e glutatona apresentaram menores alterações. A utilização do revestimento leva a uma menor difusão do oxigénio e conseqüentemente a uma melhor conservação da vitamina C.

#### 2.2.1.5. Alterações de Textura

As alterações de atributos texturais que ocorrem durante o processamento e armazenamento de PMPs devem-se principalmente ao corte dos tecidos vegetais. O corte conduz à alteração da microestrutura do produto traduzindo-se frequentemente numa perda de firmeza dos tecidos. Os três principais fatores responsáveis pelas propriedades texturais dos tecidos vegetais são a turgescência das células, a rigidez da parede celular e a adesão intercelular (Barros, 2007). A parede celular é a principal estrutura que confere rigidez à célula vegetal. Na sua constituição existem polissacarídeos que são destruídos pela ação de enzimas pectinolíticas libertadas aquando o corte, com conseqüente fragilização e perda de estrutura celular (Barros, 2007).

Varela e colaboradores (2005) observaram que o armazenamento prolongado das maçãs, mesmo em condições controladas, causa alterações na firmeza da fruta (determinado por testes de compressão), prejudicando a avaliação sensorial da mesma e a não-aceitação por parte do consumidor. Em produtos climatéricos, o incremento na produção de etileno devido ao corte e posterior acumulação no interior da embalagem

leva também à perda de firmeza dos tecidos (Bapat et al., 2010; Bulens et al., 2012). Já foi observada também perda de firmeza devido à rápida degradação na textura, entre outros, em maçã (Varela et al., 2005), banana (Gupta et al., 2006) e em pera (Oms-Oliu et al., 2008).

#### 2.2.1.6. Microbiologia

O processamento mínimo cria condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos devido ao aumento da superfície exposta do produto e ao aparecimento de sucos e substratos intracelulares após as operações de tratamento. A proteção natural dos frutos é removida tornando-os mais suscetíveis à deterioração microbiana (Oms-Oliu et al., 2010). Em adição, pode ocorrer contaminação cruzada durante as etapas de processamento, uma vez que a desinfecção da fruta apenas reduz em  $10^3$  o número de microrganismos. O processamento pode assim contribuir para uma maior suscetibilidade ao ataque de microrganismos patogênicos (Oms-Oliu et al., 2010).

#### 2.2.1.7. Alterações Nutricionais

Relativamente a alterações do valor nutricional dos produtos minimamente processados, existe a percepção de que este tipo de produtos não apresenta a mesma qualidade nutricional dos produtos que lhes deram origem. A perda de qualidade nutricional, que pode ocorrer muitas vezes devido às metodologias de processamento e conservação (Barros, 2007), pode ser contornada pelo recurso a metodologias de processamento vantajosas para este tipo de produtos.

Gil e colaboradores (2006) observaram que, após 6 dias ( $5^{\circ}\text{C}$ ), kiwi e após 9 dias em ananás, melão e morango minimamente processados, apenas se verificou uma perda do seu valor nutricional, consequência dos processos de preparação dos PMP. As principais alterações a nível nutricional verificadas pelos autores foram: diminuição de vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos. Os mesmos autores verificaram ainda que entre melancia minimamente processada e melancia inteira, armazenadas a  $14^{\circ}\text{C}$ , após 9 dias, não existem diferenças no seu valor nutricional. Pelo contrário as melancias minimamente processadas e as inteiras, armazenadas a  $5^{\circ}\text{C}$ , apresentam diferentes estados de deterioração, sendo as minimamente processadas que apresentam uma maior perda nutricional. Cocci e colaboradores (2006) observaram que, após 8 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ , maçãs minimamente processadas apresentavam um incremento na quantidade de polifenóis, levando a um maior escurecimento e consequente perda de valor nutricional.

#### 2.2.1.8. Alterações sensoriais

Os produtos hortofrutícolas minimamente processados assemelham-se com o produto fresco, pelo que as alterações sensoriais são reduzidas e a aceitabilidade por parte do consumidor é elevada.

No entanto, a nível sensorial ocorrem algumas modificações nos produtos minimamente processados, principalmente quando se tem em conta o fator tempo. A avaliação da influência do processamento e condições de armazenamento na perceção de qualidade de frutas frescas minimamente processadas tem sido avaliada através de análise sensorial em maçãs (Varela et al., 2005; Chauhan et al., 2011), peras (Oms-Oliu et al., 2008), ameixas (Valero et al., 2013) e manga (Dea et al., 2010). Muitos destes trabalhos avaliaram a qualidade visual dos produtos em estudo em que na sua maioria, após a primeira semana de armazenamento, não apresentavam a aparência desejada pela maioria dos consumidores. Segundo Soliva-Fortuny e Martín-Belloso (2003) não foram publicados estudos suficientes acerca da qualidade do sabor dos PMP.

#### **2.2.2. Processos de preservação dos hortofrutícolas minimamente processados**

A manutenção da qualidade de produtos frescos cortados baseia-se na tecnologia de barreiras, tirando benefício do efeito sinérgico entre vários fatores individuais (Barros, 2007). A adequada seleção das barreiras, tanto em número como em intensidade e sequência de aplicação, apresenta-se como o futuro do processamento mínimo de produtos hortofrutícolas (McMeekin e Ross, 2002).

Os PMP's são afetados a nível da sua qualidade principalmente devido aos seguintes fatores: grau de maturação, estado fisiológico da matéria-prima, metodologia de processamento, nomeadamente técnicas de corte e descontaminação do produto, a embalagem e a temperatura durante o processamento, conservação e transporte do produto final até ao consumidor (Allende et al., 2006; Barros, 2007). Existe uma série de metodologias/equipamentos/mecanismos a que se podem recorrer para que haja uma maior preservação dos PMP e consequentemente um maior tempo de prateleira, nomeadamente controlo da temperatura na cadeia de frio, recurso a embalagens com atmosfera modificada e a aplicação de revestimentos e filmes edíveis (Ohlsson, 2001; Allende et al., 2006).

### 2.2.2.1. Temperatura

A temperatura de armazenamento é um dos fatores mais importantes para a preservação dos produtos minimamente processados e talvez o parâmetro mais difícil de controlar, tendo todavia uma importância fulcral, principalmente quando se tratam de produtos hortofrutícolas. As taxas de alterações bioquímicas provocadas nos alimentos, quer por microrganismos, quer por enzimas, aumentam de forma logarítmica com o aumento da temperatura. Por esta razão, a preservação dos alimentos a baixas temperaturas permite um maior tempo de prateleira (Fellows, 2000). A baixas temperaturas, toda a atividade fisiológica é reduzida, observando-se um decréscimo das taxas de respiração (Fonseca et al., 2002), produção de etileno (Bulens et al., 2012), transpiração (Fonseca et al., 2002), atividade microbiológica (Piga et al., 2000) e atividade enzimática (Jung e Watkins, 2011). As temperaturas ótimas são aquelas que atrasam a senescência e mantêm a qualidade, sem causar danos pelo frio. Na tabela 2 encontram-se alguns exemplos das condições ótimas de armazenamento de alguns frutos e vegetais que permitem um maior tempo de prateleira.

**Tabela 2.** Condições ótimas de armazenamento de alguns frutos e vegetais. Adaptado de Fellows (2000).

<b>Alimento</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Humidade Relativa (%)</b>	<b>Tempo de prateleira (dias)</b>
<b>Banana</b>	11-15,5	85-95	7-10
<b>Brócolos</b>	0	95	10-14
<b>Limão</b>	10-14	85-90	30-180
<b>Pêssego</b>	-0,5-0	90	14-30
<b>Morango</b>	-0,5-0	90-95	5-7

Apesar das temperaturas baixas reduzirem a atividade fisiológica dos PMP's podem ocorrer algumas alterações indesejadas, principalmente quando o armazenamento é feito a uma temperatura mais baixa do que a temperatura ótima. Pode resultar em variações físico-químicas como por exemplo o escurecimento dos tecidos internos e externos, incapacidade de amadurecimento e manchas nos alimentos. Pensa-se que estas alterações negativas se devem a um desequilíbrio na atividade metabólica que resulta no excesso de produção de metabolitos que se tornam tóxicos para os tecidos (Fellows, 2000).

#### 2.2.2.2. Embalagem em atmosfera modificada

As embalagens de atmosfera modificada são utilizadas com o objetivo de aumentar o tempo de prateleira dos alimentos sem sacrificar a qualidade e a frescura dos mesmos. A embalagem onde os produtos são armazenados constitui, assim, uma barreira na preservação da qualidade dos alimentos (Fellows, 2000).

O tipo de atmosfera utilizada difere de alimento para alimento, dependendo: da permeabilidade do material da embalagem; atividade microbiológica; taxas de respiração dos alimentos (Fellows, 2000). Com a modificação da composição e da pressão atmosférica no ambiente de armazenamento, as reações biológicas podem ser diminuídas ou mesmo inibidas, aumentando a qualidade e segurança alimentar (Ohlsson, 2001; Costa et al., 2011).

No armazenamento de frutos e vegetais, o aumento da concentração de dióxido de carbono no meio e a redução da concentração de oxigênio retardam a respiração e prolongam o tempo de vida do produto. Também a umidade relativa é um fator importante, como controlador das emissões de etileno (Ohlsson, 2001). Ohlsson (2001) afirma que uma reduzida pressão durante o armazenamento combinado com diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> poderá ser benéfico para o tempo de vida dos produtos minimamente processados. O objetivo consiste em criar um equilíbrio gasoso ideal, no qual a atividade respiratória é conduzida ao mínimo possível, sem no entanto se atingirem níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> que afetem negativamente o produto (Costa et al., 2011; Soliva-Fortuny et al., 2003).

As principais vantagens e limitações da utilização de embalagens de atmosfera modificada encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3.** Vantagens e limitações utilização de embalagens de atmosfera modificada.

Adaptado de Fellows (2000).

<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
Aumento do tempo de prateleira de 50-400%	Custos adicionais
Redução de perdas económicas	Controlo da temperatura obrigatório
Maior raio de distribuição	Composição do gás diferente para cada tipo de alimento
Menor adição de conservantes químicos	Necessidade de equipamento específico e operadores treinados
Melhor separação de alimentos cortados	Elevado volume /kg produtos durante armazenamento/transporte
Boa apresentação dos alimentos	Segurança alimentar dos produtos a ser estabelecida

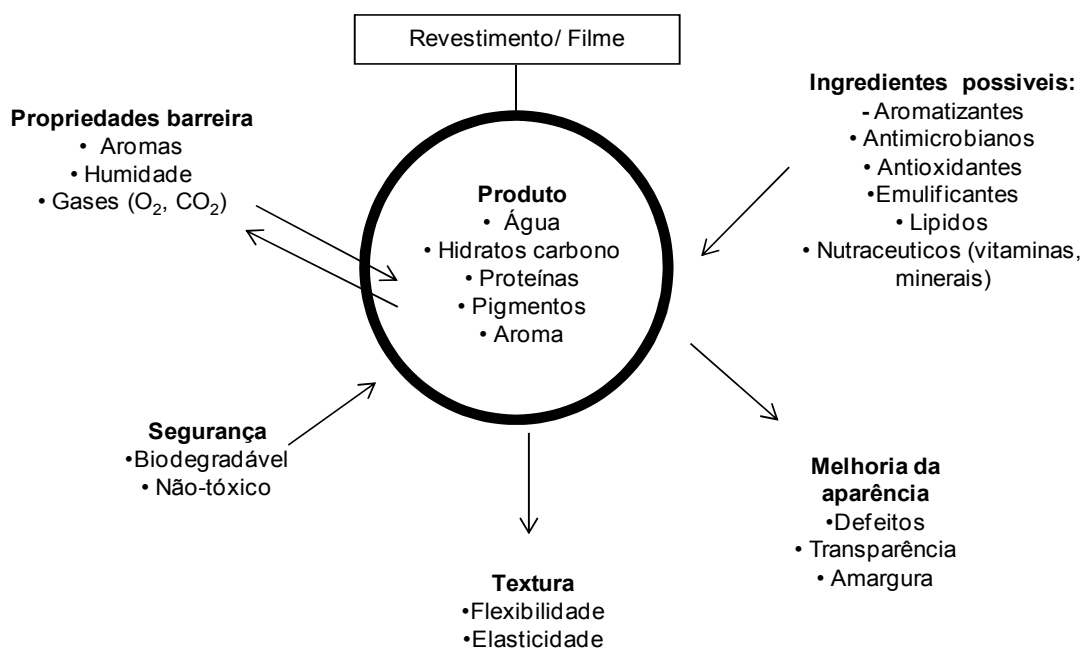
Dois dos PMP's mais conservados em atmosferas modificadas são as maçãs e as peras. Em maçã os níveis ótimos de gás numa embalagem de atmosfera modificada são de 2% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub> e 96% azoto (Fellows, 2000; Soliva-Fortuny et al., 2004).

#### 2.2.2.3. Filmes/ Revestimentos Edíveis

As embalagens sintéticas têm originado sérios problemas ecológicos devido ao facto de não serem biodegradáveis. Neste contexto têm vindo a ser criadas alternativas mais ecológicas e vantajosas para o consumidor (Bourtoom, 2008; Ramos et al., 2012). Uma outra forma de conseguir um efeito semelhante ao das embalagens com atmosfera modificada, passa pela aplicação de revestimentos/filmes poliméricos comestíveis diretamente sobre o produto desejado (Valencia-Chamorro et al., 2011). Bourtoom (2008) define filme edível como uma fina camada de material que pode ser consumido e que fornece uma barreira à humidade, oxigénio e ao movimento de solutos para o alimento.

Têm vindo a ser desenvolvidos novos filmes edíveis e revestimentos alimentares com base em produtos naturais para alimentos frescos minimamente processados. Estes filmes e revestimentos alimentares constituem uma tecnologia amiga do ambiente que permite aumentar a qualidade, segurança, estabilidade e propriedades mecânicas dos alimentos. De um modo geral, promovem uma barreira semipermeável ao vapor de água, oxigénio e dióxido de carbono, retenção dos compostos voláteis do aroma entre o alimento e a atmosfera circundante e podem funcionar como veículo para o transporte de aditivos alimentares (figura 4) (Valencia-Chamorro et al., 2011; Bonilla et al., 2012; Dhall, 2013). Deste modo, permitem o aumento do tempo de prateleira dos produtos e

possibilitam responder à procura dos consumidores por produtos mais naturais e com menor contaminação para o ambiente.



**Figura 4.** Atributos de qualidade prestados especificamente pelos filmes e revestimentos para produtos alimentares. Adaptado de Ramos e colaboradores (2012).

Os filmes edíveis e revestimentos comestíveis podem conter compostos antimicrobianos tais como ácidos orgânicos, parabenos, quitosano, óleos essenciais, extratos de plantas naturais, todos estes eficazes em inibir o crescimento de microrganismos contaminantes, mantendo a qualidade do produto durante o armazenamento e distribuição (Valencia-Chamorro et al., 2011). As propriedades dos filmes dependem do tipo de matéria-prima utilizada, dos processos de fabricação, e da aplicação final (Ramos et al., 2012). Uma das maiores vantagens da utilização de filmes edíveis e revestimentos é que estes podem ser aplicados individualmente em pequenas porções de alimentos, particularmente produtos que não são habitualmente embalados individualmente, tais como peras, feijões, amêndoas, maçãs e morangos (Bourtoom, 2008). Dependendo da aplicação pretendida podem ser usados para produzir bolsas, cápsulas, embalagens, sacos ou invólucros.

A formulação de filmes requer no mínimo um componente capaz de produzir uma matriz estrutural de coesão suficiente, enquanto a sua eficiência funcional depende fortemente da natureza dos componentes adicionais, como por exemplo antimicrobianos e antioxidantes (Galus e Lenart, 2013). O processo de elaboração de um filme edível

engloba a dispersão ou dissolução de um composto específico (um hidrocolóide ou preparação de uma solução proteica) num solvente como por exemplo água, etanol ou uma mistura de vários solventes. Neste processo podem ser adicionados plastificantes, por exemplo glicerol, agentes antimicrobianos (ex. nisina), corantes e aromatizantes. Pode ser necessário o ajuste de pH e/ou o aquecimento das soluções para facilitar a dissolução, dependendo do polímero utilizado. A solução que forma o filme é depois espalhada e seca numa superfície com uma determinada temperatura e humidade, obtendo-se no final uma folha sólida - o filme (Bourtoom, 2008; Gómez-Estaca et al., 2009; Imran et al., 2010). Um dos principais componentes dos filmes são os plastificantes, que são compostos de massa molecular pequena, utilizados para reduzir as interações entre as cadeias de polímeros através das pontes de hidrogénio, resultando em filmes delicados e flexíveis. A capacidade dos plastificantes para formar ligações depende da sua configuração molecular, não possuir grupos hidroxilo e a configuração do polímero, por exemplo a compatibilidade do plastificante com o polímero (Haq et al., 2013).

Os revestimentos são uma forma particular de películas/filmes, aplicando-se diretamente sobre a superfície do produto, normalmente por imersão do produto numa solução líquida (Falguera et al., 2011). Revestimentos edíveis podem ser definidos como uma fina camada de material edível, que é aplicada diretamente sobre a superfície do produto alimentar por imersão, *spray* ou *brushing*, com o objetivo de criar uma atmosfera modificada no próprio alimento. Após a aplicação do revestimento no produto, em geral, realiza-se uma pequena secagem para que se dê uma adesão mais eficaz do revestimento (Falguera et al., 2011; Ramos et al., 2012). Embora a remoção dos revestimentos possa ser possível, normalmente não são concebidos com tal finalidade, sendo considerados por muitos autores como parte do produto final (Valencia-Chamorro et al., 2011; Ramos et al., 2012).

Uma das técnicas de aplicação dos revestimentos comestíveis é a imersão. Os tratamentos de imersão são utilizados com o objetivo de adicionar ao produto final compostos com ação específica. A aplicação de agentes inibidores de reações de escurecimento enzimático com ação antioxidante, acidulante, complexante ou quelante, como o ácido ascórbico, ácido cítrico, EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) ou 4-hexilresorcinol é efetuada mediante tratamentos de imersão em soluções simples ou combinadas de concentração adequada ( Ahvenainen, 1996; Allende et al., 2006). Estes tratamentos mostram-se eficazes na prevenção do escurecimento e manutenção de qualidade de vários produtos minimamente processados, nomeadamente pera (Oms-Oliu et al., 2010), pêssigo (Pizato et al., 2013) e maçã (Lee et al., 2003).

### 2.2.3. Revestimentos e filmes edíveis baseados em polissacarídeos

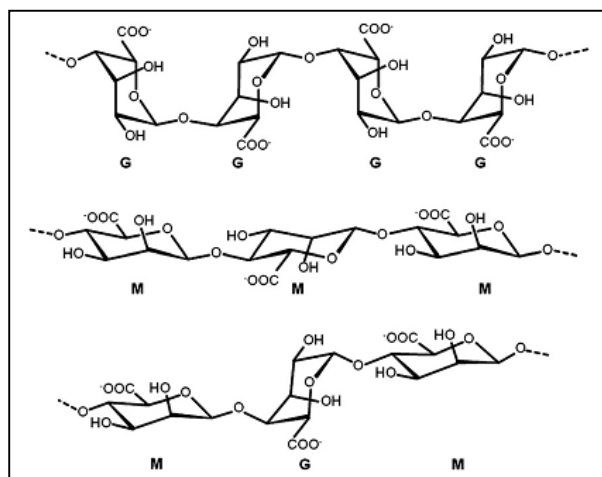
Polissacarídeos são polímeros naturais compostos por monossacarídeos que se encontram ligados por ligações  $\alpha$ -glicosídicas. Podem atuar como locais de armazenamento de energia em plantas e animais, ou ter funções estruturais na parede celular de plantas e no exosqueleto de insetos e outros animais (Ramos et al., 2012). Os polissacarídeos são os materiais mais estudados para a formulação de filmes e revestimentos edíveis (Ramos et al., 2012). Uma grande variedade de tais compostos, e dos seus derivados, têm sido testados para potencial utilização como películas biodegradáveis/comestíveis incluindo alginato, pectina, carragenano, quitosano, pulalano, celulose e amido (Ramos et al., 2012; Wu e Chen, 2013). Estes compostos conferem excelentes propriedades como barreiras ao oxigénio, aromas e óleos, ao mesmo tempo que promovem a elasticidade e integridade estrutural do produto final.

Dois polissacáridos foram estudados no presente trabalho na produção de filmes edíveis: o alginato, conhecido pelas sua vasta aplicação na indústria alimentar e o quitosano, também estudado para aplicações na área alimentar. As principais características destes tipos de polissacáridos estão descritas nas subsecções 2.2.3.1 e 2.2.3.2.

#### 2.2.3.1. Alginato

O alginato é um polissacarídeo hidrocolóide, ou seja, trata-se de uma substância que forma um gel, por hidratação, quando entra em contacto com água (Galus e Lenart, 2013). O alginato encontra-se em todas as algas castanhas (*Phaeophyceae*) por ser um componente das suas paredes celulares. As principais fontes comerciais deste polissacárido são a alga *Macrocystis pyrifera*, e espécies de *Laminaria*, *Ascophyllum* e *Sargassum* (Lee e Mooney, 2012).

Do ponto de vista molecular, o alginato é um polímero linear solúvel composto por sais de ácido algínico, que lhe conferem um elevado peso molecular. É composto por blocos alternados de unidades monoméricas constituídas por ácido  $\alpha$ -L-glicurónico (G) e ácido manurónico (M) (figura 5). Dependendo do tipo de monómeros constituintes do alginato podem formar-se géis com características diferentes. Um alginato rico em blocos G forma géis mais fortes, enquanto alginatos ricos em blocos M formam géis mais flexíveis. A junção de blocos G e blocos M resulta na formação de géis com propriedades intermédias (Lee e Mooney, 2012).



**Figura 5.** Estrutura química de blocos G, blocos M, e blocos alternativos de G-M em alginato. Retirado de Lee e Mooney (2012).

O alginato está incluindo num grupo de compostos que são considerados como seguros pela FDA (*Food and Drug Administration*), tratando-se de um aditivo alimentar autorizado e registado com o número E- 401 (George e Abraham, 2006). A sua aplicação é segura devido a algumas propriedades excelentes, tais como, não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e reprodutibilidade (Abdollahi et al., 2013).

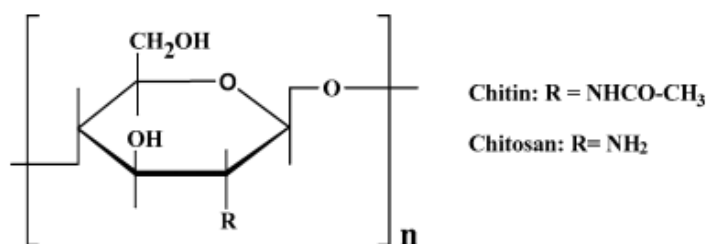
O alginato é extensivamente utilizado na indústria alimentar pela sua capacidade de formar géis, função de espessante, emulsificante e estabilizante (George e Abraham, 2006). Numa percentagem entre 0,25% e 0,5% promove e estabiliza a consistência de recheios de produtos de pastelaria, temperos de saladas e chocolates de leite. Permite ainda a prevenção de formação de grandes cristais de gelo nos gelados durante o armazenamento. É ainda muito utilizado numa variedade de produtos com textura de gel como pudins, polpas de fruta, imitação de caviar, sendo ainda usado para estabilizar sumo de fruta fresca e a espuma da cerveja (Tapia et al., 2008; Lee e Mooney, 2012; Galus e Lenart, 2013).

#### 2.2.3.2. Quitosano

A quitina é o principal componente do exoesqueleto de cerca de um milhão de artrópodes e crustáceos (ex. caranguejos e lagostas), sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose (Dash et al., 2011). Um processo de desacetilação pode converter a quitina em quitosano, polímero com uma solubilidade mais elevada em ácidos orgânicos. Industrialmente pode-se obter quitina da carapaça de caranguejos e camarões ou de fungos. A quitina obtida de caranguejos e camarões é desacetilada com hidróxido de sódio a altas temperaturas, obtendo-se quitosano. Caso

se trate de quitina proveniente de fungos, a produção de quitosano está associado a processos de fermentação (*Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* e *Streptomyces*) (Dash et al., 2011).

O quitosano é um co-polímero formado por unidades de acetil-*D*-glucosamina e *D*-glucosamina, disponíveis em diferentes quantidades, dependendo do grau de desacetilação (figura 6.). As diferentes unidades encontram-se ligadas entre si através de ligações (1→4)-β-glicosídicas (Dash et al., 2011).



**Figura 6.** Estrutura de quitina e quitosano. Retirado de Cestari e colaboradores (2004)

O quitosano apresenta muitas vantagens tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade; muitos estudos têm vindo a demonstrar a sua capacidade antibacteriana e antifúngica (Vargas et al., 2009). As propriedades do quitosano proporcionam a possibilidade de formação de filmes resistentes, flexíveis, e muito difíceis de rasgar. A maioria das propriedades mecânicas de filmes de quitosano pode ser comparável a polímeros comerciais de força média (Aider, 2010; Dash et al., 2011).

Um filme de quitosano de alto peso molecular enriquecido com ácido oleico foi desenvolvido por Vargas e colaboradores (2009). Em geral, a adição de ácido oleico à matriz de quitosano leva à diminuição da absorção de humidade e permeabilidade ao vapor de água, promovendo um maior tempo de prateleira dos alimentos. Lin e colaboradores (2011) aplicaram, por imersão, uma solução de 1% quitosano em lichias com o objetivo de aumentar o tempo de prateleira da fruta e diminuir as taxas de respiração e perdas de humidade. As lichias revestidas com quitosano apresentaram um tempo de prateleira de 5 dias superior, tendo sido observadas menores taxas de respiração e perdas de humidade nas amostras revestidas.

#### 2.2.4. Algas comestíveis

Enquanto as macroalgas fazem parte de uma dieta tradicional no Oriente, especialmente no Japão, China e Coreia, por exemplo, os japoneses podem consumir mais de 1,6 kg de alga por ano *per capita* (Dawczynski et al., 2007), nos países

ocidentais o seu uso aplica-se essencialmente na extração de compostos utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar como fontes de ficocolóides, espessantes e géis (produção de agar, alginato, carragenanos, entre outros compostos) (Gómez-Ordóñez et al., 2010). Embora variando de espécie para espécie, as algas comestíveis são conhecidas pela sua riqueza em polissacarídeos, proteínas, minerais, vitaminas e baixo teor lipídico (Gómez-Ordóñez et al., 2010; Haddar et al., 2012). Além de apresentarem macronutrientes e vitaminas essenciais, as algas possuem ainda uma incrível quantidade de compostos bioativos bastante promissores nas áreas da indústria farmacêutica e alimentar. Alguns dos compostos que tem vindo a ser vastamente estudado são os antioxidantes (Haddar et al., 2012) e os polissacarídeos (Gómez-Ordóñez et al., 2010).

Em Portugal podem encontrar-se cerca de 250 espécies de algas vermelhas (Rhodophyta), 100 espécies de algas castanhas (Phaeophyta) e 60 espécies de algas verdes (Chlorophyta), sendo algumas delas comestíveis (Andrade et al., 2013). Dependendo do tipo de alga, extraem-se compostos com diferentes propriedades, por exemplo, as algas vermelhas são ricas em galactanos sulfatados, como o agar e carrageninas, largamente utilizados e estudados nas mais diversas áreas. Nas algas castanhas são os polissacarídeos, utilizados como antioxidantes na indústria alimentar (Gómez-Ordóñez et al., 2010).

Com o aumento do conhecimento surge assim a possibilidade de aliar todas as propriedades benéficas das macroalgas com a aplicação de revestimentos e/ou filmes comestíveis em alimentos. Haddar e colaboradores (2012) desenvolveram um filme onde utilizavam gelatina da pele de atum, ao qual adicionaram extrato metanólico da alga castanha, *Cystoseira barbata*. Com a adição do extrato de alga, as propriedades antioxidantes dos filmes aumentaram, sugerindo a aplicabilidade deste tipo de extratos na indústria alimentar. Um outro filme de gelatina de peixe incorporado com extrato de alga foi estudado por Rattaya e colaboradores (2009). Neste estudo os autores verificaram que a adição do extrato ao filme poderia ser benéfica para as propriedades mecânicas, fazendo aumentar a tensão de rutura do filme e a percentagem de alongamento na rutura.

Ainda não são conhecidos estudos com a aplicação direta de extratos de algas em alimentos, como por exemplo com função de revestimento. Tendo em conta a presença de compostos bioativos antioxidantes, antimicrobianos, entre outros, nestes organismos e o facto de ser uma matéria-prima com disponibilidade, incluindo capacidade produtiva em aquacultura, a investigação do potencial de aplicação de extratos de algas comestíveis na formulação de revestimentos alimentares poderá originar novos revestimentos que

permitam uma extensão do tempo de prateleira de PMPs com uma boa razão custo/benefício.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Recolha e Tratamento de Algas

As algas *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus spiralis*, *Codium tomentosum* e *Codium vermilara* foram recolhidas na costa de Peniche, Portugal durante o mês de Setembro de 2012. As diferentes algas foram lavadas em laboratório primeiramente com água salgada e de seguida com água destilada a fim de remover organismos invertebrados e outros detritos presentes nas amostras. Após a lavagem as algas foram liofilizadas, embaladas e armazenadas a -80°C.

Durante o presente trabalho foi utilizada a seguinte nomenclatura para as algas recolhidas:

- *Bifurcaria bifurcata*: MN1
- *Fucus spiralis*: MN 2
- *Codium tomentosum*: Q1
- *Codium vermilara*: Q2

#### 3.2. Obtenção do Extrato Etanólico das Algas

Para a preparação dos extratos das diferentes algas adaptou-se a metodologia de López e colaboradores (2011).

Os extratos foram obtidos a partir da alga anteriormente liofilizada e com recurso a um solvente polar. Foram pesados 2 g de biomassa seca e adicionados 22,5 ml de água e 7,5 ml de etanol (Aga, Lisboa, Portugal) (proporção de 3:1). A solução obtida ficou em agitação durante 6h, protegida da luz e à temperatura ambiente.

De seguida realizou-se uma centrifugação (2000 g; 10 minutos; 4°C) (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante foi recolhido. O sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro nº 4 da whatman, de modo a reter as partículas suspensas. O filtrado foi assim sujeito a evaporação a vácuo (Laborota 4000-efficient, Heidolph) para remoção do etanol, a 30°C, prosseguido de liofilização (SupplyLab, Cacém, Portugal) para remoção da água, resultando assim num extrato sólido.

### **3.3. Formulação de Soluções de Revestimento de Extrato de Algas: Preparação**

Foram preparadas soluções com uma concentração de 0,5 % (m/V) de extrato de alga, em água destilada, 0,5% (m/V) ácido cítrico (Scharlau, Sentmenat, Espanha) em água destilada e um controlo com água destilada.

#### **3.3.1. Quantificação de Polifenóis Totais (QTP)**

A quantificação de polifenóis das diferentes soluções de extratos de algas foi efetuada através do método de *Folin-Ciocalteu* adaptado de Rodríguez-Rojo e colaboradores (2012).

O método de *Folin-Ciocalteu* é um método simples e reprodutível bastante utilizado para a quantificação de compostos fenólicos (Dai e Mumper, 2010). O ácido gálico é utilizado como padrão e os valores são comparados como equivalentes de miligramas de ácido gálico/ml de extrato da amostra (Dai e Mumper, 2010).

Num microtubo adicionou-se água destilada (790 µl), amostra (10 µl) e reagente de *Folin-Ciocalteu* (Pancreac, Barcelona, Espanha) (50 µl). Após 2 minutos de repouso adicionou-se carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 20% (p/v) (150 µl). Procedeu-se a uma incubação de 60 minutos, no escuro à temperatura ambiente e depois foi medida a absorvância a 755 nm (Helios α, Thermo Electron Corporation). Foi utilizado ácido gálico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como padrão para a curva de calibração. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

A QTP foi expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico.mg<sup>-1</sup> de extrato.

#### **3.3.2. Avaliação da Capacidade de Redução do radical DPPH**

O método da capacidade de redução do radical *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) é baseado na redução do radical livre estável, o DPPH, por um antioxidante, permitindo assim estimar a capacidade antioxidante de amostras. Trata-se de um método espectrofotométrico, sendo que a absorvância do radical livre pode ser monitorizada na gama do visível (entre os 515-520 nm) (Noipa et al., 2011). Para a avaliação da capacidade de redução de DPPH nas amostras em estudo recorreu-se ao método descrito por Al-Dabbas e colaboradores (2007) com algumas alterações seguidamente descritas.

Previamente foi preparada uma solução de 0,1 mM de DPPH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em etanol absoluto. Para a reação final misturaram-se 10 µl de amostra em 990 µl da solução de DPPH. Após homogeneização das misturas, estas

foram incubadas durante 30 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517 nm, sendo que quando as misturas apresentavam a evolução da cor violeta para amarelo ocorreu a inativação dos radicais livres pela amostra. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. A capacidade de redução do radical DPPH foi calculada através da equação:

$$\% \text{ Redução DPPH} = \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{(\text{Abs}_{\text{controlo}})} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ : absorvância da solução de DPPH e amostra

$\text{Abs}_{\text{branco}}$ : absorvância de solvente (etanol) com amostra

$\text{Abs}_{\text{controlo}}$ : absorvância de solução de DPPH com solvente (etanol)

### 3.3.3. Quantificação de Azoto Total (Proteína)

A concentração de proteína das soluções de extratos foi determinada com base no método de *Kjeldahl*, segundo a Norma Portuguesa 2030:1996.

Os principais processos deste método são a digestão ácida, seguida de uma destilação e uma titulação. A digestão inicia-se com a adição de ácido sulfúrico a 96% (Sigma- Aldrich, Alemanha) à amostra juntamente com pastilhas de selénio (Merck, Alemanha), seguindo-se a digestão destas num digestor de Kjeldahl (Foss, Digestor 2006) a altas temperaturas. Após a digestão da amostra procedeu-se a uma destilação da mesma num destilador automático de Kjeldahl (Foss, Kjeltec™ 2100), onde foi adicionado NaOH (AnalaR Normapur, Alemanha) à amostra. Por fim, foi realizada uma titulação manualmente, com recurso a HCl 0,1N (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como titulante. Foram realizados duplicados de cada uma das soluções de extrato.

A quantidade de proteína em cada amostra foi determinada segundo a fórmula:

$$\text{Proteína} = \frac{\% \text{ Proteína}}{100} \times \text{massa amostra} \quad (\text{Eq. 2})$$

A percentagem de proteína foi determinada segundo a fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(\text{Va} - \text{Vb}) * \text{concentração do ácido} * 6,25 * 0,014}{m} * 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:  $V_a$  é o volume de titulante gasto para a amostra (ml);  $V_b$  o volume de titulante gasto para o branco (ml); e  $m$  a massa da amostra (g); 6,25 o fator de conversão de azoto em proteínas; 0,014 o equivalente em grama presente em 1ml de HCl (0,1 N).

#### **3.3.4. Avaliação da cor das soluções de extratos**

A cor das soluções de extratos foi determinada com recurso a um colorímetro (Konica Minolta CR-400, Japão). O equipamento foi calibrado usando uma placa branca refletora padrão e as leituras foram realizadas utilizando uma célula para líquidos (Konica Minolta CR-A503, Japão). Foram feitas nove leituras de cada solução de extrato.

Na avaliação dos parâmetros colorimétricos das amostras recorreu-se ao sistema CIELAB, tendo sido registados os valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ .

#### **3.3.5. Avaliação pH das soluções de extratos**

Para a avaliação do pH recorreu-se a um potenciómetro (Inolab 720, Alemanha) previamente calibrado. A sonda do potenciómetro foi mergulhada diretamente na solução de revestimento. Foram efetuadas 3 medições em cada solução de extrato.

#### **3.3.6. Avaliação da capacidade de inibição da atividade enzimática das soluções de revestimento**

A atividade das enzimas polifenol oxidase e polifenol peroxidase foram seguidas espectrofotometricamente a 25 °C de acordo com Ponce e colaboradores (2008).

Para determinar se as soluções de revestimento teriam uma ação direta na atividade das enzimas acima mencionadas, foi necessário realizar uma extração enzimática da matéria-prima a ser utilizada futuramente - a maçã. Para tal, foi seguido o método proposto por Jang e Moon (2011). A matéria-prima foi em primeiro lugar congelada a -80°C, para que a atividade das enzimas fosse residual aquando da homogeneização.

De modo a minimizar variabilidade de resultados entre amostras, cada extrato enzimático foi obtido da mistura das polpas de três fatias de maçã. Os pedaços de maçã, com cerca de 20 g, foram colocados conjuntamente com o dobro de volume de tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 7) (40 ml) (Scharlau, Sentmenat, Espanha), no frio, contendo 50 g/L de polivinilpirrolidona (pvp) (Scharlau, Sentmenat, Espanha). A mistura obtida foi mantida em agitação durante 3 minutos (protegida da luz e à temperatura ambiente). De seguida filtrou-se a solução com gaze para a retenção das partículas de maiores dimensões. O filtrado foi depois centrifugado a 12 000 g por 30 minutos a 4°C. A solução do sobrenadante foi dividida em alíquotas de 2 ml que foram conservadas a -80°C até

posterior utilização. Após descongelamento, as alíquotas foram imediatamente utilizadas para a determinação da atividade enzimática.

A atividade da enzima polifenol peroxidase (POD) foi detetada a 470 nm usando guaiacol (Scharlau, Sentmenat, Espanha) como substrato e peróxido de hidrogénio  $H_2O_2$  (Technical, Alemanha) como dador de hidrogénio. Foi feita uma solução de mistura de substrato que continha 10 ml de 1% de guaiacol, 10 ml de 0,3% de  $H_2O_2$  e 100 ml de 0,05 M tampão fosfato de sódio (pH 6,5). A reação final continha 2,87 ml de mistura de substrato, 0,1 ml de extrato enzimático e 0,03 ml de solução de revestimento. A reação foi seguida durante 120 s, com intervalos de 20 s. A atividade enzimática foi determinada pelo declive da reta resultante do acompanhamento da evolução da absorvância durante os 120 s. Os resultados obtidos foram expressos em  $abs.s^{-1}$ .

Para o ensaio da atividade da polifenol oxidase (PPO), foi utilizado o catecol como substrato. A mistura de substrato continha 20 mM de catecol (Scharlau, Sentmenat, Espanha) em 5 mM tampão fosfato de sódio (pH 7). A reação na cuvette ocorreu pela adição de 2,9 ml de mistura de substrato com 0,1 ml de extrato enzimático e 0,03 ml de solução de revestimento. A taxa de oxidação do catecol foi seguida a 400 nm, durante 120 s, com intervalos de 20 s. A atividade enzimática foi determinada pelo declive da reta resultante do acompanhamento da evolução da absorvância durante os 120 s. Os resultados obtidos foram expressos em  $abs.s^{-1}$ .

A atividade de ambas as enzimas foi avaliada em triplicado para todas as soluções de revestimento em questão. Para cada fonte de enzima foi também realizado um branco com 0,03 ml de água destilada em substituição das soluções de revestimento (amostra controlo). Foram realizados controlos negativos utilizando apenas as soluções de revestimento.

### **3.4. Avaliação da eficácia dos extratos como revestimentos alimentares em maçãs de IV gama.**

#### **3.4.1. Preparação da matéria-prima e aplicação do revestimento**

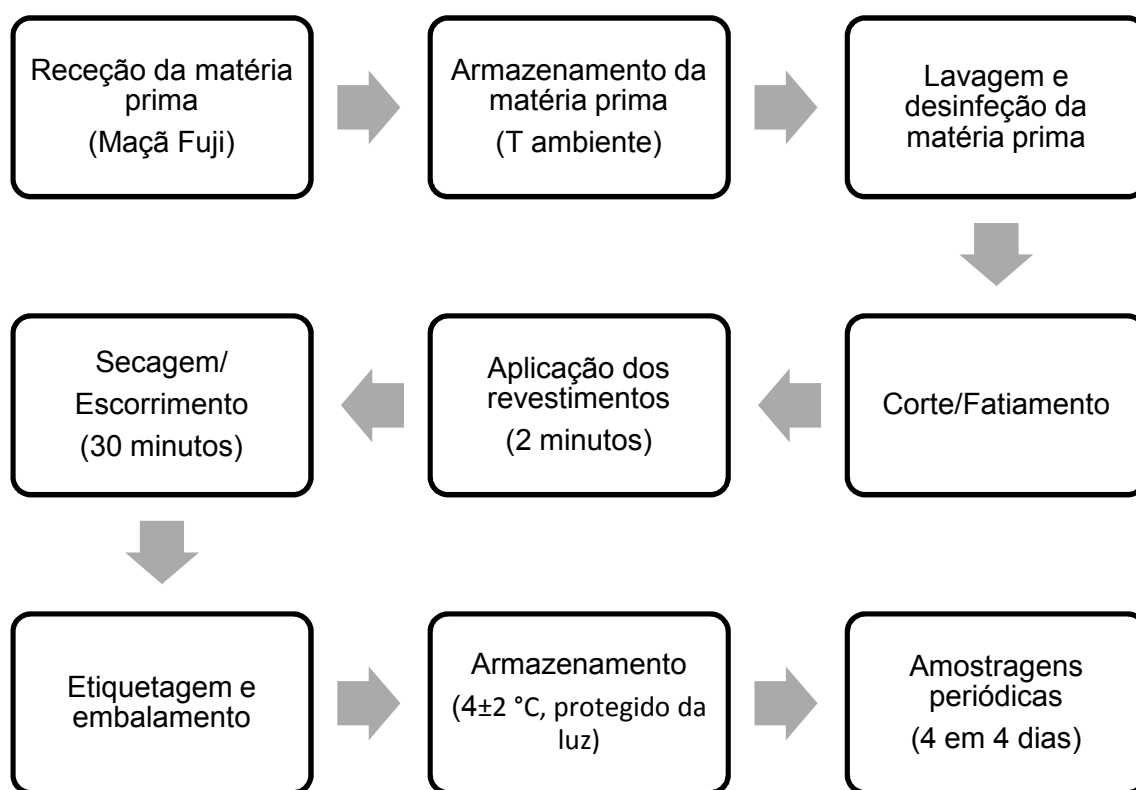
O fluxograma do processo de produção das amostras de maçã fatiada encontra-se representado na figura 7. Tendo sido adaptado o processo descrito por Rojas-Graü e colaboradores (2008) e Wu e Chen (2013).

As maçãs (Fuji) foram fornecidas pela empresa Campotec S. A. e armazenadas à temperatura ambiente. Foram submetidas a uma etapa de desinfecção por imersão durante 15 minutos numa solução de Amukina a 2,5%. As maçãs foram fatiadas com

recurso a um fatiador de frutas. O peso das fatias de maçã variou entre 16-18 g, com uma espessura de 2 cm. Um máximo de duas peças de fruta foi processado simultaneamente para minimizar o tempo de exposição a condições agressivas para a qualidade final do produto.

De seguida a maçã fatiada foi imersa na solução de revestimento. Foram utilizados os seguintes tratamentos: extratos de algas a 0,5%, água (controlo) e ácido cítrico a 0,5% durante 2 minutos e secas numa rede, protegidas da luz (de modo a minimizar o seu escurecimento), à temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), num período de 30 minutos.

Por fim, embalaram-se as fatias de maçã, três fatias de maçã em cada saco de amostragem (100 x 150 mm), que foram armazenadas, até à data de análise, em refrigeração a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  (humidade relativa (HR) 45%) durante um período de 20 dias. Foram retiradas embalagens de cada um dos tipos de tratamento, para análise aos 0, 4, 8, 12, 16 e 20 dias.



**Figura 7.** Fluxograma do processo de produção das amostras de maçã fatiada resultante do presente estudo.

### 3.4.2. Alterações de cor em maçãs processadas e homogeneizado de maçã

Primeiramente foi realizado um teste de cor a maçãs revestidas e a homogeneizado de maçã, armazenados à temperatura ambiente e sem proteção da luz.

As maçãs foram revestidas tal como foi descrito na subsecção anterior. Para a realização do homogeneizado de maçã, 3 fatias de maçã previamente revestidas foram homogeneizadas com recurso a um homogeneizador (Lauson, Barcelona, Espanha).

Foram registadas as alterações de cor recorrendo a um colorímetro. As leituras foram realizadas com um ângulo de 90°. Foram feitas nove leituras em cada amostra mudando a posição dos pedaços de maçã. Nas fatias de maçã revestidas, as medições de cor foram realizadas à superfície de cada fatia, tal como no homogeneizado de maçã. Em ambos os casos foi avaliada a cor inicial e após 90 minutos (maçã fatiada) e 10 minutos (homogeneizado de maçã). Todas as medições foram realizadas numa base branca de modo a minimizar as interferências de cor do meio.

Na avaliação dos parâmetros colorimétricos das amostras recorreu-se ao sistema CIELAB, tendo sido registados os valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$  para o cálculo do índice de escurecimento (BI), definido como a pureza da cor castanha, que é geralmente utilizada como um indicador do grau de escurecimento em produtos alimentares que contenham açúcar (Palou e Swanson 1999; Rojas-Graü et al. 2008; Perez-Gago et al. 2005).

$$BI = \frac{100 (x - 0,31)}{0,172} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

$$x = \frac{(a + 1,75 L)}{(5,645 L + a - 3,012 b)} \quad (\text{Eq. 5})$$

No início e no final de cada ensaio as maçãs e o homogeneizado de maçã foram fotografados (Olympus, modelo E-PL1, China). Todas as fotografias foram realizadas no mesmo local (caixa com o interior preto) mesma distância (máquina-objeto) e mesma intensidade luminosa de modo a uniformizar as condições de luz das fotografias.

### 3.4.3. Alterações de características físico-químicas das maçãs processadas

#### 3.4.3.1. Determinação da percentagem de peso perdido

O peso das fatias de maçã foi determinado durante o armazenamento para a avaliação da eficácia dos revestimentos utilizados como barreiras à transferência de vapor de água. A percentagem de peso perdido foi calculada medindo o peso (Sartorius CPA 225D, Goettingen, Alemanha) individual das fatias de maçã a cada 4 dias (Pizato et al., 2013) segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ Peso perdido} = \frac{\text{Massa inicial} - \text{Massa final}}{\text{Massa inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Em todos os dias de análise (0, 4, 8, 12, 16 e 20 dias) a determinação do peso foi feita às mesmas fatias de maçã.

#### 3.4.3.2. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade das amostras de maçã foi avaliado com recurso a um analisador de humidade automático (Mettler Toledo HB43 Halogen, Suíça), a uma temperatura de 120°C. Cada porção de maçã analisada tinha em média 0,500 g de peso.

#### 3.4.3.3. Determinação do teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi determinado de acordo com a norma portuguesa EN 12143:1999.

Assim extraiu-se um pouco da polpa obtida anteriormente e procedeu-se à medição do *Brix-Tc* (ABBE Refractometer, EUA). O instrumento utilizado apresentava a opção com correção dos valores em função da temperatura. Foram feitas 3 medições a cada amostra analisada.

Os resultados apresentados foram expressos em g sacarose/100 g produto.

#### 3.4.3.4. Avaliação do pH

Para a avaliação do pH das amostras seguiu-se a norma portuguesa NP EN 1132:1996. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma homogeneizadora, seguindo-se a medição direta do valor de pH com recurso a um potenciómetro previamente calibrado.

Foram efetuadas 3 medições em cada amostra analisada.

#### 3.4.3.5. Avaliação da firmeza e atributo crocante

A firmeza e o atributo crocante das amostras foram medidos com um texturómetro *TA.XT.plus* a partir do programa *TEE32*. Foi medida a força ao longo do tempo de compressão da amostra (5,5 cm/1,5 cm/1 cm) com uma sonda de 1 mm de diâmetro (sonda P2, anexo 1), a uma velocidade de 1,0 mm.s<sup>-1</sup> e uma profundidade de 25,0mm. Foram efetuados 3 ensaios por amostra em diferentes locais.

Os atributos texturais avaliados foram a firmeza definida como a área total da curva de compressão (N.s) correspondente à firmeza da amostra, e o atributo crocante relacionado com o número de picos positivos da curva força vs tempo (Costa et al., 2011).

#### 3.4.3.6. Avaliação da cor

As medições de cor foram realizadas periodicamente, e a cor na superfície de corte foi avaliada recorrendo a um colorímetro. O procedimento foi o mesmo que no ponto 3.4.2., também foi avaliado o índice de escurecimento das maçãs revestidas.

Tal como no ponto 3.4.2. as maçãs foram fotografadas de modo a obter um registo fotográfico das mesmas. Em todos os dias de análise (0, 4, 8, 12, 16 e 20 dias) a medição de cor e o registo fotográfico foi feito às mesmas fatias de maçã.

#### 3.4.3.7. Avaliação da atividade enzimática das enzimas polifenol oxidase e polifenol peroxidase

As atividades enzimáticas de PPO e POD foram avaliadas nas fatias de maçã em estudo, tal como descrito anteriormente no ponto 3.3.6. No entanto, aquando a determinação da sua atividade, não foram adicionados os 0,03 ml de solução de revestimento, uma vez que as maçãs já se encontravam revestidas com os mesmos.

### 3.5. Caraterização de filmes comestíveis

#### 3.5.1. Preparação de filmes de alginato e quitosano enriquecidos com extrato etanólico de *Codium tomentosum*

Foram testadas 4 diferentes formulações de filmes comestíveis (tabela 4).

**Tabela 4** Tipos de soluções formadoras de filmes formuladas.

<b>Controlo 1</b>	1% Alginato de sódio + 1% glicerol
<b>AE</b>	1% Alginato de sódio + 0,5% extrato Q 1 + 1% glicerol
<b>Controlo 2</b>	1% Quitosano + 0,1% Tween 80
<b>QE</b>	1% Quitosano + 0,5% extrato Q 1 + 0,1% Tween 80

Para a preparação da solução do controlo 1, dissolveu-se 1 g de alginato de sódio (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemanha) em 100 ml de água destilada a 75°C, deixando-se em agitação cerca de 45 minutos, de modo a promover a maior homogeneização possível. Após completa dissolução do alginato de sódio, a solução foi arrefecida à temperatura ambiente até aos 45°C para a adição de 813 µl de glicerol (Scharlau, Sentmenat, Espanha) seguida de homogeneização durante 15 minutos. Foi então transferido para uma placa de diâmetro 15 cm, um volume correspondente a uma densidade de superfície de sólidos de 70 g.m<sup>-2</sup> (Vargas et al., 2009). A preparação das soluções formadoras de filme de alginato e extrato foram realizadas do mesmo modo que a anterior, com a exceção de que antes da adição do alginato de sódio se fez a dissolução de 0,5 g do extrato.

Para a formulação dos filmes de quitosano (Sigma-Aldrich, Alemanha) preparou-se previamente uma solução de 1% de ácido cítrico (dissolvendo-se 1 g de ácido cítrico em 100 ml de água destilada), à qual foi adicionada 1 g de quitosano para obter uma solução de 1% de quitosano, manteve-se em agitação à temperatura ambiente durante 8 horas, de modo a solubilizar o quitosano; adicionou-se ainda 0,1% de tween 80 (934 µl) (Scharlau, Sentmenat, Espanha), segundo o método descrito por Vargas e colaboradores (2009). Visto que após 8 horas de agitação a solução de quitosano apresentava alguns compostos insolúveis efetuou-se filtração em gaze de modo a reter as partículas insolúveis. Segundo Chen e colaboradores (2007) o quitosano é apenas parcialmente dissolvido em soluções de 1% de ácido cítrico, pelo que é aconselhável realizar uma filtração para obter uma solução límpida. Após a filtração foram transferidos 58,92 ml de

solução para uma placa (correspondente a um densidade de superfície de 70 g/m<sup>2</sup>), e submetido a vácuo em dessecadores durante 3 horas com o objetivo de retirar todas as bolhas de ar presentes (Tripathi et al., 2009).

Por último, para a formulação da solução formadora de filme enriquecida com 0,5% de extrato de alga, os métodos são iguais ao anterior com a exceção de que antes da adição do quitosano se adicionou 0,5% (500mg) de extrato de alga à solução de 1% de ácido cítrico. Foram transferidos para a placa de petri 35,4 ml de solução formadora de filme.

A secagem de todos os filmes foi realizada num secador de tabuleiros (Tray Drier) com um fluxo de ar de 0,70 m.s<sup>-1</sup>, temperatura de ar seco de 23°C e humidade relativa de 55%. A secagem foi prolongada até estabilização do peso dos filmes (aproximadamente 24 horas). Após a secagem foram armazenados em dessecadores com uma humidade relativa de 0 (com sílica) para posterior utilização.

### **3.5.2. Avaliação de propriedades físicas dos filmes**

#### **3.5.2.1. Solubilidade dos filmes**

Na determinação de solubilidade dos filmes formulados anteriormente foi delineado um protocolo com base em Phan e colaboradores (2005) e por Hosseini e colaboradores (2013).

Para tal, secou-se em forno (Mettler) a 105°C durante 24 h uma amostra de 0,5 g de cada um dos filmes. Após a secagem o peso dos filmes foi determinado (peso seco inicial) (W<sub>i</sub>). De seguida os filmes secos foram imersos em 30 ml de água destilada em suave agitação por 24 horas à temperatura de 21°C (± 2°C). De seguida as soluções resultantes foram filtradas com um filtro Whatman 4, com o objetivo de recuperar a matéria insolúvel. Os filtros que continham a fração insolúvel foram secos a 105°C durante 24 horas e pesados no final, de modo a obter o peso seco final (W<sub>f</sub>), correspondente à matéria insolúvel.

A solubilidade do filme (SF %) foi calculada segundo a equação:

$$SF (\%) = \left( \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde,  $W_i$  corresponde ao peso inicial do filme seco e  $W_f$  é o peso da matéria insolúvel presente no resíduo seco do filme. Todos os testes foram realizados em triplicado.

#### 3.5.2.2. Espessura dos filmes

A espessura dos filmes obtidos foi determinada com recurso a um micrómetro digital (com uma precisão de 0,01mm; Metler, Toledo) como descrito em Maran e colaboradores (2013). A espessura foi medida em 15 pontos diferentes dos filmes e a média dos valores foi calculada e reportada em milímetros (mm).

#### 3.5.2.3. Absorção de luz e transparência dos filmes

As propriedades de barreira de luz dos filmes foram medidas espectrofotometricamente, expondo os filmes à absorção de luz a um comprimento de onda de 550 nm, de acordo com Al-Hassan e Norziah (2012). A transparência dos filmes foi medida colocando amostras retangulares dos filmes com uma área de 4,5 cm<sup>2</sup> diretamente dentro de uma célula do espectrofotómetro. A absorvância foi lida com o recurso a um espectrofotómetro. A transparência (T) foi calculada de acordo com a equação:

$$T = \frac{A_{550}}{x} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde  $A_{550}$  corresponde à leitura da absorvância da amostra e o  $x$  corresponde à espessura do filme (mm). De acordo com esta equação, um maior valor de T poderá indicar um menor grau de transparência. Os testes foram realizados em triplicados para cada tipo de filme.

#### 3.5.2.4. Propriedades Mecânicas: Testes de tensão/perfuração e de rutura dos filmes

Os testes de perfuração permitem obter informações acerca do comportamento dos filmes quando aplicados nos alimentos em várias situações de manipulação abusiva (Ghasemlou et al., 2011). Esta medição foi feita utilizando um analisador de textura. Para avaliar a resistência à perfuração, um pedaço de filme com 4 cm<sup>2</sup> foi colocado sobre uma plataforma para o teste com um orifício de diâmetro 1 cm. O filme foi perfurado com uma sonda cilíndrica de 2 mm de diâmetro (anexo 1).

A força máxima medida ao longo do teste, ou seja, a tensão de perfuração ( $T_p$ ; N.mm<sup>-2</sup>), foi registada (valores correspondentes ao pico máximo, valores do eixo y). A

partir dos valores da distância que a sonda percorreu até romper o filme foi possível calcular a taxa de deformação (%) dos filmes através da seguinte equação 9 (anexo 2):

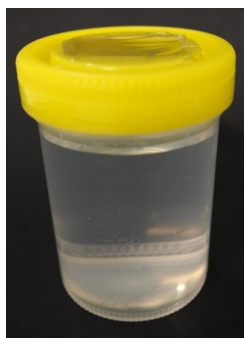
$$\text{Taxa de deformação (\%)} = \frac{L - L_i}{L_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde: L alongamento na perfuração (mm);  $L_i$  distância inicial (mm)

Foram realizadas 9 réplicas para cada tipo de filme.

#### 3.5.2.5. Permeabilidade ao vapor de água (WVP)

A transferência de vapor de água através dos filmes anteriormente formulados foi medida de acordo com a ASTM E-96-95 (ASTM, 1995) e Villalobos e colaboradores (2006). Foram utilizados recipientes de plástico, onde se depositou água destilada (HR 100%; 2800 Pa) até 2 cm do filme que se encontrava no topo do recipiente, com uma área de filme exposta de 6 cm<sup>2</sup> (figura 8). Este recipiente foi acondicionado dentro de um dissecador com uma solução saturada de NaCl (HR 75,7%; 2119,6 Pa) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Através deste desenho experimental o filme encontrava-se de um lado exposto a uma humidade relativa de 100% fornecida pela água destilada e do outro lado exposto a uma humidade relativa de 75,7% fornecida pela solução de NaCl, permitindo medir a taxa de transmissão de vapor de água através do filme. Os recipientes que continham o filme foram acondicionados dentro do dissecador durante uma hora a partir da qual foram realizadas pesagens em intervalos de 30 minutos durante 4 horas de ensaio.



**Figura 8.** Imagem representativa de sistema utilizado para a avaliação do WVP dos filmes.

O declive da perda de peso dos recipientes vs tempo de ensaio foi obtido por uma regressão linear. A medição da permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada segundo a equação descrita por Hosseini e colaboradores (2013).

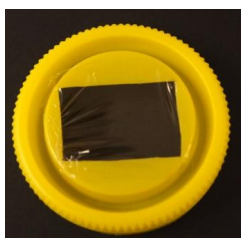
$$WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta P} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde: WVP corresponde à permeabilidade ao vapor de água ( $\text{kg.m/s.m}^2.\text{Pa}$ ); WVTR taxa de transferência de vapor de água determinada pelo declive da reta a dividir pela área de filme exposto; L é a espessura média dos filmes; e  $\Delta P$  corresponde à variação de pressão parcial entre as duas fases do filme.

#### 3.5.2.6. Isotérmicas de sorção de humidade dos filmes

Para a determinação das isotérmicas de sorção de humidade foi utilizado um protocolo adaptado de Phan e colaboradores (2005) e Villalobos e colaboradores (2006). Inicialmente foi determinada a humidade relativa dos filmes para obter a humidade inicial destes.

Pedaços de filme com uma área fixa de  $6 \text{ cm}^2$  foram expostos a várias humidades relativas proporcionadas por diferentes soluções saturadas correspondendo a diferentes atividades de água ( $a_w$ ). As soluções utilizadas foram  $\text{MgCl}_2$  (RH 33%;  $a_w$  0,34) (AnalaR Normapur, Alemanha),  $\text{KCl}$  (RH 44%;  $a_w$  0,88) (Merck, Darmstadt, Alemanha),  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (RH 50%;  $a_w$  0,59) (AnalaR Normapur, Alemanha),  $\text{NaCl}$  (RH 75%;  $a_w$  0,76) e  $\text{KNO}_3$  (RH 93%;  $a_w$  0,93) (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram pesadas no primeiro dia de ensaio de duas em duas horas e nos restantes dias diariamente até atingirem um peso constante (diferenças de 0,0001g) (figura 9).



**Figura 9.** Imagem representativa de sistema utilizado para a medição de peso dos filmes para as isotérmicas.

Após o equilíbrio, realizou-se a secagem dos filmes para obtenção do peso seco, as amostras foram colocadas a  $105^\circ\text{C}$  durante 48h. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

### 3.5.2.7. Microbiologia: Difusão em disco

A sensibilidade da microflora nativa da maçã às soluções formadoras de filmes foi determinada pelo método da difusão em disco (Jiang et al., 2012).

A microflora nativa da maçã foi preparada com 10 g de matéria-prima macerada em 90 ml de *Mueller-Hinton Broth* (MHB) (pH 7,4 ± 0,1) (Merck, Darmstadt, Alemanha) com o auxílio de um *stomacher* (Interscience, Nom, França) de seguida foi inoculado 18± 2 h a 37°C.

Para o método de difusão em disco, a microflora da maçã preparada anteriormente foi inoculada na superfície de placas (ø 90 mm) com *Mueller-Hinton Agar* (MHA) (pH 7,4 ± 0,2) (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia). Cinco discos de papel de filtro estéreis impregnados com as soluções formadoras de filme e solução de extrato Q1 foram colocados na superfície de cada uma das placas com o auxílio de uma pinça estéril. Foi também utilizado um disco de antibiótico comercial, a Amoxicilina (10µg) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) como controlo. As placas foram incubadas aerobicamente a 37°C, 24h (Binder, Tuttlingen). O diâmetro da zona de inibição foi medido após as 24 h de incubação. A sensibilidade às diferentes soluções utilizadas foi classificada pelo diâmetro dos halos de inibição como: diâmetros inferiores a 8 mm, não sensível; diâmetros entre 9-14 mm, sensível; diâmetros entre 15-19 mm, muito sensível; diâmetros superiores a 20 mm, extremamente sensíveis (Ponce et al., 2008).

### 3.6. Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico foi efetuado com recurso ao programa *IBM® SPSS® Statistics* versão 21 (EUA). Os dados obtidos foram avaliados através do teste de análise de variância com 1 fator (ANOVA-1 fator) ou análise de variância com 2 fatores (2 way ANOVA), seguido pelo teste de *Dunnnett* para comparações com o controlo, ou seguido pelo teste de LSD para comparações múltiplas. Para as condições indicadas nas figuras, os resultados representam as médias ± desvio padrão da média. O teste de *Levene* foi usado para testar a homogeneidade de variância para todas as variáveis. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância  $\alpha$  de 0,05.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização das soluções de revestimento com extratos de algas

As soluções de extrato de algas utilizados como revestimentos ou incluídos na formulação dos revestimentos investigados neste estudo foram caracterizadas em termos de quantificação total de polifenóis, redução do radical DPPH, proteína, cor, pH e atividade enzimática da PPO e POD. Os resultados desta caracterização encontram-se na tabela 5.

A quantificação de polifenóis totais (mg/ml) e a determinação da percentagem de redução de DPPH eram de extrema importância visto que um dos objetivos da aplicação das soluções de revestimento em maçã era a diminuição do escurecimento na maçã minimamente processada por inibição da oxidação. Pela determinação efetuada, as soluções com maior quantidade de polifenóis totais foram a MN1 e a MN2, estes resultados eram espectáveis pois estas soluções resultavam da adição de extratos de algas com elevada quantidade de polifenóis totais e poder antioxidante (Zubia et al., 2009; Andrade et al., 2013). As soluções resultantes dos extratos de Q1 e Q2 apresentavam uma quantidade de polifenóis totais quase vestigial e uma percentagem de redução de DPPH muito baixa, valores concordantes com o baixo teor em compostos antioxidantes reportados na literatura para estas espécies de algas (Ciancia et al., 2007; Manivannan et al., 2008; Valentão et al., 2010).

A cor das soluções de revestimento foi determinada para compreender se a cor inicial das fatias de maçã era influenciada pela coloração das soluções de revestimento. No presente estudo observou-se que a cor das soluções não influenciou a cor do produto final.

Na caracterização da composição dos extratos determinaram-se os teores em proteína. Uma vez que o teor de lípidos reportado na literatura para as algas em estudo é residual, o teor em lípidos não foi considerado (Manivannan et al., 2008; Mohamed et al., 2012). Considerando a massa de extrato utilizada na formulação dos revestimentos, o teor em lípidos foi desprezado. O pH das soluções foi determinado com o objetivo de conhecer as condições iniciais das soluções de revestimento.

A atividade das enzimas polifenol peroxidase e polifenol oxidase foi determinada *in vitro* com o intuito de perceber previamente se as soluções de revestimento teriam algum efeito na atividade das enzimas. Com a análise dos resultados obtidos pode-se observar que as soluções com extrato de alga têm a capacidade de inibir a atividade enzimática da PPO e da POD.

**Tabela 5.** Caracterização das soluções de revestimento controle (água), ácido cítrico (AC), *Fucus spiralis* (MN1), *Bifurcaria bifurcata* (MN2), *Codium tomentosum* (Q1) e *Codium vermilara* (Q2): quantificação polifenóis totais (QTP), percentagem redução de DPPH, proteína total, cor, pH, inibição da atividade enzimática de peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão (n=3; cor n=9). Diferenças estatisticamente significativas em relação: \* controle; # AC; t MN1; & MN2; £ Q1 (p< 0.05, ANOVA, teste de LSD).

	QTP (mg/ml)	% Redução DPPH	Proteína total (g/100g)	Cor	pH
<b>Controlo</b>	0,0000	0,0	0	L: 36,64 $\pm$ 1,03 a*: -0,75 $\pm$ 0,03 b*: 1,83 $\pm$ 0,07	5,80 $\pm$ 0,02
<b>AC</b>	0,0016 $\pm$ 0,01	7,5* $\pm$ 2,09	0	L: 34,87 $\pm$ 0,96 a*: -0,75 $\pm$ 0,04 b*: 1,76 $\pm$ 0,09	2,40 $\pm$ 0,01
<b>MN1</b>	0,5000* <sup>#</sup> $\pm$ 0,02	47,2* <sup>#</sup> $\pm$ 2,21	0,28* <sup>#</sup> $\pm$ 0,02	L: 22,52 $\pm$ 0,32 a*: -1,27 $\pm$ 0,02 b*: 10,09 $\pm$ 0,12	6,13 $\pm$ 0,01
<b>MN2</b>	0,3500* <sup>#t</sup> $\pm$ 0,03	25,3* <sup>#t</sup> $\pm$ 0,77	0,21* <sup>#t</sup> $\pm$ 0,03	L: 19,58 $\pm$ 0,34 a*: 1,34 $\pm$ 0,03 b*: 4,54 $\pm$ 0,09	5,81 $\pm$ 0,02
<b>Q1</b>	0,0028 <sup>t&amp;</sup> $\pm$ 0,02	1,7* <sup>t</sup> $\pm$ 0,95	0,13* <sup>#t&amp;</sup> $\pm$ 0,05	L: 33,87 $\pm$ 0,90 a*: -3,18 $\pm$ 0,10 b*: 11,63 $\pm$ 0,35	6,72 $\pm$ 0,02
<b>Q2</b>	0,0170* <sup>#t&amp;£</sup> $\pm$ 0,01	1,1* <sup>#&amp;£</sup> $\pm$ 3,07	0,11* <sup>#t&amp;£</sup> $\pm$ 0,01	L: 32,54 $\pm$ 0,50 a*: -2,70 $\pm$ 0,07 b*: 10,83 $\pm$ 0,22	6,80 $\pm$ 0,01
		Atividade POD (abs.s <sup>-1</sup> )		Atividade PPO (abs.s <sup>-1</sup> )	
<b>Controlo</b>		4,00E-5 $\pm$ 0,00		3,50E-4 $\pm$ 7,10E-05	
<b>AC</b>		2,50*E-5 $\pm$ 7,07 E-6		2,50E-4 $\pm$ 7,10E-05	
<b>MN1</b>		2,00E-5 $\pm$ 1,41E-05		1,90* <sup>#</sup> E-4 $\pm$ 1,4E-04	
<b>MN2</b>		2,00* <sup>t</sup> E-5 $\pm$ 0,00		2,00* <sup>#</sup> E-4 $\pm$ 7,10E-05	
<b>Q1</b>		1,50 <sup>&amp;</sup> E-5 $\pm$ 7,07E-6		1,50* <sup>#</sup> E-4 $\pm$ 7,10E-05	
<b>Q2</b>		1,50 <sup>&amp;</sup> E-5 $\pm$ 0		1,50* <sup>#</sup> E-4 $\pm$ 0,00	

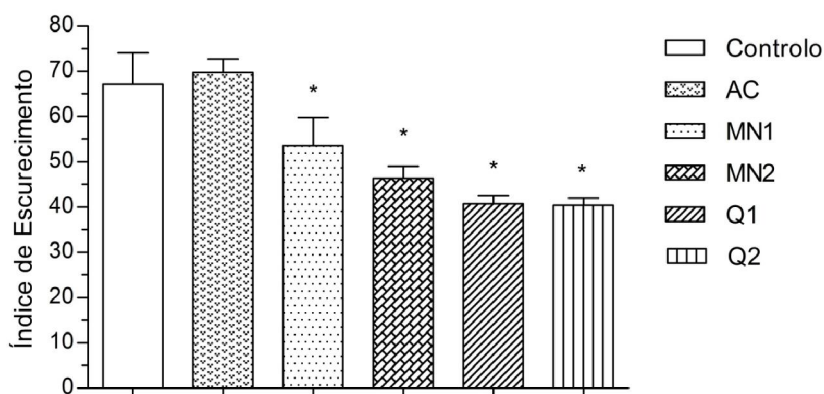
Após a caracterização das soluções de revestimento a utilizar, estas foram efetivamente aplicadas *in vivo* em maçãs fatiadas. Os resultados obtidos encontram-se representados nos pontos 4.2 e 4.3.

#### **4.2. Avaliação do efeito das soluções de revestimento em maçã fatiada e homogeneizado de maçã à temperatura ambiente**

Com o intuito de avaliar o potencial de utilização dos extratos produzidos na formulação de revestimentos comestíveis para produtos de IV gama foram efetuados dois testes preliminares.

No primeiro teste as amostras de maçã fatiada foram imersas nas soluções de revestimento água (controlo), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e *Codium vermilara* (Q2) (durante 2 minutos, com uma agitação suave num volume de 100 ml de solução) e depois expostas à temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sem qualquer proteção da luz solar durante 90 minutos.

Após o ensaio foi avaliado o índice de escurecimento nas fatias de maçã (figura 10). As amostras tratadas com as soluções de revestimento com os extratos de algas apresentaram um índice de escurecimento significativamente inferior ao controlo (água) ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste *Dunnett*). Pode-se afirmar que a aplicação das soluções de revestimento enriquecidas com os extratos de algas traz benefícios para a conservação de maçã minimamente processada relativamente a este atributo de qualidade, bastante valorizado pelo consumidor. A evolução da cor nas fatias de maçã foi ainda acompanhada fotograficamente, estando os registos apresentados na figura 11. Os resultados obtidos no índice de escurecimento são assim corroborados pelas fotografias apresentadas, pois as fatias de maçã revestidas com soluções enriquecidas com extrato de alga apresentaram, após 90 minutos, menores alterações visuais do que o controlo e o ácido cítrico.



**Figura 10.** Índice escurecimento das amostras tratadas com as soluções 0,5% de extrato de algas (*Fucus spiralis* (MN1), *Bifurcaria bifurcata* (MN2), *Codium tomentosum* (Q1) e *Codium vermilara* (Q2)) ou 0,5% de ácido cítrico ou água (controlo) após 90 minutos de exposição à temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), sem proteção da luz. Valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). \* Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ( $p<0,05$ , ANOVA, teste *Dunnett*).

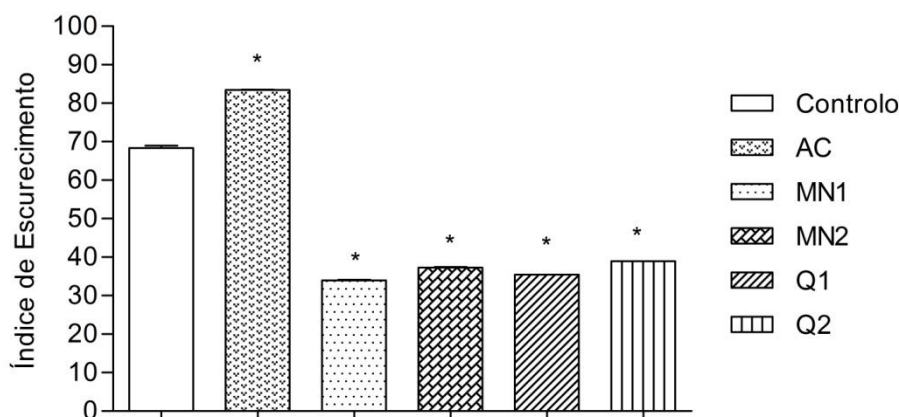


**Figura 11.** Alterações/evolução visual das amostras revestidas com água (controlo), soluções de 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2), imediatamente após a aplicação dos revestimentos (0 minutos) e aos 90 minutos de exposição à temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e sem proteção da luz.

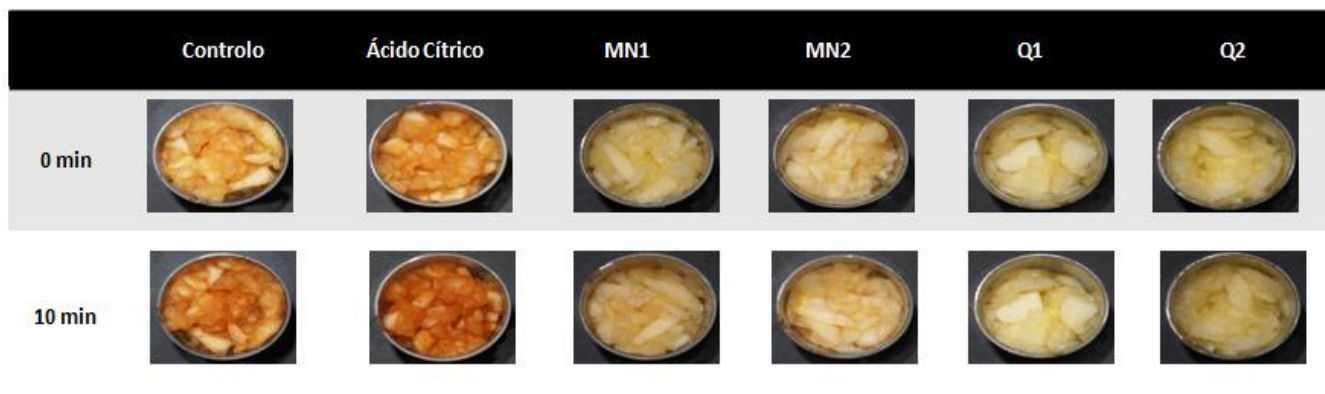
O segundo ensaio realizado para a avaliação da potencial capacidade protetora dos extratos foi a sua aplicação em puré de maçã (produzido através da homogeneização de maçã fatiada). O índice de escurecimento foi determinado após 10 minutos de exposição do homogeneizado à temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e sem proteção da luz, estando os resultados apresentados na figura 12. Foi observada uma redução significativa do índice

de escurecimento nas amostras tratadas com os concentrados de origem marinha relativamente à amostra de controlo ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste *Dunnnett*).

As amostras revestidas com solução de ácido cítrico, apesar da utilização corrente deste como agente antioxidante e regulador de acidez (E-330) (95/2/CE), apresentaram um índice de escurecimento superior ao controlo. Este aspeto será abordado posteriormente no ponto 4.3.3. Quanto às restantes amostras tratadas com as soluções de revestimento com extrato de alga, todas apresentaram um índice de escurecimento significativamente inferior ao controlo, contribuindo assim para uma melhor manutenção do apelo visual do produto. A evolução da cor dos homogeneizados de maçã foi ainda acompanhada fotograficamente (figura 13). Os resultados obtidos no índice de escurecimento são corroborados pelas fotografias apresentadas, pois os homogeneizados provenientes de fatias de maçã revestidas com soluções com extrato apresentaram, após 10 minutos, menores alterações visuais do que as tratadas com controlo e ácido cítrico.



**Figura 12.** Índice de escurecimento de homogeneizado de maçã revestidas com água (controlo) e soluções de 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2) após 10 minutos de exposição à temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), sem proteção da luz. Valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). \* Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste *Dunnnett*).



**Figura 13.** Alterações/evolução visual de homogeneizado de maçã pré-revestidas com água (controlo), soluções de 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2), imediatamente após a aplicação dos revestimentos (0 minutos) e aos 10 minutos de exposição à temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e sem proteção da luz.

Após a aplicação das soluções de revestimento e a da avaliação do seu efeito em maçãs fatiadas e em homogeneizado de maçã, pode-se concluir que os compostos testados têm potencial de aplicação na formulação de revestimentos comestíveis para produtos de IV gama.

Para avaliação da funcionalidade destes num produto produzido e armazenado em condições semelhantes às dos produtos análogos comercializados foi investigado o efeito da aplicação das soluções de revestimento em maçãs minimamente processadas, armazenadas a  $4^\circ\text{C}$ , protegidas da luz durante 20 dias de armazenamento.

#### **4.3. Avaliação do efeito da introdução dos extratos de origem marinha na formulação de revestimentos em maçã de IV gama**

A avaliação da qualidade da maçã Fuji revestida com as soluções de revestimento utilizadas no presente estudo foi baseada em análises tipo normalmente realizadas e de acordo com o efetuado neste tipo de ensaios na literatura, de forma a contemplar a evolução de parâmetros físicos e químicos significativos para a qualidade do fruto. Assim, na maçã revestida com as diferentes soluções de revestimento e no controlo, as análises efetuadas foram: percentagem de perda de massa, variação de pH, variação teor de sólidos solúveis (Brix $^\circ$ ), variação do teor de humidade entre durante os 20 dias de ensaio. Foi ainda acompanhada a evolução dos atributos texturais das amostras, o índice de escurecimento, e a atividade enzimática de POD e PPO.

#### 4.3.1. Alterações físico-químicas de maçãs revestidas com soluções de revestimento

Em produtos minimamente processados as taxas de respiração aumentam, quando comparados com produtos não processados. O corte e consequente rutura de tecidos e aumento da área de contacto com o meio ambiente são alguns fatores que levam a uma perda de água para o meio ambiente, e a uma rápida perda de massa dos frutos e vegetais (Qi et al., 2011). A perda de massa em frutas é devida a processos de transpiração e respiração que são determinados pelo gradiente de pressão do vapor de água entre a fruta e o ambiente envolvente (Maguire et al., 2000; Valero et al., 2013). Após 20 dias de armazenamento, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras submetidas aos diferentes tratamentos na percentagem de peso perdido entre o dia 0 e o dia 20 dos ensaios ( $p < 0,05$ ) (tabela 6).

Bai e colaboradores (2003) verificaram que maçãs Fuji não revestidas apresentavam uma perda de peso de 5,1% após 4 semanas de armazenamento a 5°C, pelo que, no presente estudo, seria esperado a perda de uma maior percentagem de massa nas amostras controlo ao final de 20 dias de armazenamento, e não nas amostras revestida. Perez-Gago e colaboradores (2005) também observaram que fatias de maçã com filmes de polipropileno apresentaram uma menor perda de massa comparativamente com o controlo. Uma possível justificação para diferentes perdas de massa observadas nos diferentes tratamentos poderá dever-se a vários estados de maturação dos frutos no momento da aplicação do revestimento, uma vez que não é possível ter frutos com um estado de maturação rigorosamente igual entre si (Bai et al., 2003). A superfície de PMP's tem uma elevada humidade relativa, e por esta razão, o desempenho dos revestimentos na redução da perda de peso não é tão eficiente como quando os revestimentos são aplicados à fruta inteira (Perez-Gago et al., 2005).

Em relação à variação do teor de humidade entre os dias 0 e 20 de ensaio foi possível verificar que as fatias de maçã sem tratamento (controlo) apresentaram uma perda de humidade significativamente superior ( $p < 0,05$ ) às restantes amostras (tabela 6). Chauhan e colaboradores (2011) observaram que em maçã Fuji não tratada, o teor de humidade diminuiu significativamente quando comparado com maçã revestida com gel de aloé vera, após 10 dias de armazenamento a  $6 \pm 1$  °C. As restantes amostras apresentaram menores perdas de humidade uma vez que com a aplicação de um revestimento a transferência de vapor de água diminui levando a menores perdas (Ayranci e Tunc, 2003).

Apesar de não se terem observado diferenças significativas de massa ao longo dos 20 dias, foi observada diferença na humidade existente nas diferentes situações

experimentais. Uma possível explicação será o facto de os revestimentos utilizados, apesar de formarem uma barreira eficaz contra a migração de solutos que permite manter o peso, possuem elevada permeabilidade ao vapor de água que justifica as alterações de humidade das amostras (Rojas-Graü et al., 2008).

Os açúcares presentes nas fatias de maçã ou o teor em sólidos solúveis (TSS) (°Brix) foram determinados ao longo do ensaio, permitindo obter a variação de TSS entre os dias 0 e 20 do ensaio (tabela 6). O controlo foi a amostra que apresentou o maior aumento de TSS ( $p < 0,05$ ), enquanto nas restantes amostras os valores de TSS não variaram significativamente entre o início e o fim do ensaio ( $p > 0,05$ ). As variações do teor de sólidos solúveis podem ser atribuídas à quebra dos hidratos de carbono (amido) em açúcar durante o processo de armazenamento. Curiosamente a amostra tratada com a solução de revestimento Q1 teve um decréscimo nos valores de TSS, poderá ser justificável pela elevada quantidade de hidratos de carbono presentes no extrato da alga Q1. Manivannan e colaboradores (2008) caracterizaram extratos de *Codium tomentosum* e verificaram que esta era rica em hidratos de carbono ( $20,47 \pm 0,5\%$ ).

Quanto às variações de pH (tabela 6) das amostras entre os dias 0 e 20 do ensaio, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e os restantes tratamentos ( $p < 0,05$ ). Na amostra controlo observou-se uma diminuição dos valores de pH enquanto nos outros tratamentos ocorreu uma ligeira subida dos mesmos, exceto nas amostras Q2. Cocci e colaboradores (2006) também não verificaram alterações significativas de pH em maçãs embaladas em atmosferas não convencionais, pelo que as variações apresentadas eram as esperadas.

**Tabela 6.** Alterações físico-químicas de fatias de maçã revestidas com água (controlo), soluções de 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2)). Diferenças entre dia 0 e dia 20 do ensaio. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ); \*Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ( $p<0,05$ , ANOVA, teste *Dunnett*).

	% Perda de massa	Varição Teor de humidade	Varição °Brix (g/100g)	Varição pH
<b>Controlo</b>	0,73 $\pm$ 0,42	-3,04 $\pm$ 0,39	2,8 $\pm$ 0,06	-0,03 $\pm$ 0,01
<b>AC</b>	1,64 $\pm$ 0,98	0,22* $\pm$ 1,06	0,4* $\pm$ 0,17	0,26* $\pm$ 0,03
<b>MN1</b>	0,87 $\pm$ 0,65	0,73* $\pm$ 1,32	0,6* $\pm$ 0,23	0,07* $\pm$ 0,01
<b>MN2</b>	1,07 $\pm$ 0,37	-0,99 $\pm$ 1,36	0,9* $\pm$ 0,06	0,15* $\pm$ 0,05
<b>Q1</b>	1,41 $\pm$ 1,63	0,50* $\pm$ 0,81	-0,5* $\pm$ 0,12	0,06* $\pm$ 0,02
<b>Q2</b>	1,20 $\pm$ 1,24	-0,54* $\pm$ 0,27	0,2* $\pm$ 0,12	-0,09* $\pm$ 0,04

#### 4.3.2. Alterações de Textura: Firmeza

Em PMP dá-se uma deterioração bastante rápida do produto o que pode ser prevenido pela aplicação de um revestimento. Em maçãs minimamente processadas este problema ocorre principalmente devido à hidrólise ácida e à degradação enzimática que ocorre nos tecidos da maçã, conduzindo a uma perda de firmeza e atributo crocante, comprometendo a sua qualidade sensorial (Wu e Chen, 2013). Os resultados do atributo crocante não estão representados graficamente uma vez que não foram encontradas diferenças significativas ( $p> 0,05$ ) no atributo crocante das fatias de maçã estudadas ao longo do ensaio (anexo 3).

Pela análise da tabela 7 é possível observar um aumento significativo ( $p< 0,05$ ) dos valores da firmeza das todas amostras do dia 0 para o dia 4 o que pode ser justificado pela diminuição do teor de humidade das amostras entre os dias 0 e 4 do ensaio (anexo 4). Voon e colaboradores (2006) verificaram que o acréscimo da firmeza no fruto durião minimamente processado poderia estar relacionado com a diminuição da humidade do fruto armazenado a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Entre o dia 4 e o dia 20 do ensaio, nas amostras controlo e MN2 deu-se um decréscimo significativo ( $p< 0,05$ ) nos valores de firmeza das mesmas. Nas restantes amostras não ocorreram diferenças estatísticas ( $p> 0,05$ ), demonstrando a eficácia da aplicação dos revestimentos que permitem manter a firmeza da maçã ao longo do tempo de armazenamento. Estes resultados são ainda mais importantes, se atentarmos ao facto

de que em maçãs revestidas com gel de aloé vera (Chauhan et al., 2011), com quitosano e cloreto de cálcio (Qi et al., 2011), e pululano enriquecido com agentes anti-escurecimento e antibacterianos (Wu e Chen, 2013) não foi observada uma manutenção da firmeza da amostra ao longo do armazenamento através da aplicação dos tratamentos. Deste modo, a utilização destes revestimentos pode ser assim mais vantajosa do que alguns revestimentos estudados anteriormente.

**Tabela 7.** Efeito das soluções de revestimento controlo (água), AC (ácido cítrico), MN1 (*Fucus spiralis*), MN2 (*Bifurcaria bifurcata*), Q1 (*Codium tomentosum*) e Q2 (*Codium vermilara*) na firmeza (N.s). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD): \* dia 0; # dia 4; *t* dia 8; & dia 12; £ dia 16.

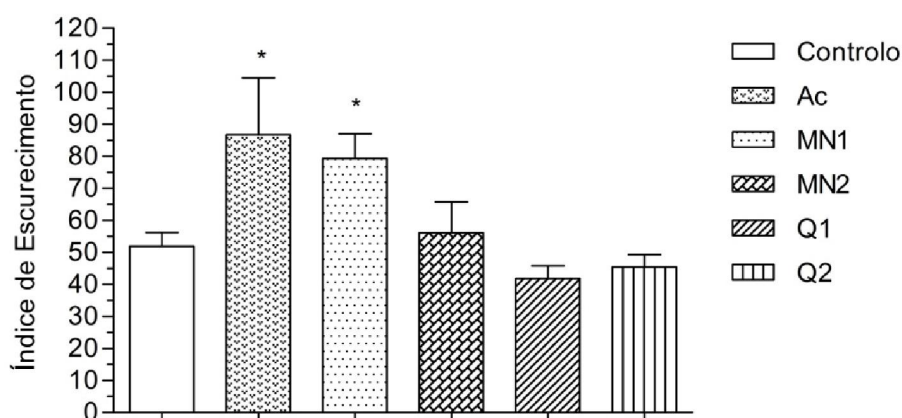
Firmeza (N.s)	Dia0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 16	Dia 20
<b>Controlo</b>	11,26 $\pm$ 1,2	25,44* $\pm$ 2,46	21,35* $\pm$ 5,56	16,36* <sup>#</sup> $\pm$ 1,69	17,69* <sup>#</sup> $\pm$ 1,07	18,13* <sup>#</sup> $\pm$ 3,16
<b>AC</b>	11,35 $\pm$ 2,39	21,95* $\pm$ 0,92	18,69* $\pm$ 4,57	23,44* <sup>t</sup> $\pm$ 3,49	18,22* <sup>&amp;</sup> $\pm$ 3,50	19,24* $\pm$ 2,41
<b>MN1</b>	11,13 $\pm$ 1,07	20,48* $\pm$ 3,25	17,87* $\pm$ 3,78	19,79* $\pm$ 2,61	19,66* $\pm$ 5,49	19,88* $\pm$ 2,02
<b>MN2</b>	10,79 $\pm$ 1,47	21,65* $\pm$ 3,66	16,93* $\pm$ 2,43	24,46* <sup>t</sup> $\pm$ 3,70	21,59* $\pm$ 3,82	14,95* <sup>#&amp;£</sup> $\pm$ 5,56
<b>Q1</b>	11,24 $\pm$ 0,96	18,55* $\pm$ 2,47	24,79* <sup>#</sup> $\pm$ 2,82	19,83* <sup>t</sup> $\pm$ 1,81	21,68* $\pm$ 4,48	21,56* $\pm$ 3,34
<b>Q2</b>	10,66 $\pm$ 0,93	25,63* $\pm$ 4,36	23,06* $\pm$ 4,59	19,66* $\pm$ 2,73	20,34* $\pm$ 3,47	19,28* $\pm$ 8,33

#### 4.3.3. Avaliação da cor

Os dados relativos ao índice de escurecimento das maçãs fatiadas no último dia de armazenamento estão apresentados na figura 14. As imagens das fatias de maçã no primeiro dia do ensaio e no último dia estão apresentadas na figura 15, para uma melhor perceção da alteração visual das mesmas. As imagens fotográficas resultantes de todos os dias de ensaio encontram-se em anexo (anexo 5).

Da análise da figura 14, as amostras que apresentaram um maior índice de escurecimento, comparativamente com o controlo, foram as revestidas com AC e MN1 ( $p < 0,05$ ). De facto não era esperado um escurecimento tão acentuado das maçãs

tratadas com o AC, pois este é amplamente utilizado na indústria alimentar como agente anti-escurecimento (Son et al., 2000; Son et al., 2001). O ácido cítrico é um aditivo utilizado como agente quelante do cobre no local ativo da polifenol oxidase inativando-a, e acidulante, reduzindo o pH (Lee et al., 2003). Em conjunto estas duas ações do ácido cítrico diminuem o escurecimento do produto final. No entanto, o tratamento com ácido cítrico não resultou num baixo índice de escurecimento (86,7%) como era expectável. Lee e colaboradores (2003) num estudo com maçãs Fuji minimamente processadas obtiveram os mesmos resultados, utilizando uma concentração de 1g/100ml de ácido cítrico. Após 14 dias de ensaio, as maçãs revestidas com ácido cítrico apresentavam baixos valores de *L* (luminosidade), resultante de um elevado índice de escurecimento, quando comparadas com maçãs revestidas com outros antioxidantes (ácido ascórbico e oxálico). Son e colaboradores (2001) sugerem a utilização de ácido cítrico em conjunto com outros agentes antioxidantes promovendo assim um efeito sinérgico benéfico para a preservação da cor em PMP. Também o tratamento com MN1 apresentou um índice de escurecimento acentuado (79,3%), resultado este não esperado. Através da análise da tabela 5 era esperado que as soluções de revestimento com uma maior redução de DPPH (47,2%) e maior quantidade total de polifenóis (0,5 mg/ml) conferissem uma proteção à maçã e conseqüentemente um menor índice de escurecimento. Curiosamente, os valores mais baixos foram os dos tratamentos com Q1 e Q2 com 41,8% e 45,5% respetivamente, correspondendo às soluções de revestimento com a menor capacidade de redução de DPPH (tabela 5). Através de análise estatística é possível afirmar que os valores de índice de escurecimento do Q1 são significativamente inferiores ao controlo (41,81%) ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de LSD) (anexo 6), permitindo ainda escolher a solução de revestimento Q1 como aquela que impede o escurecimento da maçã, embora ainda com mecanismos desconhecidos. Valentão e colaboradores (2010) sugerem a produção de metabolitos secundários, as micosporinas, com capacidade de absorção da radiação, que poderão assim permitir a proteção da maçã contra a oxidação dos tecidos. A presença de carotenoides e de hidratos de carbono no extrato da alga Q1 poderá resultar também numa proteção extra dos tecidos da maçã, uma vez que ambos os compostos poderão ter também como função a proteção contra danos foto-oxidativos dos tecidos das algas (Manivannan et al., 2008; Valentão et al., 2010).



**Figura 14.** Índice de escurecimento de maçãs revestidas com soluções de revestimento água (controlo), 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2) ao dia 20 do ensaio. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão ( $n=9$ ). \* Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ( $p < 0.05$ , ANOVA, teste *Dunnett*).

Ao observar as imagens da figura 15 é possível confirmar os resultados obtidos com o cálculo do índice de escurecimento, onde as amostras tratadas com a solução de ácido cítrico e MN1 são as que escureceram mais, enquanto as amostras com Q1 foram as que mantiveram a aparência durante os 20 dias de ensaio.



**Figura 15.** Alterações/evolução visual das fatias de maçã revestidas com água (controlo), soluções de 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2) imediatamente após a aplicação dos revestimentos (dia 0) e ao dia 20 do ensaio.

#### 4.3.4. Atividade Enzimática

A atividade de enzimas oxidativas desempenha um papel importante na degradação de qualidade em frutas e vegetais minimamente processados. As enzimas oxidativas polifenol peroxidase e polifenol oxidase são ativadas como resposta ao *stress* gerado pelo processo de corte e conseqüente aumento das taxas de respiração (Lee et al., 2003; Chauhan et al., 2011). Estas enzimas são ainda responsáveis pela proteção contra microrganismos por meio de escurecimento e desintoxicação, causado pela quebra de hidroperóxidos gerados pela degeneração de membranas biológicas.

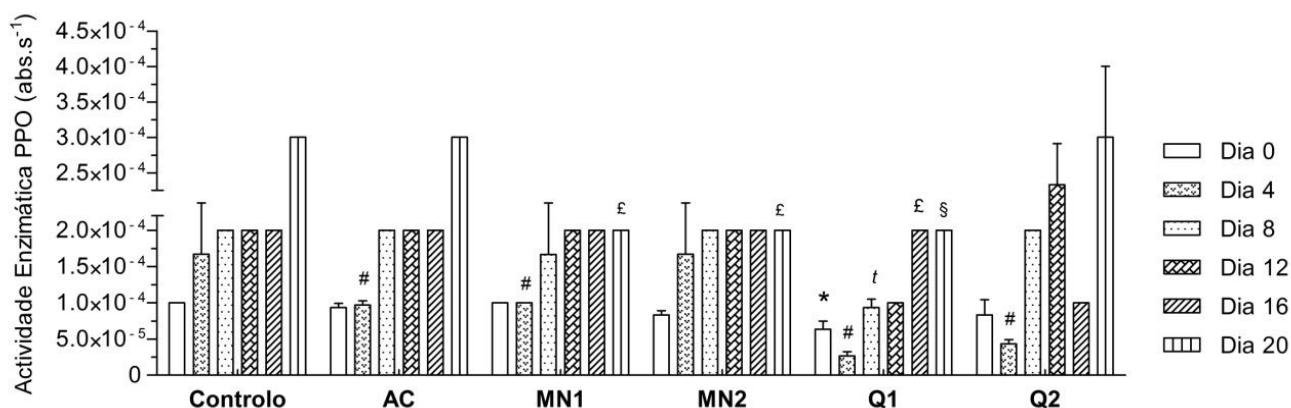
No tratamento estatístico da atividade enzimática das enzimas PPO e POD, o teste de *Levene* foi usado para testar a homogeneidade de variância para todas as variáveis. Como foram encontradas diferenças significativas, os dados foram transformados (valor logarítmico). Neste caso, as transformações não removeram a heterogeneidade, sendo na mesma realizadas as análises sobre os dados originais. Segundo Underwood (1997) este é um procedimento fiável já que a análise de variância é bastante robusta nos seus pressupostos, especialmente quando o planeamento de amostragem segue um desenho equilibrado e contém um grande número de amostras ou tratamentos, como é o caso do nosso estudo.

##### 4.3.4.1. Atividade enzimática da Polifenol Oxidase

Os efeitos das soluções de revestimento 0,5% de ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2) na atividade enzimática de PPO ao longo dos dias do ensaio estão representados na figura 16. Da análise da atividade da PPO, nos diferentes dias de ensaio, é possível afirmar que existem algumas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de *Dunnnett*) entre as soluções de revestimento utilizadas e o controlo, nos diferentes dias de amostragem. Das soluções de revestimento utilizadas a que mais inibiu a atividade enzimática foi a Q1, com diferenças estatisticamente significativas aos dias 0, 4, 8, 16 e 20 entre Q1 e o controlo. Estes resultados encontram-se de acordo com os resultados descritos anteriormente, onde o menor índice de escurecimento foram obtidos nas amostras tratadas com Q1. Tal resultado não é surpreendente, já que a atividade da PPO é geralmente considerada como o primeiro passo para o escurecimento enzimático (Mayer, 2006). Os resultados obtidos do ensaio *in vitro* do efeito das soluções de revestimento na atividade da enzima (ponto 4.1.)

permitted to affirm that the action of the coating Q1 would be promising relative to enzymatic inhibition, which is confirmed by the results obtained.

It is not possible to compare the values obtained with the bibliography since it is a pioneer assay without comparative bibliography.



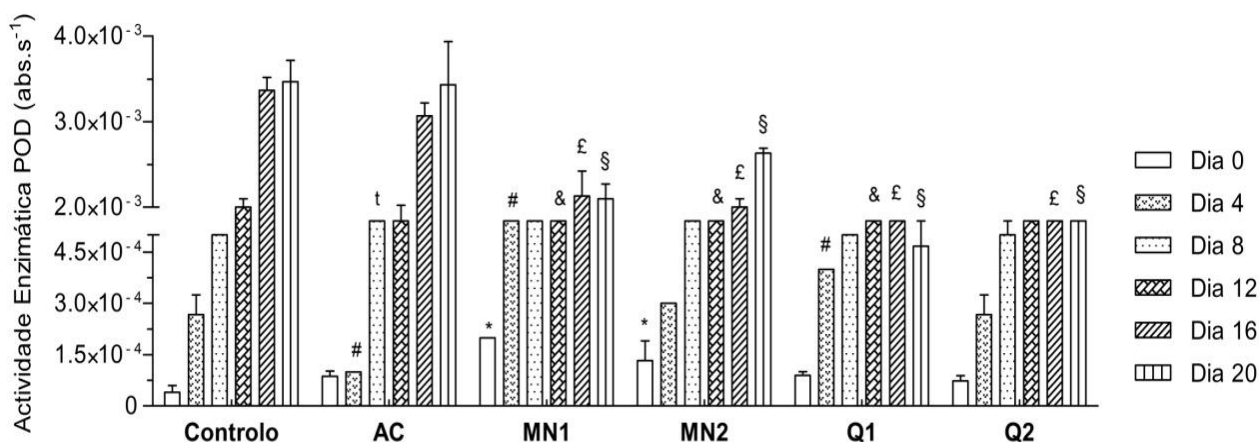
**Figura 16.** Atividade enzimática da enzima polifenol oxidase (PPO) de maçãs tratadas com as soluções de revestimento água (controlo), 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2), entre os dias 0 e 20 de ensaio, a 4°C. Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de *Dunnnett*): \* dia 0; # dia 4; t dia 8; £ dia 16; § dia 20.

#### 4.3.4.2. Atividade enzimática da Peroxidase

Although it is recognized that PPO is the main enzyme related to enzymatic browning in minimally processed apples, it is also necessary to study the changes in the enzyme POD, since this can also contribute to the changes in minimally processed products (Jang and Moon, 2011).

The changes in the activity of the POD over the days of the assay are represented in figure 17. It was also detected statistically significant differences ( $p < 0.05$ , ANOVA, *Dunnnett* test) in the different days of the assay in the coatings used. The samples treated with Q1 and Q2 were those that presented a lower evolution of the activity of the POD, which could indicate that the coatings Q1 and Q2 result in an inhibition of the enzymatic activity. Once again, these results are in accordance with the results obtained and discussed previously, where the browning index and even the physical changes of the apple slices were lower in the Q1 and Q2 samples. Also, the results obtained with the *in vitro*

são agora confirmados, pois as soluções Q1 e Q2 foram as que apresentaram uma maior inibição enzimática.



**Figura 17.** Atividade enzimática da enzima peroxidase (POD) de maçãs tratadas com as soluções de revestimento água (controlo), 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fucus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2), entre os dias 0 e 20 de ensaio, a 4°C. Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de Dunnett): \* dia 0; # dia 4; t dia 8; & dia 12; £ dia 16; § dia 20.

Com base nos resultados obtidos com a aplicação das soluções de revestimento com extrato de algas em maçã minimamente processada foi possível escolher o extrato Q1 com maior potencial de aplicação na formulação de revestimentos comestíveis. De todos os resultados, os que permitiram decidir qual a solução de revestimento a utilizar foram o índice de escurecimento, na maçã processada e armazenada à temperatura ambiente e a 4°C e nos homogeneizados de maçã, as fotos com a evolução visual dos mesmos e a menor atividade enzimática de PPO e POD. Da observação dos resultados, as amostras revestidas com o extrato Q1 apresentaram um índice de escurecimento reduzido, como verificado instrumentalmente e corroborado pela análise da aparência das amostras. A aplicação deste extrato inibiu significativamente a atividade das enzimas oxidativas de PPO e POD.

Após a escolha da Q1, foram realizados testes a filmes de alginato e quitosano enriquecidos com extrato Q1. A avaliação das propriedades de filmes edíveis quando aplicados nos produtos é muito complexa pelo que a sua avaliação foi feita sem estar

aplicado no fruto. O facto de ao estudar os filmes e os resultados serem transponíveis para matrizes alimentares suporta esta decisão.

#### **4.4. Avaliação de propriedades físicas dos filmes de alginato e quitosano enriquecidos com extrato da alga Q1**

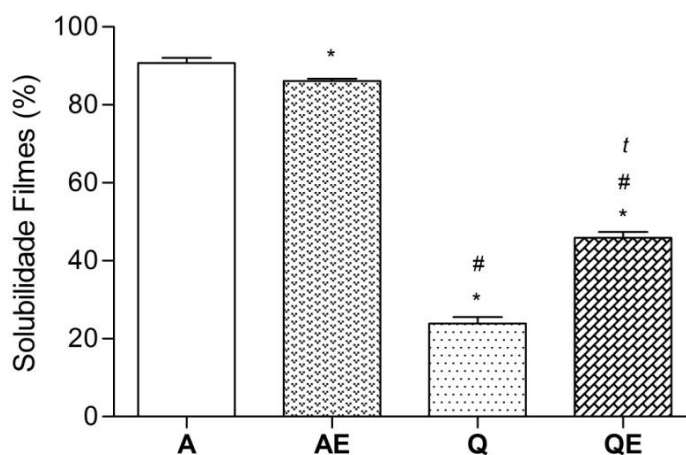
Para a avaliação de propriedades físicas dos filmes de alginato a 1% e quitosano a 1% enriquecidos com 0,5% de solução extrato de alga Q1 foram determinadas as seguintes características: solubilidade em água, espessura, transparência, tensão de perfuração, taxa de deformação, permeabilidade ao vapor de água, isotérmicas de sorção a  $21 \pm 2$  °C e capacidade antimicrobiana. A formulação dos filmes testados encontra-se na tabela 4.

##### **4.4.1. Solubilidade dos Filmes**

A solubilidade de filmes edíveis em água é um indicador da resistência do revestimento à água. Uma maior solubilidade poderá indicar uma menor resistência do filme, ou seja, na presença de água o filme poderá dissolver-se perdendo o seu efeito protetor à superfície do alimento (Maizura et al., 2007). A solubilidade é ainda um fator importante que determina a biodegradabilidade dos filmes quando utilizados como cobertura de alimentos (Maizura et al., 2007). A figura 18 mostra a solubilidade em água dos filmes formulados. Os filmes formulados com quitosano apresentam uma menor solubilidade, quando comparados com os filmes formulados com alginato ( $p < 0,05$ , 2 way ANOVA, teste LSD), resultados estes concordantes com a bibliografia que indica que o quitosano tem uma menor solubilidade, quando comparado com o alginato (Lee e Mooney, 2012; Hosseini et al., 2013). A elevada solubilidade dos filmes de alginato será justificada pelo carácter hidrofílico e sensibilidade dos filmes de alginato à água (Abdollahi et al., 2013; Galus e Lenart, 2013). A solubilidade do quitosano em água será mais baixa, pois o quitosano é um polissacarídeo que apenas é solúvel em soluções com pH ácido (Dash et al., 2011).

Verificou-se que a adição do extrato da alga Q1 resulta numa diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , 2 way ANOVA, teste LSD) da solubilidade dos filmes de alginato e num aumento significativo da solubilidade dos filmes de quitosano. Rattaya e colaboradores (2009) observaram que ao adicionarem extrato da alga *Turbinaria ornata* a solubilidade de filmes de gelatina de peixe diminuía. Os resultados obtidos correspondem a uma mistura entre os polímeros utilizados e o extrato da alga, o que pode resultar em interações entre ambos os compostos utilizados, causadas por

exemplo por forças eletrostáticas e ligações de hidrogénio (Hosseini et al., 2013). Estas interações poderão justificar as alterações divergentes de solubilidade causadas pela adição de extrato de alga ao alginato e ao quitosano. Estes resultados indicam que a inclusão do extrato Q1 num filme polimérico de alginato poderá, além de potenciar as propriedades protetoras como indicado pelos resultados apresentados na secção 4.3., contribuir para uma resistência mais elevada do filme quando aplicado em alimentos com elevado teor de humidade. Enquanto num filme polimérico de quitosano, apesar de contribuir para um decréscimo da resistência, poderá facilitar o processo de preparação e aplicação do filme ao aumentar a solubilidade da formulação.



**Figura 18.** Solubilidade filmes de 1% alginato (A), 1% alginato com 0,5% de extrato Q1 (AE), 1% quitosano (Q) e 1% quitosano com 0,5% de extrato Q1 (QE). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em relação \* ao alginato; # alginato com extrato; t quitosano ( $p < 0,05$ , 2 way ANOVA, teste LSD).

#### **4.4.2. Espessura e Transparência dos Filmes**

A espessura dos filmes produzidos variou entre 0,03 e 0,06 mm, sendo que a espessura maior corresponde ao filme Q e o de menor ao filme de AE.

Os filmes de quitosano eram flexíveis e fáceis de remover da placa, pelo contrário os filmes de alginato eram suaves, pegajosos e encolhiam facilmente quando removidos das placas, depois de expostos, por um curto período de tempo, ao ambiente de laboratório (75 % humidade relativa). Al-Hassan e Norziah (2012) obtiveram resultados similares em filmes de amido e amido/gelatina de peixe, sugerindo que o comportamento dos filmes seja influenciado pela hidrosopia dos polímeros. Os filmes de alginato ao entrarem em contacto com um ambiente com elevada humidade relativa, incorporam a

água do meio ambiente, facto que poderá estar relacionado com a sua elevada solubilidade em água. Ao serem solúveis em água, os filmes têm a capacidade de absorverem a água logo quando expostos à humidade relativa presente no ambiente. A água vai ser incorporada nos filmes e assim alterar as interações do polímero (Hosseini et al., 2013). O mesmo poderá justificar o melhor manuseamento dos filmes de quitosano, uma vez que são menos solúveis em água e não irão absorver tão facilmente a água presente no meio ambiente, e deste modo as interações do polímero não serão alteradas.

As propriedades óticas são essenciais para definir a funcionalidade dos filmes e/ou revestimentos a serem aplicados em alimentos, uma vez que afetam a aparência do produto revestido, o que é um importante fator de qualidade (Pereda et al., 2012). Tal como foi referido na secção dos métodos, um maior valor de T (equação 5) revela um filme com um menor grau de transparência e com uma elevada absorvância de luz. De acordo com os resultados obtidos e representados na tabela 8, o filme que apresentou uma menor transparência foi o filme AE ( $p < 0,05$ , 2 way ANOVA, teste LSD). Ao apresentar o valor mais elevado de T, significa que o filme AE é um filme que absorve a luz, o que poderá ser vantajoso na aplicação em alimentos, pois estudos indicam que ao absorverem a luz estes filmes poderão proporcionar excelentes barreiras à oxidação induzida pela luz envolvente (Al-Hassan e Norziah, 2012). A adição do extrato de alga ao alginato poderá trazer assim benefícios para a proteção dos alimentos à luz. No entanto, será necessário assegurar que a sua aplicação não compromete o apelo visual dos produtos. A aparência do produto deverá manter-se inalterada para que continue a ser apelativo para o consumidor.

A adição do extrato de alga ao quitosano provoca uma diminuição dos valores de transparência, quando comparados com os filmes Q ( $p < 0,05$ , 2 way ANOVA, teste LSD). Este facto é curioso, pois a adição do extrato ao quitosano tem um efeito contrário ao do alginato, o que poderá ser justificado por diferentes interações entre os polímeros utilizados e os compostos do extrato de algas (Hosseini et al., 2013).

As concentrações de alginato e quitosano poderão influenciar os valores de transparências dos filmes. Na bibliografia encontram-se valores de transparência para filmes com 1 % de alginato ( $T=1,28$ ) (Pereira et al., 2013) e com 1,5% de quitosano ( $T=0,98$ ) (Pereda et al., 2012), valores inferiores aos obtidos no presente estudo. Assim, a utilização de baixas concentrações dos polímeros poderá levar à formação de filmes com uma maior transparência. Um outro fator que influenciará a aparência dos filmes produzidos é o processo de secagem. Foi utilizado um túnel de vento, pelo que a passagem do ar poderá ter criado algumas irregularidades na superfície dos filmes prejudicando o seu aspeto final, nomeadamente a transparência.

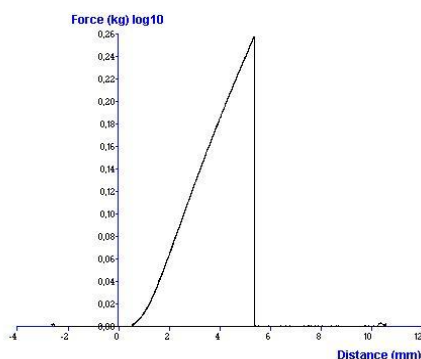
**Tabela 8.** Espessura e transparência dos filmes de 1% alginato (A), 1% alginato com 0,5% extrato (AE), 1% quitosano (Q) e 1% quitosano com 0,5% extrato (QE). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão (espessura  $n=15$ ; transparência  $n=3$ ). Diferenças estatisticamente significativas em relação \* ao alginato; # ao alginato com extrato; t ao quitosano ( $p < 0.05$ , 2 way ANOVA, teste LSD).

Filme	Espessura (mm)	Transparência (T)
A	0,05 $\pm$ 0,02	2,4 $\pm$ 0,1
AE	0,03* $\pm$ 0,01	13,1* $\pm$ 0,4
Q	0,05# $\pm$ 0,01	3,1*# $\pm$ 0,3
QE	0,06*#t $\pm$ 0,01	2,5*#t $\pm$ 0,1

#### 4.4.3. Características Mecânicas dos Filmes

Uma resistência mecânica adequada é geralmente necessária para um filme de modo a suportar o esforço externo de manter a sua integridade durante o transporte e manuseamento necessários à distribuição e venda do produto, bem como as propriedades de barreira durante a aplicação em alimentos (Ghasemlou et al., 2011; Hosseini et al., 2013). A rutura do filme irá originar zonas de fragilidade no alimento. Estas zonas ficam desprotegidas do efeito protetor dos filmes, o que irá prejudicar a qualidade do produto e reduzir o tempo de prateleira do mesmo (Bourtoom, 2008).

Na figura 19 encontra-se um gráfico representativo das curvas de tensão-deformação dos filmes. As curvas mostram o comportamento típico dos filmes até à sua quebra, assinalada nos gráficos como o ponto máximo de tensão. Os valores de tensão de perfuração e taxa de deformação dos filmes estão apresentados na figura 20.

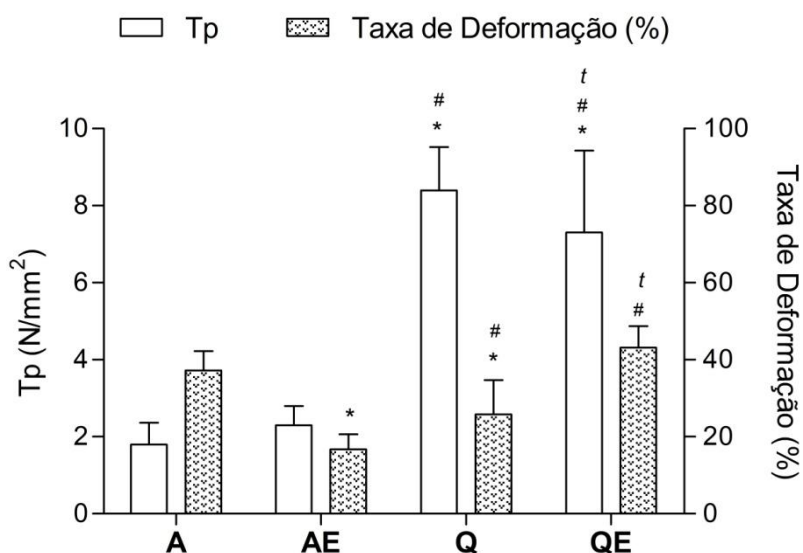


**Figura 19.** Imagem representativa de gráfico obtido das curvas de tensão – deformação dos filmes estudados.

Abdollahi e colaboradores (2013) defendem que a adição de compostos aos filmes de alginato poderá trazer benefícios para as propriedades mecânicas dos mesmos. Como por exemplo a adição de óleo essencial de orégão (Benavides et al., 2012), de pectina (Galus e Lenart, 2013) ou ainda a adição de nano-cristais de celulose (Abdollahi et al., 2013). Os filmes de alginato (A e AE) apresentaram uma tensão de perfuração significativamente menor comparativamente com os filmes de quitosano (Q e QE) ( $p < 0,05$ , 2 way ANOVA, teste LSD). Apesar de o polímero apresentar um elevado potencial para o desenvolvimento de filmes edíveis biodegradáveis (Abdollahi et al., 2013) tem, no entanto, baixa resistência e elasticidade. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre filmes de A e AE, pelo que a adição do extrato de alga ao alginato não estará a influenciar a resistência dos filmes. Os filmes Q e QE apresentam valores de tensão de perfuração superiores ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste LSD), o que indica que é necessária a aplicação de uma maior força para romper este tipo de filmes. Estudos realizados a filmes de quitosano indicam que o quitosano é um polímero bastante resistente, tornando-se um ótimo filme a ser aplicado em alimentos devido às suas propriedades de resistência mecânica e protetoras (Hosseini et al., 2013). Ao apresentarem uma elevada resistência à perfuração, este tipo de filmes poderá ter uma durabilidade superior comparativamente aos de alginato. As diferenças ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste LSD) dos valores de tensão de perfuração entre os filmes Q e QE poderá ser justificada pelas diferentes quantidades de quitosano que são transferidas para os filmes. Pereira e colaboradores (2013) identificaram o mesmo efeito, mas em filmes de alginato com *Aloé vera*. Os autores justificam-no pela redução na quantidade de alginato e de glicerol nos filmes. O mesmo poderá ter sucedido no presente trabalho, uma vez que a quantidade de sólidos presentes nos filmes não sofre alterações, variando apenas a sua composição, ou seja, proporcionalmente o filme QE terá menos quitosano na sua constituição.

Quanto à taxa de deformação entre filmes de A e AE, os filmes de AE apresentam uma menor taxa de deformação comparativamente com os filmes A ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste LSD). A adição do extrato ao alginato poderá ter um efeito estabilizante nas ligações intermoleculares do alginato, proporcionando uma maior capacidade de manter a sua forma original (Sivarooban et al., 2008). Da análise dos resultados da taxa de deformação nos filmes Q e QE (figura 20), estes apresentam diferenças estatisticamente significativas entre eles ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste LSD). Ao contrário do efeito que o extrato de alga terá nos filmes de AE, a taxa de deformação nos filmes QE aumenta. Tal poderá ter acontecido pela facilidade que os componentes do extrato de alga terão em ser inseridos entre as cadeias do quitosano, produzindo um efeito de *cross-linker*, que

diminuirá a resistência mecânica dos filmes, aumentando a sua aptidão para se deformarem. Ghasemlou e colaboradores (2011) observaram o mesmo efeito na adição de diferentes percentagens de um plastificante em filmes de polissacarídeos extraídos de Kefir.



**Figura 20.** Relação entre tensão de perfuração ( $T_p$ ) ( $N/mm^2$ ) e taxa de deformação (%) dos filmes de 1% alginato (A), 1% alginato com 0,5% extrato (AE), 1% quitosano (Q) e 1% quitosano com 0,5% extrato (QE) ( $n=9$ ). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao \*alginato; # alginato com extrato;  $t$  quitosano ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste LSD).

O filme de QE aparenta ser o mais resistente, pelo que a sua aplicação em matrizes alimentares poderá permitir a proteção do alimento. A adição do extrato contribui ainda para a maior elasticidade dos filmes, quando comparados com os filmes de Q. Esta propriedade é importante quando sujeito a agressões mecânicas, o filme, não só é mais resistente como possui maior elasticidade. Deste modo, será diminuída a probabilidade de ocorrência de ruturas do filme e consequente exposição da superfície do alimento ao meio ambiente.

#### 4.4.4. Permeabilidade ao Vapor de Água

Os resultados referentes às propriedades barreira, ao vapor de água, dos diferentes filmes estão representados na figura 21.

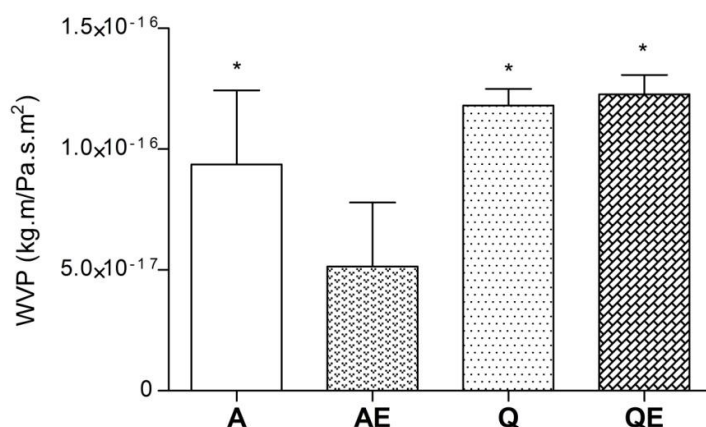
As condições de humidade relativa utilizadas durante as medições de permeabilidade (gradiente de humidade relativa de 100:75) foram estabelecidas de modo a reproduzir a ação dos revestimentos em produtos frescos e armazenados até 10°C. A média de espessura dos filmes foi a indicada na tabela 8. Os filmes AE apresentaram

uma permeabilidade menor em relação aos restantes filmes em estudo ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste LSD).

Os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de alginato (A) estudados foram mais baixos do que os apresentados por Benavides e colaboradores (2012) e Galus e Lenart (2013). Esta diferença poderá ser causada pela diferente preparação dos filmes ou pela percentagem de alginato utilizada (ambos os autores utilizaram 1,5% de alginato de sódio) ou ainda pelas diferentes condições de medição da permeabilidade ao vapor de água. Por exemplo Galus e Lenart (2013) utilizaram um gradiente de 30/100% de humidade relativa, enquanto Benavides e colaboradores (2012) e no presente estudo foi utilizado um gradiente de 75/100% nas condições de medição do WVP. Abdollahi e colaboradores (2013) utilizaram filmes com 1% de alginato e o WVP dos filmes apresentava-se superior aos do presente estudo, o que poderá ser justificado pelas diferentes técnicas de preparação dos filmes. Os filmes de AE foram os que apresentaram menor permeabilidade ao vapor de água, exibindo assim uma boa barreira ao vapor de água em relação aos outros filmes estudados. Rattaya e colaboradores (2009) verificaram o mesmo efeito na permeabilidade ao vapor de água em filmes de gelatina de peixe com extrato de alga. A adição do extrato ao alginato trará assim vantagens relativamente à capacidade de redução de transferência de vapor de água entre o alimento e o meio ambiente, o que poderá contribuir para uma maior eficiência do filme em manter as características organolépticas típicas do produto, como por exemplo a suculência. Tal poderá ser confirmado com os resultados anteriormente apresentados e discutidos na secção 4.3. Nas maçãs revestidas com a solução Q1 deu-se uma baixa perda de humidade, levando a crer que as trocas de vapor de água com o meio ambiente foram baixas. Esta observação sugere que o extrato de alga Q1, utilizado na formulação do filme AE, de alguma forma estará a fornecer uma barreira extra ao vapor de água impedindo as trocas gasosas. Uma consequência da elevada solubilidade dos filmes AE será a superior absorção de água do meio para o filme comparativamente às restantes formulações, também visível nas curvas de sorção (apresentadas na figura 22). A acumulação da água nos filmes poderá justificar a menor permeabilidade dos filmes. A água que estava dentro do sistema utilizado para a avaliação do WVP (e que representa um alimento fresco) ao ser transferida do sistema através filme fica possivelmente retida no filme, permitindo manter os níveis de água no sistema/matriz alimentar. Por outro lado, os filmes de quitosano apresentaram menores propriedades barreira ao vapor de água, apresentando os valores de WVP superiores aos filmes de alginato, tal facto é suportado pela bibliografia existente, onde vários autores afirmam que filmes de quitosano, apresentam elevada permeabilidade. A permeabilidade dos filmes de quitosano pode ser

justificada pela baixa solubilidade do quitosano em água, não apresentando a capacidade de retenção de água, o que permite a transferência para o meio ambiente (Park e Zhao, 2004; Vargas et al., 2009). Nos filmes de QE, não existem diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) comparativamente com os filmes de Q, pelo que o extrato não estará a influenciar o comportamento do filme quanto às propriedades barreira dos mesmos.

As baixas barreiras protetoras dos filmes estudados poderão ainda ser justificadas pelo facto de, num ambiente com uma elevada humidade relativa, a capacidade de barreira ao vapor de água dos filmes diminuir. A água atua como um forte plastificante na matriz dos polímeros, reduzindo o número de ligações intermoleculares entre as cadeias poliméricas (aumenta o espaço livre entre os polímeros), facilitando a transferência de vapor de água pelo filme/revestimento (Villalobos et al., 2006; Benavides et al., 2012). Segundo Villalobos e colaboradores (2006), o efeito plastificante das moléculas de água não é o único fator determinante nas propriedades barreira dos revestimentos, a permeabilidade dependerá também da presença de substâncias com baixa polaridade que possam limitar a permeabilidade dos revestimentos.



**Figura 21.** Permeabilidade ao vapor de água (WVP) de filmes de 1% alginato (A), 1% alginato com 0,5% extrato (AE), 1% quitosano (Q) e 1% quitosano com 0,5% extrato (QE). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). \* Significam diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o filme AE ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste LSD).

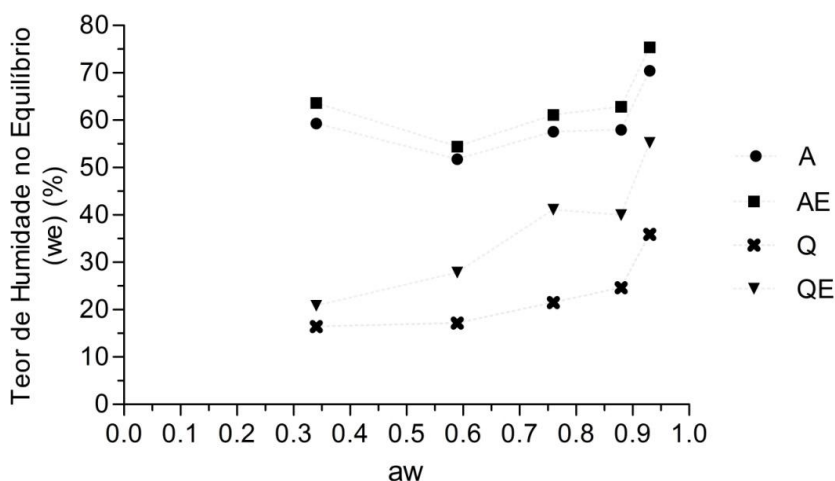
#### 4.4.5. Isotérmicas de sorção de água dos filmes

A análise das isotérmicas de sorção poderá fornecer informação importante para a avaliação da funcionalidade de filmes comestíveis, pois permitem a medição da estabilidade dos filmes em relação à humidade relativa de um ambiente, determinando o seu tempo de armazenamento e a sua funcionalidade em geral. As isotérmicas são ainda

consideradas ferramentas que oferecem informações importantes do teor de humidade de equilíbrio dos filmes, indicando o comportamento destes quanto às propriedades de barreira em diferentes humidades relativas (Baroghel-Bouny, 2007).

Na figura 22 estão representados os comportamentos dos filmes formulados: 1% alginato (A), 1% alginato com 0,5% de extrato (AE), 1% quitosano (Q) e 1% quitosano com 0,5% de extrato (QE) expostos a diferentes atividades de água, que variavam entre 0,34 e 0,94, à temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A humidade relativa inicial de cada filme era: A: 24,86%; AE: 28,29%; Q: 9,57%; e QE: 10,06%. Os filmes atingiram o equilíbrio após 144 horas de exposição aos diferentes meios. Os filmes A e AE foram os que apresentaram uma maior absorção de humidade quando expostos às diferentes atividades de água do ambiente. Os resultados vão ao encontro do obtido por Galus e Lenart (2013). Neste estudo, os autores observaram que os filmes de alginato produzidos apresentam elevadas taxas de absorção de vapor de água quando comparados com outros tipos de polímeros. Os filmes de alginato atingem um teor de humidade no equilíbrio superior, pois ao serem formulados por um polímero com características hidrofílicas têm a capacidade de absorver a água presente no meio. Ao absorverem a água presente no meio, caso esta absorção seja excessiva (provável em humidades relativas mais altas) poderá levar à solubilização do filme, o que provoca falhas na estrutura do filme e conseqüentemente compromete a proteção física do produto onde esteja aplicado. Pela observação do gráfico, os filmes que apresentaram um comportamento mais positivo, em função da funcionalidade requerida para os filmes, foram os Q e QE. Os filmes Q foram os que apresentaram menores alterações de humidade quando expostos aos diferentes  $a_w$ , o que indicará que absorvem um menor teor de água. De acordo com Vargas e colaboradores (2009) o quitosano tem três locais de absorção predominantes: grupo hidroxilpropil, grupo amina e no final da cadeia polimérica (um grupo hidroxilo ou um grupo aldeído, dependendo do grau de desacetilação).

Os filmes Q e QE atingem o equilíbrio com menores teores de humidade do que os filmes de A e AE estudados. Estas diferenças podem ser explicadas pela baixa solubilidade dos filmes Q e QE em água e por valores de WVP elevados, indicando um filme permeável aos gases. Assim, ao ser um filme permeável aos gases, aquando da sua exposição a  $a_w$  elevados, o vapor de água não fica retido no filme. A baixa solubilidade contribui também para este efeito, visto que ao ser pouco solúvel não terá uma afinidade pela água, não promovendo a fixação da água no filme e conseqüentemente um menor teor de humidade dos filmes.



**Figura 22.** Isotérmica de sorção a ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) dos filmes de 1% alginato (A), 1% alginato com 0,5% extrato (AE), 1% quitosano (Q) e 1% quitosano com 0,5% extrato (QE) em ambientes com diferentes atividades de água.

A utilização dos filmes compostos por alginato não será a melhor opção para a aplicação em produtos frescos e armazenados em locais com elevados teores de humidade porque, tal como referido anteriormente, a possível solubilização leva a falhas na proteção física dos filmes. Adicionalmente, um teor de humidade superior nos produtos alimentares fornece as condições ideais para a colonização e multiplicação de microrganismos (Oms-Oliu et al., 2008).

A utilização dos filmes de Q e QE, essencialmente QE, será vantajosa quando aplicada a matrizes alimentares pois absorve menos água, essencial em PMP frescos, a menor absorção de água diminui os riscos de falhas físicas nos filmes e a colonização por microrganismos será menor devido à baixa disponibilidade de água.

#### 4.4.6. Capacidade antimicrobiana dos filmes

Para o estudo da sensibilidade da microflora foram utilizadas as soluções formadoras de filmes e não diretamente as formas físicas dos filmes porque quando estes entravam em contacto com as placas de incubação, hidratavam e o filme desaparecia, comprometendo os resultados. Deste modo foi decidido seguir a estratégia utilizada por Ponce e colaboradores (2008), onde os autores estudaram a sensibilidade de vários vegetais a diferentes soluções de revestimento.

Na tabela 9 está representada a sensibilidade da microflora das maçãs às soluções formadoras de filmes utilizadas, pelo método de difusão em disco. A microflora da maçã apenas apresentou sensibilidade às soluções formadoras de filme Q e QE e ao controlo

ampicilina (10µg). A atividade antimicrobiana do quitosano já é bastante estudada, sendo a capacidade antibacteriana do quitosano contra uma grande variedade de organismos, uma das características mais conhecidas deste composto (Aider, 2010). A adição do extrato da alga Q1 ao quitosano, de algum modo, estará a reduzir a sua atividade antibacteriana visto que o halo de inibição foi mais pequeno do que no filme de quitosano. Esta redução de atividade antimicrobiana poderá ser causada pela capacidade máxima do quitosano para transportar agentes ativos ao mesmo tempo que se dá um fenómeno de interação dos grupos funcionais (Tripathi et al., 2009).

As soluções formadoras de filmes de A e AE não apresentaram qualquer atividade contra a microflora da maçã. Estudos realizados com alginato demonstraram que a sua atividade antimicrobiana era diminuta ou mesmo inexistente, apenas com a adição de um composto com características antimicrobianas seria possível obter algum tipo de inibição antibacteriana (Benavides et al., 2012). Quanto à atividade antimicrobiana do extrato da alga Q1 não existe bibliografia que permita comparar os resultados com trabalhos anteriores.

**Tabela 9.** Sensibilidade da microflora de maçã Fuji às soluções formadoras de filmes 1% alginato (A), 1% alginato com 0,5% extrato (AE), 1% quitosano (Q) e 1% quitosano com 0,5% extrato (QE). Os valores correspondem à média ± desvio padrão ( $n=3$ ).

<b>Amostra</b>	<b>Halo de inibição (mm)</b>	<b>Sensibilidade microflora</b>
<b>A</b>	0 ±0,0	Não sensível
<b>AE</b>	0 ±0,0	Não sensível
<b>Q</b>	10 ±0,0	Sensível
<b>QE</b>	9 ±0,0	Sensível
<b>Extrato</b>	0 ±0,0	Não sensível
<b>Ampicilina (10µg)</b>	20±0,0	Extremamente sensível

## **5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS**

---

---



## 5. Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras

No presente trabalho investigou-se o efeito da aplicação de soluções de revestimento formuladas com extratos de algas no tempo de prateleira de maçãs Fuji minimamente processadas. Hoje em dia o prazo de validade deste tipo de produtos varia entre 5-7 dias e a aplicação de tecnologias que permitam uma extensão do tempo de prateleira, sem comprometer as características típicas dos produtos de IV gama, é essencial para uma extensão de mercado destes produtos. Foram testados 4 tipos de soluções com 0,5% de extratos etanólicos de algas edíveis (*Fucus spiralis* (MN1), *Bifurcaria bifurcata* (MN2), *Codium tomentosum* (Q1) e *Codium vermilara* (Q2)), um controlo com água destilada e um com solução de ácido cítrico a 0,5% (antioxidante amplamente utilizado na indústria alimentar). Num primeiro ensaio, os revestimentos foram aplicados em maçã fatiada e maçã homogeneizada. No segundo ensaio com uma duração total de 20 dias, os revestimentos foram aplicados em maçãs de IV gama embaladas, armazenadas a 4°C, protegidas da luz, nos quais eram realizadas análises de 4 em 4 dias.

A aplicação das soluções de revestimento em fatias e homogeneizado de maçã, expostos à temperatura ambiente e sem proteção da luz, com a solução de revestimento Q1 apresentaram um índice de escurecimento menor (BI de 41,81) comparativamente com as amostras submetidas aos restantes tratamentos. Das análises físico-químicas realizadas ao longo do armazenamento refrigerado da maçã fatiada (% perda de massa; variação teor de humidade, TSS, pH; firmeza; índice de escurecimento) as amostras de maçã revestidas com a solução de revestimento Q1 foram as que apresentaram menores alterações. Também a nível visual foram as que apresentaram menores alterações entre os dias 0 e 20. A aplicação da solução Q1 demonstrou igualmente ter um efeito significativo na redução da atividade enzimática de PPO e POD.

Face aos resultados obtidos, a solução Q1 foi selecionada para incorporação em filmes comestíveis poliméricos e investigação das propriedades físicas e antimicrobiana dos mesmos. Foram testados filmes de 1% de alginato (A), 1% de alginato com 0,5% de extrato da alga Q1, 1% de quitosano e 1% de quitosano suplementado com 0,5% de extrato da alga Q1.

Os filmes foram caracterizados em termos de solubilidade, espessura, transparência, características mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, isotérmicas de sorção e características antimicrobianas de modo a averiguar qual seria a melhor formulação para os filmes edíveis, e posterior aplicação como revestimento alimentar. Dos testes efetuados, o filme com melhores características para aplicação em alimentos de IV gama

foi o QE. As características que poderão permitir a escolha destes filmes são: a baixa solubilidade não permitindo a dissolução fácil do filme; elevada resistência à perfuração e elasticidade permitindo uma proteção física das matrizes alimentares, mesmo quando sujeitos às agressões do meio; isotérmicas (na exposição aos vários  $a_w$  apresentam humidade de equilíbrio inferior aos restantes); e propriedades antibacterianas.

Como trabalho futuro sugere-se, inicialmente, a aplicação das soluções formadoras de filmes em maçã de IV gama. Deste modo será possível verificar, se a capacidade do extrato atuar como barreira antioxidante das fatias de maçã, continua a ser eficiente quando combinado com alginato e/ou quitosano. Como controlo poder-se-á utilizar um revestimento utilizado a nível industrial. A realização de provas sensoriais com um painel treinado será também um ponto não contornável.

O *scale up* deste processo de aplicação do revestimento em maçãs de IV gama seria um ponto a estudar futuramente, visto que a nível industrial os revestimentos poderão ter um comportamento diferente. Também a cadeia de transporte até ao consumidor poderá influenciar, pelo que o acompanhamento dos produtos até ao consumidor final seria de extrema importância.

A caracterização da composição do extrato da alga Q1 e identificação de compostos envolvidos nos mecanismos de proteção da maçã ao escurecimento é outra das questões bastante pertinentes, até para a possível aplicação futura do extrato como revestimento noutros produtos hortofrutícolas de interesse, como por exemplo a batata cortada descascada, saladas pré preparadas e cenoura pré preparada.

Uma outra sugestão seria a utilização de outra técnica alternativa, ecológica, para a obtenção do extrato de alga, por exemplo a utilização de fluidos super críticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Rezaei, M., Behrooz, R. (2013). Food hydrocolloids comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and / or inorganic nano fillers. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 416–424.
- Ahvenainen, R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 179–187.
- Ahern, S., Caton, S., Bouhlal, S., Hausner, H., Olsen, A., Nicklaus, S., Moller, J., Hetherington, M. (2013). Eating a Rainbow . Introducing vegetables in the first years of life in 3 European countries. *Appetite*, 71, 48–56.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 837–842.
- Al-Dabbas, M., Al-Ismail, K., Kitahara, K., Chishaki, N., Hashinaga, F., Suganuma, T., Tadera, K. (2007). The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of Varthemia crude water extract on DPPH radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 104(2), 734–739.
- Al-Hassan, A., Norziah, M. (2012). Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 108–117.
- Allende, A., Tomás-Barberán, F., Gil, M. (2006). Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 513–519.
- Altunkaya, A., Gökmen, V. (2009). Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce ( *L . sativa* ). *Food Chemistry*, 117, 122–126.
- Andrade, P., Barbosa, M., Matos, R., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T., Valentão, P. (2013). Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food chemistry*, 138(2-3), 1819–28.
- ASTM E96: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. *American Society for Testing and Materials. Authority of the United States of America*. 24 CRF 3280.504(a).
- Asoda, T., Terai, H., Kato, M., Suzuki, Y. (2009). Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 216–220.
- Ayranci, E., Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423–431.
- Bai, J., Hagenmaier, D., Baldwin, E. (2003). Coating selection for “Delicious” and other apples. *Postharvest Biology and Technology*, 28(3), 381–390.
- Bapat, V., Trivedi, P., Ghosh, A., Sane, V., Ganapathi, T., Nath, P. (2010). Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, 28(1), 94–107.
- Barbosa-Cánovas, G., Fernández-Molina, J., Alzamora, S., Tapia, M., López-Malo, A., Welti-Chanes, J. (2003). Handling and Preservation of Fruits and Vegetables by Combined

Methods for Rural Areas. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Consultado a 7 de maio 2013

Baroghel-Bouny, V. (2007). Water vapour sorption experiments on hardened cementitious materials Part I: Essential tool for analysis of hygral behaviour and its relation to pore structure. *Cement and Concrete Research*, 37, 414–437.

Barros, S. (2007). Metodologias integradas para a conservação de kiwi minimamente processado. Tese Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. *Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa*

Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 232–239.

Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 208–213.

Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3).

Buckley, M., Cowan, C., McCarthy, M. (2007). The convenience food market in Great Britain: convenience food lifestyle (CFL) segments. *Appetite*, 49(3), 600–17.

Bulens, I., Van de Poel, B., Hertog, M., De Proft, M., Geeraerd, A., Nicolai, B. (2012). Influence of harvest time and 1-MCP application on postharvest ripening and ethylene biosynthesis of “Jonagold” apple. *Postharvest Biology and Technology*, 72, 11–19.

Cantos, E., Tudela, J., Gil, M., Espín, J. (2002). Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3015–23.

Cestari, A., Vieira, E., Santos, A., Mota, J., Almeida, V. (2004). Adsorption of anionic dyes on chitosan beads. 1. The influence of the chemical structures of dyes and temperature on the adsorption kinetics. *Journal of colloid and interface science*, 280(2), 380–6.

Chauhan, O., Raju, P., Singh, A., Bawa, A. (2011). Shellac and aloe-gel-based surface coatings for maintaining keeping quality of apple slices. *Food Chemistry*, 126(3), 961–966.

Chen, P., Hwang, Y., Kuo, T., Liu, F., Lai, J., Hsieh, H. (2007). Improvement in the properties of chitosan membranes using natural organic acid solutions as solvents for chitosan dissolution. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 27(1), 23–28.

Chien, P., Sheu, F., Yang, F. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 225–229.

Ciancia, M., Quintana, I., Vizcargüenaga, M., Kasulin, L., Dios, A., Estevez, J., Cerezo, A. (2007). Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. *International journal of biological macromolecules*, 41, 641–649.

Cocci, E., Rocculi, P., Romani, S., Rosa, M. (2006). Changes in nutritional properties of minimally processed apples during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 39(3), 265–271.

Córdova, K. (2006). Desidratação osmótica e secagem convectiva de maçã fuji comercial e industrial. *Tese Mestrado Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal do Paraná.*

Costa, F., Cappellin, L., Longhi, S., Guerra, W., Magnago, P., Porro, D., Soukoulis, C., Salvi, S., Velasco, R., Biasioli, F., Gasperi, F. (2011). Assessment of apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit texture by a combined acoustic-mechanical profiling strategy. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 21–28.

Dai, J., Mumper, R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–52.

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R., Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981–1014.

Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103(3), 891–899.

Dea, S., Brecht, J., Nunes, M., Baldwin, E. (2010). Quality of fresh-cut “Kent” mango slices prepared from hot water or non-hot water-treated fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 56(2), 171–180.

Degl’Innocenti, E., Guidi, L., Pardossi, A., Tognoni, F. (2005). Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Acephala*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 9980–4.

Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84(1), 99–105.

Dhall, R. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(5), 435–50.

Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO).(2009). retirado de <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Consultado a 3 maio de 2013.

Falguera, V., Quintero, J., Jiménez, A., Muñoz, J., Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303.

Feliciano, R., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A., Figueira, M., Duarte, C., Carvalho, A., Bronze, M. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 35–45.

Fellows, P. (2000). Food Processing Technology: Principles and Practice. *Second Edition. CRC Press LLC. 2000 Corporate Blvd, New York. 409–417.*

Fonseca, S., Oliveira, F., Brecht, J. (2002). Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *Journal of Food Engineering*, 52(2), 99–119.

Galus, S., Lenart, A. (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 459–465.

George, M., Abraham, T. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs : Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*, 114, 1–14.

Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A. (2011). Physical , mechanical , barrier , and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefiran. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 477–483.

Gil, M., Aguayo, E., Kader, A. (2006). Quality Changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4284–4296.

Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78–85.

Gómez-Ordóñez, E., Jiménez-Escrig, A., Rupérez, P. (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43(9), 2289–2294.

Gupta, S., Srivastava, S., Sane, A., Nath, P. (2006). Differential expression of genes during banana fruit development , ripening and 1-MCP treatment : Presence of distinct fruit specific , ethylene induced and ethylene repressed expression. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 16–22.

Haddar, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O. M., Nasri, M., Bougatef, A. (2012). Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *International journal of biological macromolecules*, 51(4), 477–83.

Haq, M., Hasnain, A., Azam, M. (2013). Characterization of edible gum cordia film: Effects of plasticizers. *LWT - Food Science and Technology*, *In press*.

Hosseini, S., Rezaei, M., Zandi, M., Ghavi, F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food chemistry*, 136(3-4), 1490–5.

Iglesias, I., Echeverría, G., Lopez, M. (2012). Fruit color development, anthocyanin content, standard quality, volatile compound emissions and consumer acceptability of several “Fuji” apple strains. *Scientia Horticulturae*, 137, 138–147.

Imran, M., El-Fahmy, S., Revol-Junelles, A., Desobry, S. (2010). Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 219–225.

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2010). Retirado de <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailheAlimento.aspx?ID=IS663>. Consultado a 3 setembro 2013.

Jang, J., Moon, K. (2011). Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 124(2), 444–449.

Jiang, L., Wang, F., Han, F., Prinyawiwatkul, W., No, H., Ge, B. (2012). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. *Journal of applied microbiology*, 114(4), 956–63.

Jung, S., Watkins, C. (2011). Involvement of ethylene in browning development of controlled atmosphere-stored “Empire” apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 219–226.

Kevany, B., Van Agtmael, R., Dilley, D., Golding, J. Postharvest Temperature affects colour development in "Rome" apples. *Acta Hort. (ISHS)*, 628, 623-625.

Konopacka, D., Jesionkowska, K., Krucynska, D., Stehr, R., Schoorl, F., Buehler, A., Egger, S., Codarin, S., Hilaire, C., Höller, I., Guerra, W., Liverani, A., Donati, F., Sansavini, S., Martinelli, A., Petiot, C., Carbó, J., Echeverria, G., Iglesias, I., Bonany, J. (2010). Apple and peach consumption habits across European countries. *Appetite*, 55, 478–483.

Kumar, S., Mishra, B., Saxena, S., Bandyopadhyay, N., More, V., Wadhawan, S., Hajare, S., Gautam, S., Sharma, A. (2012). Inhibition of pericarp browning and shelf life extension of litchi by combination dip treatment and radiation processing. *Food Chemistry*, 131, 1223–1232.

Lee, J. Y., Park, H. J., Lee, C. Y., Choi, W. Y. (2003). Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT - Food Science and Technology*, 36(3), 323–329.

Lee, K., Mooney, D. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106–126.

Lin, B., Du, Y., Liang, X., Wang, X., Wang, X., Yang, J. (2011). Effect of chitosan coating on respiratory behavior and quality of stored litchi under ambient temperature. *Journal of Food Engineering*, 102(1), 94–99.

López, A., Rico, M., Rivero, A., Suárez de Tangil, M. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3), 1104–1109.

Maguire, K., Banks, N., Lang, A., Gordon, I. (2000). Harvest Date, Cultivar, Orchard, and Tree Effects on Water Vapor Permeance in Apples. *Journal of the American society for Horticultural Science*, 125(1), 100–104.

Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M., Karim, A. (2007). Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch – Alginate edible film containing lemongrass oil. *Journal of Food Science*, 72(6).

Manivannan, K., Thirumaran, G., Devi, G. (2008). Biochemical Composition of Seaweeds from Mandapam Coastal Regions along Southeast Coast of India. *American-Eurasian Journal of Botany*, 1(2), 32–37.

Maran, J., Sivakumar, V., Sridhar, R., Thirugnanasambandham, K. (2013). Development of model for barrier and optical properties of tapioca starch based edible films. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1335–47.

Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318–31.

McMeekin, T., Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 133–153.

Mohamed, S., Hashim, S., Rahman, A. (2012). Seaweeds : A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 83–96.

Nicolas, J., Richard-Forget, F., Goupy, P., Amiot, M., Aubert, S. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products Enzymatic Browning Reactions in Apple and Apple Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(2), 109–157.

Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., Ngeontae, W. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 44(3), 798–806.

NP EN 12135:2000. Sumos de frutos e produtos hortícolas. Determinação do teor de azoto. Método de Kjeldahl.

NP EN 12143:1999. Sumos de frutos e produtos hortícolas. Determinação do teor de sólidos solúveis. Método refractométrico.

NP EN 1132:1996. Sumos de frutos e produtos hortícolas. Determinação valor de pH.

Ohlsson, T. (2001). Minimally processed foods. In *Minimally Processed Foods*. 4023–4027.

Ohlsson, T. (2003). In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press. 2ª edição.

Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 87–94.

Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M., González, L., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M., Munuera, I., Fiszman, S., Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), 139–148.

Palou, E., Swanson, B. (1999). Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *Journal of Food Science*, 64(1), 42–45.

Park, H. (2000). Development of advanced edible coatings for fruits. *Food Science & Technology*, 10, 254–260.

Park, S., Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1933–1939.

Pereda, M., Amica, G., Marcovich, N. (2012). Development and characterization of edible chitosan / olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1318–1325.

Pereira, R., Carvalho, A., Vaz, D., Gil, M., Mendes, A., Bártolo, P. (2013). Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 221–230.

Perez-Gago, M., Serra, M., Alonso, M., Mateos, M., Río, M. (2005). Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 36(1), 77–85.

Phan, T., Debeaufort, F., Luu, D., Voilley, A. (2005). Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 973–81.

Piga, A., Agabio, M., Emonti, G., Farris, G., D'Aquino, S. (2000). Influence of storage temperature on shelf-life of minimally processed cactus pear fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 33(1), 15–20.

Pizato, S., Cortez-Vega, W., Souza, J., Prentice-Hernández, C., Borges, C. (2013). Effects of different edible coatings in physical, chemical and microbiological characteristics of minimally processed peaches (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Food Safety*, 33(1), 30–39.

Ponce, A., Roura, S., Valle, C., Moreira, M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), 294–300.

Qi, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., Li, Y. (2011). Extending shelf-life of Fresh-cut “Fuji” apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), 62–66.

Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F., Debevere, J. (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference*, 15(3), 259–270.

Ramos, O., Fernandes, J., Silva, S., Pintado, M., Malcata, F. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(6), 533–52.

Rattaya, S., Benjakul, S., Prodpran, T. (2009). Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 151–157.

Regulamento (CE) n.º 1238/2005 da Comissão de 28 de Julho de 2005 que altera o Regulamento (CE) n.º 85/2004 que estabelece a norma de comercialização aplicável às maçãs. *Jornal Oficial da União Europeia*. 30.07.2005. L200/22

Rico, D., Martín-Diana, A., Barat, J., Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(7), 373–386.

Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98–103.

Rojas-Graü, M., Tapia, M., Martín-Belloso, O. (2008). Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 139–147.

Sacilik, K., Elicin, A. (2006). The thin layer drying characteristics of organic apple slices. *Journal of Food Engineering*, 73(3), 281–289.

Saltveit, M. (1999). Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 279–292.

Santos, M., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M., Nogueira, P., Pedroso, L., Ferreira, M. (2012). Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, 23(1), 275–281.

Schlimme, D., Rooney, M. (1994). Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. Chapman & Hall. New York. Estados Unidos da América.

Shewfelt, R. (1987). Quality of minimally processed fruits and vegetables. *Journal of Food Quality*, 10(3), 143–156.

Sivaroban, T., Hettiarachchy, N., Johnson, M. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41, 781–785.

- Soliva-Fortuny, R., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. (2004). Microbiological and biochemical stability of fresh-cut apples preserved by modified atmosphere packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 215–224.
- Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2003). New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 14(9), 341–353.
- Son, S., Moon, K., Lee, C. (2000). Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14456, 2071–2074.
- Son, S., Moon, K., Lee, C. (2001). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*, 73, 23–30.
- Tapia de Daza, M., Alzamora, S., Chanes, J., Gould, G. (1996). Combination of preservation factors applied to minimal processing of foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 36(6), 37–41.
- Tapia, M., Rojas-Graü, M., Carmona, A., Rodríguez, F., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008). Use of alginate-and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1493–1503.
- Tiecher, A., Paula, L., Chaves, F., Rombaldi, C. (2013). UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 230–239.
- Toivonen, P. (2004). Postharvest Storage Procedures and Oxidative Stress. *Hort Science*, 39(2002), 938–942.
- Toivonen, P., Brummell, D. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1–14.
- Tomás-Barberán, F., Espín, J. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853–876.
- Tripathi, S., Mehrotra, G., Dutta, P. (2009). Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(4), 372–6.
- Underwood, A., 1997. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. *Cambridge University Press*
- Valencia-Chamorro, S., Palou, L., Del Río, M., Pérez-Gago, M. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9), 872–900.
- Valentão, P., Trindade, P., Gomes, D., Guedes, P., Pinho, D., Mouga, T., Andrade, P. (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 119(4), 1359–1368.
- Valero, D., Díaz-Mula, H., Zapata, P., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M. (2013). Effects of alginate edible coating on preserving fruit quality in four plum cultivars during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 77, 1–6.
- Varela, P., Salvador, A., Fiszman, S. (2005). Shelf-life estimation of “Fuji” apples: Sensory characteristics and consumer acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 38(1), 18–24.

- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536–547.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 502–509.
- Voon, Y., Abdul, N., Rusul, G., Osman, A., Quek, S. (2006). Physicochemical , microbial and sensory changes of minimally processed durian (*Durio zibethinus* cv . D24) during storage at 4 and 28°C. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 168–175.
- Wild, H., Balk, P., Fernandes, E., Peppelenbos, H. (2005). The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 273–280.
- Wills, R., Lee, T., Graham, D., McGlasson, W., Hall, E. (1981). An introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. *Postharvest*.
- Wu, S., Chen, J. (2013). Using pullulan-based edible coatings to extend shelf-life of fresh-cut “Fuji” apples. *International journal of biological macromolecules*, 55, 254–7.
- Zubia, M., Sophie, M., Kerjean, V., Le, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116(3), 693–701.



## **Anexos**

- 1.** Imagens fotográficas das sondas do texturometro utilizadas nos testes de perfuração de fatias de maçã revestidas (a) e nos testes de tensão dos filmes formulados (b).
- 2.** Cálculo taxa de deformação dos filmes.
- 3.** Atributo crocante das fatias de maçã revestidas. O atributo crocante é representado pelo número de picos dos gráficos gerados pelo programa informático.
- 4.** Teor de humidade das fatias de maçã revestidas aos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 de ensaio.
- 5.** Imagens fotográficas de fatias de maçã revestidas aos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 do ensaio.
- 6.** Análise estatística do índice de escurecimento das fatias de maçã revestidas ao dia 20 de ensaio (2 way ANOVA, teste LSD).

## Anexo 1

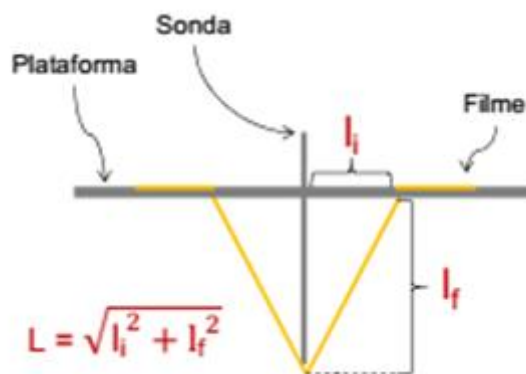


**Figura 13.** Sondas do texturometro utilizadas nos testes de perfuração de fatias de maçã revestidas (a) e nos testes de tensão dos filmes formulados (b).

## Anexo 2

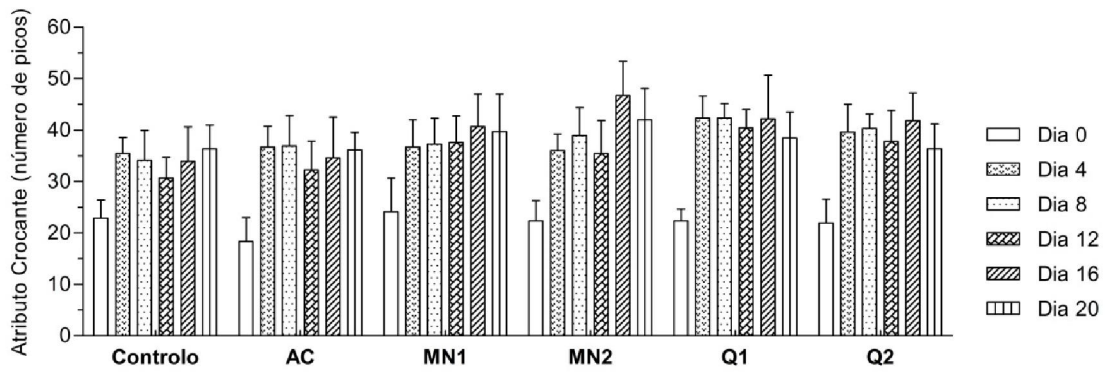
Cálculo do valor de L da equação 6 (taxa de deformação dos filmes).

A deformação pode ser calculada a partir da diferença entre o alongamento na perfuração (L) e a distância inicial (li). O alongamento na perfuração é a hipotenusa obtida a partir da soma da distância inicial (li) e da distância final (lf).



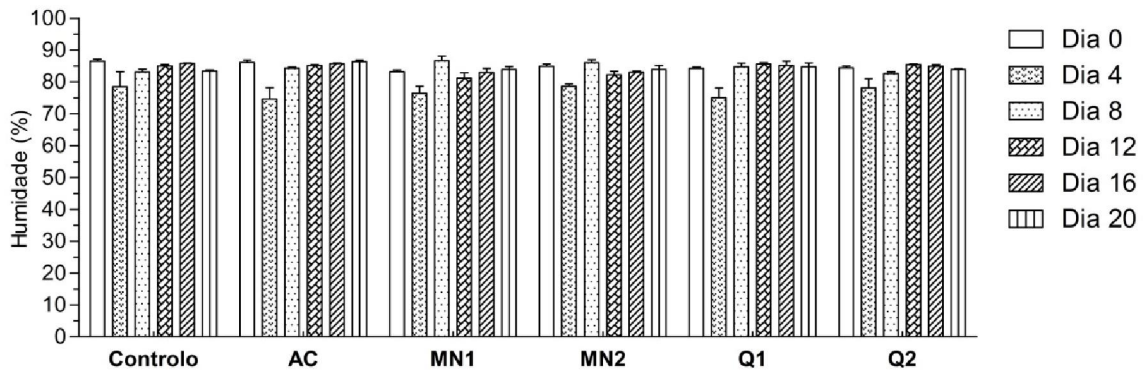
**Figura 24.** Esquema representativo dos parâmetros necessários ao cálculo da deformação na rutura.

### Anexo 3



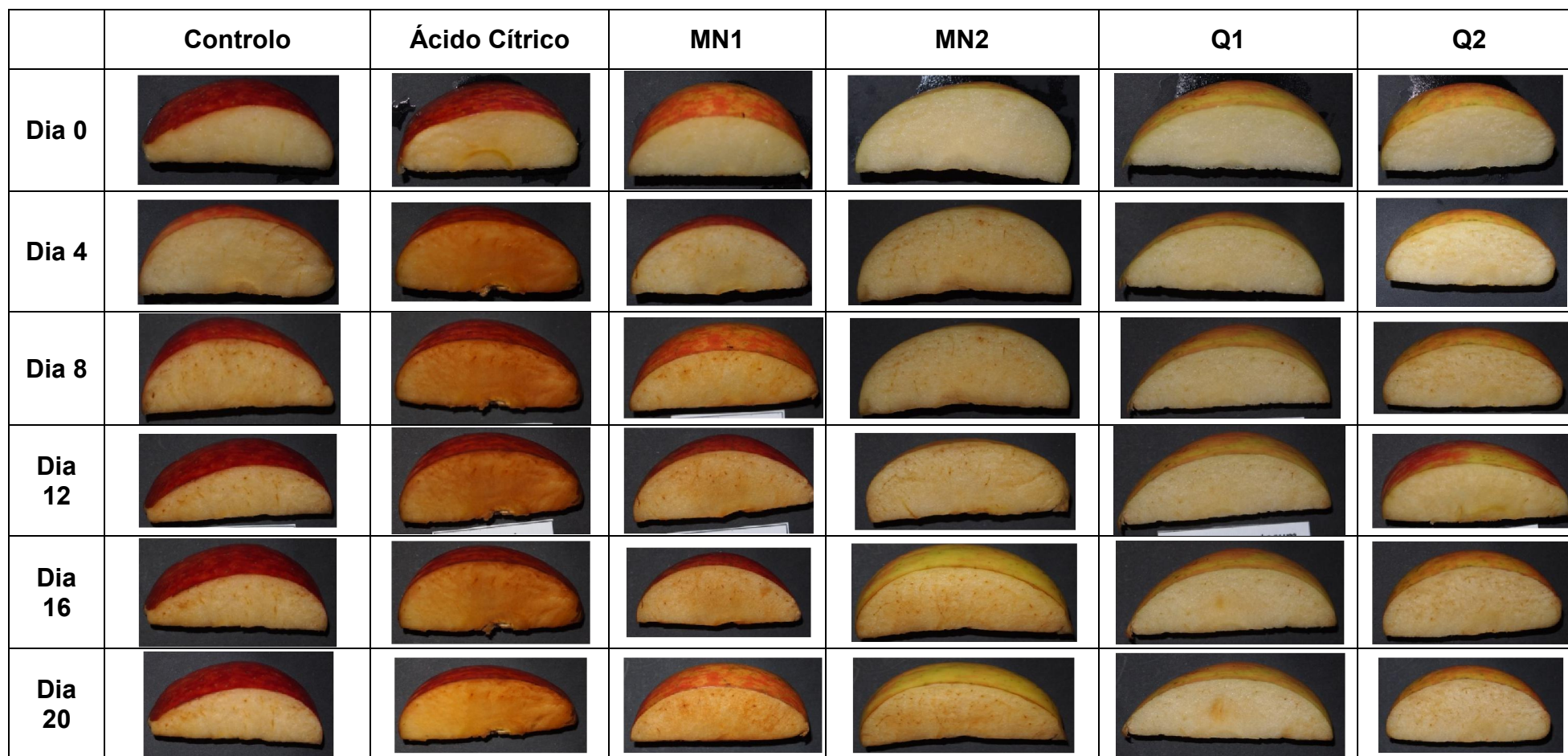
**Figura 25.** Atributo crocante das fatias de maçã revestidas com água (controlo), ácido cítrico (AC), *Fucus spiralis* (MN1), *Bifurcaria bifurcata* (MN2), *Codium tomentosum* (Q1) e *Codium vermilara* (Q2). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão (n=9).

### Anexo 4



**Figura 26.** Humidade (%) das fatias de maçã revestidas com água (controlo), ácido cítrico (AC), *Fucus spiralis* (MN1), *Bifurcaria bifurcata* (MN2), *Codium tomentosum* (Q1) e *Codium vermilara* (Q2) nos dias de ensaio. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

## Anexo 5



**Figura 27.** Registo fotográfico da evolução do aspeto das fatias de maçã revestidas com água (controlo), soluções de 0,5% ácido cítrico (AC), 0,5% *Fusicus spiralis* (MN1), 0,5% *Bifurcaria bifurcata* (MN2), 0,5% *Codium tomentosum* (Q1) e 0,5% *Codium vermilara* (Q2) nos vários dias de ensaio.

## Anexo 6

**Tabela 10.** Análise estatística do índice de escurecimento das fatias de maçã revestidas com água (controlo), soluções de 0,5% ácido cítrico, 0,5% *Fucus spiralis*, 0,5% *Bifurcaria bifurcata*, 0,5% *Codium tomentosum* e 0,5% *Codium vermilara* ao dia 20 de ensaio (2 way ANOVA, teste LSD).

	(I) Amostra	(J) Amostra	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
			Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
LSD	controlo	Acido citrico	-34,75153 <sup>*</sup>	4,38325	0,000	-43,5646	-25,9384
		<i>Fucus spiralis</i>	-27,34229 <sup>*</sup>	4,38325	0,000	-36,1554	-18,5292
		<i>Bifurcaria bifurcata</i>	-4,16650	4,38325	0,347	-12,9796	4,6466
		<i>Codium tomentosum</i>	10,18279 <sup>*</sup>	4,38325	0,024	1,3697	18,9959
		<i>Codium vermilara</i>	6,49078	4,38325	0,145	-2,3223	15,3039