



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia Alimentar

Incorporação de extrato de casca de romã em revestimentos comestíveis
Avaliação das características dos revestimentos e da sua eficácia na preservação
da qualidade de bagos de romã prontos-a-comer

Ana Margarida Romão Pereira

Beja

2016

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia Alimentar

**Incorporação de extrato de casca de romã em revestimentos
comestíveis**

**Avaliação das características dos revestimentos e da sua eficácia na
preservação da qualidade de bagos de romã prontos-a-comer**

**Dissertação de mestrado, realizado no Centro de Biotecnologia Agrícola e
Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL), apresentado na Escola Superior
Agrária do Instituto Politécnico de Beja**

Elaborado por:

Ana Margarida Romão Pereira

Orientado por:

Doutora Eliana Jerónimo

Doutor Carlos Ribeiro

Beja

2016

«As nossas lutas determinam os nossos sucessos»

Agradecimentos

Elaborar uma tese envolve aprender a organizar o pensamento e escolher as palavras certas. Tudo isto não seria possível sem o contributo de algumas pessoas, não sendo viável nomeá-las a todas, há, no entanto, algumas a quem não posso deixar de manifestar o meu agradecimento sincero.

Primeiramente, quero agradecer a DEUS por me ter ajudado a suportar a distância e as dificuldades do percurso. Por ter colocado as pessoas certas no momento certo da minha vida e principalmente por continuar a ensinar que nenhum título tem maior valor que os ensinamentos da vida e dos meus pais.

Quero fazer um agradecimento muito especial à Doutora Eliana Jerónimo por me receber e integrar tão bem no seu grupo de investigação e por toda a confiança que depositou em mim, que espero ter correspondido e não a ter desiludido. Agradeço toda a sua orientação, total apoio, disponibilidade, todos os conhecimentos transmitidos, pelas opiniões e críticas, todas as palavras de incentivo. Muito obrigada pelo fantástico acompanhamento ao longo deste ano importante na minha formação profissional.

Agradeço ao professor Doutor Carlos Ribeiro, por toda a sua disponibilidade e acompanhamento ao longo do trabalho. Também gostaria de agradecer à Doutora Silvina Ferro e Palma pelas suas palavras motivadoras que tanto me ajudaram a manter focada no meu objetivo, muito obrigada. De igual modo, agradecer aos todos os professores que nos acompanharam ao longo do mestrado, os vossos ensinamentos foram e são essenciais para o nosso percurso como profissionais.

Gostaria muito de agradecer à Flávia Fernandes por toda a sua paciência, tempo, disponibilidade e ajuda em todo o trabalho. Obrigada por todos os conselhos, por todas as opiniões e incentivos e estares sempre disposta a ajudar, muito obrigada não só pela excelente colega, mas também pela tua amizade. Também agradecer à Doutora Ana Rita por toda a disponibilidade, ajuda e paciência na elaboração dos filmes comestíveis. Obrigada pelos ensinamentos que me transmitiste que foram bastante valiosos para o meu trabalho. Agradeço à Paula Parreira por toda a sua “santa paciência” na microbiologia. Obrigada por estares sempre disponível em explicar me

todas as duvidas que tive durante o desenvolvimento do trabalho. Queria também agradecer ao David Soldado, pela ajuda e conselhos em algumas tarefas no laboratório e a tua boa disposição, muito obrigada.

Queria muito agradecer a todo o pessoal do Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL), pelo espirito de equipa, toda a atenção, toda a afinidade, integração e principalmente por todos os conhecimentos que me transmitiram não só profissionalmente como também pessoalmente. E com enorme orgulho digo que fiz parte do CEBAL, muito obrigada a todos. Agradecer à Doutora Fátima Duarte por todo o carinho que me recebeu no CEBAL. E queria ainda agradecer a duas pessoas que tenho como referência - à Ivone Torrado e Teresa Brás-obrigada por todos os vossos conselhos, amizade e carinho.

A adicionar, um agradecimento especial, a todos os meus amigos e familiares que estiveram presentes, sem margem de dúvida, foram um elemento crucial. Em especial agradecimento à minha mana e sobrinho por serem a minha inspiração.

Por ultimo dirijo um agradecimento muito especial aos meus dois pilares- aos meus pais, sem eles nada disto era possível. Obrigada por serem os meus modelos de coragem, positividade, pelo vosso carinho, amor incondicional, incentivo e paciência, tenho a certeza que sem a vossa força não teria conseguido.

Quando nos rodeamos por pessoas que nos querem bem chegamos mais longe. Obrigada a todos!!!

Publicações

Parte dos resultados preliminares desta tese foram publicados em:

Ana R. Prazeres; Namira Siga; Flávia Fernandes; **Margarida Romão**; David Soldado; Fátima Carvalho and Eliana Jerónimo (2015) Development and characterization of edible whey protein biofilms containing different pectin concentrations *in* Congress of Microbiotec and Biotechnology, December 2015, Évora.

Resumo

O objetivo do presente trabalho centra-se no desenvolvimento de metodologias de preservação da qualidade e segurança alimentar da romã minimamente processada e na valorização do resíduo gerado no descasque da romã.

Numa fase inicial preparou-se um extrato de resíduos do descasque de romã que apresentou um teor de fenóis totais de $111,7 \pm 3,25$ mg EAG/g. Com vista à obtenção de um revestimento comestível adequado para os bagos optou-se por um revestimento composto por quitosano (2%) e pectina (1%) devido à baixa solubilidade. Ao revestimento selecionado foi adicionado 3% do extrato. Filmes com e sem extrato foram caracterizados em termos de propriedades mecânicas, físico-químicas e atividades biológicas. Estes filmes apresentaram uma solubilidade de $20,4 \pm 5,59$ e $30,5 \pm 2,27$ % com e sem extrato, respetivamente. Apenas os filmes com extrato apresentaram valores de fenóis totais ($6,3 \pm 0,76$ mg EAG/g) e nenhum apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis*.

Posteriormente, os revestimentos (quitosano (2%) e pectina (1%) vs. quitosano (2%) e pectina (0,5%) e extrato (3%)) foram aplicados em bagos de romã, usando-se como controlo bagos de romã não revestidos. Os bagos foram armazenados a 4°C e monitorizados durante 14 dias em termos físico-químicos, nutricionais, microbiológicos e sensoriais. A aplicação dos revestimentos nos bagos de romã levou à redução da acidez titulável, pH e uma redução na contagem de microrganismos, comparativamente com o controlo. No que diz respeito aos compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante os bagos revestidos não mostraram melhorias em comparação com o controlo.

Palavras-chave: Romã, extrato de resíduos do descasque, processamento mínimo, revestimentos comestíveis, propriedades físico-químicas, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana

Abstract

The aim of this work focuses in the development of methods to preservation the quality and safety of the pomegranate fresh cut and in the valorization of the wastes originated from pomegranate peel.

Initially, it was prepared a waste extract from the pomegranate peel that showed a total phenolic content of 111.7 ± 3.25 mg EAG/g. In order to obtain an adequate edible coating for berries it was opted by one coating composed by chitosan (2%) and pectin (1%) due to low solubility. To the selected coating was added 3% of the extract. Films with and without extract were characterized taking in account their mechanical proprieties, physico-chemical and biological activities. These films showed a solubility of 20.4 ± 5.59 and 30.5 ± 2.27 % with and without extract, respectively. The films with extract were the only ones that showed total phenolic values (6.3 ± 0.76 mg EAG/g) and neither of them showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecallis* and *Salmonella enteretidis*.

Thereafter, the coatings (chitosan (2%) and pectin (1%) vs. chitosan (2%), pectin (0.5%) and extract (3%)) were applied in pomegranate berries, using as control pomegranate berries without coating. The berries were stored at 4°C and monitored during 14 days in physico-chemical, nutritional, microbiological and sensory parameters. The application of the coating in the pomegranate berries reduced the titratable acidity, pH and led to a reduction in the microorganism counting compared to the control. Regardless to phenolic compounds, anthocyanins and antitoxin activities the berries with coating didn't show improvements compared to control.

Keywords: Pomegranate, waste extract, fresh-cut, coatings edible, physico-chemical proprieties, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Índice geral

Agradecimentos	II
Publicações.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Índice geral.....	VII
Índice de figuras.....	X
Índice de tabelas.....	XII
Lista de abreviaturas e siglas.....	XIII
Introdução	1
1. Revisão da Literatura	3
1.1 A Romã - Origem, morfologia, composição química e benefícios da romã	3
1.1.1. Propriedades da casca da Romã	6
1.1.2. Romã minimamente processada.....	6
1.2 Frutos minimamente processados	12
1.2.1. Alterações bioquímicas e fisiológicas em frutos minimamente processados.....	13
1.2.2. Metodologias para prevenção da perda de qualidade em frutos minimamente processados	14
1.3 Objetivos	17
2. Material e métodos.....	18
2.1. Preparação e caracterização de extrato de resíduos do descasque de romã	19
2.1.1. Preparação do extrato.....	19
2.1.2. Quantificação de fenóis totais	19
2.1.3. Determinação da atividade antioxidante	20
2.1.4. Determinação da atividade antimicrobiana	21
2.2. Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para aplicação em bagos de romã... ..	23

2.2.1.	Filme de Pectina.....	23
2.2.2.	Filmes de Pectina e Carboximetilcelulose	24
2.2.3.	Filmes de Pectina e Quitosano	24
2.2.4.	Parâmetros avaliados nos filmes	25
2.3.	Incorporação do extrato de resíduos do descasque da romã num revestimento comestível	26
2.3.1.	Determinação da concentração de extrato de resíduos do descasque da romã a incorporar no revestimento comestível	26
2.3.2.	Quantificação de fenóis totais	26
2.3.3.	Análise estatística.....	27
2.4.	Caracterização dos filmes	27
2.4.1.	Determinação da espessura, gramagem e densidade.....	28
2.4.2.	Determinação da cor	28
2.4.3.	Determinação da transmissão da luz e transparência	29
2.4.4.	Determinação da firmeza	29
2.4.5.	Determinação do <i>swelling</i>	29
2.4.6.	Determinação da humidade e solubilidade.....	30
2.4.7.	Determinação da permeabilidade	30
2.4.8.	Quantificação de fenóis totais	31
2.4.9.	Determinação da atividade antioxidante	31
2.4.10.	Determinação da atividade antimicrobiana	32
2.4.11.	Análise estatística.....	32
2.5.	Processamento mínimo da romã	33
2.5.1.	Romãs e processamento mínimo.....	33
2.5.2.	Determinação da perda de peso.....	35
2.5.3.	Determinação do pH, sólidos solúveis totais e acidez titulável	35
2.5.4.	Determinação da cor	36
2.5.5.	Determinação da firmeza	36
2.5.6.	Análises microbiológicas	37
2.5.7.	Quantificação de fenóis totais e antocianinas totais.....	37

2.5.8.	Determinação da atividade antioxidante total	38
2.5.9.	Análises sensoriais	39
2.5.10.	Análise Estatística	39
3.	Resultados e discussão	41
3.1.	Caracterização do extrato de resíduos do descasque da romã.....	41
3.2.	Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para aplicação em bagos de romã	43
3.3.	Incorporação de extrato de resíduos do descasque de romã em filme comestível ..	45
3.4.	Caracterização dos filmes	47
3.5.	Processamento mínimo	51
4.	Conclusão.....	65
	Referências bibliográficas.....	67
	Anexo 1 – Ficha Prova Sensorial.....	76
	Anexo 2 – Publicações.....	77

Índice de figuras

Figura 1-Frações da romã; 1) Bagos; 2) Mesocarpo; 3) Pericarpo	4
Figura 2 - Composição e distribuição energética por 100g de bagos de romã em fresco (Fonte: INSA, 2016)	4
Figura 3 - Fluxograma geral da produção de frutas e vegetais minimamente processados (adaptado de James and Ngarmsak, 2010).....	13
Figura 4-Fluxograma correspondente às etapas do trabalho.	18
Figura 5-Preparação do extrato de romã em pó (A- Extração por ultrassons; B- Filtração por camadas de gaze; C- Extrato em pó).....	19
Figura 6- Microplaca de 96 poços para determinação da CMI no extrato	23
Figura 7-- Placo com filtro e filme filtrado	25
Figura 8- A- Bagos imersos na solução de revestimento; B- Bagos com revestimentos colocados a secar à temperatura ambiente	26
Figura 9-Micrómetro.....	28
Figura 10- Colorímetro	29
Figura 12- Exsicador com células de permeabilidade.....	31
Figura 13- Esquema do processamento da Romã. C: bagos de controlo; QP: bagos imersos em revestimento de quitosano (2%) pectina (1%) e QPE: bagos imersos em revestimento de quitosano (2%) pectina (0,5%) com 3% de extrato	34
Figura 14- A) Determinação do pH; B) Determinação de SST; C) Determinação da acidez titulável.....	35
Figura 15- Determinação da cor para materiais granulares.....	36
Figura 16- Determinação da textura no texturometro	37
Figura 17- Painel de Avaliação	39
Figura 18- Halos de Inibição - em cima à esquerda o filme QP e à direita o filme QPE, em baixo à esquerda o controlo do ácido acético e à direita o controlo de quitosano. A) <i>Escherichia coli</i> ; B) <i>Enterococcus faecalis</i> ; C) <i>Salmonella enteritidis</i>	49
Figura 19- Perda de peso nos bagos de romã ao longo do período de conservação.....	52
Figura 20- Gráficos referentes aos parâmetros da cor dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C; A- a* por tratamento; B- a* por dias de conservação; C- b* por tratamento; D- C por tratamento ; E- C por dias de conservação; F- H* por tratamento ; G- H* por dias de conservação;	56
Figura 21- Gráficos referentes aos parâmetros da textura dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C.....	57
Figura 22- Médias das pontuações sensoriais dos bagos de romã no primeiro dia de armazenamento	60

Figura 23- Compostos fenólicos dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C; A- Teor de fenóis totais; B- Teor de antocianinas	63
Figura 24- Atividade antioxidante dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C; A- DPPH; B- FRAP	64

Índice de tabelas

Tabela 1 – Composição em vitaminas e minerais por 100 g de bagos de romã (Fonte: INSA, 2016)	5
Tabela 2 - Estudos e resultados gerais obtidos em trabalhos em romã minimamente processada	8
Tabela 3- Formulações de diferentes filmes	23
Tabela 4 - Teor em fenóis totais e atividade antioxidante do extrato de resíduos de descasque da romã	41
Tabela 5- Caracterização das diferentes formulações de filmes comestíveis	43
Tabela 6- Incorporação do extrato no revestimento e otimização das concentrações a usar	45
Tabela 7-Propriedades, quantificação de fenóis e atividade antioxidante dos filmes comestíveis	47
Tabela 8 – Teor em fenóis totais e atividade antioxidante dos filmes	49
Tabela 9- Efeito dos tratamentos na perda de peso nos bagos de romã ao longo dos 14 dias de armazenamento.	51
Tabela 10 - Teor em sólidos solúveis totais (SST), Acidez titulável, pH e razão TSS/AT dos bagos de romã ao longo de 14 dias de armazenamento a 4°C	53
Tabela 11 - Parâmetros da cor e firmeza dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4° C	55
Tabela 12 - Crescimento microbiano nos bagos de romã ao longo dos 14 dias de armazenamento a 4°C (log ufg/g)	58
Tabela 13- Análise Sensorial dos bagos de romã no dia 1 de armazenamento a 4°C	60
Tabela 14 – Significâncias para o efeito do tratamento (T), tempo de armazenamento (TA) e interação entre tratamento e tempo de armazenamento (T x TA) sobre o teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante nos bagos de romã	61

Lista de abreviaturas e siglas

AA - Ácido Ascórbico

AT - Acidez titulável

BOPP - Polipropileno biorientado

C - Controlo

ClO₂ - Dióxido de Cloro

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CO₂ - Dióxido de Carbono

Cy3g - cyanidine 3-glucoside

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAA - Equivalentes de Ácido Ascórbico

EAG - Equivalentes de Ácido Gálico

ESF - Equivalentes de sulfato ferroso

FRAP - Método de redução do ferro

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogénio

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

MAP - Embalamento em atmosfera modificada

MeOH - Metanol

MHA - Muller Hinton Agar

MHB - Muller Hinton Broth

O₂- Oxigénio

OMAIAA - Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares

PAL - Fenilalanina amoníaco –Liase

PCA - Plate count agar

PET - Politereftalato de etileno

PG - Poligalacturonase

PME - Pectinametilesterase

POD- Peroxidase

PPO - Polifenol oxidase

PVC - Cloreto de polivinilo

QP – Revestimento sem extrato

QPE - Revestimento com extrato

SST - Sólidos solúveis totais

UV - Ultravioleta

Introdução

Nos dias de hoje a procura por frutos frescos prontos-a-comer (também designada por IV Gama ou minimamente processada) tem vindo a aumentar, no entanto estes frutos são mais perecíveis que os frutos inteiros. Várias estratégias têm sido exploradas no sentido de limitar a perda de qualidade dos frutos frescos prontos-a-comer e assim aumentar o tempo de vida útil destes produtos, entre elas a utilização de revestimentos comestíveis. As preocupações crescentes dos consumidores atuais com a segurança alimentar e presença de compostos com potenciais efeitos adversos para a saúde humana nos alimentos tem levado ao aumento da procura por compostos naturais como conservantes alimentares, nomeadamente por compostos naturais extraídos a partir de subprodutos da agroindústria. A utilização de extratos naturais como forma de aumentar o tempo de vida útil de frutos frescos minimamente processados tem sido explorada, e devido ao potencial aumento de eficiência destes compostos comparativamente com a imersão do fruto em solução aquosa contendo o extrato, a sua incorporação em revestimentos comestíveis apresenta-se como uma alternativa bastante apelativa.

Durante o processo de descasque da romã para a preparação dos diversos produtos de romã disponíveis no mercado, como sumos, compotas ou minimamente processada são gerados uma grande quantidade de resíduos, principalmente compostos por casca. Pesquisas recentes mostram que o extrato de casca da romã apresenta elevada quantidade de compostos fenólicos e atividades biológicas como antioxidante e antimicrobiana.

Assim, o objetivo deste projeto consiste na preparação de um extrato a partir de resíduos de descasque da romã e a sua posterior aplicação em revestimentos comestíveis para conservação de romã minimamente processada. Por um lado, pretende-se aumentar o tempo de vida útil da romã minimamente processada e por outro valorizar o resíduo obtido no processo de descasque do fruto, que normalmente é descartado. Para atingir os objetivos propostos, o presente trabalho envolve a preparação do extrato de casca de romã segundo condições já testadas previamente, o desenvolvimento de um revestimento comestível que seja adequado às características da romã, incorporação do extrato no revestimento desenvolvido e sua posterior aplicação em bagos de romã, sendo avaliada a eficácia deste tipo de estratégia na qualidade do produto através da monitorização de um

conjunto de paramentos físico-químicos, microbiológicos, biofuncionais e sensoriais durante 14 dias de conservação a temperaturas de refrigeração.

1. Revisão da Literatura

1.1 A Romã - Origem, morfologia, composição química e benefícios da romã

A romã (*Punica granatum* L.) pertence à família Punicaceae e acredita-se que é originária da Ásia Central, em particular do Irão, a partir de onde se espalhou para o resto do mundo (Teixeira da Silva *et al.*, 2013). Hoje em dia, a cultura da romã apresenta uma ampla distribuição geográfica, refletindo a flexibilidade e adaptabilidade a diferentes condições climáticas e grande diversidade genética (Teixeira da Silva *et al.*, 2013). Os maiores produtores de romã são países como Afeganistão, Irão, Israel, Brasil, Estados Unidos da América, Itália e Espanha, sendo este último o maior exportador europeu (OMAIA, 2016). Relativamente a Portugal, dados do Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares indicam que a produção de romã está concentrada na região do Algarve, que possui 80% da área e 95% da produção total do continente (OMAIA, 2016). A mesma entidade refere que a produção de romã em Portugal é proveniente principalmente de árvores dispersas, sendo a produção anual atual de cerca de 400 ton (OMAIA, 2016).

Punica granatum L. é tipicamente um arbusto ou uma árvore pequena com uma altura média de 2-5 m. As suas folhas são opostas, inteiras, brilhantes e alternadas. Os frutos da romã constituem-se em bagos (com cerca de 5-12 cm de diâmetro) dentro de uma casca dura amarelada, castanhada ou avermelhada que quando bem maduras rebentam, expondo os seus bagos de cor vermelha e sabor agri-doce muito delicioso (Teixeira da Silva *et al.*, 2013; Viladomiu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010). A casca da romã é constituída por duas partes: pericarpo (ao qual fornece uma camada de cutícula e fibras) e o mesocarpo (também conhecido como o albedo) (Gumienna *et al.*, 2016; Teixeira da Silva *et al.*, 2013). A porção edível da romã (bagos) constitui 50-60% do peso total do fruto do qual 75-85% é sumo e os restantes 15-25% são sementes (Akhtar *et al.*, 2015; Lansky and Newman, 2007; Tehranifar *et al.*, 2010). A composição química da romã depende de vários fatores, como a variedade, localização, clima, grau de maturação, método de cultivo e condições de armazenamento (Gumienna *et al.*, 2016). A Figura 1 mostra o interior da romã e as partes que a constituem (bagos, mesocarpo e pericarpo).

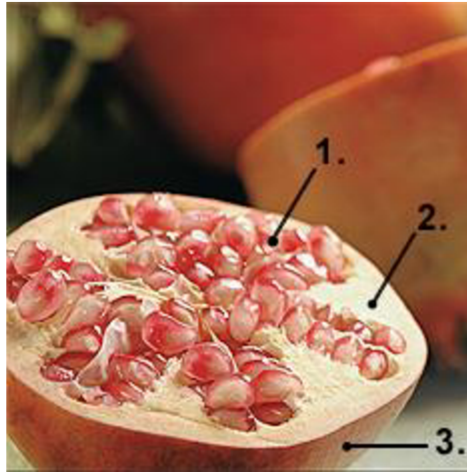


Figura 1-Frações da romã; 1) Bagos; 2) Mesocarpo; 3) Pericarpo

De acordo com dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 100 g de bagos romã (peso fresco) contém 83 g de água, 0,4 g de proteína, 12 g de hidratos de carbono, 240 mg de potássio, 11 mg de cálcio, 7 mg de magnésio, 0,6 mg de ferro e 13 mg de vitamina C, e fornecem 60 kcal de energia (INSA, 2016). Na Figura 2 é apresentada a composição e distribuição energética por 100 g de bagos de romã.

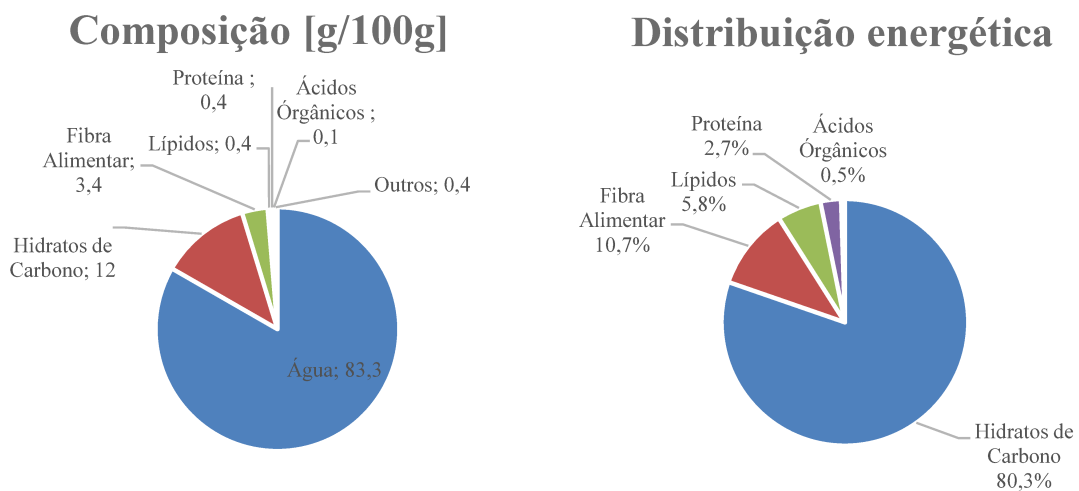


Figura 2 - Composição e distribuição energética por 100g de bagos de romã em fresco (Fonte: INSA, 2016)

Na Tabela 1 apresenta-se a composição dos bagos de romã em vitaminas e minerais, por 100 g.

Tabela 1 – Composição em vitaminas e minerais por 100 g de bagos de romã (Fonte: INSA, 2016)

<i>Vitaminas</i>	
Vitamina A total (equivalentes de retinol)	6 µg
Caroteno	38 µg
α-tocoferol	0,9 µg
Tiamina	0,05 mg
Niacina	0,2 mg
Vitamina B6	0,2 mg
Vitamina C	13 mg
Folatos	10 µg
<i>Minerais</i>	
Cinza	0,51 g
Sódio (Na)	3 mg
Potássio (K)	240 mg
Cálcio (Ca)	11 mg
Fósforo (P)	14 mg
Magnésio (Mg)	7 mg
Ferro (Fe)	0,6 mg

Nos últimos tempos, a investigação sobre os constituintes da romã estão principalmente centrados na identificação dos seus constituintes terapêuticos (Akhtar *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2010). Os bagos de romã apresentam ácidos orgânicos, como ácido ascórbico, cítrico e málico e compostos fenólicos, tais como flavonoides (principalmente antocianinas, responsáveis pela cor vermelha dos bagos) e taninos. Também são uma fonte importante de ácidos gordos, uma vez que as sementes são ricas em ácidos insaturados incluindo o linoléico, linolénico, oleico, palmítico e esteárico (Akhtar *et al.*, 2015; Gumienna *et al.*, 2016; Lansky and Newman, 2007; Teixeira da Silva *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010).

Em muitas culturas a romã é considerada como benéfica para a saúde, propriedade que tem sido cada vez mais suportada por diversos estudos *in vivo* e *in vitro*. A este fruto têm sido associadas propriedades biológicas, como atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (Arendse *et al.*, 2015; Caleb *et al.*, 2012; Kaderides *et al.*, 2015; O’Grady *et al.*, 2014).

1.1.1. Propriedades da casca da Romã

Para além dos benefícios da fração edível (bagos), vários estudos mostram que a fração não comestível da romã (sementes, cascas, folhas e raízes) apresenta efeitos biológicos relevantes, como atividades antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena (Orgil *et al.*, 2014), chegando mesmo a apresentarem maiores atividades que a fração comestível (Adams *et al.*, 2010; Orgil *et al.*, 2014; Viladomiu *et al.*, 2013).

A casca da romã, que compreende cerca de 50% do peso total do fruto, apresenta diversos compostos bioativos, como o ácido elágico e derivados, elagitaninos como punicalina e punicalagina e também minerais como potássio, cálcio, magnésio, fósforo e sódio (Akhtar *et al.*, 2015; Gullon *et al.*, 2016; Kaderides *et al.*, 2015; Viladomiu *et al.*, 2013).

No mercado estão disponíveis diversos produtos transformados de romã, como sumos, compotas, licores e vinhos, com conseqüentemente produção de uma elevada quantidade de subprodutos como bagaços e cascas. Utilizações que permitam a valorização destes recursos tem sido exploradas, nomeadamente para aplicação na alimentação humana e animal (Akhtar *et al.*, 2015; Gullon *et al.*, 2016; Kaderides *et al.*, 2015). A tendência para uma vida saudável, isenta de aditivos e conservantes, tem vindo a aumentar. Neste sentido a indústria alimentar tem procurado alternativas aos aditivos sintéticos e novas formas de conservação dos alimentos, nomeadamente através da utilização de compostos naturais de origem vegetal. A incorporação de extratos de casca da romã em produtos alimentares tem sido testada, e os resultados mostram que permitem melhorar a preservação de diversos produtos, tais como pão, camarão e produtos cárneos, reduzindo a oxidação lipídica e o desenvolvimento microbiano (Basiri *et al.*, 2015; Devatkal *et al.*, 2013; Kanatt *et al.*, 2010; Tayel and El-Tras, 2012; Yuan *et al.*, 2016), bem como enriquecer nutricionalmente gelados, bebidas e compotas (Çam *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2013; Wasila *et al.*, 2013).

1.1.2. Romã minimamente processada

Apesar dos possíveis benefícios para a saúde e das excepcionais características organolépticas que a romã apresenta, o consumo em fresco deste fruto é ainda reduzido, provavelmente devido à dificuldade de extração dos bagos. A romã minimamente

processada apresenta-se assim como um produto conveniente e atrativo para os consumidores (Caleb *et al.*, 2012; O’Grady *et al.*, 2014). No entanto, a romã minimamente processada é muito suscetível à deterioração da sua qualidade, resultando num produto com um período de validade reduzido (Maghoumi *et al.*, 2013; O’Grady *et al.*, 2014). Estudos relativos à conservação da romã minimamente processada têm vindo a aumentar nos últimos anos, apresentando-se na Tabela 2 alguns trabalhos realizados com a romã minimamente processada e os resultados obtidos.

Tabela 2 - Estudos e resultados gerais obtidos em trabalhos em romã minimamente processada

Variedade	Tratamentos e condições de conservação	Resultados	Referência
Acco e Herskawitz	<ul style="list-style-type: none"> • Embalamento em atmosfera passiva • Temperaturas de conservação - 5, 10 e 15°C • Tempo de conservação - 14 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Conservação a 5°C permite uma melhor retenção das propriedades dos bagos de romã 	(Caleb, Linus, <i>et al.</i> , 2013)
Arakta, Bahgwa e Ruby	<ul style="list-style-type: none"> • Embalamento em atmosfera passiva • Temperaturas de conservação - 1, 4 e 8°C • Tempo de conservação - 14 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior estabilidade nutricional nos bagos de romã mantidas a 1 e 4°C; • Os bagos armazenados a 1°C apresentaram melhor estabilidade microbiológica 	(O'Grady <i>et al.</i> , 2014)
Acco e Herskawitz	<ul style="list-style-type: none"> • Embalamento em atmosfera passiva • Embalagens com 75, 100 e 125 g de bagos de romã • Temperaturas de conservação - 5, 10 e 15°C • Tempo de conservação - 14 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • A perda de peso aumenta com o aumento da temperatura (5 a 15°C), sendo observado a maior perda de peso no dia 7; • Observou-se uma diminuição da concentração de O₂ nas embalagens na temperatura mais alta (15°C), enquanto que a 5°C o limite crítico não foi atingido; • Os bagos de romã embalados em atmosfera passiva mantiveram os atributos físico-químicos, a qualidade microbiológica e o valor nutricional dos bagos por 10 dias 	(Caleb, Mahajan, <i>et al.</i> , 2013)
Wonderful	<ul style="list-style-type: none"> • Embalamento em atmosfera modificada passiva e ativa e embalamento em caixas de plástico com ventilação. • Temperaturas de conservação - 5°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento do período da vida útil dos bagos de romã em 3 e 6 dias pela utilização de uma atmosfera composta por elevados níveis de oxigénio comparativamente com a utilização de atmosfera passiva ou embalamento em caixas com ventilação. 	(Banda <i>et al.</i> , 2015)

	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de conservação - 12 dias 		
Malas Syabe Lorestan. Malas Yazdi, Torsh Syabe Lorestan, Malas Torsh Saveh e Naderi Kashan	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicação de revestimento comestível de quitosano - 0,25; 0,5 e 1% • Temperaturas de conservação - 4°C • Tempo de conservação - 12 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Bagos revestidos com quitosano apresentaram menor crescimento microbiano e maior estabilidade das propriedades sensoriais e nutricionais comparativamente com os bagos do controlo sem revestimento 	(Ghasemnezhad <i>et al.</i> , 2012)
Mollar de Elche	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicação de ácido ascórbico e ácido cítrico e de revestimento de Aloe vera de forma isolada ou em combinação • Temperaturas de conservação - 3°C • Tempo de conservação - 12 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • O uso do revestimento de Aloe vera permitiu melhorar a retenção da firmeza nos bagos de romã e aumentou os níveis de antocianinas totais e fenólicos totais • A combinação de <i>Aloe vera</i> com os ácidos apresentou maior eficácia no controlo microbiano 	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 2013)
Acco	<ul style="list-style-type: none"> • Embalagens com diferentes áreas de perfuração • Temperatura de conservação: 5°C • Tempo de conservação: 15 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • O número apropriado de perfurações (neste estudo de 3 ou 6 perfurações de 160,1 cm²) nas embalagens modificadas impedem a acumulação do CO₂ nas embalagens; • Os bagos de romã minimamente processados em embalagens perfuradas apresentaram menor do crescimento microbiano 	(Hussein <i>et al.</i> , 2015)

Mridula	<ul style="list-style-type: none"> • Diferentes materiais de embalagem (Polipropileno; Polietileno de baixa densidade e KPA) • Temperatura de conservação: $5 \pm 2^\circ\text{C}$ • Tempo de conservação: 15 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • O material utilizado nas embalagens influencia as propriedades físico-químicas dos bagos de romã minimamente processados • Os bagos embalados em Poliprolineno apresentaram resultados mais significativos em termos de propriedades antioxidantes e prazo de conservação que os restantes bagos 	(Bhatia <i>et al.</i> , 2015)
Primosole	<ul style="list-style-type: none"> • Embalamento em atmosfera passiva • Temperatura de conservação: 5°C • Tempo de conservação: 10 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Não foram verificadas mudanças nas propriedades físico-químicas durante os 10 dias de armazenamento nos bagos minimamente processados embalado 	(Palma <i>et al.</i> , 2015)
Mollar de Elche	<ul style="list-style-type: none"> • Bagos expostos a diferentes doses de radiação UV (0,56; 1,13; 2,27; 4,54; 9,08 e $13,62 \text{ KJ/ m}^2$) • Temperatura de conservação: 5°C • Tempo de conservação: 13 a 15 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Não foram encontrados efeitos significativos da radiação UV nos bagos de romã minimamente processados 	(López- Rubira <i>et al.</i> , 2005)

De entre os vários trabalhos realizados destaca-se a avaliação do efeito da temperatura de conservação (O'Grady *et al.*, 2014), a composição da atmosfera (Banda *et al.*, 2015; O'Grady *et al.*, 2014), o material e tipo de embalagem (Bhatia *et al.*, 2015; Hussein *et al.*, 2015; Palma *et al.*, 2015) a aplicação de compostos antioxidantes sintéticos (Martínez-Romero *et al.*, 2013) e aplicação de revestimentos comestíveis (Ghasemnezhad *et al.*, 2012; Martínez-Romero *et al.*, 2013). Relativamente à temperatura de conservação, o trabalho de Caleb *et al.* (2013) mostrou que a manutenção da romã minimamente processada a 5°C permite uma melhor retenção das propriedades físico-químicas, da qualidade microbiológica e do valor nutricional dos bagos de romã que a conservação a 10 ou a 15 °C. Também O'Grady *et al.* (2014) verificou maior estabilidade do valor nutricional em bagos de romã conservados a 1 ou a 4 °C durante 14 dias de conservação comparativamente com a romã conservada a 8 °C. Os bagos mantidos a 1 °C apresentaram melhor qualidade microbiológica após 14 dias de conservação, não se observando nestes bagos o desenvolvimento de bolores, enquanto que nos mantidos a 4 e a 8 °C a presença de bolores foi detetada (O'Grady *et al.*, 2014).

O estudo do efeito da composição da atmosfera gasosa no interior da embalagem a par da avaliação do material de embalagem sobre a qualidade dos bagos de romã também tem tido algum destaque. O trabalho desenvolvido por Hussein *et al.* (2015) que mostrou a importância da utilização de filmes com perfurações na redução da condensação no interior das embalagens. Relativamente ao material de embalagem, no estudo realizado por Bhatia *et al.* (2015) foram testados materiais, como Polipropileno, Polietileno de baixa densidade e KPA (Nylon based laminate pouches), verificando-se menor perda de água e melhor retenção de cor e da qualidade organoléptica nos bagos de romã embalados com filme de Polipropileno.

Em menor extensão que os estudos sobre o efeito da temperatura de conservação e da composição da atmosfera no interior da embalagem, a utilização de revestimentos comestíveis também tem vindo a ser testada como forma de prolongar a vida útil de bagos de romã. Podem ajudar não apenas a retardar a deterioração dos alimentos e melhorar a sua qualidade, mas também aumentar a sua segurança e valor nutricional pela incorporação de compostos bioativos, como antimicrobianos e antioxidantes (Alvarez *et al.*, 2013; Oms-Oliu *et al.*, 2010). A aplicação de revestimentos em bagos de romã minimamente processados é um método inovador que potencia um aumento da vida de

prateleira dos bagos através da redução microbiana na sua superfície (Ghasemnezhad *et al.*, 2012; Martínez-Romero *et al.*, 2013) e ainda permite uma melhoria na qualidade dos bagos como, uma melhor retenção da firmeza e cor e maior teor de compostos bioativos, comparativamente aos bagos de controlo (Martínez-Romero *et al.*, 2013).

1.2 Frutos minimamente processados

Os produtos hortofrutícolas minimamente processados, também designados por produtos de IV (4^a) gama ou frescos cortados (fresh-cut) são frutos e vegetais que sofreram alterações físicas, como descasque e/ou corte, originando um produto que é totalmente utilizável pelo consumidor e que mantém as características sensoriais e nutricionais do fruto inteiro (James and Ngarmsak, 2010). A facilidade de consumo, frescura, o valor nutricional, a segurança e experiência sensorial tornam os produtos hortofrutícolas minimamente processados cada vez mais apelativos para os consumidores. Associado a este tipo de produtos está também a redução do desperdício familiar e o menor volume a transportar, uma vez que é apenas fornecido ao consumidor a fração comestível do fruto ou vegetal (James and Ngarmsak, 2010).

O processamento mínimo de frutas e vegetais envolve um conjunto de operações, tais como lavagem, descasque, corte, imersão e embalagem, dependendo da matéria-prima utilizada e das metodologias utilizadas para conservação do produto (Francis *et al.*, 2012; Pasha *et al.*, 2012). Na Figura 3 apresenta-se um esquema com os principais passos na produção de hortofrutícolas minimamente processados.

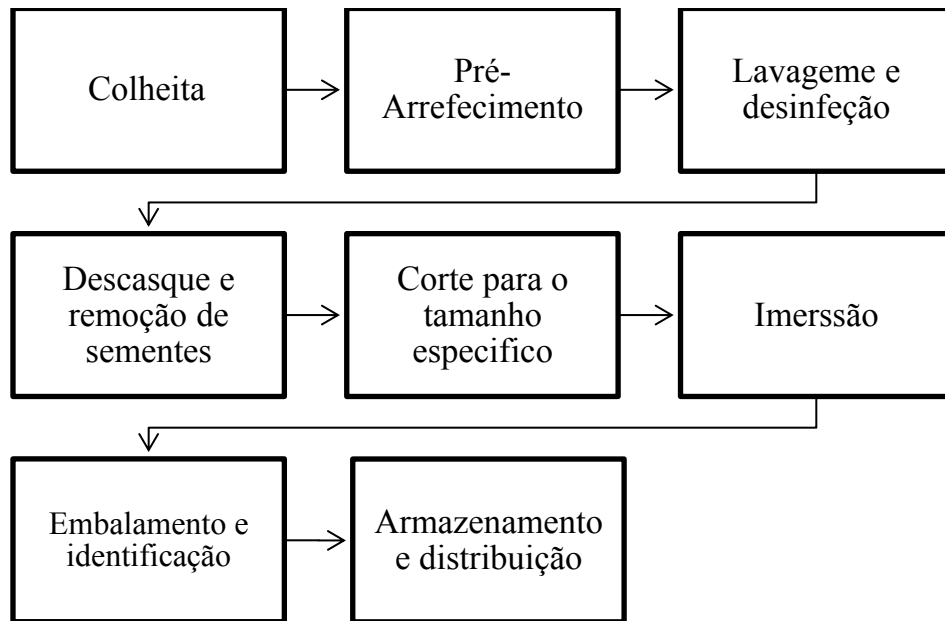


Figura 3 - Fluxograma geral da produção de frutas e vegetais minimamente processados (adaptado de James and Ngarmak, 2010)

O tempo de prateleira destes produtos depende de diversos fatores, como características iniciais do fruto ou vegetal, operações aplicadas na preparação e condições de conservação, podendo variar entre os 7 e os 20 dias (Ahvenainen, 1996; Ramos *et al.*, 2013). A temperatura de conservação é um parâmetro determinante da qualidade e conseqüentemente da vida útil dos produtos minimamente processados, sendo recomendável a manutenção dos frutos e vegetais minimamente processados a temperaturas ≤ 4 °C para garantir a qualidade e segurança alimentar do produto ao longo de toda a cadeia de distribuição e comercialização (Francis *et al.*, 2012).

1.2.1. Alterações bioquímicas e fisiológicas em frutos minimamente processados

O processamento mínimo afeta a integridade dos frutos, tornando-os suscetíveis a um conjunto de alterações que determinam uma redução da qualidade e do período de vida útil comparativamente com o fruto inteiro. A perda de qualidade dos frutos minimamente processados é principalmente causada por escurecimento, amolecimento, desidratação da superfície, perda de água, translucidez, desenvolvimento de *off-flavour* e *off-odour* e crescimento microbiano (Rojas-Graü *et al.*, 2009). Os danos mecânicos a que os frutos minimamente processados estão sujeitos levam ao aumento do metabolismo no fruto, com

aumento na taxa de respiração e da produção de etileno (James and Ngarmsak, 2010; Pasha *et al.*, 2012). O corte desprotege a superfície do fruto, contribuindo para a perda de água e também para a alteração de textura do fruto (Francis *et al.*, 2012; James and Ngarmsak, 2010). A perda da firmeza em frutos é causada principalmente pela degradação enzimática de pectinas, por intervenção das enzimas pectinesterase (PME) e poligalacturonase (PG) (Francis *et al.*, 2012; Oms-oliu *et al.*, 2010; Toivonen and Brummell, 2008).

O escurecimento enzimático é responsável pelas principais alterações de cor nos produtos minimamente processados e é o resultado da oxidação de substâncias fenólicas pela enzima polifenol oxidase (PPO) na presença de oxigênio (Ahvenainen, 1996; Francis *et al.*, 2012; Pasha *et al.*, 2012; Toivonen and Brummell, 2008). Da oxidação enzimática dos compostos fenólicos resulta a formação de quinonas, que por sua vez ao reagirem com aminoácidos e proteínas levam à formação de melanina, o pigmento castanho associado com o escurecimento enzimático (Toivonen and Brummell, 2008). A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), que é estimulada pela produção de etileno também contribui para o desenvolvimento do escurecimento (James and Ngarmsak, 2010).

Os frutos minimamente processados são altamente suscetíveis a contaminação microbiana e as condições de humidade, grandes superfícies de corte e a riqueza em nutrientes proporcionam um conjunto de condições favoráveis para o seu crescimento, sendo necessário a adaptação de metodologias para garantir a qualidade e a segurança desses produtos (James and Ngarmsak, 2010; Oms-oliu *et al.*, 2010). A manipulação destes produtos assume grande importância na sua qualidade microbiológica, sendo crítica a possível contaminação cruzada por trabalhadores e por contacto com superfícies contaminadas (Ahvenainen, 1996; Francis *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2006; Oms-oliu *et al.*, 2010).

1.2.2. Metodologias para prevenção da perda de qualidade em frutos minimamente processados

O estilo de vida dos consumidores modernos, associado ao desejo por produtos naturais que reivindicam benefícios para a saúde, têm sido responsáveis pelo aumento da produção e consumo de frutas frescas minimamente processadas. No entanto, as operações

mecânicas que envolvem o processamento mínimo dos frutos provocam um conjunto de alterações no fruto, que podem limitar o seu prazo de validade (Oms-Oliu *et al.*, 2010). Têm vindo a ser estudadas muitas metodologias, de modo, a preservar a qualidade e segurança dos frutos minimamente processados. Os tratamentos químicos visam a inibição de reações específicas que geram mudanças indesejáveis (James and Ngarmsak, 2010), como é o exemplo da acidificação para o retardamento do escurecimento. No entanto, a aplicação de métodos químicos pode conferir às frutas aromas anormais ou promover o amolecimento dos tecidos (James and Ngarmsak, 2010; Oms-oliu *et al.*, 2010; Rojas-Graü *et al.*, 2009). Alguns dos métodos físicos mais utilizados incluem a redução de temperatura e o uso de atmosferas modificadas.

As frutas são submetidas a uma primeira lavagem com água corrente, com o objetivo de remover as sujidades da superfície e reduzir a carga microbiana (James and Ngarmsak, 2010; Ramos *et al.*, 2013; Soliva-Fortuny and Martín-Belloso, 2003). A água potável é um requisito fundamental para a lavagem, a fim de impedir transferência de contaminação da água para o produto (James and Ngarmsak, 2010). No entanto a lavagem com água corrente não é suficiente para a remoção dos microrganismos presentes, sendo aplicadas de seguida formas de higienizar o produto minimamente processado, como imersão em dióxido de cloro (ClO₂), o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), aplicação de ozono e hipoclorito de sódio (Ahvenainen, 1996; Oliveira *et al.*, 2015; Pasha *et al.*, 2012; Rico *et al.*, 2007)

O embalamento com atmosfera modificada (MAP, Modified Atmosphere Packaging) é utilizado para prolongar a vida útil de frutos minimamente processados (Caleb *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015; Rojas-Graü *et al.*, 2009). A modificação da atmosfera numa embalagem pode ser feita de forma passiva ou ativa. Na atmosfera modificada passiva o produto é embalado e a atmosfera é modificada pela própria respiração do produto e da permeabilidade do material da embalagem. Na atmosfera modificada ativa é injetado, inicialmente, uma mistura de gases conhecida, tendo em conta o equilíbrio determinado pela interação produto, embalagem e ambiente (Banda *et al.*, 2015; Caleb, Mahajan, *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015) O uso de diferentes embalagens para a obtenção de uma atmosfera modificada é capaz de diminuir a atividade respiratória e produção de etileno, reduzindo a evolução do amadurecimento e posterior senescência do produto (Kendra, 2010; Rojas-Graü *et al.*, 2009).

1.2.2.1. Revestimentos Comestíveis

Revestimentos comestíveis são finas películas formadas pela secagem de material comestível aplicado à superfície do produto (Aldana *et al.*, 2014; Dhall, 2013). A formação de revestimentos comestíveis é possível graças à capacidade que diversos polímeros têm para formar películas (Campos *et al.*, 2011; Dhall, 2013). Para a preparação dos revestimentos, os polímeros devem ser dispersos e dissolvidos em solventes tal como água, álcool, soluções aquosas acidificadas, misturas de água e álcool ou em misturas de outros solventes (Campos *et al.*, 2011, Dhall, 2013). Os polímeros mais utilizados para preparar revestimentos comestíveis são: proteínas (gelatinas, caseína, glúten, queratina, proteína de soja, colagénio, soro de leite), polissacarídeos (celulose e seus derivados, quitosano, pectina, alginato e carragena, amido e seus derivados), lípidos (monoglicéridos e ácidos gordos, ceras, resinas); que podem ser utilizados de uma forma isolada ou em combinação, permitindo beneficiar das distintas características funcionais de cada polímero (Aldana *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2011; Dhall, 2013).

Os revestimentos comestíveis são aplicados como estratégia para reduzir os danos decorrentes do processamento mínimo nas frutas e vegetais, no entanto, os revestimentos comestíveis não devem interferir na aparência natural da fruta, devem possuir boa aderência a fim de evitar uma fácil remoção e não podem desenvolver alterações no gosto ou odor original (Dhall, 2013; Rojas-Graü *et al.*, 2009). Estes revestimentos atuam principalmente na manutenção das propriedades mecânicas do fruto e como barreira a gases e vapor de água, auxiliando no controlo da transferência de massas entre o fruto e o meio externo (Aldana *et al.*, 2014; Dhall, 2013; Rojas-Graü *et al.*, 2009). Para além disso, possuem também a capacidade de serem transportadores de compostos, como compostos antioxidantes e antimicrobianos que podem aumentar o tempo de prateleira dos produtos e reduzir o desenvolvimento microbiana (Aldana *et al.*, 2014; Debeaufort *et al.*, 1998; Dhall, 2013; Rojas-Graü *et al.*, 2009). A funcionalidade e o comportamento dos revestimentos depende principalmente das propriedades mecânicas e de transporte, da composição do filme, do seu processo de formação e do método de aplicação no produto (Aldana *et al.*, 2014; Dhall, 2013).

Outra aplicação prática que tem vindo a ser estudada é a incorporação de extratos/compostos naturais em revestimentos comestíveis. Um desses estudos foi realizado por Eça and Sartori (2014) onde foram incorporados extratos de fruta (acerola, papaia, pequi e morangos) em filmes de pectina. Neste estudo, os filmes de pectina contendo os compostos bioativos naturais mostram propriedades antimicrobianas contra agentes patogénicos que vulgarmente contaminam alimentos (Eça and Sartori, 2014).

Outro polímero que tem vindo a ser muito testado para aplicação em diversos produtos alimentares, incluído frutos minimamente processados é o quitosano. Alvarez *et al.* (2013) estudou as propriedades antimicrobianas de filmes de quitosano e filmes de quitosano enriquecidos com compostos bioativos e óleos essenciais, determinadas por ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo* em brócolos minimamente processados. Os resultados obtidos mostraram que os revestimentos de quitosano e quitosano enriquecidos com compostos bioativos e óleos essenciais podem ser uma boa alternativa para controlar o crescimento microbiano nos brócolos minimamente processados.

1.3 Objetivos

O objetivo final deste projeto consistiu i) no desenvolvimento de metodologia que garanta a qualidade e segurança alimentar de romã minimamente processada e ii) na valorização do resíduo obtido no processo de descasque da romã, que normalmente é descartado. Para atingir os objetivos propostos, o presente trabalho envolveu i) a preparação de um extrato de casca de romã segundo condições já testadas previamente, ii) o desenvolvimento de um revestimento comestível que seja adequado às características da romã, iii) a incorporação do extrato no revestimento desenvolvido e iv) a sua posterior aplicação em bagos de romã, sendo avaliada a eficácia deste tipo de estratégia na qualidade do produto através da monitorização de um conjunto de parâmetros físico-químicos, microbiológicos, nutricionais e sensoriais durante 14 dias de conservação a temperaturas de refrigeração.

2. Material e métodos

O trabalho experimental incluiu cinco tarefas principais, sendo elas: 1) Preparação e caracterização de extrato de resíduos do descasque de romã; 2) Formulação de revestimentos comestíveis; 3) Incorporação de extrato de resíduos do descasque de romã em revestimento comestível; 4) Caracterização dos filmes obtidos e 5) Processamento mínimo da romã. Na Figura 4 é apresentado o fluxograma das várias tarefas, com a indicação dos vários parâmetros analisados em cada uma das fases do trabalho.

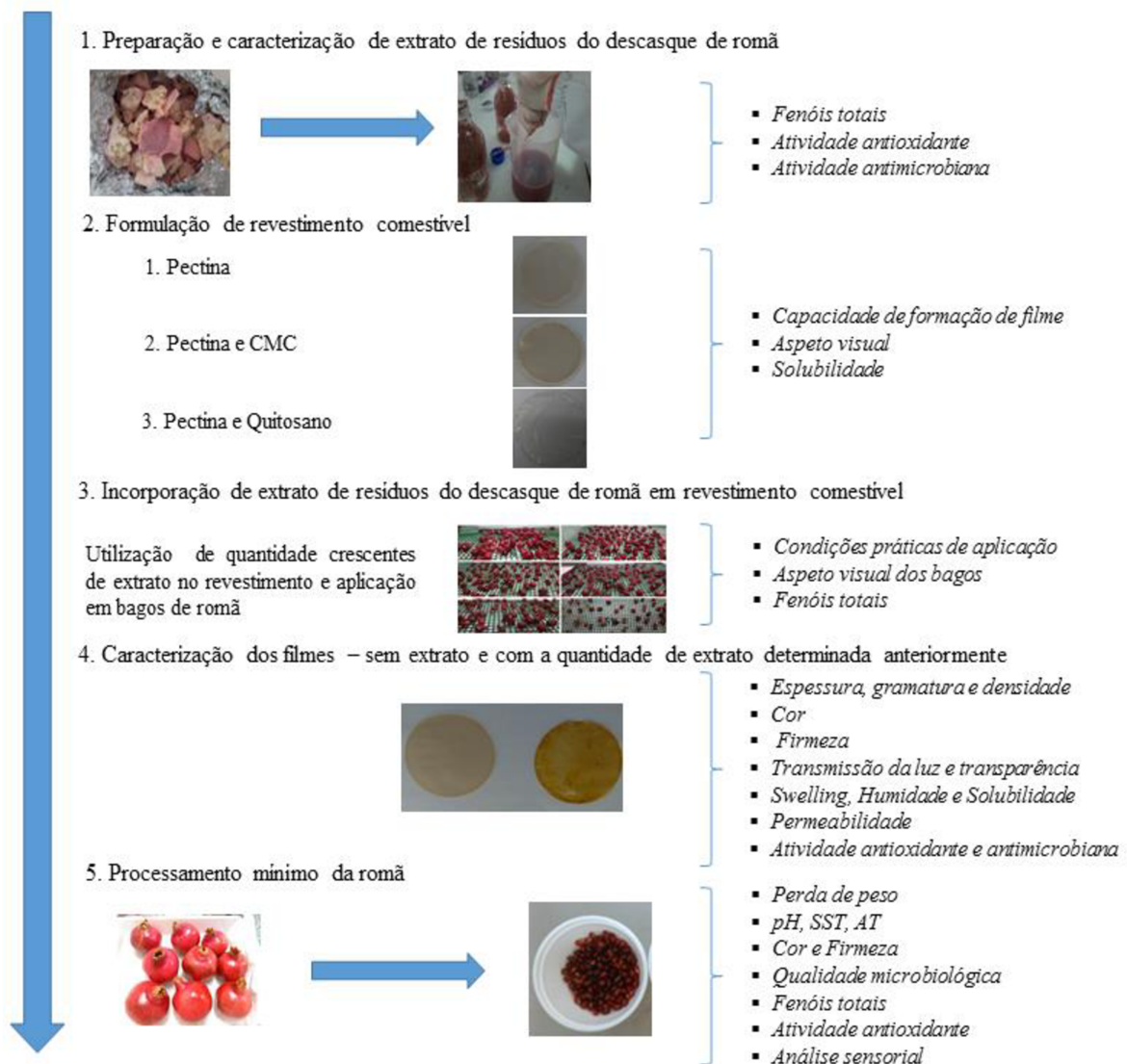


Figura 4-Fluxograma correspondente às etapas do trabalho.

2.1. Preparação e caracterização de extrato de resíduos do descasque de romã

2.1.1. Preparação do extrato

Resíduos do descasque de romã, compostos por casca (pericarpo e mesocarpo) e membranas internas, mantidos a - 80°C foram utilizados para a preparação do extrato. Imediatamente após retirar da câmara de - 80°C (MDF-U76V, Panasonic, México) os resíduos foram moídos numa picadora doméstica (Moulinex A320R1, Indonésia). O resíduo moído foi homogeneizado em água destilada na proporção 1:1 (resíduos:água) e posteriormente colocado no ultrassons (Bransonic Ultrasonic 3510E-DTH, Danbury, EUA) durante 20 min a 40°C (Figura 5A). Após extração, o homogeneizado foi filtrado com 4 camadas de gaze, como mostra a Figura 5B, e a fase líquida recolhida e congelada a - 80°C. O extrato foi posteriormente liofilizado (Liofilizador Coolsafe TM, Scanvac, Alemanha) até peso constante, obtendo-se um extrato em pó (Figura 5C). O extrato obtido foi caracterizado em termos de conteúdo em compostos fenólicos e atividades antioxidante e antimicrobiana. O extrato foi utilizado nas fases seguintes do projeto.



Figura 5-Preparação do extrato de romã em pó (A- Extração por ultrassons; B- Filtração por camadas de gaze; C- Extrato em pó)

2.1.2. Quantificação de fenóis totais

A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo descrito por Falleh *et al.* (2008), com algumas alterações. Numa microplaca de 96 poços, a 10 μL de extrato diluído em água destilada foi adicionado 150 μL de reagente de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstad, Alemanha) a 10% (v/v). Após agitação, a mistura foi deixada em repouso no escuro durante 5 min e de seguida adicionado 150 μL de 60 g/L de carbonato de sódio (Merck, Darmstad, Alemanha). Após 60 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorvância foi lida contra um branco (substituindo

apenas o volume da amostra por água) a 725 nm num leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, EUA). A concentração em fenóis totais foi determinada por interpolação de uma curva de calibração com ácido gálico (Sigma-Aldrich, Lisboa, Portugal) (0,04-0,25 mg/mL). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g extrato. A determinação da quantidade de fenóis totais no extrato foi realizada em triplicado.

2.1.3. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos: o método da captura do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e o método de redução do ferro (FRAP).

2.1.3.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método da captura do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH realizou-se segundo o procedimento descrito por Karioti *et al.* (2004) com algumas alterações, numa microplaca com 96 poços. A 3 µl de extrato diluído em água destilada adicionou-se 147 µl de metanol (MeOH) (Merck, Darmstad, Alemanha) e 150 µl da solução metanólica de DPPH 0,1 mM (Aldrich, Lisboa, Portugal). A microplaca foi agitada e deixada em repouso durante 30 min no escuro à temperatura ambiente. Preparou-se também o branco da amostra, onde a 3 µl de água adicionou-se 297 µl de solução de DPPH, uma reação de controlo substituindo o mesmo volume de amostra por água e adicionando 297 µl de solução de DPPH e um branco do controlo com o mesmo volume de água e 297 µl de MeOH. Uma curva padrão foi preparada utilizando uma solução de ácido L-ascórbico como padrão (0,05-0,300; mg mL⁻¹). A absorvância foi lida a 520 nm no leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, EUA) e a percentagem de inibição foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{[\text{Abs Controlo} - \text{Abs Amostra}]}{\text{Abs Controlo}} \times 100$$

Os resultados foram expressos em % de Inibição e como miligramas de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por g de peso seco.

2.1.3.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante pelo FRAP realizou-se de acordo com o procedimento descrito por Fawole and Opara (2013). A uma solução FRAP [50 mL de 300mM tampão de acetato com ácido acético (a pH=3.6, Normapur, VWR, Lisboa, Portugal) mais 5 mL de 10mM solução 2,4,6-tripyridyl-s-triazina (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Lisboa, Portugal em 40 mM de HCl, (Normapur, VWR, Lisboa, Portugal) e 5 mL de 20 mM de cloreto de ferro III (FeCl₃·6H₂O, 20 mM, Sigma-Aldrich, Lisboa, Portugal)] colocada em banho de água a 37°C, foi adicionado 75 µL do extrato. Após 30 min de incubação a 37°C, a absorvância foi medida a 593 nm no leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, EUA). Paralelamente, preparou-se uma solução padrão de sulfato ferroso (Merck, Darmstad, Alemanha), que foi utilizada para a curva de calibração (150-750 µM) e os resultados foram expressos em mmol equivalentes de sulfato ferroso (ESF) por g de peso seco. A determinação da atividade antioxidante pelos 2 métodos utilizados foi realizada em triplicado.

2.1.4. Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra bactérias patogénicas frequentemente associadas a contaminações alimentares, especificamente *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis* (bactérias gentilmente cedidas pelo Professor Ruben Fernandes, Escola Superior de Saúde do Porto).

As culturas bacterianas foram mantidas a -80°C em meio líquido Brucella Broth (Fluka Analytical) + 20% glicerol (Prolabo, VWR, Lisboa, Portugal) até serem utilizadas. Para reativar as culturas, estas foram descongeladas à temperatura ambiente, posteriormente inoculadas em meio líquido Muller Hinton Broth (MHB, Liofilchem) e incubadas a 37°C em agitação (200 rpm) durante aproximadamente 6 horas. Findo este tempo de incubação, as culturas foram plaqueadas, pelo método do riscado em quadrante, em meio sólido

Muller Hinton Agar (MHA, Liofilchem). A incubação decorreu a 37°C overnight. Após o período de incubação, as bactérias foram retiradas da placa, centrifugadas duas vezes durante 5 min a 2700 rpm e a densidade ótica das culturas bacterianas foi ajustada a 600 nm para 0.04 em MHB, correspondendo este valor aproximadamente 107 unidades formadoras de colónias (ufc)/mL.

A atividade antimicrobiana do extrato foi determinada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI). A CMI do extrato foi determinada através do método de microdiluição em meio líquido, de acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Foi definida uma gama de concentrações do extrato, partindo de uma solução *stock* de concentração 50 mg/mL em etanol, sendo a primeira concentração de extrato testada 2,0 mg/mL. A partir desta concentração, foram efetuadas diluições seriadas 1:2, em microplaca de 96 poços (SARSTEDT) e em triplicado. O controlo positivo da determinação de CMI usado foi inóculo bacteriano sem adição de extrato e o controlo negativo escolhido foi meio MHB. Foi também realizado um branco, uma vez que o extrato apresentava cor, sendo este constituído apenas por extrato e MHB. As placas foram seladas para prevenir evaporação de líquido durante a incubação, que decorreu a 37°C *overnight*. A CMI foi determinada qualitativamente através do ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) e quantitativamente a partir da medição da densidade ótica a 600 nm através do leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, EUA).

O MTT é usualmente utilizado para testar a viabilidade celular. Células viáveis com metabolismo ativo reagem com o MTT resultando num produto com coloração púrpura e que pode ser observado a olho nu. Por isso, a concentração mais baixa em que não é observada a cor referida corresponderá à CMI do agente antimicrobiano a estudar de uma forma visível. A solução de MTT (Calbiocher, BEM Millipore corp. Bilerica, EUA) estéril (por filtração em filtros de 0,22 µm) foi preparada em água peptonada (Liofilchem, Itália) e 40 µL desta solução a uma concentração de 0,2 mg/mL, foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por um período de cerca de 45 min e no final observadas as colorações dos poços (Figura 6).

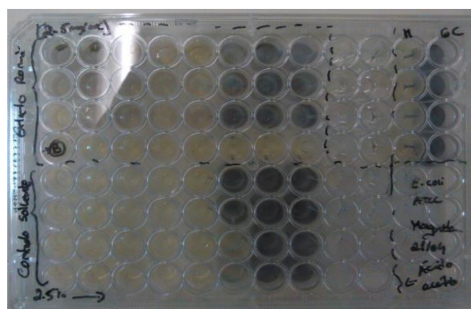


Figura 6- Microplaca de 96 poços para determinação da CMI no extrato

2.2. Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para aplicação em bagos de romã

Para o desenvolvimento de um revestimento comestível para aplicar em bagos de romã foram testadas formulações de filmes à base de: i) pectina, ii) pectina e carboximetilcelulose (CMC) e iii) pectina e quitosano. Na Tabela 3 são apresentadas as várias formulações testadas.

Tabela 3- Formulações de diferentes filmes

	Pectina	Quitosano	CMC	Glicerol	Óleo Vegetal	Tween 80	Ácido acético
1	3 %	-	-	1,5 %	0,75 %	0,20 %	-
2	3 %	-	0,25 %	1,5 %	0,75 %	0,20 %	-
3	3 %	-	0,50 %	1,5 %	0,75 %	0,20 %	-
4	3 %	-	0,75 %	1,5 %	0,75 %	0,20 %	-
5	3 %	-	1 %	1,5 %	0,75 %	0,20 %	-
6	1 %	2 %	-	1,5 %	-	-	0,595 %

2.2.1. Filme de Pectina

Para a preparação do filme de pectina – Filme 1, a pectina de maçã (Food Grade E-440i, Manuel Riesgo, S.A. Calle de Desengaño, Madrid, Espanha) foi adicionada a água destilada e mantida em agitação durante 6 h para dissolução da pectina. De seguida foi adicionado o glicerol (Prolabo, VWR, Lisboa, Portugal) e a mistura foi agitada durante 2 h e posteriormente mantida em banho de água (Memmert WND29, Schwabach, Alemanha) a 80°C durante 20 min. Após arrefecimento até atingir temperatura ambiente

foi adicionado o óleo vegetal (óleo de girassol, Fula, Sovena, Portugal) e o Tween 80 (Sigma-Aldrich, Lisboa, Portugal). A mistura foi mantida em agitação durante 20 min e de seguida homogeneizada num Ultraturrax (IKA T25 digital, Alemanha) a 15000 rpm durante 2 min utilizando um instrumento de dispersão S 25 N-10G. Por fim a mistura foi colocada num banho de ultrassons (3510, Branson) durante 15 min para desgaseificar. A solução foi espalhada em placas de petri de plástico de 90 mm, onde durante 24h foram secas em condições de temperatura (entre os 24-28°C) e humidade relativa (entre os 40-55%) controlados. Após esse período de tempo, os filmes foram acondicionados durante 72h numa caixa com uma solução saturada de nitrato de magnésio hexahidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) a uma humidade relativa controlada entre 20-30%, para posterior caracterização.

2.2.2. Filmes de Pectina e Carboximetilcelulose

Os filmes de pectina e carboximetilcelulose (CMC) – Filmes 2, 3, 4 e 5 foram preparados de acordo com o procedimento descrito para o filme de pectina, sendo carboximetilcelulose (Merck KGa, Germany) adicionada juntamente com o glicerol. A solução foi espalhada e armazenada nas mesmas condições descritas para o filme de pectina.

2.2.3. Filmes de Pectina e Quitosano

Para a preparação dos filmes de pectina e quitosano – Filme 6 foram preparadas soluções de pectina e quitosano isoladamente. O quitosano (KitoZyme, Herstal-Bélgica) foi adicionado a água destilada acidificada com ácido acético glacial e a mistura mantida em agitação durante 24 h. Paralelamente, a pectina de maçã foi também adicionada a água destilada acidificada com ácido acético glacial e mantida em agitação durante 24 h. Após este período, as duas soluções foram misturadas e adicionado o glicerol, sendo de seguida a solução final mantida em agitação durante 2 h. A solução foi espalhada e armazenada nas mesmas condições descritas para o filme de pectina.

2.2.4. Parâmetros avaliados nos filmes

Para avaliação do potencial das várias formulações testadas para aplicação em bagos de romã foram monitorizados um conjunto de parâmetros nos vários filmes obtidos, nomeadamente: a capacidade de formação de filme, aspeto visual (como falhas de formação, cor e transparência) e solubilidade.

Para avaliação da solubilidade procedeu-se de acordo com o método descrito por Eça *et al.* (2015) com algumas modificações. Amostras de filme (30 x 30 mm) foram secas em estufa a 105 °C durante 24 h. As amostras de filme secas foram pesadas (peso inicial) e colocadas em tubos contendo 40 mL de água destilada com 0,008 g de azida de sódio e mantidas em agitação durante 24 h. Após esse período, a solução contendo o filme foi filtrada, usando um filtro de 42,5 mm de diâmetro (GP/C, Whatman, Reino Unido) com a ajuda de uma bomba de vácuo (6, Vaccuterand, Alemanha). A matéria insolúvel foi recolhida e seca durante 24 h em estufa a 105 °C (Figura 7). O peso da matéria insolúvel foi determinado após secagem e a solubilidade foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Solubilidade} = \frac{\text{Pesofinal} - \text{Pesoinicial}}{\text{Pesofinal}}$$

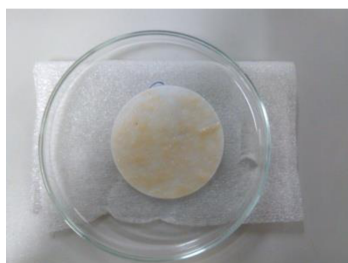


Figura 7-- Placo com filtro e filme filtrado

Com base nos resultados obtidos (apresentados na secção 3.2 dos Resultados e Discussão) considerou-se que o filme composto por quitosano e pectina apresentou características favoráveis para aplicação nos bagos de romã. O filme de quitosano e pectina foi utilizado nas fases seguintes do trabalho.

2.3. Incorporação do extrato de resíduos do descasque da romã num revestimento comestível

2.3.1. Determinação da concentração de extrato de resíduos do descasque da romã a incorporar no revestimento comestível

Para a determinação da quantidade de extrato de resíduos do descasque da romã a incorporar no revestimento comestível foi preparada uma solução de revestimento à base de quitosano (2 %) e pectina (0,5 %) de acordo com o descrito anteriormente no ponto 2.2.3. – Revestimento de pectina e quitosano (Filme 6). A quantidade de pectina foi reduzida de 1% para 0,5% comparativamente com o filme descrito anteriormente uma vez que com a incorporação do extrato numa solução contendo 1% de pectina levou à obtenção de soluções muito espessas, e de difícil aplicação. Após mistura das soluções de quitosano e pectina, foi adicionado 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de extrato de resíduos do descasque da romã. As soluções contendo o extrato foram posteriormente mantidas em agitação até dissolução completa do extrato. Após preparação das várias soluções, procedeu-se à sua aplicação nos bagos de romã para avaliação de condições práticas de aplicação dos filmes, e aspeto geral e teor em fenóis totais dos bagos de romã revestidos. Os bagos de romã foram imersos na solução de revestimento durante 5 min como mostra a Figura 8A e colocados a secar à temperatura ambiente durante 24 h (Figura 8B).

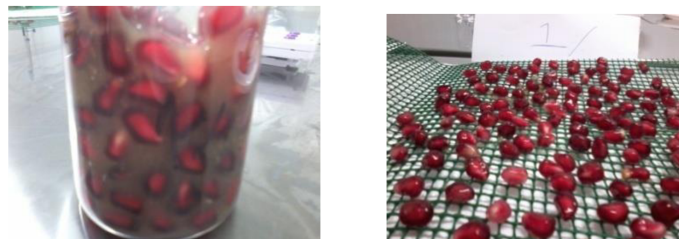


Figura 8- A- Bagos imersos na solução de revestimento; B- Bagos com revestimentos colocados a secar à temperatura ambiente

2.3.2. Quantificação de fenóis totais

Para a quantificação do teor em fenóis totais nos bagos de romã foi preparado um extrato metanólico dos bagos de acordo com o procedimento descrito por Maghoumi *et al.*, (2014) com algumas alterações. Brevemente, a 5 g de bagos de romã adicionou-se 10mL

de solução de metanol: água (2:8) (suplementado com 2mM de NaF para inativar a atividade de oxidase de polifenol e evitar a degradação fenólica). A mistura foi homogeneizada usando o Ultra Turrax (T25 digital, IKA) a uma velocidade 25000 rpm durante 20 min e de seguida centrifugada a 12000 rpm durante 25 min a 4 ° C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C até a quantificação de fenóis totais. Para cada concentração de extrato de resíduos do descasque de romã foram preparados três extratos metanólicos. A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Falleh *et al.*, (2008) e apresentado anteriormente secção 2.1.2- Quantificação de fenóis totais. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g amostra.

Com base nos resultados obtidos (apresentados na secção 3.3. dos Resultados) optou-se pela incorporação de 3 % de extrato de resíduos do descasque da romã no filme de quitosano e pectina. Os filmes de pectina e quitosano sem extrato e com 3 % de extrato foram caracterizados (secção 2.4. Caracterização dos filmes) e aplicados em bagos de romã (secção 2.5. Processamento mínimo de romã).

2.3.3. Análise estatística

Os resultados foram comparados usando o procedimento GLM do SAS (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA). O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$.

2.4. Caracterização dos filmes

A composição dos filmes caracterizados é apresentada na Tabela 3. Os filmes compostos por 2% de quitosano e 1% de pectina (QP) foram preparados de acordo com o descrito em 2.2.3, enquanto que os filmes compostos por 2% de quitosano, 0,5% de pectina e 3% de extrato de resíduos do descasque da romã (QPE) foram preparados de acordo com o descrito em 2.3.1.

2.4.1. Determinação da espessura, gramagem e densidade

A espessura dos filmes foi medida em 5 pontos diferentes com um micrómetro (Figura 9, Elcometer, 124Thickness Gauge:0,5mm, India). A gramagem e a densidade foram determinadas da seguinte forma:

$$\text{Gramagem (g/ cm}^2\text{)} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{área (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{Densidade (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{espessura (mm)} * \text{área (cm}^2\text{)}}$$



Figura 9-Micrómetro

2.4.2. Determinação da cor

A cor dos filmes foi determinada com um colorímetro (Figura 10, CR-400, Konica Minolta, Japão) usando o sistema CIE $L^* a^* b^*$, sendo o L^* a luminosidade e que varia entre 0 (preto) e 100 (branco), o a^* os tons verdes/vermelhos e o b^* os tons amarelos/azuis. O colorímetro foi calibrado usando uma placa branca de referência fornecida com o colorímetro. O ângulo de tonalidade (h^*) foi calculado a partir $\tan^{-1}(b^*/a^*)$, em que 0° representa vermelho, 90° amarelo, 180° verde e 270° azul (Robles-Sánchez *et al.*, 2009). A cor foi medida na parte inferior e superior de cada revestimento. Para determinar a variação total de cor entre as três coordenadas para cada revestimento, foi utilizada a seguinte fórmula: $\Delta = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2}$, onde (ΔL^{*2}) , (Δa^{*2}) e (Δb^{*2}) são a soma das diferenças de L^* , a^* e b^* , usando-se os valores de L^* , a^* e b^* da placa de calibração como referência.



Figura 10- Colorímetro

2.4.3. Determinação da transmissão da luz e transparência

A transmissão da luz foi medida num espectrofotómetro (Helios Alpha, Thermo Scientific, England) a comprimentos de onda seleccionados de 200 a 800 nm. A transparência do filme foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Transparência} = \frac{A_{600}}{x}$$

Onde, A_{600} é a absorvância a 600 nm e x a média da espessura do filme em milímetros.

2.4.4. Determinação da firmeza

A firmeza dos filmes foi determinada utilizando-se um texturometro (TA.HDPlus, Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 5 kg. Em 5 filmes escolhidos aleatoriamente foi determinada a força máxima necessária para que uma sonda de 3 mm perfure os filmes a uma velocidade 1mm/s percorrendo uma distância de 5 mm. Todas as medições foram realizadas a 20 °C e os resultados foram expressos em N.

2.4.5. Determinação do *swelling*

O *swelling* (a caracterização do inchaço do filme) foi determinado de acordo com o método descrito por Eça *et al.* (2015) com algumas modificações. Fragmentos de filme foram cortados com a dimensão 35 x 20 mm e colocados em tubos falcon com 40 mL de água destilada, onde permaneceram durante 24 h em repouso e a temperatura ambiente.

Após este período os filmes foram retirados, secos cuidadosamente com papel absorvente, pesados e colocados numa estufa a 70 °C durante 24 h. No final do período de secagem foi determinada a quantidade de água absorvida pelo filme.

2.4.6. Determinação da humidade e solubilidade

O teor de humidade e solubilidade dos filmes foram determinados de acordo com o procedimento descrito por Eça *et al.* (2015) com algumas modificações. Para determinação da humidade foram usados fragmentos de filme com uma dimensão de 30 x 30 mm. Os fragmentos de filme foram secos a 105 °C (Figura 11A) durante 24 h e a percentagem de humidade foi determinada pela diferença do peso final com o peso inicial. A solubilidade foi determinada por filtração dos fragmentos de filmes secos (Figura 11B) de acordo com o descrito em 2.2.4.

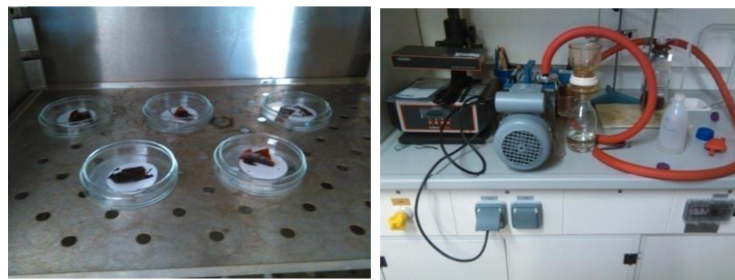


Figura 11- A- Fragmentos de filmes secos a 105°C; B- Filtração

2.4.7. Determinação da permeabilidade

A permeabilidade foi determinada de acordo com o método descrito por Eça *et al.* (2015), com algumas alterações. Resumidamente, os filmes foram colocados sobre umas células de permeabilidade (diâmetro = 65mm) com uma abertura circular e seladas com elásticos. O interior da célula foi preenchido com 9 mL de água destilada e as células foram colocadas num exsiccador com ventilação (ventoinha), como mostra a Figura 12. O peso nas células foi monitorizado durante 8 horas com intervalos de uma hora. As análises foram realizadas em triplicado.



Figura 12- Exsicador com células de permeabilidade

A permeabilidade foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$P = \frac{Na \delta}{\Delta P}$$

Onde, P – permeabilidade (mol m/ m² s Pa); Na – fluxo molar de vapor de água (mol/ m² s); δ – espessura do filme (m); ΔP – diferença de pressão de vapor de água entre os dois lados do filme(Pa).

2.4.8. Quantificação de fenóis totais

A quantificação de fenóis totais nos filmes foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Falleh *et al.* (2008) e apresentado anteriormente secção 2.1.2. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g amostra.

2.4.9. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes foi determinada por dois métodos: o método da captura do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e o método de redução do ferro (FRAP), conforme descrito na secção 2.1.3. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/g amostra no método do DPPH e em mM equivalentes de sulfato ferroso (ESF) por g amostra no método do FRAP.

2.4.10. Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana nos filmes foi realizada pelo Testes de Difusão em disco em agar, utilizando as mesmas estirpes bacterianas usadas para a determinação das CMI's no extrato (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis*), com uma concentração de aproximadamente 10⁷ ufc/mL, como descrito na secção 2.1.4. Uma porção de 100 µl de cada cultura bacteriana foram inoculados, recorrendo a um espalhador estéril em forma de T, em meio Muller Hinton Agar (MHA), de modo a se obter um crescimento bacteriano uniforme (em tapete). Após secagem (5 min) aplicou-se, com a ajuda de uma pinça estéril, discos de cada um dos filmes (sem e com extrato), previamente cortados uniformemente com 0,5 cm de diâmetro. Uma vez que o quitosano e o ácido acético glacial usados na composição dos revestimentos têm sido descritos como tendo atividade antimicrobiana, foram feitos controlos destes reagentes nas mesmas proporções que foram adicionados nos filmes (2% de quitosano (m/v) e 1.2% ácido acético glacial). Para tal, embebeu-se 10µl de quitosano e de ácido acético glacial em discos de filtro estéreis de 0,5 cm de diâmetro e procedeu-se de igual modo ao previamente mencionado. A incubação decorreu durante 24 h a 37 °C. Após 24 h, foi avaliado o crescimento bacteriano, ou ausência do mesmo, através da formação de halos de inibição em redor dos discos. Quanto maior o halo de inibição, maior o efeito antimicrobiano dos filmes e/ou soluções de controlo. Estes ensaios foram realizados em triplicado.

2.4.11. Análise estatística

Os filmes foram comparados usando o procedimento GLM do SAS (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA). O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$.

2.5. Processamento mínimo da romã

2.5.1. Romãs e processamento mínimo

Para o processamento mínimo foram utilizadas romãs da variedade ‘Acco’ produzidas na região do Baixo Alentejo. Após colheita, as romãs foram mantidas a 4 °C até ao processamento mínimo. As romãs foram desinfetadas numa solução aquosa de hipoclorito de sódio (200 ppm) durante 5 min, lavadas com água corrente e posteriormente secas com papel absorvente. As romãs foram descascadas manualmente, com a ajuda de uma faca e os bagos recolhidos. Os bagos foram distribuídos aleatoriamente em três lotes e cada um dos lotes submetidos a um dos seguintes tratamentos: i) imersão em água destilada (controlo, C); ii) imersão em solução de revestimento de quitosano e pectina (QP); e iii) imersão em solução de revestimento de quitosano e pectina com 3% de extrato de resíduos de descasque da romã (QPE). As soluções de revestimento foram preparadas de acordo com o descrito na secção 2.4. Em todos os tratamentos, os bagos foram imersos nas soluções correspondentes durante 5 min. O excesso de revestimento foi drenado e os bagos secos à temperatura ambiente. Após a secagem, os bagos foram distribuídos aleatoriamente por taças plásticas (100 g por cada taça) e as taças cobertas por filme de polipropileno biorientado (BOPP), utilizando uma seladora manual (Table Sealer, AVC). As embalagens foram armazenadas a 4 ± 1 °C por 14 dias, e nos dias 1, 4, 7, 11 e 14 de armazenamento foram avaliadas três embalagens por cada um dos tratamentos. Na Figura 13 apresenta-se em fluxograma as principais operações realizadas durante o processamento mínimo da romã.

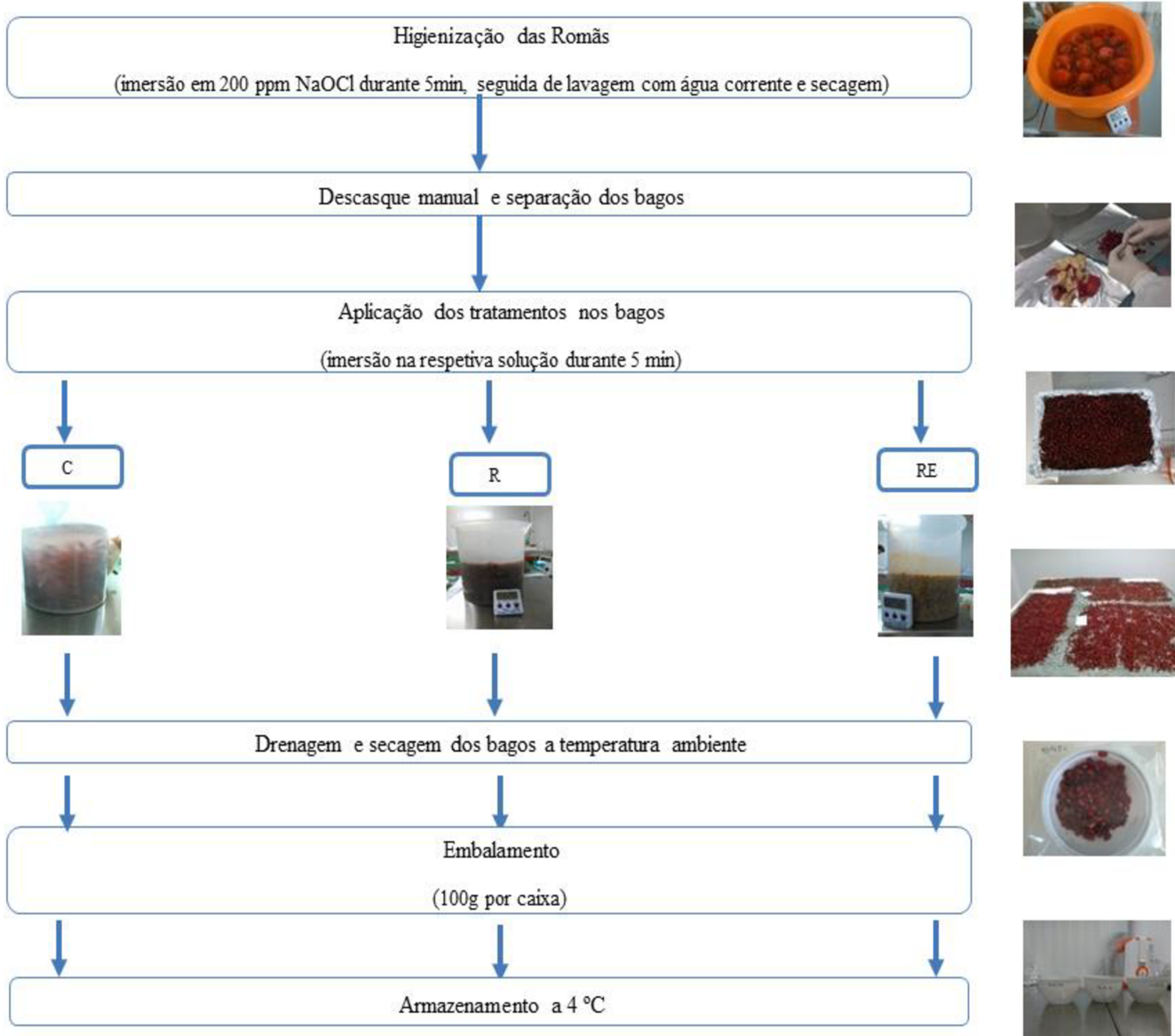


Figura 13- Esquema do processamento da Romã. C: bagos de controle; QP: bagos imersos em revestimento de quitosano (2%) pectina (1%) e QPE: bagos imersos em revestimento de quitosano (2%) pectina (0,5%) com 3% de extrato

2.5.2. Determinação da perda de peso

O peso inicial e final de cada embalagem foi determinado usando uma balança de precisão (AB204, Mettler Toledo, Alemanha). A perda de peso foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Perda de peso} = [(P_i - P_f) / (P_i)] \times 100,$$

onde P_i é o peso inicial (g) dos bagos embalados no dia 0 (dia de embalagem) e o P_f é o peso final (g) em cada dia de amostragem (4,7, 11 e 14).

2.5.3. Determinação do pH, sólidos solúveis totais e acidez titulável

A determinação do pH, sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável (AT) foi realizada em sumo de romã (Figura 14). O sumo foi preparado numa máquina doméstica de fazer sumos (FAGOR, Portugal) utilizando bagos de cada uma das embalagens. O teor em SST foi determinado com um refratômetro digital (RX-5000 α , Atago, Japão) a 20°C. Os resultados foram expressos em °Brix. A AT foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N de 1 mL de sumo diluído em 10 mL de água destilada com após adição de 3-4 gotas de indicador fenolftaleína (1%). Os resultados foram expressos em % de ácido cítrico. O pH dos sumos foi medido num potenciômetro (C861, Consort, Turnhout, Bélgica), a temperatura ambiente. Todas as determinações foram feitas em duplicado.

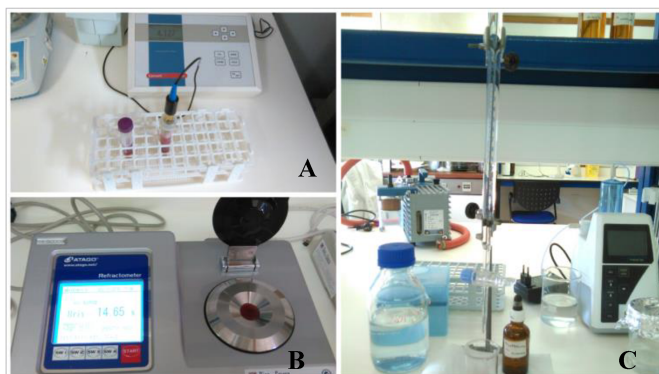


Figura 14- A) Determinação do pH; B) Determinação de SST; C) Determinação da acidez titulável

2.5.4. Determinação da cor

A cor dos bagos de romã minimamente processada foi determinada com um colorímetro usando o sistema CIE L^* , a^* , b^* (como descrito na secção 2.4.2.), utilizou-se um acessório CR-A50 (Konica Minolta, Osaka, Japão) para materiais granulares (Figura 15).

Para a determinação da diferença total de cor entre as três coordenadas L^* , a^* e b^* , é utilizada a seguinte fórmula: $\Delta E = [(\Delta L^*2 + \Delta a^*2 + \Delta b^*2)^{1/2}]$. E para a determinação do ângulo Hue utilizou-se a seguinte fórmula: $\Delta H = \arctan (a^*/b^*) \times (180/\pi)$



Figura 15- Determinação da cor para materiais granulares

2.5.5. Determinação da firmeza

A firmeza dos bagos de romã foi determinada utilizando-se um texturometro (TA. HDPlus, Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 5 kg. Em 10 bagos escolhidos aleatoriamente por cada embalagem foi determinada a força máxima necessária para que uma sonda cilíndrica de 35 mm (P/35) comprima o bago a uma profundidade de 5 mm, com uma velocidade de 1 mm/s (Figura 16). Todas as medições foram realizadas a 20 °C e os resultados foram expressos em N.



Figura 16- Determinação da textura no texturometro

2.5.6. Análises microbiológicas

Para a determinação da qualidade microbiológica dos bagos de romã minimamente processada, adicionou-se 10 g de bagos de cada uma das embalagens a 90 mL de meio diluente Peptone Buffered Water (PBW) (Liofilchern, Roseto Degli Abruzzi, Itália) e homogeneizou-se num Stomacher (400 Circulator, Seward, West Sussex, Reino Unido). Preparam-se diluições seriadas de 1:10 utilizando o mesmo meio diluente. Para a contagem de mesófilos totais e psicrófilos, foi inoculado 1 mL de cada diluição em meio Plate Count Agar (PCA), por incorporação e incubou-se a 30 ± 1 °C durante 72h, no caso dos mesófilos, e a 4 ± 1 °C durante 7 dias, no caso dos psicrófilos. Para a contagem de bolores e leveduras, 1 mL das várias diluições foi inoculado em meio Yeast Glucose Chloramphenicol Agar (YGCA), por incorporação e incubou-se a 25 ± 1 °C durante 5 dias. Todas as inoculações foram feitas em triplicado. Para microrganismos mesófilos e psicrófilos apenas as contagens entre 30-300 ufc foram consideradas, enquanto que para as leveduras e bolores só foram consideradas contagens entre 1-30 ufc. Os resultados foram expressos log de unidades formadoras de colónias por grama de amostra (log ufc/g).

2.5.7. Quantificação de fenóis totais e antocianinas totais

Para a quantificação de fenóis totais e antocianinas nos bagos de romã, foi preparado um extrato metanólico de acordo com o procedimento descrito por Maghoumi *et al.*, (2014) e apresentado na secção 2.2.2. Para cada embalagem foram preparados dois extratos metanólicos.

A quantificação de fenóis totais nos bagos de romã foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu, como descrito na secção 2.1.2. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de peso fresco (mg EAG/100 g PF).

A quantificação de antocianidinas foi realizada pelo método do pH diferencial, de acordo com o procedimento descrito por Giusti and Wrolstad, (2001). Brevemente, procedeu-se à diluição do extrato metanólico em tampão de cloreto de potássio 0,025M, pH=1 e tampão acetato de sódio 0,4M, pH=4,5. Após agitação no vortex, a mistura foi incubada no escuro e à temperatura ambiente durante 15 min. A absorvância foi lida a dois comprimentos de onda, 515 e 700 nm, utilizando-se um espectrofotómetro (Helios Alpha, Thermo Scientific). O método recomenda a leitura de absorvância a dois comprimentos de onda, um em que ocorre absorção não relacionada com as antocianinas (700 nm) (outras partículas em suspensão, interferentes) e outro em que ocorre absorção máxima da antocianina maioritária/padrão da amostra (comprimento testado: 515 nm para cyanidine 3-glucoside, cy3g). Para a determinação do teor em antocianidinas totais, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Antocianidinas totais} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times L}$$

$$A = [A_{\text{máx}} - A_{700}] \text{pH1}$$

Em que, A= Absorvância; $A_{\text{máx}}$ = Absorvância máxima na zona do visível (515 nm para cy3g); MW= Peso molecular da antocianidina maioritária (449,2 g/mol para cy3g); DF= Fator de diluição; ϵ =Coeficiente de extinção molar da antocianidina maioritária (26900 para cy3g); L= Comprimento da célula (1 cm).

Os resultados foram expressos em mg de cyanidine 3-glucoside (por 100g peso fresco (mg cyanidine 3-glucoside /100 g PF).

2.5.8. Determinação da atividade antioxidante total

A atividade antioxidante nos bagos de romã foi determinada no extrato metanólico previamente preparado por dois métodos: o método da captura do radical livre 2,2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e o método de redução do ferro (FRAP) de acordo com o descrito na secção 2.1.3. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/100g PF no método do DPPH e em mmol equivalentes de sulfato ferroso (ESF) por 100g PF no método do FRAP.

2.5.9. Análises sensoriais

Para a análise sensorial apenas foram utilizados bagos de romã no primeiro dia de armazenamento. O painel de avaliação (Figura 17) foi composto por 10 provadores não treinados. Aos provadores foi solicitada a avaliação dos seguintes parâmetros: aroma, cor, aparência global, firmeza, sabor, doçura e apreciação global, usando uma escala de 9 pontos (ficha de prova apresentada no Anexo I), onde 1 corresponde a desgostei muito e o 9 gostei muito. Pontuações acima de 6 foram considerados como aceitáveis para consumo comercial.



Figura 17- Painel de Avaliação

2.5.10. Análise Estatística

Os dados relativos aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram analisados através do procedimento GLM do SAS (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA), considerando o tratamento (T) aplicado nos bagos de romã (C, QP e QPE) e o tempo de armazenamento (TA, 1, 4, 7, 11 e 14 dias) como efeitos principais. Também foi avaliada a interação entre o tratamento e o tempo de armazenamento (T * TA). Relativamente à

análise sensorial, foi apenas analisado o efeito do tratamento (T) através do procedimento GLM do SAS. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização do extrato de resíduos do descasque da romã

Obtiveram-se 163,32 g de extrato liofilizado, correspondendo a um rendimento de extração 10,2%. O teor em fenóis totais e a atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato de resíduos do descasque da romã são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor em fenóis totais e atividade antioxidante do extrato de resíduos de descasque da romã

Parâmetros analisados	Média ± Desvio Padrão
Fenóis totais (mg EAG/g)	111,7 ± 3,25
Atividade antioxidante	
DPPH (mg EAA/g)	251,3 ± 7,97
DPPH (% inibição)	80,4 ± 0,90
FRAP (mmol ESF/g)	4,40 ± 0,357

EAG - Equivalentes de ácido gálico; EAA - Equivalentes de ácido ascórbico; ESF - Equivalentes de sulfato ferroso

O extrato preparado a partir dos resíduos do descasque da romã (composto por casca e membranas internas) apresentou um teor de fenóis de 111,7 mg EAG/g. Gullon *et al.* (2016) observou um teor de fenóis totais inferior ao obtido no presente trabalho, de 19,30 mg de EAG/g de peso seco em farinha de casca de romã cv “Mollar de Elche” obtida por prensagem. Em extratos de casca de romã preparados recorrendo a ultrassons, Tabaraki *et al.* (2012) encontrou teores de fenóis totais entre 55,1 e 89,2 mg EAG /g de peso seco, enquanto que Kazemi *et al.*, (2016) encontrou valores de fenóis totais entre 272,0 e 320,3 mg EAG/g de peso seco.

Relativamente à atividade antioxidante, o extrato de resíduos do descasque da romã apresentou valores de 251,3 mg EAA/g pelo ensaio de DPPH e de 4,40 mmol ESF/g pelo ensaio de FRAP. A % de inibição determinada pelo método do DPPH foi de 80,4%. Tabaraki *et al.* (2012) utilizando ultrassons, obteve um extrato de casca de romã com atividades antioxidantes na ordem de 24,3 to 63,4 mmol Fe²⁺/100 g peso seco e 60,1–83,5 % de inibição pelos métodos de FRAP e DPPH, respetivamente.

Os resultados obtidos tanto para o teor em fenóis totais como atividade antioxidante são muito amplos, o que pode estar relacionado com fatores como as características da






matéria-prima e as condições de extração utilizadas. No presente trabalho utilizamos a totalidade do resíduo gerado no descasque da romã, especificamente casca e membranas internas, enquanto que nos trabalhos citados foi utilizada apenas a casca. De referir também que a composição em fenóis totais e a atividade antioxidante nos frutos é dependente de vários fatores, como variedade, estado de maturação, condições edafoclimáticas e práticas culturais (Akhtar *et al.*, 2015), que podem variar muito entre os vários trabalhos. As condições de extração, nomeadamente a técnica de extração e o solvente utilizado, o tempo e temperatura de extração, a razão sólido:solvente e o tamanho da partícula também podem afetar o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante do extrato (Tabaraki *et al.*, 2012, Kazemi *et al.*, 2016).

Para a determinação da atividade antimicrobiana do extrato recorreu-se à determinação de Concentração Mínima Inibitória (CMI), que corresponde à concentração mínima de agente antimicrobiano à qual se consegue no mínimo 99% de inibição de crescimento bacteriano. Nos vários microrganismos testados, para a gama de concentrações testadas (0,0020 e 2,4 mg/ml) obteve-se no máximo uma inibição de crescimento de 90%, não sendo assim possível determinar a CMI nesta gama de concentrações. De acordo com os nossos resultados, Marchi *et al.* (2015) também não observaram atividade inibitória em extratos aquosos e alcoólicos de casca de romã para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. No entanto, em outros estudos diversos extratos de casca de romã apresentaram atividade antimicrobiana para microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp (Kanatt *et al.*, 2010; Marchi *et al.*, 2015; Gullon *et al.*, 2016). A diferença de resultados entre trabalhos poderá dever-se à diferente composição dos extratos testados, dependendo essa composição de vários fatores como a características da matéria-prima e das condições aplicadas na extração, como discutido anteriormente para a composição em fenóis totais e atividade antioxidante.

3.2. Desenvolvimento de revestimentos comestíveis para aplicação em bagos de romã

Os parâmetros analisados nos diversos filmes testados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Caracterização das diferentes formulações de filmes comestíveis

Filme	Aptidão para espalhamento em placa	Aptidão para formação de filme	Aspetto visual	Solubilidade (%)
1	Sem dificuldade de espalhar	Sim		88,4 ± 2,62 ^a
2	Sem dificuldade de espalhar	Sim		77,3 ± 9,49 ^b
3	Difícil de espalhar	Sim		44,9 ± 2,61 ^c
4	Difícil de espalhar	Sim		50,6 ± 1,33 ^c
5	Solução de revestimento muito espessa, não se consegue espalhar	-	-	-
6	Sem dificuldade de espalhar	Sim		30,5 ± 2,27 ^d

Um dos grandes desafios deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um filme que apresentasse características adequadas à aplicação em bagos de romã, nomeadamente baixa solubilidade para além da aptidão para formar filme e a facilidade de aplicação. A pectina foi inicialmente escolhida como polímero base para a formulação dos filmes devido à sua natureza vegetal, ser um polímero natural, de baixo custo e biodegradável. Para além disso, a pectina apresenta elevada viabilidade para a produção de filmes só ou







em combinação com outras matrizes e é também um bom suporte para a incorporação de compostos bioativos (Campos *et al.*, 2011; Eça *et al.*, 2015; Espitia *et al.*, 2014). Filmes de pectina têm sido usados com sucesso na conservação de vários frutos minimamente processados, como a manga (Moalemiyan *et al.*, 2012) e melão (Ferrari *et al.*, 2013). Em ensaios prévios realizados no CEBAL foi testada a aplicação de um filme de pectina em bagos de romã minimamente processada, tendo-se, no entanto, verificado problemas devido à elevada solubilidade do filme. No presente trabalho, pretendeu-se dar continuidade a estes estudos, tentando-se solucionar a questão da solubilidade do filme. Assim, foram feitas conjugações de pectina com outros polímeros, nomeadamente a CMC e o quitosano. A incorporação de níveis crescentes de CMC no filme – 0,25; 0,50 e 0,75% levou a uma redução significativa da solubilidade, observando-se uma solubilidade de 50,6% nos filmes com 0,75% de CMC (Filme 4), enquanto que o filme apenas de pectina (Filme 1) apresentou uma solubilidade de 88,4%. No entanto, a utilização de quantidades de 0,5% e superiores de CMC torna as soluções muito espessas e difíceis de espalhar em placa, não tendo sido possível colocar em placa a solução de filme com 1 % de CMC. Os melhores resultados em termos de solubilidade foram obtidos no filme de quitosano e pectina (Filme 6), que apresentou uma solubilidade mais baixa (30,5%) comparativamente os restantes filmes testados (variam entre 50,6% e 88,4%).

Tendo em conta a sua baixa solubilidade, bem como a capacidade de formação de filme e a perspectiva de uma fácil aplicação no produto, o filme selecionado para utilizar em romã minimamente processada foi composto pela mistura de pectina e quitosano (Filme 6). Por outro lado, para além de contribuir para solucionar o problema da solubilidade, o quitosano possui propriedades antimicrobianas (Alvarez *et al.*, 2013; Ochoa-Velasco and Guerrero-Beltrán, 2014), aumentando assim as propriedades bioativas do filme. Por exemplo, Ochoa-Velasco and Guerrero-Beltrán (2014) verificaram que a aplicação de um revestimento de quitosano em figo-da-índia minimamente processado é eficaz na manutenção da qualidade do produto durante o armazenamento, retardando o crescimento microbiano.

3.3. Incorporação de extrato de resíduos do descasque de romã em filme comestível

Foram incorporadas percentagens crescentes de extrato de resíduos do descasque da romã (0, 1, 2, 3, 4 e 5%) no filme selecionado anteriormente (Filme 6) e as soluções obtidas aplicadas em bagos de romã. A seleção da percentagem a incorporar foi feita com base em questões operacionais de aplicação do filme, aspeto geral dos bagos e na quantidade de fenóis totais presentes no fruto. Na Tabela 6 apresentam-se os parâmetros analisados e utilizados para a seleção a quantidade de extrato a incorporar no filme.

Tabela 6- Incorporação do extrato no revestimento e otimização das concentrações a usar

% de extrato	Condições de aplicação nos bagos de romã	Aspeto geral dos bagos	Fenóis totais (mg EAG/100 g peso fresco)
0	Solução de revestimento líquida e de fácil aplicação		118,2 ^c
1	Solução de revestimento líquida e de fácil aplicação		116,7 ^c
2	Solução de revestimento pouco espessa e de fácil aplicação		121,5 ^c
3	Solução de revestimento espessa e de média aplicação		129,9 ^b
4	Solução de revestimento muito espessa e de difícil aplicação		134,3 ^b
5	Solução de revestimento muito espessa e de difícil aplicação		159,4 ^a

O teor em fenóis totais nos bagos revestidos com o filme contendo as diversas percentagens de extrato foi avaliada com a finalidade de se selecionar a quantidade de extrato que permita aumentar significativamente o teor em fenóis do fruto, incrementando assim o valor nutricional do fruto, mas também o fornecimento de compostos com

possível ação antioxidante e antimicrobiana para auxiliar na preservação do produto. Entre as percentagens estudadas, os maiores valores de fenóis foram obtidos nos bagos de romã revestidos com filme contendo 5% de extrato (159,4 mg EAG/100g peso fresco). No entanto, este revestimento apresentou-se de difícil aplicação nos bagos, uma vez que a incorporação de 5% de extrato no filme tornou a solução de revestimento muito espessa, sendo possível identificar nos bagos de romã o revestimento (Tabela 6). Por outro lado, a aplicação de quantidades de extrato mais baixas de extrato (1 e 2 %) embora tenham permitido uma fácil aplicação e um aspeto visual mais apelativo nos bagos de romã, conduziu a um conteúdo em fenóis totais mais baixo e estatisticamente semelhante aos dos bagos de controlo (0% de extrato). Os bagos de romã revestidos com as soluções contendo as quantidades intermédias de extrato a (3 e 4 %) apresentaram um teor de fenóis totais semelhante (129,9 e 134,3 mg EAG/100g peso fresco para 3 e 4 %, respetivamente). No entanto, a solução de revestimento com 3 % de extrato apresentou-se menos espessa comparativamente com a de 4% de extrato, sendo assim mais fácil de aplicar e resultando em bagos com aspeto visual aceitável. Desta forma, optou-se pela incorporação de 3% de extrato de resíduos do descasque de romã no revestimento de quitosano e pectina, a aplicar nos bagos de romã.

3.4. Caracterização dos filmes

Na Tabela 7 apresentam-se alguns dos parâmetros físicos e químicos analisados nos filmes de quitosano e pectina (2 e 1%, respectivamente, QP) e quitosano e pectina (2 e 0,5% respectivamente) com 3% de extrato de resíduos do descasque da romã (QPE).

Tabela 7-Propriedades, quantificação de fenóis e atividade antioxidante dos filmes comestíveis

	Filmes		P	
	QP	QPE		
Espessura (mm)	0,051 ± 0,0070	0,042 ± 0,0006	0,016	
Gramagem (g/cm ²)	0,004 ± 0,0006	0,004 ± 0,0003	0,137	
Densidade (g/cm ³)	0,86 ± 0,144	0,95 ± 0,083	0,369	
Humidade (%)	28,9 ± 0,55	24,4 ± 5,87	0,129	
Swelling (g/g)	250 ± 50,2	125 ± 43,4	0,004	
Solubilidade (%)	30,5 ± 2,27	20,4 ± 5,59	0,006	
Permeabilidade (mol m m ² s Pa)	7,23E ⁻¹¹ ± 1,865E ⁻¹¹	1,35E-10 ± 4,743E ⁻¹¹	0,117	
Firmeza (N)	39,8 ± 12,10	88,0 ± 9,58	<0,001	
Transparência (nm/mm)	10,0 ± 3,19	5,82 ± 0,777	0,021	
Transmissão de luz (nm)				
	200	0,015 ± 0,0009	0,029 ± 0,0008	<0,001
	280	0,023 ± 0,0077	4,51 ± 1,187	<0,001
	300	0,034 ± 0,0097	12,3 ± 2,81	<0,001
	350	0,052 ± 0,0151	23,9 ± 3,28	<0,001
	400	0,143 ± 0,0416	35,5 ± 3,33	<0,001
	500	18,8 ± 1,94	49,1 ± 3,57	<0,001
	600	24,9 ± 8,99	54,8 ± 3,08	<0,001
	700	28,0 ± 9,35	57,6 ± 2,62	<0,001
	800	29,6 ± 9,34	59,0 ± 2,40	<0,001
Cor				
	L*	89,6 ± 0,36	80,5 ± 1,31	<0,001
	a*	-0,76 ± 0,038	-2,85 ± 0,497	<0,001
	b*	15,5 ± 0,61	47,7 ± 2,44	<0,001
	C	15,4 ± 0,61	47,8 ± 2,41	<0,001
	H*	92,8 ± 0,19	93,4 ± 0,72	0,013
	ΔE	91,0 ± 0,30	93,7 ± 0,53	<0,001
	ΔH*	15,0 ± 0,61	47,3 ± 2,41	<0,001

A gramagem, densidade, humidade e permeabilidade ao vapor de água não diferiu entre os filmes testados ($P > 0,05$), sendo em média $0,04 \pm 0,0005 \text{ g/cm}^2$; $0,91 \pm 0,117 \text{ g/cm}^3$; $9,73\text{E}^{-11} \pm 4,363 \text{ E}^{-11}\%$ e $26,7 \pm 4,579 \text{ mol m m}^2 \text{ s Pa}$, respetivamente. Os outros parâmetros analisados, como espessura, *swelling*, solubilidade, firmeza, transparência, transmissão de luz e cor diferiram significativamente entre os dois filmes ($P < 0,05$). O filme QP apresentou maior espessura, *swelling* e solubilidade que o filme contendo o extrato (filme QPE). Por outro lado, a firmeza, avaliada pelo teste de perfuração foi maior no filme com extrato comparativamente com o filme sem extrato.

O filme QP apresentou maior transparência que o filme QPE (10, 0 vs. 5,82 nm/mm). Relativamente à transmissão de luz numa gama de 200-800 nm, o filme QP apresentou menores valores de transmitância que o filme QPE para todos os comprimentos de onda testados.

A incorporação do extrato de resíduos do descasque da romã conferiu uma cor amarela aos filmes, refletindo-se em maiores valores da coordenada b^* nos filmes QPE que nos QP. Os filmes QPE apresentaram menores valores de L^* e a^* e maiores de valores de C e H^* comparativamente com os filmes QP. Maiores variações (ΔE e ΔH^*) relativamente à placa branca que serviu de referência também foram observadas nos filmes com extrato (QPE) que nos filmes sem extrato (QP).

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados para o teor de fenóis totais e atividade antioxidante nos filmes com e sem extrato. Os filmes sem incorporação de extrato (QP) não apresentaram fenóis totais e atividade antioxidante. Por outro lado, os filmes com incorporação de 3% de extrato de resíduos do descasque da romã (QPE) apresentaram um teor de fenóis totais de 6,3 mg EAG/g e atividades antioxidantes na ordem de 1,46 mg EAA/g e % de redução de 64,6% pelo método de DPPH, e 0,037 mmol Eq Fe^{2+} pelo método de FRAP.

Tabela 8 – Teor em fenóis totais e atividade antioxidante dos filmes

	Filmes	
	QP	QPE
Fenóis totais (mg EAG/g)	-	6, 3± 0,76
Atividade Antioxidante		
DPPH (mg EAA/g)	-	1,46 ± 0,384
DPPH (% inibição)	-	64,6 ± 2,62
FRAP (mmol Eq Fe ²⁺ /g)	-	0,037 ± 0,0018

Também foi determinada a atividade antimicrobiana dos filmes contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis* através da observação de halos de inibição (Figura 18). Relativamente aos resultados tanto para os filmes QP e QPE não foram observados halos de inibição para nenhum dos microrganismos estudados, o que indica que os filmes não apresentam atividade antimicrobiana para estes microrganismos. Da mesma forma o controle de quitosano não apresentou atividade antimicrobiana. Apenas o controle de ácido acético apresentou halos de inibição para as três bactérias.

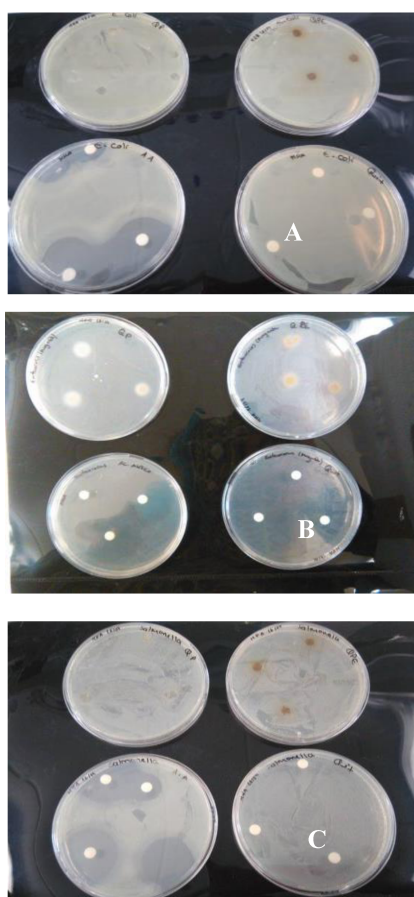


Figura 18- Halos de Inibição - em cima à esquerda o filme QP e à direita o filme QPE, em baixo à esquerda o controle do ácido acético e à direita o controle de quitosano. A) *Escherichia coli*; B) *Enterococcus faecalis*; C) *Salmonella enteritidis*

Alvarez *et al.*,(2013) estudaram as propriedades antimicrobianas de filmes de quitosano e filmes de quitosano enriquecidos com diversas fontes de compostos naturais, como pólen de abelha, extrato etanólico de própolis, extrato seco de romã, resveratrol e óleos essenciais (óleo essencial de melaleuca, alecrim, cravo, limão, calêndula e aloé vera), determinadas por ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo* em brócolos minimamente processado. Neste estudo, os resultados obtidos *in vivo* mostraram que filmes de quitosano enriquecidos com compostos bioativos têm propriedades antibacterianas. Yuan *et al.* (2015) mostraram que o revestimento quitosano em combinação com extrato de casca de romã aumentava a eficácia do revestimento para a inibição microbiana. Ainda em outro estudo, mostrou-se que revestimentos de quitosano em combinação com o ácido acético eram uma boa alternativa para retardar o crescimento microbiano no período de armazenamento, sendo que a quantidade de ácido acético usado não afetava os resultados (Ochoa-Velasco and Guerrero-Beltrán, 2014).

Como se pode observar, apenas o controle com ácido acético apresentou atividade antimicrobiana contra as três bactérias estudadas através da formação de halos de inibição. Embora vários estudos mostrem atividade antimicrobiana de revestimentos de quitosano, tal não se observou neste trabalho, o que pode estar relacionado com fatores como a sua concentração, o seu peso molecular e o seu grau de acetilação que podem influenciar a sua ação antimicrobiana (Goy *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006). Por outro lado, embora os filmes (QP e QPE) tenham na sua composição ácido acético, nenhum deles apresentou atividade antimicrobiana. Tais resultados podem dever-se às condições de formação dos filmes e às possíveis ligações moleculares que se estabeleceram entre o ácido orgânico e o quitosano e que podem reduzir a difusão do ácido no meio e o seu efeito antimicrobiano. De acordo com Doores (1993) a ação antimicrobiana do ácido acético pode ser afetada por vários fatores como o comprimento da cadeia, o seu grau de ramificação e a proporção de formas não dissociadas do ácido que favorecem a sua penetração nas membranas plasmáticas dos microrganismos.

3.5.Processamento mínimo

3.5.1.Perda de peso

Os resultados de perda de peso nos bagos durante o tempo de armazenamento são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Efeito dos tratamentos na perda de peso nos bagos de romã ao longo dos 14 dias de armazenamento.

Tratamento (T)	Tempo de armazenamento (TA,d)	Perda de peso (%)
C	4	0,166
	7	0,200
	11	0,432
	14	0,532
QP	4	0,133
	7	0,499
	11	0,466
	14	0,750
QPE	4	0,449
	7	0,300
	11	0,749
	14	0,599
EPM		0,1190
<i>P</i>		
	T	0,079
	TA	0,002
	T * TA	0,268

C - Controlo; QP - Revestimento de quitosano e pectina; QPE – Revestimento de quitosano e pectina com 3% de extrato de resíduos do descasque da romã.

A perda de peso dos bagos de romã ao longo do período de conservação não foi afetada pelo tratamento aplicado ($P = 0,079$). No entanto, independentemente do tratamento aplicado verificou-se um aumento da perda de peso dos bagos ao longo dos 14 dias de conservação, atingindo uma perda de 0,612% no último dia de conservação (Figura 19).

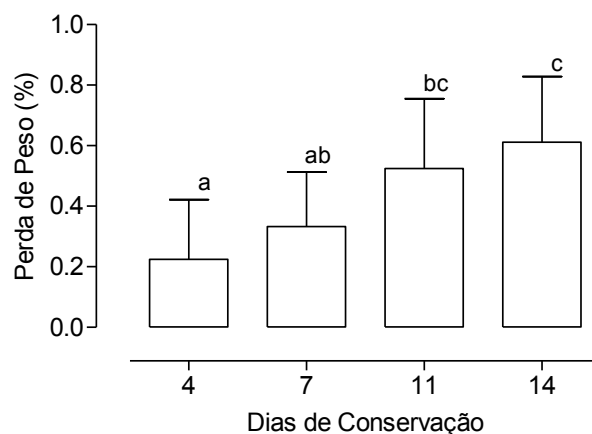


Figura 19- Perda de peso nos bagos de romã ao longo do período de conservação

Caleb *et al.* (2013) verificaram perdas de peso na ordem dos 0,5 e 0,8% em bagos de romã das variedades “Acco” e “Herskawitz”, respectivamente, mantidas a 5 °C. Ghasemnezhad *et al.* (2012), também observaram em bagos de romã sem revestimento ou revestidos com quitosano, perdas de peso entre 0,62 e 0,75% após 12 dias conservação a 4 °C. Contrariamente aos nossos resultados, Ghasemnezhad *et al.* (2012) verificaram que a aplicação de um revestimento de quitosano (0,5 e 1%) em bagos de romã leva a uma diminuição da perda de peso dos bagos após 12 dias de conservação comparativamente com bagos sem revestimento.

3.5.2. Teor de Sólidos Totais, Acidez titulável e pH

O teor em sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT) e pH dos bagos de romã sujeita aos diferentes tratamentos e ao longo do tempo de armazenamento são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Teor em sólidos solúveis totais (SST), Acidez titulável, pH e razão TSS/AT dos bagos de romã ao longo de 14 dias de armazenamento a 4°C

Tratamento (T)	Tempo de armazenamento (TA, d)	SST (°Brix)	AT (% ácido cítrico)	pH	TSS/A T
C	1	13,2	0,50	4,06 ^d	16,9
	4	12,7	0,50	4,02 ^{cd}	16,2
	7	14,4	0,58	3,75 ^b	15,9
	11	13,7	0,56	3,60 ^a	15,9
	14	14,4	0,68	3,58 ^a	13,5
QP	1	12,3	0,48	4,17 ^{efg}	16,5
	4	15,0	0,50	3,98 ^c	19,1
	7	12,7	0,52	4,15 ^{ef}	15,5
	11	13,2	0,58	4,05 ^d	14,6
	14	13,0	0,60	4,01 ^{cd}	14,6
QPE	1	12,6	0,45	4,21 ^{fg}	17,0
	4	12,6	0,45	4,23 ^g	17,6
	7	12,5	0,49	4,20 ^{efg}	16,4
	11	12,1	0,57	4,14 ^e	13,8
	14	14,3	0,62	4,06 ^d	14,8
EPM		0,73	0,018	0,022	0,84
P					
	T	0,210	<0,001	<0,001	0,723
	TA	0,371	<0,001	<0,001	<0,001
	T * TA	0,161	0,081	<0,001	0,196

C - Controlo; QP - Revestimento de quitosano e pectina; QPE – Revestimento de quitosano e pectina com 3% de extrato de resíduos do descasque da romã.

O teor em SST dos bagos de romã não foi afetado pelos tratamentos nem pelo tempo de armazenamento, não se observando também interação entre estes dois fatores (T x TA) ($P > 0,05$). Os resultados foram semelhantes a outros estudos em que não se observaram variações do teor em SST ao longo do período de conservação (Arendse *et al.*, 2015; Caleb, Mahajan, *et al.*, 2013; O’Grady *et al.*, 2014; Palma *et al.*, 2015). No entanto, Ghasemnezhad *et al.* (2012) observaram um aumento do teor em SST durante o armazenamento em bagos de romã sem revestimento ou revestidos com quitosano.

A AT dos bagos de romã foi afetada pelo tratamento aplicado ($P < 0,001$), verificando-se uma redução nos valores de AT pela aplicação dos revestimentos (tratamentos QP e QPE)

comparativamente com o controle (0,53 vs. 0,56 nas romãs com revestimento e no controle, respetivamente). Ao longo do tempo de conservação também se verificou o aumento dos valores de AT nos bagos de romã de todos os tratamentos ($P < 0,001$).

A razão STT/TA dos bagos de romã minimamente processada não foi afetada pelo tratamento aplicado ($P = 0,723$). No entanto, ao longo do período de conservação observou-se uma redução da razão STT/TA em todos os tratamentos ($P < 0,001$), variando entre 17,1 e 14,1 nos dias 1 e 14 de armazenamento, respetivamente.

Relativamente ao pH, verificou-se efeito significativo do tratamento aplicado ($P < 0,001$) e do tempo de armazenamento ($P < 0,001$). Os bagos de romã não revestidos apresentaram menor valor de pH (3,80) que os bagos revestidos, observando-se também diferenças no valor de pH entre os bagos revestidos, sendo menor nos bagos do tratamento QP (4,07) do que nos do tratamento QPE (4,17). Em todos os tratamentos verificou-se uma redução do pH ao longo do tempo. No entanto, para o pH existe interação entre tratamento e tempo de armazenamento (T x TA, $P < 0,001$). Nos bagos de romã sem revestimento, os valores de pH mantiveram-se constantes até ao 4º dia de armazenamento, diminuindo até ao 11º dia, a partir do qual se manteve constante até ao final do ensaio. Nos bagos de romã revestidos do tratamento QP assistiu-se a uma redução do pH entre o 1ª e o 4º dia de armazenamento, valor que subiu no 7º dia para valores iguais aos encontrados no dia 1. Nos dias 11 e 14 de conservação os valores de pH mantiveram-se constantes e inferiores aos observados no dia 7. Relativamente aos bagos revestidos do tratamento QPE, apenas no dia 11 de armazenamento se verifica uma redução dos valores de pH em comparação o pH inicial. Nestes bagos de romã o pH diminui entre o 11º e o 14º dia de conservação.

3.5.3. Cor e Firmeza

Na Tabela 11 são apresentados os parâmetros da cor e a firmeza nos bagos de romã sujeitas aos tratamentos ao longo do período de conservação.

Tabela 11 - Parâmetros da cor e firmeza dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4° C

Tratamento (T)	Tempo de armazenamento (TA, d)	L^*	a^*	b^*	C	H*	ΔE	Firmeza
C	1	23,7	9,46	4,03	10,3	23,2	-	7,85
	4	23,3	4,96	2,57	5,61	28,8	4,85	8,75
	7	23,1	6,03	3,23	6,85	29,0	3,89	9,88
	11	23,1	10,1	4,28	11,0	23,0	1,41	9,74
	14	22,5	5,82	2,89	6,51	26,4	4,06	10,0
QP	1	25,6	8,14	2,95	8,71	19,3	-	8,45
	4	24,1	5,42	3,14	6,27	30,2	3,12	8,81
	7	23,6	4,70	3,08	5,67	34,8	4,14	8,74
	11	23,0	8,29	5,11	9,86	30,4	3,57	9,51
	14	23,9	5,87	3,64	6,92	31,9	3,04	9,86
QPE	1	24,4	7,66	4,45	8,89	29,8	-	8,97
	4	23,7	4,78	3,36	5,91	36,4	3,20	9,60
	7	22,7	4,86	3,38	5,93	35,5	3,82	9,47
	11	24,1	5,87	3,65	6,92	31,9	2,42	9,01
	14	23,8	4,25	3,62	5,22	35,3	4,05	9,79
EPM		0,71	0,656	0,401	0,697	2,45	0,551	0,424
<i>P</i>								
	T	0,134	<0,001	0,721	0,008	<0,001	0,897	0,556
	TA	0,145	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,012	0,004
	T * TA	0,731	0,153	0,056	0,100	0,422	0,038	0,292

A coordenada da cor L^* nos bagos de romã não foi afetada pelo tratamento aplicado ($P = 0,134$) e manteve-se inalterada ao longo do tempo de conservação ($P = 0,145$). A aplicação do revestimento com extrato (QPE) levou a redução da coordenada a^* e do C nos bagos de romã comparativamente com os outros tratamentos – C e QP, não se verificando diferença entre estes tratamentos para estes parâmetros da cor ($P < 0,05$, Figuras 20A e 20D, respectivamente). Os bagos de romã com o revestimento contendo extrato (QPE) apresentaram maior valor de H* que os bagos dos outros tratamentos, verificando-se também maiores valores de H* nos bagos revestidos do tratamento QP comparativamente com o controle ($P < 0,001$, Figura 20F).

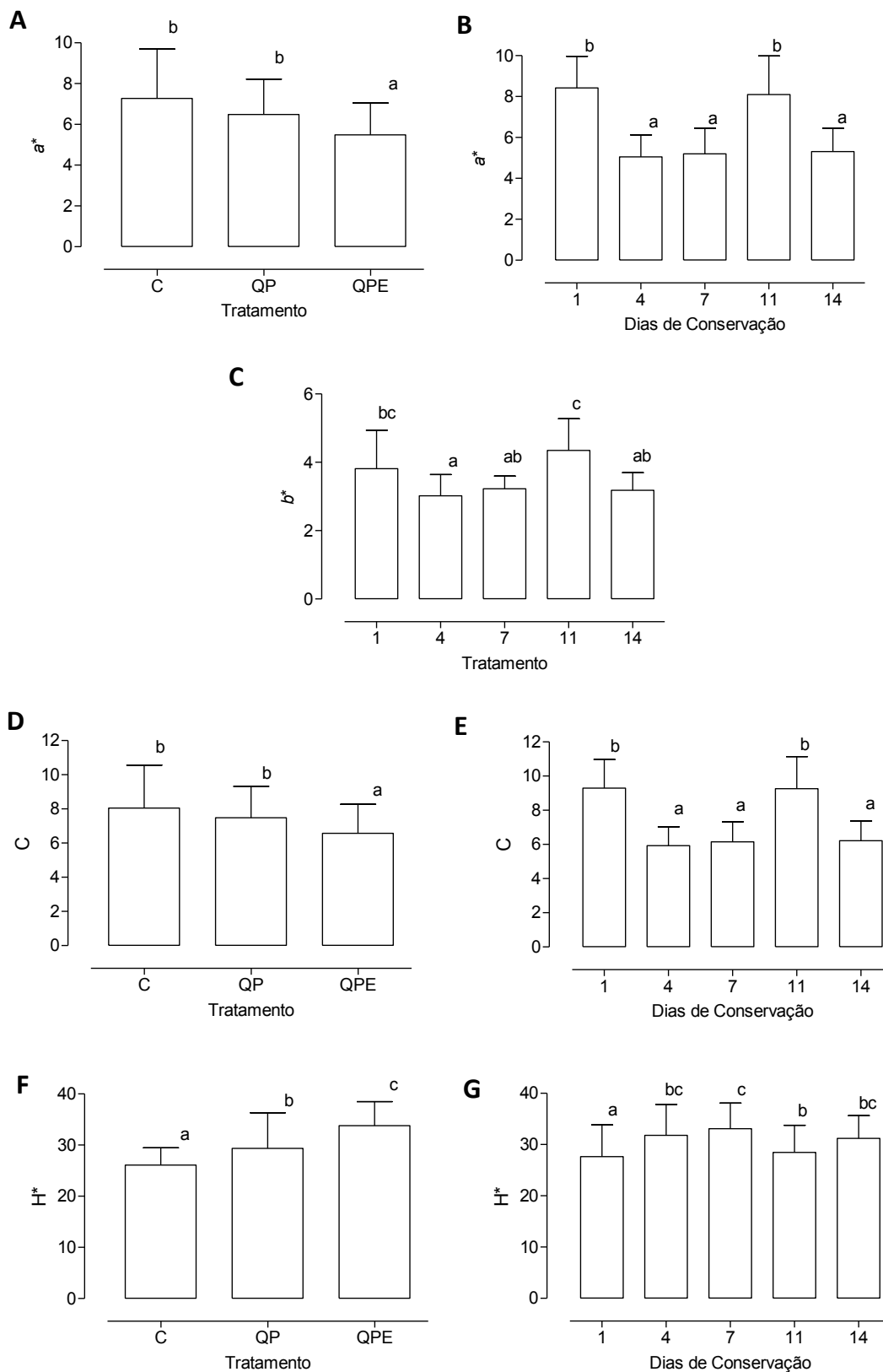


Figura 20- Gráficos referentes aos parâmetros da cor dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C; A- a^* por tratamento; B- a^* por dias de conservação; C- b^* por tratamento; D- C por tratamento ; E- C por dias de conservação; F- H^* por tratamento ; G- H^* por dias de conservação;

Os parâmetros a^* , b^* , C e H^* variaram ao longo do tempo de conservação ($P < 0,05$), embora essas variações não tenham sido muito consistentes. No entanto, considerando o ultimo dia de ensaio (dia 14) verificou-se uma redução da coordenada a^* e do C (Figuras 20B e 20E, respetivamente) e aumento do H^* (Figura 20G) nos bagos de romã de todos os tratamentos comparativamente com os valores iniciais (dia 1). Relativamente à coordenada b^* não se verificou diferenças entre o 1º e o 14º dia de conservação (Figura 20C).

Em alguns estudos com romã minimamente processada embalada em atmosfera modificada, o tempo de armazenamento não teve efeitos significativos sobre os parâmetros na cor (Caleb, Linus, *et al.*, 2013; Caleb, Mahajan, *et al.*, 2013). Em contraste, Martínez-Romero *et al.*, (2013), observaram que quando revestiram os bagos de romã com um revestimento de *Aloe vera* com adição de ácidos havia efeitos significativos na cor e o H^* diminuía ao longo do tempo de conservação.

A firmeza dos bagos de romã não foi afetada pelo tratamento aplicado ($P = 0,556$). No entanto, em todos os tratamentos verificou-se o aumento da firmeza dos bagos de romã ao longo do período de conservação ($P < 0,001$, Figura 21).

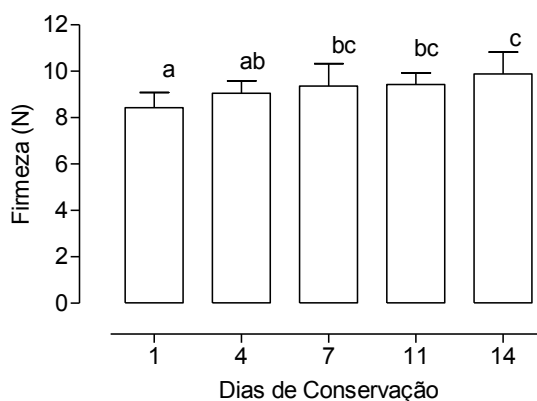


Figura 21- Gráficos referentes aos parâmetros da textura dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C

Estes resultados obtidos mostram que ao longo do tempo há um aumento da firmeza nos bagos, que poderá ser justificada pela desidratação dos bagos no período de conservação (Ayhan and Eştürk, 2009). Em outros estudos independentemente do tratamento (embalagens de atmosfera modificada, temperatura de refrigeração ou revestimentos)

observou-se declínio da firmeza ao longo do tempo (Arendse et al., 2015; Martínez-Romero *et al.*, 2013).

3.5.4. Estabilidade microbiológica

A estabilidade microbiológica nos bagos de romã ao longo dos 14 dias de armazenamento foi avaliada pela pesquisa de microrganismos mesófilos, bolores e leveduras e psicrófilos. Os valores da contagem destes microrganismos são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Crescimento microbiano nos bagos de romã ao longo dos 14 dias de armazenamento a 4°C (log ufg/g)

Tratamento (T)	Tempo de armazenamento (TA, d)	Mesófilos	Bolores e Leveduras	Psicrófilos
C	1	2,90	0,33	0
	4	3,93	0,33	0
	7	5,87	1,77	2
	11	4,73	3,47	0
	14	4,77	5,83	2
QP	1	0,73	0,37	0
	4	0,07	0,77	0
	7	4,27	0,87	0
	11	4,83	4,30	0
	14	3,80	4,07	0
QPE	1	0	0	0
	4	2,80	0,53	0
	7	2,30	0,37	0
	11	4,33	4,10	0
	14	4,93	3,43	0
EPM		0,896	0,687	0,577
<i>P</i>				
	T	0,009	0,326	0,055
	TA	<0,001	<0,001	0,331
	T * TA	0,145	0,499	0,332

De entre os grupos de microrganismos analisados, apenas os mesófilos totais foram afetados pelo tratamento ($P = 0,009$), observando-se menores contagens de mesófilos

totais nos bagos de romã revestidos (tratamentos QP e QPE) que no controlo (2,81 vs. 4,44 log ufc/g nos bagos revestidos e controlo, respetivamente). Relativamente aos microrganismos psicrófilos verifica-se uma tendência no efeito do tratamento ($P = 0,055$), em que no controlo foram detetados microrganismos psicrófilos nos dias 7 e 14 de armazenamento, enquanto que durante os 14 dias de armazenamento não foram detetados microrganismos psicrófilos nos bagos de romã revestidos (tratamento QP e QPE). Independentemente do tratamento aplicado nos bagos de romã verificou-se o aumento de mesófilos totais ($P < 0,001$) e de bolores e leveduras ($P < 0,001$) ao longo do período de armazenamento.

O aumento do crescimento microbiano em bagos de romã minimamente processados durante o armazenamento a temperaturas de refrigeração também foi observado por outros autores (Banda *et al.*, 2015; Caleb, Linus, *et al.*, 2013; Caleb, Mahajan, *et al.*, 2013; Ghasemnezhad *et al.*, 2012, 2015; Martínez-Romero *et al.*, 2013). De acordo com os nossos resultados, Ghasemnezhad *et al.* (2012) também verificou a redução de crescimento microbiana em bagos de romã revestidos com quitosano (0,25 a 1%). Estes resultados parecem ser incongruentes com os obtidos anteriormente sobre a atividade antimicrobiana nos filmes (QP e QPE) (secção 2.4.10), em que nenhum dos filmes testados apresentou atividade antimicrobiana, verificando-se apenas inibição do crescimento microbiano na presença do ácido acético. No entanto, a atividade antimicrobiana identificada neste ensaio de processamento mínimo de romã poderá estar relacionada com os fatores já discutidos anteriormente. De referir também, que no ensaio para avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes foram utilizados microrganismos específicos, enquanto que neste ensaio com os bagos de romã minimamente processada foi apenas tida em consideração a microflora natural do alimento.

3.5.5. Análise Sensorial

A análise sensorial nos bagos de romã no dia 1 de armazenamento foi avaliada por um painel de 10 provadores e classificados de 1 (desgostei muito) a 9 (gostei muito) quanto ao aroma, cor, aparência global, firmeza, sabor, doçura e apreciação global. As pontuações obtidas na análise sensorial são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13- Análise Sensorial dos bagos de romã no dia 1 de armazenamento a 4°C

	Tratamentos (T)			EPM	P
	C	QP	QPE		
Aroma	7,00	5,70	4,70	0,723	0,090
Cor	8,10 ^b	8,40 ^b	6,40 ^a	0,438	0,007
Aparência geral	7,80 ^b	8,20 ^b	5,10 ^a	0,448	<0,001
Firmeza	7,90	7,90	7,00	0,384	0,180
Sabor	7,60	7,50	6,70	0,520	0,418
Doçura	7,50	7,00	6,90	0,556	0,719
Apreciação global	7,80 ^b	7,50 ^b	6,10 ^a	0,443	0,026

De entre os parâmetros analisados relativos à análise sensorial, apenas a cor, apreciação geral e apreciação global foram afetados pelo tratamento aplicado ($P < 0,05$); observando-se menores pontuações para estes parâmetros nos bagos de romã com revestimento contendo extrato de resíduos do descasque da romã (QPE) do que nos bagos de romã dos outros tratamentos (C e QP), como observado na Figura 22.

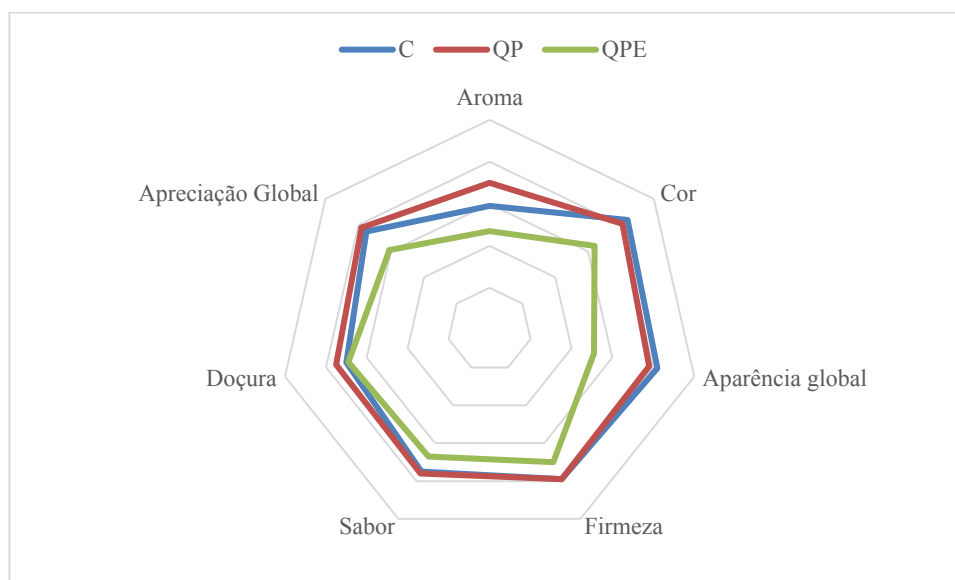


Figura 22- Médias das pontuações sensoriais dos bagos de romã no primeiro dia de armazenamento

Em outros estudos observou-se que os atributos sensoriais da romã minimamente processada são afetados pelos tratamentos aplicados (Arendse *et al.*, 2015; Bhatia *et al.*, 2015; Caleb, Linus, *et al.*, 2013; Martínez-Romero *et al.*, 2013).

3.5.6. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

Os compostos fenólicos e atividade antioxidante dos bagos de romã ao longo dos 14 dias de armazenamento foi avaliada pela quantificação de fenóis, quantificação de antocianinas, determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH e determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP). As significâncias (*P*) para o efeito do tratamento (T), tempo de armazenamento (TA) e interação entre tratamento e tempo de armazenamento (T x TA) sobre os parâmetros analisados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Significâncias para o efeito do tratamento (T), tempo de armazenamento (TA) e interação entre tratamento e tempo de armazenamento (T x TA) sobre o teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante nos bagos de romã

Efeitos	Fenóis totais	Antocianinas totais	Atividade Antioxidante	
			DPPH	FRAP
T	<0,001	<0,001	0,055	0,004
TA	0,007	<0,001	<0,001	<0,001
T * TA	<0,001	0,022	<0,001	0,005

Para todos os parâmetros analisados verificou-se efeito do tratamento e tempo de armazenamento e interação significativa entre estes dois fatores ($P < 0,05$), à exceção do efeito do tratamento sobre a atividade antioxidante em que se verificou uma tendência ($P = 0,055$). Relativamente aos fenóis totais (Figura 23A), no 1º dia de conservação os bagos de romã sujeitos aos tratamentos QP e QPE apresentaram menores valores de fenóis totais comparativamente com os bagos de romã do tratamento controlo (112,4, 101,8 e 105,1 mg EAG/100g em bagos dos tratamentos controlo, QP e QPE, respetivamente). Ao longo do período de conservação, nos bagos de romã sujeitos ao tratamento controlo verificou-se a manutenção do teor de fenóis totais até ao 11º dia de conservação (115,6 mg EAG/100g), valor que aumentou no último dia de conservação (128,4 mg EAG/100g); enquanto que nos bagos revestidos (tanto do tratamento QP como QPE) verificou-se uma redução no teor em fenóis nos primeiros 4 dias de conservação, teor que se manteve

constante até ao final do ensaio (103,45 mg EAG/100g no 1º dia de conservação vs 91,1 mg EAG/100g nos restantes dias de conservação).

No que diz respeito ao conteúdo em antocianinas totais nos bagos de romã (Figura 23B), o teor inicial foi semelhante entre os bagos de romã dos vários tratamentos (0,150 mg C3GE/100 g). Ao longo do período de conservação, ocorreu uma variação no conteúdo em antocianinas totais nos bagos do tratamento controlo, com menores concentrações nos dias 7 e 11 de conservação, no entanto entre os dias 1 e 14 de conservação não se verificou diferença significativa. Por outro lado, nos bagos revestidos, ocorreu uma redução do conteúdo em antocianinas totais ao longo do período de conservação, sendo essa redução mais acentuada nos bagos de romã do tratamento QPE.

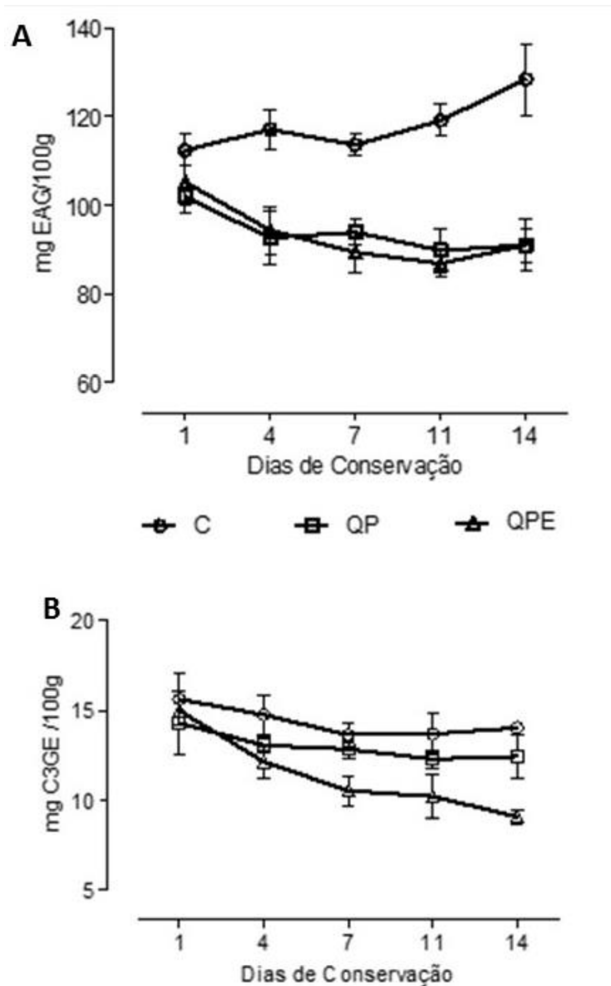


Figura 23- Compostos fenólicos dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C; A- Teor de fenóis totais; B- Teor de antocianinas

Os resultados da atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH mostram grandes oscilações ao longo do período de conservação (Figura 24A), no entanto considerando o primeiro e o último dia de conservação verificou-se uma redução da atividade antioxidante nos bagos de romã revestidos enquanto que nos bagos do controlo não se observaram diferenças significativas entre estes dias. Os revestimentos aplicados (tratamentos QP e QPE) tendem a reduzir os valores de atividade antioxidante (DPPH) nos bagos de romã ($P = 0,055$) comparativamente com o controlo. Relativamente á atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP (Figura 24A), verificou-se menor atividade antioxidante nos bagos de romã revestidos no primeiro dia de conservação comparativamente com os bagos do tratamento controlo. Nestes bagos

(tratamento C) observou-se uma redução da atividade antioxidante entre o 1º e o 4º dia de conservação, mantendo-se constante até ao final do ensaio, enquanto que nos bagos revestidos os valores de atividade antioxidante não variaram significativamente ao longo dos 14 dias de conservação.

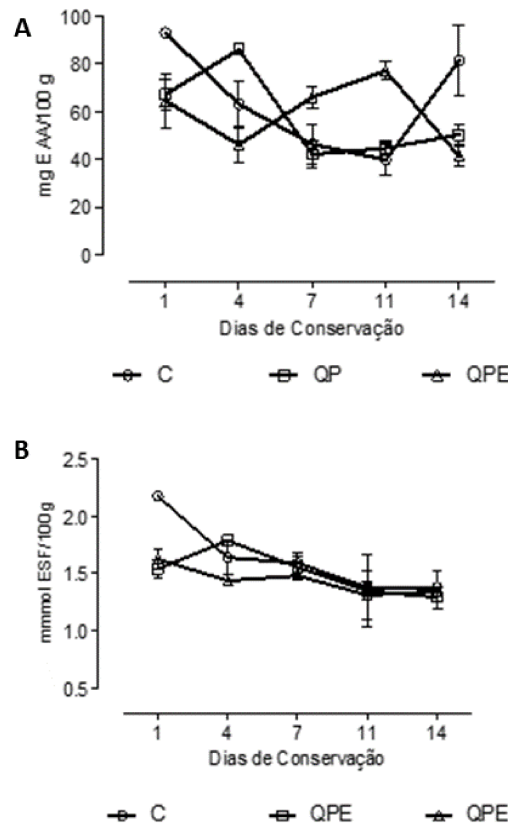


Figura 26- Atividade antioxidante dos bagos de romã armazenados durante 14 dias a 4°C; A- DPPH; B- FRAP

Esperava-se que tal como em outros trabalhos onde a incorporação de extratos de fruta em revestimentos comestíveis contribuíram para uma melhoria da qualidade, melhor capacidade antioxidante e aumento do tempo de prateleira (Alvarez *et al.*, 2013, 2014; Eça *et al.*, 2015; Ghasemnezhad *et al.*, 2012), que a aplicação do extrato da casca de romã nos bagos permitisse limitar as perdas de qualidade do produto e enriquecimento do produto em compostos bioativos, o que não se verificou no estudo em questão. Tal resultado pode estar relacionado com um efeito de diluição causado pela aplicação do revestimento comestível, que não é compensado pela incorporação dos 3% de extrato dos resíduos do descasque da romã.

4. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo final o desenvolvimento de metodologias que garantissem a qualidade e segurança alimentar da romã minimamente processada a temperaturas de refrigeração, através da aplicação de revestimentos comestíveis ativos. Por outro lado, pretendeu-se valorizar a casca da romã, que normalmente é considerada como resíduo e por isso descartada, através da formulação de um extrato fenólico dos resíduos de descasque para aplicação nos revestimentos como conservante bioativo natural.

O extrato aquoso de resíduos de descasque de romã preparado por ultrassons mostrou uma boa capacidade fenólica e antioxidante, mas, no entanto, não apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos estudados. Mais microrganismos contaminantes deverão ser analisados para averiguar a capacidade antimicrobiana do extrato e outras técnicas de extração como micro-ondas poderão ser testadas para concentrar mais compostos fenólicos e propriedades antimicrobianas do extrato.

Foram desenvolvidos revestimentos comestíveis como base para a incorporação do extrato, tendo os revestimentos formulados com mistura de pectina e quitosano apresentado as melhores características para aplicação nos bagos de romã, nomeadamente baixa solubilidade (cerca de 30%) e boa capacidade de formação do filme.

A incorporação de 3% do extrato de resíduos de descasque da romã ao revestimento comestível de pectina e quitosano permitiu aumentar significativamente o teor em compostos fenólicos no filme, sem afetar as propriedades suas físico-químicas (gramagem, densidade, humidade e permeabilidade ao vapor de água). Para além disso, a incorporação de extrato no revestimento aumentou a firmeza e reduziu a solubilidade do filme. Apesar da presença de quitosano e de ácido acético os revestimentos comestíveis com e sem extrato não apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos estudados; estudos para analisar as relações estruturais entre os compostos do filme e diferentes formulações/concentrações desses compostos deverão ser feitos para aumentar a capacidade antimicrobiana do filme.

Por fim, a aplicação dos revestimentos- com e sem extrato- em bagos de romã, foi monitorizada durante 14 dias de conservação a temperaturas de refrigeração (4°C).

Observou-se que os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade dos bagos de romã foram afetados principalmente pelo tempo de conservação, sendo o efeito dos tratamentos limitado à AT, pH e alguns parâmetros de cor (a^* , C e H^*). A aplicação de revestimentos comestíveis aos bagos de romã (QP e QPE) reduziu significativamente a acidez titulável e aumentou o pH dos bagos comparativamente com o controlo. Apesar dos filmes não terem apresentado atividade antimicrobiana contra os microrganismos patogénicos estudados a aplicação dos revestimentos nos bagos de romã parece ter influência positiva na sua estabilidade microbiológica contra bacterias mesófilas e psicrófilas, uma vez que se observou uma redução significativa de mesófilos e uma tendência para a redução de psicrófilos com a aplicação de QP e QPE durante o armazenamento.

A aplicação de revestimentos comestíveis no produto não conseguiu reter os compostos bioativos (fenóis totais e antocianidinas totais) durante o tempo de armazenamento comparativamente com o controlo. A aplicação do extrato de romã também não permitiu aumentar significativamente o teor em compostos bioativos e a atividade antioxidante nos bagos de romã. Grandes oscilações ao longo do tempo de conservação foram observadas na atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH, não permitindo a observação de resultados consistentes; pelo método do FRAP as oscilações foram menores com maior estabilidade da capacidade antioxidante nos bagos durante o armazenamento.

Futuramente, mais estudos devem ser feitos de modo a elaborar um filme com extrato de resíduos de descasque de romã que consiga reter melhor os compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato e que consiga enriquecer nutricionalmente os bagos; uma forma de manter a qualidade físico-química dos bagos e ainda inibir o crescimento microbiano durante mais tempo. Por outro lado, a cor e a aparência global, dos bagos de romã revestidos deve ser melhorada de forma a não comprometer a sua avaliação sensorial pelos provadores.

Referências bibliográficas

- Adams, L.S., Zhang, Y., Seeram, N.P., Heber, D. and Chen, S. (2010), “Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro.”, *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, Vol. 3 No. 1, pp. 108–13.
- Ahvenainen, R. (1996), “New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables”, *Food Science & Technology*, Vol. 71 No. June, pp. 179–187.
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D. and Sestili, P. (2015), “Pomegranate peel and peel extracts : chemistry and food features”, *Food Chemistry*, Elsevier Ltd, Vol. 174, pp. 417–425.
- Aldana, D.S., Contreras-Esquivel, J.C., Nevárez-Moorillón, G.V. and Aguilar, C.N. (2014), “Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano”, *CyTA - Journal of Food*, No. May 2015, pp. 37–41.
- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L.A., Gutierrez-Pacheco, M.M., Bernal-Mercado, A.T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G.A., Ponce, A., *et al.* (2014), “Oregon essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 5 No. DEC, pp. 1–7.
- Alvarez, M. V., Ponce, A.G. and Moreira, M.D.R. (2013), “Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli”, *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 50 No. 1, pp. 78–87.
- Arendse, E., Fawole, O.A. and Opara, U.L. (2015), “Discrimination of pomegranate fruit quality by instrumental and sensory measurements during storage at three temperature regimes”, *Journal of Food Processing and Preservation*, Vol. 39 No. 6, pp. 1867–1877.
- Ayhan, Z. and Eştürk, O. (2009), “Overall quality and shelf life of minimally processed and modified atmosphere packaged ‘ready-to-eat’ pomegranate arils”, *Journal of*

Food Science, Vol. 74 No. 5, available at:<http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01184.x>.

- Banda, K., Caleb, O.J., Jacobs, K. and Linus, U. (2015), “Effect of active-modified atmosphere packaging on the respiration rate and quality of pomegranate arils (cv . Wonderful)”, *Postharvest Biology and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 109, pp. 97–105.
- Basiri, S., Shahram, S., Aminlari, M. and Akbari, S. (2015), “The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Paci fi c white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage”, *LWT - Food Science and Technology*, Elsevier Ltd, Vol. 60 No. 2, pp. 1025–1033.
- Bhatia, K., Asrey, R. and Varghese, E. (2015), “Correct packaging retained phytochemical, antioxidant properties and increases shelf life of minimally processed pomegranate (*Punica granatum* L.) arils Cv. Mridula”, *Journal of Scientific and Industrial Research*, Vol. 74 No. 3, pp. 141–144.
- Caleb, O.J., Linus, U., Mahajan, P. V, Manley, M., Mokwena, L. and Tredoux, A.G.J. (2013), “Effect of modified atmosphere packaging and storage temperature on volatile composition and postharvest life of minimally-processed pomegranate arils (cvs . ‘ Acco ’ and ‘ Herskawitz ’)”, *Postharvest Biology and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 79, pp. 54–61.
- Caleb, O.J., Mahajan, P. V, Manley, M. and Opara, U.L. (2013), “Evaluation of parameters affecting modified atmosphere packaging engineering design for pomegranate arils”, *Food Science & Technology*, No. 1996, pp. 2315–2323.
- Caleb, O.J., Opara, U.L. and Witthuhn, C.R. (2012), “Modified atmosphere packaging of pomegranate fruit and arils : a review”, *Food Bioprocess Technol*, pp. 15–30.
- Çam, M., Erdoğan, F., Aslan, D. and Dinç, M. (2013), “Enrichment of functional properties of ice cream with pomegranate by-products.”, *Journal of Food Science*, Vol. 78 No. 10, pp. C1543-50.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N. and Flores, S.K. (2011), “Development of edible films and coatings with antimicrobial activity”, *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 4

No. 6, pp. 849–875.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A. and Voilley, A. (1998), “Edible Films and Coatings: Tomorrow’s Packagings: A Review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 38 No. 4, pp. 299–313.

Devatkal, S.K., Jaiswal, P., Jha, S.N., Bharadwaj, R. and Viswas, K.N. (2013), “Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against *Pseudomonas stutzeri* isolated from poultry meat”, *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 50 No. 3, pp. 555–560.

Dhall, R.K. (2013), “Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review.”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 53 No. 5, pp. 435–50.

Doores, S. 1993. Organic acids . In: *Antimicrobials in Foods* (Ed.A. L. Branene and P. M. Davidson). Marcel Dekker, Inc. pp. 75-108

Eça, K.S., Machado, M.T.C., Hubinger, M.D. and Menegalli, F.C. (2015), “Development of Active Films From Pectin and Fruit Extracts: Light Protection, Antioxidant Capacity, and Compounds Stability”, *Journal of Food Science*, Vol. 80 No. 11, pp. C2389–C2396.

Eça, K.S. and Sartori, T. (2014), “Films and edible coatings containing antioxidants – a review”, *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol. 17(2), pp. 98–112.

Espitia, P.J.P., Du, W.X., Avena-Bustillos, R. de J., Soares, N. de F.F. and McHugh, T.H. (2014), “Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review”, *Food Hydrocolloids*, Elsevier Ltd, Vol. 35, pp. 287–296.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. and Abdelly, C. (2008), “Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities”, *Comptes Rendus - Biologies*, Vol. 331 No. 5, pp. 372–379.

Fawole, O.A. and Opara, U.L. (2013), “Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv.

- ‘Bhagwa’), *South African Journal of Botany*, South African Association of Botanists, Vol. 85, pp. 23–31.
- Ferrari, C.C., Sarantópoulos, C.I.G.L., Carmello-Guerreiro, S.M. and Hubinger, M.D. (2013), “Effect of Osmotic Dehydration and Pectin Edible Coatings on Quality and Shelf Life of Fresh-Cut Melon”, *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 6 No. 1, pp. 80–91.
- Francis, G., Gallone, a, Nychas, G.J., Sofos, J.N., Colelli, G., Amodio, M.L. and Spano, G. (2012), “Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce.”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 52 No. 7, pp. 595–610.
- Ghasemnezhad, M., Zareh, S., Rassab, M. and Sajedic, R. (2012), “Effect of chitosan coating on maintenance of aril quality , microbial population and PPO activity of pomegranate (*Punica granatum L . cv . Tarom*) at cold storage temperature”, *Society of Chemical Industry*, No. May 2012, pp. 368–374.
- Ghasemnezhad, M., Zareh, S., Shiri, M.A. and Javdani, Z. (2015), “The arils characterization of five different pomegranate (*Punica granatum*) genotypes stored after minimal processing technology”, *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 52 No. 4, pp. 2023–2032.
- Gil, M.I., Aguayo, E. and Kader, A.A. (2006), “Quality changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54 No. 12, pp. 4284–4296.
- Giusti, M. and Wrolstad, R. (2001), “Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy”, *Handbook of Food Analytical Chemistry*, Vol. 2–2 No. July, pp. 19–31.
- Goy, R.C., Britto, D. De and Assis, O.B.G. (2009), “A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan”, Vol. 19, pp. 241–247.
- Gullon, B., Pintado, M.E. and Viuda-martos, M. (2016), “Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction”, *Food Control*, Vol. 59, pp. 94–98.

- Gumienna, M., Szwengiel, A. and Górna, B. (2016), “Bioactive components of pomegranate fruit and their transformation by fermentation processes”, *European Food Research and Technology*, Springer Berlin Heidelberg, Vol. 242 No. 5, pp. 631–640.
- Hussein, Z., Caleb, O.J., Jacobs, K., Manley, M. and Linus, U. (2015), “Effect of perforation-mediated modified atmosphere packaging and storage duration on physicochemical properties and microbial quality of fresh minimally processed ‘Acco’ pomegranate arils”, *LWT - Food Science and Technology*, Elsevier Ltd, Vol. 64 No. 2, pp. 911–918.
- INSA-Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2006). Resultados da Composição e distribuição energética por 100g de bagos de romã em fresco. Lisboa, Portugal: Departamento de Alimentação e Nutrição.
- James, J. and Ngarmsak, T. (2010), *Processing of Fresh-Cut Tropical Fruits and Vegetables: A TECHNICAL GUIDE*.
- Kaderides, K., Goula, A.M. and Adamopoulos, K.G. (2015), “A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Elsevier Ltd, Vol. 31, pp. 204–215.
- Kanatt, S.R., Chander, R. and Sharma, A. (2010), “Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products”, *International Journal of Food Science & Technology*, Vol. 45 No. 2, pp. 216–222.
- Karioti, A., Hadjipavlou-Litina, D., Mensah, M.L.K., Fleischer, T.C. and Skaltsa, H. (2004), “Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopia aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana.”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52 No. 26, pp. 8094–8098.
- Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H. and Abdul Hamid, A. (2016), “Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids”, *Food Chemistry*, Elsevier Ltd, Vol. 206, pp. 156–166.

- Kendra, K. V. (2010), "Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs", *LWT - Food Science and Technology*, Elsevier Ltd, Vol. 43 No. 3, pp. 381–392.
- Lansky, E.P. and Newman, R.A. (2007), "*Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer", Vol. 109, pp. 177–206.
- Liu, N., Chen, X., Park, H., Liu, C., Liu, C., Meng, X. and Yu, L. (2006), "Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*", Vol. 64, pp. 60–65.
- López- Rubira, V., Conesa, A., Allende, A. and Art, F. (2005), "Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C", Vol. 37, pp. 174–185.
- Maghoubi, M., Gómez, P.A., Mostofi, Y., Zamani, Z., Artés-Hernández, F. and Artés, F. (2013), "Combined effect of heat treatment, UV-C and superatmospheric oxygen packing on phenolics and browning related enzymes of fresh-cut pomegranate arils", *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 54 No. 2, pp. 389–396.
- Maghoubi, M., Mostofi, Y., Zamani, Z., Talaie, A., Boojar, M. and Gómez, P.A. (2014), "Influence of hot-air treatment, superatmospheric O₂ and elevated CO₂ on bioactive compounds and storage properties of fresh-cut pomegranate arils", *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 49 No. 1, pp. 153–159.
- Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Díaz-mula, H.M., Zapata, P.J., Valero, D. and Serrano, M. (2013), "Aloe vera gel coating maintains quality and safety of ready-to-eat pomegranate arils", *Postharvest Biology and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 86, pp. 107–112.
- Moalemiyan, M., Ramaswamy, H.S. and Maftoonazad, N. (2012), "Pectin-based edible coating for shelf-life extension of Ataulfo mango", *Journal of Food Process Engineering*, Vol. 35 No. 4, pp. 572–600.
- O'Grady, L., Sigge, G., Caleb, O.J. and Linus, U. (2014), "Effects of storage temperature and duration on chemical properties , proximate composition and selected bioactive

- components of pomegranate (*Punica granatum L.*) arils”, *LWT - Food Science and Technology*, Elsevier Ltd, Vol. 57 No. 2, pp. 508–515.
- Ochoa-Velasco, C.E. and Guerrero-Beltrán, J.Á. (2014), “Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan”, *Postharvest Biology and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 92, pp. 139–145.
- Oliveira, M., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N. and Viñas, I. (2015), “Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-cut fruits and vegetables - A review”, *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 46 No. 1, pp. 13–26.
- OMAIAA- Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares. Acedido em: 09 Abril de 2016, em: http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=118).
- Oms-oliu, G., Rojas-graü, M.A., Alandes, L., Varela, P., Soliva-fortuny, R., Isabel, M., Hernando, H., *et al.* (2010), “Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit : a review”, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 57, pp. 139–148.
- Orgil, O., Schwartz, E., Baruch, L., Matityahu, I., Mahajna, J. and Amir, R. (2014), “The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree”, *LWT - Food Science and Technology*, Elsevier Ltd, Vol. 58 No. 2, pp. 571–577.
- Palma, A., Continella, A., La, S., Gentile, A. and Aquino, S.D. (2015), “Postharvest Biology and Technology Overall quality of ready-to-eat pomegranate arils processed from cold stored fruit”, *Postharvest Biology and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 109, pp. 1–9.
- Pasha, I., Saeed, F., Sultan, M.T., Khan, M.R. and Rohi, M. (2012), “Recent Developments in Minimal Processing; A Tool to Retain Nutritional Quality of Food”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 8398 No. September 2015, p. 120924132554000.
- Ramos, B., Miller, F.A., Brandã, O, T.R.S., Teixeira, P. and Silva, C.L.M. (2013), “Fresh

- fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Elsevier Ltd, Vol. 20, pp. 1–15.
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M. and Barry-Ryan, C. (2007), “Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review”, *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 18 No. 7, pp. 373–386.
- Robles-Sánchez, R.M., Rojas-Graü, M.A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G.A. and Martín-Belloso, O. (2009), “Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut ‘Kent’ mango (*Mangifera indica* L.)”, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 51 No. 3, pp. 384–390.
- Rojas-Graü, M.A., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. and Martín-Belloso, O. (2009), “The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: A review”, *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 44 No. 5, pp. 875–889.
- Soliva-Fortuny, R.C. and Martín-Belloso, O. (2003), “New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A review”, *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 14 No. 9, pp. 341–353.
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E. and Benvidi, A. (2012), “Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology”, *Separation and Purification Technology*, Elsevier B.V., Vol. 98, pp. 16–23.
- Tayel, A.A. and El-Tras, W.F. (2012), “Plant extracts as potent biopreservatives for *Salmonella* Typhimurium control and quality”, *Journal of Food Safety*, pp. 115–121.
- Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B. and Vazifeshenas, M.R. (2010), “Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars”, *Scientia Horticulturae*, Elsevier B.V., Vol. 126 No. 2, pp. 180–185.
- Teixeira da Silva, J.A., Singh, T., Narzary, D., Verma, N., Tarachand, D. and Ranade, S.A. (2013), “*Scientia horticulturae* pomegranate biology and biotechnology: A

- review”, *Scientia Horticulturae*, Elsevier B.V., Vol. 160, pp. 85–107.
- Toivonen, P.M.A. and Brummell, D.A. (2008), “Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables”, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 48 No. 1, pp. 1–14.
- Ventura, J., Alarcón-Aguilar, F., Roman-Ramos, R., Campos-Sepulveda, E., Reyes-Vega, M.L., Daniel Boone-Villa, V., Jasso-Villagómez, E.I., *et al.* (2013), “Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels.”, *Food Chemistry*, Elsevier Ltd, Vol. 136 No. 1, pp. 109–115.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P. and Bassaganya-Riera, J. (2013), “Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2013, available at:<http://doi.org/10.1155/2013/789764>.
- Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L. and Du, L. (2010), “Pomegranate : Constituents , Bioactivities and Pharmacokinetics”, *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, Vol. 4 No. 2, pp. 77–87.
- Wasila, H., Li, X., Liu, L., Ahmad, I. and Ahmad, S. (2013), “Peel effects on phenolic composition, antioxidant activity, and making of pomegranate juice and wine.”, *Journal of Food Science*, Vol. 78 No. 8, pp. C1166-72.
- Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X. and Sun, H. (2016), “Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage”, *Food Control*, Elsevier Ltd, Vol. 59, pp. 818–823.
- Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X.-J. and Sun, H. (2015), “Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage”, *Food Control*, Elsevier Ltd, Vol. 59, pp. 818–823.

Anexo 1 – Ficha Prova Sensorial

 cebal Centro de Referência em Alimentos e Agro-Alimentos de Qualidade	Ensaio "Tela da Folha: da planta ao lago pronto-a-consumir" Grupo de Validação de Agro-Alimentos
--	---

FICHA DE PROVA SENSORIAL

Nome: _____

Data: ____/____/____ Idade: _____

Atente no aroma, aparência, firmeza e sabor das amostras fornecidas (3 amostras, A a C). No início e entre cada prova ingira uma pequena porção de bolacha e água, para evitar a mistura de sabores.

Classifique cada amostra (A a C) de 1 [desgostei muito] a 9 [gostei muito] quanto ao aroma, cor, aparência global, firmeza, sabor, doçura e apreciação global percebidos.

Parâmetro	Amostra		
	A	B	C
Aroma			
Cor			
Aparência global			
Firmeza			
Sabor			
Doçura			
Apreciação global			

Observações (Ex. algum parâmetro atípico da romã):

Obrigado pela sua colaboração!

Anexo 2 – Publicações

Development and characterization of edible whey protein biofilms containing different pectin concentrations

Ana R. Prazeres⁽¹⁾, Namira Siga⁽²⁾, Flávia Fernandes⁽¹⁾, Margarida Romão⁽¹⁾, David Soldado⁽¹⁾, Fátima Carvalho⁽²⁾ and Eliana Jerónimo⁽¹⁾

(1) Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL)/Instituto Politécnico de Beja, Portugal.

(2) Departamento de Tecnologias e Ciências Aplicadas, Escola Superior Agrária de Beja, Instituto Politécnico de Beja, Portugal.

Coating has been explored to extend the shelf-life of several food products by reducing the respiration, oxidation, color changes and microorganism growth. Additionally, this process is a suitable tool for the formation of barriers of gases and water vapor, incorporation of additive compounds and improvement of mechanical and optical properties, enhancing the shelf-life of the coated foods. From the various biodegradable polymers, whey protein presents an exceptional film-forming ability and a high nutritional and functional value, acting as an efficient matrix to incorporate additives. Thus, edible whey protein biofilms were developed containing glycerol as a plasticizer (protein:glycerol ratio, 2:1), vegetal oil (2.5%), tween 80 (0.2%) and different levels of pectin in the range of 0.250-0.500%, using casting method. Biofilms were characterized in terms of thickness, weight, diameter, area, grammage, density, dry matter, weight swelling, solubility, puncture strength and deformation, transparency, light transmission and color parameters (L^* , a^* , b^* and ΔE).

Pectin level in whey protein biofilms affected ($P < 0.05$) the thickness, weight, diameter, area, grammage, weight swelling, puncture strength and deformation, light transmission and color parameters, observing higher values for thickness, weight and grammage in biofilms with high pectin concentration (0.350 and 0.500%) (Figure 1A). These properties can affect the film structure, mechanical properties and water vapor permeability. Contrarily, diameter and area of the biofilms showed an inverse pattern. Weight swelling and puncture strength also decreased ($P < 0.05$) when increasing the pectin level in whey protein biofilms (Figure 1A and 1B). Pectin incorporation in whey protein biofilms had effect ($P < 0.05$) on the light transmission at different wavelength (200, 280, 300, 350, 400, 500, 600, 700 and 800 nm), decreasing when the pectin concentration rose in biofilms. Biofilm density, dry matter, solubility and transparency were not affected by pectin concentration, presenting average values of 1.1 g cm⁻³, 73.2%, 18.4% and 4.1%, respectively. To conclude, in this work were achieved transparent biofilms with good solubility, mechanical, light transmission and color properties, which can be used to improve the shelf-life of foods.

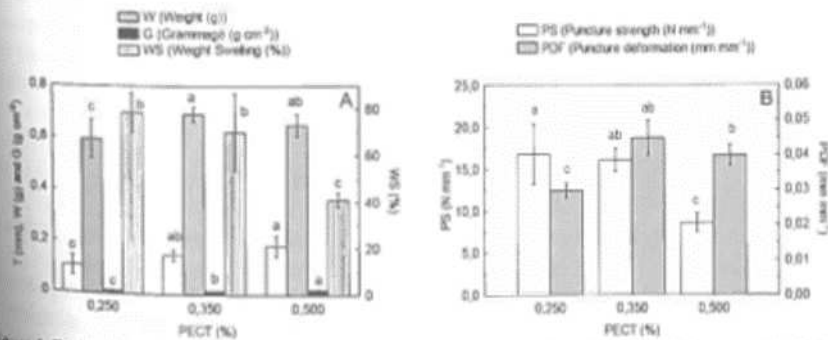


Figure 1. Thickness, weight, grammage, weight swelling (A), puncture strength and puncture deformation (B) of whey protein biofilms containing different pectin concentrations.