



Revestimentos edíveis sustentáveis com atividade antimicrobiana

Ana Catarina Carvalho Oliveira Leite

Uminho | 2021



Ana Catarina Carvalho Oliveira Leite

Revestimentos edíveis sustentáveis com atividade antimicrobiana

dezembro de 2021



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Ana Catarina Carvalho Oliveira Leite

**Revestimentos edíveis sustentáveis com
atividade antimicrobiana**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob orientação do(s)

Dra. Michele Michelin

Dr. Lorenzo Pastrana

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Com o fim desta jornada, gostaria de agradecer a todos aqueles que me acompanharam ao longo destes anos e que contribuíram para a realização deste trabalho.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador do INL, Dr. Miguel Cerqueira, por todo o apoio e por se ter mostrado sempre disponível em responder a qualquer questão a qualquer hora. A sua orientação foi essencial em todas as etapas do meu estágio, dando sempre os melhores conselhos e sempre mostrando o seu ponto de vista, de forma a guiar-me à obtenção de melhores resultados.

Desejo também agradecer ao Dr. Pablo Fucinos por todo o conhecimento transmitido e por me acompanhar na realização de testes ao longo do estágio.

À Dra. Michele Michelin por ter encarado este projeto comigo e por toda a sua ajuda e disponibilidade.

Um agradecimento muito especial a todo o pessoal do INL com quem trabalhei, por me terem acolhido de forma tão calorosa, por se mostrarem sempre tão disponíveis em me auxiliar e, especialmente, por todo o apoio e companheirismo que recebi. Em particular, gostaria de agradecer ao Pedro Silva e à Cátia Sampaio que desde o início estiveram lá para me apoiar, partilhar o seu conhecimento e me aconselhar. Estou também grata ao Victor Souza e ao Artur Martins por terem despendido o seu tempo a me dar formação sobre alguns equipamentos e por me auxiliarem no desenvolvimento do projeto e, finalmente, à Mafalda Pinto por me acompanhar nas pausas do trabalho, tornando-o mais prazeroso.

Por último, mas não menos importante, agradeço, em particular, aos meus Pais e Avó por todo o apoio e motivação que me transmitiram ao longo destes anos, por sempre acreditarem em mim e por me apoiarem e comemorarem todas as pequenas vitórias que fui alcançando. O seu apoio foi essencial para manter o otimismo durante toda esta jornada.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

REVESTIMENTOS EDÍVEIS SUSTENTÁVEIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

RESUMO

Nos últimos anos, o interesse pelo uso de biopolímeros biodegradáveis para aplicação em embalagens de alimentos tem aumentado, principalmente na produção de embalagens ativas, como revestimentos comestíveis com compostos ativos incorporados. Os revestimentos comestíveis ativos, produzidos a partir de materiais biológicos, como proteínas, polissacarídeos e lipídios, são uma tecnologia ambientalmente correta que oferece vantagens substanciais no aumento da vida útil e na melhoria da qualidade e segurança alimentar de frutas e vegetais, atuando como uma barreira contra a difusão de gases e, retardando, ainda, a deterioração e crescimento superficial de bactérias, leveduras e bolores numa ampla gama de produtos. Além do mais, os surtos microbiológicos de origem alimentar e a atual pandemia de coronavírus (SARS-CoV2) são um sério problema de saúde pública. Dados e pesquisas experimentais mostraram que compostos de origem natural, como ácidos fenólicos e flavonóides, têm potencial antiviral promissor, no entanto ainda não existem estudos sobre a eficácia de revestimentos ativos contra este vírus. Assim, surgiu a motivação para este trabalho, onde se pretende avaliar a eficácia de revestimentos ativos comestíveis contra o coronavírus e na preservação e aumento do tempo de prateleira de peras.

Neste sentido, esta dissertação visa o desenvolvimento de três revestimentos à base de alginato de sódio e de éster de sacarose com compostos ativos incorporados, nomeadamente o ácido gálico, o geraniol, e o extrato de chá verde. Estes revestimentos foram avaliados em termos de capacidade antiviral contra o coronavírus, e em paralelo determinou-se a sua atividade antioxidante. A partir dos testes antioxidantes concluiu-se que o ácido gálico apresenta uma maior capacidade antioxidante, e, a partir dos testes antivirais, determinou-se que o ácido gálico é o composto ativo mais eficaz, na concentração crítica de 12,5 g/L, pelo que se usou esta condição em posteriores testes antibacterianos, contra a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, nos quais apresentou um efeito inibitório forte, e em testes de tempo de prateleira. Neste último, o revestimento à base de 10 g/L de alginato, 5 g/L de éster de sacarose (m/v) e 12,5 g/L de ácido gálico foi aplicado em peras, nas quais se procedeu à análise da sua variação de massa, firmeza, teor de acidez titulável, pH, conteúdo de sólidos solúveis e aparência ao longo de 45 dias de armazenamento. Constatou-se que o revestimento ativo não teve efeito no prolongamento do tempo de prateleira nem na melhoria dos seus atributos de qualidade, provavelmente devido a fatores externos.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, coronavírus, revestimento ativo, tempo de prateleira

SUSTAINABLE EDIBLE COATINGS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

ABSTRACT

In recent years, the interest in the use of biodegradable biopolymers for food packaging applications has increased, particularly in the production of active packaging, such as edible coatings with embedded active compounds. Active edible coatings, produced from bio-based materials such as proteins, polysaccharides and lipids, are an environmentally friendly technology that offers substantial advantages in increasing the shelf-life and improving the quality and food safety of fruits and vegetables by acting as a barrier against mass diffusion (moisture and gases) and also by retarding spoilage and surface growth of bacteria, yeasts and molds on a wide range of products. Furthermore, food-borne microbiological outbreaks and the current coronavirus pandemic (SARS-CoV2) are a serious public health problem. Some works have shown that compounds of natural origin, such as phenolic acids and flavonoids, have promising antiviral potential, however, there are still no studies on the efficacy of active coatings against this virus. Thus, the motivation for this work arose, where it was intended to evaluate the efficacy of edible active coatings against coronavirus and in the preservation and increasing of pears' shelf life.

In this sense, this dissertation aimed to evaluate three coatings based on sodium alginate and sucrose ester incorporated with active compounds, namely gallic acid, geraniol, and green tea extract. These coatings were evaluated in terms of their antiviral ability against coronavirus SARS-CoV2, and, in parallel, their antioxidant activity was determined. From the antioxidant tests, it was concluded that gallic acid has the highest antioxidant capacity, and from the antiviral tests it was determined that gallic acid is the most effective active compound at the critical concentration of 12,5 g/L, so this condition was used in further antibacterial tests, against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, in which it showed a strong inhibitory effect, and in shelf-life tests. In this latter, the coating based on 10 g/L alginate, 5 g/L sucrose ester and 12,5 g/L gallic acid was applied to pears, which were analyzed for their change in mass, firmness, titratable acidity content, pH, soluble solids content and appearance over 45 days of storage. It was found that, probably due to external factors, the active coating had no effect in extending shelf life or improving their quality attributes.

Keywords: Active coating, antimicrobial activity, coronavirus, shelf-life

ÍNDICE

1	<i>Introdução</i>	1
1.1	Enquadramento e motivação	2
1.2	Objetivos	3
1.3	Estrutura da dissertação	4
2	<i>Revestimentos comestíveis</i>	5
2.1	Definição e aplicações	6
2.2	Biomateriais	8
2.3	Materiais empregues na formulação	10
3	<i>Incorporação de compostos ativos</i>	12
3.1	Compostos antivirais	13
3.2	Compostos antimicrobianos	15
3.3	Compostos antioxidantes	17
3.4	Compostos de estudo	18
4	<i>Tempo de prateleira de alimentos</i>	20
5	<i>Materiais e métodos</i>	24
5.1	Testes antivirais	25
5.1.1	Condições de testagem antiviral	25
5.1.2	Preparação das soluções	25
5.1.3	Preparação dos filmes	26
5.1.4	Inoculação das amostras	26
5.2	Testes antioxidantes	27
5.2.1	Preparação das soluções	27
5.2.2	Ensaio DPPH	28
5.2.3	Ensaio ABTS	29
5.3	Testes antibacterianos	29
5.3.1	Preparação dos meios de cultura	30
5.3.2	Preparação das amostras	31
5.3.3	Pré-cultura de bactérias	31

5.3.4	Preparação do inóculo de teste	31
5.3.5	Inoculação das amostras	32
5.3.6	Contagem das bactérias viáveis	33
5.3.7	Análise dos resultados.....	33
5.4	Testes de avaliação do tempo de prateleira	34
5.4.1	Condições de testagem	34
5.4.2	Preparação das soluções.....	35
5.4.3	Aplicação das soluções nas peras.....	35
5.4.4	Perda de massa	36
5.4.5	Firmeza	37
5.4.6	pH	38
5.4.7	Conteúdo de sólidos solúveis	38
5.4.8	Acidez Titulável	39
5.4.9	Análise sensorial.....	40
5.4.10	Análise estatística	41
6	Resultados e Discussão	42
6.1	Análise dos testes antivirais.....	43
6.1.1	Atividade antiviral do alginato de sódio e do éster de sacarose.....	43
6.1.2	Atividade antiviral do ácido gálico – resultados de resposta à dose.....	43
6.1.3	Atividade antiviral do geraniol – resultados de resposta à dose	45
6.1.4	Atividade antiviral do extrato de chá verde – resultados de resposta à dose	46
6.1.5	Determinação do tempo de prateleira dos revestimentos com concentrações críticas	47
6.2	Análise dos testes antioxidantes	49
6.3	Análise dos testes antibacterianos	53
6.4	Análise dos testes de tempo de avaliação do tempo de prateleira	57
6.4.1	Perda de massa	57
6.4.2	Firmeza.....	58
6.4.3	pH.....	60
6.4.4	Conteúdo de sólidos solúveis totais	61
6.4.5	Acidez titulável	62
6.4.6	Análise sensorial.....	63
7	Conclusões e recomendações.....	69
	Referências.....	73
	Anexos	83

Anexo I – Testes antioxidantes.....	84
Anexo II – Ficha de análise sensorial	88
Anexo III – Dados dos testes de tempo de prateleira	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vantagens e propriedades funcionais de um revestimento comestível.	8
Figura 2. Esquema geral dos biomateriais empregues num revestimento comestível.	9
Figura 3. Representação ilustrativa da estrutura molecular do alginato de sódio [20].	10
Figura 4. Representação ilustrativa da estrutura molecular geral dos ésteres de sacarose [21].	11
Figura 5. Classificação dos compostos antimicrobianos de acordo com a sua origem. Adaptado de [37].	16
Figura 6. Cuvetes onde o filme foi produzido.	26
Figura 7. Meios de cultura preparados.	30
Figura 8. Representação esquemática da aplicação das soluções de revestimento nas peras por imersão.	36
Figura 9. Teste de perfuração no texturómetro.	37
Figura 10. Medidor de pH.	38
Figura 11. Filtração a vácuo das polpas de pera.	39
Figura 12. Refratómetro.	39
Figura 13. Painel não treinado a realizar a análise sensorial.	41
Figura 14. Filme AG1.	48
Figura 15. Filme GER-1.	48
Figura 16. Filme ECV-1.	49
Figura 17. Curva de calibração Trolox, usada nos ensaios DPPH.	50
Figura 18. Curva de calibração Trolox, usada nos ensaios ABTS.	50
Figura 19. Estrutura química do ácido gálico [86].	52
Figura 20. Estrutura química de catequinas presentes no chá verde [88].	52
Figura 21. Estrutura esquemática das paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Adaptado de [95].	55
Figura 22. Perda de massa (W / %) das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.	58
Figura 23. Firmeza (N) das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.	59
Figura 24. Variação do pH das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.	60

Figura 25. Conteúdo de sólidos solúveis totais, em °Brix, das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.....	61
Figura 26. Variação da acidez titulável, em equivalentes de ácido málico, das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.	62
Figura 27. Gráfico radar da análise sensorial das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, no dia 45.....	64
Figura 28. Imagens do exterior e do interior das peras com revestimento ativo, no dia 45.	67
Figura 29. Imagens do exterior e do interior das peras com revestimento normal, no dia 45.	67
Figura 30. Imagens do exterior e do interior das peras sem revestimento, no dia 45.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS EM ANEXOS

Figura A 1. Microplaca com a curva padrão de Trolox no ensaio DPPH.....	84
Figura A 2. Microplaca com as várias concentrações das amostras no ensaio DPPH.	84
Figura A 3. Microplaca com a Curva padrão de Trolox no ensaio ABTS.	84
Figura A 4. Microplaca com as várias concentrações das amostras no ensaio ABTS.	85
Figura A 5. Atividade antioxidante do ácido gálico, pelo método DPPH.....	85
Figura A 6. Atividade antioxidante do geraniol, pelo método DPPH.....	85
Figura A 7. Atividade antioxidante do extrato de chá verde, pelo método DPPH.....	86
Figura A 8. Atividade antioxidante do ácido gálico, pelo método ABTS.....	86
Figura A 9. Atividade antioxidante do geraniol, pelo método ABTS.	86
Figura A 10. Atividade antioxidante do extrato de chá verde, pelo método ABTS.....	87
Figura A 11. Exemplar da ficha de análise sensorial.	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Aplicação de revestimentos comestíveis em frutos e vegetais [9]	7
Tabela 2. Concentração dos compostos ativos nos filmes usados nos testes antivirais	25
Tabela 3. Parâmetros para o teste de perfuração das peras	37
Tabela 4. Atividade antiviral do alginato de sódio e do éster de sacarose	43
Tabela 5. Resultados de resposta à dose de filmes com ácido gálico	44
Tabela 6. Resultados de resposta à dose de filmes com geraniol	45
Tabela 7. Resultados de resposta à dose de filmes com extrato de chá verde	46
Tabela 8. Atividade antiviral do filme com ácido gálico (12,5 g/L) ao longo de um mês de armazenamento	47
Tabela 9. Atividade antiviral do filme com geraniol (3,125 g/L) ao longo de um mês de armazenamento	48
Tabela 10. Atividade antiviral do filme com extrato de chá verde (3,125 g/L) ao longo de um mês de armazenamento	49
Tabela 11. Valores de IC_{50} e de valor máximo de inibição percentual ($I_{máx}$), para cada composto ativo em cada ensaio	51
Tabela 12. Número de bactérias viáveis recuperadas (N) nas amostras	54
Tabela 13. Imagens do exterior das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento ao longo do tempo de armazenamento	66

ÍNDICE DE TABELAS EM ANEXOS

Tabela A 1. Massa das peras (g) ao longo do tempo de armazenamento	89
Tabela A 2. Perda de massa (%) das peras ao longo do tempo de armazenamento	89
Tabela A 3. Firmeza (N) das peras ao longo do tempo de armazenamento	90
Tabela A 4. Valores de pH das peras ao longo do tempo de armazenamento	91
Tabela A 5. Conteúdo de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) das peras ao longo do tempo de armazenamento ...	91
Tabela A 6. Valores de acidez titulável (g ácido málico/ 100 g de solução) das peras ao longo do tempo de armazenamento	92
Tabela A 7. Resultados da análise sensorial	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – Radical 2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenztiazolina-6-sulfónico)

ABTS-PP – Complexo ABTS e PP

ACE2 – Enzima conversora de angiotensina 2

AG – Ácido gálico

AOAC – Métodos de Análise Oficiais (*Official Methods of Analysis*)

ARN – Ácido ribonucleico

BHA – Butil hidroxianisol

BHT – Butil hidroxitolueno

Caldo SCDLP – Caldo de digestão de caseína de soja com lecitina e monooleato de polioximetileno sorbitano

CoV – Coronavírus

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EC – Epicatequina

ECG – Galato de epicatequina

ECV – Extrato de chá verde

EGC – Epigallocatequina

EGCG – Galato de epigallocatequina

GER – Geraniol

GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro (*Generally recognized as safe*)

HCoV – Coronavírus humano (*Human coronavirus*)

INL – Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (*International Iberian Nanotechnology Laboratory*)

MERS-CoV – Síndrome respiratório do médio oriente (*Middle East respiratory syndrome*)

MNV – Norovírus murino (*Murine norovirus*)

NoV – Norovírus

NaOH – Hidróxido de sódio

PCR – Reação em cadeia de polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PG – Poligalacturonase

PP – Persulfato de potássio

SARS-CoV – Síndrome respiratório aguda grave coronavírus (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus*)

SARS-CoV2 – Síndrome respiratório aguda grave coronavírus 2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

TEAC – Capacidade antioxidante equivalente de Trolox (*Trolox equivalent antioxidant capacity*)

TR – Transcrição reversa

LISTA DE SÍMBOLOS

- A – Área superficial da cuvete onde o revestimento foi produzido.
- Aa – Recuperação ou atividade antibacteriana
- Ab – Absorvância média do branco
- Ac – Absorvância média do controlo de cor
- As – Absorvância média da amostra
- A_t – Média do logaritmo comum do número de bactérias viáveis recuperadas das amostras de teste tratadas, após 24 h de incubação
- C – Contagem média de placas
- c_{AG} – Concentração de ácido gálico
- c_{ECV} – Concentração de extrato de chá verde
- c_{GER} – Concentração de geraniol
- c_T – Concentração de Trolox
- D – Fator de diluição das placas contadas
- $F_{máx}$ – Força máxima exercida no teste de firmeza
- I – Percentagem de inibição antioxidante
- I_{ABTS} – Inibição percentual de ABTS
- IC_{50} – Metade da concentração inibitória máxima
- I_{DPPH} – Inibição percentual de DPPH
- $I_{máx}$ – Inibição percentual máxima
- $L_{máx}$ – Logaritmo comum do número máximo de bactérias viáveis encontradas numa amostra
- $L_{médio}$ – Logaritmo comum do número médio de bactérias viáveis encontradas nas amostras
- L_{min} – Logaritmo comum mínimo de bactérias viáveis encontradas numa amostra
- mi – Massa inicial
- M_{NaOH} – Molaridade da solução de hidróxido de sódio
- mt – Massa no instante t
- Mv – Valor de atividade antiviral
- N – Número de bactérias viáveis recuperadas
- R – Valor percentual de redução antiviral
- TA – Acidez titulável (*Titrateable Acidity*)

U_0 – Média do logaritmo comum do número de bactérias viáveis recuperadas das amostras de teste não tratadas imediatamente após inoculação

U_t – Média do logaritmo comum do número de bactérias viáveis recuperadas das amostras de teste não tratadas após 24 h de incubação

V – Volume de meio SCDLP adicionado a cada amostra

V_0 – Volume do balão volumétrico

V_f – Volume do filtrado

V_{NaOH} – Volume de hidróxido de sódio gasto na titulação

W – Índice da perda de massa

σ – Desvio padrão

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO

Atualmente, devido a surtos microbiológicos recentes de origem alimentar, os consumidores são sensíveis ao consumo de alimentos frescos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, anualmente, em todo o mundo, a ingestão de alimentos contaminados causa 420000 mortes e 600 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos. As principais causas de transmissão de doenças alimentares estão atribuídas a agentes de doenças diarreicas, como o norovírus e a *Campylobacter* spp., que provocam cerca de 230000 mortes por ano. *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli* estão também entre os patogénicos alimentares mais comuns que afetam milhões de pessoas todos os anos. Anualmente, a *Salmonella enterica* e a *Escherichia coli* enteropatogénica são responsáveis pela perda de 18 milhões de anos de vida saudáveis, em todo o mundo [1].

Os consumidores precisam de garantias adicionais de segurança alimentar agora mais do que nunca: origem, rastreabilidade e certificações deverão ser destacadas. Ainda que, não existam evidências sobre a ingestão de alimentos como forma de disseminação do SARS-CoV2, o vírus mais predominante nos dias atuais, a manipulação de superfícies de alimentos contaminadas ou a contaminação acidental de superfícies de alimentos pode representar um sério risco de disseminação de coronavírus, principalmente se alguém manusear alimentos frescos, como frutas ou vegetais, enquanto estiver a assoar o nariz, a tossir ou a espirrar. Uma recente pesquisa COVID da *International Food Information Council Foundation* afirmou que 4 em cada 10 pessoas estão a reduzir a compra de alimentos frescos não embalados e a comprar mais produtos embalados com plástico [2]. O uso de revestimentos comestíveis contendo compostos antivirais de grau alimentício, como polifenóis e alcalóides de extratos de ervas, como o chá verde, é uma abordagem já conhecida que provou ser eficaz para garantir a segurança contra vírus importantes para alimentos relevantes, como os vírus hepatite A, B e C. As mesmas moléculas bioativas demonstraram atividade inibitória contra membros da família *Coronaviridae* [3]. Assim, o desenvolvimento de tratamentos antivirais comestíveis, como revestimentos capazes de manter os alimentos frescos, como proposto no projeto COVICOAT, no qual a 2BNanoFood, Lda era uma das empresas participantes, terá impacto na segurança alimentar, confiança do consumidor e meio ambiente.

Neste sentido, o interesse pela aplicação de revestimentos comestíveis em produtos alimentícios, como forma de preservação, tem vindo a aumentar com a crescente demanda, por parte dos consumidores, por alimentos mais seguros e pelos benefícios de saúde associados aos alimentos frescos. Da mesma forma, o aumento da consciencialização dos impactos ambientais negativos resultantes da utilização de embalagens não biodegradáveis e a preocupação gerada pelos surtos alimentares de origem

patogénica têm igualmente despertado o interesse pela utilização dos revestimentos comestíveis sustentáveis. Posto isto, os revestimentos respondem às questões ambientais, uma vez que são produzidos a partir de produtos biológicos de natureza polimérica marinha ou agrícola, como polissacarídeos, proteínas e lípidos, ou uma combinação destes, permitindo a substituição das típicas embalagens não renováveis e uma redução consequente de resíduos do produto [4].

Trata-se de uma estratégia verde que, além de minimizar o uso de aditivos químicos e sintéticos, permite prolongar a vida útil dos produtos alimentícios e melhorar a qualidade e segurança alimentar, sem modificar as propriedades físico-químicas, sensoriais, nutricionais e organoléticas dos alimentos. Os revestimentos comestíveis ativos apresentam propriedades únicas e vantagens em relação às tradicionais técnicas de conservação, providenciando barreiras protetoras contra danos físicos e mecânicos e barreiras seletivas, entre o alimento e a atmosfera circundante, ao oxigénio, gases, humidade e aromas, o que impede a oxidação lipídica. Mais especificamente, um revestimento atua como uma barreira semipermeável para retenção de dióxido de carbono e vapor de água com baixa permeação de oxigénio, o que se traduz numa redução da taxa de respiração, da perda de água e da carga microbiana na superfície dos alimentos [5].

Ademais, com a progressiva tendência de inclusão de produtos frescos na dieta humana têm surgido doenças de natureza alimentar com origem em bactérias patogénicas, fungos e, mais recentemente vírus entéricos humanos. O crescimento e proliferação dos organismos patogénicos consiste num problema sério de segurança e qualidade alimentar e, neste sentido, a incorporação de agentes antimicrobianos em revestimentos ativos comestíveis revela-se uma solução promissora no controlo e inibição da proliferação dos mesmos. Além dos antimicrobianos, existe ainda a possibilidade de incorporar nos revestimentos diferentes ingredientes funcionais como nutracêuticos, antioxidantes, corantes e aromas, e, ainda, microrganismos vivos, como bacteriocinas e leveduras para conferir propriedades antimicrobianas e probióticas, numa abordagem de biocontrolo que visa a extensão do tempo de prateleira do produto alimentar e o controlo de doenças associadas à pós colheita [6].

1.2 OBJETIVOS

Tendo em conta a atual preocupação com o surto da COVID-19, o principal objetivo deste trabalho consistiu em dar continuidade aos estudos iniciados no projeto COVICOAT, através do desenvolvimento de um revestimento antiviral comestível contendo um composto ativo com vista em prevenir a contaminação da superfície de frutas frescas do coronavírus SARS-CoV2. Este projeto foi desenvolvido inicialmente em 2020 pela 2BNanoFood, Lda, uma spin-out do INL (*International Iberian Nanotechnology*

Laboratory), em colaboração com o INL e a empresa Eroski. A 2BNanoFood, Lda, tinha como principal objetivo a produção de um revestimento comestível ativo de grau alimentar capaz de estender a vida útil e eliminar contaminantes relevantes para alimentos. A 2BNanoFood, Lda, procurava agora explorar os limites da tecnologia e aprimorar a formulação do revestimento sustentável antiviral. No seguimento da avaliação antiviral dos revestimentos, surgiram ainda dois objetivos secundários: a testagem das propriedades antioxidantes dos vários compostos ativos; e a avaliação da atividade antibacteriana do revestimento cujo composto ativo e sua concentração foram definidos como os mais eficazes contra o coronavírus SARS-CoV2, nos testes antivirais prévios. Por último, o segundo foco principal do projeto consistiu em aplicar o revestimento antiviral mais eficaz em peras e avaliar o seu efeito na vida útil das mesmas, a partir da análise de parâmetros de controlo do tempo de prateleira de frutas.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em 7 capítulos. Este capítulo apresenta o enquadramento e as motivações para o estudo em questão, bem como os principais objetivos. O capítulo 2 apresenta alguns conceitos e definições assim como os biomateriais geralmente empregues na produção de revestimentos comestíveis, além de fornecer informação sobre os materiais que foram utilizados na formulação dos presentes revestimentos comestíveis. O próximo capítulo apresenta uma breve revisão da literatura relativamente à incorporação de compostos funcionais nos revestimentos. Em primeiro lugar, explica-se a importância de desenvolver um revestimento antiviral e apresentam-se alguns estudos sobre compostos antivirais que já foram estudados com potencial contra a COVID-19, em seguida abordam-se os vários compostos antimicrobianos mais utilizados e quais os microrganismos patogénicos de origem alimentar mais preocupantes, e finalmente, no último subcapítulo, expõe-se a relevância do processo de oxidação em alimentos dando-se exemplos de compostos antioxidantes. O capítulo 4 explica em que consiste o estudo do tempo de prateleira dos produtos alimentícios e aborda os parâmetros indicadores da qualidade dos alimentos com maior interesse a analisar. Seguidamente, o capítulo 5 refere-se aos materiais e métodos utilizados ao longo do desenvolvimento deste trabalho onde estão detalhados todos os passos realizados para atingir os objetivos definidos. Por fim, o capítulo 6 apresenta uma discussão dos resultados obtidos e o capítulo 7 expõe as principais conclusões e algumas recomendações para trabalhos futuros.

2 REVESTIMENTOS

COMESTÍVEIS

2.1 DEFINIÇÃO E APLICAÇÕES

Um revestimento comestível é definido como uma camada fina de material formada diretamente na superfície do produto alimentício, sob a forma de revestimento, ou como uma película (filme) resultante da secagem de uma solução preparada separadamente do alimento e aplicada posteriormente nele. Esta barreira semipermeável tem em vista estender a vida útil e proteger o alimento, fornecendo uma barreira ao oxigênio e à humidade que permite controlar trocas gasosas, reações de oxidação e taxas de respiração. O revestimento tem também como objetivo a melhoria das propriedades mecânicas e da percepção sensorial e, ainda, reduzir a carga microbiana externa e distúrbios fisiológicos em alimentos minimamente processados [7].

A escolha do revestimento mais adequado ao tipo de produto alimentício segue determinados critérios. Primeiramente, é essencial garantir a capacidade molhante do revestimento na superfície do alimento e de seguida, surgem outros fatores como as propriedades mecânicas e estruturais, de transporte, térmicas e óticas que afetam a eficácia do revestimento [8]. Os revestimentos podem, além do mais, ser usados como transportadores de compostos bioativos, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, antivirais, melhoradores de textura, probióticos, entre outros. Na Tabela 1 encontram-se resumidas várias aplicações de revestimentos utilizadas em frutos e vegetais.

Os potenciais benefícios da implementação dos revestimentos comestíveis em frutas são vários (Figura 1), nomeadamente [8]:

- Reduzir a perda de água, ou seja, diminuir a permeabilidade ao vapor de água;
- Reduzir a permeabilidade ao oxigênio, de forma a aumentar o tempo de prateleira, retardar a decomposição oxidativa e reduzir a produção de etileno (impulsiona a maturação de alguns frutos) dos alimentos;
- Aumentar a permeabilidade ao dióxido de carbono para prolongar a fase lag e de crescimento logarítmico dos microrganismos indesejáveis (leveduras e bolores);
- Reduzir a deterioração, a maturação, e a perda de aroma e retardar o escurecimento e alterações da cor;
- Melhorar a aparência e potenciar a cor e o sabor;
- Melhorar a resistência mecânica, com o objetivo de prolongar a integridade do fruto;
- Reduzir a incidência de luz, através de valores elevados de opacidade, uma vez que a luz promove a oxidação de gorduras;
- Promover o transporte e libertação controlada de agentes que melhoram a textura e a capacidade antioxidante, de precursores voláteis e de compostos nutricionais e funcionais.

Tabela 1. Aplicação de revestimentos comestíveis em frutos e vegetais [9]

Tipo de revestimento	Composição	Aplicação	Principais resultados
Polissacarídeo	Quitosano e Tween 80	Frutos (morangos, cerejas, framboesas, uvas, tomates, pêssago, kiwi) e vegetais (alface e cenoura)	Extensão do tempo de prateleira, manutenção da firmeza e redução da infecção de fungos
Polissacarídeo	Alginato e glicerol	Frutos (maça) e vegetais (cebola e cogumelos)	Extensão do tempo de prateleira, melhoria da aparência e redução da perda de humidade
Proteína-polissacarídeo	Carboximetilcelulose, isolado de proteína de soro, caseína e glicerol	Frutos (morangos)	Redução da proliferação de bolores
Polissacarídeo-lípido	Maltodextrina, carboximetilcelulose, ésteres de ácidos gordos, benzoato de sódio	Frutos (manga)	Extensão do tempo de armazenamento após colheita
Polissacarídeo-lípido	Quitosano, ácido oleico e Tween 80	Frutos (morangos)	Atraso na senescência e na infecção de fungos

Apesar das inúmeras vantagens relacionadas com o uso de revestimentos comestíveis existem ainda algumas limitações associadas como taxas de difusão inadequadas, fraca adesão do revestimento à superfície hidrofílica do produto alimentício e a degradação do composto antimicrobiano incorporado.

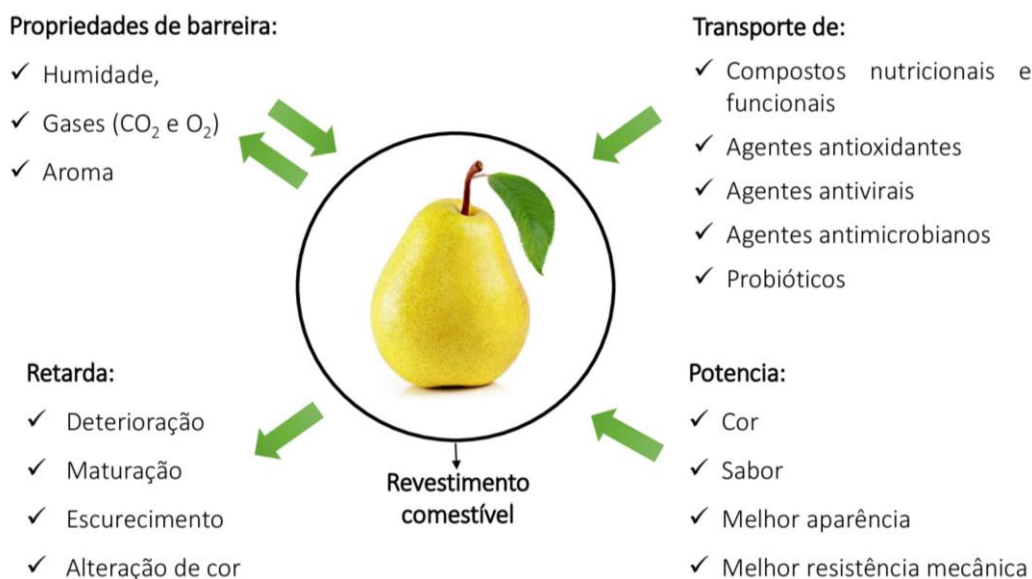


Figura 1. Vantagens e propriedades funcionais de um revestimento comestível.

2.2 BIOMATERIAIS

Os revestimentos são formados a partir de materiais de natureza biológica, nomeadamente polissacarídeos, proteínas e lípidos ou uma combinação dos mesmos. Plastificantes e surfactantes podem ser também adicionados a estes materiais (Figura 2), com o objetivo de melhorar as características do produto final, como a flexibilidade, a elasticidade e propriedades de barreira e óticas [10]. A seleção dos materiais a usar baseia-se nas suas características físico-químicas, sendo desejável um material que disponha de uma boa barreira ao vapor de água, de forma a retardar a desidratação da superfície dos alimentos frescos e que controle as trocas gasosas e de oxigénio para reduzir a oxidação e o ranço [11]. Outros requisitos para a escolha da matéria-prima incluem um material que deve ser considerado seguro para consumo (*Generally Recognized As Safe, Gras*) e com habilidade de formar uma camada contínua de revestimento.

Dependendo das fontes, as matérias-primas utilizadas na formação dos revestimentos comestíveis podem ser agrupadas de acordo com sua origem animal, vegetal ou marinha e podem ser classificadas em duas categorias: hidrofóbicas e hidrofílicas. Em geral, as substâncias hidrofóbicas ou lipídicas têm melhores propriedades de barreira contra a transferência de humidade, enquanto as substâncias hidrofílicas (proteínas e polissacarídeos, por exemplo) apresentam baixa permeabilidade, mas melhores propriedades mecânicas [11].

Os revestimentos à base de polissacarídeos são transparentes e homogêneos, com boas propriedades mecânicas e estruturais. Devido à natureza hidrofílica dos polissacarídeos, as suas propriedades de barreira à humidade são ineficazes; no entanto, fornecem boas barreiras ao oxigénio, sabores e óleos. Os polissacarídeos mais utilizados são derivados de celulose, alginato, amido, algas, extratos vegetais, gomas microbianas, pectina e quitosano [12].

Os materiais de formação de revestimentos proteicos podem ser derivados de fontes vegetais ou animais. As proteínas animais incluem gelatina, caseína e soro de leite, e as proteínas vegetais mais exploradas são zeína de milho, glúten de trigo e proteína de soja [13]. Estes tipos de revestimentos apresentam inúmeras vantagens, uma vez que reduzem a perda de humidade, restringem a absorção de oxigénio, reduzem a migração de lípidos, além de melhorarem as propriedades mecânicas e fornecerem proteção física. No entanto, a maior parte deles são sensíveis à humidade, o que pode limitar sua aplicação [14].

Finalmente, a função primária dos revestimentos lipídicos é diminuir o transporte de humidade visto possuírem baixa polaridade. Devido ao facto de os lípidos não serem polímeros e às suas características hidrofóbicas, as estruturas formadas são frágeis e pouco coesas, razão pela qual devem ser associados a outros agentes formadores de revestimentos, como proteínas e polissacarídeos, para melhorar a resistência mecânica [15]. Em contraste, as principais vantagens do emprego de lípidos em revestimentos é a sua capacidade de fornecer uma boa barreira à humidade e de melhorar a aparência da superfície de alimentos frescos. Por outro lado, os revestimentos à base de lípidos podem fornecer uma superfície oleosa e propriedades organoléticas indesejáveis, como sabor de cera e ranço lipídico. As substâncias hidrofóbicas potencialmente usadas em revestimentos comestíveis à base de lípidos incluem lípidos neutros, ácidos gordos, ceras e resinas [16].

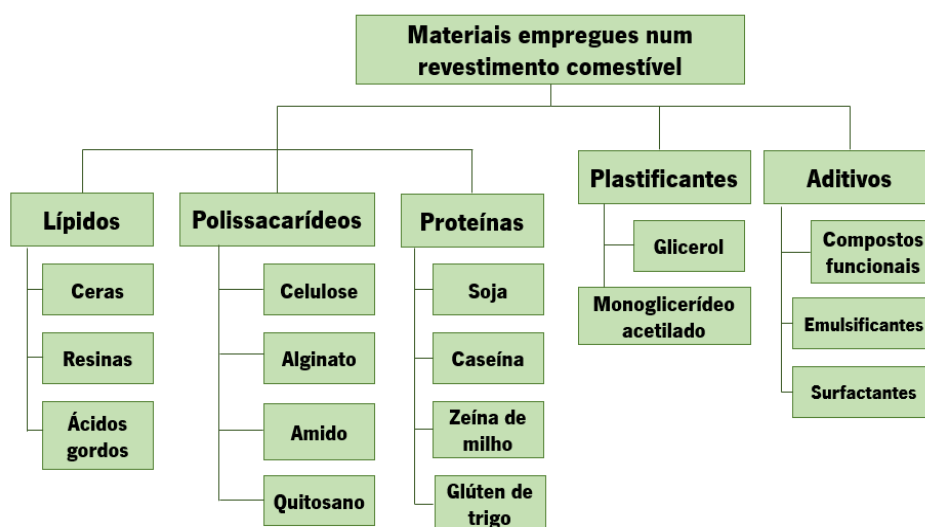


Figura 2. Esquema geral dos biomateriais empregues num revestimento comestível.

2.3 MATERIAIS EMPREGUES NA FORMULAÇÃO

Na presente formulação, o material de base da matriz empregue foi o alginato de sódio, cuja estrutura molecular encontra-se ilustrada na Figura 3. O alginato de sódio, de fórmula química $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$, é um dos polissacarídeos mais interessantes no desenvolvimento de revestimentos, devido à sua natureza não tóxica e às suas propriedades coloidais únicas de espessamento, estabilização, suspensão, formação de filme, produção de gel e estabilização de emulsão [17]. O alginato é um coloide extraído de algas marinhas castanhas conhecidas por *Phaeophyceae* cuja natureza hidrofílica providencia propriedades de barreira à humidade pouco eficazes [12]. Em contrapartida, revestimentos à base de alginato mostram-se transparentes, uniformes e solúveis em água e apresentam boas barreiras ao oxigénio, o que permite retardar a oxidação lipídica em frutas e vegetais e reduzir a perda de peso e a carga microbiana na superfície de alimentos minimamente processados [18]. Isto deve-se ao facto de os sítios ativos da cadeia carbónica do alginato se sódio se encontrarem parcialmente carregados positivamente e outros negativamente, o que favorece a acumulação e o rearranjo da água e de moléculas polares nesses locais. Assim sendo, este material é bastante solúvel em meio aquoso proporcionando uma melhor dispersão do soluto e uma formação do revestimento mais homogénea [19].

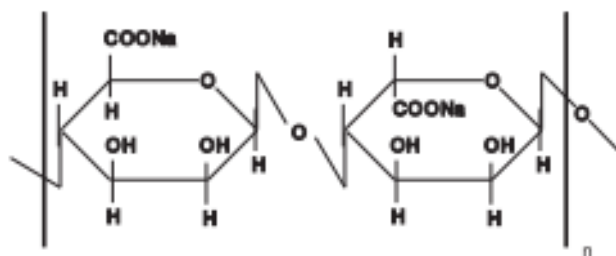


Figura 3. Representação ilustrativa da estrutura molecular do alginato de sódio [20].

O éster de sacarose foi também adicionado à composição do revestimento comestível. Trata-se de um composto anfifílico que é constituído por uma porção lipofílica, representada pelos ácidos gordos, e por uma porção hidrofílica, representada pela sacarose. A sua estrutura molecular está representada na Figura 4. É um composto biodegradável e não tóxico amplamente utilizado na produção de géneros alimentícios como um emulsificante que, além de possuir propriedades espumantes, exhibe, ainda, capacidade de formação de géis, sendo, por este motivo, uma boa adição à formulação de um revestimento comestível [21]. O éster de sacarose é um surfactante comercialmente utilizado como inibidor de escurecimento que, quando aplicado em frutas minimamente processadas, funciona como uma barreira ao oxigénio [22]. Além disso, permite estabilizar revestimentos comestíveis, uma vez que a sua capacidade anfifílica reduz a tensão superficial, assim como melhorar a molhabilidade e, consequentemente, a adesão do revestimento ao alimento [23].

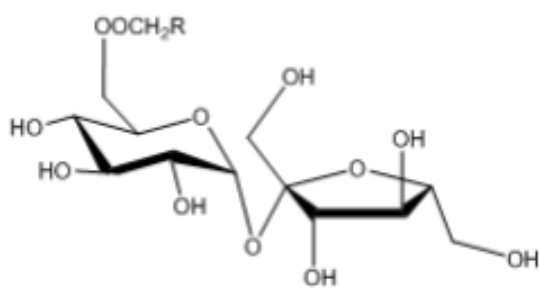


Figura 4. Representação ilustrativa da estrutura molecular geral dos ésteres de sacarose [21].

3 INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS

O princípio base da utilização dos revestimentos comestíveis passa por aumentar o tempo de prateleira de um produto alimentício sem danificar as suas propriedades sensoriais e organoléticas com a vantagem da possibilidade de incorporar compostos ativos, que irão interagir com o alimento e o ambiente redundante. Os compostos ativos possuem propriedades funcionais que podem melhorar a qualidade do alimento e estender o seu tempo de prateleira (agentes antioxidantes e anti-escurecimento), melhorar as propriedades sensoriais, atrasar o decaimento bacteriano (agentes antibacterianos) e viral (compostos antivirais) e introduzir benefícios para a saúde do consumidor (nutracêuticos como vitaminas, minerais, pré-bióticos e probióticos) [6].

De facto, a incorporação de componentes bioativos em alimentos pode trazer muitas vantagens, mas, por vezes, pode alterar o sabor, tornar o produto suscetível a uma degradação mais rápida, interagir negativamente com outros elementos da matriz alimentar e limitar a solubilidade. A integração em sistemas de embalagens pode adicionalmente melhorar a solubilidade do composto e providenciar uma libertação controlada, enquanto mantém as características sensoriais e nutritivas do alimento. A incorporação de minerais, vitaminas e ácidos gordos é atualmente uma estratégia usada para melhorar o valor nutricional dos produtos e é especialmente benéfica em produtos minimamente ou não processados, como frutas e vegetais [24].

3.1 COMPOSTOS ANTIVIRAIS

O uso de revestimentos comestíveis com compostos antivirais incorporados está provado como uma medida efetiva para garantir a segurança alimentar contra alguns vírus de origem alimentar.

No presente, o norovírus (NoV), um patogénico entérico humano, é um vírus de ARN de origem alimentar da família *Caliciviridae*, que causa gastroenterites agudas e aparece principalmente em alimentos minimamente processados e prontos para consumo. Os norovírus humanos (HNoV) são considerados a causa número um de doenças transmitidas por alimentos e a quarta causa de mortes decorrentes do consumo de alimentos infetados em todo o mundo [25]. O extrato de semente de uva, por exemplo, é um composto que, além de ter atividade antibacteriana e antioxidante, é eficaz contra o norovírus murino (MNV), o norovírus substituto do norovírus humano [26]. Ademais, Gilling et al. mostraram que o óleo de orégão e o seu principal componente ativo, o carvacrol, são eficazes na inativação do MNV, sendo que ambos os compostos permitem a redução da infectividade do MNV em concentrações menores ou iguais a 5 g/L [27]. No mesmo sentido, Amankwaah et al., avaliaram a eficácia de filmes à base de quitosano enriquecidos com extrato de chá verde (ECV) contra o norovírus murino e os resultados mostraram que 50 e 100 g/L de ECV, após 24 h de incubação, permitiram uma

redução do MNV de 1,6 e 4,6 log, respetivamente, pelo que esta formulação de filme é eficaz contra o MNV, possivelmente devido aos compostos fenólicos como a catequina e os polifenóis presentes no ECV [28].

Além do mais, o uso de revestimentos comestíveis contendo compostos antivirais de grau alimentício, como polifenóis e alcalóides de extratos de ervas, como o chá verde, é uma abordagem bem conhecida que provou ser eficaz em garantir a segurança contra vírus importantes para alimentos relevantes, como o vírus hepatite A, B e C. As mesmas moléculas bioativas demonstraram atividade inibitória contra membros da família *Coronaviridae* [3]. Assim, reconquistar a confiança no sistema alimentar e, mais especificamente, na segurança de frutas e vegetais crus, passa pelo desenvolvimento de tratamentos antivirais comestíveis.

Atualmente, ainda que existam na literatura vários artigos sobre filmes com propriedades antibacterianas, pesquisas sobre a eficácia antiviral de filmes nos sistemas alimentares atuais contra a COVID-19, o vírus de maior foco nos dias de hoje, são ainda muito reduzidas. O coronavírus (CoV) pertence à família *Coronaviridae* e é um vírus de ARN com envelope. Os seus efeitos consistem em infeções graves no sistema respiratório e gastrointestinal, que podem levar a casos de pneumonia. Os coronavírus humanos (HCoV) incluem HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1 e nas últimas duas décadas, tornaram-se uma ameaça à vida humana e causaram três doenças epidémicas: SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus*), MERS (*Middle East respiratory syndrome*) e SARS-CoV2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). Os surtos em curso são uma grande preocupação para a saúde pública e, atualmente, este patogénico é responsável por uma pandemia mortal, portanto o estudo dos potenciais antivirais é essencial e urgente [29].

Vários autores têm tentado descobrir possíveis compostos naturais eficazes contra este vírus, a partir da informação já retida do SARS-CoV e o MERS-CoV. Zhang et al. identificaram 13 possíveis compostos naturais efetivos contra o SARS-CoV2, bem como seus mecanismos de ação [30]. Inicialmente, identificaram na literatura os compostos naturais que tinham sido biologicamente confirmados como eficazes contra o SARS-CoV e o MERS-CoV e cruzaram-nos com os listados no Banco de Dados de Farmacologia de Sistemas de Medicina Tradicional Chinesa. Os compostos que atenderam ambos os requisitos foram depois submetidos a testes para verificar se a administração oral seria eficaz (testes de absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e realizou-se, de seguida, uma análise de docking para verificar se os compostos tinham potencial na interação direta com o coronavírus. Desses compostos, destacaram o sugiol (um constituinte da classe dos compostos orgânicos conhecidos como diterpenóides), lignana (um polifenol encontrado no Alcaçuz) e ácido betulínico (obtido de *Peucedani*

radix, *Alcaçuz*, *Eriobotryae folium*, *Forsythiae Fructus*, *Hedysarum multijugum maxim*, *Cortex mori* e *Tamaricis cacumen*) como substâncias capazes de inibir a replicação do vírus. Outras plantas como *Fortunes bossfern rhizome* (produtor de harmonil) e *Lepidii semen descurainiae semen* (produtor de ácido dihomog- γ -linolênico), por exemplo, também se revelaram capazes de inibir SARS-CoV2.

3.2 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Uma das funções mais significativas dos revestimentos comestíveis é a possibilidade de incorporação de agentes antimicrobianos como uma ferramenta para aumentar não só a vida útil dos produtos alimentícios como para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes indesejáveis.

Apesar das diversas técnicas de conservação de alimentos, a deterioração microbiana continua a ser um problema em todo o mundo que afeta a saúde pública [31]. A *E. coli*, por exemplo, é um organismo patogênico de origem alimentar muito predominante que afeta gravemente os seres humanos. A maioria das cepas desta bactéria anaeróbia facultativa Gram negativa colonizam de forma inofensiva o trato gastrointestinal dos humanos, no entanto, outras cepas são patogênicas causando diarreias e infecções mais graves. A transmissão da *E. coli* dá-se essencialmente a partir do consumo de alimentos e água contaminados pelo que, o controlo desta bactéria na indústria e cadeia alimentar, é de grande importância [32]. Da mesma forma, a *S. aureus*, uma bactéria Gram positiva aeróbia ou anaeróbia facultativa, é responsável por uma das doenças mais transmitidas por alimentos em todo o mundo, causando cerca de 241000 doenças anualmente nos Estados Unidos. A *S. aureus* é transmitida por ingestão de alimentos contaminados, como carnes e derivados, aves e ovos, leite, produtos de panificação, entre outros, e os sintomas da infecção incluem náuseas, vômitos e cólicas abdominais com ou sem diarreia. A bactéria é altamente resistente ao calor e a condições ambientais, como secagem e congelamento, pelo que constitui uma ameaça significativa nas indústrias de alimentos [33].

Uma ampla variedade de substâncias antimicrobianas pode ser incorporada em revestimentos para melhorar as suas propriedades antimicrobianas e para controlar a taxa de crescimento de microrganismos específicos ou grupos de microrganismos no espaço superior da embalagem, garantindo a segurança alimentar e estendendo a vida útil do produto. A Figura 5, representa a classificação dos compostos antimicrobianos de acordo com a sua origem. Os agentes antimicrobianos mais utilizados são ácidos orgânicos, bacteriocinas, enzimas, compostos derivados de plantas e seus subprodutos, como óleos essenciais, e, ainda, alguns compostos de origem animal [14]. Os ácidos orgânicos, como o ácido acético, benzóico, cítrico, málico, gálico, propiónico, sórbico, tartárico, entre outros, encontram-se

naturalmente em diversos alimentos e têm vindo a ser usados como preservativos biológicos devido à sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias e fungos [34]. Por sua vez, bacteriocinas como pediocina, natamicina ou reuterina são ativas contra bactérias Gram positivas, como os patogénicos de origem alimentar *L. monocytogenes*, *S. aureus*, e *Clostridium spp.*, já contra patogénicos Gram negativos como *E. coli* e *Salmonella spp.* é necessário outros fatores como choque osmótico, baixo pH, agentes quelantes ou detergentes, campo de pulso elétrico ou altas pressões [6]. Os óleos essenciais provenientes de plantas, como orégão, canela, capim-limão, alecrim, alho, e cravo inibem a atividade metabólica de bactérias, fungos e leveduras e melhoram as propriedades de barreira e de resistência mecânica dos filmes em que são incorporados [35]. Ainda como exemplo de um composto antimicrobiano de origem animal ou fúngica, destaca-se o quitosano como uma substância promissora que permite estender o tempo de prateleira de produtos alimentícios e cujas propriedades se demonstram eficazes a nível antifúngico e antibacteriano devido, essencialmente, à sua natureza policatiónica [36].

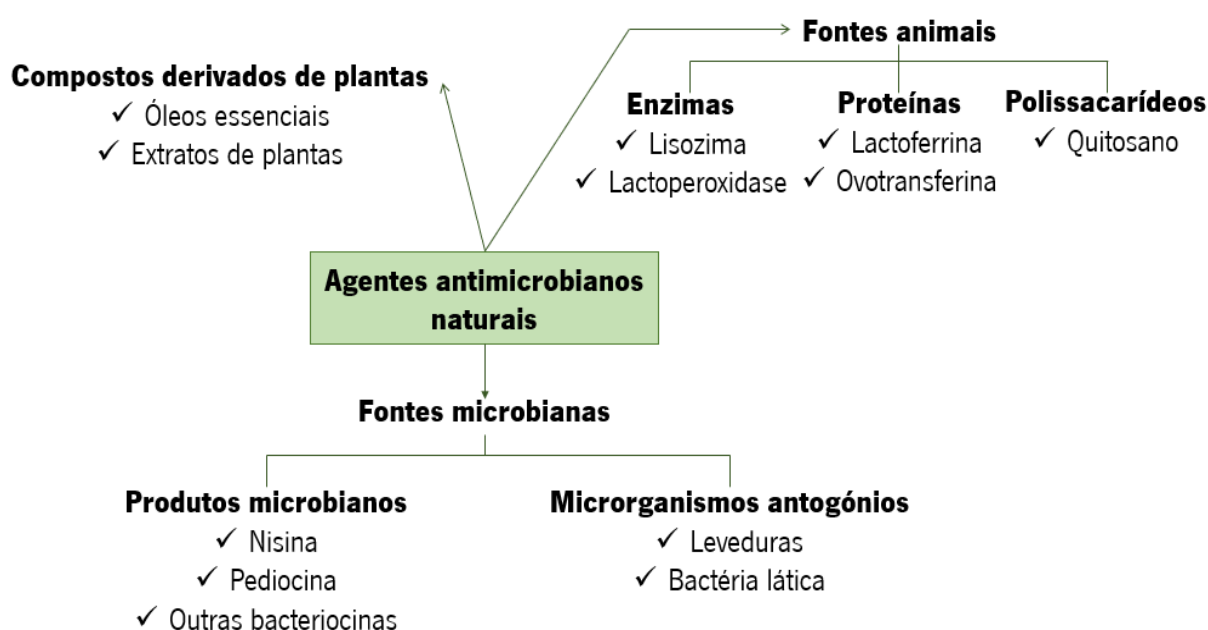


Figura 5. Classificação dos compostos antimicrobianos de acordo com a sua origem. Adaptado de [37].

Tipicamente, a maior parte destes agentes têm sido usados como aditivos alimentares e, portanto, são geralmente classificados como seguros (GRAS), no entanto, muitos têm efeito limitado sobre os microrganismos [38]. Uma das características mais atrativas dos revestimentos comestíveis é a possibilidade de controlar a libertação de agentes funcionais, a partir de mudanças na humidade,

temperatura, pH ou disrupções mecânicas na matriz. A liberação controlada de ingredientes funcionais pode compensar a degradação dos compostos ativos, mantendo uma concentração adequada do composto durante a vida útil do produto [39].

3.3 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Um dos principais problemas dos produtos alimentícios é o processo de oxidação, que pode resultar na degradação da cor, perda do sabor e do valor nutricional e no desenvolvimento de ranço. A autooxidação é o processo mais comum que gera deterioração oxidativa dos lipídios nos alimentos. A oxidação é caracterizada como a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons, ou seja, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância. Esta transferência de elétrons é essencial para a sobrevivência das células, no entanto a produção de radicais livres e de espécies reativas ao oxigênio podem gerar dano oxidativo. Por outras palavras, ainda que algum oxigênio seja necessário para a respiração dos tecidos vivos, a oxidação acelera o consumo de açúcares, lipídios e ácidos orgânicos, aumentando a produção de etileno, que induz ao amadurecimento e causa senescência. A geração de radicais livres é impulsionada pela presença de luz, calor, radiação ionizante, metais de transição e oxidantes, e o seu efeito em alimentos é considerado pernicioso sendo a peroxidação lipídica a principal causa de deterioração de ácidos gordos e a responsável pela modificação do odor e sabor dos alimentos e pela perda do valor nutricional, o que inevitavelmente se traduz numa depreciação e rejeição por parte do consumidor [40].

O efeito do oxigênio pode ser retardado com a adição de antioxidantes à matriz de revestimento. Um agente antioxidante retarda a oxidação lipídica, inibindo a formação inicial de radicais livres ou impedindo-os de produzir mais e de disseminar a reação de oxidação, além que ajudam a preservar os alimentos, retardar o desenvolvimento de ranço e de descoloração. Exemplos de antioxidantes incluem butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), propil galato, butil-hidroquinona terciária, ácido ascórbico, ácido cítrico, palmitato de ascorbilo, ácido tartárico, óleos essenciais, N-acetilcisteína e glutatona. Além do mais, compostos fenólicos derivados de plantas exibem, de igual forma, um elevado poder antioxidante aliado às suas propriedades antimicrobianas e de inibição enzimática, pelo que também têm potencial para serem usados como substitutos dos compostos sintéticos [41].

3.4 COMPOSTOS DE ESTUDO

No âmbito do projeto COVICOAT pretendeu-se averiguar neste estudo a eficácia antiviral, e posteriormente as propriedades antioxidantes e antimicrobianas, dos compostos ativos ácido gálico, geraniol e extrato de chá verde.

O ácido gálico (AG), de fórmula química $C_6H_2(OH)_3COOH$, também conhecido como 3,4,5-triidroxibenzóico, é um composto fenólico natural que se encontra numa grande variedade de frutos e vegetais, como folhas de chá, uvas, cerejas, entre outros. Tem sido relatado que este composto possui atividade antibacteriana significativa contra patogénicos de espécies vibrios e ainda atividade antialérgica, anti-inflamatória, anti-mutagénica e anti-carcinogénica [42]. Além do mais, um estudo revelou que o ácido gálico, quando incorporado em revestimentos à base de quitosano, demonstrou melhorar a sua elasticidade atuando, desta forma, como um plastificante que permitiu eliminar problemas de flexibilidade e de fragilidade [43]. Assim, este ácido orgânico tem vindo a ser usado como um conservante biológico devido à sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias e fungos. O seu efeito antimicrobiano está relacionado com o aumento da concentração de protões que, consequentemente, provoca uma diminuição do pH intracelular. Por conseguinte, a integridade e permeabilidade das membranas celulares microbianas são alteradas, ocorrendo também perturbações a nível de transporte de nutrientes, levando assim à inativação e morte celular dos patogénicos. A sua atividade é mais significativa a baixos valores de pH, pelo que o seu uso pode ser limitado a produtos ácidos, e é ainda dependente da composição da matriz alimentar e de condições ambientais [34].

O geraniol (GER), de forma molecular $C_{10}H_{18}O$, é um álcool monoterpénico, mais especificamente um óleo essencial extraído do óleo de ninde, óleo de rosa, óleo de palmarosa e óleo de citronela [44]. Este composto, reconhecido como GRAS e como uma substância aromatizante aprovada pela Comissão Europeia [45], demonstra atividade inibitória de crescimento de várias bactérias e fungos. A atividade antimicrobiana deste óleo essencial pode ser atribuída à sua capacidade de perturbar a integridade da membrana citoplasmática microbiana, de interromper a força motriz ao transporte ativo e de inibir a síntese de proteínas [46]. Por outras palavras, a sua atividade bactericida deve-se essencialmente à disrupção das membranas celulares fosfolipídicas que levam ao aumento da permeabilidade celular e, consequentemente, à perda de macromoléculas, como proteínas e lípidos, e à diminuição das enzimas responsáveis pela produção de energia, resultando em stress oxidativo e morte celular. Mais concretamente, o geraniol atua contra células de fungos danificando a membrana celular e reduzindo o conteúdo de ergosterol, um componente essencial da membrana celular [47]. Além do mais, a

incorporação de óleos em revestimentos comestíveis permite melhorar as suas propriedades de barreira e diminuir a resistência mecânica [35].

O extrato de chá verde (ECV) é outro composto ativo de interesse de estudo. O chá verde derivado de *Camellia sinensis* é uma boa fonte de compostos polifenólicos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anti-carcinogénica. A composição do chá consiste em polifenóis (flavonóides e catequinas), alcalóides (cafeína, teobromina, teofilina), óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lípidos, entre outros. Destes componentes, as catequinas (que incluem galato de epigallocatequina (EGCG), epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e epicatequina (EC)) são as mais importantes especialmente devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana. Recentemente, o chá verde tem sido reportado pela sua capacidade de atrasar a oxidação lipídica de vários alimentos como óleo marinho, óleo de soja, óleo de milho e linguiça fermentada a seco [48]. Além do mais, Xu et al. provaram que o galato de epigallocatequina (EGCG), o principal constituinte do chá verde reduz a expressão de antígenos específicos do vírus de hepatite B [49], assim como Ciesek et al. demonstraram que este composto previne a infeção do vírus de hepatite C [50].

4 TEMPO DE PRATELEIRA DE ALIMENTOS

A vida de prateleira ou vida útil de um alimento pode ser definida como o período de tempo, sob condições de armazenamento, no qual o produto permanece com a qualidade inicial adequada para consumo. Por outras palavras, a vida de prateleira corresponde ao período de tempo no qual o produto alimentar irá permanecer seguro e manter as suas características sensoriais, químicas, físicas, microbiológicas e funcionais desejadas. O estudo de vida de prateleira de produtos alimentícios consiste em submeter várias amostras a determinados testes e examiná-las durante um período de tempo até ao limite de aceitação. As alterações na qualidade do produto, que o tornam inaceitável para consumo, podem estar relacionadas com diversos aspetos, como a presença de microrganismos patogénicos e deteriorantes, alterações organoléticas, alterações físico-químicas, perda de valor nutricional e contaminantes provenientes da embalagem. Desta forma, a identificação dos atributos que se alteram e a sua quantificação são fatores chave para a monitorização da perda de qualidade durante o armazenamento e para a consequente análise do tempo de prateleira dos alimentos [51].

Na presente dissertação, considerou-se interessante estudar os seguintes parâmetros indicadores da qualidade da peça de fruta: a perda de peso, a acidez (por meio da monitorização do pH e da acidez titulável), o conteúdo de sólidos solúveis, a firmeza e as mudanças a nível de cor e aparência.

Um dos critérios primários mais decisivos na escolha do produto para o consumidor é a aparência do alimento e a sua cor que indicam o grau de frescura do fruto. A qualidade visual de um produto é definida como uma simbiose da cor natural, da uniformidade, do brilho e da falta de defeitos na superfície do alimento. O procedimento de análise deste parâmetro inclui a avaliação visual assim como uma análise sensorial [52].

O sabor e aroma dos frutos são difíceis de avaliar a partir de perceção sensorial. Relativamente ao sabor os principais atributos associados a frutas são a doçura, acidez, adstringência e amargura. A doçura pode ser avaliada medindo os sólidos totais dissolvidos e a acidez titulável. Por outro lado, o aroma é geralmente avaliado por análise sensorial [52]. A análise sensorial consiste em avaliar a aceitação ou rejeição de um determinado produto por parte do consumidor, ao longo de vários dias, sendo a vida de prateleira definida como o tempo ao fim do qual a percentagem de rejeição se torna superior à de aceitação [53].

O conteúdo de sólidos solúveis da fruta, na sua maioria açúcares, tem um grande impacto na sua qualidade organolética visto que influencia a doçura que este terá, sendo por isso um fator que deve ser monitorizado. Por norma, os frutos apresentam um elevado teor de açúcares de baixa massa molecular e, por isso, um elevado teor de sólidos solúveis está associado à boa qualidade do fruto. Aquando do

amadurecimento, o amido presente nas frutas é convertido em açúcares mais simples (glicose, sacarose e frutose) havendo um aumento do teor de sólidos solúveis, por conseguinte. O conteúdo de sólidos solúveis é dado em °Brix que corresponde a 1 g açúcar/100 g solução [54].

Relativamente à acidez, os frutos apresentam de uma forma geral um pH ácido devido à presença dos ácidos málico, cítrico e tartárico. No caso da pera, o ácido málico é o que está presente em maior quantidade. Com a maturação do fruto ocorre uma diminuição da acidez visto que, durante a respiração, o substrato inicial do fruto são os ácidos orgânicos, sendo estes consumidos em primeiro lugar antes dos açúcares. A redução da acidez pode afetar negativamente a qualidade organolética da fruta, por perda do equilíbrio entre acidez e doçura, ou até mesmo aumentar a suscetibilidade a desenvolvimento microbiano de organismos patogénicos [54].

No mesmo sentido, a acidez titulável é outro parâmetro de interesse a controlar, uma vez que reflete diretamente o efeito que os ácidos orgânicos terão no sabor do fruto e na sua qualidade, sendo que quanto mais maduro é o fruto menor o conteúdo de ácido. Em comparação com o pH, a acidez titulável é um melhor indicador do impacto do ácido no sabor [55]. A acidez titulável (TA), expressa em g ácido málico/ 100 g de solução, é determinada através de uma titulação com hidróxido de sódio.

A firmeza, definida como a capacidade de uma fruta resistir a uma força exercida sobre a mesma, é um fator determinante para o consumidor no momento de aquisição de fruto, e está associada ao seu grau de maturação. Durante o processo de maturação do fruto, ocorre perda de firmeza devido, essencialmente, ao aumento da permeabilidade das membranas, pela libertação da poligalacturonase (PG), uma enzima hidrolítica que, consequentemente, torna a parede celular da fruta mais fraca, sendo as membranas rompidas mais facilmente. Também a diminuição da turgescência, decorrente da perda de humidade, é um fator que impulsiona a perda de firmeza [56]. Além do mais, outros fatores como reações enzimáticas podem causar a degradação dos compostos da parede celular, a desnaturação de proteínas e peroxidação lipídica [57]. Segundo um estudo realizado por Galvis-Shánchez et al. uma pera durante o processo de amadurecimento normal sofre uma redução de firmeza significativa quando armazenada até 9 dias sob condições de atmosfera normal e temperatura ambiente. Assim, o presente estudo tem como objetivo averiguar se os revestimentos desenvolvidos permitem retardar a perda de firmeza da fruta, nas mesmas condições, e assim aumentar o seu tempo de prateleira [58].

Além do mais, a perda de massa é também um dos fatores mais determinantes na avaliação do tempo de prateleira dos frutos. Este parâmetro está relacionado com a perda de água do produto alimentício e é um efeito comum resultante de processos de corte e de descasque. Em alguns casos, a perda de água é tão relevante que o fluido cobre as peças da fruta tornando-a inaceitável para o

consumidor. A percentagem ou índice da perda de massa pode ser avaliada por pesagem direta do fluído ou calculada pela diferença entre o peso bruto e o peso de drenagem do produto, ou seja, pela diferença entre o peso inicial e o peso no instante final de armazenamento do produto [59].

Uma análise sensorial com um painel especializado e treinado pode ainda ser utilizada na determinação do tempo de prateleira de um alimento, no entanto é subjetiva a cada pessoa, nomeadamente a nível de sabor e odor. Assim, as propriedades organoléticas podem ser avaliadas conforme testes de afetividade, discriminatórios ou descritivos, nos quais se pretende averiguar a aceitação ou rejeição de um determinado produto por parte do consumidor, ao longo de vários dias, sendo a vida de prateleira definida como o tempo ao fim do qual a percentagem de rejeição se torna superior à de aceitação [53].

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 TESTES ANTIVIRAIS

5.1.1 CONDIÇÕES DE TESTAGEM ANTIVIRAL

Os ensaios antivirais foram os primeiros testes a serem realizados de forma a determinar qual o composto ativo e qual a respetiva concentração mais eficaz contra o SARS-CoV2. Com base em testes prévios realizados no âmbito do projeto COVICOAT foi decidido analisar a atividade antiviral do ácido gálico, do geraniol e do extrato de chá verde para concentrações inferiores a 25 g/L, de forma a determinar qual a concentração mínima inibitória de cada composto. Para tal, produziram-se diferentes filmes com uma matriz de base de 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose à qual se adicionaram várias concentrações de compostos ativos, como discriminado na Tabela 2, além de filmes controlo compostos apenas por 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose.

Tabela 2. Concentração dos compostos ativos nos filmes usados nos testes antivirais

Filme	AG	GER	ECV
-2	1,15625 g/L ácido gálico	1,15625 g/L geraniol	1,15625 g/L extrato de chá verde
-1	3,125 g/L ácido gálico	3,125 g/L geraniol	3,125 g/L extrato de chá verde
0	6,25 g/L ácido gálico	6,25 g/L geraniol	6,25 g/L extrato de chá verde
1	12,5 g/L ácido gálico	12,5 g/L geraniol	12,5 g/L extrato de chá verde
2	25 g/L ácido gálico	25 g/L geraniol	25 g/L extrato de chá verde

Um segundo objetivo da realização dos testes antivirais passou por determinar se haveria perda da atividade antiviral dos compostos incorporados nos filmes após um mês de armazenamento. É de salientar que as concentrações dos compostos ativos usadas nestes ensaios foram determinadas em testes anteriores como as concentrações críticas a partir das quais os compostos conseguiam inibir o coronavírus. Neste caso analisou-se o tempo de prateleira dos filmes AG1 (10 g/L alginato de sódio, 5 g/L éster de sacarose e 12,5 g/L ácido gálico), GER-1 (10 g/L alginato de sódio, 5 g/L éster de sacarose e 3,125 g/L geraniol) e ECV-1 (10 g/L alginato de sódio, 5 g/L éster de sacarose e 3,125 g/L extrato de chá verde), assim como amostras de controlo (10 g/L alginato de sódio e 5 g/L éster de sacarose).

5.1.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

A preparação das soluções passou por dissolver 10 g/L alginato de sódio e 5 g/L éster de sacarose em água destilada. Esta solução foi deixada a agitar até o alginato dissolver totalmente e, de seguida,

aquecida em banho-maria a 80 °C, durante 30 minutos, com agitação. Posteriormente, reduziu-se a temperatura até 50 °C e dividiu-se a solução em gobelés de volume menor, aos quais se adicionaram as respectivas concentrações dos compostos ativos definidos, que ficaram em agitação durante a noite.

5.1.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES

Após a preparação das soluções que ficaram em agitação durante a noite, de acordo com a seção 5.1.2, colocou-se 1 mL de cada solução numa cuvette, como as apresentadas na Figura 6, que seguiu depois para uma estufa onde permaneceu a 35 °C, durante aproximadamente 4 horas, até secar totalmente, de forma a produzir os filmes para posteriores testes.



Figura 6. Cuvetes onde o filme foi produzido.

5.1.4 INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os filmes em cuvetes após secos e formados foram enviadas para o Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa onde se realizaram testes *in vitro* para determinar a atividade antiviral (Mv) e a percentagem de redução antiviral (R) dos filmes. A atividade antiviral *in vitro* foi realizada usando um teste de viabilidade de ARN. Inocularam 1 mL de cada amostra com 10 μ L de coronavírus de rato, VR-1410. As amostras foram misturadas por inversão e incubadas à temperatura ambiente no escuro por 24 horas. Em seguida, o ARN viral foi extraído com o kit NucleoSpin Dx Virus (Macherey-Nagel) seguindo as instruções do fabricante. Realizou-se uma análise RT-qPCR das amostras a partir de um sistema de PCR em tempo real, QuanStudio 5. As reações foram feitas com o kit One-step NZYSpeedy RT-qPCR Green (NZYTech) com um perfil térmico de uma etapa de TR (síntese do ADN complementar a partir do ARN, por transcrição reversa) de 20 min a 50 °C, inicialização a quente a 95 °C por 5 min e 40 ciclos a 95 °C por 15 s e a 60°C por 30 s seguindo-se um análise da curva de fusão.

As reações continham 10 µL de mistura de reação, 0,8 µL de mistura NZYRT, 200 nM de iniciador direto e reverso e 3 µL de modelo de ARN (o volume restante, até 20 µL, foi preenchido com água estéril tratada com dietil pirocarbonato).

5.2 TESTES ANTIOXIDANTES

Na literatura, são reportados vários testes rápidos e eficientes de análise da atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, como o ensaio DPPH, ou método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e o ensaio ABTS, ou método do sequestro do radical 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico) (ABTS). O princípio destes ensaios consiste em gerar um radical sintético colorido e na habilidade de uma amostra biológica sequestrar esse radical, sendo esta reação monitorizada espectrofotometricamente através da adição de um padrão apropriado para quantificar a atividade antioxidante, geralmente o Trolox, que permite determinar a capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) [60].

5.2.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Previamente à realização dos testes antioxidantes, preparou-se as soluções com os compostos ativos a analisar, nomeadamente o ácido gálico, o geraniol e o extrato de chá verde.

Numa fase inicial, prepararam-se soluções de 10 g/L alginato de sódio e 5 g/L éster de sacarose com concentrações de composto ativo de 3,125, 6,25, 12,5 e 25 g/L que iam de encontro às concentrações analisadas nos testes antivirais. Verificou-se que, nestas soluções, os compostos ativos não ficavam totalmente dissolvidos e o alginato de sódio proporcionava uma cor branca bastante opaca que induzia em erros na leitura da absorvância. Por este motivo, realizaram-se novos testes com concentrações de compostos ativos de 0,15625 g/L e 0,7813 g/L a partir dos quais se concluiu que concentrações inferiores a 0,075 g/L permitiam uma melhor dissolução dos compostos ativos. Assim, determinou-se que seria melhor realizar os testes antioxidantes apenas com os compostos puros sem o alginato de sódio e o éster de sacarose na formulação das soluções, devido à cor branca intensa que forneciam e que dificultava a leitura da absorvância.

Para cada composto ativo e para cada ensaio, foram formuladas sete soluções com as seguintes concentrações de composto ativo puro: 0,001, 0,005, 0,01, 0,015, 0,025, 0,05 e 0,075 g/L. No ensaio DPPH o solvente utilizado na preparação das soluções foi o etanol e no ensaio ABTS usou-se água ultrapura.

5.2.2 ENSAIO DPPH

O ensaio DPPH tem por base a medição da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), reduzindo-o a hidrazina (2,2-difenil-1-picril-hidrazina). Por outras palavras, a molécula de DPPH tem a capacidade de aceitar hidrogénio de antioxidantes, o que significa que quando uma dada substância, dadora de hidrogénio, é adicionada a uma solução de DPPH, obtém-se a hidrazina e uma mudança de cor de violeta a amarelo-pálido [61]. O ensaio DPPH foi realizado conforme o método descrito por Ballesteros et al., com algumas modificações [62].

Inicialmente preparou-se uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) diluído em etanol (20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 500, 750, 1000 $\mu\text{mol/L}$), de forma a se identificar a parte linear da curva de calibração padrão e, consequentemente, os limites de absorvância e de percentagem de inibição onde as amostras terão de se enquadrar. A leitura da absorvância foi feita em triplicado para cada concentração. Numa microplaca de 96 poços colocou-se 25 μL de cada solução e 200 μL de 150 $\mu\text{mol/L}$ de solução de DPPH acertado previamente a um valor de absorvância de 0,7 (a solução de DPPH foi diluída em etanol 99 % até se obter um valor de absorvância de 0,7 a 515 nm). Na microplaca adicionou-se ainda um controlo de cor que consistiu em 25 μL de amostra e 200 μL de etanol e um branco que consistiu em 25 μL de etanol e 200 μL de DPPH diluído. Cada uma destas amostras foi lida em quintuplicado. A microplaca foi mantida no escuro, durante 30 min, e, de seguida, leu-se a absorvância num leitor espectrofotométrico de microplaca, a 515 nm. A percentagem de inibição, dada por I , de DPPH foi calculada a partir da Equação 1, onde As é a absorvância média da amostra, Ac é a absorvância média do controlo de cor, e Ab é a absorvância média do branco.

$$I / \% = \left(1 - \frac{As - Ac}{Ab} \right) \times 100 \quad (1)$$

Os dados de inibição percentual de DPPH foram convertidos em função da concentração de antioxidante de forma a se obter a concentração de composto que permite uma inibição de DPPH de 50 % (IC_{50}), ou seja, o valor que corresponde a metade da concentração inibitória máxima, que advém da equação da reta obtida nos gráficos concentração do composto vs % de inibição. Os valores de IC_{50} foram expressos como miligramas de equivalente Trolox (mg TE/mL).

5.2.3 ENSAIO ABTS

O ensaio ABTS é considerado uma das técnicas mais sensíveis para identificar a atividade antioxidante de compostos, pois a resposta dos antioxidantes envolve uma cinética de reação bastante rápida. A adição de antioxidantes ao radical ABTS segue um mecanismo de transferência de elétrons, havendo uma descoloração, de azul-esverdeado para amarelo-pálido, quando o radical ABTS é reduzido pelo antioxidante. Assim sendo, o grau de descoloração permite avaliar a percentagem de inibição do radical ABTS, que é determinado em função da concentração do antioxidante e do tempo de reação após interagir com o padrão Trolox [63].

O protocolo do ensaio ABTS foi adaptado do método desenvolvido por Roberta et al. [64]. O ABTS foi dissolvido em água ultrapura a uma concentração de 7 mM e preparou-se paralelamente uma solução de 2,47 mM de persulfato de potássio, dissolvido também em água ultrapura. Seguidamente, obteve-se uma solução designada de ABTS-PP, a partir da mistura, de proporção 1:1, da solução de ABTS preparada previamente e da solução de persulfato de potássio. A mistura foi deixada resguardada da luz em agitação durante cerca de 12 a 16 h antes de se proceder ao ensaio.

Neste teste foi também preparada uma curva de calibração a partir de uma solução do padrão Trolox (15, 30, 50, 80, 100, 200, 300, 500, 600, 650, 700 $\mu\text{mol/L}$) e de etanol de 99 % de pureza. A solução de ABTS-PP foi acertada, a partir de diluições com água ultrapura, de forma a ser obter espectrofotometricamente um valor de 0,7 de absorvância a 734 nm. Após o acerto colocou-se 10 μL de cada uma das sete soluções de diferentes concentrações de composto ativo diluídas em água ultrapura juntamente com 200 μL de solução ABTS-PP diluída, em quintuplicado. Na placa foram também colocados 5 controlos de cor (10 μL amostra e 200 μL de água ultrapura) e 5 brancos (10 μL água ultrapura e 200 μL de ABTS-PP diluído). Finalmente, deixou-se a placa repousar, no escuro, durante 6 min antes da leitura das absorvâncias que se realizou num leitor a 734 nm. Tal como no ensaio DPPH, calculou-se a inibição percentual do ABTS, a partir da Equação 1, assim como o IC_{50} , para cada composto.

5.3 TESTES ANTIBACTERIANOS

Os testes antibacterianos foram realizados segundo a ISO 22196 “Plásticos - Medição da atividade antibacteriana em superfícies de plásticos”, com algumas modificações [65]. Os testes antivirais previamente realizados determinaram que o composto ativo com melhor capacidade antiviral foi o ácido gálico e que a respetiva concentração mínima que permite eliminar o SARS-CoV2 foi de 12,5 g/L. Neste

sentido, decidiu-se proceder aos testes antibacterianos *in vitro* analisando filmes compostos por 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e 12,5 g/L de ácido gálico. Ademais, as bactérias em estudo escolhidas foram a *E. coli* e a *S. aureus* devido ao grande impacto que têm na indústria alimentar, como discutido anteriormente.

5.3.1 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Um meio de cultura (Figura 7) é uma preparação química que tem na sua composição nutrientes e outras substâncias necessárias ao crescimento e proliferação de microrganismos inoculados num meio artificial.



Figura 7. Meios de cultura preparados.

5.3.1.1 MEIO DE SUSPENSÃO – 1/500 DO CALDO DE NUTRIENTES

O meio de suspensão (1/500 caldo de nutrientes) foi preparado diretamente a partir de uma diluição de 1:500 do caldo de nutrientes existente no laboratório. A solução foi armazenada num frigorífico a 4 °C até ser utilizada.

5.3.1.2 AGAR DE CONTAGEM EM PLACAS

Dissolveu-se 2,5 g de extrato de levedura, 5,0 g de triptona, 1,0 g de glicose e 15,0 g de agar em pó em 1000 mL de água destilada. Assim que a solução se encontrava dissolvida, ajustou-se o pH para um valor entre 7,0 e 7,2 (a 25 °C) com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Esterilizou-se em autoclave a 121 °C e depois guardou-se a solução numa estufa a 60 °C.

5.3.1.3 CALDO DE DIGESTÃO DE CASEÍNA DE SOJA COM LECITINA E MONOOLEATO DE POLIOXIETILENO SORBITANO (CALDO SCDLP)

Dissolveu-se 30 g de caldo de soja triptico em pó (composto por 17,0 g de peptona de caseína, 3,0 g de peptona de soja, 5,0 g de cloreto sódio, 2,5 g de hidrogenofosfato dissódico e 2,5 g de glicose) e

1,0 g de lecitina em 1000 mL de água destilada. Misturou-se bem e de seguida adicionou-se 7,0 g de tensoativo não iónico, nomeadamente Tween 80. Por fim, ajustou-se o pH para um valor entre 6,8 e 7,2 (a 25 °C) com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico e esterilizou-se em autoclave a 121 °C. O meio SCDLP foi depois armazenado no frigorífico a 4 °C.

5.3.1.4 *SOLUÇÃO TAMPÃO DE FOSFATO*

A solução tampão de fosfato preparou-se colocando 34,0 g de dihidrogenofosfato de potássio num balão volumétrico de 1000 mL, no qual se adicionou 500 mL de água destilada e se misturou para dissolver. Ajustou-se o pH para um valor entre 6,8 e 7,2 (a 25 °C) com hidróxido de sódio e de seguida adicionou-se água destilada para perfazer os 1000 mL do balão volumétrico. Finalmente, esterilizou-se a solução em autoclave a 121 °C e guardou-se num frigorífico a 4 °C até utilização.

5.3.1.5 *SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA TAMPONADA COM FOSFATO*

Inicialmente preparou-se uma solução de soro fisiológico dissolvendo 8,5 g de cloreto de sódio em 1000 mL de água destilada e depois diluiu-se a solução tampão de fosfato preparada em 5.3.1.4 com esse soro fisiológico para um volume de 800 vezes. Esterilizou-se a solução salina fisiológica tamponada com fosfato em autoclave a 121°C que ficou posteriormente armazenada a 4 °C.

5.3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras, ou filmes, foram preparadas da mesma forma como descrito no método 5.1.3. Para cada ensaio prepararam-se 9 filmes: 3 amostras tratadas AG1 (10 g/L alginato de sódio, 5 g/L éster de sacarose e 12,5 g/L ácido gálico) e 6 amostras controlo não tratadas (10 g/L alginato de sódio e 5 g/L éster de sacarose).

5.3.3 PRÉ-CULTURA DE BACTÉRIAS

Usando uma alça de inoculação estéril, transferiu-se as bactérias da cultura stock para 4 mL de caldo de nutrientes e incubou-se a 37 °C durante 16 h a 24 h.

5.3.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO DE TESTE

Diluiu-se, na proporção de 1:2, a pré-cultura preparada com o caldo de nutrientes e procedeu-se à leitura da absorvância, a 600 nm, de forma a determinar a concentração da pré-cultura. De seguida,

sabendo que 1 unidade de absorvância corresponde a 8×10^8 células/ mL, a 600 nm, tanto para a *E. coli* como para a *S. aureus*, diluiu-se a pré-cultura com o meio de suspensão (1/500 do caldo de nutrientes) preparado de acordo com 5.3.1.1. para se obter uma concentração bacteriana entre $2,50 \times 10^5$ células/ mL e 10×10^5 células/ mL, com uma concentração alvo de 6×10^5 células/ mL. Após diluição obteve-se o inóculo de teste.

5.3.5 INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS

Com uma pipeta estéril transferiu-se 400 µL do inóculo de teste para cada uma das cuvetes com as amostras e agitou-se para espalhar. Três amostras de controlo não tratadas (denominadas de C4, C5 e C6) e três amostras AG1 tratadas (denominadas AG1,1, AG1,2 e AG1,3) foram colocadas imediatamente a incubar a 37 °C com uma humidade relativa superior a 90 % durante 24 h e as restantes três amostras de controlo não tratadas (denominadas de C1, C2 e C3) seguiram imediatamente para testes de recuperação de bactérias.

5.3.5.1 AMOSTRAS DE TESTE IMEDIATAMENTE APÓS A INOCULAÇÃO

Imediatamente após a inoculação, adicionou-se 10 mL do caldo SCDLP nas amostras de controlo não tratadas C1, C2 e C3 para as lavar e recolheu-se o caldo SCDLP recuperado. Tendo em conta a concentração inicial bacteriana do inóculo de teste determinada em 5.3.4. procedeu-se a diluições seriadas, cada uma na proporção 1:10, do caldo SCDLP recuperado, com o meio de solução salina fisiológica tamponada com fosfato, de forma a se obter uma solução com uma concentração de aproximadamente 30 células/ mL.

De seguida, em placas petri estéreis, colocou-se 1 mL de cada diluição realizada e 15 mL do meio de agar, agitando-se gentilmente para o espalhar. Este processo foi feito em duplicado para cada diluição.

Por último, inverteu-se e colocou-se as placas a incubar a 37 °C durante 40 a 48 h.

5.3.5.2 AMOSTRAS DE TESTE APÓS INCUBAÇÃO

Após a incubação das amostras tratadas AG1 (AG1,1, AG1,2 e AG1,3) e das amostras não tratadas de controlo (C4, C5 e C6) em 5.3.5, processou-se os corpos de prova restantes de acordo com 5.3.5.1.

5.3.6 CONTAGEM DAS BACTÉRIAS VIÁVEIS

Assim que terminado o período de incubação das amostras procedeu-se à determinação das bactérias viáveis presentes em cada uma das placas de petri que consistiu numa contagem direta das colónias visíveis a olho nu.

5.3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.3.7.1 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS VIÁVEIS

Para cada amostra, determinou-se o número de bactérias viáveis recuperadas, dado por células/cm², de acordo com a Equação 2:

$$N = (100 \times C \times D \times V)/A \quad (2)$$

Onde,

N é o número de bactérias viáveis recuperadas por cm² para cada amostra;

C é contagem média das placas para as placas duplicadas;

D é o fator de diluição das placas contadas;

V é o volume de meio SCDLP, em mL, adicionado a cada amostra:

A é a área superficial, em mm², da cuvette onde o revestimento foi produzido.

5.3.7.2 CONDIÇÕES DE VALIDAÇÃO DO TESTE

Para o teste ser considerado válido as seguintes condições devem ser satisfeitas:

1. O valor logarítmico do número de bactérias viáveis recuperadas imediatamente após inoculação das amostras de teste não tratadas deve satisfazer o seguinte requisito:

$$(L_{m\acute{a}x} - L_{m\acute{i}n})/(L_{m\acute{e}dio}) \leq 0,2 \quad (3)$$

Onde,

$L_{m\acute{a}x}$ é o logaritmo comum (de base 10) do número máximo de bactérias viáveis encontradas numa amostra;

$L_{m\acute{i}n}$ é o logaritmo comum mínimo de bactérias viáveis encontradas numa amostra;

$L_{m\acute{e}dio}$ é o logaritmo comum do número médio de bactérias viáveis encontradas nas amostras.

2. O número médio de bactérias viáveis recuperadas imediatamente após a inoculação das amostras de teste não tratadas (C_1 , C_2 e C_3) deve-se encontrar dentro do intervalo $6,2 \times 10^3/\text{cm}^2$ a $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$;

3. O número de bactérias viáveis recuperadas das amostras de testes não tratadas após 24 h de incubação (C4, C5 e C6) não deve ser inferior a $6,2 \times 10^1/\text{cm}^2$.

Se estas três condições se reverificaram, o teste é considerado válido, caso contrário, se não foram satisfeitas o ensaio não é considerado válido e as amostras devem ser testadas de novo.

5.3.7.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Caso as condições de validação de teste se verifiquem, calcula-se a atividade antibacteriana, também denominada de recuperação antibacteriana (Aa), a partir da Equação 4:

$$Aa = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (4)$$

Onde,

Aa é a atividade antibacteriana

U_0 é a média do logaritmo comum do número de bactérias viáveis, em células/ cm^2 , recuperadas das amostras de teste não tratadas imediatamente após inoculação (C1, C2 e C3);

U_t é a média do logaritmo comum do número de bactérias viáveis, em células/ cm^2 , recuperadas das amostras de teste não tratadas após 24 h de incubação (C4, C5 e C6);

A_t é a média do logaritmo comum do número de bactérias viáveis, em células/ cm^2 , recuperadas das amostras de teste tratadas após 24 h de incubação (AG1, AG2 e AG3).

5.4 TESTES DE AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRATELEIRA

5.4.1 CONDIÇÕES DE TESTAGEM

Tal como enunciado no capítulo 4, os parâmetros indicadores do tempo de prateleira avaliados durante o período de monitorização foram a perda de peso, a firmeza, a acidez titulável, o pH, o conteúdo de sólidos solúveis, e as alterações na aparência da peça de fruta, por meio de uma análise sensorial. Os pontos de testagem da qualidade das frutas corresponderam aos dias 0, 3, 13, 20, 31 e 45, a partir do dia de aplicação dos revestimentos nas peras.

Na avaliação do tempo de prateleira das peras decidiu-se averiguar o efeito que 12,5 g/L de ácido gálico tem no prolongamento do seu tempo de vida. Assim, as amostras em estudo foram:

- Peras com revestimento ativo cujo revestimento é formado a partir de uma solução composta por 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e 12,5 g/L de ácido gálico;

- Peras com revestimento normal, cujo revestimento é formado a partir de uma solução composta por 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose;
- Peras sem revestimento, onde não foi aplicada qualquer solução.

A escolha do ácido gálico como composto ativo e da respetiva concentração derivaram não só dos resultados obtidos nos testes antivirais, a partir dos quais se concluiu que 12,5 g/L de ácido gálico era a concentração crítica ótima em termos de atividade inibitória antiviral, como também devido ao facto de este composto não apresentar um odor intenso como os restantes. Tendo em conta a necessidade de usar amostras em triplicado em cada teste, os 6 pontos de testagem estabelecidos e o carácter destrutivo de alguns testes de qualidade, a quantidade de frutas necessária para a avaliação do tempo de prateleira fez um total de 63 peras.

As frutas foram obtidas no dia do tratamento a partir de um supermercado local e tentaram-se seguir critérios de seleção que consistiam em tamanho homogéneo, ausência de danos na pele, ausência visível de microrganismos, maturidade fisiológica e cor intensa. Às peras não foi realizado nenhum tratamento preliminar antes de se proceder aos testes de tempo de prateleira, pois partiu-se do princípio de que este já teria sido feito.

5.4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

A preparação das soluções a aplicar nas peras seguiu o método descrito em 5.1.2, tendo sido preparadas as seguintes duas formulações:

- Solução de 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e 12,5 g/L de ácido gálico;
- Solução de 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose .

5.4.3 APLICAÇÃO DAS SOLUÇÕES NAS PERAS

Após preparação das soluções procedeu-se à sua aplicação direta nas frutas através da técnica de imersão (Figura 8) [66]. Esta metodologia consistiu em submergir o produto alimentício numa solução que contém o revestimento, com posterior secagem, e engloba três fases [67]:

- Imersão e permanência, em que o alimento é imerso na solução precursora seguida de permanência durante 30 s, de forma a garantir que a interação do produto com a solução de revestimento é suficiente para completar o processo de molha em todo o alimento;
- Deposição da fruta revestida, numa superfície plana, à temperatura ambiente, sendo o excesso de líquido removido por gravidade;

- Evaporação, na qual o excesso de solvente evapora do fluido formando-se um revestimento fino.

O processo de imersão é vantajoso quando os produtos requerem um revestimento total e uniforme. Contudo, podem ocorrer problemas incluindo a perda de atividade do composto ativo [67]. Aquando da aplicação do revestimento com composto ativo observou-se que o ácido gálico não dissolveu completamente, por se tratar de uma concentração ligeiramente elevada, pelo que ficaram depositados alguns resíduos na superfície da fruta. Ainda assim, estes resíduos não afetam a qualidade da peça nem a eficácia do composto ativo.

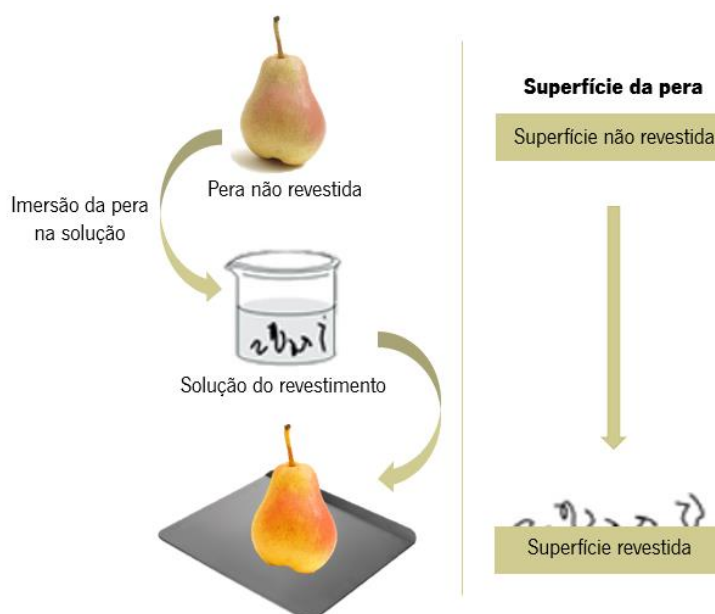


Figura 8. Representação esquemática da aplicação das soluções de revestimento nas peras por imersão.

5.4.4 PERDA DE MASSA

A evolução da perda de massa das peras consistiu em pesar individualmente cada amostra no dia de aplicação dos revestimentos (dia 0) e nos dias 3, 13, 20, 31 e 45 de armazenamento, usando uma balança analítica com a precisão de $\pm 0,0001$ g. Foram analisadas 3 réplicas para cada amostra [59]. A percentagem ou índice de perda de massa foi calculada conforme descrito na Equação 5 [68]:

$$W / \% = \frac{m_i - m_t}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

Onde,

m_i é a massa inicial da pera no instante $t = 0$

m_t é a massa da pera no instante t , com $t = 3, 13, 20, 31, 45$

5.4.5 FIRMEZA

O teste da firmeza foi efetuado usando um texturômetro (Shimadzu Universal Testing Machine) (Figura 9) e com o auxílio do *software* Trapezium, onde foi feita a perfuração das peras, com recurso a uma sonda pistão de 5 mm de diâmetro, até se alcançar 10 mm de profundidade, a uma velocidade de 0,5 mm/s e com uma força de tensão de 500 N. As condições utilizadas estão resumidas na Tabela 3. A perfuração realizou-se 3 vezes em cada peça de fruta, havendo 3 réplicas por cada grupo de amostras de peras com diferentes tipos de tratamentos aplicados (3 peras com revestimento ativo, 3 peras com revestimento normal e 3 peras sem revestimento) [22]. Destes ensaios obtiveram-se resultados relativos à força de compressão máxima exercida no momento de penetração - parâmetro indicador da firmeza da pera.

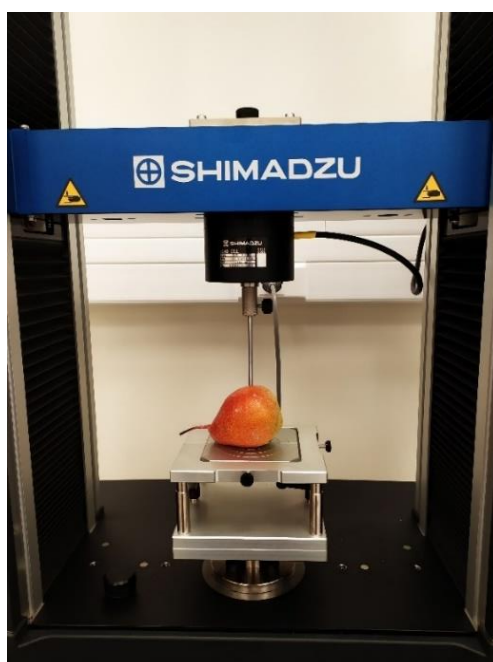


Figura 9. Teste de perfuração no texturômetro.

Tabela 3. Parâmetros para o teste de perfuração das peras

Parâmetro	Valor	Unidade
Tipo de teste	Compressão	
Direção da força	Para baixo	
Força de tensão	500	N
Velocidade do testeg	0,5	mm/ s
Distância	10	Mm

5.4.6 pH

Para a medição do pH das frutas foi necessário homogeneizar previamente as mesmas, de onde resultaram 9 polpas (3 de peras com revestimento ativo, 3 de peras com revestimento normal e 3 de peras sem revestimento), em cada dia de testagem. Para tal, procedeu-se ao corte da fruta em pedaços pequenos, removendo as sementes e o pedúnculo, seguindo-se uma trituração e homogeneização com o auxílio de uma máquina de cozinha e de uma varinha mágica [69].

Após a obtenção das polpas, diluiu-se 10 g de cada polpa em 100 mL de água destilada e leu-se o pH com recurso a um medidor de pH (Mettler Toledo SevenCompact) (Figura 10), de acordo com o método específico para o processamento de frutos (AOAC 981.12). [70]



Figura 10. Medidor de pH.

5.4.7 CONTEÚDO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS

A determinação do conteúdo de sólidos solúveis foi feita igualmente a partir das polpas resultantes. Colocou-se 5 g de cada polpa em balões volumétricos de 50 mL perfazendo-se o volume com água destilada. Os 9 balões volumétricos foram deixados a repousar durante 30 min procedendo-se, de seguida, a duas filtrações: uma primária utilizando um peneiro para remover os resíduos sólidos presentes na polpa e uma secundária a partir de um sistema de vácuo (Figura 11), de maneira a se obter apenas o líquido sobrenadante [69]. Nesta última utilizou-se papel de filtro Whatman Grade 1 com um tamanho de poro de 11 μm .



Figura 11. Filtração a vácuo das polpas de pera.

Uma vez filtradas as polpas, utilizou-se um refratômetro (HI 96801 - Hanna Instruments) (Figura 12) para medir o conteúdo de sólidos solúveis, mais especificamente o conteúdo em açúcar, nas soluções resultantes. O aparelho mede o índice de refração e fornece um valor expresso em °Brix que corresponde a g açúcar/100 g solução [69].



Figura 12. Refratômetro.

5.4.8 ACIDEZ TITULÁVEL

Finalmente, para determinar a acidez titulável (TA) de cada peça de fruta, que se obtém de acordo com a Equação 6, foi necessário quantificar o volume de hidróxido de sódio necessário para alcançar o ponto de viragem da solução [69].

$$TA = V_{\text{NaOH}} \times 0,1 \times 0,06705 \times \frac{V_0}{V_f} \times M_{\text{NaOH}} \quad (6)$$

Onde,

V_{NaOH} é o volume de NaOH gasto na titulação (em mL)

M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH (0,01 mol/L)

V_0 é o volume do balão volumétrico (50 mL)

V_f é o volume do filtrado (20 mL)

0,06705 é o fator do ácido predominante no fruto, neste caso o ácido málico [71]

Para tal, utilizou-se o método AOAC 942.15 ("Official Methods of Analysis," 2005). Dissolveu-se 5 g de cada homogenato (polpa da fruta) em 50 mL de água destilada. Esta mistura foi deixada a repousar durante 30 min e foi de seguida filtrada, tal como na quantificação do conteúdo de sólidos solúveis. O sobrenadante obtido, cerca de 20 mL das soluções filtradas, foi titulado com uma solução de 0,01 mol/L de hidróxido de sódio, utilizando o indicador fenolftaleína [72].

5.4.9 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi realizada por um painel de provadores não treinados composto por 13 trabalhadores, de ambos os géneros e com idades compreendidas entre os 20 e 40 anos, do grupo Food Processing and Nutrition do INL (Figura 13). Nesta análise, avaliou-se o aroma, a cor, a textura/firmeza, a homogeneidade (aparência) e a apreciação pessoal pelas peças de fruta no último dia de armazenamento. Foi utilizada uma escala de 1 a 5 onde o valor 1 correspondia à ausência ou depreciação do parâmetro em questão e a não aceitação dessa fruta e o valor 5 correspondia ao oposto, considerando-se a fruta excelente. No Anexo II, encontra-se uma cópia da ficha de diagnóstico usada na análise sensorial.



Figura 13. Paineis não treinados a realizar a análise sensorial.

5.4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos dos testes de tempo de prateleira foram submetidos a uma análise estatística tendo sido avaliados pelo teste ANOVA e pelo teste Turkey HSD com significância $P \leq 0,05$, recorrendo ao programa estatístico online “Astatsa”, de forma a averiguar se existem diferenças estatísticas para cada formulação do revestimento e ao longo do tempo de armazenamento.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DOS TESTES ANTIVIRAIS

6.1.1 ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ALGINATO DE SÓDIO E DO ÉSTER DE SACAROSE

Inicialmente, pretendeu-se averiguar a atividade antiviral (Mv) das amostras de controlo compostas por 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose. Para tal, analisaram-se filmes compostos por 10 g/L de alginato de sódio e filmes compostos por 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose, de forma a tentar determinar a atividade antiviral de cada composto. Na Tabela 4 estão representados os resultados do valor de atividade antiviral e da redução percentual dos filmes produzidos.

Tabela 4. Atividade antiviral do alginato de sódio e do éster de sacarose

Filme	$Mv \pm \sigma$	$R / \% \pm \sigma$
Alginato de sódio 10 g/L	$0,68 \pm 0,31$	$73,73 \pm 14,98$
Alginato de sódio 10 g/L e éster de sacarose 5 g/L	$2,81 \pm 0,32$	$99,80 \pm 0,15$

A partir dos resultados obtidos, observou-se que o alginato de sódio a 10 g/L tem um valor de atividade antiviral (Mv) contra o coronavírus de $0,68 \pm 0,31$, o que se traduz numa redução antiviral (R) de $(73,73 \pm 14,98) \%$. Segundo a ISO 18184, se o valor de atividade antiviral (Mv) de um composto estiver entre valores de 2 e 3 significa que tem um bom efeito inibitório e se for superior ou igual a 3 tem um efeito inibitório excelente [73], por isso conclui-se que o alginato de sódio não apresenta boa atividade antiviral contra o coronavírus.

Por sua vez, o filme com éster de sacarose apresentou uma boa atividade antiviral visto que o Mv é superior a 2, com uma redução/eficácia de quase 100 %. Assim, as amostras de controlo sem composto ativo são eficazes contra a COVID-19 devido essencialmente ao éster de sacarose.

6.1.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÁCIDO GÁLICO – RESULTADOS DE RESPOSTA À DOSE

O efeito antiviral do ácido gálico foi analisado em filmes compostos por 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e várias concentrações de ácido gálico, desde 1,563 até 25 g/L, de forma a avaliar a resposta à dose. Os resultados de resposta à dose de ácido gálico estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados de resposta à dose de filmes com ácido gálico

Filme	Concentração de ácido gálico (g/L)	$Mv \pm \sigma$	$R / \% \pm \sigma$
AG-2	1,563	$1,79 \pm 0,02$	$98,38 \pm 0,07$
AG-1	3,125	$2,41 \pm 0,19$	$99,57 \pm 0,20$
AG0	6,25	$2,83 \pm 0,40$	$99,78 \pm 0,20$
AG1	12,5	$> 3,29$	$> 99,95$
AG2	25	$> 3,29$	$> 99,95$

Pelos resultados, verificou-se que o ácido gálico adicionou efeito antiviral ao éster de sacarose em concentrações a partir de 12,5 g/L, em que o Mv foi superior a 3, tendo em conta que a atividade antiviral do filme com 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose e a redução antiviral são de $2,81 \pm 0,32$ e $(99,80 \pm 0,15) \%$, respetivamente, como apresentado na Tabela 4. Assim, a concentração crítica do ácido gálico, a partir da qual existe atividade inibitória, é 12,5 g/L com um valor de atividade superior a 3,29 e uma redução antiviral superior a 99,95 %. Além do mais, obteve-se um menor valor de atividade antiviral para AG-2 e AG-1, em comparação com o filme com éster de sacarose sem a presença de ácido gálico.

Estes resultados vão ao encontro aos obtidos num ensaio de docking molecular, realizado por Umar et al. onde se analisou a ação de dezasseis derivados do ácido gálico contra as cinco proteínas-chave do SARS-CoV2 (nsp3 (protease semelhante à papaína), nsp5 (protease principal), nsp12 (ARN polimerase dependente de ARN), nsp13 (helicase) e nsp14 (endoribonuclease específica de uridilato nidoviral) [74]. Este estudo revelou o potencial do ácido gálico como possível opção de tratamento contra o coronavírus, nomeadamente de três inibidores promissores das proteínas não estruturais SARS-CoV2 selecionadas, de entre os dezasseis derivados: 4-*O*-(6-galoilglucosídeo), 3-*O*-(6-galoilglucosídeo), e galato de epicatequina.

Além do mais, como título informativo, vários trabalhos experimentais têm vindo a demonstrar que o ácido gálico possui um bom espectro antiviral contra vários vírus. Como exemplo, surge o estudo de Salas et al. onde provaram que o ácido gálico é eficaz contra o vírus da Hepatite C, por meio da sua capacidade antioxidante. O composto diminui a taxa de produção de proteínas virais levando à diminuição do stress oxidativo celular, o que é desfavorável ao vírus [75]. Ainda como exemplo, Kratz et al. comprovaram que o ácido gálico tem atividade antiviral contra o vírus do Herpes Simples a partir da inibição da ligação e penetração do vírus nas células, impedindo a propagação da infeção de célula para célula [76].

6.1.3 ATIVIDADE ANTIVIRAL DO GERANIOL – RESULTADOS DE RESPOSTA À DOSE

Tal como para o ácido gálico, analisou-se o efeito de várias concentrações de geraniol (de 1,563 g/L a 25 g/L) em filmes compostos por 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose. Os resultados de resposta à dose de geraniol estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados de resposta à dose de filmes com geraniol

Filme	Concentração de geraniol (g/L)	$Mv \pm \sigma$	$R / \% \pm \sigma$
GER-2	1,563	$3,13 \pm 0,22$	$99,92 \pm 0,05$
GER-1	3,125	$> 3,45$	$>99,96$
GER0	6,25	$> 3,45$	$>99,96$
GER1	12,5	$> 3,45$	$>99,96$
GER2	25	$> 3,41$	$> 99,96$

O geraniol adicionou efeito antiviral ao éster de sacarose em concentrações a partir de 3,125 g/L em que o Mv foi superior a 3. O filme GER-2 não foi tido em conta devido ao desvio padrão associado. Por sua vez, o valor da atividade antiviral de GER2 foi ligeiramente inferior quando comparado com as restantes concentrações. A concentração crítica do geraniol foi então de 3,125 g/L com uma atividade antiviral superior a 3,45 e uma redução antiviral/eficácia superior a 99,96 %.

Era de esperar que o geraniol tivesse atividade antiviral contra o coronavírus, tendo em conta um estudo desenvolvido por Kumar et al. [77]. Neste, descobriu-se que, em células epiteliais, 50 $\mu\text{mol/L}$ de geraniol (que corresponde a 0,00077 %), um dos principais compostos do óleo de gerânio, foi capaz de reduzir os níveis da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), uma proteína transmembranar recetora do vírus SARS-CoV2, de 18,0 ng/mL (controlo) para 10,44 ng/mL. Desta forma, os resultados sugerem que o geraniol é um valioso agente antiviral natural que pode contribuir para a prevenção da invasão do coronavírus no corpo humano.

Adicionalmente, é de mencionar as propriedades antivirais do geraniol previamente investigadas. Hassan et al. indicaram que o geraniol apresenta propriedades inibitórias pronunciadas contra a replicação do vírus de Herpes Simples, estabelecendo uma ligação com a protease do vírus e inibindo-a. Consequentemente, o geraniol ao se ligar à enzima está a competir com o substrato e, portanto, atua como um inibidor competitivo [78]. Atualmente, sobre a atividade antiviral do geraniol a literatura

científica ainda carece de dados publicados sobre o assunto, tendo um estudo revelado que geraniol não apresentou efeito antiviral contra o vírus Influenza A, bem como contra o vírus Sincicial Respiratório [79].

6.1.4 ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO DE CHÁ VERDE – RESULTADOS DE RESPOSTA À DOSE

A resposta à dose relativamente ao extrato de chá verde foi também avaliada em filmes com 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados de resposta à dose de filmes com extrato de chá verde

Filme	Concentração de extrato de chá verde (g/L)	$Mv \pm \sigma$	$R / \% \pm \sigma$
ECV-2	1,563	$3,03 \pm 0,36$	$99,86 \pm 0,12$
ECV-1	3,125	$> 3,34$	$>99,95$
ECV0	6,25	$> 3,34$	$>99,95$
ECV1	12,5	$> 3,34$	$>99,95$
ECV2	25	$> 3,41$	$> 99,96$

Neste caso, observou-se que o extrato de chá verde adiciona efeito antiviral ao éster de sacarose em concentrações a partir de 3,125 g/L ($Mv > 3$). Novamente, o filme ECV-2 não foi tido em conta devido ao desvio padrão associado. Tal como se verificou com o geraniol, a concentração crítica do extrato de chá verde é de 3,125 g/L e o valor de atividade antiviral e a redução percentual são superiores a 3,34 e 99,95 %, respetivamente. Neste caso, verificou-se uma redução ligeiramente superior na amostra ECV2 pelo que o seu valor de atividade antiviral é superior ao das concentrações inferiores.

O mecanismo de ação do extrato de chá verde contra o SARS-CoV2 poderá ser explicado de acordo com um estudo recente realizado por Liu et al. [80]. Neste, provou-se que EGCG (galato de epigallocatequina), uma catequina presente no extrato de chá verde, pode inibir a protease 3CL do SARS-CoV2, uma enzima importante para a infeção e replicação do coronavírus no hospedeiro, e que o EGCG bloqueia a ligação viral das células hospedeiras de SARS-CoV2 ao recetor ACE2, atuando assim como um composto antiviral ao coronavírus.

A eficácia do extrato de chá verde, mais especificamente do EGCG, tem sido muito reportada por vários autores. Xu et al. provaram que o EGCG reduz não só a expressão de antígenos específicos do vírus da Hepatite B, como também os níveis de ADN extracelular, os intermediários replicativos intracelulares e o ADN circular covalentemente fechado viral (cccDNA) [49]. Similarmente, Ciesek et al.,

demonstraram a eficácia antiviral do EGCG contra o vírus da Hepatite C, inibindo a entrada de todos os genótipos do vírus nas linhas de células de hepatoma e hepatócitos humanos primários, evitando que se ligue às células alvo [50]. Além disso, semelhante ao efeito de EGCG no vírus da Hepatite C, Isaacs et al., demonstraram que este composto é eficaz contra o vírus do Herpes Simples, impedindo diretamente a ligação da partícula viral extracelular aos recetores da célula alvo [81].

6.1.5 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE PRATELEIRA DOS REVESTIMENTOS COM CONCENTRAÇÕES CRÍTICAS

Tal como enunciado no subcapítulo 5.1, um dos objetivos dos testes antivirais era avaliar se haveria perda de atividade antiviral dos compostos após um mês de armazenamento. Desenvolveram-se filmes com 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e com os compostos ativos nas concentrações críticas que foram determinadas anteriormente.

No caso do ácido gálico a concentração crítica foi de 12,5 g/L, correspondente ao filme AG1. A atividade antiviral deste filme ao longo de um mês de armazenamento (Tabela 8) começou a diminuir continuamente a partir da semana 2 ($Mv < 3$, considerando o desvio padrão), pelo que se constatou que o composto é bastante sensível e que a sua eficácia não é prolongada, o que se traduz numa limitação na utilização deste composto em filmes comestíveis, sempre que os alimentos tenham períodos de conservação alargados.

Tabela 8. Atividade antiviral do filme com ácido gálico (12,5 g/L) ao longo de um mês de armazenamento

Período	$Mv \pm \sigma$	$R / \% \pm \sigma$
Semana 0	> 3,29	> 99,95
Semana 2	3,16 $\pm$ 0,32	99,91 $\pm$ 0,05
Semana 3	2,88 $\pm$ 0,20	99,85 $\pm$ 0,06
Semana 4	2,62 $\pm$ 0,25	99,72 $\pm$ 0,15

Além do mais, observou-se mudanças no fenótipo do filme AG1 com o aparecimento de alguma cristalização durante os experimentos de vida de prateleira, como visível na Figura 14.



Figura 14. Filme AG1.

Relativamente ao geraniol, a concentração crítica determinada foi 3,125 g/L correspondente ao filme GER-1. A evolução da atividade antiviral deste composto ao longo de um mês está discriminada na Tabela 9, onde é possível constatar que, tal como acontece com o filme AG1, após duas semanas de armazenamento a atividade antiviral começa a diminuir até valores inferiores a 3 ($Mv < 3$), tendo em conta o desvio padrão, ainda que menos acentuado quando comparado com o filme AG1. Neste filme GER-1, não se verificou qualquer mudança na aparência do filme (Figura 15).

Tabela 9. Atividade antiviral do filme com geraniol (3,125 g/L) ao longo de um mês de armazenamento

Período	$Mv \pm \sigma$	$R / \% \pm \sigma$
Semana 0	> 3,45	> 99,96
Semana 2	3,32 $\pm$ 0,37	99,93 $\pm$ 0,06
Semana 3	3,35 $\pm$ 0,37	99,93 $\pm$ 0,06
Semana 4	3,08 $\pm$ 0,45	99,85 $\pm$ 0,15



Figura 15. Filme GER-1.

Finalmente, para o extrato de chá verde também se usou a concentração crítica de 3,125 g/L, correspondente ao filme ECV-1. Ao analisar a evolução da atividade antiviral deste composto ao longo de um mês de armazenamento (Tabela 9), observa-se que, ao contrário dos outros filmes, a atividade antiviral de ECV-1 começa apenas a diminuir na semana 4 ($Mv < 3$). Isto significa que o filme composto com 3,125 g/L de extrato de chá verde é o que proporciona um tempo de prateleira maior, verificando-se atividade do vírus apenas na semana 4. Contudo, verificou-se a ocorrência de alterações da cor da superfície do filme (para rosa-claro) (Figura 16).

Tabela 10. Atividade antiviral do filme com extrato de chá verde (3,125 g/L) ao longo de um mês de armazenamento

Período	$Mv \pm \sigma$	$R / \% \pm \sigma$
Semana 0	$> 3,34$	$> 99,95$
Semana 2	$> 3,58$	$> 99,97$
Semana 3	$> 3,61$	$> 99,98$
Semana 4	$2,88 \pm 0,44$	$99,79 \pm 0,19$



Figura 16. Filme ECV-1.

6.2 ANÁLISE DOS TESTES ANTIOXIDANTES

Os testes antioxidantes foram realizados com o objetivo de averiguar se os compostos ativos (ácido gálico, geraniol e extrato de chá verde) são substâncias eliminadoras de radicais livres ou se têm um mecanismo de atividade antioxidante primária. Tal como mencionado anteriormente, para cada composto ativo e para cada ensaio, foram formuladas 7 soluções com as seguintes concentrações de

composto ativo puro: 0,001, 0,005, 0,01, 0,015, 0,025, 0,05 e 0,075 g/L, sendo que no ensaio DPPH o solvente utilizado foi o etanol e no ensaio ABTS foi usada água ultrapura.

A determinação da atividade antioxidante dos vários compostos teve como base a elaboração de uma curva de calibração, a partir do padrão Trolox, para ambos os ensaios DPPH e ABTS, conforme pode ser visto nas Figuras 17 e 18, respectivamente, sendo que c_T corresponde à concentração de Trolox em $\mu\text{mol/L}$ e I_{DPPH} e I_{ABTS} correspondem às inibições percentuais de DPPH e ABTS.

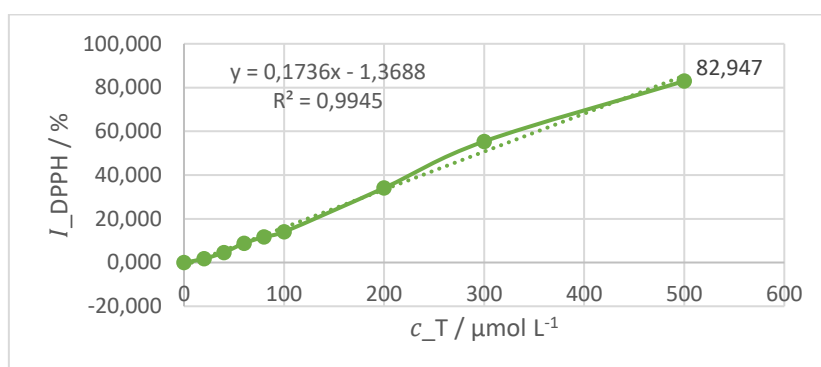


Figura 17. Curva de calibração Trolox, usada nos ensaios DPPH.

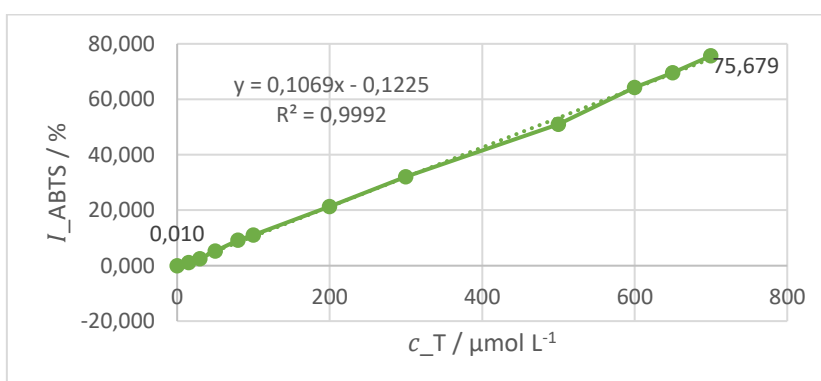


Figura 18. Curva de calibração Trolox, usada nos ensaios ABTS.

A atividade antioxidante dos compostos ativos pela sua habilidade sequestradora de radicais livres de DPPH e de ABTS foi obtida a partir da correlação entre as concentrações dos compostos ativos (x) e a % de inibição do DPPH ou do ABTS (y), recorrendo a uma análise linear (para o ácido gálico e para o extrato de chá verde) e a uma análise polinomial de grau dois (para o geraniol). Foram apenas tidos em conta os valores de inibição percentual que se encontravam dentro dos intervalos obtidos nas curvas de calibração Trolox para cada um dos ensaios. Os gráficos resultantes da inibição percentual dos radicais

em função da concentração dos compostos ativos estão apresentados nas Figuras A 4 a A 10 do Anexo I.

Acredita-se que o potencial de eliminação de radicais livres de um antioxidante seja resultado da sua capacidade de doar hidrogênio. Por outras palavras, a atividade sequestrante do radical livre mede a capacidade da amostra de doar hidrogênio a esse radical, resultando no branqueamento do radical livre DPPH estável, da cor roxa do catião DPPH para a difenilpicri-hidrazina de cor amarelo-pálido e do radical ABTS estável da cor azul-esverdeada para a cor amarelo-pálido. Uma maior atividade antioxidante reflete-se num menor IC_{50} , que corresponde à concentração necessária para apenas 50 % de inibição [82]. Na Tabela 11, que se segue, encontram-se os valores de IC_{50} obtidos para cada composto ativo em cada ensaio, assim como os valores de inibição percentual máxima ($I_{máx}$).

Tabela 11. Valores de IC_{50} e de valor máximo de inibição percentual ($I_{máx}$), para cada composto ativo em cada ensaio

	Ensaio	Ácido Gálico	Geraniol	Extrato de chá verde
$IC_{50} / g L^{-1}$	DPPH	0,0147	-	0,0212
	ABTS	0,0161	-	0,0349
$I_{máx} / \%$	DPPH	82,234	-	56,669
	ABTS	68,988	6	62,315

Para ambos os ensaios DPPH e ABTS, constatou-se que o efeito antioxidante do ácido gálico e do extrato de chá verde aumenta exponencialmente em função da concentração de composto ativo, o que indica que com o aumento da concentração o poder redutor também aumenta.

É de salientar que, no caso do ácido gálico, se obteve uma concentração máxima antioxidante, a partir da qual a sua capacidade começa a diminuir, de 0,025 mg/mL o que corresponde a uma percentagem de inibição de 82,234 % e 68,988 %, para o ensaio DPPH e ABTS, respetivamente. Ademais, o valor de IC_{50} do ácido gálico, foi muito semelhante em ambos os ensaios, nomeadamente de 0,0147 mg/mL no ensaio DPPH e 0,0161 mg/mL no ensaio ABTS. Estes valores são semelhantes aos reportados por Hsu et al. ($IC_{50} = 0,0129$ mg/mL) [83] e por Yokosawa et al. ($IC_{50} = 0,0138$ mg/mL) [84].

Investigadores pensam que a atividade antioxidante do ácido gálico advém da sua estrutura molecular, que se encontra representada na Figura 19, mais especificamente devido à presença dos três grupos hidroxila, dispostos na posição *orto*, ligados ao seu anel aromático e que formam uma ligação de

hidrogénio intramolecular. Outro fator decisivo pode ser o facto do grupo carboxílico estar ligado ao carbono número 1, o que aumenta a capacidade do ácido gálico de doar prótons [85].

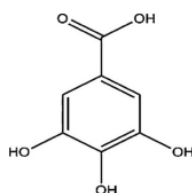


Figura 19. Estrutura química do ácido gálico [86].

Similarmente, o extrato de chá verde apresentou uma tendência de aumento exponencial da % de inibição, ou seja, da capacidade antioxidante, com o aumento da concentração. Nos ensaios DPPH e ABTS, obtiveram-se concentrações antioxidantes máximas diferentes, sendo no primeiro de 0,025 mg/mL, correspondente a uma inibição de 56,669 %, e no segundo de 0,050 mg/mL, correspondente a uma inibição de 62,315 %. Estes valores traduziram-se num IC_{50} de 0,0212 mg/mL no ensaio DPPH e de 0,0349 mg/mL no ensaio ABTS, que são próximos do valor de IC_{50} de 0,0233 mg/mL obtido por Unachukwu et al. [87]. A atividade antioxidante do extrato de chá verde deve-se essencialmente à combinação de grupos hidroxila e anéis aromáticos que formam a sua estrutura química (Figura 20) e à consequente ligação e neutralização dos radicais livres por esses grupos hidroxila. Além do mais, vários estudos provaram que as catequinas do chá verde são eficazes na eliminação de espécies reativas de oxigénio e na doação de eletrões [88].

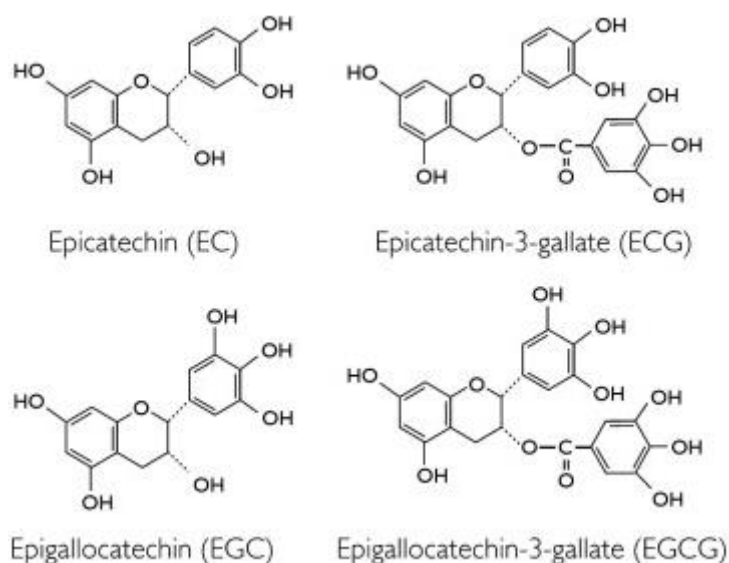


Figura 20. Estrutura química de catequinas presentes no chá verde [88].

Relativamente ao geraniol obtiveram-se resultados invulgares: no ensaio DPPH constatou-se uma evolução exponencial negativa da percentagem de inibição em função da concentração do composto, pelo que neste caso não se pode aferir que o geraniol tem atividade antioxidante e, por isso, não foi possível calcular o IC_{50} ; no ensaio ABTS, o aumento da concentração de geraniol não teve impacto significativo na atividade antioxidante, que se manteve constante, e com uma percentagem de inibição de aproximadamente 6 %, pelo que também não se calculou o respetivo IC_{50} .

Estes resultados discordam com os relatados em estudos de vários autores que provaram que o geraniol apresenta elevada atividade antioxidante, provavelmente resultante da sinergia entre os componentes do óleo, com um valor de IC_{50} de 663 nmol [89,90]. Nestes estudos, como por exemplo, o desenvolvido por Chikhi et al., a atividade sequestradora de radicais livres do geraniol foi medida, usando o método de DPPH, a partir de soluções de geraniol diluído em metanol, onde se obteve o mesmo valor de IC_{50} de 663 nmol [91]. Aqui, o solvente utilizado foi o metanol e não o etanol como no presente estudo, por isso, pode-se especular que a atividade antioxidante do geraniol poderá ser influenciada pelo solvente em que é diluído. No entanto, na prática, o ideal seria realizar novos testes, com solventes diferentes, para determinar efetivamente a atividade antioxidante do geraniol. Também de referir que o geraniol é um composto difícil de manusear, tendo-se verificado que ao pipetar parte do composto ficava retido na tip e que este composto foi difícil de dissolver em água, na preparação das soluções.

Tal como mencionado previamente, um menor IC_{50} corresponde a uma maior atividade antioxidante, ou seja, quanto menor a concentração de composto ativo que permite uma inibição de DPPH ou ABTS de 50 %, maior é a capacidade desse composto doar hidrogénio ao radical livre e o sequestrar, e maior é também o seu poder redutor. Neste sentido, a partir dos resultados destes ensaios verificou-se que as atividades antioxidantes dos compostos ativos diminuíram na seguinte sequência (estando em concordância tanto para o ensaio DPPH como ABTS): ácido gálico > extrato de chá verde > geraniol.

6.3 ANÁLISE DOS TESTES ANTIBACTERIANOS

Nos testes antibacterianos foram analisadas amostras de controlo não tratadas, nomeadamente filmes compostos por 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose, imediatamente após inoculação (amostras C1, C2 e C3) e 24 h após incubação (amostras C4, C5 e C6), e amostras tratadas, nomeadamente filmes compostos por 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e 12,5 g/L de ácido gálico, após 24 h de incubação. Para cada amostra, procedeu-se à contagem das bactérias

viáveis em placa e calculou-se, posteriormente, o número de bactérias viáveis recuperadas (N). Os resultados de N estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Número de bactérias viáveis recuperadas (N) nas amostras

N / células cm^{-2}	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Amostras não tratadas após inoculação (C1, C2 e C3)	$8,96 \times 10^3$	$2,44 \times 10^3$
Amostras não tratadas após 24 h de incubação (C4, C5 e C6)	$4,65 \times 10^4$	$1,58 \times 10^4$
Amostras tratadas após 24 h de incubação (AG1, AG2 e AG3)	0	0

Analisando os resultados, constatou-se que, para os ensaios com a *E. coli* e com a *S. aureus*, os filmes com ácido gálico incorporado, não permitiram o crescimento das bactérias, não se tendo verificado nenhuma colônia de bactérias visível, o que se refletiu num número de bactérias viáveis recuperadas nulo. Averiguou-se também que, em ambos os ensaios, a incubação de 24 h se traduziu num número de bactérias recuperadas de cerca de 5/6 vezes superior aos números obtidos logo após inoculação.

Ademais, o valor logarítmico do número de bactérias viáveis recuperadas imediatamente após inoculação das amostras de teste não tratadas foi de 0,007 no ensaio com a *E. coli* e de 0,006 no ensaio com a *S. aureus*. Como estes valores são inferiores a 0,2, então a primeira condição de validação do teste encontra-se verificada. Por sua vez, como constatado na Tabela 12, o número médio de bactérias viáveis recuperadas (N) imediatamente após inoculação das amostras de teste não tratadas, foi de $8,96 \times 10^3/\text{cm}^2$ no ensaio com a *E. coli* e de $2,44 \times 10^3/\text{cm}^2$ no ensaio com a *S. aureus*. De acordo com a segunda condição de validação, este valor deve-se encontrar dentro do intervalo $6,2 \times 10^3/\text{cm}^2$ a $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$. O primeiro ensaio satisfaz este requisito, no entanto, nos testes com a *S. aureus*, o mesmo não se verificou.

Uma possível justificação para este acontecimento pode estar associada ao éster de sacarose presente na formulação dos revestimentos. Provavelmente, o éster de sacarose tem efeito inibitório contra a *S. aureus* e limita o seu crescimento bacteriano, ou seja, o composto por si só tem capacidade de inibir o crescimento da bactéria, não sendo por isso possível recuperar todas as bactérias viáveis.

Um estudo anterior foi realizado com o propósito de analisar esta possibilidade. Zhang et al., concluíram que a atividade antibacteriana dos ésteres de sacarose contra a *S. aureus* foi maior do que contra a bactéria Gram negativa, *E. coli*, que foi resistente aos efeitos inibitórios devido a diferenças na

estrutura da membrana e na parede celular [92]. Uma descoberta semelhante foi reportada por Zhao et al. que indicaram um efeito antibacteriano mais forte contra bactérias Gram positivas do que Gram negativas, devido à sua membrana externa, que restringe a difusão do éster de sacarose através da sua cobertura de lipopolissacarídeo. Os autores argumentaram que, de acordo com os resultados, o efeito antibacteriano deste composto deve-se essencialmente a danos na permeabilidade da membrana celular, levando à perda de alguns componentes celulares, como proteínas, açúcares redutores e materiais absorventes e à inibição do crescimento das células bacterianas [93]. Bactérias Gram negativas apresentam uma estrutura celular composta pela membrana citoplasmática interna circundada por uma parede celular fina de peptidoglicano, cujo exterior é coberto por uma membrana externa contendo lipopolissacarídeo. Por sua vez, bactérias Gram positivas não apresentam membrana externa e são revestidas por camadas de peptidoglicano mais espessas. A membrana externa das bactérias Gram negativas serve como uma barreira protetora à difusão de componentes, sendo por isso também mais resistente a efeitos inibitórios [94]. As diferenças das estruturas das paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas são visíveis na Figura 21.

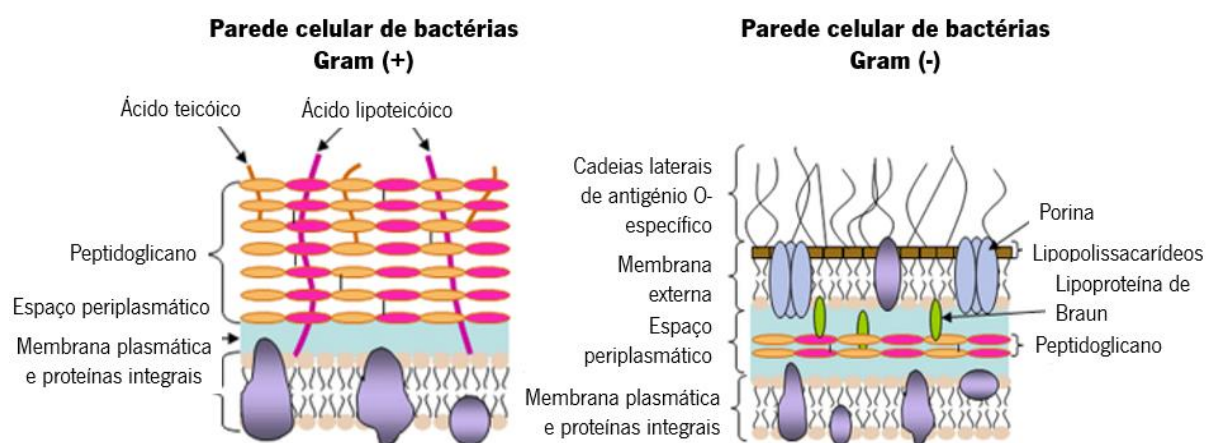


Figura 21. Estrutura esquemática das paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Adaptado de [95].

Em trabalhos futuros, seria importante analisar amostras apenas com alginato de sódio, ou apenas com éster de sacarose de forma a determinar o efeito antibacteriano que cada composto tem individualmente, e analisar diferentes concentrações de ácido gálico para averiguar se existe dependência dose-resposta.

A última condição exige que o número de bactérias viáveis recuperadas das amostras de testes não tratadas após 24 h de incubação seja superior a $6,2 \times 10^3/\text{cm}^2$. Este requisito foi também satisfeito visto

que se obtiveram valores de N de $4,65 \times 10^4$, no ensaio com a *E. coli*, e de $1,58 \times 10^4$ no ensaio com a *S. aureus*.

Verificando-se que, no primeiro ensaio, todas as condições foram cumpridas, é possível validar o teste com a *E. coli*. Relativamente ao segundo ensaio, ainda que na segunda condição se tenha obtido um número médio de bactérias viáveis recuperadas imediatamente após inoculação das amostras de teste não tratadas abaixo do limite exigido ($6,2 \times 10^3/\text{cm}^2$), pode-se validar o método, visto que este valor não era tão distante do estabelecido e tendo em conta que as outras condições se verificaram.

O último objetivo dos testes antibacterianos, consistia em determinar a atividade antibacteriana, também denominada de recuperação antibacteriana (Aa) das amostras. Os filmes tratados com ácido gálico demonstraram um valor de atividade ou de recuperação antibacteriana de 3,6 relativamente à *E. coli* e de 3,2 relativamente à *S. aureus*. É de notar que o ácido gálico demonstrou uma atividade antibacteriana maior para a bactéria Gram negativa do que para a Gram positiva. Segundo a ISO 20743 “Têxteis - Determinação da atividade antibacteriana de produtos têxteis”, um valor de atividade antibacteriana superior a 3 corresponde a um forte efeito inibitório, pelo que se pode concluir que o revestimento é muito eficaz em inibir o crescimento das bactérias responsáveis por surtos alimentares [96].

Efetivamente, esperava-se que o ácido gálico fosse um bom agente antibacteriano contra a *E. coli* e a *S. aureus*. A literatura descreve o ácido gálico como um composto fenólico capaz de inibir a síntese de ácidos nucleicos de bactérias Gram negativas, como a *E. coli*, e Gram positivas, como a *S. aureus*. Um estudo realizado por Borges et al., explicou o mecanismo de ação do ácido gálico. Este composto interage com a superfície de bactérias Gram negativas e Gram positivas, comprometendo a integridade das membranas citoplasmáticas e promovendo a libertação de conteúdo intracelular que resulta, consequentemente, em morte celular. Os autores comprovaram que o seu caráter parcialmente lipofílico permite que este ácido fenólico atravesse a membrana celular, por difusão passiva, acidificando o citoplasma e causando a desnaturação das proteínas [97].

Ademais, verificaram que o ácido gálico alterou as propriedades físico-químicas das membranas bacterianas, tornando a superfície das células de *E. coli* mais hidrofílica e a superfície das células *S. aureus* mais hidrofóbica. Também a exposição deste ácido fenólico a estas bactérias, afetou a capacidade dos seus aceptores de eletrões, que aumentou em bactérias Gram positivas e diminuiu em Gram negativas. Averiguaram, ainda, que o tipo de microrganismo e sua estrutura, e a composição da membrana celular têm impacto na atividade antibacteriana do ácido gálico. A partir de medições do potencial zeta (uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre

partículas) demonstraram que, após a exposição aos ácidos fenólicos, as células bacterianas ficaram menos carregadas negativamente (a sua carga superficial é normalmente negativa). Este efeito verificou-se particularmente na bactéria *E. coli*, o que justificou a sua maior suscetibilidade quando comparada com a *S. aureus* [97]. Este motivo, aliado aos mencionados anteriormente, pode explicar o facto de se ter obtido uma maior recuperação ou atividade antibacteriana e um maior número de bactérias viáveis recuperadas para a *E. coli* do que para a *S. aureus*.

6.4 ANÁLISE DOS TESTES DE TEMPO DE AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRATELEIRA

Tal como mencionado anteriormente, a partir dos testes antioxidantes e dos testes antivirais escolheu-se o revestimento com ácido gálico com uma concentração de 12,5 g/L, uma vez que, além de ser o composto com maior atividade antioxidante e de demonstrar uma atividade antiviral forte, não produz um odor muito predominante, em comparação com os restantes compostos ativos, o que não iria ser aceite para consumo pelo consumidor. Desta forma, para a análise do tempo de prateleira das peras foram analisadas peras revestidas com composto ativo (revestimento composto por 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e 12,5 g/L de ácido gálico) e sem composto ativo (revestimento composto por 10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose) e peras não revestidas, como grupo controlo. A avaliação do tempo de prateleira teve por base o estudo de vários parâmetros e os resultados encontram-se descritos abaixo.

6.4.1 PERDA DE MASSA

A variação de massa nas peras com revestimento ativo (10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e 12,5 g/L ácido gálico), nas peras com revestimento normal (10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose) e nas peras sem revestimento foi avaliada ao longo do tempo e os resultados estão apresentados na Figura 22. Nas Tabelas A 1 e A 2, do Anexo III, encontram-se os dados recolhidos da massa e da perda de massa (%) das peras ao longo do tempo de armazenamento.

O valor da perda de massa aumentou constantemente durante o período de avaliação em todos os tratamentos. Ainda que, as peras sem revestimento aparentem apresentar uma menor perda de massa, seguidas das peras com revestimento ativo e das peras com revestimento normal, não se verificaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os três grupos de peras.

Na prática, era de esperar que as peras revestidas apresentassem menor perda de massa, devido à diminuição da perda de vapor de água para o seu exterior. Vários autores relataram que a aplicação

de revestimentos comestíveis ativos contribuiu para a diminuição da perda de massa das frutas [98] a partir da formação de uma barreira ao seu redor que, além de diminuir a concentração de oxigênio e de aumentar a de dióxido de carbono na fruta, reduz a transferência de vapor [99]. Em contrapartida, um estudo realizado por Saucedo-pompa et al. revelou que o ácido gálico incorporado num revestimento de cera de candelila não teve um efeito significativo na redução de perda de peso de bananas, maçãs e abacates [100].

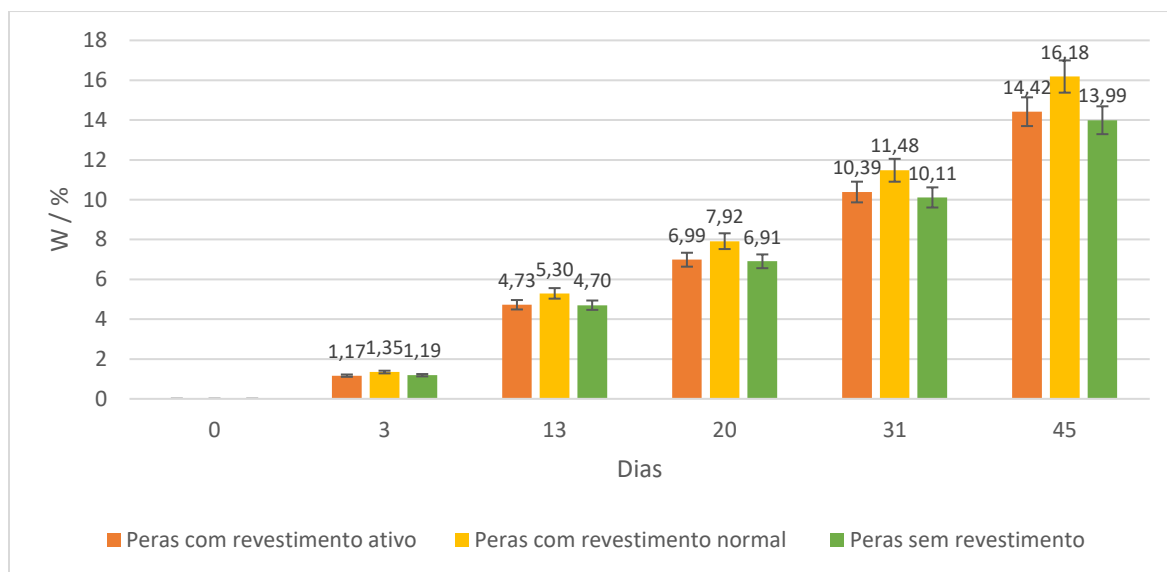


Figura 22. Perda de massa (W / %) das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.

6.4.2 FIRMEZA

Os testes de perfuração realizados aos três grupos de peras tinham como objetivo determinar se o revestimento ativo iria afetar a firmeza da fruta ao longo do tempo. Na Figura 23 apresentam-se os resultados obtidos e na Tabela A 3, do Anexo III, encontram-se os valores de firmeza recolhidos das peras ao longo do tempo de armazenamento.

A partir da análise do gráfico, constatou-se que a firmeza das peras diminuiu com o avanço do tempo de armazenamento. A perda da firmeza foi bastante maior nas amostras não tratadas em comparação com as amostras tratadas, a partir do dia 20 de armazenamento. Recorrendo a uma análise estatística, averiguou-se que apenas nos dias 20 e 45 de armazenamento se verificaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as peras com revestimento ativo e as peras não revestidas e entre as peras com revestimento normal e as peras não revestidas. Ademais, em todo o tempo de avaliação não se verificaram diferenças entre as peras com revestimento ativo e revestimento normal. Por este motivo, é

possível afirmar que os revestimentos efetivamente diminuíram a perda de firmeza das frutas, ainda que este efeito tenha sido observado apenas nos dias 21 e 45 de armazenamento. Neste sentido, um estudo, realizado por Hussain et al., veio também comprovar que revestimentos comestíveis à base de polissacarídeos têm a capacidade de reduzir a perda de firmeza da parede celular de peras resultante do atraso do processo de amadurecimento [101].

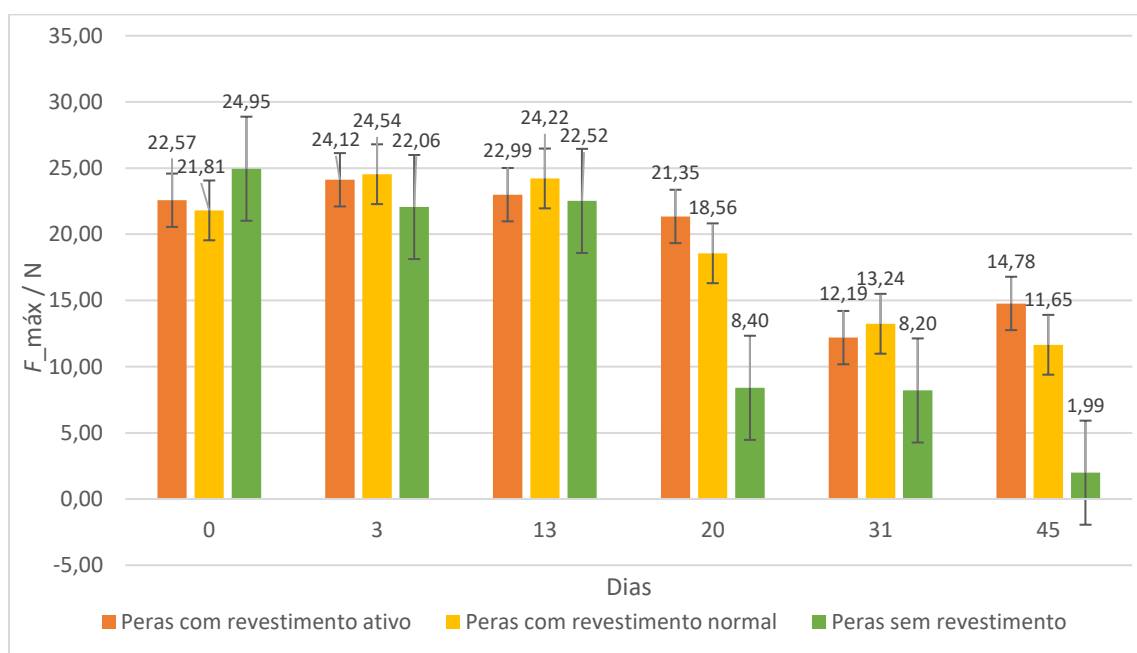


Figura 23. Firmeza (N) das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.

Pode-se ainda observar, pelo gráfico da Figura 23, que existem variações não lineares da firmeza, mais visivelmente entre os dias 20 e 45, em que há um aumento (não significativo) deste parâmetro no dia 31. Isto pode ser explicado pela grande variabilidade das peras analisadas nos diferentes dias de testagem, uma vez que, sendo este teste destrutivo, as frutas ficavam danificadas e inviáveis para posterior utilização. Outros fatores como diferentes graus de maturação, formas e tamanhos entre as peras usadas nos diferentes tempos de amostragem podem também ter afetado os resultados obtidos.

A perda de firmeza observada durante o armazenamento e processo de maturação das peras deve-se essencialmente a reações enzimáticas, perda de água que diminui a turgescência e à degradação de substâncias pécticas presentes na fruta [102]. Com o decorrer do tempo ocorre a liberação de uma enzima hidrolítica, a poligalacturonase (PG), que aumenta a permeabilidade das membranas das peras e torna as suas paredes celulares mais fracas, levando a um rompimento mais facilitado das membranas.

Também reações enzimáticas podem ter corrido e degradado os compostos presentes nas paredes celulares provocando a desnaturação de proteínas [57].

6.4.3 pH

Os valores de pH das peras medidos ao longo do tempo estão evidenciados na Figura 24 e encontram-se discriminados na Tabela A 4, do Anexo III.

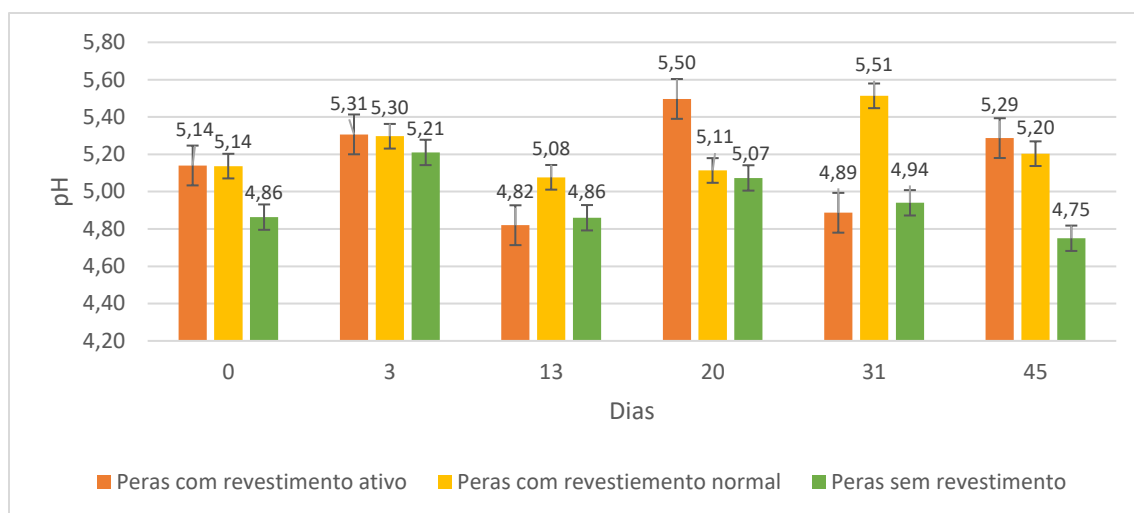


Figura 24. Variação do pH das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.

A medição do pH indicou que, no dia 0, todas as peras tinham um valor de pH de aproximadamente 5. Analisando o gráfico, observa-se que, no último dia de armazenamento, o valor de pH das peras com revestimento ativo e normal foi ligeiramente superior relativamente aos valores do primeiro dia de análise e o das peras sem revestimento foi inferior. De uma forma geral, ainda que tenha havido aumentos e diminuições no valor do pH, este não variou ao longo dos vários dias de armazenamento, não se tendo notado diferenças estatisticamente significantes ($P \leq 0,05$) entre as peras com diferentes tratamentos nos mesmos dias e entre as mesmas peras em diferentes dias.

Com a maturação do fruto ocorre uma diminuição da acidez, decorrente do consumo de ácidos orgânicos previamente ao consumo dos açúcares, durante a respiração, e, portanto, seria de prever que houvesse um aumento dos valores de pH das peras [54]. Tal como enunciado na análise do teste da firmeza, a grande variabilidade das peras analisadas, a necessidade de se usar novos grupos de peras em cada dia de testagem, devido a ser um teste destrutivo, e as diferenças no grau de maturação fisiológica (embora esforços tenham sido feitos para escolher amostras com maturidade uniforme)

podem ter afetado os resultados obtidos. Assim sendo, nada se pode aferir se o revestimento ativo ou o revestimento normal têm impacto na acidez da fruta.

6.4.4 CONTEÚDO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

O conteúdo de sólidos solúveis totais é um bom indicador de qualidade alimentar e do estado de maturação das frutas de pera durante o armazenamento. A Figura 25 resume a quantificação do conteúdo de sólidos solúveis totais, expresso em °Brix, ao longo do tempo de armazenamento e a Tabela A 5, do Anexo III, apresenta todos os valores de conteúdo de sólidos solúveis das peras recolhidos.

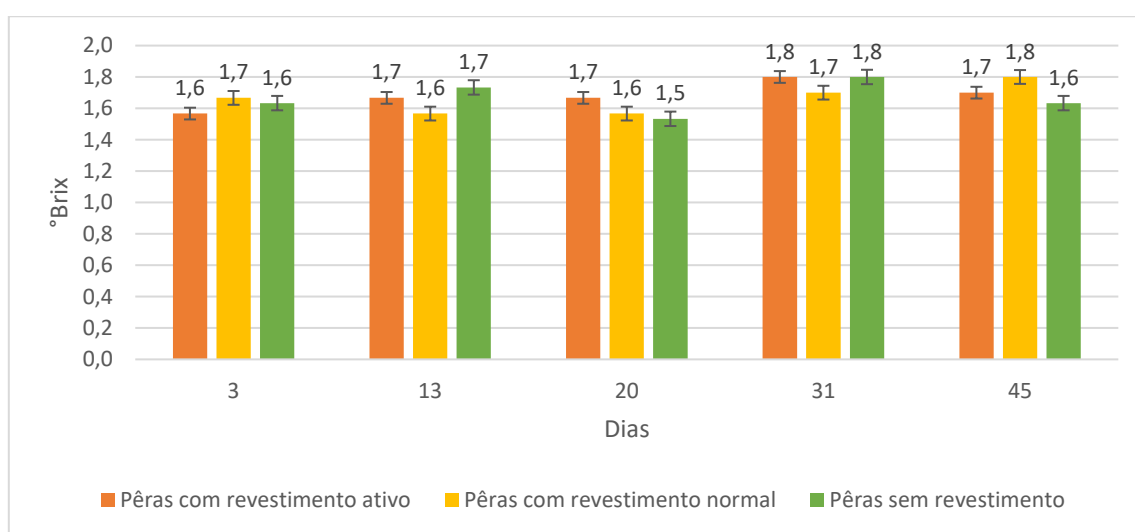


Figura 25. Conteúdo de sólidos solúveis totais, em °Brix, das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.

Os resultados indicam que, ao longo do tempo de armazenamento, não houve alterações ($P \leq 0,05$) no conteúdo de sólidos solúveis em nenhum grupo de amostras em nenhuma dia. Neste caso, não foi possível realizar este teste no dia 0.

Na teoria, durante o armazenamento, o conteúdo de sólidos solúveis totais deveria ter aumentado visto que, com o amadurecimento da fruta, há a conversão enzimática de polissacarídeos superiores, como amidos e pectinas, em açúcares simples e ainda a desidratação do próprio fruto [54]. O não aumento do conteúdo de sólidos solúveis em peras revestidas pode ser resultado da desaceleração da atividade metabólica e do processo de respiração nas frutas que o revestimento composto possa ter induzido, e consequentemente atrasado a conversão de polissacarídeos em açúcares.

Novamente, a variabilidade dos resultados pode dever-se ao facto das peras serem diferentes entre si a nível de tamanho, forma e mesmo grau de maturação.

Além do mais, é de realçar que se obtiveram valores de conteúdo de sólidos totais, entre 1,6 e 1,8 °Brix. Estes valores são muito baixos quando comparados com os reportados na literatura para peras. Muziri et al., por exemplo, estudou a pera Forelle (a mesma do presente estudo) e obteve valores de aproximadamente 16 °Brix [103]. Esta diferença significa que o conteúdo de açúcares nas peras analisadas era muito reduzido, o que é algo invulgar. Pensa-se que isto possa ser resultado da dupla filtração que se realizou e que provavelmente foi excessiva removendo açúcares em demasia.

6.4.5 ACIDEZ TITULÁVEL

Tal como o conteúdo de sólidos solúveis, a acidez titulável é outro indicador da qualidade alimentar e do grau de maturação das frutas durante o armazenamento. A variação da acidez titulável das peras ao longo do tempo de armazenamento encontra-se representada na Figura 26 e os valores recolhidos deste parâmetro encontram-se discriminados na Tabela A 6, do Anexo III.

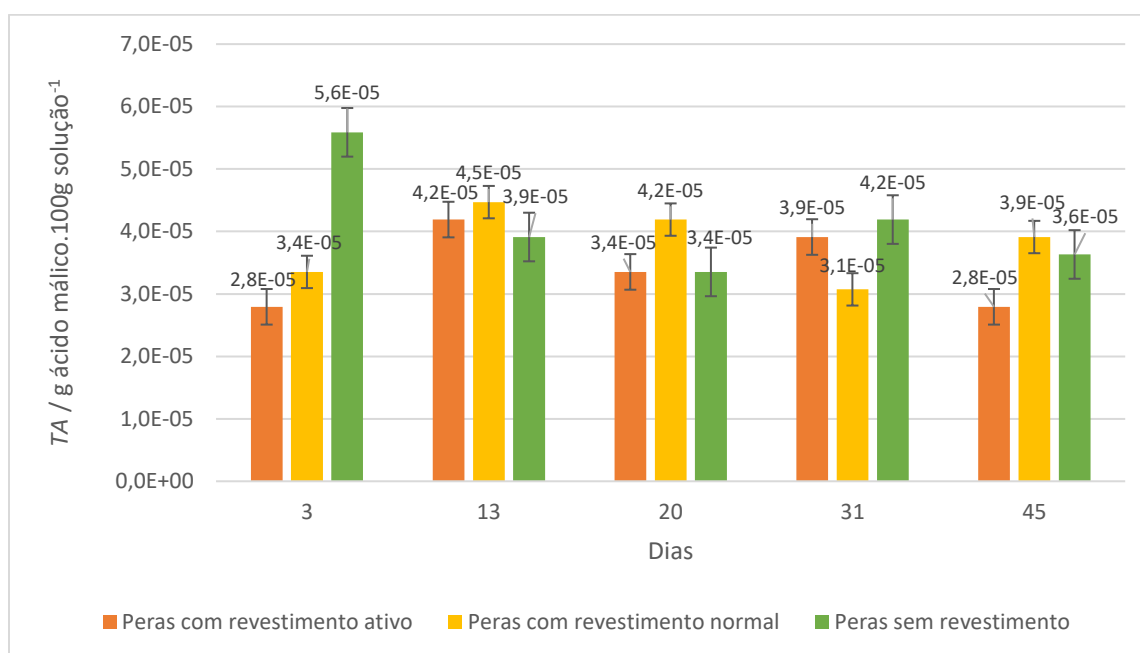


Figura 26. Variação da acidez titulável, em equivalentes de ácido málico, das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, ao longo do tempo de armazenamento.

Segundo o gráfico da Figura 26, verifica-se que ao longo do tempo de armazenamento, não houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) nos valores de acidez titulável entre as várias peras nos mesmos dias e entre as mesmas peras nos diferentes dias.

Aqui também se excluiu o dia 0, assim como no ensaio de quantificação do conteúdo de sólidos solúveis, devido ao facto de a análise da acidez titulável ter sido realizada no dia a seguir ao primeiro dia de testagem, o que induzia a valores significativamente diferentes.

De acordo com a literatura, a acidez titulável está relacionada com a quantidade de ácidos orgânicos presentes na fruta sendo que, com o amadurecimento, ocorre uma redução deste parâmetro devido a alterações metabólicas e à conversão de ácidos orgânicos em açúcares e seus derivados (como fonte de carbono) ou à sua utilização no processo de respiração (como fonte de energia) [104,105]. Desta forma, idealmente, desejava-se verificar um declínio linear da acidez com o avanço do período de armazenamento e que o revestimento ativo proporcionasse uma maior diminuição dos ácidos tituláveis. Ainda assim, estes resultados estão concordantes com as variações de pH obtidas.

Além do mais, no dia 3 obtiveram-se valores de acidez titulável de $2,79 \times 10^{-5}$ g ácido málico/ 100 g de solução para peras com revestimento ativo, $3,35 \times 10^{-5}$ g ácido málico/ 100 g de solução para peras com revestimento normal e $5,59 \times 10^{-5}$ g ácido málico/ 100 g de solução para peras sem revestimento. Estes valores diferem muito dos reportados na literatura para peras, como é o caso de um estudo realizado por Saquet et al. onde determinaram que a acidez titulável de uma pera rocha é de 2×10^{-3} g ácido málico/ 100 g de solução [106]. Mais uma vez, a discrepância destes valores pode ser resultado da dupla filtração que se realizou, que pode ter sido excessiva. Também a questão dos diferentes graus de maturação, das formas e tamanhos das peras utilizadas, como consequência de se tratar de um teste destrutivo, podem ter afetado negativamente os resultados.

6.4.6 ANÁLISE SENSORIAL

Para o estudo da análise sensorial das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento no último dia de armazenamento, elaborou-se um gráfico radar (Figura 27) a partir dos resultados obtidos na análise (Tabela A 7, do Anexo III).

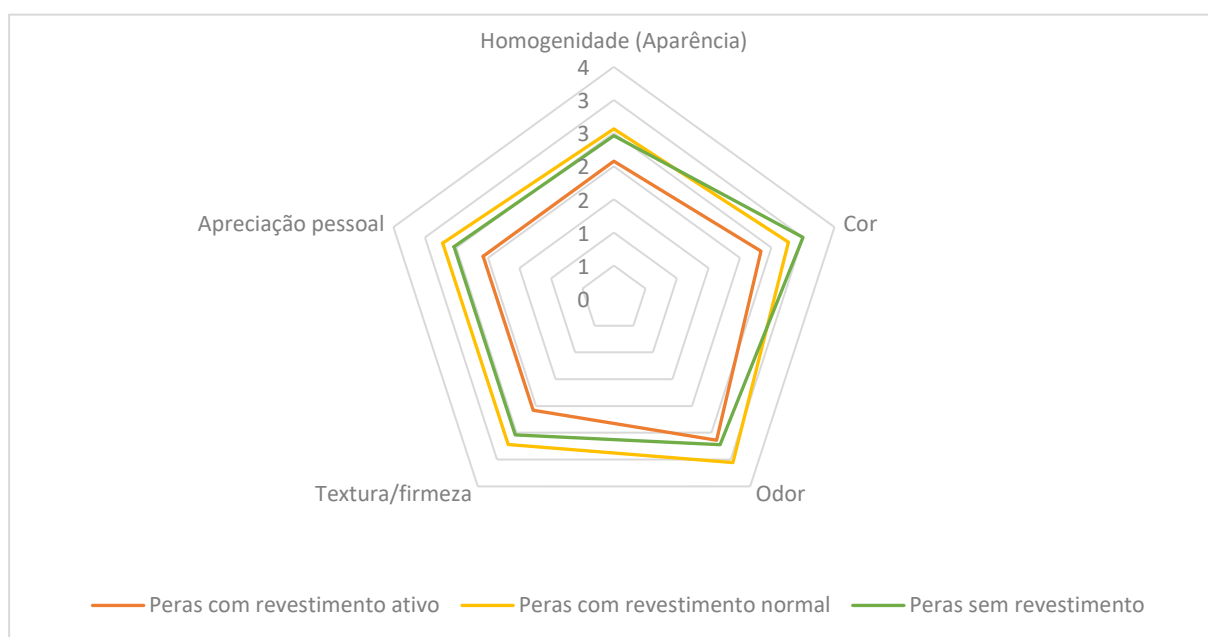


Figura 27. Gráfico radar da análise sensorial das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento, no dia 45.

Por análise ao gráfico radar é possível observar que, de uma forma geral, as peras com revestimento ativo foram as que tiveram menor pontuação e as que foram mais depreciadas pelo painel de observadores. Em contrapartida, as peras com revestimento normal tiveram a melhor pontuação em grande parte dos parâmetros analisados.

Relativamente à textura/firmeza, ainda que os testes de firmeza tenham evidenciado que as peras não tratadas foram as que sofreram maior perda, os analisadores escolheram as peras com revestimento ativo como as que estavam mais “moles e murchas” e as peras com revestimento normal como as que se encontravam mais rígidas. Alguns membros do painel argumentaram que “as peras com revestimento ativo tinham uma textura um pouco borrachosa e não madura como seria de esperar”. É de salientar que, no último dia de testes de prateleira, as peras usadas nos testes de firmeza e as apresentadas na análise sensorial foram diferentes, uma vez que o primeiro teste é de caráter destrutivo.

No parâmetro do odor, as peras com revestimento normal foram as melhor classificadas seguidas, por empate, das restantes peras. Os analisadores afirmaram que nas peras sem revestimento sentia-se um odor ténue indicativo do estado avançado de maturação da fruta, e nas peras com revestimento ativo sentiam um ligeiro odor ácido, possivelmente decorrente da presença do composto ativo, já nas peras com revestimento normal disseram que a fruta tinha um aroma “normal de pera”.

A avaliação da cor foi um pouco difícil de se realizar. Os elementos indicaram que as peras com melhor classificação foram as sem revestimento, pois se apresentavam mais vermelhas e que as peras

com revestimento ativo foram as pior classificadas, devido à sua cor amarela/acastanhada resultante da maturação.

Este último parâmetro está muito associado à homogeneidade e aparência da fruta. A Tabela 13 apresenta imagens das peras ao longo do tempo de armazenamento, onde é possível observar a evolução do seu estado de maturação. Nos parâmetros de apreciação pessoal e homogeneidade (aparência) os resultados indicaram que as peras com revestimento normal foram as mais aceitas, seguidas das peras sem revestimento, e por último, das peras com revestimento ativo. Esta análise é bastante subjetiva, uma vez que de entre os vários grupos de amostras foram eleitas como as mais apelativas tanto peras com revestimento ativo, peras com revestimento normal e peras sem revestimento, no entanto, de uma forma geral as primeiras foram as mais rejeitadas pela maioria.

Ao longo do tempo de armazenamento, a cor da pera mudou de vermelho e verde para amarelo e, já numa fase avançada de maturação, para castanho. Como podemos ver pelas imagens da Tabela 13, todas as frutas apresentaram mudanças na sua aparência externa. No dia 31 já eram visíveis danos nas superfícies das peras com revestimento normal e nas sem revestimento, com o aparecimento de zonas podres, já as peras com revestimento ativo apresentavam uma superfície intacta. É possível notar que, do dia 31 ao dia 45, houve um declínio significativo no estado de maturação de todas as peras, verificando-se que todas elas apresentavam danos na sua superfície e zonas bastante apodrecidas.

Estes resultados são um tanto desapontantes. Desejava-se que as peras com revestimento ativo singrassem em maior parte dos parâmetros em análise, principalmente na firmeza e na aparência e, que no fundo, atrasassem o processo de maturação das frutas. Um aspeto importante a ter em conta é que as peras com revestimento ativo utilizadas no dia 45 nos testes destrutivos apresentavam uma aparência e uma firmeza significativamente melhores que as restantes peras, contudo, as utilizadas na análise sensorial encontravam-se já num estado de maturação mais avançado. Aqui, novamente, estamos presentes ao problema das frutas não se encontrarem todas no mesmo grau de maturação.

Além do mais, foram ainda capturadas imagens do interior e exterior das peras no último dia de armazenamento (Figuras 28 a 30), de forma a determinar se o aspeto exterior se manifestava igualmente no interior. De entre as várias peras, as únicas com um interior mais aceitável foram a primeira com revestimento ativo (Figura 28) e a terceira com revestimento normal (Figura 29), todas as restantes já ultrapassavam o estado de maturação aceite para consumo. Como indicado até ao dia 31, praticamente não havia indícios de zonas apodrecidas no interior das 9 peras, com a exceção de duas (1 pera com revestimento normal e 1 pera sem revestimento). Teria sido interessante observar o interior das peras

nesta altura pois provavelmente iria corresponder ao limite máximo de tempo de prateleira aceite para consumo.

Tabela 13. Imagens do exterior das peras com revestimento ativo, das peras com revestimento normal e das peras sem revestimento ao longo do tempo de armazenamento

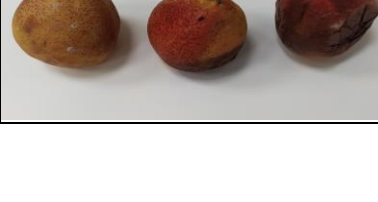
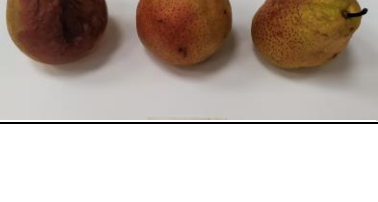
Dia	Peras com revestimento ativo	Peras com revestimento normal	Peras sem revestimento
0			
3			
13			
20			
31			
45			



Figura 28. Imagens do exterior e do interior das peras com revestimento ativo, no dia 45.

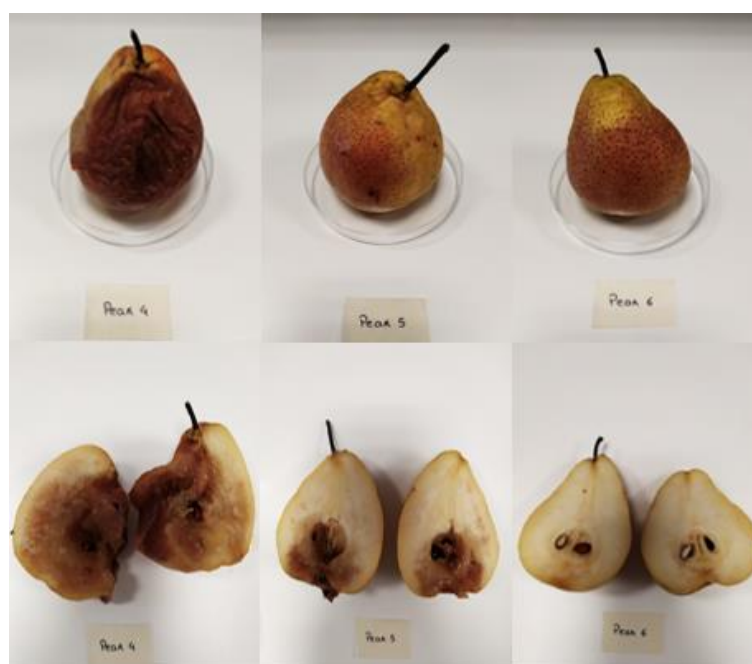


Figura 29. Imagens do exterior e do interior das peras com revestimento normal, no dia 45.



Figura 30. Imagens do exterior e do interior das peras sem revestimento, no dia 45.

7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Esta dissertação teve como principal objetivo a formulação de um revestimento comestível sustentável com atividade antiviral contra o coronavírus, que pudesse posteriormente ser aplicado em frutas, e que colmatasse a atual inexistência de informação e experimentos nesta área.

No início do projeto, foram desenvolvidos três filmes diferentes com uma matriz de base de 10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose, e diversas concentrações (1,5625, 3,125, 6,25, 12,5 e 25 g/L) dos compostos ativos: ácido gálico, geraniol e extrato de chá verde. Estes filmes foram estudados a nível da sua capacidade antiviral com o objetivo de determinar o conjunto de condições que permitissem otimizar uma formulação, tendo em vista a sua aplicação em peras e a consequente melhoria da sua qualidade e tempo de prateleira. Daqui, extrapolou-se que para o ácido gálico a sua concentração crítica foi de 12,5 g/L ($Mv > 3,29$ e $R > 99,95\%$), para o geraniol foi de 3,125 g/L ($Mv > 3,45$ e $R > 99,96\%$), e para o extrato de chá verde foi de 3,125 g/L ($Mv > 3,34$ e $R > 99,95\%$), sendo que estes filmes apresentaram uma excelente atividade antiviral uma vez que o valor de Mv foi superior a 3. Sabidas as condições ideais produziram-se novos filmes com as concentrações críticas, de forma a verificar se após um mês de armazenamento os compostos perdiam atividade. Concluiu-se que, no filme com extrato de chá verde apenas se verificou atividade do vírus após quatro semanas de armazenamento (com $Mv < 3$), enquanto nos restantes filmes após a segunda semana já se verificava atividade do vírus. Contudo, para os testes de prateleira de peras escolheu-se a formulação com o ácido gálico (12,5 g/L), uma vez que os outros compostos ativos produziam um odor muito forte que não seria aceite para consumo pelo consumidor.

Em paralelo, estudou-se a atividade antioxidante dos compostos ativos puros nas seguintes concentrações: 0,001, 0,005, 0,01, 0,015, 0,025, 0,05 e 0,075 mg/mL. Como referido, não foi possível utilizar os revestimentos compostos nestes ensaios, visto que o alginato de sódio e o éster de sacarose proporcionavam uma cor branca opaca e alguma espuma, o que induzia a erros de leitura espectrofotométrica. Tal como referido, um menor valor de IC_{50} , ou seja, da metade da concentração inibitória máxima, corresponde a uma maior atividade antioxidante. Assim, a partir destes testes, constatou-se que o ácido gálico era o composto com maior atividade antioxidante, seguido do extrato de chá verde. Curiosamente, e ao contrário do que se encontra reportado na literatura, o geraniol não apresentou atividade antioxidante. Pensa-se que o solvente utilizado nos ensaios poderá ter afetado a atividade do composto e, por isso, seria necessário realizar novos testes com diferentes tipos de solvente, de forma a esclarecer esta questão e a determinar efetivamente a atividade antioxidante do geraniol.

Relativamente aos testes antibacterianos, verificou-se que o revestimento formulado apresentou um efeito inibitório forte ($Aa > 3$) contra o crescimento das bactérias responsáveis por surtos de origem

alimentar como a *E. coli* e a *S. aureus*, eliminando-as totalmente, com um valor de atividade antibacteriana de 3,6 e 3,2, respectivamente. No ensaio com a *S. aureus* verificou-se que o número médio de bactérias viáveis recuperadas (*N*) imediatamente após inoculação das amostras de teste não tratadas encontrava-se abaixo do limite estabelecido pela norma. Tendo em conta estudos anteriores, pensa-se que o próprio éster de sacarose, presente na matriz dos revestimentos, tenha atividade antibacteriana e seja mais eficaz contra a *S. aureus* pelo que limitou o seu crescimento bacteriano de forma mais precipitada, do que em comparação com a *E. coli*, devido às diferenças estruturais das paredes celulares. Por este motivo, seria importante analisar futuramente a atividade antibacteriana dos compostos alginato de sódio e éster de sacarose isoladamente contra estas bactérias de forma a poder fundamentar fidedignamente os resultados obtidos. Seria também interessante produzir filmes com diferentes concentrações de ácido gálico, para averiguar se existe dependência dose-resposta, e revestimentos com outros compostos ativos incorporados, como o geraniol e o extrato de chá verde.

No âmbito do segundo grande objetivo deste trabalho, após determinado o composto ativo (ácido gálico) mais eficaz contra o coronavírus e a respetiva concentração em termos de massa/volume (1,25 %) nos testes antivirais, produziu-se em larga escala este revestimento composto que foi, posteriormente, aplicado em peras, através do processo de imersão. Aqui, o propósito passou por averiguar se o revestimento ativo tinha efeito e permitia prolongar a vida de prateleira de frutas, neste caso concreto, de peras Forelle. Foram estabelecidos três grupos de amostras: peras com o revestimento ativo (10 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de éster de sacarose e 12,5 g/L de ácido gálico), peras com revestimento normal (10 g/L de alginato de sódio e 5 g/L de éster de sacarose) e peras sem revestimento. Ao longo de 45 dias de armazenamento, mais concretamente nos dias 0, 3, 13, 20, 31 e 45, os grupos de amostras de peras foram avaliados, em triplicado, a nível de perda de massa, de firmeza, do pH e do teor de acidez titulável, do conteúdo de sólidos solúveis, e no último dia realizou-se uma análise sensorial com um painel de analisadores. Os resultados dos testes de tempo de prateleira concluíram que houve uma tendência de aumento de perda de massa com a evolução do tempo de armazenamento uniforme entre os diferentes grupos de amostras de peras, sem diferenças significativas entre os tratamentos. Da mesma forma, a firmeza das peras foi diminuindo ao longo do tempo e verificou-se que, a partir do dia 20, os revestimentos (ativo e normal) proporcionaram um atraso na diminuição deste parâmetro, em comparação com as peras sem revestimento. Os valores de pH, de acidez titulável e do conteúdo de sólidos solúveis mantiveram-se estatisticamente constantes com o decorrer do tempo, sem diferenças significativas entre os vários grupos de amostras de peras nos mesmos dias de testagem e entre os mesmos grupos em diferentes dias de testagem. Relativamente à análise sensorial, as peras com

revestimento normal singraram com as melhores classificações nos parâmetros da firmeza/textura odor, homogeneidade (aparência) e apreciação pessoal, e as peras sem revestimento foram as melhores classificadas a nível de cor. Lamentavelmente, as peras com revestimento ativo foram as piores classificadas de uma forma geral. No entanto, analisando as imagens capturadas do exterior das várias amostras de peras ao longo do tempo de armazenamento, observa-se que, ao contrário das restantes, as peras com revestimento ativo até ao dia 31 não demonstraram sinais de apodrecimento. Contudo, a partir desse dia houve um declínio significativo do estado de maturação de todas as peras, afetando inclusivamente as peras com revestimento ativo.

Neste sentido, é possível aferir que o revestimento ativo, e ainda o revestimento normal, não tiveram um impacto positivo no aumento do tempo de prateleira das peras, como era idealizado, tendo-se observado uma tendência uniforme dos resultados obtidos, nos vários testes de qualidade, sem diferenças significativas em todas as peras. Portanto, em suma, a criação de um revestimento edível para melhorar a qualidade e aumentar o tempo de vida da pera não foi conseguida

As principais justificações para estes resultados estão relacionadas com o carácter destrutivo da maior parte dos testes, que implicavam a utilização de novos grupos de frutas em cada dia de testagem. Por sua vez, ainda que esforços tenham sido feitos, não foi possível obter peras com o mesmo grau de maturação, forma e tamanho, o que pode ter induzido a resultados imprecisos. Como mencionado, nos testes de determinação do conteúdo de sólidos solúveis e da acidez titulável, a dupla filtração pode ter sido excessiva, removendo açúcares em demasia. Posto isto, e consoante todas as conclusões obtidas ao longo do projeto, surgem algumas sugestões de trabalho futuro como a obtenção das frutas de um produtor local, que assegure um estado de maturação uniforme entre as mesmas, em vez de um supermercado, onde não é possível controlar totalmente esta questão. Seria igualmente interessante repetir os testes apenas com uma filtração, testar outro método de aplicação do revestimento, como o método de *spray*, e ainda repetir os ensaios em condições de refrigeração. Ademais, a análise sensorial deveria ter sido realizada por um painel mais alargado de provadores que fossem especializados na área, de forma a obter resultados mais fidedignos.

REFERÊNCIAS

- [1] World Health Organization, "WHO ESTIMATES OF THE GLOBAL BURDEN OF FOODBORNE DISEASES: executive summary." World Health Organization, 2015.
- [2] International Food Information Council, "2020 Food & Health Survey," 2020, [Online]. Available: <https://foodinsight.org/wp-content/uploads/2020/06/IFIC-Food-and-Health-Survey-2020.pdf>.
- [3] Y. Q. Wang, Q. S. Li, X. Q. Zheng, J. L. Lu, and Y. R. Liang, "Antiviral effects of green tea EGCG and its potential application against COVID-19," *Molecules*, vol. 26, no. 13, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3390/molecules26133962.
- [4] M. J. Fabra, I. Falcó, W. Randazzo, G. Sánchez, and A. López-Rubio, "Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts," *Food Hydrocoll.*, vol. 81, pp. 96–103, 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.02.026.
- [5] I. Falcó, P. L. Flores-Meraz, W. Randazzo, G. Sánchez, A. López-Rubio, and M. J. Fabra, "Antiviral activity of alginate-oleic acid based coatings incorporating green tea extract on strawberries and raspberries," *Food Hydrocoll.*, vol. 87, pp. 611–618, 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.08.055.
- [6] A. Guimarães, L. Abrunhosa, L. M. Pastrana, and M. A. Cerqueira, "Edible Films and Coatings as Carriers of Living Microorganisms: A New Strategy Towards Biopreservation and Healthier Foods," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 17, no. 3, pp. 594–614, 2018, doi: 10.1111/1541-4337.12345.
- [7] N. A. & M. S. Kumar Raghav, "(Pdf) Edible Coating of Fruits and Vegetables: a Review," *Edible Coat. Fruits Veg. a Rev.*, vol. I, no. I, pp. 188–204, 2016, [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/331298687_EDIBLE_COATING_OF_FRUITS_AND_VEGETABLES_A_REVIEW.
- [8] A. C. Pinheiro, M. A. Cerqueira, B. W. S. Souza, J. T. Martins, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, "Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares," *Bol. da Biotecnol.*, vol. Outubro, pp. 18–29, 2010, [Online]. Available: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/16725/1/3559.pdf>.
- [9] M. Vargas, C. Pastor, A. Albors, and A. Chiralt, "Development of Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables : Possibilities and Limitations," 2008.
- [10] C. A. Campos, L. N. Gerschenson, and S. K. Flores, "Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 4, no. 6, pp. 849–875, 2011, doi: 10.1007/s11947-010-0434-1.

- [11] S. M. Jafari, Ed., "Application of Nano/Microencapsulated Ingredients in Food Products," *Nanoencapsulation in the Food Industry. Nanoencapsulation in the Food Industry*. vol. 6, 1st edition, pp. 221-258. Academic Press, 2020.
- [12] D. Lin and Y. Zhao, "Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 6, no. 3, pp. 60–75, 2007, doi: 10.1111/j.1541-4337.2007.00018.x.
- [13] E. A. Baldwin, R. D. Hagenmaier, and J. Bai, *Edible coatings and films to improve food quality, second edition*. 2011.
- [14] P. S. Pooja Saklani, S. nath, S. Kishor Das, and S. M. Singh, "A Review of Edible Packaging for Foods," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 8, no. 07, pp. 2885–2895, 2019, doi: 10.20546/ijcmas.2019.807.359.
- [15] M.-P. M., "Biopolymers in the fabrication of edible and biodegradable materials for food preservation," *Food Preserv. by Moisture Control Fundam. Appl.*, no. January, pp. 849–868, 1995.
- [16] M. M. Skoryakov, "Chemical polishing of crystal ware," *Glas. Ceram.*, vol. 15, no. 2, pp. 61–64, 1958, doi: 10.1007/BF00668465.
- [17] M. J. Costa, A. M. Marques, L. M. Pastrana, J. A. Teixeira, S. M. Sillankorva, and M. A. Cerqueira, "Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio," *Food Hydrocoll.*, vol. 81, pp. 442–448, 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.03.014.
- [18] A. Amanatidou, R. A. Slump, L. G. M. Gorris, and E. J. Smid, "High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots," *J. Food Sci.*, vol. 65, no. 1, pp. 61–66, 2000, doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb15956.x.
- [19] O. B. G. Assis and D. de Britto, "Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações," *Brazilian J. Food Technol.*, vol. 17, no. 2, pp. 87–97, 2014, doi: 10.1590/bjft.2014.019.
- [20] K. V. De Souza, P. Peralta-zamora, and S. Faria, "Imobilização de ferro (II) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processos fenton," vol. 31, no. 5, pp. 1145–1149, 2008.
- [21] A. C. M. Branco, "Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz Mestrado Integrado Em Medicina Dentária," *Eng. dos tecidos e órgãos sucessos e desafios*, pp. 30–45, 2016, [Online]. Available: <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/13009>.

- [22] X. Dong, R. E. Wrolstad, and D. Sugar, "Extending shelf life of fresh-cut pears," *J. Food Sci.*, vol. 65, no. 1, pp. 181–186, 2000, doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb15976.x.
- [23] S. Y. Lin and J. M. Krochta, "Whey protein coating efficiency on mechanically roughened hydrophobic peanut surfaces," *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 6, 2006, doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00063.x.
- [24] M. A. Rojas-Graü, R. Soliva-Fortuny, and O. Martín-Belloso, "Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 10, pp. 438–447, 2009, doi: 10.1016/j.tifs.2009.05.002.
- [25] E. Robilotti, S. Deresinski, and B. A. Pinsky, "Norovirus," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 1, pp. 134–164, 2015, doi: 10.1128/CMR.00075-14.
- [26] P. S. Negi, "Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 156, no. 1, pp. 7–17, 2012, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006.
- [27] D. H. Gilling, M. Kitajima, J. R. Torrey, and K. R. Bright, "Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 116, no. 5, pp. 1149–1163, 2014, doi: 10.1111/jam.12453.
- [28] C. Amankwaah, J. Li, J. Lee, and M. A. Pascall, "Antimicrobial Activity of Chitosan-Based Films Enriched with Green Tea Extracts on Murine Norovirus, Escherichia coli, and Listeria innocua," *Int. J. Food Sci.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/3941924.
- [29] C. Geller, M. Varbanov, and R. E. Duval, "Human coronaviruses: Insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies," *Viruses*, vol. 4, no. 11, pp. 3044–3068, 2012, doi: 10.3390/v4113044.
- [30] D. hai Zhang, K. lun Wu, X. Zhang, S. qiong Deng, and B. Peng, "In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus," *J. Integr. Med.*, vol. 18, no. 2, pp. 152–158, 2020, doi: 10.1016/j.joim.2020.02.005.
- [31] U. Pinto, M. Landgraf, and B. Franco, "DETERIORAÇÃO MICROBIANA DOS ALIMENTOS."
- [32] J. Y. Lim, J. W. Yoon, and C. J. Hovde, "A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, 2010, doi: 10.4014/jmb.0908.08007.
- [33] J. Kadariya, T. C. Smith, and D. Thapaliya, "Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/827965.

- [34] A. Lucera, C. Costa, A. Conte, and M. A. Del Nobile, "Food applications of natural antimicrobial compounds," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. AUG, pp. 1–13, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00287.
- [35] L. Sánchez-González, M. Vargas, C. González-Martínez, A. Chiralt, and M. Cháfer, "Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review," *Food Eng. Rev.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, 2011, doi: 10.1007/s12393-010-9031-3.
- [36] M. Aider, "Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 6, pp. 837–842, 2010, doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.021.
- [37] H. Aloui and K. Khwaldia, "Natural Antimicrobial Edible Coatings for Microbial Safety and Food Quality Enhancement," vol. 00, pp. 1–24, 2016, doi: 10.1111/1541-4337.12226.
- [38] R. Gyawali and S. A. Ibrahim, "Natural products as antimicrobial agents," *Food Control*, vol. 46, pp. 412–429, 2014, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.
- [39] M. Mastromatteo, M. Mastromatteo, A. Conte, and M. A. Del Nobile, "Advances in controlled release devices for food packaging applications," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 21, no. 12, pp. 591–598, 2010, doi: 10.1016/j.tifs.2010.07.010.
- [40] D. H. Van Thiel, J. S. Gavalier, and R. R. Schade, "Liver disease and the hypothalamic pituitary gonadal axis.," *Semin. Liver Dis.*, vol. 5, no. 1, pp. 35–45, 1985, doi: 10.1055/s-2008-1041756.
- [41] M. Carocho, P. Morales, and I. C. F. R. Ferreira, "Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 107–120, 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2017.11.008.
- [42] T. Thanyacharoen, P. Chuysinuan, S. Techasakul, P. Nooeaid, and S. Ummartyotin, "Development of a gallic acid-loaded chitosan and polyvinyl alcohol hydrogel composite: Release characteristics and antioxidant activity," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, no. PartA, pp. 363–370, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.002.
- [43] X. Sun, Z. Wang, H. Kadouh, and K. Zhou, "The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 57, no. 1, pp. 83–89, 2014, doi: 10.1016/j.lwt.2013.11.037.
- [44] M. Akgün, I. Başaran, S. C. Suner, and A. Oral, "Geraniol and cinnamaldehyde as natural antibacterial additives for poly(lactic acid) and their plasticizing effects," *J. Polym. Eng.*, no. December, 2019, doi: 10.1515/polyeng-2019-0198.
- [45] Comissão Europeia, "REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N. o 872/2012 DA COMISSÃO de 1

- de outubro de 2012,” *J. Of. da União Eur.*, vol. 267, pp. 1–161, 2012.
- [46] S. Burt, “Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- [47] S. Agarwal, M. Hoque, N. Bandara, K. Pal, and P. Sarkar, “Synthesis and characterization of tamarind kernel powder-based antimicrobial edible films loaded with geraniol,” *Food Packag. Shelf Life*, vol. 26, no. June, p. 100562, 2020, doi: 10.1016/j.fpsl.2020.100562.
- [48] U. Siripatrawan and B. R. Harte, “Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract,” *Food Hydrocoll.*, vol. 24, no. 8, pp. 770–775, 2010, doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.04.003.
- [49] J. Xu, J. Wang, F. Deng, Z. Hu, and H. Wang, “Green tea extract and its major component epigallocatechin gallate inhibits hepatitis B virus in vitro,” *Antiviral Res.*, vol. 78, no. 3, pp. 242–249, 2008, doi: 10.1016/j.antiviral.2007.11.011.
- [50] S. Ciesek *et al.*, “The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry,” *Hepatology*, vol. 54, no. 6, pp. 1947–1955, 2011, doi: 10.1002/hep.24610.
- [51] R. K. Grizotto, S. A. G. Berbari, S. C. S. R. De Moura, and M. L. Claus, “Shelf life studies of restructured and dried fruit made from concentrated papaya pulp,” *Cienc. e Tecnol. Aliment.*, vol. 26, no. 3, pp. 709–714, 2006, doi: 10.1590/s0101-20612006000300035.
- [52] D. Rico, A. B. Martin-Diana, J. M. Barat, and C. Barry-Ryan, “Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 18, no. 7, pp. 373–386, 2007, doi: 10.1016/j.tifs.2007.03.011.
- [53] J. Espinosa, *Evaluacion sensorial de los alimentos*. 2007.
- [54] A. A. Saquet, “Physiology and Biochemistry of ‘Rocha’ Pear During Ripening and Long-Term Controlled Atmosphere Storage,” 2017.
- [55] B. C. H. Practical, “Determination of total acidity of food,” *Ind. Microbiol.*, 1994.
- [56] B. Maringgal, N. Hashim, I. S. Mohamed Amin Tawakkal, and M. T. Muda Mohamed, “Recent advance in edible coating and its effect on fresh/fresh-cut fruits quality,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 96, no. December 2019, pp. 253–267, 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2019.12.024.
- [57] J. K. Brecht *et al.*, “Fresh-Cut Vegetables and Fruits,” *Horitultural Reviews.*, vol. 30, 2004.
- [58] M. S. de Martin, C. A. Steffens, C. V. T. do Amarante, A. Brackmann, M. F. Rodrigues, and C. Soethe, “Peras ‘rocha’ armazenadas em atmosfera controlada com ultrabaixo O₂ e com baixo O₂ associado a diferentes teores de CO₂,” *Rev. Bras. Frutic.*, vol. 39, no. 5, 2017, doi:

- 10.1590/0100-29452017143.
- [59] A. Possas, F. J. Benítez, D. Savran, N. J. Brotóns, P. J. Rodríguez, and G. D. Posada-Izquierdo, *Quantitative Tools and Procedures for Shelf Life Determination in Minimally Processed Fruits and Vegetables*. 2018.
 - [60] H. Abramović and P. Ulrih, "Relevance and Standardization of In Vitro Antioxidant Assays : ABTS , DPPH , and Folin – Ciocalteu," vol. 2018, 2018.
 - [61] P. Molyneux, "The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity," vol. 50, no. June 2003.
 - [62] L. F. Ballesteros, M. A. Cerqueira, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, "Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment," *Carbohydr. Polym.*, vol. 127, pp. 347–354, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.03.047.
 - [63] M. M. Vuolo, V. S. Lima, M. Roberto, and M. Junior, *Classification , and Antioxidant Power*. Elsevier Inc., 2019.
 - [64] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
 - [65] S. International, "International Standard ISO 22196," *Ergonomics*, vol. 2000, 2002.
 - [66] V. Cruz *et al.*, "Improvement of Shelf Life and Sensory Quality of Pears Using a Specialized Edible Coating," *J. Chem.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/138707.
 - [67] R. D. Andrade, O. Skurtys, and F. A. Osorio, "Atomizing Spray Systems for Application of Edible Coatings," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 11, no. 3, pp. 323–337, 2012, doi: 10.1111/j.1541-4337.2012.00186.x.
 - [68] Y. Li *et al.*, "Shelf-life, quality, safety evaluations of blueberry fruits coated with chitosan nano-material films," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1038/s41598-020-80056-z.
 - [69] H. Struszczyk, "Preparation of chitosan fibres," *Chitin Handb.*, pp. 340–437, 1997.
 - [70] P. H. England, "Detection and enumeration of bacteria in swabs and other environmental samples National Infection Service Food Water and Environmental Microbiology Standard Method About Public Health England," no. 4, p. 22, 2017.
 - [71] A. Em and F. E. Hortaliças, "Acidez em frutas e hortaliças," no. July, 2015.
 - [72] N. Del Socorro Cruz-Cansino *et al.*, "Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 27, no. 1, pp. 277–286, 2015, doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.05.040.

- [73] E. Technology, S. A. Standard, S. Jis, and S. E. K. Reference, "Functionality test : Antiviral test," pp. 2–3, 1922.
- [74] H. I. Umar, B. Siraj, A. Ajayi, T. O. Jimoh, and P. O. Chukwuemeka, "Molecular docking studies of some selected gallic acid derivatives against five non- structural proteins of novel coronavirus," vol. 7, 2021.
- [75] M. G. Salas *et al.*, "Gallic acid decreases hepatitis C virus expression through its antioxidant capacity," pp. 619–624, 2016, doi: 10.3892/etm.2015.2923.
- [76] J. M. Kratz *et al.*, "Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate," vol. 103, no. June, pp. 437–442, 2008.
- [77] R. Domain *et al.*, "Geranium and Lemon Essential Oils and Their Active Compounds Downregulate Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain, in Epithelial Cells," vol. 2, no. December 2019.
- [78] S. T. S. Hassan and K. Berchova, "In Vitro Study of Multi-Therapeutic Properties of Thymus bovei Benth . In Vitro Study of Multi-Therapeutic Properties of Thymus bovei Benth . Essential Oil and Its Main Component for Promoting Their Use in Clinical Practice," no. September, 2018, doi: 10.3390/jcm7090283.
- [79] M. Mileva *et al.*, "ACTA MICROBIOLOGICA BULGARICA Investigation of Antioxidant and Antiviral Properties of Geraniol."
- [80] J. Liu *et al.*, "Epigallocatechin gallate from green tea effectively blocks infection of SARS - CoV - 2 and new variants by inhibiting spike binding to ACE2 receptor," *Cell Biosci.*, pp. 1–15, 2021, doi: 10.1186/s13578-021-00680-8.
- [81] C. E. Isaacs *et al.*, "Epigallocatechin Gallate Inactivates Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus ," vol. 52, no. 3, pp. 962–970, 2008, doi: 10.1128/AAC.00825-07.
- [82] Y. Y. Lim, "Antioxidant properties of guava fruit : Comparison with some local fruits ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GUAVA FRUIT : COMPARISON WITH SOME LOCAL FRUITS," no. April, 2015.
- [83] F. Hsu, W. Huang, T. Wu, M. Lee, and L. Chen, "Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Polyphenolics from Pods of *Caesalpinia pulcherrima*," pp. 6073–6088, 2012, doi: 10.3390/ijms13056073.
- [84] T. Yokozawa, C. P. Chen, E. Dong, and T. Tanaka, "Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1 , 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical," vol. 56, no. 98, pp. 213–222, 1998.
- [85] K. Malinda, H. Sutanto, and A. Darmawan, "Characterization and Antioxidant Activity of Gallic Acid

- Derivative,” vol. 020030, 2017.
- [86] V. Pachauri and S. J. S. Flora, “Combined Efficacy of Gallic Acid and MiADMSA with Limited Beneficial Effects over MiADMSA against Arsenic-induced Oxidative Stress in Mouse Combined Efficacy of Gallic Acid and MiADMSA with Limited Beneficial Effects Over MiADMSA Against Arsenic-induced O,” no. May, 2016, doi: 10.4137/BCI.S30505.
- [87] A. U. J. Unachukwu *et al.*, “White and Green Teas (*Camellia sinensis* var . *sinensis*): Variation in Phenolic , Methylxanthine , and Antioxidant Profiles *sinensis*): Variation in Phenolic , Methylxanthine , and Antioxidant Profiles,” vol. 6, no. 6, 2010, doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01705.x.Made.
- [88] S. P. J. N. Senanayake, “Green tea extract : Chemistry , antioxidant properties and food applications – A review,” *J. Funct. Foods*, vol. 5, no. 4, pp. 1529–1541, 2013, doi: 10.1016/j.jff.2013.08.011.
- [89] S. Prasad and M. Muralidhara, “Analysis of the antioxidant activity of geraniol employing various in-vitro models : Relevance to neurodegeneration in diabetic neuropathy,” no. July, 2017, doi: 10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18564.
- [90] W. Chen and A. M. Viljoen, “Geraniol — A review of a commercially important fragrance material,” *South African J. Bot.*, vol. 76, no. 4, pp. 643–651, 2010, doi: 10.1016/j.sajb.2010.05.008.
- [91] I. Chikhi, F. Dergal, D. M. Gana, M. El, A. Dib, and H. Chaker, “Applied Biotechnology Reports Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Solenostemma oleifolium* Essential Oil From Southern,” vol. 6, no. 2, pp. 50–54, 2019, doi: 10.29252/JABR.06.02.02.
- [92] X. Zhang, F. Song, M. Taxipalati, W. Wei, F. Feng, and C. S. Chen, “Comparative study of surface-active properties and antimicrobial activities of disaccharide monoesters,” *PLoS One*, vol. 9, no. 12, pp. 1–19, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0114845.
- [93] L. Zhao, H. Zhang, T. Hao, and S. Li, “In vitro antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food-related bacteria,” *Food Chem.*, vol. 187, pp. 370–377, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.108.
- [94] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, “The bacterial cell envelope.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 5, 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- [95] K. R. Atanasova, “Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs,” no. January 2010, p. 140, 2010, [Online]. Available: https://www.researchgate.net/profile/Kalina_Atanasova/publication/294263540/figure/fig2/AS:478497148805120@1491094018230/Schematic-structure-of-Gram-positive-and-Gram-

- negative-cell-walls-Gram-positive-cell.ppm.
- [96] "INTERNATIONAL STANDARD Textiles — Determination of antibacterial activity of textile," vol. 2021, 2021.
- [97] C. Ferreira, M. J. Saavedra, and M. Simo, "Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic," vol. 00, no. 0, 2013, doi: 10.1089/mdr.2012.0244.
- [98] M. Sultan, O. M. Hafez, A. Saleh, and A. M. Youssef, "Smart edible coating films based on chitosan and beeswax – pollen grains for the postharvest preservation of Le Conte pear," pp. 9572–9585, 2021, doi: 10.1039/d0ra10671b.
- [99] R. D. Hagenmaier and R. A. Baker, "rK H," 1993.
- [100] F. Fruits, "EFFECT OF CANDELILLA WAX WITH NATURAL," vol. 30, no. 2007, pp. 823–836.
- [101] B. William, P. R. Hussain, R. S. Meena, M. A. Dar, and A. M. Wani, "Carboxymethyl Cellulose Coating and Low-Dose Gamma Irradiation Improves Storage Quality and Shelf Life of Pear (Pyrus Communis L., Cv .)," vol. 75, no. 9, pp. 586–596, 2010, doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01868.x.
- [102] A. Nath, B. C. Deka, A. Singh, and R. K. Patel, "Extension of shelf life of pear fruits using different packaging materials," vol. 49, no. October, pp. 556–563, 2012, doi: 10.1007/s13197-011-0305-4.
- [103] T. Muziri, K. I. Theron, H. H. Nieuwoudt, L. Schoeman, and E. M. Crouch, "Mealiness in 'Forelle' pears: relationship between TSS and prediction based on FT-NIR spectroscopy," 2018, doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1201.46.
- [104] N. B. Gol, P. R. Patel, and T. V. R. Rao, "Postharvest Biology and Technology Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 85, pp. 185–195, 2013, doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.06.008.
- [105] P. E. Zerbin, "The Quality of Pear Fruit," pp. 805–810, 2002.
- [106] A. A. Saquet, J. Streif, and D. P. F. Almeida, "Responses of 'Rocha' pear to delayed controlled atmosphere storage depend on oxygen partial pressure," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 222, no. May, pp. 17–21, 2017, doi: 10.1016/j.scienta.2017.05.006.

ANEXOS

ANEXO I – TESTES ANTIOXIDANTES

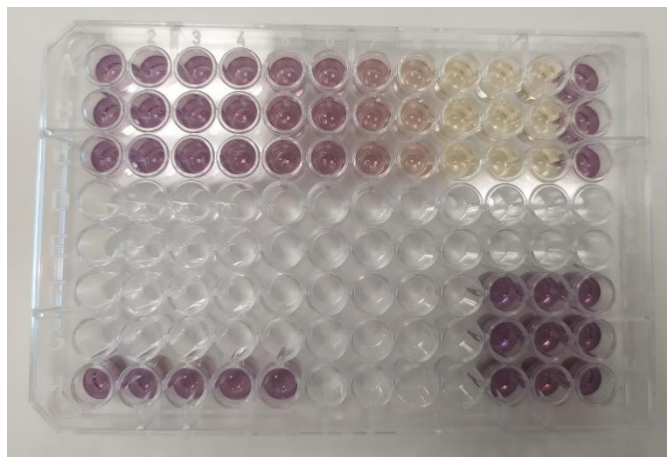


Figura A 1. Microplaca com a curva padrão de Trolox no ensaio DPPH.

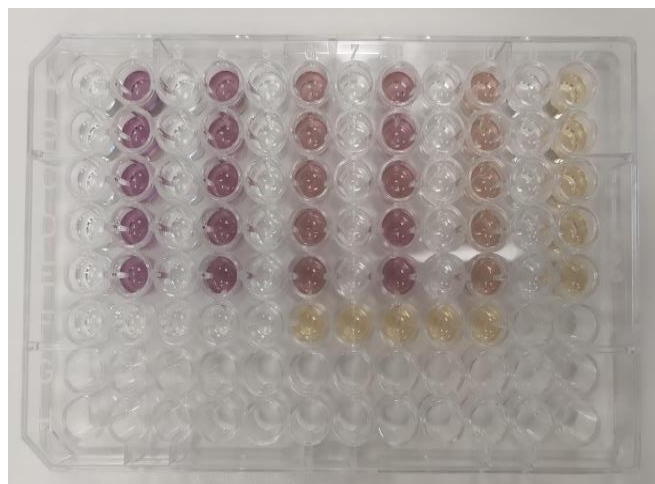


Figura A 2. Microplaca com as várias concentrações das amostras no ensaio DPPH.

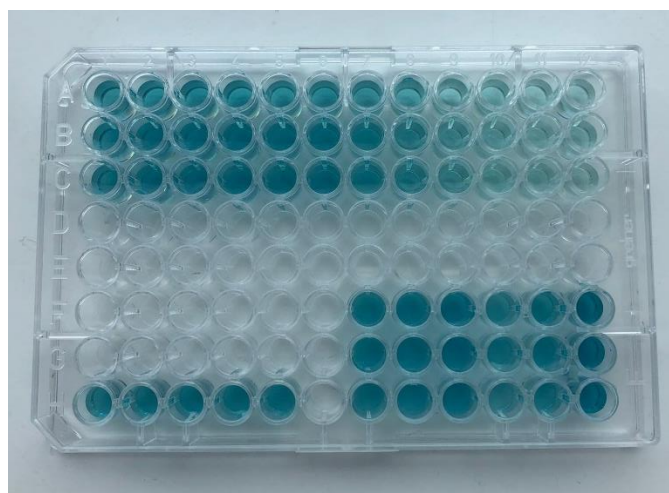


Figura A 3. Microplaca com a Curva padrão de Trolox no ensaio ABTS.

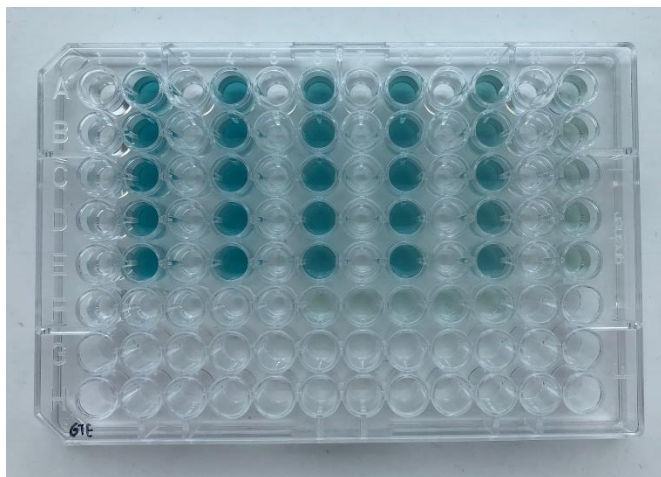


Figura A 4. Microplaca com as várias concentrações das amostras no ensaio ABTS.

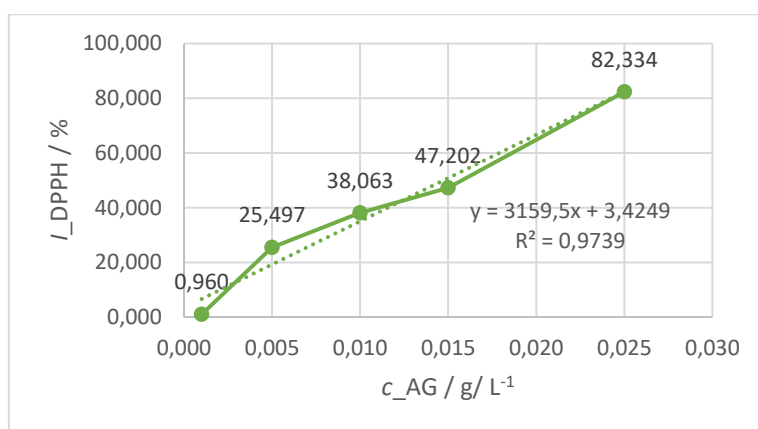


Figura A 5. Atividade antioxidante do ácido gálico, pelo método DPPH.

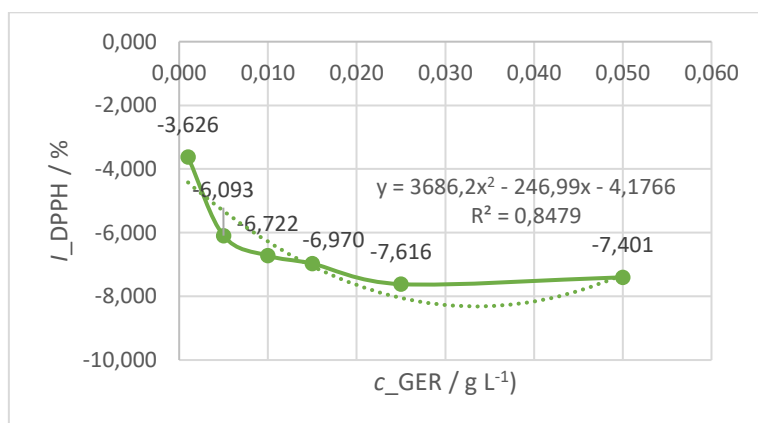


Figura A 6. Atividade antioxidante do geraniol, pelo método DPPH.

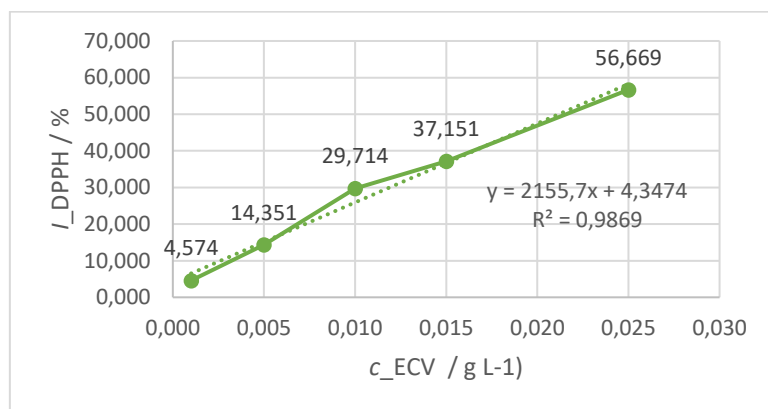


Figura A 7. Atividade antioxidante do extrato de chá verde, pelo método DPPH.

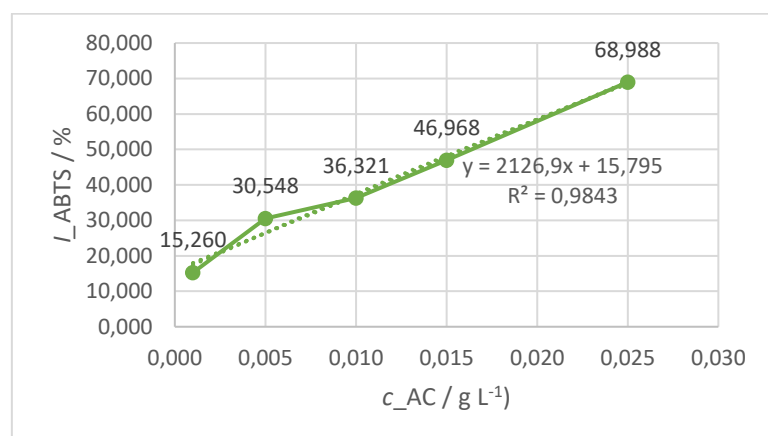


Figura A 8. Atividade antioxidante do ácido gálico, pelo método ABTS.

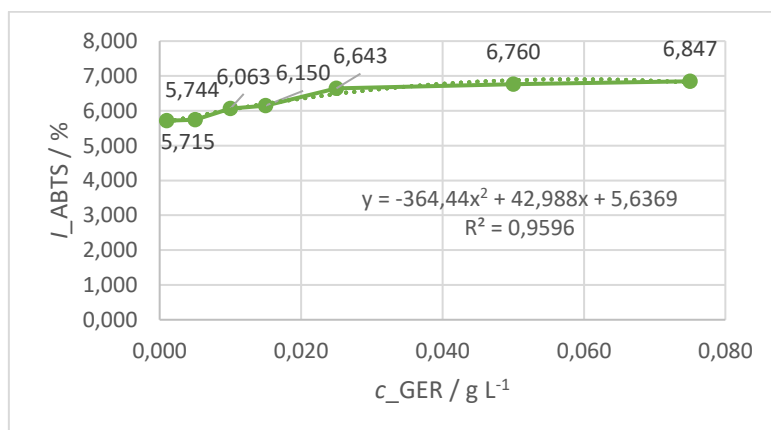


Figura A 9. Atividade antioxidante do geraniol, pelo método ABTS.

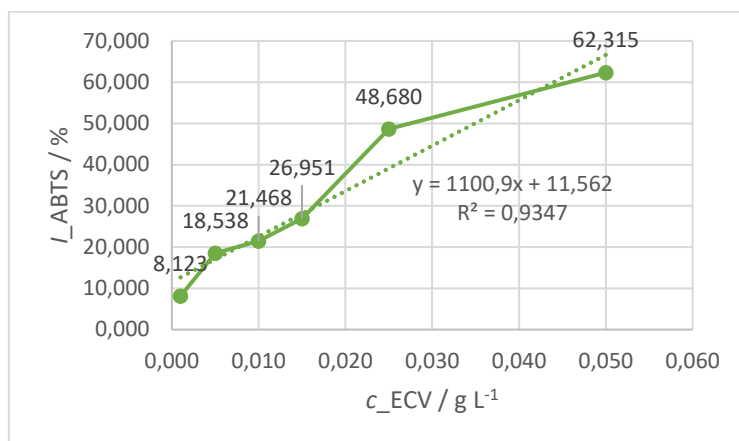


Figura A 10. Atividade antioxidante do extrato de chá verde, pelo método ABTS.

ANEXO II – FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Consumer acceptance

Sensory analysis survey - Consumer acceptance on coated pears

Main goal

Within the scope of the COVICOAT project, an active coating was developed to be applied to pears, whose objective is to prolong their shelf life. Thus, this sensory analysis is mainly focused on ascertaining consumer acceptance of 3 sets of pears (untreated pears, active-coated pears and normal-coated pears) at the end of their storage time.

Participants will have to observe the samples and indicate on a form a justified score of a series of characteristics and attributes related to the organoleptic quality of the different products, for example: color, odor, firmness/texture, homogeneity (general appearance) and personal appreciation.

Sensory analysis form

Score each attribute of the samples according to the values that are indicated at the bottom and note your opinion in observations.

Attribute	Pear 1	Pear 2	Pear 3	Pear 4	Pear 5	Pear 6	Pear 7	Pear 8	Pear 9	Observations
Homogeneity (appearance)										
Color										
Odor										
Texture/ firmness										
Personal appreciation										

Homogeneity / color / odor / texture classification	Personal appreciation classification
5 - Very good	5 - I really like it
4 - Good	4 - I Like it
3 - Acceptable	3 - Neither like nor dislike
2 - Bad	2 - I do not like
1 - Very bad	1 - I really don't like it

2BNanoFood

Figura A 11. Exemplar da ficha de análise sensorial.

ANEXO III – DADOS DOS TESTES DE TEMPO DE PRATELEIRA

Tabela A 1. Massa das peras (g) ao longo do tempo de armazenamento

Dia	0	3	13	20	31	45
Pera com revestimento ativo 1	191,80	189,63	183,21	179,03	172,85	165,52
Pera com revestimento ativo 2	161,93	159,92	153,88	150,15	144,39	137,87
Pera com revestimento ativo 3	173,82	171,87	165,61	161,59	155,66	148,27
Média	175,85	173,81	167,56	163,59	157,63	150,55
Pera com revestimento normal 1	182,92	180,91	174,82	170,28	165,08	156,45
Pera com revestimento normal 2	188,49	185,69	177,47	172,28	164,73	155,71
Pera com revestimento normal 3	181,65	179,01	171,45	166,68	159,71	151,33
Média	184,35	181,87	174,58	169,74	163,17	154,50
Pera sem revestimento 1	177,93	175,95	170,07	166,25	160,53	154,07
Pera sem revestimento 2	174,41	172,33	166,26	162,53	157,24	150,63
Pera sem revestimento 3	196,07	193,61	186,23	181,67	175,06	166,80
Média	182,80	180,63	174,19	170,15	164,28	157,17

Tabela A 2. Perda de massa (%) das peras ao longo do tempo de armazenamento

Dia	0	3	13	20	31	45
Pera com revestimento ativo 1	0	1,13	4,48	6,65	9,88	13,70
Pera com revestimento ativo 2	0	1,24	4,97	7,27	10,83	14,86
Pera com revestimento ativo 3	0	1,12	4,73	7,04	10,45	14,70
Média	0	1,17	4,73	6,99	10,39	14,42
Pera com revestimento normal 1	0	1,10	4,43	6,91	9,75	14,47
Pera com revestimento normal 2	0	1,49	5,85	8,60	12,61	17,39
Pera com revestimento normal 3	0	1,45	5,61	8,24	12,08	16,69
Média	0	1,35	5,30	7,92	11,48	16,18
Pera sem revestimento 1	0	1,11	4,42	6,56	9,78	13,41
Pera sem revestimento 2	0	1,19	4,67	6,81	9,85	13,63
Pera sem revestimento 3	0	1,26	5,02	7,35	10,72	14,93
Média	0	1,19	4,70	6,91	10,11	13,99

Tabela A 3. Firmeza (N) das peras ao longo do tempo de armazenamento

Dia	Pera 1	Pera 2	Pera 3	Pera 4	Pera 5	Pera 6	Pera 7	Pera 8	Pera 9
0	29,95	19,54	20,42	19,72	26,01	18,72	23,74	18,43	23,49
	22,12	24,63	27,94	18,79	28,73	20,09	25,77	24,30	29,00
	21,56	18,17	18,82	21,27	21,14	21,81	29,76	23,86	26,23
Média	24,54	20,78	22,39	19,92	25,29	20,20	26,42	22,20	26,24
3	25,72	21,73	22,88	27,48	27,69	20,50	18,19	20,53	25,82
	25,21	26,12	26,04	34,83	23,78	24,33	16,43	20,17	27,03
	21,52	28,08	19,75	19,75	19,75	19,75	26,33	24,65	19,37
Média	24,15	25,31	22,89	24,09	27,04	22,49	20,32	21,79	24,07
13	25,21	23,29	14,78	24,02	31,46	27,48	19,32	26,66	22,09
	25,66	26,43	20,94	23,33	21,85	22,37	24,15	22,55	16,37
	24,83	26,46	19,35	24,90	27,81	17,62	23,28	29,53	18,74
Média	25,23	25,39	18,35	24,09	27,04	21,53	22,25	26,25	19,07
20	16,04	26,87	29,06	26,98	11,74	12,04	5,72	8,53	10,95
	12,89	26,55	14,65	25,08	11,89	17,60	4,56	7,70	17,41
	14,98	26,73	24,36	31,23	12,87	17,65	4,09	7,40	9,26
Média	14,64	26,72	22,69	27,76	12,17	15,76	4,79	7,88	12,54
31	20,52	8,00	10,12	20,96	12,11	10,95	15,81	6,16	4,44
	15,35	8,00	10,29	15,54	13,90	8,09	11,58	5,00	6,67
	21,21	7,72	8,54	19,60	8,87	9,13	11,52	6,01	6,60
Média	19,03	7,91	9,65	18,70	11,63	9,39	12,97	5,72	5,90
45	31,01	10,20	1,31	22,56	3,52	11,73	1,85	1,87	0,61
	29,10	13,73	9,17	4,45	8,49	12,66	2,07	4,40	0,89
	25,30	10,31	2,85	22,64	6,54	12,26	1,89	3,22	1,10
Média	28,47	11,41	4,44	16,55	6,18	12,22	1,93	3,16	0,87

Nota: Pera 1, pera com revestimento ativo 1; Pera 2, pera com revestimento ativo 2; Pera 3, pera com revestimento ativo 3; Pera 4, pera com revestimento normal 1; Pera 5, pera com revestimento normal 2; Pera 6, pera com revestimento normal 3; Pera 7, pera sem revestimento 1; Pera 8, pera sem revestimento 2; Pera 9, pera sem revestimento 3.

Tabela A 4. Valores de pH das peras ao longo do tempo de armazenamento

Dia	0	3	13	20	31	45
Pera com revestimento ativo 1	5,23	5,25	4,91	5,27	4,71	5,32
Pera com revestimento ativo 2	5,01	5,54	4,92	5,59	4,89	5,18
Pera com revestimento ativo 3	5,18	5,13	4,63	5,63	5,06	5,36
Média	5,14	5,31	4,82	5,50	4,89	5,29
Pera com revestimento normal 1	4,89	5,60	5,19	4,76	5,23	5,31
Pera com revestimento normal 2	5,18	5,18	5,25	4,92	5,31	4,96
Pera com revestimento normal 3	5,34	5,11	4,79	5,66	6,00	5,34
Média	5,14	5,30	5,08	5,11	5,51	5,20
Pera sem revestimento 1	4,93	5,34	4,93	5,43	4,96	4,40
Pera sem revestimento 2	5,06	5,09	4,98	4,95	4,88	5,30
Pera sem revestimento 3	4,60	5,20	4,67	4,84	4,98	4,55
Média	4,86	5,21	4,86	5,07	4,94	4,75

Tabela A 5. Conteúdo de sólidos solúveis (°Brix) das peras ao longo do tempo de armazenamento

Dia	3	13	20	31	45
Pera com revestimento ativo 1	1,6	1,7	1,6	1,8	1,6
Pera com revestimento ativo 2	1,5	1,7	1,7	1,8	1,7
Pera com revestimento ativo 3	1,6	1,6	1,7	1,8	1,8
Média	1,6	1,7	1,7	1,8	1,7
Pera com revestimento normal 1	1,7	1,6	1,5	1,8	1,8
Pera com revestimento normal 2	1,6	1,4	1,6	1,7	1,8
Pera com revestimento normal 3	1,7	1,7	1,6	1,6	1,8
Média	1,7	1,6	1,6	1,7	1,8
Pera sem revestimento 1	1,7	1,8	1,6	1,8	1,5
Pera sem revestimento 2	1,6	1,7	1,6	1,8	1,6
Pera sem revestimento 3	1,6	1,7	1,4	1,8	1,8
Média	1,6	1,7	1,5	1,8	1,6

Tabela A 6. Valores de acidez titulável (g ácido málico/ 100 g de solução) das peras ao longo do tempo de armazenamento

Dia	3	13	20	31	45
Pera com revestimento ativo 1	0,000017	0,000017	0,000017	0,000050	0,000034
Pera com revestimento ativo 2	0,000034	0,000050	0,000042	0,000042	0,000025
Pera com revestimento ativo 3	0,000034	0,000059	0,000042	0,000025	0,000025
Média	0,000028	0,000042	0,000034	0,000039	0,000028
Pera com revestimento normal 1	0,000025	0,000042	0,000042	0,000025	0,000042
Pera com revestimento normal 2	0,000042	0,000042	0,000034	0,000034	0,000042
Pera com revestimento normal 3	0,000034	0,000050	0,000050	0,000034	0,000034
Média	0,000034	0,000045	0,000042	0,000031	0,000039
Pera sem revestimento 1	0,000050	0,000042	0,000034	0,000034	0,000034
Pera sem revestimento 2	0,000067	0,000042	0,000025	0,000059	0,000034
Pera sem revestimento 3	0,000050	0,000034	0,000042	0,000034	0,000042
Média	0,000056	0,000039	0,000034	0,000042	0,000036

Tabela A 7. Resultados da análise sensorial

Atributo	Classificação	Pera 1	Pera 2	Pera 3	Pera 4	Pera 5	Pera 6	Pera 7	Pera 8	Pera 9
Homogeneidade (aparência)	Pessoa 1	4	2	1	1	4	4	4	2	2
	Pessoa 2	3	2	1	1	5	5	5	2	3
	Pessoa 3	1	1	1	1	1	1	2	1	1
	Pessoa 4	4	3	1	1	4	3	4	2	2
	Pessoa 5	2	3	1	2	4	4	4	1	1
	Pessoa 6	3	1	1	1	2	3	3	2	2
	Pessoa 7	4	1	1	1	3	3	5	2	2
	Pessoa 8	3	2	1	1	3	3	5	1	2
	Pessoa 9	4	2	1	1	3	3	4	2	1
	Pessoa 10	4	2	2	1	4	4	4	2	2
	Pessoa 11	3	2	1	1	4	4	3	2	2
	Pessoa 12	3	2	2	2	3	3	3	2	2
	Pessoa 13	3	2	1	1	3	2	3	2	2
	Média	3	2	1	1	3	3	4	2	2
Cor	Pessoa 1	4	3	2	2	3	3	5	3	4
	Pessoa 2	4	2	1	1	5	5	5	3	3
	Pessoa 3	2	2	2	2	2	2	3	2	2
	Pessoa 4	4	4	1	4	4	3	3	3	2
	Pessoa 5	3	3	2	2	4	4	5	4	4
	Pessoa 6	3	3	3	1	2	2	4	1	4
	Pessoa 7	3	1	1	1	5	5	5	2	2
	Pessoa 8	2	3	1	1	3	3	5	1	1
	Pessoa 9	4	3	1	1	3	3	4	3	2
	Pessoa 10	3	2	2	2	4	3	4	2	2
	Pessoa 11	2	1	1	1	3	3	3	2	2
	Pessoa 12	3	3	1	2	3	3	3	3	3
	Pessoa 13	4	1	1	1	4	3	4	2	2
	Média	3	2	1	2	3	3	4	2	3
Odor	Pessoa 1	5	4	3	2	4	4	4	3	3
	Pessoa 2	3	4	2	1	4	2	4	2	4
	Pessoa 3	1	1	1	1	3	3	3	1	1
	Pessoa 4	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Pessoa 5	4	4	2	3	4	4	4	2	2
	Pessoa 6	4	3	2	2	4	4	3	2	3
	Pessoa 7	4	1	3	3	5	5	5	2	4
	Pessoa 8	2	1	1	1	3	4	3	1	3
	Pessoa 9	4	3	2	1	3	3	3	1	1
	Pessoa 10	4	3	2	2	4	4	4	3	2

	Pessoa 11	4	2	2	2	4	4	3	2	3
	Pessoa 12	3	1	1	1	3	4	3	2	3
	Média	3	3	2	2	4	4	4	2	3
		3			3			3		
Textura/firmeza	Pessoa 1	4	3	1	1	4	4	3	3	2
	Pessoa 2	3	2	1	1	3	4	5	3	2
	Pessoa 3	2	2	2	1	3	3	3	3	3
	Pessoa 4	4	3	4	4	4	3	5	4	3
	Pessoa 5	4	5	1	1	5	4	3	2	2
	Pessoa 6	2	3	1	1	3	3	4	4	3
	Pessoa 7	3	2	1	1	5	5	2	4	3
	Pessoa 8	2	1	1	1	4	3	3	2	2
	Pessoa 9	4	4	1	1	3	4	3	3	2
	Pessoa 10	3	2	1	2	4	4	2	2	2
	Pessoa 11	3	2	1	1	3	3	2	2	2
	Pessoa 12	4	4	1	1	3	3	3	3	2
	Pessoa 13	4	1	1	1	4	3	4	2	3
	Média	3	3	1	1	4	4	3	3	2
		2			3			3		
Apreciação pessoal	Pessoa 1	4	2	1	1	4	4	4	2	2
	Pessoa 2	4	2	1	1	3	3	5	2	2
	Pessoa 3	1	1	1	1	3	4	3	2	2
	Pessoa 4	4	2	1	1	5	3	5	3	2
	Pessoa 5	4	3	1	1	4	4	4	2	2
	Pessoa 6	3	1	1	1	2	2	3	1	2
	Pessoa 7	4	2	1	1	4	4	5	2	3
	Pessoa 8	2	2	1	1	3	3	4	1	2
	Pessoa 9	5	2	1	1	4	4	5	2	1
	Pessoa 10	3	2	1	1	4	4	3	2	2
	Pessoa 11	2	1	1	1	3	3	2	2	2
	Pessoa 12	4	3	1	1	4	4	3	2	2
	Pessoa 13	4	1	1	1	4	4	4	1	1
	Média	3	2	1	1	4	4	4	2	2
		2			3			3		

Nota: Pera 1, pera com revestimento ativo 1; Pera 2, pera com revestimento ativo 2; Pera 3, pera com revestimento ativo 3; Pera 4, pera com revestimento normal 1; Pera 5, pera com revestimento normal 2; Pera 6, pera com revestimento normal 3; Pera 7, pera sem revestimento 1; Pera 8, pera sem revestimento 2; Pera 9, pera sem revestimento 3.