



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

2014/2015

Diana Barbosa Costa

Estudo da utilização de filmes de quitosana como conservante de sumos

Diana Barbosa Costa

Estudo da utilização de filmes de quitosana como conservante de sumos

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Nunes, Investigadora de Pós- Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria do Rosario Gonçalves dos Reis Marques Domingues
Professora auxiliar com agregação do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

arguente

Professor Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-
Montes e Alto Douro

orientador

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes
Investigadora de pós-doutoramento do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Cláudia Nunes pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos e por terem sempre acreditado que a realização deste projeto era possível;

À Professora Doutora Rosário Domingues pela paciência e pelos ensinamentos prestados;

À Doutora Joana Simões pelas longas horas que passou comigo, pela dedicação, pela paciência e pelos pensamentos positivos que sempre me transmitiu;

Aos meus colegas de laboratório da Unidade de Investigação em Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares (QOPNA) pela ajuda, em especial ao António, pelo companheirismo e pela amizade que, certamente, irá ficar;

Aos meus amigos por serem as pessoas especiais que são e por me proporcionarem momentos de verdadeira amizade;

E por último, dirijo um agradecimento especial aos meus pais e irmão, por me incentivarem todos os dias a fazer mais e melhor, pelo carinho e apoio que constantemente me oferecem, e palavras de incentivo nas alturas mais delicadas.

palavras-chave

Refrigerantes à base de fruta, conservação, quitosana, reticulação química, genipina

resumo

A quitosana é um polissacarídeo linear constituído por resíduos de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina que, devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas, tem surgido como uma estratégia alternativa e segura aos conservantes de origem sintética utilizados pela indústria dos sumos. Apesar da utilização deste filmes de quitosana-genipina ser favorável em vinhos, a sua incorporação em refrigerantes, com alto teor de açúcares, levou à sua destruição. Neste estudo, filmes à base de quitosana foram preparados em combinação com uma molécula reticulante, a genipina. Foram avaliados diversos parâmetros durante o armazenamento dos sumos, de forma a aferir acerca da potencialidade dos filmes nestes produtos, tendo-se verificado a diminuição da capacidade antioxidante dos refrigerantes após seis meses de armazenamento. Esta diminuição pode ser explicada pela oxidação dos compostos fenólicos observada ao longo dos seis meses e à degradação do ácido ascórbico. Observou-se também que o escurecimento dos sumos ao longo do período de armazenamento era potenciado na presença dos filmes de quitosana-genipina e sob temperaturas de armazenamento mais elevadas, obtendo-se uma intensidade de escurecimento duas vezes mais intensa após o período de armazenamento nos refrigerantes com filme a 37 °C relativamente ao refrigerante no início do período de armazenamento. A inserção destes filmes no refrigerante de ananás levou à diminuição de alguns compostos voláteis, nomeadamente de alguns ésteres e de *off-flavours* como o diacetilo e a acetoína.

O objetivo da segunda parte do trabalho foi perceber o mecanismo da destruição da reticulação entre a glucosamina e a genipina, responsável pela degradação do filme, na presença de açúcares redutores. Para tal, foram usadas soluções modelo de genipina e glucosamina de forma a simular a reticulação observada nos filmes à base de quitosana. Os resultados obtidos permitem propor estruturas que confirmam duas reações entre a genipina e a glucosamina descritas na literatura: o ataque nucleofílico dos grupos amina primários da glucosamina ao anel dihidropirânico da genipina e a substituição nucleofílica do grupo ester da genipina pelo grupo amina da glucosamina. Depois da adição da glucose, estas estruturas não foram observadas, suportando a hipótese de que a presença de açúcares redutores, nomeadamente da glucose, é a responsável pela degradação das estruturas de genipina-glucosamina. O mecanismo proposto para a degradação do filme descreve a quebra da cadeia de quitosana ligada ao carbono anomérico da glucosamina envolvida na reação de reticulação.

Em conclusão, este trabalho permitiu perceber a reação de reticulação entre a genipina e a glucosamina, e a reação destas estruturas formadas com a glucose. Estas informações são a base para o desenvolvimento de filmes de quitosana-genipina estáveis em refrigerantes com elevado teor em açúcar.

keywords

Fruit soft drinks, preservation, chitosan, chemical crosslinking, genipin

abstract

Chitosan is a linear polysaccharide consisting of residues of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine that, due to its biological and physicochemical properties, has emerged as a safe alternative strategy to synthetic preservatives used in the juice industry. Despite the use of these chitosan-genipin films being favorable in wine, its incorporation in pineapple soft drinks with high sugar content, led to its destruction. In this study, chitosan based films were prepared in combination with a crosslinker molecule, genipin. Several parameters were evaluated during storage of the soft drink in order to assess about the potential of films in these sodas. It was observed a decrease in the soft drinks antioxidant capacity after six months of storage. This decrease can be explained by the oxidation of phenolic compounds also observed during the six months of storage and by the ascorbic acid degradation. It was also observed that the soft drink browning during the storage period was enhanced in the presence of film and under high storage temperatures, obtaining browning twice more intense after the storage period of the juice with the film at 37 °C relative to the soft drink at the beginning of the storage period. The insertion of these films in pineapple juice led to the decrease of some volatile compounds, including some esters and *off-flavors* such as diacetyl and acetoin.

The purpose of the second part of the work was to understand the destruction mechanism of crosslinking between glucosamine and genipin, responsible for the degradation of the film in the presence of reducing sugars. For this purpose it was used genipin and glucosamine model solutions to simulate the crosslinking observed in the chitosan based films. The results obtained allowed to propose structures that confirm the two reactions mechanism between glucosamine and genipin described in the literature: the nucleophilic attack of the amine groups of glucosamine to the dihydropyran genipin ring and the nucleophilic substitution of the ester group of genipin by the amine group of glucosamine. After the addition of glucose, these structures were not observed, supporting the hypothesis that the presence of reducing sugars are responsible for the glucosamine-genipin structure degradation. The proposed mechanism for the chitosan-genipin film degradation describes the cleavage of the chitosan chain linked to the anomeric carbon of the glucosamine involved in the crosslinking reaction.

In conclusion, this study allowed to realize the crosslinking reaction between genipin and glucosamine, and the reaction of these structures formed with glucose. This information is the basis for the development of chitosan-genipin films stable in soft drinks with high content of sugars.

ÍNDICE

Siglas e Abreviaturas	9
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas	13
1. Introdução	14
1.1. Composição química e características de bebidas à base de fruta	14
1.2. Processamento de bebidas à base de fruta	16
1.3. Mercado de bebidas não alcoólicas.....	18
1.4. Fatores responsáveis pela degradação de bebidas de fruta	19
1.4.1. Degradação microbiológica	19
1.4.2. Degradação enzimática	20
1.4.3. Degradação oxidativa.....	21
1.5. Influência da composição de bebidas de fruta na sua degradação	22
1.5.1. Efeito dos açúcares	22
1.5.2. Efeito dos iões metálicos.....	25
1.5.3. Efeito dos compostos fenólicos.....	27
1.5.4. Efeito das vitaminas	29
1.5.5. Efeito dos compostos voláteis.....	30
1.6. Métodos de conservação de bebidas de fruta.....	31
1.7. Características, propriedades e funcionalidades da quitosana	33
1.7.1. Modificação química da quitosana	34
1.7.2. Potencialidades da quitosana na área alimentar	41
1.8. Interação da quitosana com diferentes compostos existentes nos sumos de fruta	45
1.8.1. Reação dos açúcares com a quitosana.....	45
1.8.2. Adsorção dos iões metálicos pela quitosana	46
1.8.3. Adsorção dos compostos fenólicos pela quitosana	47
2. Enquadramento do trabalho	50
3. Materiais e Métodos.....	52
3.1. Preparação de filmes de quitosana reticulados com genipina	52
3.1.1. Redução dos filmes de quitosana-genipina	53
3.2. Incorporação de filmes de quitosana-genipina em refrigerantes à base de fruta.....	53
3.3. Estudo das propriedades físico-químicas do refrigerante à base de fruta	54

3.3.1.	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais	54
3.3.2.	Determinação da atividade antioxidante	54
3.3.3.	Quantificação do teor em ácido ascórbico	56
3.3.4.	Monitorização da intensidade de escurecimento.....	56
3.3.5.	Avaliação do perfil volátil.....	57
3.4.	Preparação de soluções modelo de açúcar	58
3.5.	Preparação de soluções modelo de genipina e glucosamina	59
3.6.	Preparação da solução modelo de butiramida e glucose	59
3.7.	Espetrometria de massa (MS)	60
3.8.	Análise Estatística.....	61
4.	Apresentação e Discussão dos Resultados.....	62
4.1.	Comportamento dos filmes à base de quitosana em refrigerantes	63
4.2.	Análises das propriedades físico-químicas do refrigerantes	64
4.2.1.	Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais	64
4.2.2.	Determinação da atividade antioxidante e quantificação do teor de ácido ascórbico	66
4.2.3.	Monitorização da intensidade de escurecimento.....	68
4.2.4.	Avaliação do efeito de filmes à base de quitosana reticulado com genipina no perfil aromático de refrigerantes.....	70
4.3.	Identificação do fator responsável pela destruição do filme de quitosana-genipina.....	77
4.4.	Caracterização estrutural dos compostos formados entre a genipina e a glucosamina	80
4.5.	Identificação do mecanismo responsável pela destruição do filme de quitosana-genipina	92
5.	Conclusão.....	100
6.	Perspetivas futuras	102
7.	Referências Bibliográficas	104

SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
DCIP	2-6-dicloroindofenol
ESI	Ionização por Eletrospray
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GCxGC	Cromatografia gasosa
bidimensional	
Gen	Genipina
HFGS	Xarope de glucose com alto teor
em	frutose
MRP	Produtos da reação de Maillard
MS	Espetrometria de massa
MS/MS	Espetrometria de massa tandem
PET	Tereftalato de polietileno
PPO	Polifenoloxidase
PVP	polivinilpirrolidona
RI	Índice de retenção
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RSD	Relative standard deviation
RTD	<i>Ready-to-drink</i>
Suc	Sacarose
SPME	Micro extração em fase sólida
HS-SPME	Micro extração em fase sólida da fase de vapor

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Bebidas comercialmente disponíveis. Adaptado de Ashurst ¹	15
Figura 2 – Formação de ácido carbónico a partir do dióxido de carbono adicionado às bebidas de fruta ⁸	17
Figura 3 – Panorama do consumo total de bebidas não alcoólicas na União Europeia e em Portugal entre 2009 e 2013 ¹⁰	18
Figura 4 – Ação catalítica da polifenoloxidase (PPO) na formação de melanoidinas, de coloração castanha. Adaptado de Wrolstad ¹³	21
Figura 5 - Estimativa da quantidade de açúcares e adoçantes utilizados nos sumos de fruta comerciais. Adaptado de Ashurst ¹	22
Figura 6 - Via biossintética inicial da reação de Maillard. Adaptado de Hui ¹⁸	24
Figura 7 - Reação de Fenton ³²	26
Figura 8 - Oxidação do catecol por metais pesados e formação do radical HO [•] ³²	29
Figura 9 - Formação do furfural a partir da degradação anaeróbia do ácido ascórbico. Adaptado de Damodaran <i>et al.</i> ¹⁹	30
Figura 10 - Estruturas químicas da quitina e da quitosana. Adaptado de Shahidi <i>et al.</i> ⁴⁶	34
Figura 11 - Hidrólise do geniposídeo (à esquerda) pela β-glucosidase, obtendo-se genipina (à direita). Adaptado de Pujana <i>et al.</i> ⁵¹	36
Figura 12 - Mecanismo 1 da reação entre a genipina e a quitosana ⁵³	37
Figura 13 - Mecanismo proposto para a migração dos eletrões na molécula de genipina, após o ataque nucleofílico do grupo amina. Adaptado de Mi. <i>et al.</i> ⁵⁶	37
Figura 14 – Mecanismo 2 da reação entre a genipina e a quitosana. Adaptado de Chen <i>et al.</i> ⁵⁷	38
Figura 15 - Mecanismo 3 da reação entre a genipina e a quitosana. Adaptado de Mi <i>et al.</i> ⁵⁰	40
Figura 16 - Aplicações da quitosana na indústria alimentar.	41
Figura 17 - Aparência de morangos não revestidos (controlo) e revestidos com filmes de quitosana após 10, 16 e 21 dias de armazenamento. Adaptado de Tripathi <i>et al.</i> ⁵⁹	42
Figura 18 - Complexação de um ião metálico à quitosana de acordo com o modelo descrito por Wang <i>et al.</i> ⁷¹	47
Figura 19 - Filme de quitosana reticulado com genipina.	52
Figura 20 - Os filmes à base de quitosana em contacto com os refrigerantes, antes do armazenamento a 37 °C: (A) filme de quitosana reticulado com genipina reduzido em sumo Sumol Ananás; e (B) filme à base de quitosana não reduzido em sumo Sumol Laranja Zero.	53
Figura 21 - Formação do radical ABTS ^{•+} . Adaptado de Pannala <i>et al.</i> ⁷⁸	55
Figura 22 – Seringa de SPME.....	57
Figura 23 - LECO Pegasus 4D GC × GC – ToFMS.....	58

Figura 24 - <i>Ion trap</i> Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA.	60
Figura 25 - Aspeto dos filmes de quitosana reticulados com genipina mergulhados no refrigerante Sumol Ananás após (A) 0, (B) 2, (C) 6, (D) 9, (E) 15 e (F) 20 dias de armazenamento a 37 °C.	64
Figura 26 - Variação do conteúdo total fenólico (mg GAE/ mL), dos refrigerantes Sumol Ananás durante seis meses, a duas temperaturas (temperatura ambiente e 37 °C), com e sem filme à base de quitosana.	65
Figura 27 - Variação da atividade antioxidante durante seis meses, a duas temperaturas distintas (temperatura ambiente e 37 °C), em refrigerantes Sumol Ananás com e sem filme à base de quitosana.	66
Figura 28 – I) Variação da intensidade de escurecimento durante seis meses, a duas temperaturas de armazenamento distintas (temperatura ambiente e 37 °C), em refrigerantes Sumol Ananás com e sem filme à base de quitosana. II) Fotografia com o aspeto macroscópico dos refrigerantes Sumol Ananás após os seis meses de armazenamento, sendo o Sumol Ananás (A) sem filme à Tamb; (B) com filme à Tamb; (C) sem filme a 37 °C e (D) com filme a 37 °C.	68
Figura 29 - Cromatogramas de GCxGC do refrigerante Sumol Ananás sem (A) e com (B) filme de quitosana reticulado com genipina.	72
Figura 30 - Valores nutricionais para 250 mL de sumo Sumol Ananás.	78
Figura 31 - Filme à base de quitosana mergulhado no sumo Sumol Laranja Zero (à esquerda) e o seu rótulo nutricional (à direita).	79
Figura 32 – Filme à base de quitosana mergulhado no refrigerante Sumol Ananás (em cima) e no Sumol Laranja Zero (em baixo), após dois (à esquerda), quinze (ao centro) e vinte (à direita) dias de armazenamento a 37 °C.	79
Figura 33 – Espetro de ESI-MS da solução genipina após uma semana de reação a 37°C.	81
Figura 34 - Solução mistura de Gen+GlcN, após uma semana de reação a 37 °C.	82
Figura 35 – Espetro de ESI-MS da solução mistura de genipina e glucosamina ao tempo (A) 0 e (B) 1 semana de armazenamento.	82
Figura 36 – Estrutura proposta para a razão m/z 576 e respetivo espetro ESI-MS/MS.	83
Figura 37 – Zoom do espetro de ESI-MS da solução mistura de genipina e glucosamina, sendo que o zoom corresponde ao espetro de ESI-MS entre (zoom A) 460 e 570 e (zoom B) 600 e 800.	84
Figura 38 – Estruturas propostas da simulação da reticulação observada nos filmes à base de quitosana com razões m/z (A) 501 e (B) 535.	85
Figura 39 – Espetro de ESI-MS/MS e respetivo zoom do ião fragmento com razão m/z 501.	86
Figura 40 - Espectros de ESI-MS/MS do ião com razão m/z 535.	87
Figura 41 – Espetro de ESI-MS/MS do fragmento com razão m/z 677.	89
Figura 42 - Estruturas propostas para o fragmento com razão m/z 741.	90
Figura 43 – Espetro de ESI-MS/MS do fragmento com razão m/z 741.	91
Figura 44 - Soluções modelo de 0,5 mg/mL genipina (à esquerda), de 15 mg/mL de glucosamina (ao centro) e a mistura de 0,5 mg/mL de genipina e 15 mg/mL de glucosamina (à direita) após uma semana de armazenamento a 37 °C, na estufa.	92

Figura 45 – Espectro de ESI-MS da solução mistura de genipina, glucosamina e glucose (Gen+GlcN+Glc) ampliado entre (zoom A) m/z 480 e 570 e (zoom B) 580 e 800.	93
Figura 46 – Mecanismo de formação de imina. Adaptado de Solomons <i>et al.</i> ¹¹⁹	94
Figura 47 – Mecanismo proposto para a reação de degradação do filme de quitosana-genipina.	95
Figura 48 – Espectro de ESI-MS da solução de butiramida e glucose após uma semana de armazenamento a 37 °C.	96
Figura 49 – Estrutura proposta para a razão m/z 290 e respetivo espectro ESI-MS/MS.	97
Figura 50 – Filme à base de quitosana reduzido mergulhado no refrigerante Sumol Ananás após (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 20 e (E) 40 dias de armazenamento.	98

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de açúcares presente em determinados sumos de fruta comerciais. Adaptado de Wrolstad ¹³	23
Tabela 2 - Conteúdo total fenólico de diferentes sumos de fruta em mg GAE ^(a) /100 mL. Adaptado de Mahdavi <i>et al.</i> ³⁷	28
Tabela 3 - Compostos voláteis característicos do aroma de ananás identificados por GCxGC nas amostras de refrigerantes Sumol Ananás armazenadas à temperatura ambiente.	74
Tabela 4 - <i>Off-flavours</i> identificados por GCxGC nas amostras de refrigerante Sumol Ananás armazenadas à temperatura ambiente.....	76

1. INTRODUÇÃO

Os sumos de fruta são submetidos a um conjunto de procedimentos e técnicas de forma a estender o tempo de prateleira e melhorar a sua qualidade. As altas temperaturas e a adição de conservantes são os procedimentos mais utilizados e têm como finalidade erradicar microrganismos patogénicos que possam estar presentes nos sumos, assim como inibir reações químicas e enzimáticas, que levam a mudanças organoléticas indesejáveis. No entanto, a tendência do mercado é aumentar o consumo de produtos frescos e minimamente processados devido à procura por parte dos consumidores, de alimentos cada vez menos manipulados, com o mínimo de aditivos sintéticos e que se assemelhem o mais possível às suas matérias-primas em fresco. Assim, a indústria alimentar tem-se focado em estratégias de conservação que permitam a redução de conservantes não naturais.

A quitosana é um polissacarídeo que, devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas, tem sido aplicada em diversas áreas, nomeadamente na área alimentar. A sua capacidade de formar filmes reticulados que lhes conferem resistência e uma integridade em matrizes ácidas, tornam os filmes de quitosana viáveis para uma conservação natural de sumos de fruta, pois apresentam propriedades fundamentais para a sua conservação, como as atividades antimicrobiana e antioxidante.

1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS DE BEBIDAS À BASE DE FRUTA

A indústria das bebidas constitui um mercado de grande magnitude, tendo um grande impacto na economia mundial ¹. O setor das bebidas é uma área de um notável esforço de diversificação e de inovação, que tem como fim atender as necessidades nutricionais, de prazer e/ou económicas, assim como, os estilos de vida dos consumidores ². Desta forma, existe uma diversidade crescente de formulações, sabores e embalagens, que culmina em quatro setores primários no mercado global das bebidas e que proporciona opções adequadas e ajustadas a cada estilo de vida (**Figura 1**).

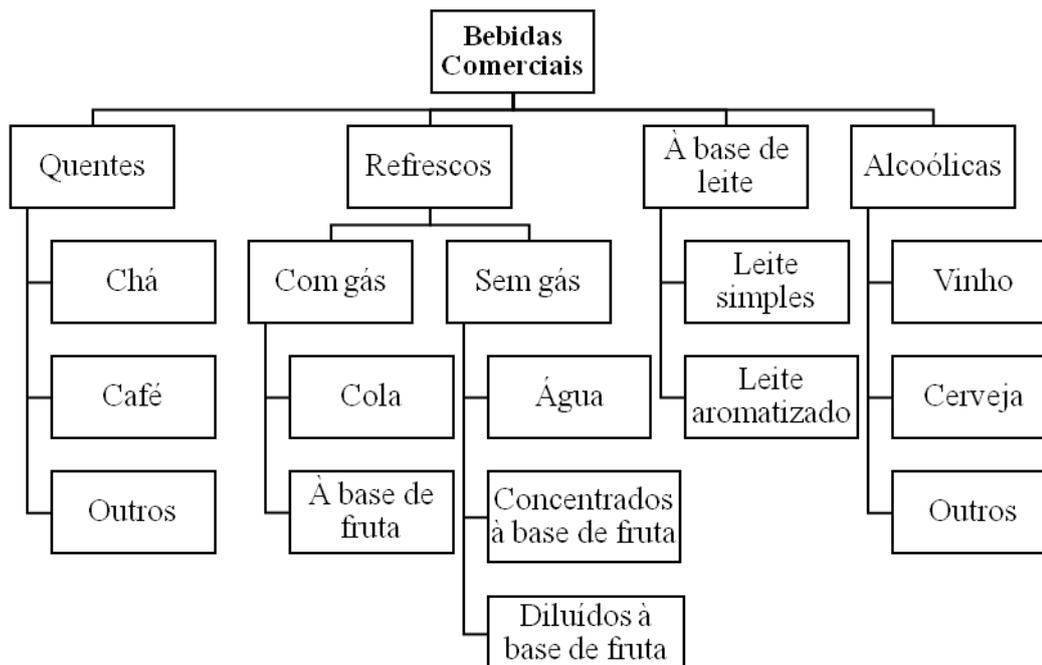


Figura 1 – Bebidas comercialmente disponíveis. Adaptado de Ashurst ¹.

Atualmente há uma maior consciencialização da população para a importância de ingerir produtos que contribuam diretamente para o seu bem-estar e para a sua saúde, que para além de nutritivos, previnam muitas doenças crónicas e degenerativas, e que ajudem a reforçar o bem-estar físico e mental, obtendo-se, assim, uma melhor qualidade de vida ^{2,3}. Deste modo, tem-se verificado um aumento mundial do consumo de hortícolas e de frutas, disponíveis das mais variadas formas, sendo os sumos de fruta uma delas.

De acordo com a legislação portuguesa são inúmeros os refrescos comerciais. Dando particular destaque aos sumos de fruta prontos-a-beber (refrescos com gás à base de fruta e refrescos sem gás diluídos à base de fruta), estes são bebidas não-alcoólicas à base de água, adoçadas, coradas e aromatizadas, contendo, ainda, uma determinada quantidade de sumo ou polpa de fruta ¹. As bebidas comerciais à base de fruta, na sua essência, contêm uma menor proporção de sumo ou polpa de fruta (6 a 30%) quando comparados com os sumos naturais ¹. Os refrigerantes são um exemplo de bebida comercial à base de fruta que contêm uma percentagem em volume do sumo das respetivas frutas que depende dos frutos utilizados no seu fabrico, variando de 6 a 16 %.

Os sumos de fruta comerciais são genericamente constituídos por 75-90% de água, 9-25% de açúcar, 1-5% de ácidos orgânicos, 0,2-0,6% de proteína e 0,1-0,2% de fibra dietética ⁴. Contêm também outros componentes como os sais minerais (sódio, cálcio, potássio, ferro, cobre, fósforo, zinco) e vitaminas (A, B1, B2 e C) ^{1,5}. Os hidratos de carbono, as vitaminas e os minerais apresentam-se como sendo os componentes mais

abundantes, sendo os de menor importância as proteínas e a gordura ^{1,5}. Fazem também parte destas bebidas os aditivos, tais como os conservantes, os aromatizantes, os corantes, os acidificantes e os adoçantes e têm como objetivo melhorar a aparência e a estabilidade do produto, assegurando que as suas características organolépticas se mantenham durante um tempo de prateleira razoável. Os aditivos utilizados durante a formulação das bebidas têm de ser cuidadosamente selecionados, uma vez que, grandes quantidades podem ser potencialmente perigosos para a saúde e bem-estar dos consumidores ⁵.

Perante o seu potencial nutricional e biológico, as bebidas comerciais são ricas em sabor, cor e aroma. O seu equilíbrio entre doçura e acidez, juntamente com os sabores agradáveis, torna-as atraentes para diferentes faixas etárias em todo o mundo ^{1,2}. No entanto, o consumo destas bebidas é um assunto controverso devido ao açúcar comumente adicionado aos sumos prontos a beber que leva ao aumento do consumo de calorias, correlacionando-se positivamente com inúmeros problemas de saúde, como a resistência à insulina, estando também associados a um ganho de peso a longo prazo, e ao aumento do aparecimento de doenças como a diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares ³. Para além disso, alguns dos aditivos adicionados, nomeadamente os conservantes, quando ingeridos em grandes quantidades, constitui uma preocupação de saúde pública. Assim, há uma tendência cada vez maior para minimizar o uso de ingredientes e aditivos artificiais e sintéticos.

1.2. PROCESSAMENTO DE BEBIDAS À BASE DE FRUTA

A produção dos sumos de fruta envolve uma série de etapas, que têm como principal objetivo alterar algumas das barreiras sensoriais dos frutos, fornecendo, simultaneamente, um método conveniente de ingestão. Para além da utilização de matérias-primas de máxima qualidade, é também fundamental a aplicação de procedimentos operacionais padronizados que não tragam riscos à saúde do consumidor ⁶. De um modo geral, o processo engloba o tratamento de água, a preparação de xaropes (simples e composto), o fabrico da bebida (diluição do xarope e pasteurização) e o enchimento e embalagem do produto. A água, que representa cerca de 90 % do volume total dos sumos, deve ser sujeita a um tratamento que assegura as características físico-químicas, organolépticas e microbiológicas do produto ^{6,7}. A produção do xarope simples e composto é uma das fases mais importantes na produção de um sumo, sendo comum tanto nas bebidas carbonatadas como nas não-carbonatadas. O xarope simples é constituído por

açúcar (ou adoçantes na produção de sumos *light*) diluído em água previamente tratada, sendo, de seguida, passado por um pasteurizador, que tem como intuito inativar microrganismos e enzimas que possam desencadear problemas de odor e sabor no produto final ⁶⁻⁸. O xarope é depois arrefecido a uma temperatura próxima de 20 °C, sendo armazenado em tanques de aço inoxidável, onde será preparado o xarope composto ⁸.

O xarope composto, por sua vez, é preparado a partir do xarope simples, onde de uma forma lenta e cuidadosa e sob agitação magnética, é-lhe adicionado outros ingredientes como os sumos de fruta, adoçantes, corantes, conservantes e antioxidantes. Após essas adições procede-se à sua diluição numa relação pré-estabelecida (de 1:2 a 1:6) com água tratada e deve-se garantir a agitação constante durante um tempo determinado de modo a promover a completa homogeneização ⁶⁻⁸. Uma vez obtida a bebida, poderá suceder uma fase de carbonatação (gaseificação) que é conseguida pela injeção de uma quantidade específica (entre 1,5 a 5 g/L) de dióxido de carbono nos sumos. Quando o dióxido de carbono é dissolvido em água forma ácido carbónico (H₂CO₃), que produz o sabor ácido característico dos refrigerantes carbonatados (**Figura 2**) ^{5,8}.

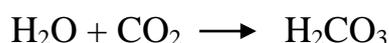


Figura 2 – Formação de ácido carbónico a partir do dióxido de carbono adicionado às bebidas de fruta ⁸.

O CO₂ injetado nos sumos é capaz de lhes conferir as características organolépticas pretendidas, fornecendo, simultaneamente, um efeito antimicrobiano muito eficaz, especialmente contra bolores e leveduras ^{8,9}. Por esta razão, a suscetibilidade de deterioração em bebidas carbonatadas é inferior comparativamente às bebidas não carbonatadas.

As bebidas são enviadas para a linha de embalagem assética de forma a evitar a perdas de CO₂, sendo as latas de alumínio, as garrafas de vidro e as PET (tereftalato de polietileno) as embalagens mais utilizadas ^{5,8}. Este procedimento ocorre a frio, o que minimiza a criação de espuma na bebida, preservando a carbonatação, e oferecendo, para além disso, vantagens do ponto de vista microbiológico. A utilização de embalagens de PET requer um nível de carbonatação superior ao habitual de forma a compensar as perdas de CO₂ através das paredes e durante o período de consumo ^{7,8}.

Um problema da formulação de bebidas não carbonatadas é que lhes falta a proteção fornecida pela carbonatação, podendo estas possuírem ar atmosférico no espaço de vapor (*headspace*) da embalagem, o que pode levar a níveis indesejáveis de oxigénio, o

que conduz, conseqüentemente, à degradação do sumo. Este problema é solucionado pressurizando as embalagens com azoto líquido que, por preencher a *headspace*, assegura a sua rigidez e impede a incorporação de oxigénio dentro da embalagem durante o transporte e armazenamento.

1.3. MERCADO DE BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS

O panorama geral do mercado de bebidas não alcoólicas em Portugal e na União Europeia, segundo o Probeb (Associação Portuguesa das Bebidas Refrescantes Não-Alcoólicas) encontra-se evidenciado na **Figura 3**¹⁰. O estado precário da economia nacional tem levado ao decréscimo do consumo de bebidas comerciais não alcoólicas desde 2010¹¹. Existe uma evolução negativa nos últimos anos, havendo um diferencial significativo entre o consumo anual por habitante português (68 litros por habitante) e o consumo médio na União Europeia (110 litros por habitante) em 2013, uma diferença de 42 litros por habitante/ano.

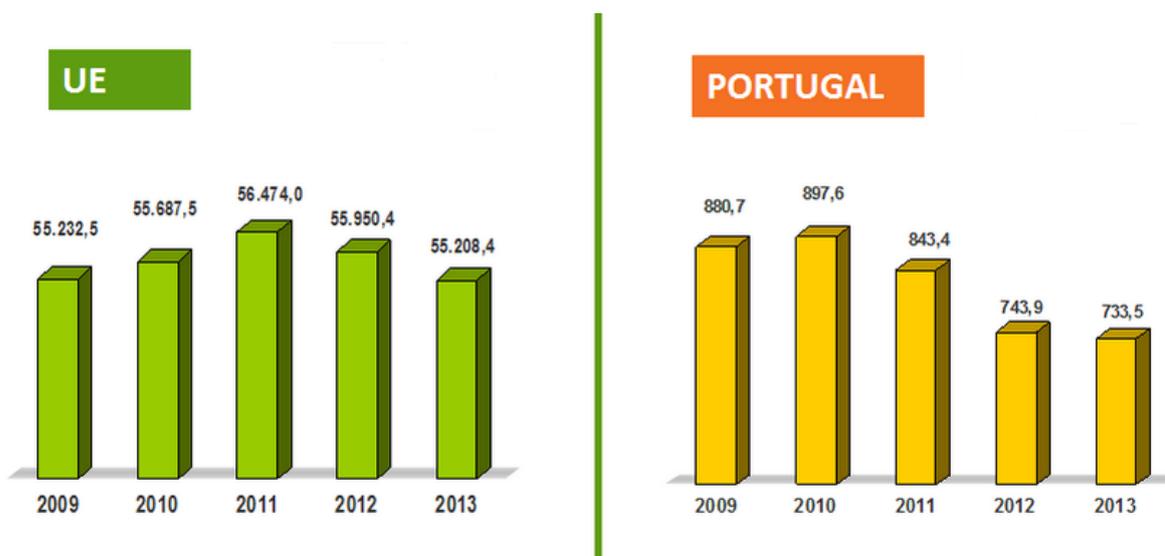


Figura 3 – Panorama do consumo total de bebidas não alcoólicas na União Europeia e em Portugal entre 2009 e 2013¹⁰.

A diminuição no consumo de refrigerantes verificada no mercado português vai ao encontro da crescente procura dos consumidores por bebidas associadas ao pensamento de vida saudável, como é o caso dos sumos de fruta naturais, dos chás industrializados prontos-a-beber, das águas aromatizadas, das bebidas de soja, entre outros^{1,12}. De forma a reverter esta tendência, a indústria dos refrigerantes tem apostado em estratégias de

inovação, sendo elas de mudança de nome, de novas embalagens e de estratégias de conservação naturais, aliadas a estratégias de marketing, que despertam e fidelizam a atenção dos consumidores.

1.4. FATORES RESPONSÁVEIS PELA DEGRADAÇÃO DE BEBIDAS DE FRUTA

O principal entrave da indústria das bebidas de fruta é o seu curto tempo de prateleira que se deve à estabilidade reduzida e suscetibilidade à deterioração. A perda de qualidade dos sumos de fruta deve-se a fatores microbiológicos, enzimáticos e, sobretudo, oxidativos, os quais têm repercussões a nível organolético (cor, aroma e textura) e nutricional (perda de vitaminas). A deterioração dos sumos ocorre de forma gradual e depende das condições de armazenamento ¹³.

1.4.1. DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A contaminação microbiana é um problema associado aos sumos de fruta e tem origem principalmente nas matérias-primas durante o seu crescimento, colheita ou armazenamento ⁵. A inclusão de fruta num determinado produto, usualmente na forma de sumo, faz com que o produto seja mais vulnerável à degradação microbiana ^{14,15}.

A colonização de alimentos por uma microflora específica depende das características do produto (por exemplo da atividade da água e do pH), bem como, das condições de processamento e armazenamento (temperatura, tempo e composição da atmosfera) ^{13,14}. Para além da elevada atividade da água e da presença de vitaminas e minerais, os sumos de fruta constituem uma matriz ácida (pH entre 2,0 e 4,5) e, portanto, a degradação microbiológica deve-se à ação de microrganismos tolerantes ao meio ácido, como as bactérias lácticas ^{5,15}. As bactérias dos géneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, por exemplo, são produtoras de ácido láctico (responsáveis pela redução do pH do meio) e CO₂, o que leva à alteração da turvação natural dos sumos e à introdução de odores desagradáveis devido à formação, por exemplo, de diacetilo, acetoína e 2,3-dihidroibutanodiol ^{14,15}. No entanto, são as leveduras o grupo mais significativo de microrganismos associados à degradação de sumos de fruta, na medida em que são resistentes em meio ácido e carbonatado, a temperaturas elevadas e de refrigeração comparativamente com as bactérias e a maioria dos fungos, fazendo deles potenciais

contaminantes de sumos ^{5,15}. Para além disso, verifica-se que muitas das leveduras têm a particularidade de se desenvolverem em meios anaeróbios. Algumas das leveduras isoladas de sumos de fruta incluem a *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula* e *Pichia* ⁵. De uma forma mais particular, leveduras como a *Candida intermedia* e a *Candida parapsilosis* têm sido descritas como microrganismos envolvidos na recontaminação de sumos pasteurizados de laranja, enquanto que leveduras como a *Hanseniaspora occidentalis* e a *Hanseniaspora uvarum* estão associadas à contaminação de sumos não pasteurizados do mesmo fruto ¹⁵. As mudanças físico-químicas e organoléticas resultantes da ação das leveduras são a produção de dióxido de carbono, etanol e acetaldeído, que contribui para o aparecimento de um odor característico ¹.

1.4.2. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

As reações enzimáticas têm um impacto importante na estabilidade dos sumos de fruta. A pectina é normalmente referida como um componente estabilizante da turvação de sumos de fruta, agindo, deste modo, como emulsificante ⁵. As enzimas pécticas, apesar de serem fundamentais na obtenção de determinados sumos (como por exemplo os sumos de maçã clarificados), limitam também o período de vida útil dos sumos de fruta não clarificados, levando à diminuição da viscosidade do sumo ¹⁶. A pectinametilesterase (E.C. 3.1.1.11) promove a desesterificação dos grupos metoxilo do ácido galacturónico que constitui a cadeia principal das pectinas existentes nos sumos. Por sua vez, a poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15) é responsável pela hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 entre os resíduos de ácido galacturónico ^{16,17}. Estas reações são responsáveis pela perda de viscosidade e pela separação de fases devido à precipitação de pectatos de cálcio, o que resulta num sistema de duas fases correspondente a uma clarificação na parte superior do sumo e a um precipitado na parte inferior ¹⁶. Estas alterações ocorrem numa fase inicial do ciclo de vida dos sumos, tendo um grande impacto visual, interferindo, desta forma, na sua aceitação.

O escurecimento enzimático, catalisado pela enzima polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1), também conhecida como fenoloxidase, fenolase ou tirosinase, é um dos problemas mais limitantes no processamento dos sumos de fruta, levando a perdas de qualidade dos seus produtos ^{13,18}. O processamento dos frutos leva ao contacto da enzima com o oxigénio, levando, deste modo, à sua ativação e ao desenvolvimento do escurecimento enzimático. Esta enzima catalisa a hidroxilação de monofenóis a difenóis e

a oxidação de di-fenóis e o-quinonas, que sendo altamente reativas polimerizam, originando pigmentos de coloração escura (**Figura 4**)^{18,19}. O escurecimento dos sumos provoca uma diminuição dos atributos de qualidade dos sumos, tendo um impacto negativo não só na cor, mas também na textura, odor e valor nutricional dos produtos.

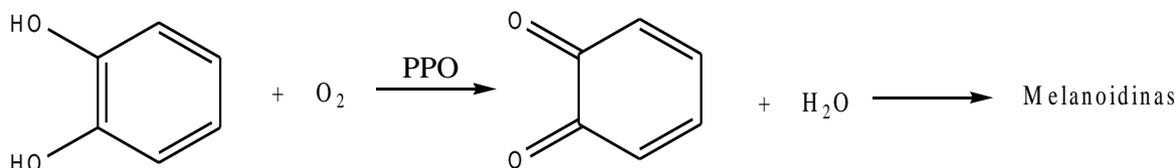


Figura 4 – Ação catalítica da polifenoloxidase (PPO) na formação de melanoidinas, de coloração castanha. Adaptado de Wrolstad¹³.

Apesar de ocorrer em fases iniciais da obtenção do sumo, as reações enzimáticas não são uma preocupação central nos sumos comercializados, pois o processamento térmico (pasteurização), quando aplicado em condições de temperatura/tempo adequadas, inativa as enzimas presentes nos sumos. No entanto, para sumos de fruta naturais, torna-se fundamental conhecer o mecanismo de escurecimento enzimático de forma a prevenir alterações de cor, de sabor e de valor nutricional¹⁹.

1.4.3. DEGRADAÇÃO OXIDATIVA

Muitos alimentos são deteriorados por reações oxidativas, sendo estes um dos problemas mais comuns do armazenamento de uma bebida⁵. Durante a maceração, homogeneização e extração do sumo das frutas, a parede celular é destruída, sendo o oxigénio encontrado sobretudo no espaço de vapor (*headspace*) da embalagem^{1,20}. O processo oxidativo é frequentemente atribuído à permeabilidade ao oxigénio das embalagens plásticas utilizadas na indústria dos sumos. Esta situação pode levar a níveis de oxigénio indesejáveis no sumo, que ao interagir com diferentes componentes alimentares resultam em várias reações sequenciais e paralelas que resultam em mudanças nos alimentos como o escurecimento, a mudança de aroma e a perda de valor nutricional, reduzindo a qualidade global do produto durante o armazenamento^{13,20,21}.

Uma barreira ao oxigénio é indispensável para alcançar um tempo de prateleira longo. Embora a indústria recorra a linhas de embalagem assética, há sempre uma quantidade residual de oxigénio que fica nos sumos, estando este dissolvido em solução ou no espaço de vapor das embalagens²⁰. Uma das reações catalisadas pela presença de

oxigénio é o escurecimento não enzimático, via degradação oxidativa do ácido ascórbico, cuja formação de produtos de decomposição resulta na degradação da cor ¹⁸.

1.5. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE BEBIDAS DE FRUTA NA SUA DEGRADAÇÃO

Os sumos de fruta comerciais, em virtude da sua composição química, apresentam um meio apropriado à ocorrência de inúmeras reações, que contribuem para a sua deterioração ⁵. A partir do momento em que o fruto sofre uma série de procedimentos necessários à obtenção do sumo, ocorrem mudanças devido ao início de reações que comprometem, indesejavelmente, a qualidade e aceitabilidade destes produtos pelos consumidores ¹⁸.

1.5.1. EFEITO DOS AÇÚCARES

Os açúcares são uma parte fundamental da formulação das bebidas já que, para além de proporcionar a sensação de doçura, é a interação com outros componentes que determina a aceitabilidade em termos de sabor pelo consumidor ⁵. Na **Figura 5**, está resumida, a proporção de açúcar e de adoçantes frequentemente utilizados em sumos de fruta comerciais.

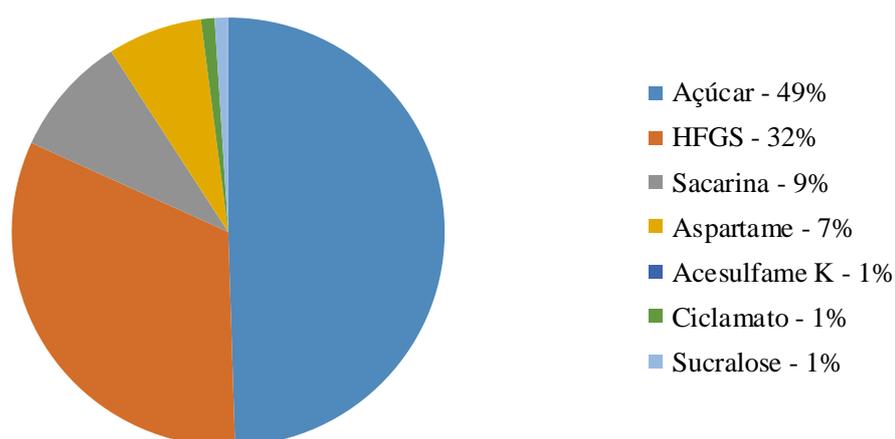


Figura 5 - Estimativa da quantidade de açúcares e adoçantes utilizados nos sumos de fruta comerciais. Adaptado de Ashurst ¹.

Devido aos efeitos adversos resultantes do excesso do açúcar adicionado aos sumos, tem havido alterações nas fontes de doçura dos sumos, sendo a adição de adoçantes uma

alternativa que, para além de serem cerca de 200 a 2000 mil vezes mais doces que a sacarose (usada como referência de doçura), estão isentos de calorias ^{18,19,22}. Isto tem levado ao aumento repentino da disponibilidade de adoçantes, que se tem refletido no melhoramento do sabor e na variedade de formulações de sumos com baixo teor em açúcar (produtos *light*) ^{22,23}.

Do ponto de vista nutricional, os sumos de fruta são uma fonte rica em energia devido à mistura de três açúcares principais: a glucose, a frutose e a sacarose ^{5,13,19}. A composição de açúcares nestes sumos depende do tipo de frutas que lhes dão origem, bem como, do seu estado de maturação e das condições ambientais e climatéricas onde foram produzidos ^{18,24}.

Na **Tabela 1** está representada o conteúdo de glucose, frutose e sacarose de diferentes sumos de fruta comerciais, bem como o respetivo valor de °Brix, que se define como sendo a percentagem de açúcar por peso de sumo.

Tabela 1 - Composição de açúcares presente em determinados sumos de fruta comerciais. Adaptado de Wrolstad ¹³.

Fruto	° Brix	% Fru^a	% Glc^a	Fru:Glc	% Suc^a
Ananás	12,8	25	22	1,14	53
Laranja	11,8	28	26	1,08	46
Limão	4,5	33	43	0,77	24
Maça	11,5	52	19	2,7	24
Morango	8,0	41	43	0,95	17
Pera	12,0	54	14	3,86	14
Pêssego	10,5	12	11	1,09	67
Uva	16,0	47	48	0,98	4

^a Abreviaturas – Fru: Frutose; Glc: Glucose; Suc: Sacarose.

A glucose e a frutose são os açúcares geralmente em maior quantidade, sendo que os sumos de laranja, morango, pêssego e uva apresentam quantidades bastantes similares destes dois açúcares redutores. Os valores de sacarose variam, podendo representar uma grande parte dos açúcares encontrados nos sumos (de ananás e laranja, por exemplo), mas também constituir uma quantidade vestigial ou mesmo inexistente (sumo de uva). Os valores de sacarose tendem a variar devido à hidrólise ácida que poderá ocorrer durante o processamento e armazenamento dos sumos, que consiste na quebra da ligação glicosídica da sacarose, resultando numa mistura equimolar de D-glucose e D-frutose ^{13,23}. O grau de

inversão depende obviamente de variáveis como a temperatura e o tempo, mas para produtos já embalados, as condições de inversão são mais favoráveis já que, sob efeito da elevada acidez e na presença do dióxido de carbono, a reação torna-se inevitável de ocorrer ¹.

Uma das propriedades características dos açúcares é a sua capacidade de integrar reações de escurecimento, que são desejadas em determinados alimentos como produtos de confeitaria, mas que devem ser evitadas noutros, nomeadamente nos sumos de fruta ^{13,23,25}. A reação de Maillard é a principal preocupação na indústria dos sumos, principalmente em sumos processados termicamente. É uma reação não enzimática favorecida a altas temperaturas, onde ocorre um ataque nucleofílico do grupo amina de aminoácidos, péptidos ou proteínas ao carbono anomérico de açúcares redutores (**Figura 6**). Esta reação é extremamente complexa devido aos inúmeros compostos que podem participar nas diversas reações que se podem dar ¹⁸. Os sumos de fruta são produtos muito suscetíveis à reação de Maillard devido ao seu elevado conteúdo em açúcares redutores. Apesar da quantidade de aminoácidos nos sumos ser reduzida, a sua quantidade é suficiente para afetar a qualidade dos sumos ¹⁹.

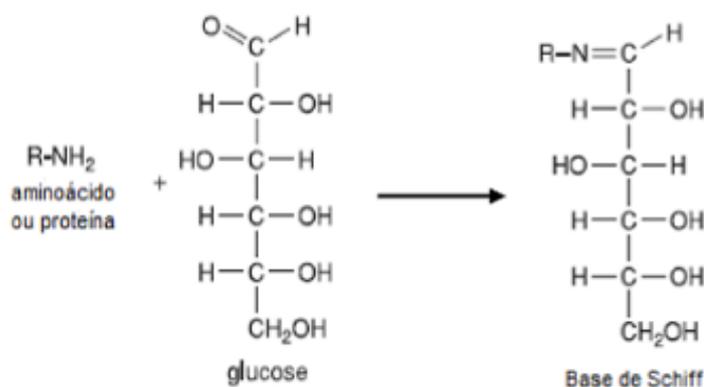


Figura 6 - Via sintética inicial da reação de Maillard. Adaptado de Hui ¹⁸.

A taxa de escurecimento e a natureza dos produtos formados depende diretamente de uma diversidade de fatores, nomeadamente da concentração e do tipo de açúcares redutores encontrados nos alimentos ^{26,27}. No entanto, são muitos os argumentos discutidos de forma a explicar as diferentes taxas de escurecimento com a diversidade de açúcares disponíveis. Atualmente já é consensual a ideia de que a reatividade dos açúcares está relacionada com a eletrofilicidade do grupo carbonilo do açúcar e com a proporção de cadeia aberta ^{26,28}. Muitos autores defendem que a maior reatividade das aldoses (glucose)

relativamente às cetoses (frutose) se deve à maior acessibilidade e eletrofilicidade do terminal aldeído comparativamente com o grupo cetona, o que facilita o ataque nucleofílico do grupo amina aos grupos carbonilo existentes em solução no primeiro passo da reação ^{26,27}. No entanto, há estudos que reportam uma maior contribuição da frutose no escurecimento, devido à maior proporção de cadeia aberta, o que facilita a reação com os grupos amina ^{29,30}. Há, ainda, outros estudos que defendem que a reatividade dos açúcares varia com o tempo. Pensa-se que a reação de escurecimento é mais intensa com a frutose durante uma fase inicial. No entanto, nas fases finais da reação de Maillard, a taxa de escurecimento tende a diminuir nas reações que envolvem a frutose como açúcar redutor, predominando a contribuição da glucose no escurecimento dos sumos ²⁷. Estes resultados são controversos e difíceis de serem explicados devido à diversidade de condições de reação (reagentes, temperatura, pH) e a variedade de indicadores a monitorizar capazes de avaliar a reação de Maillard ²⁸.

A formação de aromas pela reação de Maillard deve-se a uma variedade de produtos degradativos como o amoníaco e o sulfeto de hidrogénio, bem como, a formação de compostos típicos aromatizantes como as furanonas e as pirazinas ¹³. Poderá também ocorrer a interação do oxigénio dissolvido com alguns compostos existentes nos sumos de fruta como o ácido desidroascórbico, precursor de aldeídos formados durante a degradação de Strecker ²⁰.

1.5.2. EFEITO DOS IÕES METÁLICOS

Para além das grandes quantidades de elementos essenciais e fisiologicamente importantes, os sumos de fruta são também fontes ricas de macronutrientes (cálcio, potássio, magnésio e sódio), verificando também a presença de elementos indispensáveis ao funcionamento de sistemas biológicos, como é o caso do cobre, ferro, níquel, zinco e manganês, chamados de micronutrientes ³¹. Por esta razão, os sumos de fruta são frequentemente usados como suplementos alimentares em casos de deficiência nutricional ^{2,31}.

Estes iões metálicos são muito reativos em bebidas de fruta, sendo que a presença de determinados iões pode iniciar e catalisar reações de oxidação durante o manuseamento, o processamento e/ou armazenamento dos sumos, originando alterações na composição química que afetam o sabor, a frescura, a cor e o aroma ². A presença de metais pode levar à formação de sedimentos/precipitados, dependendo da sua concentração, do potencial

redox, do pH e da temperatura do sistema. As mudanças de cor em sumos de fruta podem dever-se à formação de complexos de ferro, cobre e magnésio com compostos fenólicos, nomeadamente com as antocianinas ³¹.

Na presença de iões metálicos, as constantes de degradação do ácido ascórbico nos sumos de fruta são superiores às obtidas nas soluções desprovidas de iões metálicos. Assim sendo, a presença de iões metálicos é responsável, em parte, pela degradação oxidativa do ácido ascórbico em sumos de fruta. O potencial de iões metálicos na catálise da degradação do ácido ascórbico depende do metal envolvido, do seu estado de oxidação e da sua concentração, sendo o Cu (II) cerca de 80 vezes mais eficaz que o Fe (III) ¹⁹. Poderá haver, também, a associação destes iões a outros constituintes (como os compostos fenólicos) ou a participação em outras reações, sendo que alguns podem gerar radicais livres que podem acelerar a oxidação do ácido ascórbico ¹⁹.

O ferro e o cobre são indispensáveis no organismo mas a sua presença nos sumos de fruta pode conduzir à sua deterioração pela participação em reações que geram espécies reativas de oxigénio (ROS) ³². A decomposição do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) catalisada por iões metálicos, como a reação de Fenton, é um passo fundamental na oxidação dos sumos. O oxidante mais relevante é o radical hidroxilo (HO•). O mecanismo clássico desta reação envolve iões Fe (II) que são oxidados a Fe (III), sendo o H₂O₂ reduzido a um HO• e a um ião hidróxido (HO⁻), de acordo com a equação apresentada na **Figura 7** ³².

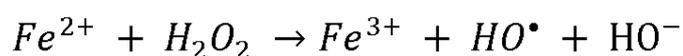


Figura 7 - Reação de Fenton ³².

O cobre (I) também catalisa a decomposição do H₂O₂ de uma forma idêntica ao ferro (II). Havendo um excesso de H₂O₂, os radicais hidroxilo são consumidos por outra molécula de H₂O₂, produzindo o radical hidroperóxido (HOO•) e o radical superóxido (O₂^{-•}). Quando a reação de *Fenton* é mediada por outros metais, como o cobre (I), designa-se de reação *Fenton-like* ³².

Para além da presença de oxigénio, de substâncias redutoras, do pH e da temperatura, a presença de cobre (I) é essencial para a reação de escurecimento já que funciona como uma oxidase de função mista, atuando na hidroxilação de monofenóis a di-hidroxifenóis e, seguidamente, oxidando estes últimos a *o*-quinonas ¹⁸.

1.5.3. EFEITO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonóides e estilbenos, dependendo da sua estrutura química básica, ou seja, do número de anéis aromáticos que contêm e dos elementos funcionais a eles ligados. Estes compostos englobam desde moléculas simples até moléculas com algum grau de polimerização que contribuem para as características organolépticas dos alimentos ³³.

Os compostos fenólicos contribuem para as propriedades antioxidantes e características sensoriais, tal como a cor, a adstringência, a formação de aromas, e a turbidez dos sumos de fruta, sendo importantes na dieta humana ³⁴. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente relacionado com a capacidade de inibição de compostos oxidantes e/ou de neutralização de radicais livres, por diferentes mecanismos que envolvem, por exemplo, a complexação de metais e/ou o sequestro de oxigénio, limitando, desta forma, as etapas de iniciação e propagação das reações radicalares em cadeia ³⁴.

Os compostos fenólicos encontrados nas frutas dependem de fatores genéticos e ambientais e podem ser modificados durante o processamento e armazenamento ³⁵. Os ácidos fenólicos mais frequentemente encontrados nos sumos de fruta incluem os ácidos gálico, cumárico, cafeico e clorogénico ^{13,36}. Os frutos de tonalidade vermelha, azul e roxa possuem uma elevada quantidade de antioxidantes, sendo as antocianinas os compostos predominantes ³⁶. As frutas cítricas, por sua vez, são também uma fonte rica em compostos fenólicos, sendo os principais as flavanonas hesperitina, naringenina e eriodictiol. Relativamente à maçã, muitos autores enfatizam a quantidade de compostos fenólicos neste fruto, havendo cerca de sete vezes mais compostos fenólicos na casca do que na polpa. Cerca de 80 % dos polifenóis da maçã são representados por flavan-3-óis e procianidinas, predominando as epicatequinas e os dímeros de procianidina B2, respetivamente ³⁶.

O conteúdo fenólico encontrado nos sumos 100% naturais e sumos comercializados dos mesmos frutos não são idênticos, havendo, em alguns casos, uma diminuição no conteúdo destes compostos nos sumos sujeitos a processamento, tal como é comprovado pela **Tabela 2** ³⁷.

Tabela 2 - Conteúdo total fenólico de diferentes sumos de fruta em mg GAE^(a)/100 mL. Adaptado de Mahdavi *et al.* ³⁷.

Sumos de Fruta	Naturais	Comerciais (tratados termicamente)
Ananás	36,16 ± 0,50	35,74 ± 0,32
Laranja	54,28 ± 0,32	42,85 ± 0,14
Maça	45,38 ± 0,41	42,81 ± 0,25
Pêssego	58,29 ± 0,39	50,05 ± 0,32
Uva Vermelha	144,50 ± 0,64	135,22 ± 0,36
Uva Branca	37,69 ± 0,38	33,71 ± 0,18

(a) Equivalentes de ácido gálico.

O tratamento ao qual a fruta é submetida durante a produção do sumo tem repercussões no seu conteúdo fenólico ³⁸. Um dos métodos de processamento adotados de forma a assegurar a segurança dos alimentos é a pasteurização. Sendo os compostos fenólicos particularmente sensíveis ao calor, as altas temperaturas requeridas durante este procedimento podem alterar a estrutura molecular e funcionalidade dos compostos fenólicos presentes nos sumos ^{35,38,39}.

A oxidação não enzimática dos sumos é favorecida na presença de di-hidroxibenzenos, principalmente os derivados de catecol, que têm a capacidade de reduzir o Fe (III) em Fe (II) (**Figura 8**). A capacidade dos di-hidroxibenzenos em promover a reação de Fenton prende-se com a maior formação de radicais livres por um tempo mais prolongado, comparativamente com a reação de Fenton convencional. O catecol é oxidado por iões metálicos, o que resulta na formação de uma semiquinona que é consequentemente oxidada a uma quinona ^{32,40}. O oxigénio molecular pode participar como um aceitador de eletrões, sendo reduzido pelo radical semiquinona a superóxido/hidroperóxido ($O_2^{\cdot-}/HOO^{\cdot}$), que por sua vez, pode ser convertido em H_2O_2 . Cria-se, assim, um ciclo vicioso que perpetua a degradação do sumo pela formação constante de radicais hidroxilo. Um mecanismo semelhante ocorre para o ião Cu (II) ³².

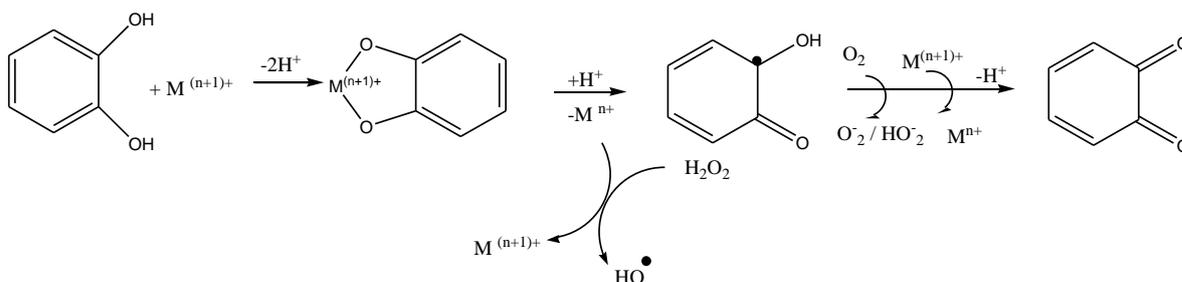


Figura 8 - Oxidação do catecol por metais pesados e formação do radical $HO\cdot$ ³².

1.5.4. EFEITO DAS VITAMINAS

Os sumos de fruta têm um papel preponderante na nutrição humana devido à presença de nutrientes em quantidades maiores do que em outros alimentos, nomeadamente o retinol (vitamina A), a tiamina (vitamina B1), a riboflavina (vitamina B2) e o ácido ascórbico (vitamina C) ¹.

O processamento e o armazenamento dos sumos de fruta podem conduzir à perda de 5-40% do retinol presente. Na ausência de oxigénio e sob temperaturas elevadas, tal como acontece no processo de esterilização dos sumos, as reações preferenciais são as de isomerização e clivagem do retinol ²³.

A estabilidade da tiamina é relativamente baixa em soluções aquosas. A sua degradação térmica leva à formação de produtos de degradação como os furanos, os tiofenos, os derivados de di-hidrotiofenos e o sulfeto de hidrogénio, responsáveis pela formação de um aroma desagradável. Perdas de 22% e 40% de tiamina podem ser observadas durante um período de armazenamento de um ano em sumos de laranja e de tomate, respetivamente, a 38°C. Pelo contrário, a riboflavina é normalmente estável durante o processamento dos sumos, sendo as suas perdas cerca de 10-15% ²³.

Os sumos de fruta são uma fonte considerável de ácido ascórbico, sendo utilizado na indústria dos sumos não só como acidulante mas também como estabilizador e antioxidante, tendo como objetivo estender o tempo de vida dos produtos ^{1, 19}. Para além das propriedades mencionadas, o ácido ascórbico confere ainda uma contribuição nutricional adicional ao produto. Nos sumos de fruta naturais, a vitamina C é rapidamente degradada por ação da luz, na presença de oxigénio e de iões metálicos (como o Cu (II) e o Fe (III)) ¹⁹. A degradação do ácido ascórbico pode ocorrer tanto por via aeróbia como anaeróbia, ambas causando o escurecimento do sumo, a mudança de sabor e do odor limitando, desta forma, o prazo de validade do produto ^{19,23}. As reações sequenciais e paralelas de degradação do ácido ascórbico são predominantemente de natureza não

enzimática, podendo seguir a via aeróbia ou anaeróbia. Atendendo à existência residual de oxigénio em alimentos embalados, a causa primária de degradação do ácido ascórbico é a oxidação em condições aeróbias. A degradação anaeróbia é insignificante na maioria dos alimentos mas no caso dos produtos enlatados como os sumos de fruta, o ácido ascórbico inicia a sua própria via de escurecimento não enzimática e anaeróbia, resultando no aparecimento do furfural (**Figura 9**) que, sendo um aldeído muito reativo, poderá combinar-se com grupos amina livres existentes em solução e integrar a reação de Maillard^{19,23}. Neste sentido, o ácido ascórbico pode ser usado como um marcador ou indicador de qualidade de sumos de fruta.

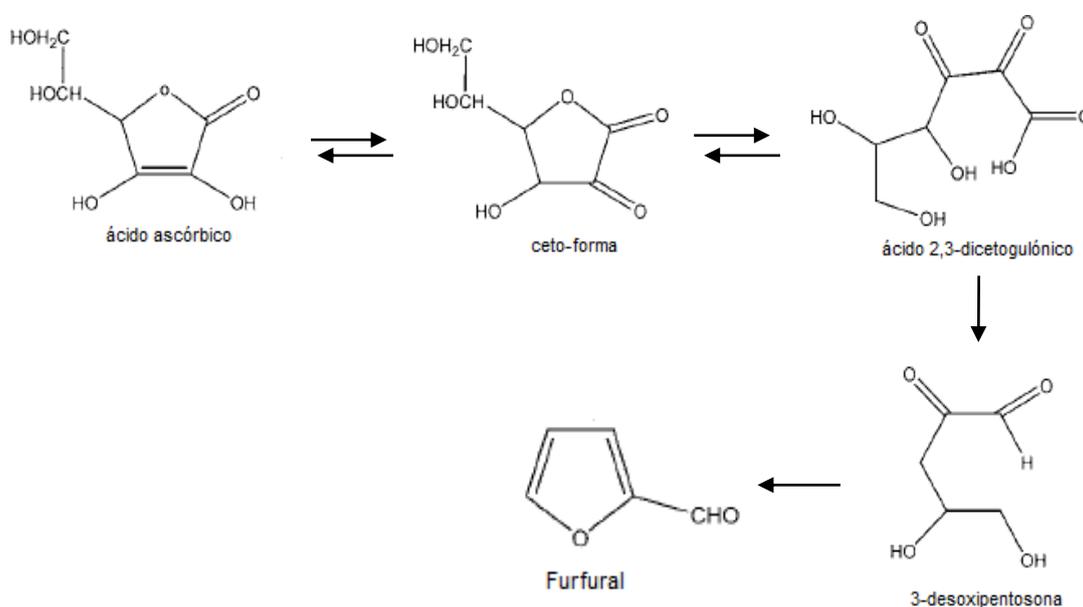


Figura 9 - Formação do furfural a partir da degradação anaeróbia do ácido ascórbico. Adaptado de Damodaran *et al.*¹⁹.

Outra desvantagem do ácido ascórbico é o seu efeito sobre outros compostos na presença de luz. No caso de corantes azo, que contêm o grupo funcional R-N=N-R', como é o caso da carmosina, ocorre uma reação catalisada pela luz, resultando na clivagem da ligação -N=N-, destruindo o cromóforo. Isso explica o desaparecimento de cor e o branqueamento da tonalidade característica de alguns refrigerantes¹.

1.5.5. EFEITO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

O aroma dos sumos de fruta é uma das características mais apreciadas pelos consumidores, o que faz dos compostos voláteis substâncias fundamentais na

aceitabilidade dos produtos no mercado ^{23,41}. O aroma típico dos sumos de fruta é resultado de uma combinação complexa de um grande número de compostos voláteis, cuja percepção depende da composição característica de cada espécie, da sua concentração e do limite de percepção individual de cada composto volátil (*threshold*). A percepção do aroma depende de um equilíbrio entre os compostos voláteis, não havendo um único constituinte individual a ser inteiramente responsável pelo aroma característico de um fruto ²³.

Devido à reatividade dos compostos voláteis, o produto final deve ser protegido da presença do oxigénio e da luz ¹². No caso dos sumos de fruta, protegê-los da ação do oxigénio significa minimizar o mais possível a quantidade dissolvida no sumo e a existente no espaço de cabeça da embalagem. No caso das bebidas gaseificadas, esta questão torna-se fácil de resolver uma vez que a presença de dióxido de carbono desloca naturalmente o oxigénio para o exterior da embalagem. A proteção contra a luz é conseguida usando embalagens opacas ¹²

Durante o processamento e armazenamento, os sumos medeiam reações que originam uma grande variedade de compostos voláteis, sendo os grupos dominantes os álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos e cetonas ¹⁸.

1.6. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE BEBIDAS DE FRUTA

Os procedimentos adotados pela indústria têm como objetivo prolongar a qualidade e segurança dos sumos de fruta, e assim maximizar o tempo para o qual estão adequados para o consumo ¹. Um parâmetro crucial no desenvolvimento de um sumo de fruta é a sua suscetibilidade à fermentação e outras formas de contaminação microbiana e enzimática ⁵. As técnicas de preservação de alimentos têm dois objetivos principais: controlar o crescimento de microrganismos que existem nas frutas e/ou que podem ter origem na higiene deficiente durante o processamento, e/ou inibir enzimas que ocorrem naturalmente nas frutas e que são responsáveis pela perda da consistência e aparência dos sumos de fruta ^{1,42}.

Os sumos de fruta produzidos com o intuito de serem comercializados são frequentemente sujeitos a um tratamento térmico, podendo variar na duração e temperatura empregada ⁴³. Apesar desta tecnologia ser muito eficaz e ser a mais utilizada na indústria dos sumos de fruta, alguns efeitos negativos podem surgir com o incremento da temperatura, podem conduzir à perda de vitaminas, de textura, podendo também conduzir à formação de odores desagradáveis, favorecendo, ainda, as reações de escurecimento não

enzimático, tornando o produto menos atrativo para o consumidor ^{5,43}. No passado, a estabilidade dos sumos de fruta era assegurada empregando uma leve pasteurização, sendo ela de 74 °C durante 16 segundos ou de 85 °C por um segundo. Atualmente, com o aparecimento de microrganismos resistentes ao calor, novos processos térmicos são utilizados para garantir a estabilidade destes produtos. No caso de *A. acidoterrestris*, para alcançar a sua redução de 5 log é necessário aplicar um tratamento de 98 °C durante 9 minutos ou 115 °C durante 8 segundos ^{42,43}. O uso de agentes antimicrobianos de origem natural como a nisina e a lisozima é uma possibilidade interessante e promissora para controlar a deterioração provocada por *A. acidoterrestris*, uma vez que, estas enzimas são capazes de inativar concentrações baixas de células vegetativas e esporos ⁴².

Os métodos de conservação não-térmicos, como é caso da utilização de conservantes de origem sintética, surgem como uma alternativa preventiva ^{43,44}. Estes aditivos alimentares são capazes de inibir ou retardar o crescimento de microrganismos ou a deterioração originada por estes ^{5,44}. O ácido benzóico e o ácido sórbico são os conservantes predominantemente utilizados na indústria dos sumos, e ocorrem naturalmente em alguns frutos e vegetais ^{5,8}. No entanto, são adicionados na indústria dos sumos na forma de sais de sódio e potássio devido aos seus problemas de solubilidade em água ¹. O benzoato de sódio (E211) tem um efeito mais marcante entre pH 6,0 e 6,5 e atua sobre os microrganismos em geral, enquanto o sorbato de potássio (E202) atua mais especificamente sobre bolores e leveduras a pH 3,0 ^{44,45}. Os melhores resultados são obtidos quando é utilizada em conjunto uma combinação de conservantes, como por exemplo, o sorbato de potássio com o benzoato de sódio ou com o dióxido de enxofre (SO₂), devido aos efeitos sinérgicos ⁴⁵. O mecanismo de ação do benzoato de sódio assenta essencialmente na destruição do gradiente de prótons nas células microbianas, enquanto que o sorbato de potássio atua na inibição da absorção de aminoácidos e inibição da função de enzimas sulfidrílo ⁵. Embora a adição intencional de conservantes não naturais no fabrico dos alimentos seja indispensável, o risco de toxicidade e o aparecimento de reações alérgicas nos consumidores faz com que exista uma pressão crescente para reduzir a quantidade de conservantes adicionados aos alimentos ^{5,45}.

A preferência dos consumidores por produtos alimentares com o mínimo de aditivos, que mantenham a funcionalidade, a conveniência e a segurança dos alimentos, que se assemelham o mais possível aos seus congéneres em fresco, mantendo as suas propriedades nutritivas e sensoriais, é cada vez maior. De facto, a manutenção da qualidade dos alimentos é frequentemente conseguida graças à adição de conservantes não naturais

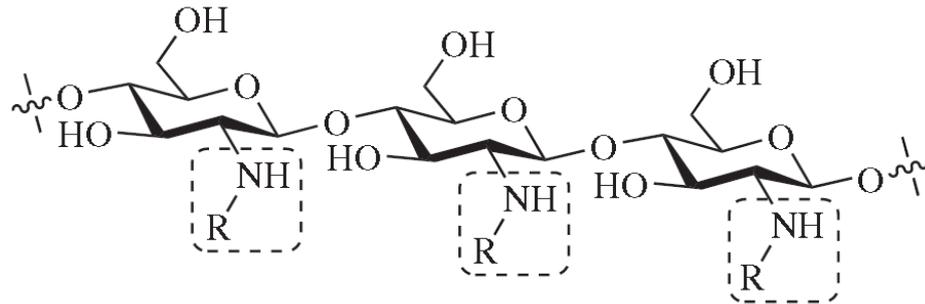
⁴³. Desta forma, a indústria alimentar, face às necessidades e exigências dos consumidores, vem equacionando, de forma acrescida, a criação/implementação de novas tecnologias, pretendendo que estas sejam inovadoras e que complementem os métodos de conservação convencionais ⁴⁵. Assim, tem-se verificado nos últimos anos uma diminuição no uso de aditivos de síntese química, optando-se, por alternativas mais naturais, como por exemplo, a utilização de derivados de quitina.

1.7. CARACTERÍSTICAS, PROPRIEDADES E FUNCIONALIDADES DA QUITOSANA

A quitina é o segundo polissacarídeo natural mais abundante na Terra, a seguir à celulose e é, encontrada, por exemplo, no exosqueleto dos crustáceos, na cutícula dos insetos e, ainda, na parede celular de fungos. É constituída por unidades 2-acetamido-D-glucopiranosose (*N*-acetil-D-glucosamina, GlcNAc) unidas por ligações β (1,4), sendo um polissacarídeo linear com uma estrutura cristalina extremamente organizada ^{46,47}.

A quitosana é o polissacarídeo obtido a partir da *N*-desacetilação parcial da quitina com um tratamento alcalino, onde os grupos acetilo da quitina são hidrolisados, originando derivados com diferentes razões de D-glucosamina (GlcN) e GlcNAc ^{46,48}. As características da quitosana em termos de peso molecular e grau de desacetilação dependem das condições adotadas durante o tratamento de obtenção do polímero. A utilização de condições muito severas, tais como o uso de soluções ácidas ou alcalinas concentradas, tempos prolongados e temperaturas elevadas devem ser evitadas pois resultam na fragmentação do polímero, obtendo-se uma quitosana de menor massa molar, o que afeta, as propriedades do produto final (**Figura 10**) ^{47,49,50}.

Geralmente, o produto da *N*-desacetilação da quitina só é considerado como sendo quitosana quando o grau de desacetilação é superior a 60% ^{46,48}. O grau de desacetilação é o parâmetro que expressa o conteúdo de GlcN nas cadeias do polímero e exerce influência sobre algumas propriedades como a solubilidade, a capacidade de adsorção e a viscosidade, determinando a sua aplicabilidade ^{47,48,51}.



Quitina: R = COCH₃

Quitosana: R = H (*GlcN*) ou COCH₃ (*GlcNAc*)

Figura 10 - Estruturas químicas da quitina e da quitosana. Adaptado de Shahidi *et al.* ⁴⁶.

A quitosana atua como uma base fraca, apresentando um pKa entre 6,3 e 7,3, dependendo da sua densidade de carga e do grau de desacetilação. É insolúvel em água, em soluções alcalinas e em solventes orgânicos ⁵². No entanto, é solúvel em soluções ácidas diluídas com pH inferior ao seu pKa e, portanto, soluções de ácido acético (CH₃COOH) e ácido fórmico (HCOOH) poderão ser utilizadas para dissolver este polímero ^{47,51,53}. Em meio ácido, os seus grupos amina livres da quitosana tornam-se protonados (-NH₃⁺), o que facilita a sua dissolução em água, conferindo-lhe um carácter catiónico. Esta é uma característica particular da quitosana, pois a maioria dos polissacarídeos apresentam carácter neutro (por exemplo, a celulose) ou aniónico (como o alginato). Muito do potencial deste polímero como biomaterial deriva da sua natureza catiónica e da elevada densidade de carga da solução ^{46,52,53}.

1.7.1. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero com grande interesse, uma vez que se obtém a partir dela um vasto leque de derivados poliméricos com propriedades físico-químicas e funções biológicas ajustadas aos diferentes campos de aplicação. A manipulação química da quitosana, por métodos como o *grafting* (ligação covalente de compostos) e o *crosslinking* (reticulação polimérica), tem sido extensivamente explorada com o intuito de lhe atribuir propriedades adicionais e/ou melhorar as suas características funcionais ⁴⁷. A vantagem da quitosana sobre outros polissacarídeos (por exemplo, a celulose, amido e galactomananas) é que a sua estrutura química permite modificações específicas, nomeadamente N-acetilações, formação de bases de Schiff e desaminações ^{46,54}.

A versatilidade química e as propriedades biológicas da quitosana devem-se principalmente à existência de três grupos reativos na estrutura do polímero: o grupo amina primário em C2, o grupo hidroxilo primário em C6 e o grupo hidroxilo secundário em C3 ^{46,53,55}. Embora a maioria das derivatizações químicas ocorram em virtude da presença dos grupos amina na posição C2, poderão também ocorrer alterações nos grupos hidroxilo em C3 e C6, sendo que as reações ocorrem preferencialmente em C6, uma vez que, para além dos grupos em C3 serem álcoois secundários, encontram-se estericamente impedidos sendo, portanto, menos reativos ^{46,53}.

Apesar do grande potencial, a quitosana em filme também apresenta algumas desvantagens, como a baixa estabilidade em soluções ácidas, a elevada permeabilidade à água, a baixa porosidade e a reduzida resistência térmica ⁴⁷. Desta forma, a modificação química tem como intuito obter um produto com as características desejadas, ultrapassando, assim, as limitações do polímero ^{51,53}. Dando particular atenção à interação do polímero com soluções ácidas diluídas, como os sumos de fruta, a formação de ligações intermoleculares fortes entre a quitosana e agentes reticulantes, conseguidas com estratégias de reticulação, culmina, essencialmente, no aumento da resistência mecânica e estabilidade química de filmes à base de quitosana neste tipo de matriz. As propriedades físico-químicas e mecânicas do produto desenvolvido são muito diferentes das do polímero original e estão diretamente relacionadas com a densidade de ligações cruzadas formadas durante o processo de reticulação ^{48,53}.

A genipina é frequentemente utilizada como molécula reticulante da quitosana devido à sua capacidade de reagir espontaneamente com grupos amina primários, como os grupos amina da quitosana, conduzindo a matrizes bastante estáveis de coloração azul (*gardenia blue*) ⁵⁶. Esta propriedade confere-lhe diversas aplicações, nomeadamente em sondas naturais, na medicina tradicional Chinesa e, ainda, na indústria alimentar como corante ⁵¹. A genipina é um composto heterocíclico de ocorrência natural, obtido da hidrólise enzimática com β -glucosidase do geniposídeo extraído dos frutos da *Gardenia jasminoides* ELLIS (**Figura 11**) ^{48,53}.

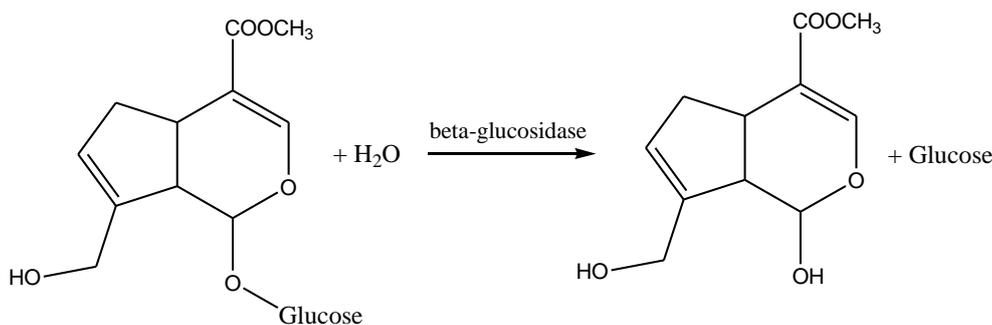


Figura 11 - Hidrólise do geniposídeo (à esquerda) pela β -glucosidase, obtendo-se genipina (à direita). Adaptado de Pujana *et al.* ⁵¹.

Outra vantagem do uso da genipina como agente reticulante é a sua elevada seletividade, sendo capaz de reagir apenas com grupos amina primários. Grupos nucleofílicos $-OH$ não são capazes de reagir com a genipina ⁵⁷. Para além da sua capacidade de desenvolver redes poliméricas na presença de grupos amina, comparativamente com o agente reticulante mais utilizado nas últimas décadas, o glutaraldeído, a genipina possui ainda a vantagem de ser 5000-10000 vezes menos tóxica e de ter uma maior biocompatibilidade, tornando-se uma alternativa natural aos agentes de reticulação convencionais e mais viável na indústria alimentar ^{50,53,56}.

O mecanismo de reticulação entre a quitosana e a genipina tem sido extensivamente estudado, no entanto, estes ainda não se encontra completamente elucidado, havendo vários mecanismos para explicar a reação entre a quitosana e a genipina ⁵³. No mecanismo proposto na **Figura 12** é favorecido um ataque nucleofílico da amina primária da quitosana ao átomo de carbono olefínico C3 da genipina, originando um aldeído intermediário, com consequente abertura do anel di-hidropirânico. Depois da abertura do anel ocorre um ataque da amina secundária originada da primeira reação, formando um composto heterocíclico. Por fim, ocorre uma substituição nucleofílica do grupo éster da molécula de genipina por uma ligação amida secundária ao grupo amina primário do biopolímero, com consequente libertação de metanol ^{48,50,53,56}.

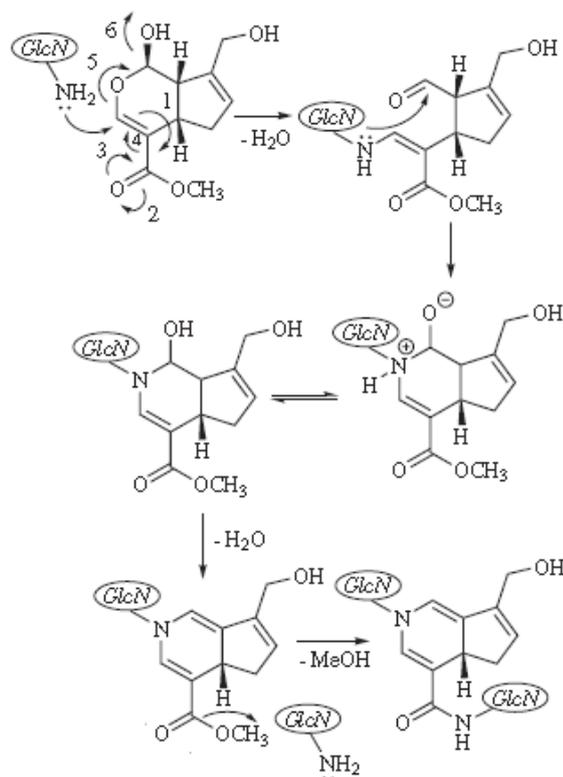


Figura 12 - Mecanismo 1 da reação entre a genipina e a quitosana ⁵³.

Tal como é observável pela **Figura 13**, pode existir migração de elétrons após o ataque nucleofílico da amina primária da quitosana ao carbono 3 olefinico da genipina, dando origem a dois intermediários possíveis ⁵⁶.

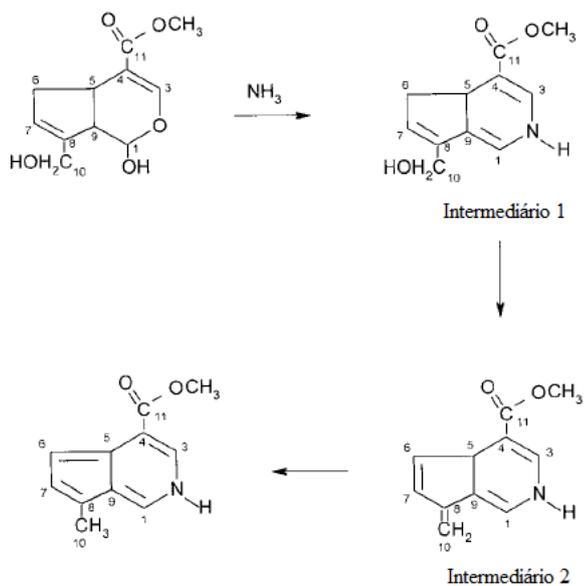


Figura 13 - Mecanismo proposto para a migração dos elétrons na molécula de genipina, após o ataque nucleofílico do grupo amina. Adaptado de Mi. *et al.* ⁵⁶.

Outro mecanismo proposto é iniciado pelo ataque nucleofílico da primeira reação do mecanismo referido anteriormente (**Figura 14**). As diferenças entre mecanismos assentam essencialmente na desidratação do anel heterocíclico. Ocorrem, de seguida, passos de polimerização, obtendo-se derivados altamente conjugados de genipina e quitosana. Poderão estabelecer-se, eventualmente, ligações amida secundárias originadas pela substituição nucleofílica do grupo éster da genipina pelo grupo amina da quitosana, tal como descrito no primeiro mecanismo proposto (**Figura 12**), conduzindo à formação de uma rede polimérica ⁵⁶⁻⁵⁸.

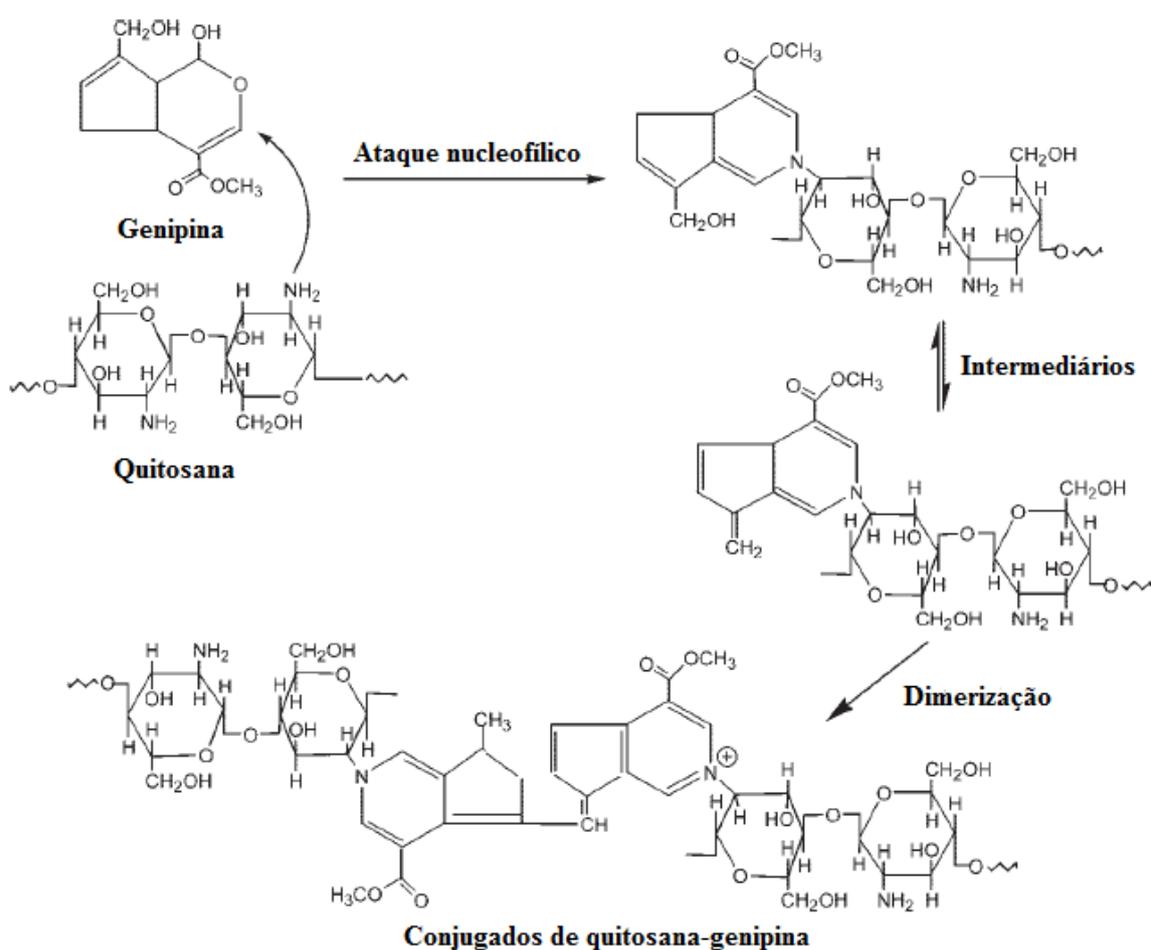


Figura 14 – Mecanismo 2 da reação entre a genipina e a quitosana. Adaptado de Chen *et al.* ⁵⁷.

No mecanismo da **Figura 15** podem ocorrer polimerizações, formando dímeros, trímeros ou tetrámeros de uma cadeia de quitosana ligada a uma molécula de genipina, sendo esta o ponto de ligação entre cadeias de quitosana. As ligações entre o polímero e o

agente reticulante seguem o mecanismo da **Figura 12**. O mecanismo proposto da polimerização da genipina encontra-se também representado na **Figura 15**^{50,56}.

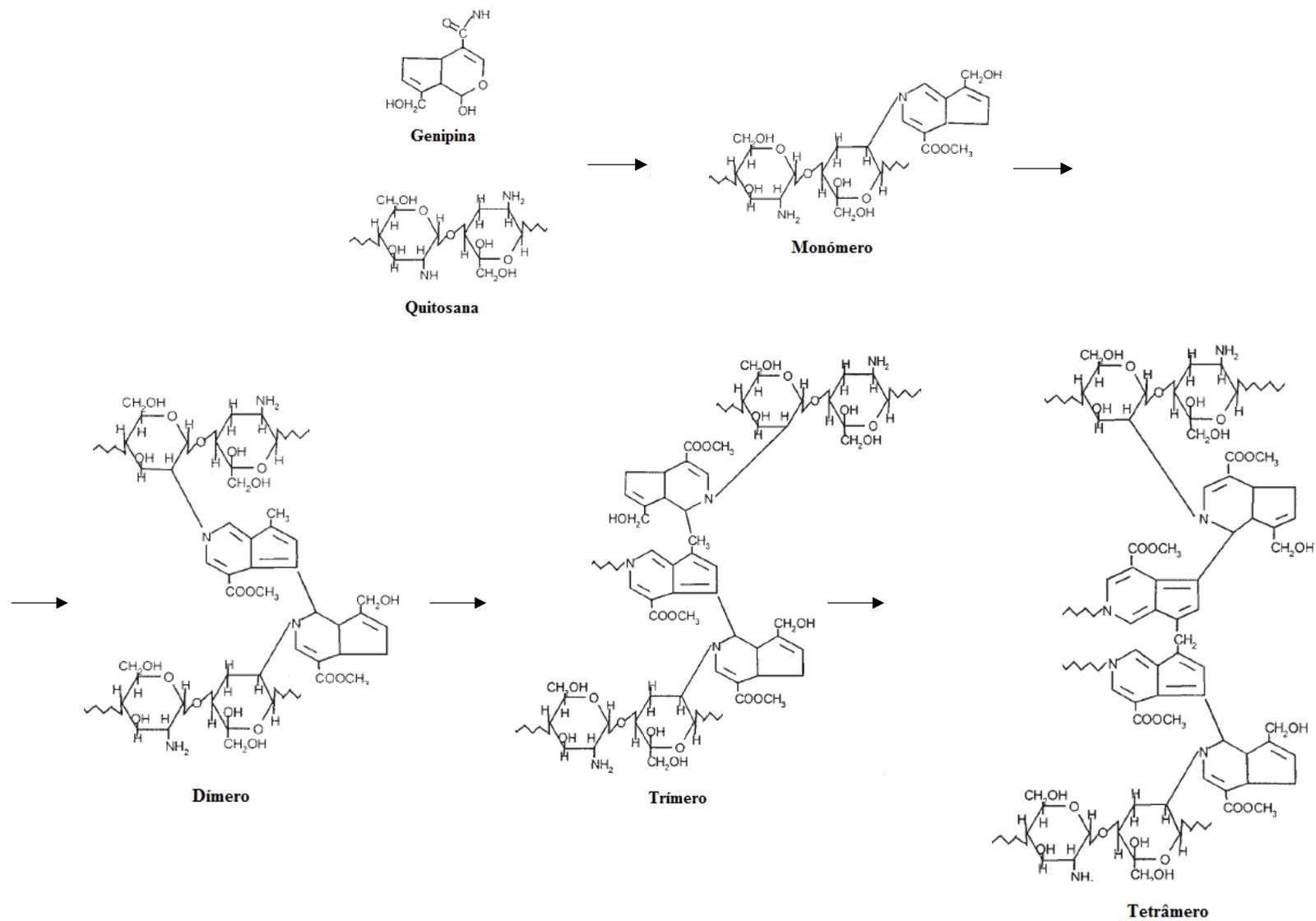


Figura 15 - Mecanismo 3 da reação entre a genipina e a quitosana. Adaptado de Mi *et al.* ⁵⁰.

1.7.2. POTENCIALIDADES DA QUITOSANA NA ÁREA ALIMENTAR

A quitosana tem sido extensivamente estudada para aplicações na área da biomedicina, biotecnologia, engenharia têxtil, mas também na área alimentar, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, elevada disponibilidade na natureza, viscosidade controlada, baixo custo e à sua capacidade para formar membranas, fibras, géis e filmes ^{46,48,56}.

Na indústria alimentar a quitosana pode ser usada em embalagens e/ou para o revestimento de alimentos, e ainda para incorporação no próprio fabrico do alimento, melhorando a sua qualidade e a segurança, aumentando o seu tempo de conservação (**Figura 16**) ⁴⁶.

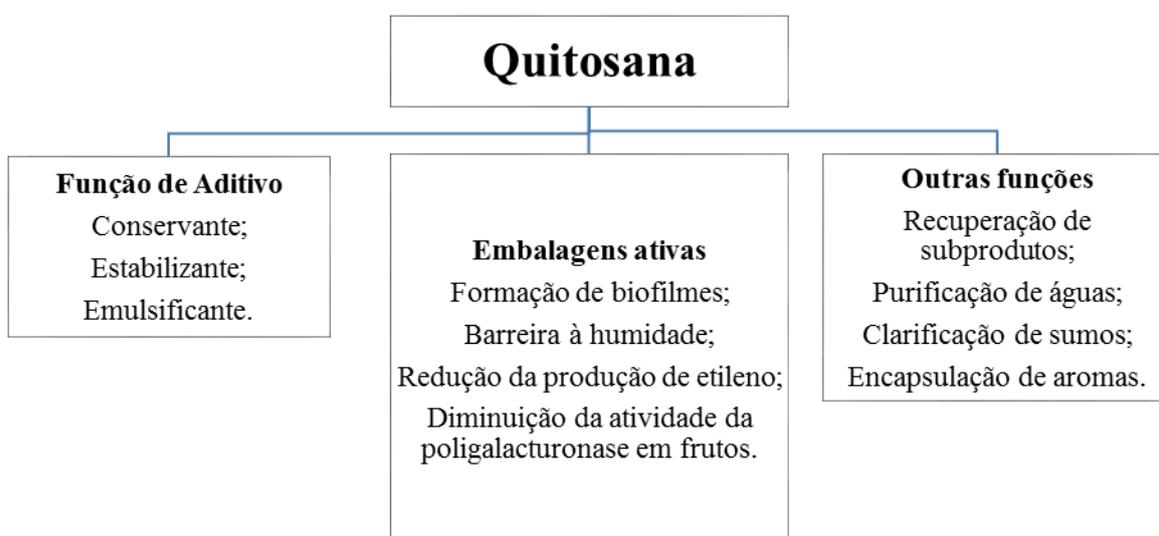


Figura 16 - Aplicações da quitosana na indústria alimentar.

Na maior parte dos alimentos frescos ou processados, as mudanças organolépticas indesejáveis ocorrem em maior extensão na sua superfície, exigindo, desta forma, um controlo da oxidação do crescimento microbiano. Tradicionalmente, a utilização de aditivos de origem sintéticos que sejam antimicrobianos e antioxidantes é a prática mais comum, no entanto, a sua atividade pode ser inibida por substâncias presentes na matriz alimentar, reduzindo a sua eficiência ⁴⁴.

A utilização da quitosana na formação de filmes edíveis transparentes surge como sendo a principal aplicação deste polímero na área alimentar. Estes filmes comestíveis, colocados sobre os alimentos, são resistentes à ruptura, flexíveis e de longa duração, e têm a capacidade de controlar mudanças fisiológicas, morfológicas e físico-químicas,

preservando, desta forma, as características indígenas dos produtos alimentares ^{21,46,59}. Estes filmes têm fortificado o conceito de revestimentos inteligentes, na medida em que limitam a disponibilidade de oxigênio, dióxido de carbono e humidade, funcionam como barreira contra a transmissão de gases e solutos e controlam a temperatura, podendo, ainda, intervir no controlo da taxa de respiração de frutos e vegetais, retardando, deste modo, inúmeras reações degradativas ^{21,52,59,60}. Para além disso, os filmes de quitosana contribuem para a proteção física e mecânica dos alimentos, dependendo das propriedades mecânicas do filme. Outra particularidade importante dos filmes de quitosana prende-se com a capacidade de incorporar ingredientes como vitaminas, minerais e compostos fenólicos, aumentando, assim, a funcionalidade dos alimentos ⁵⁹. Adicionalmente, graças à atividade antimicrobiana da quitosana, é possível reduzir, atrasar ou mesmo inibir o crescimento de microrganismos sobre a superfície do produto revestido e, desta forma, estender o tempo de vida útil de alimentos perecíveis (**Figura 17**) ^{46,60}.

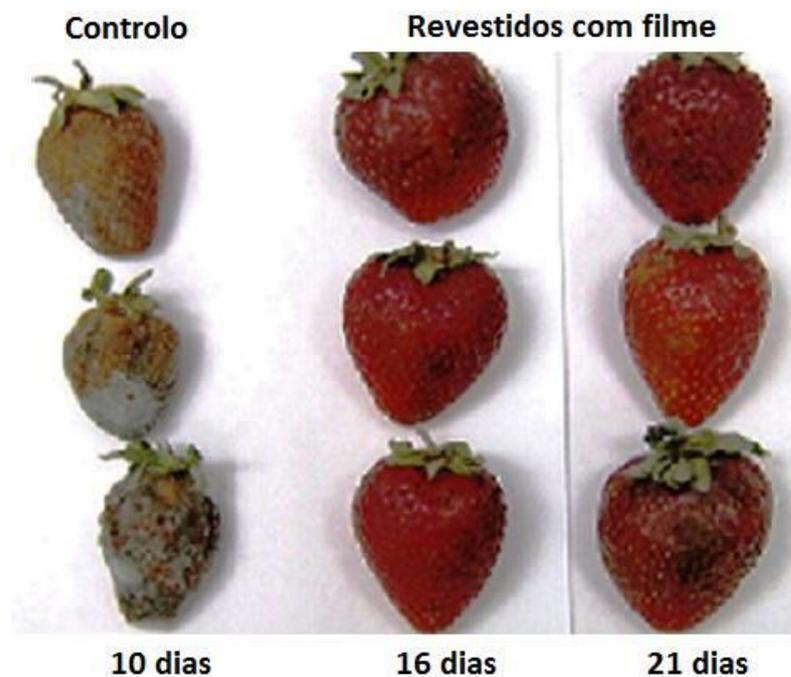


Figura 17 - Aparência de morangos não revestidos (controlo) e revestidos com filmes de quitosana após 10, 16 e 21 dias de armazenamento. Adaptado de Tripathi *et al.* ⁵⁹.

A clarificação é um passo importante no processamento de alguns sumos de fruta que tem como objetivo remover fragmentos celulares provenientes do tecido polposo como as pectinas, amido e compostos fenólicos, e que afetem o processamento, estabilidade e aceitação do sumo por parte dos consumidores ⁶¹. Este processo é normalmente realizado

por centrifugação, tratamento enzimático ou envolvendo o uso de agentes de clarificação como a gelatina, taninos, bentonite, caseinato de potássio e polivinilpirrolidona. Todavia, o método tradicional de clarificação é normalmente dispendioso e demorado, podendo, ainda, causar mudanças indesejáveis no produto final ^{61,62}. A quitosana surge, assim, como um agente de clarificação alternativo e natural ⁴⁶. A quitosana, sendo de natureza catiónica, é um agente coagulante eficaz na separação de partículas de suspensão em bebidas, formando complexos insolúveis ^{61,62}. Para além da eficácia semelhante comparativamente com os agentes clarificantes convencionais, a quitosana apresenta ainda a vantagem de ser antioxidante e antimicrobiana ⁴⁶. Adicionalmente, devido à elevada densidade de cargas positivas, este polímero tem sido utilizado no controlo da acidez dos sumos de fruta ⁴⁶.

Do ponto de vista nutricional, a quitosana pode ser utilizado como suplemento alimentar na medida em que, para além da sua função como fibra dietética, tem capacidades hipocolesterolémicas e hipolipédicas, atuando na redução dos níveis de colesterol e lípidos ^{63,64}.

Na indústria alimentar têm sido efetuados diversos estudos de forma a potenciar as propriedades da quitosana. Tem-se verificado que a sua atividade antimicrobiana e antioxidante são razões primordiais para a utilização deste biopolímero como conservante alimentar ⁴⁶.

1.7.2.1. Atividade antimicrobiana da quitosana

A quitosana e os seus derivados têm recebido especial atenção nos últimos anos por possuírem um largo espetro de ação quer contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, mas também contra leveduras e fungos. Este polímero tem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano e, assim, retardar a deterioração microbiana em alimentos, atuando como bacteriostático e bactericida ^{52,65}.

O mecanismo de ação deste biopolímero sobre os microrganismos não se encontra bem elucidado, pois várias propostas têm sido sugeridas. Alguns investigadores sugerem que o efeito antimicrobiano é devido ao caráter catiónico do polímero, isto é, à interação entre os seus grupos amina protonados e as macromoléculas carregadas negativamente existentes à superfície celular (proteínas e lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas), o que resulta inevitavelmente em mudanças morfológicas e estruturais na superfície, como a diminuição da permeabilidade e integridade da membrana e, conseqüente, perda de componentes intracelulares, indispensáveis ao desenvolvimento

microbiano ⁵². Portanto, quanto maior a densidade de carga, maiores são as interações entre a quitosana e o microrganismo e, desta forma, maior o poder antibacteriano ^{46,52,65}. Outro mecanismo proposto é a entrada da quitosana de baixo peso molecular, através da parede celular, ligando-se ao DNA no núcleo (carga negativa), o que leva à inibição da síntese proteica, impedindo, deste modo, a ação de determinadas enzimas essenciais à sobrevivência dos microrganismos. A sua capacidade de quelar nutrientes e iões metálicos essenciais à estabilização das membranas das bactérias poderá também ser um mecanismo plausível para explicar a atividade antimicrobiana da quitosana. Sabe-se também que a atividade antimicrobiana varia consoante o grau de desacetilação, do tipo e massa de quitosana utilizada, do tipo de microrganismo alvo e das condições do meio como a temperatura e o pH ^{46,47,52,65}. A um pH superior ao seu pKa, a quitosana apresenta dificuldade em se tornar bactericida devido à presença de poucas cargas positivas e à baixa solubilidade em água. Em meios alcalinos, a ação antimicrobiana da quitosana deve-se essencialmente aos efeitos quelantes e hidrofóbicos, em vez do efeito eletrostático responsável pelo extermínio dos microrganismos a pH inferiores. A temperatura é também um fator importante já que pode alterar a eletronegatividade da superfície celular ⁴⁷.

1.7.2.2. Atividade antioxidante da quitosana

O potencial antioxidante da quitosana deve-se a diferentes mecanismos que incluem: (1) a captura de radicais livres, associados a espécies reativas de oxigénio que estão diretamente envolvidos na morte celular e envelhecimento; (2) o baixo potencial redox, que favorece a sua oxidação, em detrimento dos restantes compostos existentes na matriz dos alimentos e; (3) a complexação de iões metálicos indispensáveis no processo de oxidação por facilitarem a transferência de eletrões nas reações ^{46,66}.

A capacidade antioxidante da quitosana depende do grau de desacetilação e do peso molecular. O grau de desacetilação tem uma maior capacidade de neutralizar radicais livres enquanto que quitosanas com menor peso molecular têm demonstrado um efeito mais marcante na eliminação de radicais de DPPH, de peróxido de hidrogénio e superóxido de hidrogénio comparativamente com quitosanas de maior peso molecular ^{46,67}. A capacidade antioxidante deste polímero deve-se sobretudo ao seu efeito quelante de iões metálicos, como o ferro e o cobre, envolvidos em reações de oxidação ^{46,66}. De facto, a quitosana apresenta elevada capacidade quelante para vários iões metálicos, em condições ácidas,

sendo, por este motivo, amplamente aplicada, para além da preservação de alimentos, na remoção ou recuperação de iões metálicos em diferentes indústrias ⁶⁵.

1.8. INTERAÇÃO DA QUITOSANA COM DIFERENTES COMPOSTOS EXISTENTES NOS SUMOS DE FRUTA

Devido às suas propriedades funcionais e estruturais, a quitosana apresenta uma boa capacidade de adsorção a diversos compostos presentes nas matrizes alimentares, podendo atuar como adsorvente de açúcares, iões metálicos e compostos fenólicos. Dependendo da massa molecular e do grau de desacetilação, os grupos amina e hidroxilo reativos da quitosana podem conferir-lhe elevada versatilidade, estabilidade química e reatividade, permitindo-lhe interagir com uma variedade de moléculas, sendo, portanto, usada na indústria dos sumos de fruta ou dos vinhos ^{46,68}.

As propriedades de adsorção da quitosana não se baseiam apenas na existência de grupos funcionais mas, também, na sua disponibilidade, que é geralmente determinada pelas características das matrizes poliméricas ⁵³. Assim, o número total de grupos amina não está necessariamente disponível para a adsorção dos compostos, uma vez que alguns locais de ligação dos grupos amina estão envolvidos em ligações de hidrogénio intra e intermoleculares. Para além disso, o grau de cristalinidade do polímero pode controlar a acessibilidade dos locais de ligação. Uma vez que a afinidade da quitosana pelos compostos é fortemente influenciada pela presença de grupos amina disponíveis, a reticulação com agentes que diminuam a disponibilidade destes grupos funcionais, especialmente dos grupos amina, pode reduzir a capacidade de adsorção do polímero ^{48,53}.

1.8.1. REAÇÃO DOS AÇÚCARES COM A QUITOSANA

A interação da quitosana com os açúcares encontrados em grande quantidade nos sumos desencadeia vários tipos de reações. A reação de Maillard é uma das reações mais problemáticas na indústria dos sumos. A presença de grupos amina faz da quitosana um participante na reação de Maillard, sendo então capaz de reagir com o grupo carbonilo de açúcares redutores como a glucose ou a frutose, levando à formação de produtos de reação de Maillard (MRP) ^{25,26}.

Diversos estudos têm explorado a formação de complexos de quitosana com diversos açúcares ^{25,26,67,69}. O aquecimento ou a irradiação UV da quitosana na presença de açúcares redutores catalisa a reação entre os grupos amina livres da quitosana e o grupo carbonilo

desses açúcares, originando uma mudança de cor, o que indica a formação de produtos da reação de Maillard (MRP) ^{25,69}. Esta formação de MRP coincide também com o aumento da atividade antioxidante, sugerindo um maior potencial antioxidante dos complexos quitosana-açúcar do que os seus precursores em separado ^{25,30,69}. A atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* tem demonstrado, de uma forma geral, ser mais eficiente na presença de MRP comparativamente com a quitosana isolada ^{25,30,69}. Deste modo, a formação de complexos com capacidades antioxidante e antimicrobiana superior a partir da quitosana tem demonstrado ser uma potencial alternativa natural aos aditivos sintéticos comumente utilizados, aumentando, assim, a qualidade do produto e, conseqüentemente, o seu tempo de prateleira.

1.8.2. ADSORÇÃO DOS IÕES METÁLICOS PELA QUITOSANA

O elevado potencial da quitosana para adsorver iões metálicos é resultado de inúmeros fatores: (1) a elevada hidrofiliçidade dos grupos hidroxilo e dos grupos amina; (2) a presença de grupos funcionais de grande tamanho; (3) a alta reatividade química destes grupos funcionais e; (4) a estrutura flexível das cadeias do polímero ³¹.

A quitosana pode interagir com os iões metálicos através de três mecanismos distintos, dependendo do metal, do pH e da matriz da solução. Os grupos amina são os responsáveis pela adsorção de catiões metálicos, em meios com pH aproximadamente neutro, por um mecanismo de complexação, devido ao dupletos de elétrões livres do átomo de nitrogénio, capazes de reagir com iões carregados positivamente. Por sua vez, em meios ácidos, a natureza fortemente hidrofílica dos filmes, causada pelo comportamento catiónico dos grupos amina protonados é a principal responsável pela adsorção de aniões, por atração eletrostática ⁷⁰. Esta atração eletrostática, para além de ocorrer com aniões, pode ser também o mecanismo de interação com complexos, resultantes da reação entre catiões metálicos e ligantes em solução. A adsorção de catiões de metais alcalinos e alcalino-terrosos ocorre através da formação de pares iónicos devido à afinidade reduzida da quitosana por estes metais ^{70,71}.

Dando particular atenção à interação da quitosana como os catiões e aniões, sabe-se que a pH neutro, existem cerca de 50% de grupos amina protonados, teoricamente capazes de interagir com aniões. No entanto, a existência de grupos amina $-NH_2$ livres pode desencadear a complexação de catiões metálicos, mecanismo este que pode coexistir com a

atração eletrostática requerida para a adsorção dos iões negativos. À medida que o pH diminui (sobretudo abaixo de pH 2), observa-se que a taxa de adsorção de catiões metálicos é drasticamente reduzida, devido à ligação competitiva dos iões H^+ . De facto, em soluções ácidas, como é o caso dos sumos, existem mais prótons a protonar os grupos amina, formando grupos $-NH_3^+$, reduzindo os locais de ligação disponíveis para os catiões metálicos, como o Fe (II) ou o Fe (III) ^{31,71}. Apesar de ocorrer a possibilidade de permuta entre iões, pensa-se que a interação entre os iões metálicos e os grupos funcionais presentes nos filmes é aumentada com o aumento do pH da solução, o que pode ser explicado pela diminuição do efeito inibitório dos iões H^+ e pela disponibilidade do par de eletrões do azoto da amina em doar eletrões aos iões metálicos ⁷⁰. Wang *et al.* ⁷¹ relacionaram a dependência do pH com a capacidade de interação da quitosana a um ião metálico, tendo chegado à conclusão que o metal é o aceitador de eletrões e que está ligado a uma ou mais cadeias da quitosana por meio do NH_2 , formando pontes com o grupo hidroxilo. Este mecanismo encontra-se esquematizado na **Figura 18**.

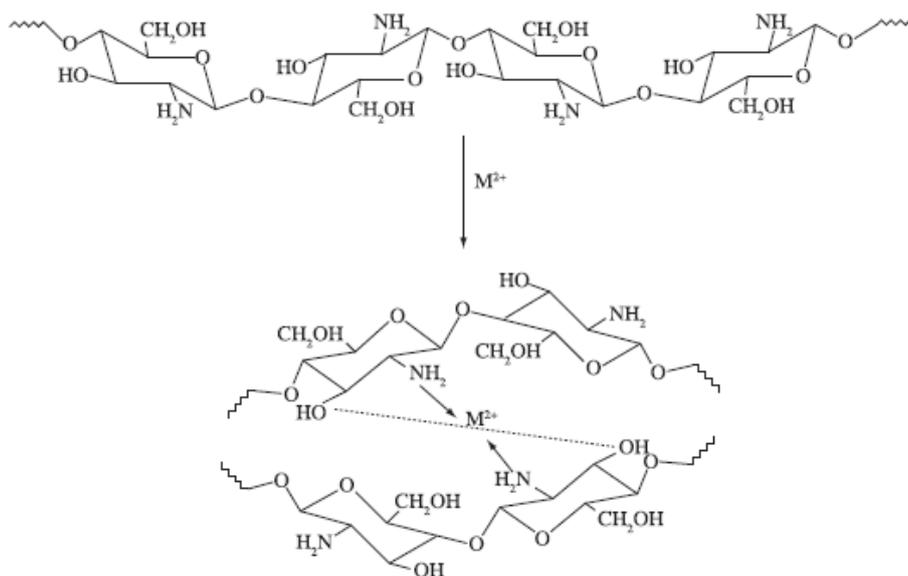


Figura 18 - Complexação de um ião metálico à quitosana de acordo com o modelo descrito por Wang *et al.* ⁷¹.

1.8.3. ADSORÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PELA QUITOSANA

Os grupos funcionais da quitosana podem interagir com os compostos fenólicos presentes em solução por interações fracas como as pontes de hidrogénio ou as forças de Van der Waals. Os grupos amina, mais precisamente, podem também contribuir com interações iónicas com os grupos carboxílicos dos ácidos fenólicos ⁶⁸. A quitosana é,

portanto, um bom adsorvente de compostos fenólicos, frequentemente encontrados em sumos de fruta, e que estão diretamente envolvidos em reações como o escurecimento enzimático e a oxidação não enzimática ⁷². Comparativamente com os adsorventes comumente utilizados, o caseinato de potássio e a polivinilpirrolidona (PVP), a eficácia da quitosana para adsorver este tipo de compostos tem sido superior em estudos com vinhos brancos ⁶⁸.

O processo de complexação entre os compostos fenólicos e a quitosana pode ser reversível ou irreversível. A reação reversível dos polifenóis ocorre em dois passos, sendo que no primeiro, devido à formação de ligações não covalentes, tanto a quitosana como o composto fenólico se encontram em equilíbrio. Neste ponto, estes complexos solúveis agregam-se e precipitam em solução. Todo o processo é reversível, pelo que o precipitado pode ser redissolvido ^{72,73}.

A capacidade de adsorção de um sistema não pode ser facilmente prevista pois são inúmeros os fatores que interferem com as propriedades do adsorvente e do adsorvido, nomeadamente a força iónica, a concentração de soluto, a competição entre solutos, a solubilidade em água, entre outros. O pH é um dos fatores que influencia a capacidade de adsorção dos compostos fenólicos. Estando num meio ácido, a adsorção dos compostos fenólicos pela quitosana é estimulada, uma vez que os fenóis se encontram não-dissociados e, por isso, a formação das ligações de dispersão predominam. Por sua vez, a pH alcalino, a adsorção pela quitosana é inibida na medida em que ocorre dissociação dos grupos hidroxilo e carboxilo dos compostos fenólicos ^{72,73}.

2. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

A utilização de conservantes de síntese química é uma prática comum na indústria dos sumos, no entanto, tal como todos os aditivos alimentares, existem limites rigorosos de utilização que não devem ser extrapolados, de forma a garantir, ao consumidor, a segurança do alimento.

A indústria tem interesse em reduzir a utilização dos conservantes de síntese química nos sumos, existindo, assim, a necessidade de encontrar estratégias alternativas de conservação. Devido às características e propriedades da quitosana, o recurso a filmes deste polímero reticulados, nomeadamente com a genipina, tem sido uma metodologia estudada como alternativa de conservação.

Um dos objetivos deste trabalho é estudar a utilização de filmes de quitosana reticulados com genipina como conservantes naturais em refrigerantes de fruta, dadas as suas propriedades antioxidante e antimicrobiana que, permitem estender o tempo de prateleira destes produtos. Algumas das características físico-químicas e sensoriais dos sumos de fruta serão estudadas ao longo do período de armazenamento, de forma a prever a influência dos filmes nas propriedades organoléticas e nutricionais da bebida.

No entanto, muitos dos constituintes destas bebidas, como por exemplo os açúcares, que estão presentes em grandes quantidades nos sumos, podem interagir com os filmes à base de quitosana. O segundo objetivo do trabalho é estudar o mecanismo de reticulação e as estruturas formadas entre a quitosana e a genipina, assim como a possível modificação destas estruturas, na presença de açúcares, usando, para tal, soluções modelo de genipina, glucosamina e glucose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA RETICULADOS COM GENIPINA

Os filmes de quitosana reticulados com genipina (**Figura 19**) foram preparados de acordo com a metodologia de Nunes *et al.* ⁷⁴. Uma solução aquosa de quitosana (Sigma-Aldrich, peso molecular médio) a 1,5 % (m/v) foi preparada por dissolução em 0,1 M de ácido acético (Sigma-Aldrich, ≥ 98 %) sob agitação magnética constante durante cerca de 16 h à temperatura ambiente. Filtrou-se a solução sob vácuo, por um funil de placa porosa (G2), tendo-se adicionado posteriormente 0,75 % (m/v) de plastificante (glicerol). A mistura foi colocada num banho de água a 50 °C durante 10 min de modo a promover a sua homogeneização e, de seguida, arrefecida à temperatura ambiente sob agitação constante (aproximadamente 30 min). Adicionaram-se 250 μ L de uma solução de genipina – Gen – (Challenge Bioproducts Co., Taiwan, $\geq 98\%$), 10 % (m/v) em etanol (95 %), para obter uma concentração de 0,05% de genipina no filme, tendo-se deixado uma hora a reagir com agitação. Decorrido o tempo de reação, a solução foi desgaseificada sob vácuo, tendo sido, de seguida, transferidos 31 g para placas de plexiglass 12 x 12 cm (área útil de 144 cm²), colocadas num suporte nivelado, permanecendo à temperatura ambiente durante 24 h. As placas foram colocadas numa estufa com circulação de ar a 35 °C durante 16 h para a formação dos filmes de quitosana e genipina por evaporação do solvente.



Figura 19 - Filme de quitosana reticulado com genipina.

3.1.1. REDUÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA-GENIPINA

Preparou-se uma solução de boro-hidreto de sódio (NaBH_4) 15 % (m/v) em amoníaco 3 M, tendo o filme de quitosana sido posteriormente mergulhado na solução durante 1 h. Decorrido este tempo, procedeu-se à lavagem abundante do filme com água destilada.

3.2. INCORPORAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA-GENIPINA EM REFRIGERANTES À BASE DE FRUTA

Neste estudo foi usado o refrigerante Sumol Ananás comercializado em garrafa de 1,5 L, sendo todas as embalagens do mesmo lote (AL40341). Foram colocados 9 cm² (1 quadrado de 3x3 cm) do filme à base de quitosana reticulado com genipina reduzido e não reduzido em contacto com 100 mL de refrigerante, tendo sido posteriormente adicionados 0,02 mg/mL de azida de sódio para evitar o crescimento microbiano. Os ensaios foram armazenados à temperatura ambiente (22 °C) e a 37 °C (condição de envelhecimento acelerado) numa estufa durante 6 meses. Todos os estudos foram realizados em duplicado (n=2). Para cada condição de estudo foi efetuado um controlo que correspondeu ao sumo sem adição do filme à base de quitosana. Os filmes à base de quitosana com as mesmas proporções (1 quadrado de 3x3 cm) foram também colocados em 100 mL de Sumol Laranja Zero, tendo sido armazenados a 37 °C durante dois meses (**Figura 20**).

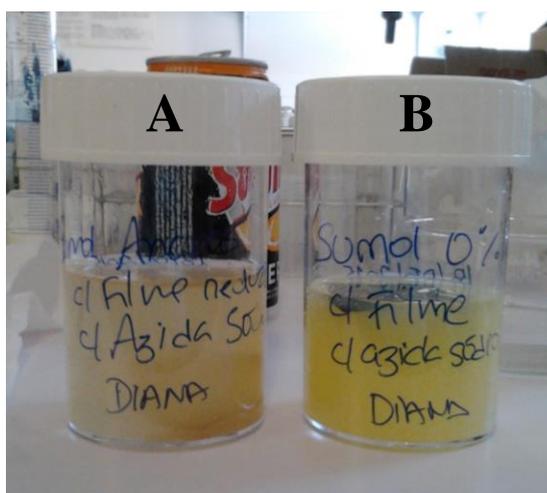


Figura 20 - Os filmes à base de quitosana em contacto com os refrigerantes, antes do armazenamento a 37 °C: (A) filme de quitosana reticulado com genipina reduzido em sumo Sumol Ananás; e (B) filme à base de quitosana não reduzido em sumo Sumol Laranja Zero.

3.3. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO REFRIGERANTE À BASE DE FRUTA

3.3.1. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado de Huang *et al.* ⁷⁵. Este método baseia-se num mecanismo de reação de oxidação-redução, pela transferência de eletrões dos compostos fenólicos presentes em solução, em condições alcalinas, para o reagente de Folin-Ciocalteu, caracterizado como sendo uma mistura complexa de ácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos. Nesta reação forma-se um complexo azul, que pode ser monitorizado espectrofotometricamente a 760 nm ⁷⁶.

Adicionaram-se 0,125 mL de amostra apropriadamente diluída, a 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Homogeneizou-se a solução e deixou-se a reagir durante 5 min à temperatura ambiente. De seguida, adicionaram-se 1,25 mL de solução de carbonato de sódio 75 g/L e 1 mL de água destilada. Deixou-se a reagir durante 90 min à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de reação, foram lidas as absorvâncias a 760 nm, utilizando o equipamento de leitura de placas (absorbance microplate reader Biotek EON). Soluções de ácido gálico, com concentrações compreendidas entre 0 e 150 mg/L, foram utilizadas como padrões para a construção da curva de calibração. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalentes de ácido gálico (GAE). Todas as medições foram realizadas em triplicado.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos refrigerantes armazenados na presença do filme e respetivos controlos foi determinada por uma adaptação do método do ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) descrito por Re *et al.* ⁷⁷. Este método consiste na redução do radical monocatiónico de ABTS⁺ inicialmente formado por oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio (K₂SO₅) (**Figura 21**). Este radical caracteriza-se por ser um cromóforo azul esverdeado quimicamente estável, com um máximo de absorvância a 734 nm. A redução do ABTS⁺, estimulada pela presença de antioxidantes dadores de hidrogénio ou de eletrões, provoca a perda de coloração, podendo

esta perda ser convertida numa percentagem de inibição do ABTS, que é proporcional à concentração de antioxidante ⁷⁸.

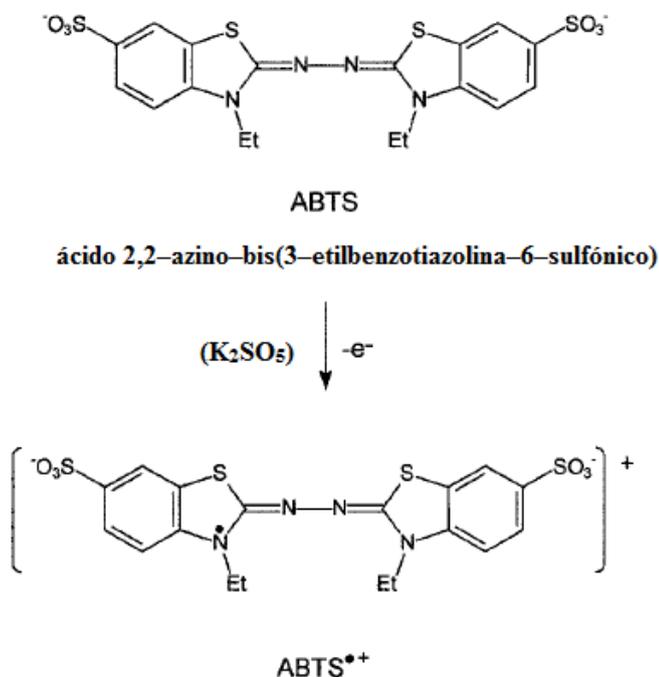


Figura 21 - Formação do radical ABTS^{•+}. Adaptado de Pannala *et al.* ⁷⁸.

Preparou-se uma solução a 7 mM de ABTS em 2,45 mM de persulfato de potássio, deixando-a reagir no escuro durante 16 h à temperatura ambiente para a formação do ABTS^{•+}. Posteriormente, diluiu-se 1 mL da solução de ABTS^{•+} em 80 mL de etanol. A leitura da absorvância foi efetuada a 734 nm utilizando o equipamento de leitura de placas (absorbance microplate reader Biotek EON), ajustando a concentração da solução para valores de absorvância compreendidos entre 0,7 e 0,8. Colocaram-se 50 µL da amostra apropriadamente diluída em 1 mL da solução de ABTS^{•+} e deixou-se reagir no escuro durante 15 minutos. A atividade antioxidante das soluções foi determinada pela percentagem de inibição, calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{abs}_{\text{branco}} - \text{abs}_{\text{amostra}}}{\text{abs}_{\text{branco}}} \right) \times 100$$

Absbranco corresponde ao valor de absorvância da solução de ABTS^{•+} em que foram adicionados 50 µL de água destilada. Em termos de quantificação, a percentagem de

inibição de ABTS⁺ foi determinada em função da concentração de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), que foi sujeito às mesmas condições de análise. Os valores de concentração de Trolox foram compreendidos entre 0 e 400 µM. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.3.3. QUANTIFICAÇÃO DO TEOR EM ÁCIDO ASCÓRBICO

Este método espectrofotométrico baseia-se na redução de 2,6-dicloroindofenol (DCIP) pelo ácido ascórbico em meio ácido⁷⁹. O DCIP é um corante que em meio básico apresenta uma cor azul, em meio ácido uma tonalidade cor-de-rosa e na forma reduzida apresenta-se incolor⁸⁰. Assim, a adição de ácido ascórbico resulta na descoloração do DCIP, que origina uma solução incolor a partir de uma solução cor-de-rosa. Esta reação pode ser monitorizada espectrofotometricamente a 518 nm.

A estabilidade do ácido ascórbico foi avaliada quer nos refrigerantes armazenados à temperatura ambiente quer a 37 °C. Adicionaram-se 4,5 mL de DCIP (Sigma) 36 mg/L a 0,5 mL de amostra (apropriadamente diluída com solução de ácido oxálico). Dada a instabilidade do ácido ascórbico, as leituras espectrofotométricas foram efetuadas de imediato. Foi efetuado um branco para cada amostra analisada que consistiu em adicionar 4,5 mL de água a 0,5 mL de amostra. As leituras foram analisadas em duplicado e as medições efetuadas num espectrofotómetro a 515 nm (Jenway, 6405 UV/Vis). Foi efetuada uma curva de calibração de ácido ascórbico preparado numa solução de ácido oxálico (Sigma) a 1% com concentrações compreendidas entre 0 e 100 mg/L. Os resultados foram expressos em mg/L de ácido ascórbico. O conteúdo em ácido ascórbico dos refrigerantes foi determinado pela percentagem de inibição, tal como se encontra descrito no ponto 3.3.2., sendo a *Absbranco* o valor da absorvância da solução de DCIP e de ácido oxálico.

3.3.4. MONITORIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE ESCURECIMENTO

A intensidade de acastanhamento e a sua monitorização espectrofotométrica a 420 nm é utilizada como indicador do grau da reação de Maillard⁸¹.

O escurecimento dos refrigerantes foi determinado por monitorização da absorvância das soluções a 420 nm. A absorvância foi medida usando o equipamento de leitura de placas (absorbance microplate reader Biotek EON).

3.3.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL

3.3.5.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Comparativamente com os métodos convencionais de extração de amostras líquidas ou gasosas, a microextração em fase sólida (SPME) é simples, rápida e sensível, permitindo combinar a extração e a concentração numa única etapa, reduzindo consideravelmente, deste modo, o tempo de análise e eliminando o consumo de solventes orgânicos. A SPME é baseada em equilíbrios multifásicos, consistindo na interação entre a fração livre do analito e a fase estacionária que constitui a fibra ^{82,83}.

Os compostos voláteis existentes nos sumo de ananás armazenado após 6 meses, na presença de filme, foram extraídos por HS-SPME. A amostra de sumo foi previamente degaseificada na câmara fria durante a noite. A amostra (10 mL) foi colocada num frasco (Chromacol, Hertfordshire, Reino Unido) com uma tampa com septo de PTFE (politetrafluoro-etileno) de 9 mL e adicionou-se 2,0 g de cloreto de sódio (NaCl). O frasco foi colocado num banho termostaticado a $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e a fibra de SPME polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) (**Figura 22**) foi exposta no espaço-de-cabeça por 20 min. A variabilidade é expressa em RSD (*relative standard deviation*).



Figura 22 – Seringa de SPME.

3.3.5.2. Cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (GCxGC)

Após a etapa de extração, a fibra de SPME foi inserida manualmente no injetor do GC × GC – ToFMS, a 250°C , durante 30 s para dessorção térmica dos compostos. A injeção foi feita em modo *splitless*. O sistema GC × GC – ToFMS consistiu num cromatógrafo de fase gasosa Agilent GC 7890A (Agilent Technologies, Burwood, Australia) e num espectrómetro de massa Pegasus 4D (LECO, St. Joseph, MI, USA – **Figura 23**) com analisador de tempo de voo (ToF). Na primeira dimensão foi usada uma coluna Equity-5 ($30\text{ m} \times 0,32\text{ }\mu\text{m}$), com $0,25\text{ }\mu\text{m}$ de espessura (J&W Scientific Inc.,

Folsom, CA, USA) e na segunda dimensão foi usada uma coluna DB-FFAP (0,79 m × 0,25 µm), com 0,25µm de espessura (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA).

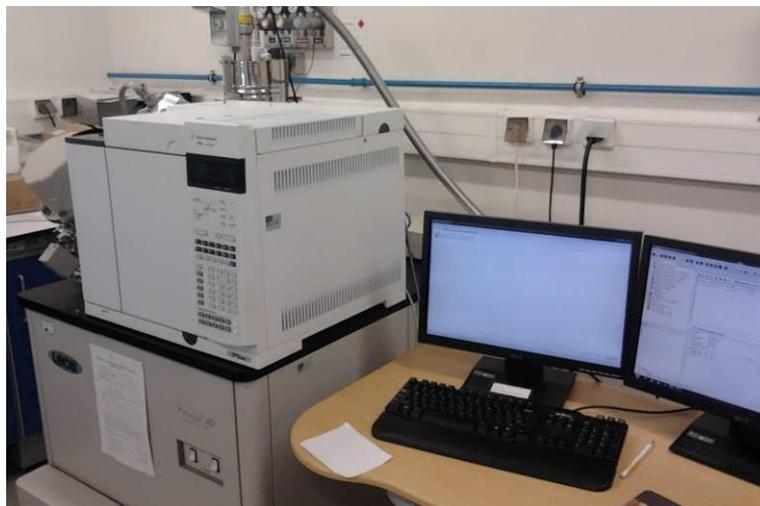


Figura 23 - LECO Pegasus 4D GC × GC – ToFMS.

O hélio foi usado como gás de arraste, com um fluxo constante de 2,5 mL/min. A temperatura do forno principal estava programada para 40 °C (1 min), mantida a 40 °C até 230 °C a 10 °C/min, mantendo-se a 230 °C durante 2 minutos. A temperatura do forno secundário foi programada para 70 °C (1 min), mantida a 70 °C até 250 °C a 10 °C/min, mantendo-se a 250 °C durante 3 min. A temperatura da linha de transferência e da fonte de MS foi de 250°C; o tempo de modulação foi de 6s. O espectrômetro de massa ToF-MS foi programado a uma taxa de armazenamento de 125 espectros/s, operou a 70eV numa gama de 33 a 350 m/z e com uma voltagem do detetor de 1695 V. O sinal de ruído usado foi de 80. Os dados foram processados usando o *software* ChromaToF (LECO).

A identificação dos compostos realizou-se pela comparação dos espectros de massa experimentais com espectros existentes nas bibliotecas de bases de dados comerciais disponíveis no software do GCxGC-ToFMS: *Wiley*, *US National Institute of Science and Technology* (NIST), *Mainlib* e *Replib*, e com espectros de padrões puros existentes no laboratório.

3.4. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES MODELO DE AÇÚCAR

Soluções modelo de glucose (D-(+)-Glucose, Sigma-Aldrich, ≥ 99,5 %) e de frutose (D-(-)-Fructose, Sigma-Aldrich, ≥ 99 %), com concentração 1,0 g/L, foram preparadas por dissolução do respetivo açúcar em água destilada, sem ajuste de pH e pH

ajustado para 3,5 através da adição de ácido clorídrico 1 M. A todas as soluções foram adicionadas 0,02 mg/mL de solução de azida de sódio para evitar o crescimento microbiano. Transferiram-se 20 mL da solução para porta-amostras, em duplicado (n=2). A estas soluções adicionaram-se 40 cm² de filme de quitosana reticulado com genipina. Os porta amostras foram colocados à temperatura ambiente ou a 37 °C. Foi também realizado um controlo, em duplicado, que correspondeu a uma solução de água destilada e azida de sódio, com a mesma proporção de filme à base de quitosana.

3.5. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES MODELO DE GENIPINA E GLUCOSAMINA

Soluções modelo de 0,50 mg/mL de Gen e 0,39 mg/mL de glucosamina – GlcN – (Hidrocloreto de glucosamina, Merck) foram preparadas num tubo de sovirel, tendo a Gen sido dissolvida em etanol (95 %) e a GlcN em água ultra-pura. O pH das soluções foi acertado para pH 3,5 com ácido fórmico. As soluções de Gen (0,50 mg/mL) e GlcN (0,39 mg/mL) em separado constituíram o leque de controlos. As soluções foram incubadas a 37 °C durante uma semana. Decorrido o tempo de armazenamento, uma alíquota de 1 mL das soluções de Gen, GlcN e Gen+GlcN foram congeladas para o estudo posterior em Espetrometria de Massa. De seguida, foram adicionadas 0,49 mg/mL glucose (Glc) à solução de Gen+GlcN e esta foi armazenada por mais uma semana na estufa a 37 °C, sendo posteriormente guardada.

3.6. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO MODELO DE BUTIRAMIDA E GLUCOSE

Soluções modelo mistura de 0,5 mg/mL de butiramida (Fluka, >98%) e 5,4 mg/mL de Glc (D-(+)-Glucose, Sigma-Aldrich, ≥ 99,5 %) foram dissolvidas com água ultra-pura num tubo de sovirel. O pH das soluções foi acertado para pH 3,5 com ácido fórmico. Foram usados como controlo uma solução de butiramida (0,5 mg/mL). As soluções foram incubadas a 37 °C durante uma semana.

3.7. ESPETROMETRIA DE MASSA (MS)

A Espectrometria de Massa (MS) desempenha um papel importante no campo da caracterização e identificação estrutural de diversas moléculas, sendo aplicada a diversas áreas. A MS é um método analítico sensível, seletivo e rápido, que permite a separação e detecção de compostos eletricamente carregados (ou iões) em fase gasosa ⁸⁴.

As soluções modelo de Gen, GlcN e Gen+GlcN foram monitorizadas em modo positivo por espectrometria de massa (ESI-MS) e por espectrometria de massa Tandem (ESI-MS/MS) usando um espectrômetro de massa com um analisador de trapa de iões LXQ, do inglês “Linear Ion Trap” (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA – **Figura 24**), com as condições normais de funcionamento as seguintes: voltagem de electropulverização foi de 5 kV; temperatura capilar foi de 320 ° C; voltagem do capilar de 29 V e tubo de lente de tensão 120 V. As amostras foram injetadas com um fluxo de 8 mL/min para a fonte de ionização. Foi utilizado azoto como gás nebulizador e de secagem. Os espectros de MS/MS foram obtidos variando a energia de colisão entre 15 e 25 (unidades arbitrárias). Os dados adquiridos foram tratados usando o programa de análise de dados Xcalibur.

Para todas análises de ESI, as amostras foram dissolvidas em metanol:água:ácido fórmico (0,1%) (1:1:1) (v:v:v), sendo a digitalização dos espectros adquiridos na gama de m/z 100 a 1500.



Figura 24 - Ion trap Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA.

As reações também foram monitorizadas em modo positivo por ESI-MS e ESI-MS/MS usando o espectrômetro de massa com um analisador tempo de voo Q-TOF2 (Micromass, Manchester, UK) com um fluxo de 10 µL/min, voltagem aplicada na agulha de 3 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 80 °C, temperatura de solvatação de 150 °C. A resolução foi ajustada para 9000 (FWHM). O espectro de massa foi adquirido durante 1 minuto. O espectro de massa tandem foi adquirido por

decomposição induzida por colisão (CID, *collision-induced decomposition*) usando árgon como gás de colisão, durante 1 minuto. As energias de colisão utilizadas variaram de 20 a 35 eV. Os dados adquiridos foram tratados usando o programa de análise de dados MassLynx 4.0.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, da atividade antioxidante, do conteúdo de ácido ascórbico e da intensidade de escurecimento foram avaliados estatisticamente. Tal avaliação foi realizada com base no teste F e *t*-student com um nível de significância de 95 % (ferramentas do Microsoft Excel 2010). As diferenças foram aceites como significativas quando $p \leq 0,05$.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A preocupação atual dos consumidores e, concomitantemente, da indústria alimentar, por produtos mais saudáveis de elevada qualidade e funcionalidade, constituiu um dos fatores para a solicitação da empresa Sumol+Compal para a incorporação dos filmes à base de quitosana nos refrigerantes analisados. A utilização de biopolímeros com propriedades conservantes, nomeadamente a quitosana em forma de filme, reticulado com genipina de forma a garantir a sua insolubilidade na matriz ácida dos refrigerantes, em detrimento dos processos convencionais de conservação, tem surgido como uma tecnologia recente e inovadora de conservação alimentar. Qualquer estratégia alternativa terá de atuar a três níveis: como conservante, antioxidante e na manutenção das características organoléticas do produto.

Este trabalho surgiu como uma adaptação de um estudo efetuado a vinhos brancos por Nunes *et al.* ⁷⁴, onde se verificou que vinhos quando colocados em contacto com o filme de quitosana reticulada com genipina, em detrimento da adição de anidrido sulfuroso, apresentavam estabilidade a nível microbiológico e tinham atividade antioxidante após 9 meses de armazenamento. Com o objetivo de avaliar a eficiência dos filmes de quitosana-genipina nos refrigerantes Sumol Ananás como conservantes, nomeadamente com atividade antioxidante e antimicrobiana, os filmes foram submergidos num refrigerante de fruta e as propriedades deste foram determinadas ao longo do armazenamento.

A presença/ausência do filme de quitosana reticulado com genipina adicionado aos refrigerantes, assim como os diferentes tempos/temperaturas de armazenamento constituíram as variáveis dependentes estudadas. Dado que a temperatura é um fator determinante durante o armazenamento dos sumos, o presente trabalho foi conduzido a duas temperaturas distintas: à temperatura ambiente (sensivelmente a 22 °C) para simular o envelhecimento natural dos refrigerantes nas prateleiras das superfícies comerciais, e a uma temperatura superior (37 °C) que mimetiza um envelhecimento acelerado. A aplicação de uma temperatura superior faz com que reações que acontecem naturalmente nos sumos, ocorram a velocidades superiores, permitindo, deste modo, tempos de amostragem mais curtos.

Ao longo deste capítulo irão ser apresentados os resultados dos diversos parâmetros avaliados durante o armazenamento dos refrigerantes, nomeadamente o conteúdo total fenólico e de ácido ascórbico, a atividade antioxidante e a intensidade de escurecimento, de

forma a averiguar o efeito do armazenamento e, sobretudo, da presença do filme de quitosana reticulado com genipina nas propriedades físico-químicas dos refrigerantes. Para além disso, o perfil volátil dos refrigerantes com e sem filme foram também analisados decorrido o tempo de armazenamento.

Soluções modelo de glucosamina e genipina foram preparadas com o intuito de simular o crosslinking existente nos filmes à base de quitosana utilizados, recorrendo, para tal, à Espectrometria de Massa (MS) e à Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS). A adição de glucose à solução mistura teve como objetivo identificar o mecanismo responsável pela destruição do filme, na presença de açúcares redutores como a glucose.

4.1. COMPORTAMENTO DOS FILMES À BASE DE QUITOSANA EM REFRIGERANTES

A introdução dos filmes de quitosana reticulados com genipina nos refrigerantes Sumol Ananás teve como objetivo preservar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos refrigerantes, evitando ou retardando reações oxidativas e alterações bioquímicas degradativas que podem ocorrer durante o período de armazenamento e que comprometem a qualidade do produto final, comparativamente aos seus controlos (refrigerantes sem filme à base de quitosana). A utilização da genipina, um agente de ligação cruzada, deu origem a filmes com as suas propriedades mecânicas melhoradas, tal como foi verificado por Nunes *et al.*⁷⁴. A baixa solubilidade em meio ácido é fundamental para a preservação das suas propriedades organoléticas, mantendo ou prolongando, deste modo, o seu tempo de conservação relativamente aos refrigerantes sem a adição do filme.

Os filmes de quitosana foram postos em contacto com o refrigerante analisado. Na **Figura 25** é possível comparar visualmente o estado dos filmes nos refrigerantes armazenados a 37 °C durante vinte dias de armazenamento. Após dois dias de armazenamento, verificou-se a degradação dos filmes incorporados nos sumos, tendo-se verificado que ao vigésimo dia o filme se encontrava completamente degradado. A temperatura de armazenamento foi um fator relevante já que se verificou uma taxa de destruição do filme maior nos filmes armazenados nos sumos a 37 °C (observando-se a degradação completa do filme após 20 dias), comparativamente aos sumos armazenados à temperatura ambiente, cujos filmes precisaram de um maior tempo para se degradarem.

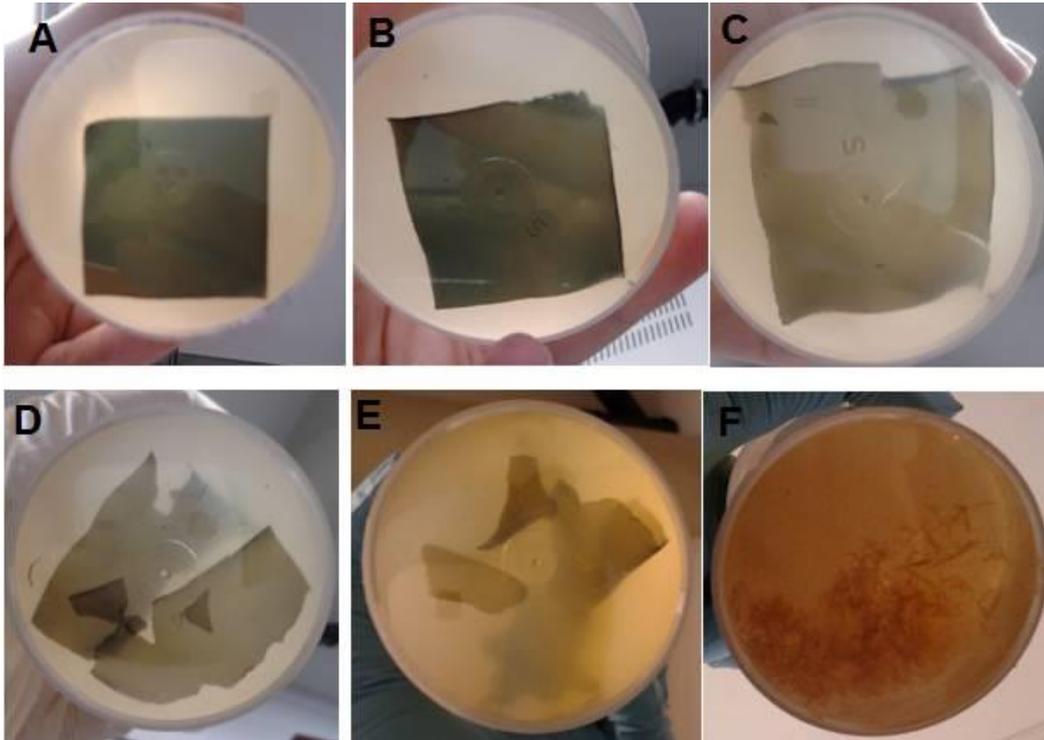


Figura 25 - Aspeto dos filmes de quitosana reticulados com genipina mergulhados no refrigerante Sumol Ananás após (A) 0, (B) 2, (C) 6, (D) 9, (E) 15 e (F) 20 dias de armazenamento a 37 °C.

4.2. ANÁLISES DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO REFRIGERANTES

Os refrigerantes Sumol Ananás com e sem filme à base de quitosana, armazenados no escuro à temperatura ambiente e a 37 °C, foram avaliados mensalmente durante 6 meses. Os parâmetros analisados foram a medição do conteúdo de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu, a determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS e a monitorização do escurecimento por medição da absorvância a 420 nm.

4.2.1. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO EM COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Neste trabalho, o conteúdo total fenólico durante o período de armazenamento foi determinado recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu. Na **Figura 26** estão representados os valores do conteúdo de compostos fenólicos para os refrigerantes com e sem filme à base de quitosana armazenados a diferentes temperaturas de armazenamento (temperatura ambiente e a 37 °C) ao longo de seis meses de armazenamento.

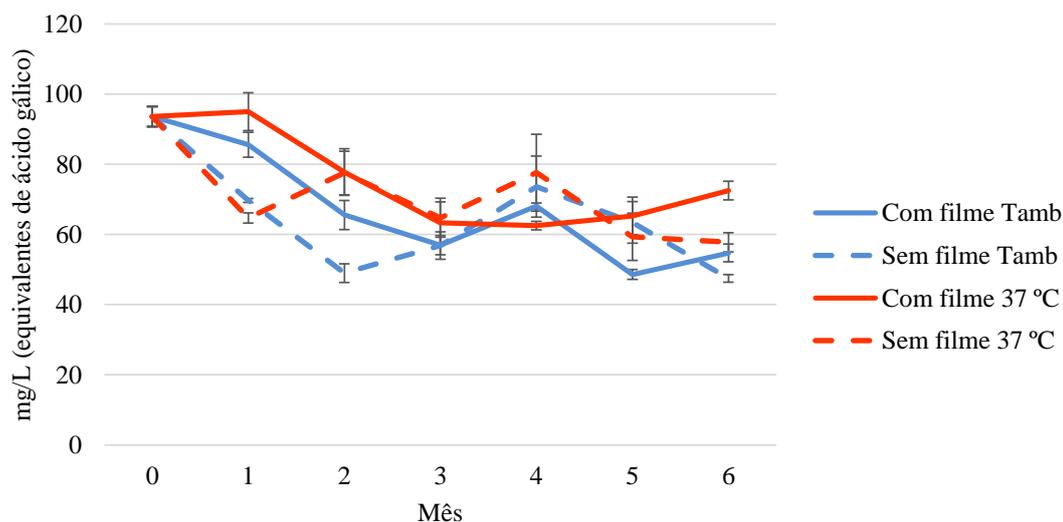


Figura 26 - Variação do conteúdo total fenólico (mg GAE/ mL), dos refrigerantes Sumol Ananás durante seis meses, a duas temperaturas (temperatura ambiente e 37 °C), com e sem filme à base de quitosana.

Tendo em conta os resultados obtidos, verifica-se que o tempo de armazenamento afeta significativamente o conteúdo em compostos fenólicos sob as condições experimentais aplicadas ($p < 0,05$), verificando-se uma diminuição ao longo do período de armazenamento. Nos sumos com filme existe uma diminuição gradual do conteúdo total fenólico nas duas temperaturas de armazenamento, enquanto que para os refrigerantes sem filme, não existe uma tendência linear ao longo do período de armazenamento, não se podendo, portanto, tirar conclusões. A diminuição verificada após os seis meses de armazenamento pode dever-se a uma eventual oxidação dos compostos fenólicos ou a reações de polimerização, que reduzem substancialmente o número de grupos hidroxilo determinados pelo método de Folin-Ciocalteu ⁸⁵. Estas perdas correspondem, respetivamente, a 41,5 e 22,5 %, para os refrigerantes com filme armazenados à temperatura ambiente e a 37 °C, e a 49,3 e 38,4 % para os refrigerantes desprovidos de filme armazenados à temperatura ambiente e a 37 °C, respetivamente, comparativamente ao refrigerante no início do armazenamento. Verifica-se, portanto, que as menores perdas correspondem aos refrigerantes armazenados a 37 °C. Se por um lado as temperaturas elevadas podem potenciar a destruição de alguns compostos fenólicos, por outro lado, podem aumentar a disponibilidade de outros compostos fenólicos ou potenciar a formação de outros com maior capacidade antioxidante, o que pode ser a razão pela qual a 37 °C se observa um ligeiro aumento do teor de compostos fenólicos. O método de Folin-Ciocalteu apresenta uma série de limitações, principalmente na sua inespecificidade, já que qualquer composto presente na amostra pode ser suscetível de sofrer oxidação e, assim, contribuir

para a coloração azul, monitorizada a 760 nm. Estes resultados estão de acordo com Klimczak *et al.* ⁸⁶ que verificaram um aumento significativo do conteúdo total fenólico no fim do armazenamento em sumos de laranja comerciais resultante devido ao aumento da concentração de ácido ferúlico e *p*-coumárico, como resultado da libertação dos ácidos fenólicos das suas formas éster, normalmente ligados a glicosídeos. Outros investigadores, no entanto, verificaram que temperaturas mais baixas (4 e 27 °C) despoletam uma menor perda de compostos fenólicos em sumos de ananás comerciais (11,2 % e 14,9 %, respetivamente) do que a temperaturas de armazenamento superiores, (o armazenamento a 37 °C correspondeu a uma perda de 15,3%), durante os 6 meses de armazenamento ⁸⁵.

Apesar de a literatura apontar para uma maior perda de compostos fenólicos na presença de filme à base de quitosana, devido à adsorção dos compostos fenólicos pelo biopolímero, que se traduziria numa maior perda nos refrigerantes com filme comparativamente aos refrigerantes desprovidos de filme, a dissolução do filme pode explicar a não observação dessa tendência, já que a fragmentação do filme pode ter originado estruturas incapazes de interagir com os compostos fenólicos existentes ^{68,74}.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO

A **Figura 27** representa a variação da atividade antioxidante de refrigerantes com e sem filme à base de quitosana, determinada pelo método de ABTS. O resultados encontram-se descritos em mg/L de equivalentes de trolox.

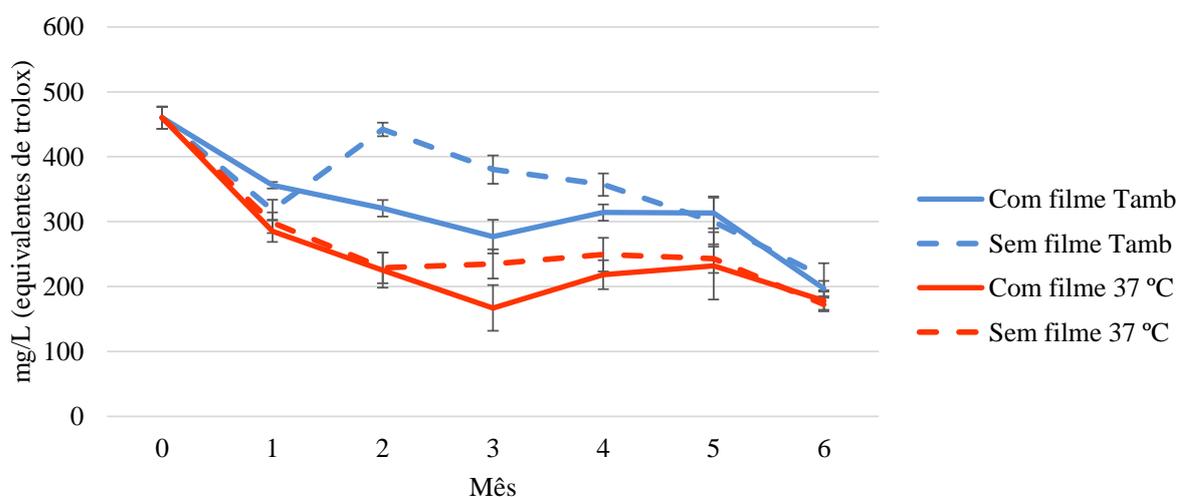


Figura 27 - Variação da atividade antioxidante durante seis meses, a duas temperaturas distintas (temperatura ambiente e 37 °C), em refrigerantes Sumol Ananás com e sem filme à base de quitosana.

Atendendo à **Figura 27** observa-se que os refrigerantes Sumol Ananás com e sem filme à base de quitosana diminuem a sua atividade antioxidante ao longo do período de armazenamento, nas duas temperaturas de armazenamento utilizadas ($p < 0,05$). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Laorko *et al.* ⁸⁵, que verificaram que em sumos de ananás não pasteurizados termicamente a capacidade antioxidante diminuiu com o passar do tempo, ao longo de seis meses de armazenamento. Esta diminuição da atividade antioxidante pode ser explicada pela oxidação dos compostos fenólicos ao longo do período de armazenamento, tal como foi verificado no ponto 4.2.1.. No entanto, a variação no perfil antioxidante pode dever-se a diversos fatores. Para além dos compostos fenólicos contribuírem normalmente para a atividade antioxidante, outros compostos, como o ácido ascórbico adicionado aquando do fabrico da bebida, podem estar a atuar sinergicamente com os compostos fenólicos, contribuindo para a atividade antioxidante dos refrigerantes ^{87,88}. Sendo os refrigerantes, em geral, constituídos por compostos fenólicos em pouca quantidade (8%) comparativamente com os sumos de fruta naturais, a atividade antioxidante deve-se sobretudo à adição de ácido ascórbico, tal como foi verificado por Gardner *et al.* ⁸⁹.

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado no presente estudo no refrigerante no início do tempo de armazenamento e após seis meses do seu armazenamento, na presença e na ausência de filme. Verificou-se que o ácido ascórbico adicionado ronda os $188,3 \pm 15,0$ mg/L. O conteúdo de ácido ascórbico em sumos de ananás sujeitos a processamento reportados por Hounhouigan *et al.* ⁹⁰ ficaram compreendidos entre 92 e 938 mg/ mL, o que sugere que o conteúdo de ácido ascórbico determinado no refrigerante Sumol Ananás no início do período de armazenamento enquadra-se no largo espectro de valores obtido pelos investigadores. Verificou-se, no entanto que, após os seis meses de armazenamento, quer à temperatura ambiente ou a uma temperatura superior, quer na presença ou na ausência de filme, o conteúdo de ácido ascórbico tornou-se nulo. Deste modo, estes resultados suportam a ideia de que o ácido ascórbico é o maior contribuinte para a atividade antioxidante nos refrigerantes de ananás analisados, sendo a atividade antioxidante restante devida à presença dos compostos fenólicos residuais. Assim, a degradação do ácido ascórbico pode também explicar a diminuição da atividade antioxidante dos sumos observada ao longo do período de armazenamento. Dados reportados pela literatura informam que as perdas de ácido ascórbico em sumos de fruta comerciais podem rondar os 60 a 81 %, refletindo-se, invariavelmente, na diminuição da sua atividade antioxidante ^{91,92}.

Comparando o efeito da presença e ausência de filme nos sumos, as diminuições estatisticamente verificadas na atividade antioxidante após os seis meses de armazenamento não validam o efeito da capacidade antioxidante dos filmes de quitosana adicionados. A dissolução do filme no refrigerante estudado pode ter alterado as propriedades antioxidantes da quitosana, fazendo da temperatura e do tempo os principais fatores capazes de influenciar a atividade antioxidante determinada pelo método de ABTS.

4.2.3. MONITORIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE ESCURECIMENTO

O efeito da temperatura de armazenamento e o efeito dos filmes de quitosana reticulados com genipina no acastanhamento e na formação de compostos de coloração castanha de refrigerantes Sumol Ananás foi estudado medindo a absorvância a um comprimento de onda de 420 nm (**Figura 28**).

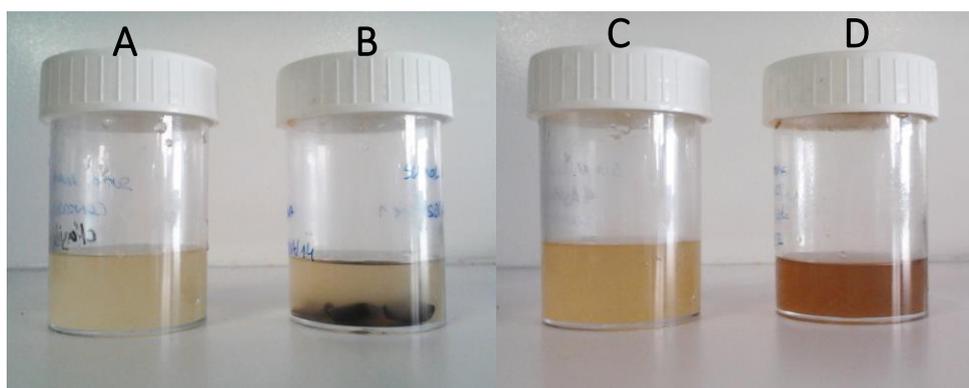
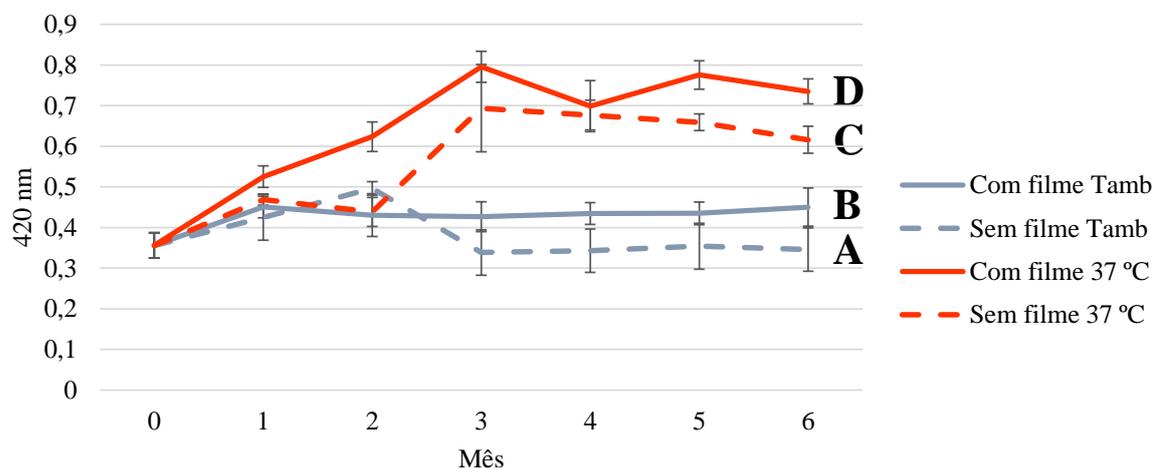


Figura 28 – I) Variação da intensidade de escurecimento durante seis meses, a duas temperaturas de armazenamento distintas (temperatura ambiente e 37 °C), em refrigerantes Sumol Ananás com e sem filme à base de quitosana. **II)** Fotografia com o aspeto macroscópico dos refrigerantes Sumol Ananás após os seis meses de armazenamento, sendo o Sumol Ananás (A) sem filme à Tamb; (B) com filme à Tamb; (C) sem filme a 37 °C e (D) com filme a 37 °C.

Ao longo do período de armazenamento, houve um aumento gradual e significativo ($p < 0,05$) do escurecimento não enzimático ao longo do período de armazenamento, quer na presença e ausência de filme nos refrigerantes armazenados a 37 °C. Por sua vez, os refrigerantes armazenados à temperatura ambiente não alteraram de forma significativa o seu escurecimento. De facto, diferenças significativas ($p > 0,05$) foram observadas após os seis meses de armazenamento nas amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 37 °C, quer na presença quer na ausência dos filmes de quitosana, podendo-se concluir que o escurecimento não enzimático é potenciado por temperaturas mais elevadas. Verifica-se também que a intensidade de escurecimento se mantém praticamente constante durante os primeiros dois meses de armazenamento, sendo que ao terceiro mês se começa a notar diferenças significativas entre os sumos armazenados a temperaturas diferentes.

Atendendo aos refrigerantes com e sem filme armazenados a uma temperatura superior, os resultados finais comparativamente com os sumos originais (referentes ao $t = 0$) indicam que produtos de coloração escura são produzidos, podendo estes ser derivados da reação de Maillard ou da degradação do ácido ascórbico. Os sumos são produtos alimentares que contêm a mistura de três açúcares: glucose, frutose e sacarose. A hidrólise da sacarose, potenciada a temperaturas mais altas, nos seus respetivos monossacarídeos redutores, a glucose e a frutose, pode também estar no cerne do maior escurecimento verificado a 37 °C⁹³. Este aumento da absorvância a 420 nm com o aumento da temperatura está de acordo com a literatura, já que se encontra relatado que a exposição de uma solução de glucose-glicina a elevadas temperaturas, simulando a reação de Maillard, causou o aumento da absorvância dessas mesmas soluções. É consensual que sistemas que envolvem monossacarídeos tendem a escurecer gradualmente com o aumento da temperatura e ao longo do tempo de aquecimento²⁷.

O ácido ascórbico é um composto instável adicionado como antioxidante nos sumos, e a sua degradação, promovida pelo aumento da temperatura e pela presença de oxigénio, integra também as reações de escurecimento não enzimático. Deste modo, o aumento da temperatura e a presença de oxigénio poderão potenciar a degradação aeróbia do ácido ascórbico, alterando, desta forma, a atividade antioxidante dos sumos, e introduzindo, adicionalmente, um maior escurecimento nestes sumos^{23,91}. O aumento do escurecimento dos sumos armazenados a 37 °C estão em conformidade com a redução do teor de ácido ascórbico determinado anteriormente.

O escurecimento não enzimático de sumos comerciais tem sido atribuído essencialmente à degradação do ácido ascórbico, sendo que a contribuição da reação de

Maillard se torna negligenciável⁹³. O aumento da concentração de ácido ascórbico nos sumos tem dois efeitos antagônicos: (1) a inibição do escurecimento enzimático pelo sequestro do oxigênio e a extensão do valor nutricional do produto e, (2) o agravamento do escurecimento não enzimático destes. Desta forma, assim que o ácido ascórbico é adicionado aos sumos, têm de ser tomadas medidas preventivas de forma a garantir que a quantidade adicionada é apenas proporcional ao nível de oxigênio presente⁹³.

Comparando o efeito do filme de quitosana reticulado com genipina adicionado ao refrigerante, constata-se que, nas duas temperaturas utilizadas, após os seis meses de armazenamento, os refrigerantes com filme possuem uma maior intensidade de escurecimento ($p < 0,05$) comparativamente com os refrigerantes sem filme. Era esperado, todavia, que os refrigerantes na presença dos filmes à base de quitosana não alterassem significativamente a sua cor relativamente aos sumo original, uma vez que a capacidade quelante de metais da quitosana evitaria reações de oxidação, impedindo, assim, a formação de precursores das reações de escurecimento. No entanto, a dissolução do filme à base de quitosana nos sumos, principalmente nos sumos armazenados a 37 °C, potenciou a intensidade de escurecimentos dos sumos, já que a presença de maiores quantidades de grupos amina dos resíduos de glucosamina livres são capazes de integrar reações de escurecimento não enzimático, como a reação de Maillard, potenciando a reação entre os açúcares redutores e os grupos amina da quitosana, levando a um escurecimento mais marcante²⁶.

É de realçar que o tratamento térmico usado no processamento dos refrigerantes Sumol Ananás inativa a polifenoloxidase, a enzima responsável pelo escurecimento enzimático, pelo que o escurecimento observado nos refrigerantes se deve exclusivamente à via não enzimática, mais precisamente à reação de Maillard e à degradação do ácido ascórbico, não podendo, no entanto, se dever à caramelização já que não foram utilizadas suficientemente temperaturas elevadas (superiores a 120 °C) para despoletar essa reação²⁷.

4.2.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FILMES À BASE DE QUITOSANA RETICULADO COM GENIPINA NO PERFIL AROMÁTICO DE REFRIGERANTES

Os métodos analíticos para a avaliação do perfil aromático exigem, para além da preparação da amostra, a separação e deteção dos compostos voláteis. Entre estes métodos destaca-se a cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente, acoplada à

espectrometria de massa (GCxGC-MS), tendo sido utilizada no presente estudo a microextração em fase gasosa (SPME) para preparar as amostras.

A natureza apolar da primeira coluna utilizada neste estudo possibilitou que a separação acontecesse por diferença de volatilidade dos analitos, enquanto que a aplicação de uma segunda coluna mais polar permitiu a separação dos analitos de acordo com a sua polaridade, aumentando do espaço cromatográfico e o potencial de separação dos analitos. A combinação das colunas utilizadas forneceu uma separação independente (ortogonal), sendo, os analitos separados de acordo com a sua volatilidade e polaridade. Consequentemente, compostos com volatilidade semelhante apresentaram tempos de retenção idênticos na primeira dimensão e compostos com polaridades semelhantes surgiram a tempos de retenção semelhantes na segunda dimensão ⁹⁴.

Relativamente à fibra de extração utilizada, a PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), esta possui uma natureza polar, permitindo uma extração mista. Uma fase estacionária mista combina propriedades de absorção do polímero líquido com as propriedades de adsorção das partículas gasosas. Este efeito sinérgico de absorção e adsorção promove uma maior sensibilidade já que possui uma maior capacidade de retenção dos analitos por parte da fase estacionária ⁹⁵.

O refrigerante em estudo é constituído por 8% de polpa de fruta e contém aromatizantes que lhe conferem um aroma típico a ananás. O sumo de ananás é uma das bebidas mais procuradas a nível mundial, no entanto, apresenta problemas no que diz respeito à estabilidade do seu aroma ^{96,97}. Tal como todos os refrigerantes, o aroma do sumo de ananás é constituído por uma ampla variedade de compostos voláteis, uma mistura envolvida na matriz do sumo e que é altamente suscetível a reações de degradação durante o tratamento térmico e o armazenamento.

Os sumos com filme à base de quitosana foram comparados com os sumos desprovidos de filme, procedendo-se, deste modo, à análise dos perfis de aroma, após os seis meses de armazenamento à temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$).

Na **Figura 29** estão representados os cromatogramas de GCxGC adquiridos dos compostos voláteis dos refrigerantes com filme à base de quitosana e o respetivo controlo (refrigerante na ausência de filme).

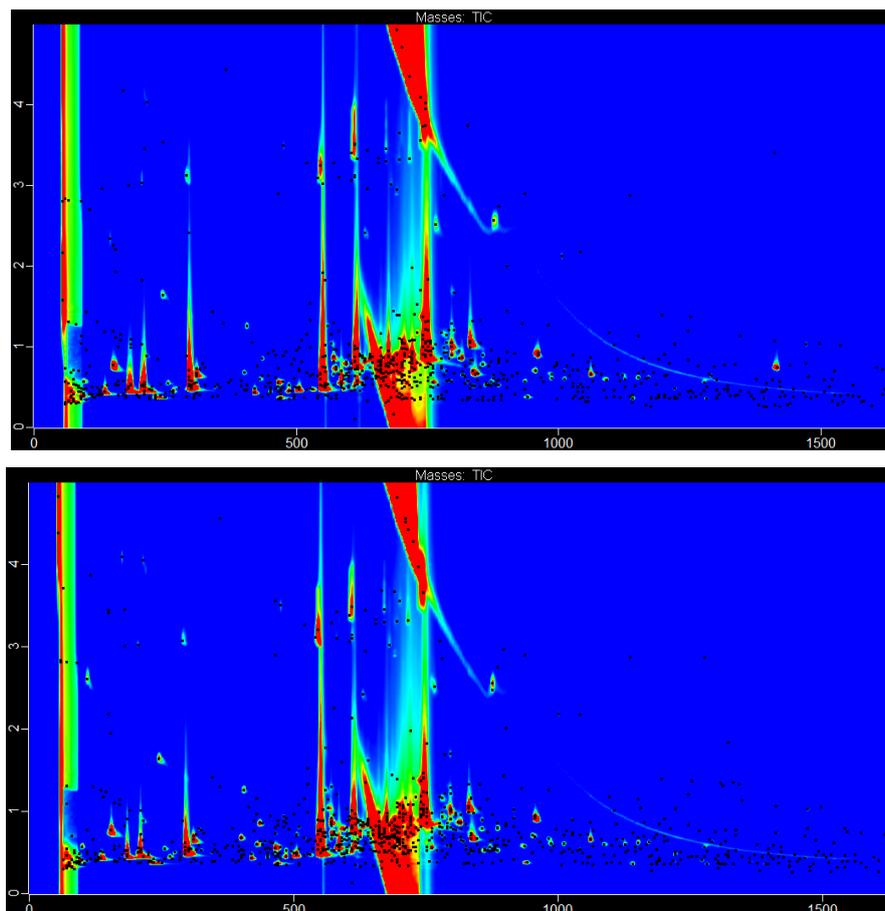


Figura 29 - Cromatogramas de GCxGC do refrigerante Sumol Ananás sem (A) e com (B) filme de quitosana reticulado com genipina.

Atendendo à **Figura 29**, conclui-se que existe uma dispersão dos vários metabolitos ao longo da primeira e segunda dimensão. Apesar de não terem sido estudadas as fontes de variabilidade na presença ou ausência dos filmes, foi efetuada uma análise não exaustiva dos compostos voláteis descritos na literatura característicos do aroma de ananás. De modo a confirmar a identificação dos compostos pretendidos na análise, comparou-se o índice de retenção determinado experimentalmente com o índice de retenção da literatura para cada composto. Para além desta comparação, confrontaram-se, ainda, os espetros de massa obtidos experimentalmente com os que constam na base de dados.

Na literatura estão identificados mais de 280 compostos, responsáveis pelo perfil volátil de sumos de ananás ⁹⁸. Os ésteres são os compostos predominantes que constituem o perfil volátil dos frutos de ananás, entre eles os ésteres metílicos e etílicos ⁹⁶⁻⁹⁸. Para além destes compostos, outros grupos de compostos voláteis foram extraídos da polpa de ananás como a γ e δ lactonas, vários mono e sesquiterpenos e álcoois ⁹⁶.

Foram selecionados 14 compostos voláteis, identificados na literatura como importantes para o aroma do sumo de ananás, sendo que na **Tabela 3** estão representados os nomes dos compostos identificados, as áreas cromatográficas, o índice de retenção (RI) obtido e da literatura e o número CAS.

Tabela 3 - Compostos voláteis característicos do aroma de ananás identificados por GCxGC nas amostras de refrigerantes Sumol Ananás armazenadas à temperatura ambiente.

Nome do composto	CAS	Área cromatográfica (Sumol sem filme)	Área cromatográfica (Sumol com filme)	RI obtido	RI literatura
Etil 2-metilpropanoato 99,100	7452-79-1	2,6E+05	nd	846	847 ¹⁰¹
Metil 2-metilbutanoato 99,100	19883-27-3	2,8E+06	nd	1074	1182 ¹⁰²
γ-nonalactona 99,100	104-61-0	6,4E+05	9,2E+05	1155	1360 ¹⁰³
γ-octalactona ^{99,100}	104-50-7	5,7E+05	5,3E+05	1365	1260 ¹⁰⁴
Metil-3-(metiltio)-propanoato ¹⁰⁰	13532-18-8	1,5E+06	1,3E+06	1027	1023 ¹⁰⁵
Hexanoato de etilo ¹⁰⁰	123-66-0	1,6E+06	2,2E+06	1004	1001 ¹⁰⁶
Butanoato de etilo ¹⁰⁰	105-54-4	3,5E+08	5,8E+05	803	800 ¹⁰³
Acetato de etilo ⁹⁷	141-78-6	2,8E+07	2,4E+07	601	608 ¹⁰⁷
Acetato de propilo ⁹⁷	109-60-4	3,7E+07	nd	750	712 ¹⁰⁴

Quatro dos compostos representativos do aroma de ananás analisados, nomeadamente a 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, 2-metilbutanoato de etilo, Δ -octalactona e o hexanoato de metilo, não foram identificados nas duas amostras analisadas..

Atendendo à **Tabela 3** verifica-se que a incorporação do filme à base de quitosana no refrigerante analisado leva a uma diminuição de alguns dos ésteres típicos do aroma de ananás, nomeadamente do 2-metilpropanoato de etilo, 2-metilbutanoato de metilo, acetato de propilo e do butanoato de etilo, havendo uma redução em três ordens de grandeza no caso do último composto volátil. Estes resultados estão concordantes com os resultados observados num estudo realizado na UA não publicado, onde foi verificado que a introdução de filmes de quitosana-genipina diminuiu o conteúdo de alguns ésteres ⁷⁴.

A contribuir para o odor desagradável dos sumos armazenados foram identificados alguns compostos voláteis que incluem os compostos representados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – *Off-flavours* identificados por GCxGC nas amostras de refrigerante Sumol Ananás armazenadas à temperatura ambiente.

Nome do composto	CAS	Área cromatográfica (Sumol sem filme)	Área cromatográfica (Sumol com filme)	RI obtido	RI literatura
Alfa-terpineol ¹⁰⁸	98-55-5	2,9E+08	7,6E+07	1192	1300 ¹⁰⁸
Diacetilo ⁹⁷	431-03-8	1,4E+05	nd	980	981 ¹⁰⁸
Beta-terpineol ¹⁰⁹	138-87-4	7,1E+06	5,7E+06	1145	1159 ¹¹⁰
Ácido acético ⁹⁷	64-19-7	1,5E+07	5,6E+07	623	603 ¹¹¹
Furfural ¹⁰⁹	98-01-1	4,0E+07	5,6E+07	835	832 ¹⁸
4-vinilguiacol ¹⁰⁹	7786-61-0	9,0E+05	1,2E+06	1298	1313 ¹⁰⁷
Carvona ¹⁰⁹	6485-40-1	3,2E+07	3,4E+07	1247	1255 ¹¹²
Acetoína ^{97 109}	513-86-0	1,3E+07	nd	807	711 ¹¹³
5-metilfurfural ¹⁰⁹	620-02-0	2,2E+06	2,1E+06	927	945 ¹¹³

Estes compostos são considerados *off flavours* pois encontram-se associados a descritores de aroma desagradável, contribuindo negativamente para o aroma dos sumos de fruta em geral. O refrigerante Sumol Ananás utilizado no presente estudo foi sujeito a um tratamento térmico, pelo que se observaram compostos característicos do processamento térmico, como o furfural e o 5-metilfurfural nos dois sumos analisados (com e sem filme)¹⁰⁹. É de realçar que após uma análise dirigida de alguns dos compostos associados a *off-flavours* comumente encontrados em sumos de fruta, verificou-se que compostos como o diacetilo e a acetoína se encontravam nos sumos sem filme, não estando, no entanto, nos refrigerantes em contacto com o filme. Deste modo, o filme poderá ter um efeito na prevenção do aparecimento destes mesmos compostos. O metional, que se encontra descrito como o *off-flavour* característico do sumo de ananás, não se encontrou presente em nenhuma das matrizes analisadas¹⁰⁰.

A análise efetuada não permite concluir acerca da importância do filme de quitosana após o tempo de armazenamento nos refrigerantes analisados, já que a não utilização de réplicas não permite uma análise quantitativa. Assim, esta análise requer um maior detalhe, com a identificação pormenorizada de todos os compostos voláteis nas amostras analisadas e nas respetivas réplicas, com a identificação dos componentes maioritários responsáveis pelo aroma dos refrigerantes na presença e ausência dos filmes à base de quitosana, de forma a poder inferir acerca do efeito do polímero na manutenção do perfil volátil destes produtos.

4.3. IDENTIFICAÇÃO DO FATOR RESPONSÁVEL PELA DESTRUIÇÃO DO FILME DE QUITOSANA-GENIPINA

Uma vez dissolvido o filme à base de quitosana no refrigerante Sumol Ananás, foram preparadas soluções modelo de forma a perceber o que estava a potenciar a degradação do filme no refrigerante analisado. As formulações dos refrigerantes são propriedades corporativas, pelo que a sua constituição exata é desconhecida. No entanto, tendo em conta o rótulo nutricional apresentado na **Figura 30**, os refrigerantes de ananás são constituídos por uma grande quantidade de açúcar (cerca de 10%), pelo que as soluções modelo inicialmente preparadas foram soluções modelo de açúcar.



Figura 30 - Valores nutricionais para 250 mL de sumo Sumol Ananás.

Os filmes foram colocados em soluções modelo de glucose e de frutose com pH ajustado para 3,5 (pH dos sumos Sumol Ananás) e não ajustado, tendo-se verificado a sua degradação, quer à temperatura ambiente, quer a 37 °C. Uma vez que se verificou a degradação dos filmes a pH abaixo do pKa da quitosana (pKa 6,3), testou-se também a degradabilidade dos filmes numa solução modelo de açúcar com pH básico, tendo-se obtido igualmente um filme fragmentado. A hipótese da degradação microbiana foi descartada, uma vez que se adicionou azida de sódio às soluções modelo de açúcar, que sendo um biocida elimina qualquer tipo de microrganismo.

Cruzando os resultados obtidos nos ensaios realizados com as soluções modelo de açúcar com a degradabilidade dos filmes nos refrigerantes Sumol Ananás, concluiu-se que o açúcar era o catalisador da destruição do filme à base de quitosana. É de realçar que nos refrigerantes houve uma aceleração da degradação do filme comparativamente às soluções modelo de açúcar, potenciada pela presença em maior quantidade de açúcares redutores.

Partindo do princípio que os açúcares seriam os responsáveis pela degradação do filme, efetuou-se um ensaio onde os filmes à base de quitosana foram colocados em contacto com o refrigerante Sumol Laranja Zero e armazenado a 37 °C (**Figura 31**). Este sumo, ao contrário do sumo Sumol Ananás, é um produto sem adição de açúcar. Tal como se pode ver pelo rótulo da embalagem do refrigerante, o sumo contém 4 g por 330 mL, o que corresponde a 1,2 % de açúcar, um valor bastante inferior comparativamente aos 10,4 % do Sumol Ananás, utilizado inicialmente no presente estudo.



Figura 31 - Filme à base de quitosana mergulhado no sumo Sumol Laranja Zero (à esquerda) e o seu rótulo nutricional (à direita).

Na **Figura 32** é possível comparar-se o estado dos filmes de quitosana imersos nos dois refrigerantes Sumol, após dois, quinze e vinte dias de armazenamento a 37 °C.

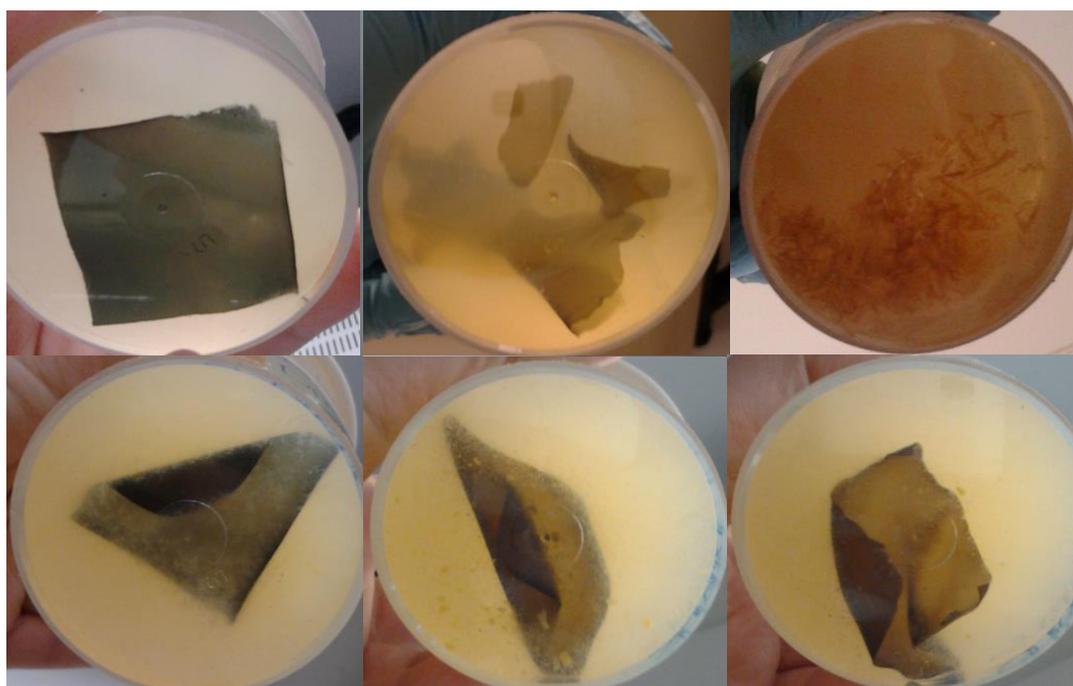


Figura 32– Filme à base de quitosana mergulhado no refrigerante Sumol Ananás (em cima) e no Sumol Laranja Zero (em baixo), após dois (à esquerda), quinze (ao centro) e vinte (à direita) dias de armazenamento a 37 °C.

Verifica-se que, decorridos vinte dias de armazenamento, o filme à base de quitosana mergulhado no refrigerante Sumol Laranja Zero mantém o seu aspeto físico, o que não aconteceu com os filmes submersos no refrigerante Sumol Ananás onde após dois

dias de armazenamento, o filme à base de quitosana começou a degradar-se. Estas observações são, portanto, mais uma evidência a favor da hipótese de que a fragmentação do filme é catalisada na presença de grandes quantidades de açúcar, sendo esta mais intensa quanto maior for a quantidade de açúcar disponível.

4.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS FORMADOS ENTRE A GENIPINA E A GLUCOSAMINA

A complexidade do mecanismo de reação entre a quitosana e a genipina, que resulta na formação da rede reticulante tridimensional nos filmes utilizados no presente estudo, tem-se refletido no seu estudo extensivo^{50,56-58}. No entanto, este mecanismo ainda não se encontra completamente elucidado. A MS surgiu como uma ferramenta capaz de nos elucidar de estruturas que podiam ocorrer na reticulação dos filmes à base de quitosana e, posteriormente, perceber de que forma os açúcares redutores, nomeadamente a glucose, interferiam na degradação dos compostos formados entre a quitosana e a genipina. A caracterização estrutural destas misturas, nomeadamente a identificação de estruturas que mimetizam a rede reticulada, foi conseguida por MS/MS de iões formados com a fonte de ionização por electrospray (ESI) no modo positivo, por injeção direta das soluções modelo de genipina (Gen), glucosamina (GlcN) e Gen+GlcN preparadas.

Nos espectros de massa inicialmente adquiridos foram vistos compostos interferentes provenientes da preparação da solução modelo mistura, que podiam comprometer a viabilidade dos resultados já que, nestas circunstâncias, podiam ser obtidos falsos positivos. Após a otimização das condições experimentais, onde se efetuou uma análise meticulosa às soluções controlo (soluções individuais de Gen e de GlcN após 0 e 1 semana de tempo de armazenamento, e solução mistura de Gen+GlcN ao tempo de armazenamento 0), de forma a avaliar contaminações provenientes do material, dos reagentes e do processo de manipulação, passou-se à análise dos espectros de ESI-MS das soluções mistura Gen+GlcN.

Na **Figura 33** encontra-se representado o espectro de ESI-MS da GlcN e da Gen, após uma semana de armazenamento a 37 °C (t=1sem). No espectro de ESI-MS da glucosamina, observa-se um ião maioritário, de razão m/z 180, correspondente à forma protonada da GlcN, $[GlcN+H]^+$. A GlcN possui um elevado poder de ionização comparativamente com a Gen devido à presença de grupos $-NH_2$ do C2 dos resíduos de GlcN, que são facilmente convertidos a $-NH_3^+$. A formação de iões $[M+H]^+$ é, portanto,

característica da ionização da GlcN. Por sua vez, a análise do espectro de ESI-MS da genipina revelou a existência de inúmeros compostos interferentes.

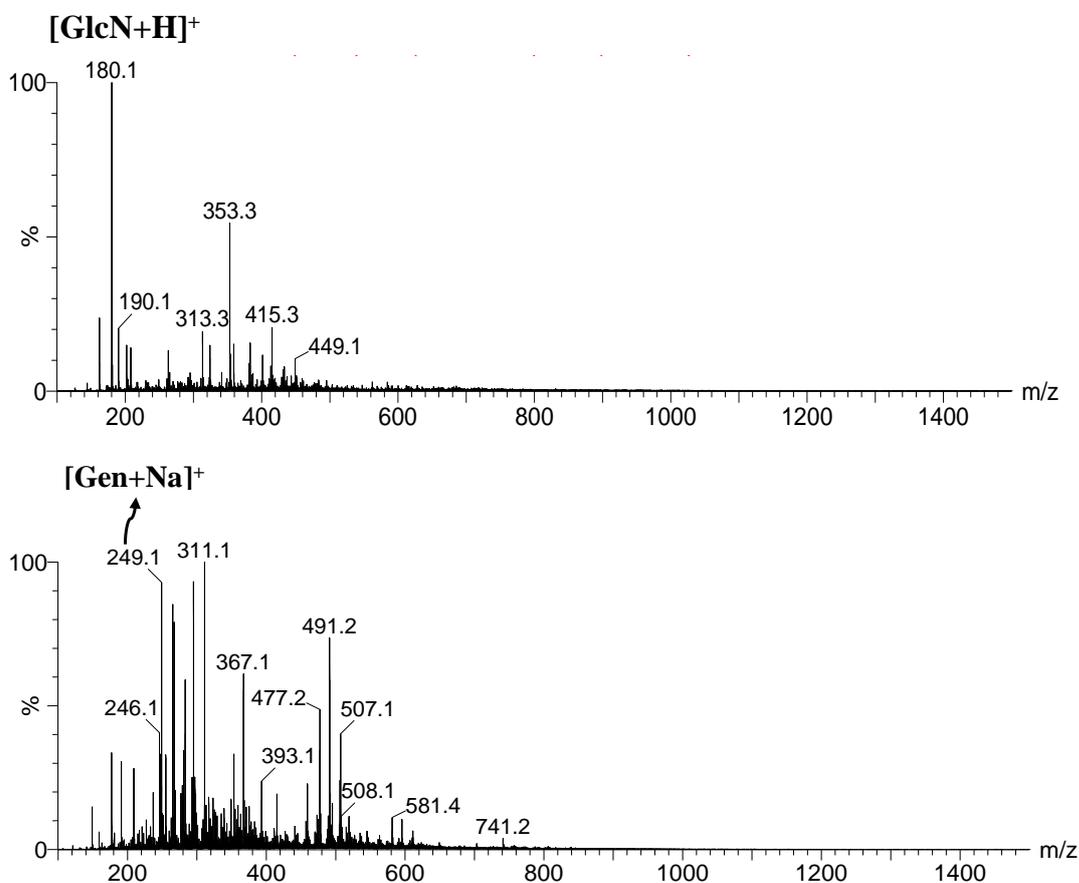


Figura 33 – Espectro de ESI-MS da solução de glucosamina e genipina após uma semana de reação a 37°C.

A Gen é um produto natural extraído de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides*, sendo um extrato natural, o isolamento e purificação prévia da Gen seria um passo fundamental, recorrendo a uma eletroforese ou a uma cromatografia líquida de alta eficiência, de forma a garantir a eliminação de resíduos indesejáveis e, assim, evitar a posterior formação de ligações cruzadas destes contaminantes com a GlcN. Repara-se também que existe uma maior tendência da Gen para se sodiar, aparecendo, assim, um fragmento com razão m/z 249, correspondente a $[Gen+Na]^+$.

Na solução mistura de Gen+GlcN correspondente à solução $t=0$, ou seja, após a adição dos reagentes, não foram identificadas estruturas simulantes da reação entre os grupos amina primários da GlcN e a Gen encontradas no filme, estando, deste modo, concordante com a tonalidade incolor da solução. Após o período de uma semana ($t=1$ sem), a uma temperatura controlada (37 °C), a solução ficou com uma coloração azul-esverdeada (**Figura 34**). De facto, alterações na aparência física da mistura,

nomeadamente, a intensificação da tonalidade azul, sugere que houve reação entre os grupos amina primários da GlcN e a Gen. O estabelecimento de ligações cruzadas entre a Gen e a GlcN encontra-se descrito como sendo espontâneo num meio reacional adequado 56,57.



Figura 34 - Solução mistura de Gen+GlcN, após uma semana de reação a 37 °C.

Na **Figura 35** estão representados os espectros de ESI-MS adquiridos para a solução mistura de Gen+GlcN após preparação da solução e após uma semana de armazenamento a 37 °C.

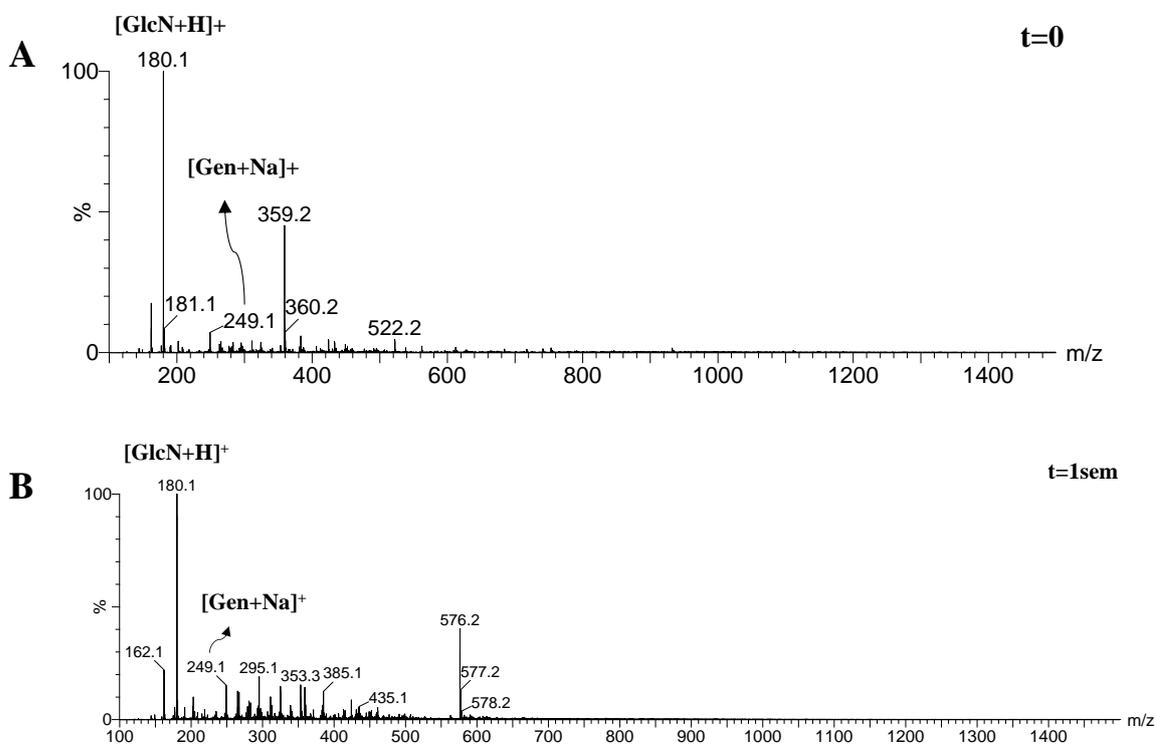


Figura 35 – Espectro de ESI-MS da solução mistura de genipina e glucosamina ao tempo (A) 0 e (B) 1 semana de armazenamento.

Após uma semana de armazenamento, para além do pico maioritário a uma razão m/z 180, a ionização em modo positivo destacou um fragmento de m/z igual a 576 na solução Gen+GlcN, não existente nas amostras controlo. Este ião foi identificado como sendo um produto da reação entre a Gen e GlcN, podendo ser um dos contribuintes para o desenvolvimento de uma tonalidade azul da solução, e a sua estrutura proposta está indicada na **Figura 36**.

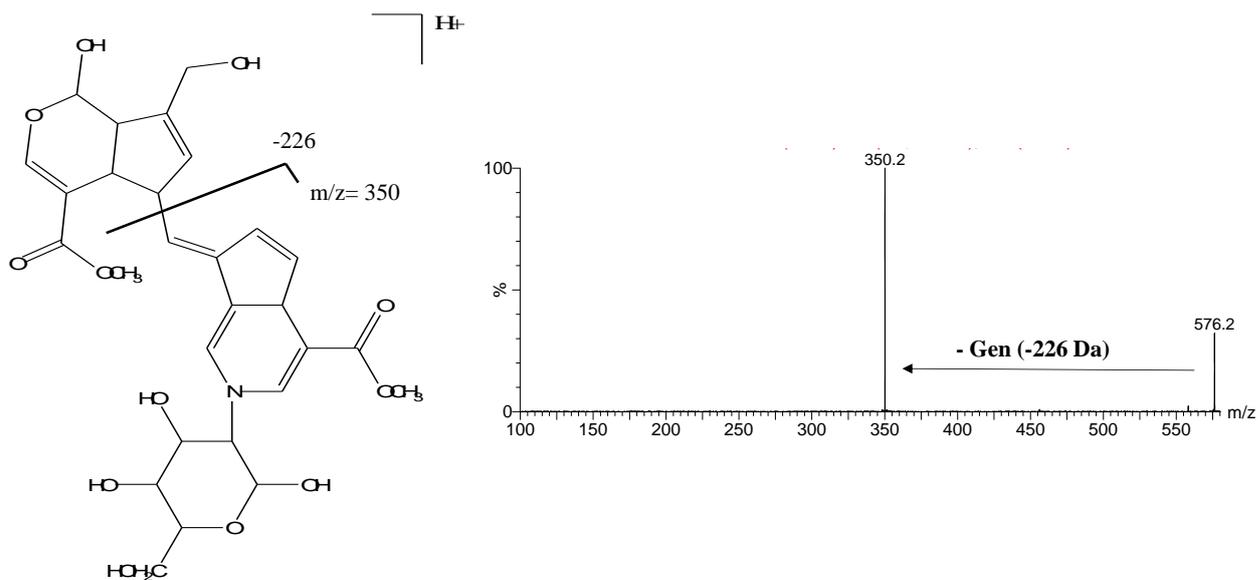


Figura 36 – Estrutura proposta para a razão m/z 576 e respetivo espectro ESI-MS/MS.

A estrutura proposta consiste na ligação de duas moléculas de Gen a uma molécula de GlcN, não sendo esta, deste modo, uma estrutura característica da reticulação da GlcN com a Gen. Analisando o espectro de ESI-MS/MS do ião representado na **Figura 36** observa-se que o ião com razão m/z 576 produziu um ião fragmento intenso com m/z 350. O fragmento ionizável de m/z 576 é consistente com a perda de uma molécula de Gen (com peso molecular de 226 Da), caracterizada como sendo perda neutra, o que permite confirmar a sua estrutura.

Neste trabalho foi necessário otimizar as condições utilizadas no estudo na MS. Numa primeira fase prepararam-se soluções equimolares de Gen (agente reticulante) e GlcN (unidade base da quitosana) de forma a simplificar e potenciar a reação entre os precursores da reação e, assim, obter estruturas bem definidas, correspondentes à reticulação existente nos filmes à base de quitosana. No entanto, esta solução não mimetizou o que se passa na preparação dos filmes de quitosana reticulada, pois os carbonos anoméricos da GlcN encontravam-se livres e, ao serem muito reativos, podiam

estar a reagir com a genipina de uma forma indesejada. A quitosana não foi utilizada como precursor da reação, uma vez que, dada a sua complexidade estrutural, seria inviável a sua análise por MS.

Dado que o objetivo inicialmente proposto era encontrar moléculas correspondentes à reticulação entre a GlcN e a Gen, que mimetizassem a rede reticulada existente no filme à base de quitosana, com razões de m/z compreendidas entre 460 e 800, efetuou-se um zoom dessa zona do espectro (**Figura 37**).

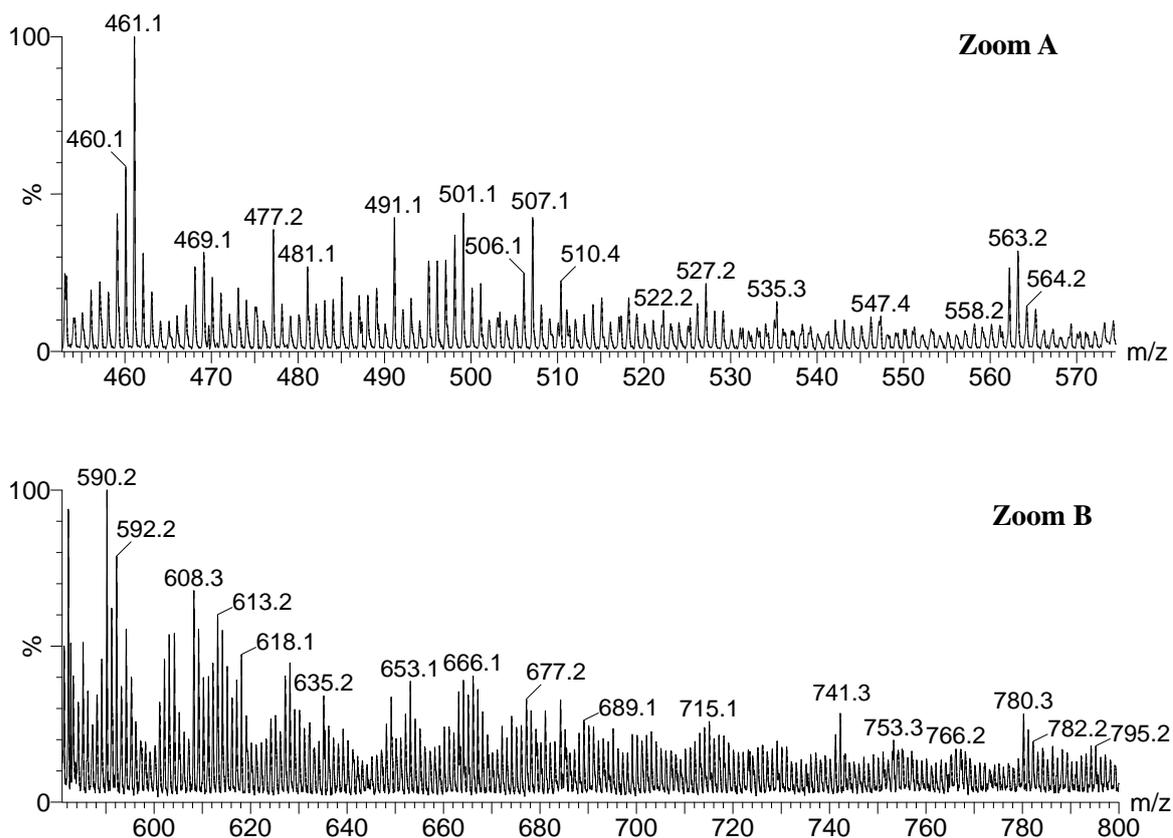


Figura 37 – Zoom do espectro de ESI-MS da solução mistura de genipina e glucosamina, sendo que o zoom corresponde ao espectro de ESI-MS entre (zoom **A**) 460 e 570 e (zoom **B**) 600 e 800.

Tal como é possível ver na **Figura 37**, existe uma grande complexidade na região do espectro entre razões m/z 460 e 800, sendo que a maioria dos picos encontrados podem estar associados a reações que envolvem a Gen e o carbono anomérico da GlcN. Este, ao contrário do que acontece nos filmes à base de quitosana, encontra-se livre e, sendo muito reativo, pode estar a potenciar reações que não ocorram nos filmes de quitosana e que não são as desejáveis no presente estudo. Tendo em conta as possíveis reações possíveis de Gen e GlcN descritas na literatura, efetuou-se uma *target analysis* (análise dirigida), onde

se foram procuradas razões de m/z específicas e características da reação entre a Gen e a GlcN^{50,55–58}.

São inúmeros os estudos que demonstram, por técnicas como o RMN, FT-IR e UV/Vis, o mecanismo reacional da Gen com os grupos amina primários da quitosana, formando covalentemente redes reticuladas^{57,58,114}. Após uma exaustiva análise das estruturas possíveis resultantes da reação entre a Gen e a GlcN, foram propostas estruturas com razões m/z de 501, 535, 677, 684, 702, 729 e 741. No entanto, foram apenas determinadas quatro estruturas com razões m/z 501, 535, 677 e 741, cujas fragmentações do espectro de ESI-MS/MS coincidem com partes das moléculas propostas. De facto, as restantes estruturas propostas foram recusadas pois a ESI-MS/MS permitiu concluir que as estruturas não correspondiam aos iões encontrados no espectros de ESI-MS, já que as fragmentações dos iões específicos não coincidiam com quebras existentes nas moléculas propostas.

Na **Figura 38** encontram-se representadas duas dessas estruturas, com razão m/z 501 e 535, sendo que estas envolvem as duas reações típicas da reticulação entre a Gen e os grupo amina primários da GlcN citadas na literatura: o ataque nucleofílico do GlcN ao anel da genipina e a substituição nucleofílica do grupo éster da Gen pelo grupo amina primário da GlcN^{50,53,57,58}.

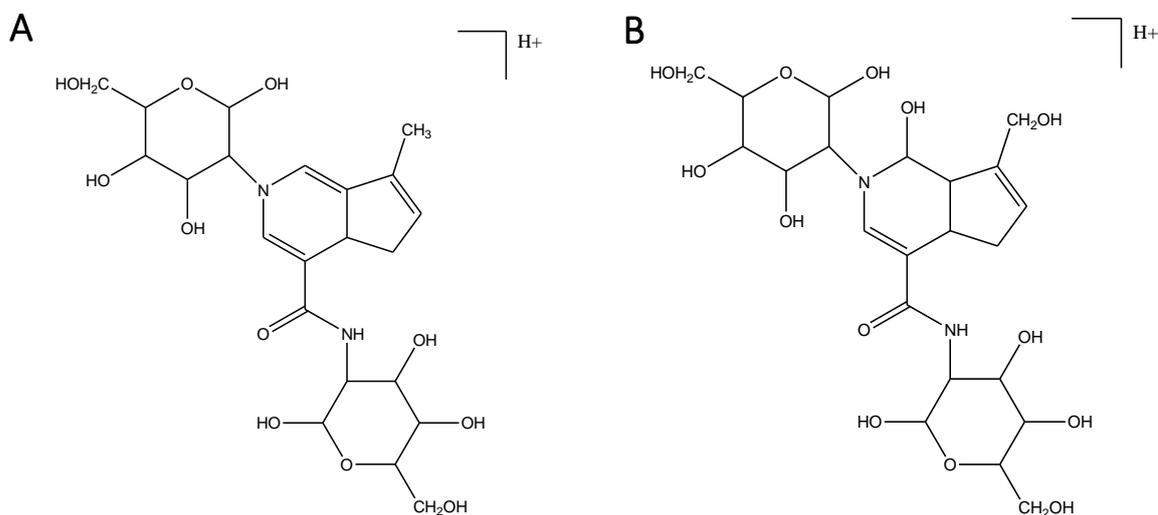


Figura 38 – Estruturas propostas da simulação da reticulação observada nos filmes à base de quitosana com razões m/z (A) 501 e (B) 535.

Apesar de nos dois casos a molécula de Gen se encontrar ligada a duas moléculas de GlcN por mecanismos descritos na literatura, a diferença entre as duas estruturas reside

na estrutura da molécula de Gen, que pode variar em solução. A estrutura B ao sofrer migração de elétrons depois do ataque nucleofílico da glucosamina ao carbono 3 olefínico da genipina origina a estrutura proposta A, tal como foi observado por Mi *et al.* ⁵⁶.

Na **Figura 39** encontra-se representado o espectro ESI-MS/MS do fragmento com razões m/z 501, e respetiva estrutura proposta com as quebras coincidentes com os fragmentos obtidos no espectro.

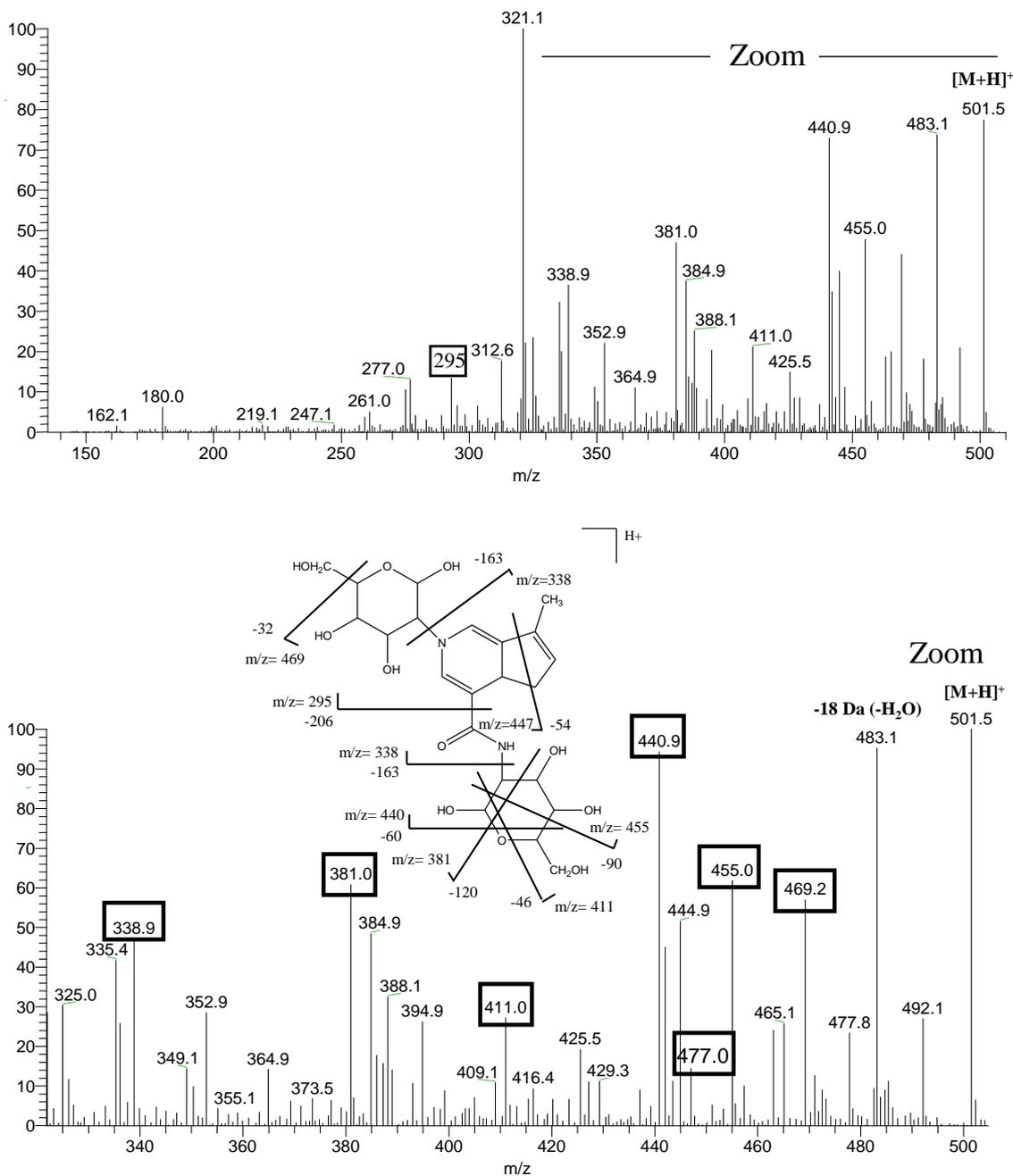


Figura 39 – Espectro de ESI-MS/MS e respetivo zoom do ião fragmento com razão m/z 501.

Após a análise do espectro ESI-MS/MS do íon com razão m/z 501, concluiu-se que a formação de alguns fragmentos indica a perda de partes da molécula proposta. O aparecimento de fragmentos com razões m/z como 381, 411, 440, 455 e 469 concidentes com perdas de 120, 90, 60, 46 e 32 Da, sugere a presença de uma molécula de GlcN. O aparecimento de um fragmento a 455, concordante com a perda de 46 Da, prova que a GlcN se encontra efetivamente ligada pelo grupo amina primário à molécula de Gen, já que o estabelecimento de uma ligação envolvendo o carbono anomérico da GlcN não permitiria a perda dessa razão m/z . Os fragmentos 338 e 295 permitem, ainda, concluir que existe efetivamente a ligação da molécula de GlcN e uma molécula de Gen pela substituição nucleofílica do grupo éster da Gen pelo grupo amina primário da GlcN, com posterior formação da ligação amida. Observa-se, também, a perda de água (-18 Da) caracterizada pela presença de um íon fragmento a 483 Da, estando consistente com a presença de inúmeros grupos hidroxilo na estrutura proposta.

Na **Figura 40** encontra-se representado o espectro de ESI-MS/MS do fragmento com razão m/z 535.

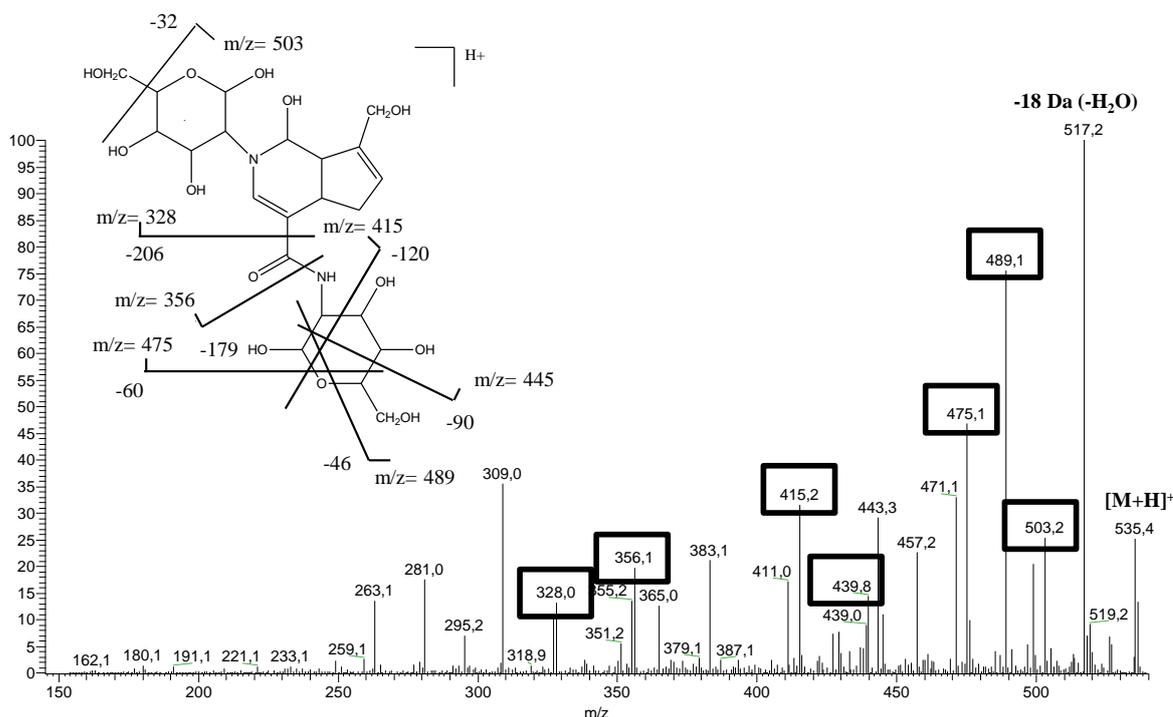


Figura 40- Espectros de ESI-MS/MS do íon com razão m/z 535.

Alguns fragmentos permitem propor a estrutura proposta, nomeadamente os fragmentos com m/z 328, 356, 439 e 503, e os íões mais abundantes com razões m/z 415, 475 e 489, consistentes com remoções de 120, 60 e 46 Da, respetivamente, e

correspondentes a quebras do anel da GlcN. À semelhança do sucedido na estrutura proposta com razão m/z 501, uma das duas moléculas de GlcN da estrutura proposta encontra-se ligada por uma ligação amida à molécula de genipina, que é traduzida pelo aparecimento de fragmentos como os de razões m/z 328 e 356. O aparecimento do íon fragmento com razão m/z 356, resultante da quebra da ligação amida encontra-se concordante com a literatura, já que a clivagem homolítica da ligação (-CO-NH-) ocorre preferencialmente em ligações amida peptídicas comparando com as ligações subjacentes^{115,116}. Tal como se verificou na estrutura proposta m/z 501, a remoção de 46 Da do interior do anel da GlcN permite concluir que a reação entre a genipina e a glucosamina se dá pelo ataque do grupo amina primária.

O desenvolvimento de cor na solução de Gen e GlcN preparada deve-se à deslocalização de eletrões nas moléculas que compõe tal solução. Estas moléculas apresentam geralmente ligações duplas insaturadas e alternadas com ligações simples, o que permite a mobilidade e deslocalização dos eletrões ao longo da molécula e que é a responsável pela emissão de cor. No presente caso, a molécula de Gen apresenta um anel que pode sofrer rearranjo que permite uma deslocalização de eletrões, representando, deste modo, duas estruturas de ressonância. Comparando as duas estruturas sugeridas na **Figura 38**, conclui-se que a única molécula capaz de contribuir para o desenvolvimento de cor azul da solução é a estrutura com razão m/z 501, já que a molécula de Gen apresenta ligações duplas alternadas com ligações simples, à semelhança da estrutura sugerida para a razão m/z 576 (**Figura 36**). Desta forma, a deslocalização de carga é uma condição necessária para o aparecimento de cor e nem todas as moléculas resultantes do crosslinking entre a Gen e a GlcN contribuem para essa deslocalização.

A reticulação entre a Gen e a GlcN pode ocorrer por meio de apenas uma Gen, tal como foi observado anteriormente, podendo, porém, ocorrer a ligação de duas moléculas de Gen, ligando-se cada uma, posteriormente, a uma molécula de GlcN. Da análise dirigida efetuada, foram propostas duas outras estruturas, tendo-se verificado dois fragmentos com razões m/z 677 e 741 no espetro de ESI-MS da solução mistura Gen+GlcN representado na **Figura 37**.

Na estrutura proposta com razão m/z 677, as moléculas de Gen encontram-se ligadas uma à outra de acordo com um dos mecanismos propostos por Mi *et al.*⁵⁰. À semelhança das estruturas propostas na **Figura 38**, as moléculas de GlcN ligam-se às moléculas de genipina em dois locais distintos, resultantes do ataque nucleofílico do grupo amina primário da GlcN ao carbono 3 olefínico da Gen e à substituição nucleofílica do

grupo éster, com libertação de metanol ^{53,56-58}. Esta estrutura proposta foi também analisada por MSⁿ (**Figura 41**). Foram identificados iões com razões *m/z* coincidentes com as quebras do anel da GlcN ligada à Gen e já encontradas nos MS/MS das restantes estruturas propostas, nomeadamente a remoção de 60 (grupo acetilo) e 120 Da, coerentes com resultados já anteriormente publicados ^{117,118}. No entanto, não se verificou remoções de 32, 46 e 90 Da, também consistentes com quebras do anel da GlcN e verificadas nas moléculas propostas anteriormente. Não se conseguiu identificar as fragmentações maioritárias existentes no espectro de ESI-MS/MS do ião 677, nomeadamente os picos com razão *m/z* 427, 501 e 529. O aparecimento de um pico fragmento com razão *m/z* 501 sugere que ocorreu uma reação com a estrutura proposta *m/z* 501 ilustrada na **Figura 39**, no entanto, não se conseguiu chegar a uma estrutura representativa. O desconhecimento da maioria dos fragmentos maioritários não permite confirmar a estrutura inicialmente proposta na **Figura 41**.

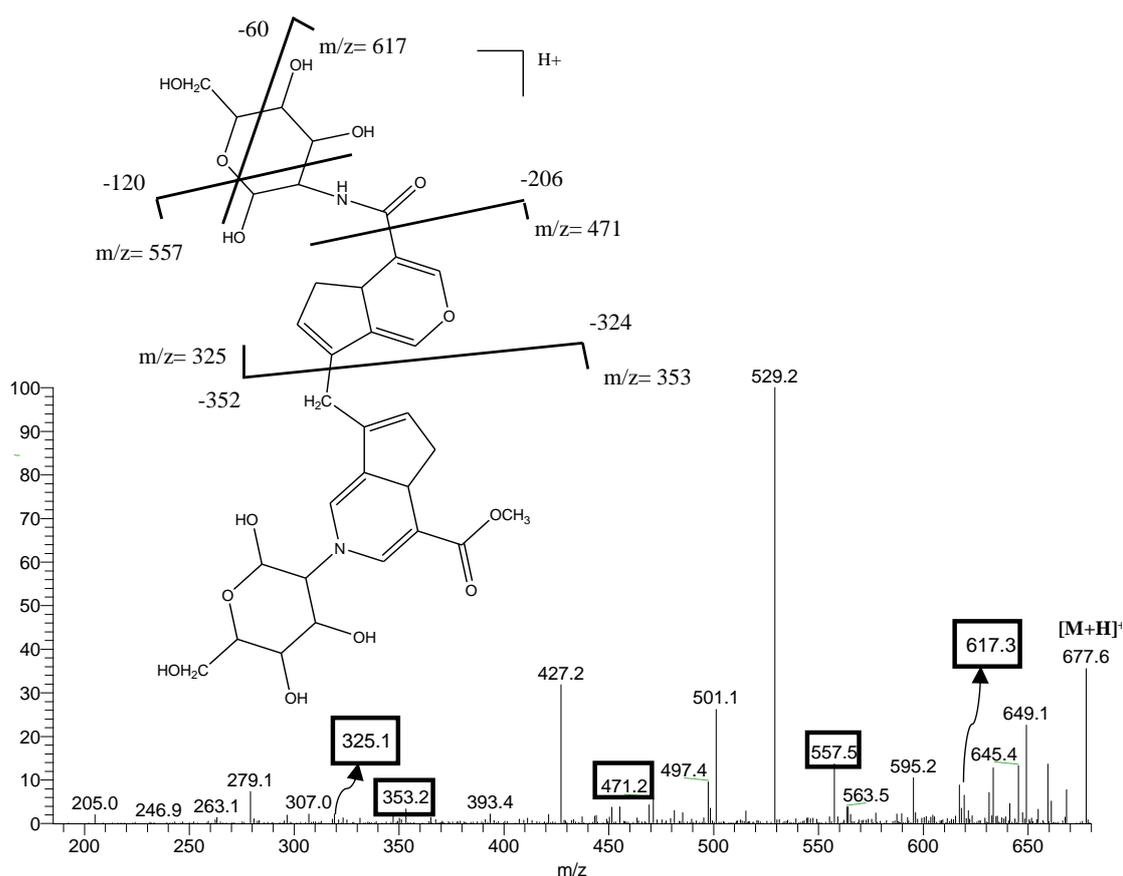


Figura 41 – Espectro de ESI-MS/MS do fragmento com razão *m/z* 677.

Foram propostas duas estruturas para a razão *m/z* 741, sendo que estas se distinguem no que diz respeito à ligação entre as duas moléculas de Gen (**Figura 42**). Na

estrutura A, a ligação entre as moléculas de genipina coincide com a estrutura proposta por Nunes *et al.*¹¹⁴ identificada por espectroscopia de FT-IR, sendo que a forma de ligação representada pela estrutura B se encontra concordante com o mecanismo proposto por Mi *et al.*⁵⁰.

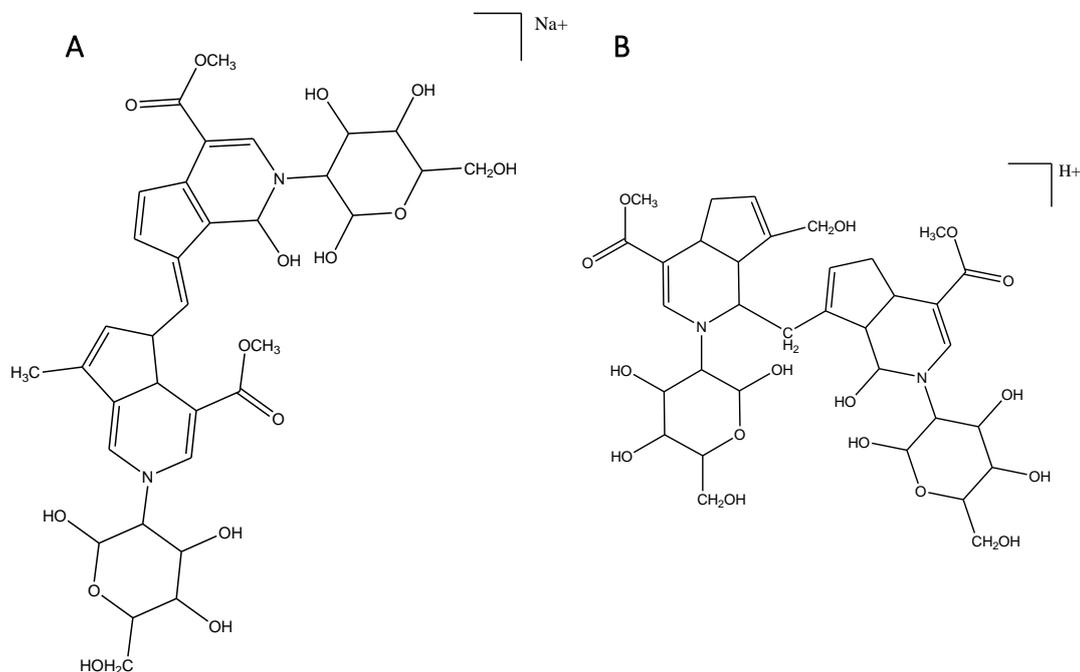


Figura 42 - Estruturas propostas para o fragmento com razão m/z 741.

Na **Figura 43** encontra-se representado o espectro de ESI-MS/MS do fragmento 741. O perfil de fragmentação, nomeadamente, os fragmentos com razões m/z 621, 681, 695 e 709, correspondentes às perdas de 120, 60, 46 e 32 Da, respetivamente, indicam a existência de uma molécula de GlcN na estrutura proposta, já que estas remoções estão consistentes com quebras verificadas no interior do anel da GlcN. No entanto, o desconhecimento da maioria dos fragmentos, sobretudo de alguns dos picos maioritários, não permite confirmar as estruturas propostas na **Figura 42**.

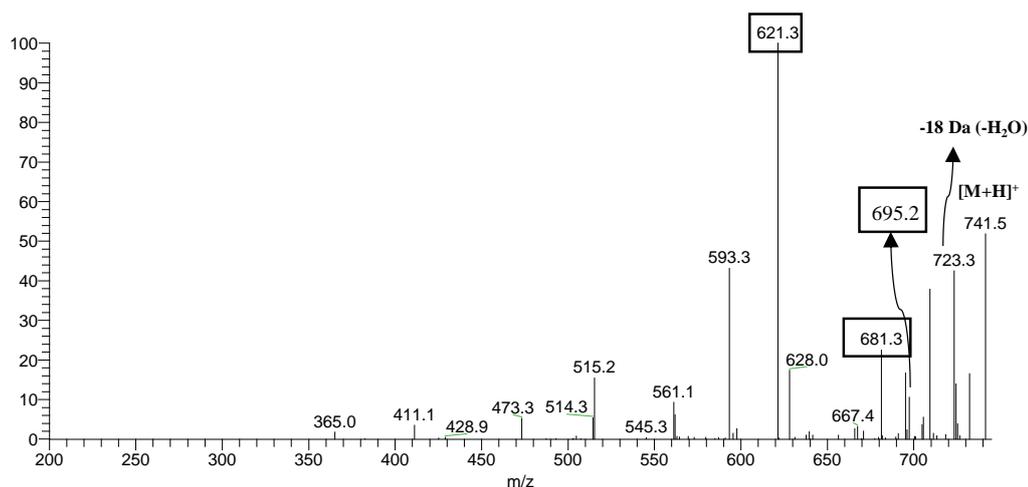


Figura 43 – Espectro de ESI-MS/MS do fragmento com razão m/z 741.

Após a análise das estruturas propostas por ESI-MS, conclui-se que provavelmente a elevada estabilidade do anel heterocíclico da Gen não permite a sua quebra, verificando-se mais facilmente fragmentações junto à ligação amida e quebras ocorridas no interior do anel de GlcN.

De forma a obter mais informações acerca das estruturas simuladoras da reticulação entre a Gen e a quitosana existente nos filmes utilizados, foi aumentada a complexidade das soluções modelo, tendo-se adquirido um espectro ESI-MS de soluções com as proporções reais de GlcN encontrados nos filmes à base de quitosana reticulados com Gen, onde a quantidade molar de GlcN era cerca de 40 vezes maior que o agente crosslinker (**Figura 44**).

Apesar destas condições não mimetizarem as condições existentes no filme, conseguiu-se desenvolver uma mistura de tonalidade azul escura, o que permitiu concluir que houve a formação de uma grande variedade de produtos de ligação entre a Gen e a GlcN, comparativamente à solução equimolar analisada anteriormente. No entanto, nestas condições, para além da GlcN estar em maior quantidade, esta também apresentava um maior poder de ionização, mascarando, deste modo, as moléculas resultantes do crosslinking entre as moléculas precursoras, e as responsáveis pelo desenvolvimento da cor azul. Deste modo, os espectros de massa adquiridos para a solução controlo de GlcN (controlo) e de Gen+GlcN foram bastante idênticos, observando-se um pico maioritário a uma razão m/z 180 correspondente a $[\text{GlcN}+\text{H}]^+$, e os restantes picos com uma intensidade relativa muito baixa.

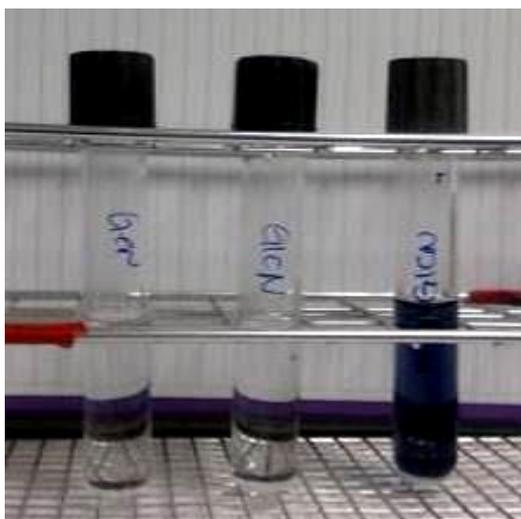


Figura 44 - Soluções modelo de 0,5 mg/mL genipina (à esquerda), de 15 mg/mL de glucosamina (ao centro) e a mistura de 0,5 mg/mL de genipina e 15 mg/mL de glucosamina (à direita) após uma semana de armazenamento a 37 °C, na estufa.

4.5. IDENTIFICAÇÃO DO MECANISMO RESPONSÁVEL PELA DESTRUIÇÃO DO FILME DE QUITOSANA-GENIPINA

Uma vez conhecidas algumas das moléculas propostas simuladoras da reticulação entre a Gen e a GlcN, e partindo do pressuposto que eram os açúcares redutores existentes nas soluções modelo de açúcar e nos refrigerantes os responsáveis pela destruição do filme à base de quitosana, a espectrometria de massa foi usada com a finalidade de obter informações sobre a reação de destruição dos compostos formados entre a GlcN e a Gen, na presença de açúcares redutores como a glucose (Glc).

Numa primeira fase, adicionou-se uma quantidade equimolar de Glc à solução anteriormente preparada de Gen e GlcN, que foi deixada a reagir a 37°C durante 1 semana tendo sido adquirido o espectro de ESI-MS, representado na **Figura 45**. Efetuou-se, uma vez mais, uma análise dirigida, onde foram procurados os fragmentos anteriormente propostos com razão m/z 501, 535, 677 e 741 resultantes da reação entre a Gen e a GlcN.

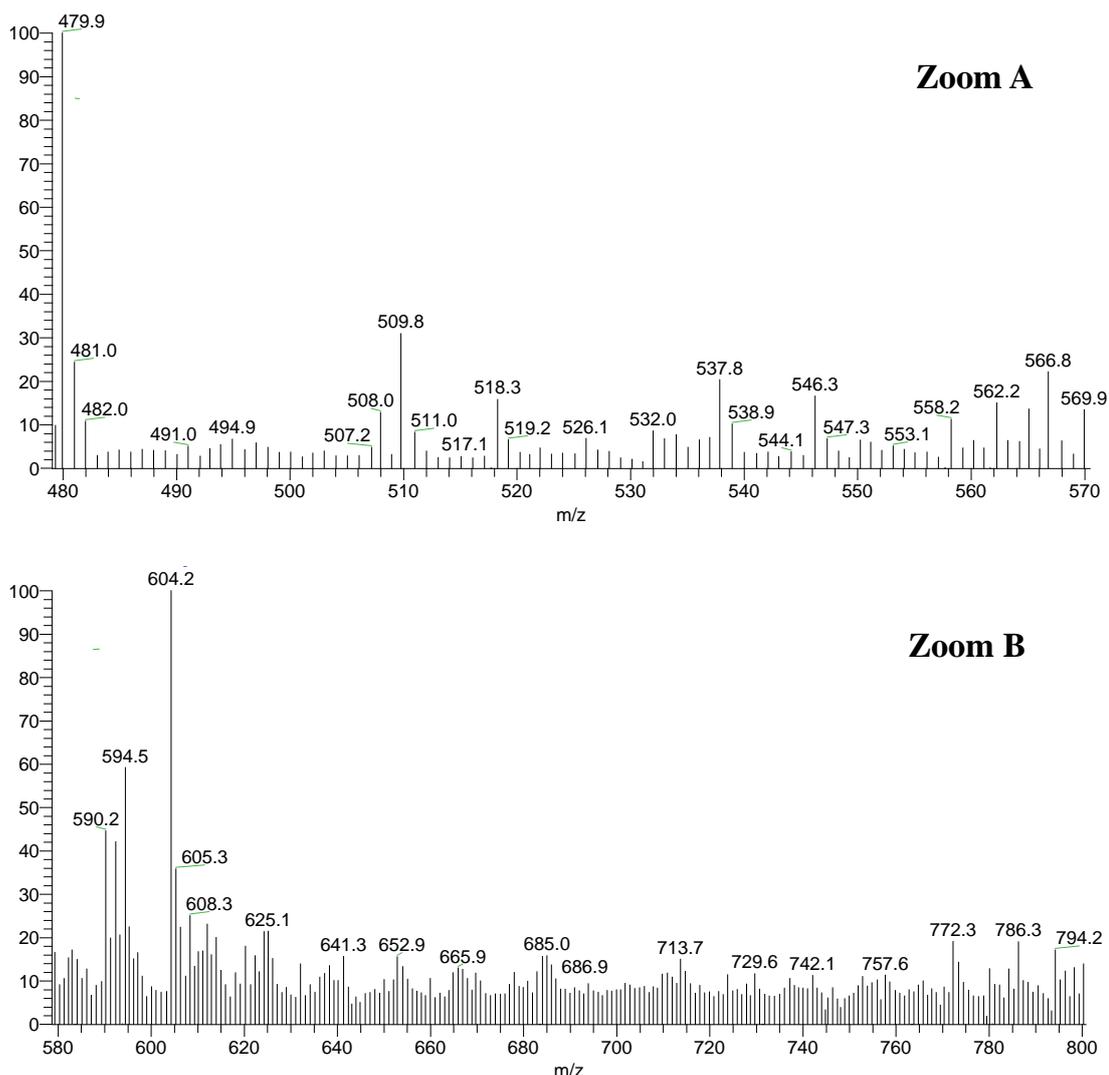


Figura 45 – Espectro de ESI-MS da solução mistura de genipina, glucosamina e glucose (Gen+GlcN+Glc) ampliado entre (**zoom A**) m/z 480 e 570 e (**zoom B**) 580 e 800.

A não visualização dos iões fragmento propostos resultantes da reação entre a Gen e a GlcN no espectro de ESI-MS da **Figura 45** apoia a hipótese de que com a adição de Glc estas estruturas são destruídas, sendo os açúcares efetivamente os responsáveis pela degradação do filme à base de quitosana.

Partindo das estruturas propostas com razão m/z 501 e 535 representadas na **Figura 38**, e atendendo à estrutura da Glc, tentou-se perceber qual poderia ser o mecanismo representativo da degradação das estruturas resultantes da reação entre a Gen e a GlcN, e que seria o responsável pela degradação do filme à base de quitosana.

Sabe-se que os aldeídos, como é o caso da glucose, podem reagir com grupos amina, devido à carga parcial positiva localizada no átomo de carbono resultante da ligação a um átomo de oxigénio eletronegativo. Desta reação pode-se formar compostos com dupla

ligação carbono-nitrogénio, designados de iminas ou bases de Schiff ($R_2C=NR$) ou ($RCH=NR$)¹¹⁹.

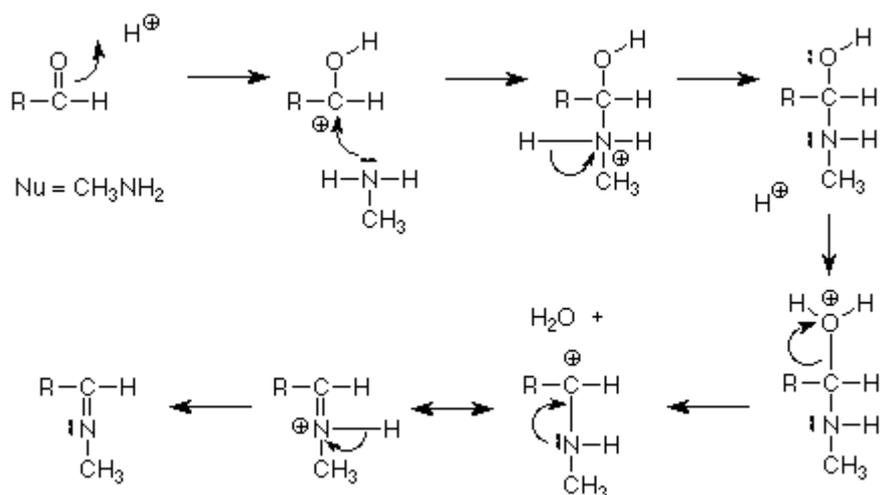


Figura 46 – Mecanismo de formação de imina. Adaptado de Solomons *et al.*¹¹⁹.

O mecanismo proposto para a destruição das estruturas resultantes da reação entre a Gen e a GlcN assentou no mecanismo de formação das iminas, representado na **Figura 46**. Tal como foi discutido anteriormente, a molécula de quitosana é constituída por unidades de D-glucosamina e *N*-acetil-D-glucosamina, unidas por ligações β (1,4), sendo esta ligada à molécula reticulante (Gen) pelo grupo amina primário. Deste modo, partindo do princípio que as moléculas propostas com razão m/z 501 e 535 representam uma das formas de reticulação entre a Gen e a quitosana nos filmes utilizados no presente estudo, os grupos hidroxilo dos carbonos 1 e 4 da GlcN foram substituídos por grupos R. A forma de reticulação elucidada pela molécula de razão m/z 501 foi utilizada para demonstrar a reação de degradação proposta, na presença de açúcar redutores como a Glc (**Figura 47**).

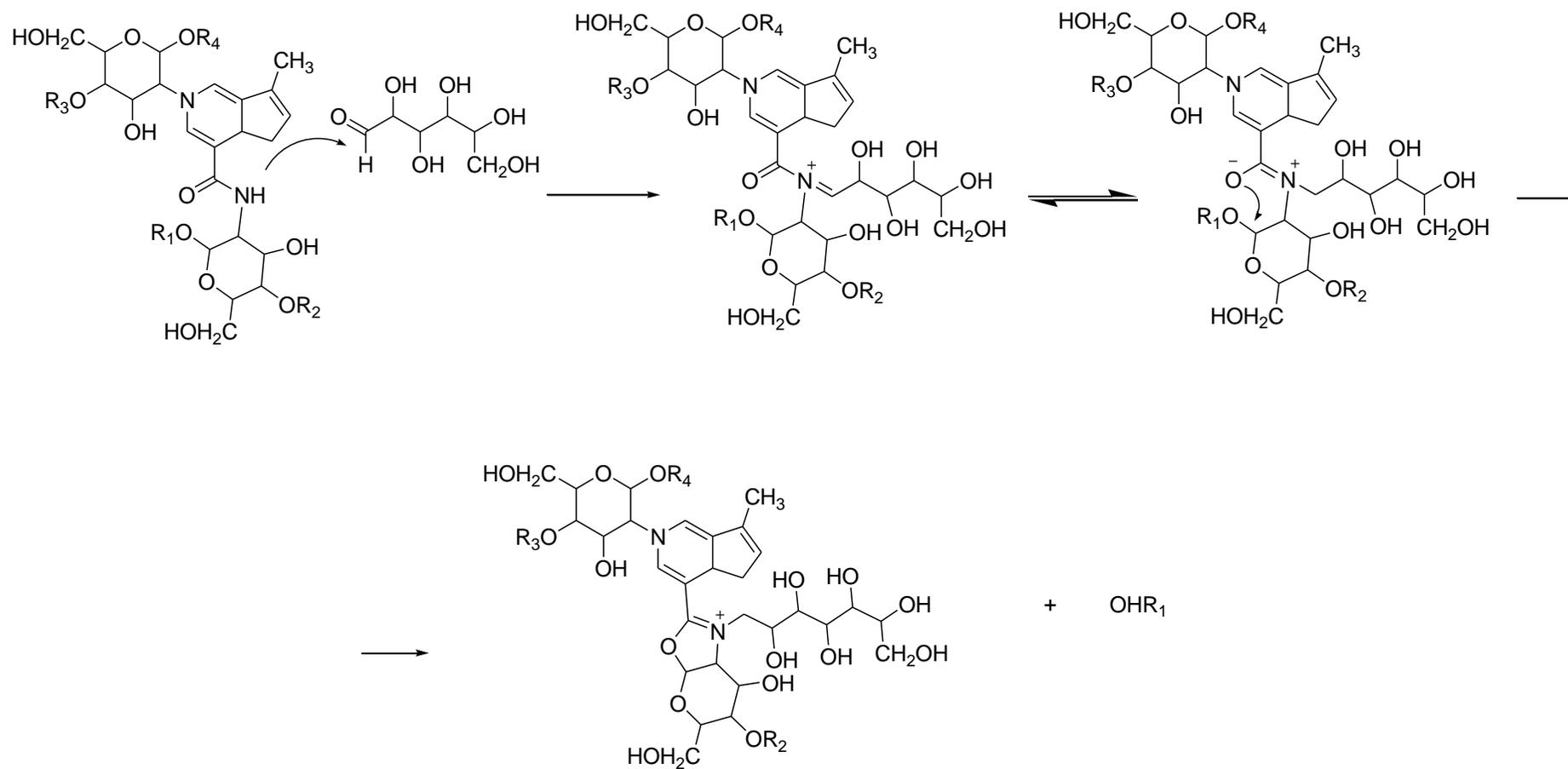


Figura 47 – Mecanismo proposto para a reação de degradação do filme de quitosana-genipina.

O mecanismo de degradação proposto baseia-se essencialmente no ataque do grupo amida da estrutura formada entre a Gen e a GlcN, ao grupo aldeído da Glc, com consequente formação de uma imina (ligação dupla carbono-nitrogénio). Posteriormente ocorre deslocalização de carga, formando uma estrutura de ressonância, que origina uma carga parcial negativa no átomo de oxigénio. Há o ataque do átomo de oxigénio ao carbono anomérico da molécula de GlcN, clivando a cadeia de quitosana ligada, responsável pela quebra do filme à base de quitosana. Deste modo, suspeita-se que a fragmentação do filme à base de quitosana decorra da clivagem da cadeia de quitosana, e não pela destruição da ligação entre a Gen e a GlcN.

Após ter sido sugerido o mecanismo da **Figura 47**, tentou-se testar a reação entre a ligação amida da estrutura resultante da reação entre a Gen e a GlcN e o grupo aldeído da Glc. Para tal, e de forma a simplificar o mecanismo reacional, fez-se uso da butiramida (com massa molar igual a 87 Da) que, à semelhança de algumas das estruturas reticulantes entre a Gen e a GlcN, possui um átomo de azoto livre, capaz de reagir. A adição da Glc a uma solução de butiramida teve como objetivo perceber de uma forma simplificada se esse grupo amida da butiramida reagia na presença do açúcar redutor. Na **Figura 48** encontra-se representado o espectro de ESI-MS da butiramida com Glc.

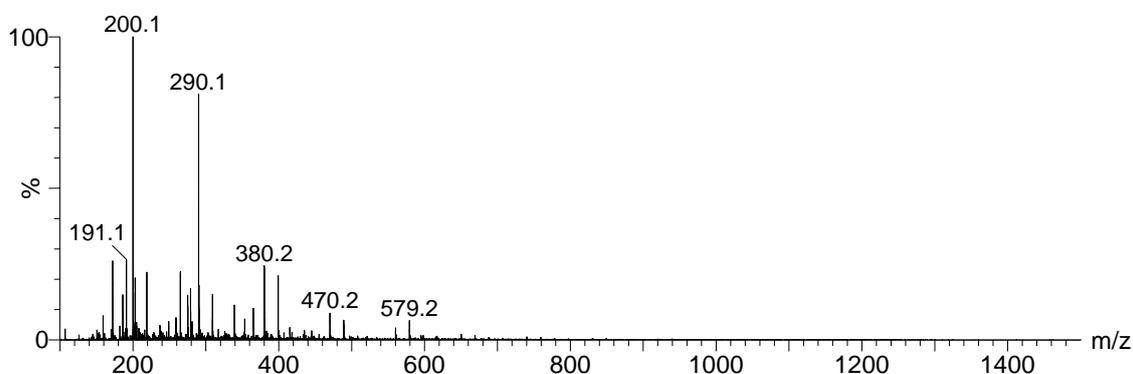


Figura 48 – Espectro de ESI-MS da solução de butiramida e glucose após uma semana de armazenamento a 37 °C.

Atendendo ao espectro de ESI-MS da butiramida e da glucose, verifica-se a existência de dois picos maioritários, com razões de m/z 200 e 290. Na **Figura 49** encontra-se representada a estrutura proposta para a razão m/z 290, que é consistente com o ataque nucleofílico do grupo amina da butiramida ao grupo aldeído da glucose, sendo esta

uma estrutura intermediária da reação de formação da imina. Nenhuma proposta de estrutura foi sugerida para a razão m/z 200.

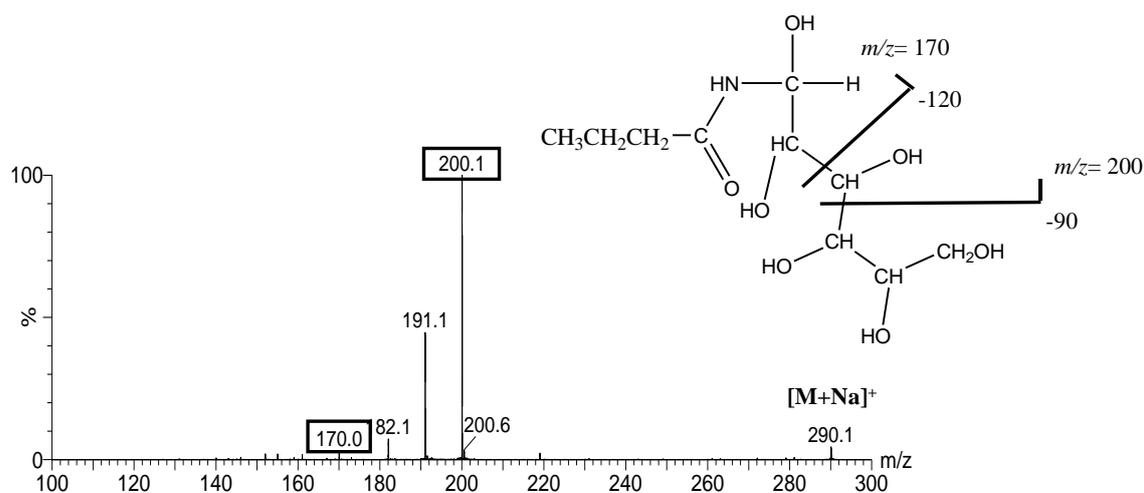


Figura 49 – Estrutura proposta para a razão m/z 290 e respetivo espectro ESI-MS/MS.

O espectro de ESI-MS/MS apresenta um pico maioritário, com razão m/z 200, consistente com a perda de 90 Da. Esse fragmento, juntamente com a perda de 120, correspondente ao fragmento com razão m/z 170, foram identificados. Com a formação da estrutura proposta na **Figura 49** prova-se que existe efetivamente reação entre o grupo amina e o grupo aldeído da glucose, estando também coincidente com a formação de um intermediário da reação de formação da imina, podendo-se confirmar, portanto, a base de Schiff proposta na **Figura 47**.

De forma a tentar melhorar a estabilidade dos filmes à base de quitosana nos refrigerantes Sumol Ananás, procedeu-se à sua redução com boro-hidreto de sódio (NaBH₄). Verificou-se uma maior resistência destes filmes nos refrigerantes enriquecidos com açúcar durante o tempo de armazenamento a 37 °C, sendo que o início da sua degradação foi visível após 15 dias de armazenamento, ao contrário dos filmes não sujeitos a redução que começaram a degradar-se passados dois dias de incubação. Na **Figura 50** encontra-se representado o aspeto dos filmes reduzidos mergulhados no refrigerante Sumol Ananás, ao longo de quarenta dias de armazenamento.

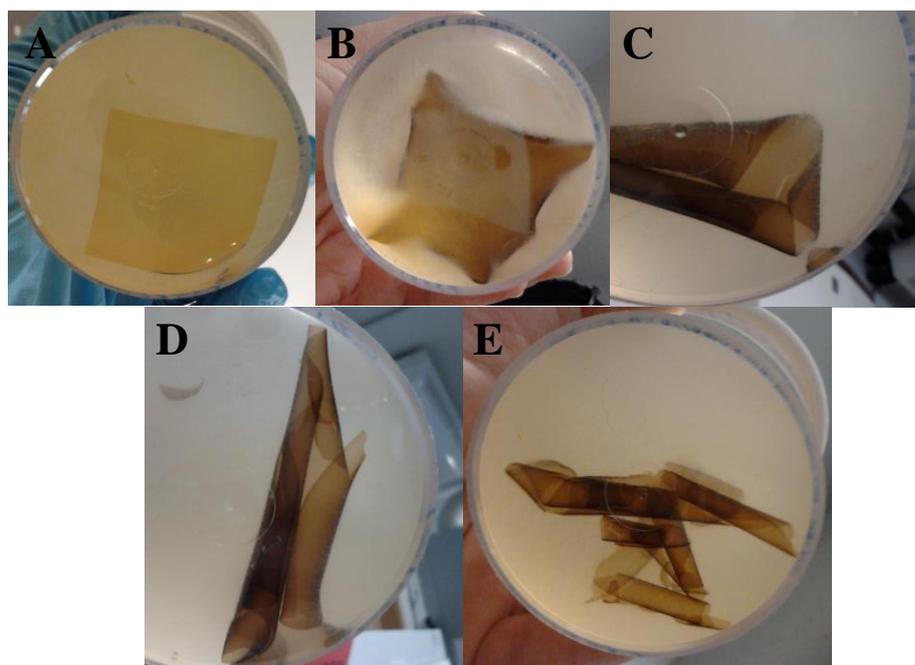


Figura 50 – Filme à base de quitosana reduzido mergulhado no refrigerante Sumol Ananás após (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 20 e (E) 40 dias de armazenamento.

Os mecanismos responsáveis pela resistência dos filmes de quitosana reticulados com genipina tratados com NaBH_4 na presença de glucose ainda não se encontram completamente explicados se atendermos ao mecanismo de degradação do filme de quitosana-genipina proposto na **Figura 47**. Apesar da hipótese surgida ao longo deste trabalho não explicar a resistência dos filmes adquirida com a redução com NaBH_4 , a autooxidação da glucose poderá ser outra hipótese capaz de esclarecer a degradação dos filmes na presença do açúcar redutor. De facto, segundo Wolff e Dean ¹²⁰, a glucose pode sofrer oxidação na presença de metais de transição, gerando intermediários oxidantes que poderão comprometer a integridade do filme. A lavagem inadequada do filme após a redução, pode ter deixado quantidades residuais de NaBH_4 que tenha atuado em pequena extensão na redução de algumas das espécies reativas de oxigénio existentes na matriz. A observação do início da destruição do filme após os quinze dias de armazenamento pode ser explicada pela saturação da glucose relativamente à quantidade de agente redutor disponível.

5. CONCLUSÃO

A adição de um filme à base de quitosana reticulado com genipina, possuidor de propriedades antimicrobianas e antioxidantes, aos sumos Sumol Ananás teve como objetivo proporcionar um método de conservação mais natural comparativamente aos convencionalmente utilizados, na tentativa de minimizar o efeito do uso de conservantes de origem química nos consumidores, evitando, igualmente, reações bioquímicas degradativas que possam ocorrer naturalmente durante o armazenamento dos sumos. No entanto, o uso destes filmes em bebidas com elevado teor de açúcares, nomeadamente no Sumol Ananás, levou à sua degradação, provavelmente devido à interação dos açúcares com a rede reticulada formada entre a genipina (Gen) e a glucosamina (GlcN).

Este trabalho foi desenvolvido tendo dois grandes objetivos: 1) perceber a potencialidade da quitosana como conservante de refrigerantes de fruta e 2) identificar o mecanismo que desencadeia a degradação do filme à base de quitosana na presença de açúcares, nomeadamente da glucose (Glc).

As análises físico-químicas permitiram concluir que o filme à base de quitosana poderá ter potencialidade na conservação de refrigerantes à base de fruta, pois alguns dos *off-flavours* característicos do aroma desagradável em sumos de fruta, nomeadamente o diacetilo e a acetoína, estão diminuídos nos refrigerantes com filme. No entanto, a dissolução do filme catalisou um maior escurecimento dos refrigerantes, impossibilitando, portanto, retirar conclusões acerca da capacidade inibitória do escurecimento dos filmes à base de quitosana nos sumos Sumol Ananás.

A degradação dos filmes nos refrigerantes em estudo foi devido à presença de grandes quantidades de açúcar nos refrigerantes Sumol. A Espectrometria de Massa permitiu obter informações sobre a reação de reticulação entre a Gen e a GlcN, simulando, deste modo, a reticulação existente no filme à base de quitosana. A reação de reticulação verificada entre os precursores Gen e GlcN, estão concordantes com duas das reações típicas descritas na literatura, que envolvem o ataque do grupo amina primário ao anel e ao grupo éster da Gen. Tentou-se, posteriormente, perceber o mecanismo responsável pela destruição do filme à base de quitosana, na presença de açúcares, como a Glc. A adição do açúcar permitiu concluir que as estruturas propostas simulantes da reticulação verificada no filme de quitosana-Gen desapareciam, suportando a ideia de que a presença de açúcares redutores é a responsável pela degradação das estruturas de reticulação. A incorporação do

filme no refrigerante Sumol Laranja Zero mostrou que em bebidas com matrizes com baixos teores em açúcar, os filmes à base de quitosana mantêm-se resistentes por um período prolongado de tempo. O mecanismo de degradação do filme proposto consistiu na quebra da cadeia de quitosana ligada ao carbono anomérico da GlcN, no entanto, esta reação encontra-se ainda em fase de estudo.

Este trabalho permitiu concluir que a dissolução dos filmes de quitosana-genipina não mantiveram as propriedades organolépticas dos sumos após um longo período de armazenamento. O estudo da espectrometria de massa teve como intuito perceber a reação entre a Gen e a GlcN e entre as estruturas resultantes e a Glc, de forma a contornar o problema da dissolução do filme neste tipo de matriz e, assim, desenvolver filmes resistentes e promissores na conservação de refrigerantes de fruta com alto conteúdo em açúcar.

6. PERSPETIVAS FUTURAS

Num trabalho futuro seria interessante proceder à redução do carbono anomérico da glucosamina, que impediria reações indesejáveis, que resultam na formação de inúmeros compostos interferentes.

Complementar o estudo das estruturas simuladoras da reticulação existente no filme à base de quitosana com outras técnicas, como o RMN e o FT-IR.

Estender a aplicabilidade dos filmes à base de quitosana a outros tipos de produto, nomeadamente, a sumos com baixa quantidade de açúcar e avaliar as suas propriedades organoléticas após o seu armazenamento.

A longo prazo, desenvolver filmes à base de quitosana estáveis em refrigerantes com alto teor em açúcar e estudar as suas propriedades conservantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashurst P. R., *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*, 2nd Edition. UK: Blackwell Publishing, 2005.
2. Szymczycha-Madeja A., Welna M., Jedryczko D. and Pohl P., *Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices*, Trends in Analytical Chemistry, 2014, 55, 68–80.
3. Wootton-Beard P. C. and Ryan L., *Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages*, Food Research International, 2011, 44, 3135–3148.
4. Girard B. and Fukumoto L. R., *Membrane processing of fruit juices and beverages: a review*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000, 40, 91–157.
5. Kregiel D. *Health Safety of Soft Drinks: Contents, Containers, and Microorganisms*. Biomed Research Internacional, 2015, 2015, 1-15.
6. Celestino M. S. C., *Produção de Refrigerantes de Frutas*. Embrapa, 2010.
7. Piorkowski D. T. and McClements D. J., *Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications*. Food Hydrocolloides, 2013, 42, 5-41.
8. Ashurst P. R. *Carbonated Soft Drinks Formulation and Manufacture*. Blackwell Publishing Ltd, 2006.
9. Nations U., *Greening Food and Beverage Value Chains: the Case of the Soft Drinks Industry*, Vienna 2014.
10. Probeb, *Bebidas refrescantes não alcoólicas - consumo por habitante em Portugal continua em dos mais baixos na EU*. Available at: <http://probeb.pt/noticias/BEBIDAS-REFRESCANTES-NÃO-ALCOÓLICAS:-CONSUMO-POR-HABITANTE-EM-PORTUGAL-CONTINUA-UM-DOS-MAIS-BAIXOS-NA-UE/-/241>.
11. *2014 Market Report*, European Fruit Juice Association, 2014.
12. Ashurst P. R. and Hargitt R., *Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved*, 1st Edition, Woodhead Publishing, 2009.
13. Wrolstad R. E., Reactions of Sugars in *Food Carbohydrate Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., West Sussex, UK, 2012.
14. Veld J. H. J. H., *Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview*, International Journal Food Microbiology., 1996, 33, 1–18.
15. Gram L., Ravn L., Rasch M., Bruhn J. B., Christensen A. B. and Givskov M., *Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria.*, International Journal Food Microbiology., 2002, 78, 79–97.

16. Uenojo M. and Pastore G. M., *Pectinases: aplicações industriais e perspectivas*, *Química Nova*, 2007, 30, 388-394.
17. Palanivelu P., *Polygalacturonases : Active site analyses and mechanism of action*, *Indian Journal of Biotechnology*, 2006, 5, 148–162.
18. Hui Y. H., *Food Biochemistry and Food Processing*. 2nd ed., Blackwell Publishing, 2006.
19. Fennema O. R., Damodaran S. and Parkin K. L., *Química de Alimentos de Fennema*, 4th ed. Artmed, 2010.
20. García-Torres R., Ponagandla N. R., Rouseff R. L., Goodrich-Schneider R. M. and Reyes-De-Corcuera J. I., *Effects of Dissolved Oxygen in Fruit Juices and Methods of Removal*, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8, 409-423.
21. Bonilla J., Atarés L., Vargas M. and Chiralt A., *Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations*, *Journal of Food Engineering*, 2012, 110, 208–213.
22. Varzakas T., Labropoulos S. and Stylianos A., *Sweeteners: Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology*. CRC Press; 2012.
23. Belitz, H. D., Grosch W. and Schieberle P., *Food Chemistry*. 4th edition, Springer Berlin Heidelberg, 2009.
24. Serpen J. Y., *Comparison of Sugar Content in Bottled 100 % Fruit Juice versus Extracted Juice of Fresh Fruit*, *Food and Nutrition Sciences*, 2012, 3, 1509-1513.
25. Kanatt S. R., Chander R. and Sharma A., *Chitosan glucose complex – A novel food preservative*, *Food Chemistry*, 2008, 106, 521–528.
26. Food I., *Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution*, *International Food Research Journal*, 2013, 20, 1077–1085.
27. Laroque, D., Inisan, C., Berger, C., Vouland, É., Dufossé, L. and Guérard, F. *Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity*. *Food Chemistry*, 2008, 111, 1032–1042.
28. Jing H. and Kitts D., *Chemical and biochemical properties of casein–sugar Maillard reaction products*, *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40, 1007–1015.
29. López-Nicolás J. M., Núñez-Delicado E., Sánchez-Ferrer Á. and García-Carmona F., *Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl- β -cyclodextrin as secondary antioxidant*. *Food Chemistry*, 2007, 101(3), 1164-1171.
30. Mahae N., Chalot C. and Muhamud P., *Antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-sugar complex*. *Journal of International Food Research*, 2011, 18, 1543-1551.
31. Dehelean A. and Magdas D. A., *Analysis of mineral and heavy metal content of some commercial fruit juices by inductively coupled plasma mass spectrometry*, *The Scientific World Journal*, 2013, 2013, 6.

32. Friedrich L. C., Lúcia C., Paiva D., Zanta S., Silva O. and Quina F. H., *Interference of inorganic ions on phenol degradation by the Fenton reaction*, *Scientia Agricola*, 2012, 69, 347–351.
33. Bravo L., *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*, *Nutrition Reviews*, 2009, 56, 317–333.
34. Franke S. I., Ckless K., Silveira J., Rubensam G., Brendel M., Erdtmann B. and Henriques J. A., *Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices*, *Food Chemistry*, 2004, 88, 45–55.
35. Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P. and Glover W., *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*, *Food Chemistry*, 1999, 66, 401–436.
36. Sikora E., Cieślík E. and Topolska K., *The Sources of Natural Antioxidants*, *ACTA Scientiarum Polonorum*, 2008.
37. Mahdavi R., Nikniaz Z., Rafrat M. and Jouyban A., *Determination and Comparison of Total Polyphenol and Vitamin C Contents of Natural Fresh and Commercial Fruit Juices*, *Pakistan Journal of Nutrition*, 2010, 9, 968–972.
38. Crowe K. M. and Murray E., *Deconstructing a fruit serving: comparing the antioxidant density of select whole fruit and 100% fruit juices.*, *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2013, 113, 1354–1358.
39. Cheynier V., *Phenolic compounds: from plants to foods*, *Phytochemistry Reviews*, 2012, 11, 153–177.
40. Mullen W., Marks S. C. and Crozier A., *Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55, 3148–3157.
41. Wilkes J. G., Conte E. D., Kim Y., Holcomb M., Sutherland J. B. and Miller D. W., *Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods*, *Journal of Chromatography A*, 2000, 880, 3–33.
42. Tribst A. A. L., Sant’Ana A. D. S. and Massaguer P. R., *Review: Microbiological quality and safety of fruit juices--past, present and future perspectives*. *Critical Reviews of Microbiology*, 2009, 35, 310–339.
43. Rupasinghe H. P. V. and Yu L. J., *Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages*, *Food Additive*, 2012, 65–82.
44. Walker M. and Phillips C. A., *The effect of preservatives on Alicyclobacillus acidoterrestris and Propionibacterium cyclohexanicum in fruit juice*, *Food Control*, 2008, 19, 974–981.
45. Jr, H. M. P. and Grether M. T., *Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods*, *Journal of Chromatography A*, 2000, 883, 299–304.
46. Shahidi F., Arachchi J. K. V. and Y. J. Jeon, *Food applications of chitin and chitosans*, *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10, 37–51.

47. Alvarenga E. S., *Characterization and Properties of Chitosan*, Biotechnology of Biopolymers, 2006.
48. Chen M., Mi F., Liao Z. and Sung H., *Chitosan : Its Applications in Drug Eluting Devices*, Advances in Polymer Science, 2011, 243, 1–42.
49. Srinivasa P. C., Tharanathan R. N., *Chitin/Chitosan — Safe, Ecofriendly Packaging Materials with Multiple Potential Uses*, Food Reviews Internacional, 2007, 23, 53-72.
50. Mi F., Shyu S. and Peng C., *Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2005, 43, 1985-2000.
51. Pujana M. A., Pérez-Álvarez L., Iturbe L. C. C. and Katime I., *Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin*, Carbohydrate Polymers, 2013, 94, 836–842.
52. Martínez-Camacho A. P., Cortez-Rocha M. O., Ezquerro-Brauer J. M., Graciano-Verdugo A. Z., Rodríguez-Félix F., Castillo-Ortega M. M., Yépiz-Gómez M. S. and Plascencia-Jatomea M., *Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties*, Carbohydrate Polymers, 2010, 82, 305–315.
53. Gonsalves A. A., Araújo C. R. M., Soares N. A., Goulart M. O. F. and Abreu F. C., *Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana*, Química. Nova, 2011, 34, 1215–1223.
54. Venugopal V., *Marine Polysaccharides*, CRC Press, 2011.
55. Jin J., Song M. and Hourston D. J., *Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties*, Biomacromolecules, 2004, 5:162-168.
56. Mi F., Sung H. and Shyu S., *Synthesis and Characterization of a Novel Chitosan-Based Network Prepared Using Naturally Occurring Crosslinker*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry 2000, 38, 2804-2814.
57. Chen H., Ouyang W., Lawuyi B., Martoni C. and Prakash S., *Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005, 75, 917-927.
58. Butler M. F., Ng Y.F. and Pudney P. D., *Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2003, 41, 3941-3953.
59. Tripathi S., Mehrotra G. K. and Dutta P. K., *Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications*, International. Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45, 372–376.
60. Elsabee M. Z. and Abdou E. S., *Chitosan based edible films and coatings: A review*, Materials Science and Engineering: C, 2013, 33, 1819–1841.
61. Domingues R. C. C., Junior S. B. F., Silva R. B., Cardoso V. L. and Reis M. H. M., *Clarification of passion fruit juice with chitosan: Effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments*, Process Biochemistry, 2012, 43, 467-471.

62. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B. P. and Guha A. K., *Clarification of fruit juice with chitosan*. *Process Biochemistry*, 2004, 39, 2229-2232.
63. Maezaki Y., Tsuji K. and Nakagawa Y., *Hypocholesterolemic Effect of Chitosan in Adult Males*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1993, 57, 1439-1444.
64. Gades M. D. and Stern J.S., *Chitosan supplementation and fat absorption in men and women*, *Journal of American Dietetic Association*, 2005, 105, 72-77.
65. Kong M., Chen X., Xing K. and Park H., *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review.*, *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144, 51-63.
66. Schreiber S. B., Bozell J. J., Hayes D. G. and Zivanovic S., *Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material*, *Food Hydrocolloids*, 2013, 33, 207-214.
67. Kosaraju S. L., Weerakkody R. and Augustin M. A., *Chitosan-glucose conjugates: Influence of extent of maillard reaction on antioxidant properties*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58, 12449-12455.
68. Spagna G., Pifferi P. G., Rangoni C., Mattivi F., Nicolini G. and Palmonari R., *The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan*, *Food Research Internacional*, 1996, 29, 241-248.
69. Rao M. S., Chawla S. P., Chander R., and Sharma A., *Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan-glucose solution*, *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83, 714-719.
70. Guibal E., *Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review*, *Separation and Purification Technology*, 2004, 38, 43-74.
71. Wang X., Du Y., Fan L., Liu H. and Hu Y., *Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study*, *Polymer Bulletin*, 2005, 55, 105-113.
72. Soto M. L., Moure A., Domínguez H. and Parajó J. C., *Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review*, *Journal of Food Engineering*, 2011, 105, 1-27.
73. Popa M. I., Aelenei N., Popa V. I. and Andrei D., *Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan*, *Reactive and Functional Polymers*, 2000, 45, 35-43.
74. Nunes C., Cunha Â., Maricato É., Santos M. C., Silva J. A. L., Mendo S., Rocha S. M., Saraiva, J. A., Coimbra M. A., *Desenvolvimento de Metodologias para a Produção de Vinho sem Adição de Anidrido Sulfuroso*, *Sociedade Portuguesa de Química*, 39-44.
75. Huang, D. J., Ou B. X. and Prior RL. *The chemistry behind antioxidant capacity assay*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, 53, 1841-1856.
76. Sinica D. P., Jadhav A. P., Kareparamban J. A., Nikam P.H. and Kadam V.J., *Spectrophotometric Estimation of Ferulic Acid from Ferula asafoetida by Folin - Ciocalteu's Reagent*, *Pelagia Research Library*, 2012, 3, 680-684..

77. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26, 1231-1237.
78. Sekher P. A., Chan T. S., O'Brien P. J. and Rice-Evans C., *Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 282, 1161-1168.
79. Pearson D., *The Chemical Analyses of Foods*. 6th Edition, Gloucester Place, London, 1970.
80. Oliveira R. G., Godoy H. T. and Prado M.A., *Optimization of a colorimetric method to determine ascorbic acids in fruit jelly*, Ciência e Tecnologia dos Alimentos, 2010, 30, 244-249.
81. Tsai P., Yu T., Chen S., Liu C. and Sun Y., *Interactive role of color and antioxidant capacity in caramels*, Food Research International, 2009, 42, 380-386.
82. Hinshaw J. V., *Solid-Phase Microextraction*, G. C Connections, 2003.
83. Vas G. and Vékey K., *Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, 39, 233-254.
84. Gross J. H., *Mass Spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 381, 1319-1320.
85. Laorko A., Tongchitpakdee S. and Youravong W., *Storage quality of pineapple juice non-thermally pasteurized and clarified by microfiltration*, Journal of Food Engineering, 2013, 116, 554-561.
86. Klimczak A., Malecka M., Szlachta M. and Gliszczyn A., *Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices*, Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20, 313-322.
87. Vendana M. I. S., Ziemer C., Obdúlio M. G. and Portella A. C., *Efeito Do Processamento Na Atividade Antioxidante De Uva*, Alimentos e Nutrição, 2008, 19, 159-165.
88. Owczarek L., Jasińska U., Osinińska M. and Skpska S., *Juices and beverages with a controlled phenolic content and antioxidant capacity*, Polish Journal of Food and Nutrition Science, 2004;, 3, 261-268.
89. Gardner P. T., White T. A. C., McPhail D.B. and Duthie G. G., *The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices*, Food Chemistry, 2000, 68, 471-474.
90. Hounhouigan M. H., Linnemann A. R., Soumanou M. M. and Van Boekel M. A., *Effect of Processing on the Quality of Pineapple Juice*, Food Reviews International, 2014, 30, 112-133.
91. Kabasakalis V., Siopidou D. and Moshatou E., *Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage*, Food Chemistry, 2000, 70, 325-328.
92. Wojdyło A., Teleszko M. and Oszmiański J., *Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds*, Food Chemistry, 2014, 152, 261-270.

93. Roig M. G., Bello J. F., Rivera Z. S., Kennedy J. F., *Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice*, *Food Reserch International*, 1999, 32, 609-619.
94. Rocha S. M., Coelho E., Zrostlíková J., Delgadillo I. and Coimbra M. A., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability*, *Journal of Chromatography A*, 2007, 1161, 292-299.
95. Pedroso M. P., Ferreira E. C., Hantao L. W., Bogusz S. and Augusto F., *Identification of volatiles from pineapple (Ananas comosus L.) pulp by comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry*, *Journal of Separation Science*, 2011, 34, 1547-1554.
96. Steingass C. B., Grauwet T. and Carle R., *Influence of harvest maturity and fruit logistics on pineapple (Ananas comosus [L.] Merr.) volatiles assessed by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS)*, *Food Chemistry*, 2014, 150, 382-391.
97. Hassan A., Othman Z. and Siriphanich J., *Pineapple (Ananas Comosus L. Merr.)*, *Methods in Molecular Biology*, 2006, 344, 219-226.
98. El Hadi M. A. M., Zhang F., Wu F., Zhou C. and Tao J., *Advances in fruit aroma volatile research*, *Molecules*, 2013, 18, 8200-8229.
99. Heredia F. J., *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality*. Woodhead Publishing Limited, 2013.
100. Steinhaus, M.; Thomas, K. and Schieberle, P., *Molecular insights into off-flavor formation during pineapple juice processing*, *Flavour Science. Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*, Academic Press, Elsevier, Amsterdam, 2013, 87-90.
101. Valim, M. F., Rouseff, R .L. and Lin J., *Gas chromatographic-olfactometric aharacterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, 51, 1010-1015.
102. Priestap, H. A., Baren V., Lira D. L., Coussio, J. D. and Bandoni A. L., *Volatile constituents of Aristolochia argentina*, *Phytochemistry*, 2003, 63, 221-225.
103. Adams R. P., *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, Academic Press, 1995.
104. Pino J. A., Mesa J., Munoz Y., Marti M. P. and Marbot R., *Volatile components from mango (Mangifera indica L.) cultivars*, *Food Chemistry*, 2005, 53, 2213-2223.
105. Beaulieu J. C. and Grimm C. C., *Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, 49, 1345-1352.
106. Engel E., Baty C., LeCorre D., Souchon I. and Martin N., *Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50, 6459-6467.

107. El-Sayed A. M., Heppelthwaite V. J., Manning L. M., Gibb A. R. and Suckling D., *Volatile constituents of fermented sugar baits and their attraction to lepidopteran species*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53, 953-958.
108. Bezman Y., Rouseff R. L. and Naim M., *2-Methyl-3-furanthiol and methional are possible off-flavors in stored orange juice*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49, 5425-5432.
109. Elss S., Preston C., Hertzog C., Heckel F., Richling E. and Schreier P., *Aroma profiles of pineapple fruit (Ananas comosus [L.] Merr.) and pineapple products*, LWT - Food and Science Technology, 2005, 38, 263-274.
110. Hognadottir A. and Rouseff R. L., *Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2003, 998, 201-211.
111. Jirovetz L., Buchbauer G., Ngassoum M. B. and Geissler M., *Aroma compound analysis of Piper nigrum and Piper guineense essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction -gas chromatography, solid-phase microextraction -gas chromatography - mass spectrometry and olfactometry*, Journal of Chromatography A, 2002, 976, 265-275.
112. Rychlik M., Schieberle P. and Grosch W., *In compilation of odour thresholds, odour qualities and retention indices of key food odorants*, Dt. Forschungsanst. für Lebensmittelchemie, 1998.
113. Jordan M. J., Margaria C. A., Shaw P. E. and Goodner K. L., *Aroma active components in aqueous Kiwi fruit essence and Kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50, 5386-5390.
114. Nunes C, Maricato É, Cunha Â, Nunes A, Silva J. A. L. and Coimbra M A., *Chitosan-caffeic acid-genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media*, Carbohydrate Polymers, 2013, 91, 236-243.
115. Dass C., *Mass spectrometry: structure determination of proteins and peptides*, Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, 2010, 6, 457-496.
116. Wysocki V. H., Resing K. A., Zhang Q. and Cheng G., *Mass spectrometry of peptides and proteins*, Methods, 2005, 35, 211-222.
117. Domon, B. and Costello C. E., *A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS-MS spectra of glycoconjugates*, Glycoconjugate Journal, 1988, 5, 397-409.
118. Simões J., Nunes F. M., Domingues M. R. and Coimbra M. A., *Demonstration of the presence of acetylation and arabinose branching as structural features of locust bean gum galactomannans*, Carbohydrate Polymers, 2011, 86, 1476-1483.
119. Solomons T. W. and Fryhle C. B., *Organic Chemistry*. John Wiley, 2011.
120. Wolff S. P. and Dean R. T., *Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'antioxidative glycosilation' in diabetes*. Biochemical Journal, 1987, 245, 243-250.