

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Desenvolvimento de Filmes com Microencapsulação de Agentes Naturais: Aplicação na Preservação de Salmão

Vera Lúcia da Conceição Duarte Alves

Mestrado em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

**Professora Doutora Maria Margarida Cortês Vieira
Professor Doutor Rui Mariano Sousa da Cruz**

2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Desenvolvimento de Filmes com Microencapsulação de Agentes Naturais: Aplicação na Preservação de Salmão

Vera Lúcia da Conceição Duarte Alves

Mestrado em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria Margarida Cortês Vieira

Professor Doutor Rui Mariano Sousa da Cruz

2015

Declaração de Autoria de Trabalho

Desenvolvimento de Filmes com Microencapsulação de Agentes Naturais: Aplicação na Preservação de Salmão

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

© 2015 Vera Alves “A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos às pessoas que de algum modo contribuíram na realização deste trabalho.

Um especial agradecimento aos meus orientadores:

- Doutor Rui Cruz pela disponibilidade e forma como acompanhou todo o trabalho experimental e a escrita deste relatório, apoio e ajuda dispensados, para além dos conhecimentos transmitidos.
- Doutora Margarida Vieira por me ter proporcionado a realização deste trabalho experimental, pelos esclarecimentos e incentivos que demonstrou.

Agradecimento ao Doutor António Vicente da Universidade do Minho pela disponibilidade e colaboração no trabalho experimental.

À Engenheira Vera Gonçalves e Engenheira Clarisse Ramalho pelo auxílio e apoio técnico durante a execução das análises físico-químicas.

À Engenheira Neusa Rodrigues e Sílvia Madeira pela disponibilidade, esclarecimentos e auxílio na realização das análises microbiológicas.

A todos que tornaram possível a concretização, nomeadamente à minha família, em especial mãe, pai e irmã. Aos meus amigos, em especial à Bruna Rico, Tânia Mateus e Lúcia Rocha através da vossa compreensão, motivação, boa disposição e amizade ao longo do trabalho.

Lista de Abreviaturas

FQ	Filme de quitosano
FQM	Filme de quitosano com microcápsulas
EITF	Espetro de infravermelhos com transformação de Fourier
P _{VA}	Permeabilidade ao vapor de água
P _{O₂}	Permeabilidade ao oxigénio
P _{CO₂}	Permeabilidade ao dióxido de carbono
ABVT	Azoto básico volátil total
log(UFC/g)	Logaritmo de unidades formadoras de colónias por grama
TVB-N	Total volatile base nitrogen
WVP	Water vapor permeability
log(CFU/g)	Logarithm of colony forming units per
PET	Polietileno tereftalato
PVC	Policloreto de vinilo
PE	Polietileno
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PA	Poliamida
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PVOH	Álcool polivinílico
GRAS	Geralmente reconhecidos como seguros
TPP	Tripolifosfato
rpm	Rotações por minuto
HR	Humidade relativa
a _w	Atividade da água

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos filmes de quitosano simples (FQ) e com microcápsulas (FQM) de extrato de grainha de uva e carvacrol, estudaram-se as suas características físico-químicas e testou-se o seu efeito em parâmetros físico-químicos e microbiológicos em salmão refrigerado.

Na caracterização físico-química foram analisados o EITF para ambos os filmes tendo-se verificado que as microcápsulas modificavam o espectro. Foram também analisados para ambos os tipos de filme pela ordem 1) FQ e 2) FQM, os seguintes parâmetros: a P_{VA} ($\text{gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$) 1) $(4,43\pm 0,41)\times 10^{-11}$ e 2) $(4,39\pm 0,41)\times 10^{-10}$, a P_{O_2} ($\text{gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$) 1) $(9,80\pm 1,01)\times 10^{-15}$ e 2) $(1,32\pm 0,31)\times 10^{-12}$, e ainda, a P_{CO_2} ($\text{gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$) 1) $(4,98\pm 2,37)\times 10^{-15}$ e 2) $(1,34\pm 3,22)\times 10^{-12}$.

O ABVT (mg ABVT/100 g) das amostras de salmão embaladas com FQM apresentaram ao 7º dia um valor mais baixo ($36,66\pm 4,18$) do que as embaladas com FQ ($41,64\pm 2,83$) e do que as amostras controlo ($65,62\pm 6,92$). O pH e a luminosidade seguiram a mesma tendência, apresentando ao 7º dia as amostras com FQM valores mais baixos do que as amostras com FQ e as amostras controlo. Nos mesófilos totais observou-se que ao 4º dia as amostras embaladas com FQM apresentaram valores significativamente mais baixos, $6,02\pm 0,19$ log(UFC/g) do que as amostras com FQ e controlo, $7,19\pm 0,55$ log(UFC/g) e $7,18\pm 0,30$ log(UFC/g), respetivamente. Os psicotróficos e as *Pseudomonas spp.* apresentaram também o mesmo comportamento que os microrganismos mesófilos. Concluiu-se que o FQM prolonga o tempo de vida útil de salmão refrigerado entre 4 a 7 dias de armazenamento graças às propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos extratos naturais presentes que contribuíram para a diminuição da velocidade de desnaturação de proteínas e de oxidação de lípidos que ocorrem normalmente em salmão refrigerado e que levam à sua deterioração.

Palavras-chave: Filmes com microcápsulas, Quitosano, Carvacrol, Extrato de grainha de uva, Salmão.

Abstract

Chitosan films were developed with microcapsules (FQM) and without (FQ) of grape seed extract and carvacrol and their physico-mechanical properties were analyzed and their effect on physicochemical and microbiological parameters in chilled salmon was tested.

Regarding the physico-mechanical properties, the infrared spectro of FQM presented differences from FQ. The films' permeabilities showed the following results 1) FQ and 2) FQM: WVP ($\text{gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$) 1) $(4.43\pm 0.41)\times 10^{-11}$ and 2) $(4.39\pm 0.41)\times 10^{-10}$, P_{O_2} ($\text{gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$) 1) $(9.80\pm 1.01)\times 10^{-15}$ and 2) $(1.32\pm 0.31)\times 10^{-12}$ and P_{CO_2} ($\text{gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$), 1) $(4.98\pm 2.37)\times 10^{-15}$ and 2) $(1.34\pm 3.22)\times 10^{-12}$.

The TVB-N(mg volatile total nitrogen (TVB-N)/100 g) in salmon samples packed with FQM presented by the 7th day a lower value (36.66 ± 4.18) when compared with samples with FQ (41.64 ± 2.83) and with control samples (65.62 ± 6.92). For pH and brightness the same trend was verified, after 7 days of storage, the samples with FQM had a lower value than the FQ samples and control samples. When evaluating mesophilic bacteria it was observed that by day 4, samples packed with FQM, had 6.02 ± 0.19 log(CFU/g) whereas FQ and control samples, 7.19 ± 0.55 log(CFU/g) and 7.18 ± 0.30 log(CFU/g), respectively. The psychotropic showed the same behavior as well as *Pseudomonas spp.* It can be concluded that with FQM it is possible to increase the shelf-life of chilled salmon up to 4-7 days of storage because the antimicrobial and antioxidant properties of the natural agents present in FQM helped to reduce the rates of protein denaturation and lipid oxidation, typically occurring in refrigerated salmon leading to its deterioration.

Key-words: Packaging films with microcapsules, Chitosan, Carvacrol, Grape seed extract, Salmon.

Índice Geral

1.	Introdução.....	1
1.1.	Embalagens Tradicionais.....	1
1.3.	Embalagens Ativas.....	3
1.3.1.	Biopolímero: Quitosano.....	5
1.3.2.	Filmes de Quitosano e o seu Efeito em Alimentos.....	8
1.3.2.1.	Aplicação de Extratos Naturais em Filmes de Quitosano	10
1.3.2.1.1.	Extratos Naturais.....	10
1.3.2.1.2.	Carvacrol.....	12
1.3.2.1.3.	Extrato de Grainha Uva	13
1.4.	Metodologias de Microencapsulação	14
1.4.1.	Secagem por Atomização.....	17
1.4.2.	Gelificação Iónica.....	20
1.4.3.	Coacervação	22
1.4.3.1.	Coacervação Simples	22
1.4.3.2.	Coacervação Complexa.....	23
1.4.4.	Liofilização.....	23
1.5.	Pescado.....	24
1.5.1.	Salmão.....	26
1.6.	Objetivos.....	28
2.	Materiais e Métodos.....	29
2.1.	Desenvolvimento de Filmes de Quitosano com Microcápsulas de Extrato de Grainha de Uva e Carvacrol	29
2.1.1.	Preparação da Solução Matriz de Quitosano	31
2.1.2.	Preparação dos Filmes de Quitosano (FQ)	31

2.1.3. Preparação da Solução de Quitosano com Extrato de Grainha de Uva e Carvacrol.....	32
2.1.4. Produção das Microcápsulas de Extrato de Grainha de Uva e Carvacrol	32
2.1.4.1. Secagem por Atomização.....	32
2.1.4.2. Gelificação Iônica.....	32
2.1.5. Desenvolvimento dos Filmes de Quitosano com Microcápsulas (FQM).....	33
2.2. Determinação dos Parâmetros Físico-químicos dos Filmes de Quitosano e dos Filmes de Quitosano com Microcápsulas.....	34
2.2.1. Permeabilidade ao Vapor de Água (P_{VA}).....	34
2.2.2. Permeabilidade ao Oxigênio e ao Dióxido de Carbono (P_{O_2} e P_{CO_2})	34
2.2.3. Espectro de Infravermelhos com Transformação de Fourier (EITF).....	35
2.3. Efeito dos Filmes Produzidos no Tempo de Prateleira de Salmão Refrigerado	36
2.3.1. Preparação das Amostras	36
2.3.2. Condições do Estudo	36
2.3.3. Parâmetros Físico-Químicos	37
2.3.3.1. Cor.....	37
2.3.3.2. Teor de Azoto Básico Volátil Total (ABVT).....	37
2.3.3.3. Textura	38
2.3.3.4. pH.....	38
2.3.3.5. Teor de Humidade	38
2.3.3.6. Atividade da Água (a_w)	39
2.3.4. Parâmetros Microbiológicos	39

2.3.4.1.	Contagem de Microrganismos Mesófilos	39
2.3.4.2.	Contagem de Microrganismos Psicrotróficos	39
2.3.4.3.	Contagem de <i>Pseudomonas spp.</i>	40
2.3.5.	Análise Estatística.....	40
3.	Resultados e Discussão	41
3.1.	Caraterização dos Filmes de Quitosano e dos Filmes de Quitosano com Microcápsulas	41
3.1.1.	Permeabilidade ao Vapor de Água (P_{VA}).....	41
3.1.2.	Permeabilidade ao Oxigênio e ao Dióxido de Carbono (P_{O_2} e P_{CO_2})	43
3.1.3.	Espetro de Infravermelhos com Transformação de Fourier.....	45
3.2.	Efeito dos Filmes Produzidos no Tempo de Prateleira de Salmão Refrigerado	49
3.2.1.	Parâmetros Físico-Químicos	49
3.2.1.1.	Cor.....	50
3.2.1.2.	<i>L</i>	51
3.2.1.3.	<i>a</i>	53
3.2.1.4.	<i>b</i>	55
3.2.1.5.	pH.....	57
3.2.2.	Teor de Azoto Básico Volátil Total (ABVT).....	61
3.2.3.	Textura	65
3.2.4.	Teor de Humidade	66
3.2.5.	Atividade da Água (a_w)	67
3.3.	Parâmetros Microbiológicos	68
3.3.1.	Contagem de Microrganismos Mesófilos	69
3.3.2.	Contagem de Microrganismos Psicrotróficos	74
3.3.3.	Contagem de <i>Pseudomonas spp.</i>	77

4. Conclusões Finais	80
5. Perspetivas de Trabalho Futuro	82
6. Referências Bibliográficas	83
Anexos.....	I
Anexo A – Resultados dos Parâmetros Físico-químicos	II
Anexo B – Análise Estatística dos Parâmetros Físico-químicos.....	VII
Anexo C – Resultados dos Parâmetros Microbiológicos	XXVIII
Anexo D – Análise Estatística dos Parâmetros Microbiológicos	XXIX

Índice de Figuras

Figura 1.1. Mercado de embalagens.....	2
Figura 1.2. Estrutura química da quitina.	6
Figura 1.3. Estrutura química do quitosano.....	6
Figura 1.4. Estrutura química do carvacrol.....	12
Figura 1.5. Estrutura química dos flavonoides.....	13
Figura 1.6. Formas comuns de microencapsulação. a) Microcápsula mononuclear; b) Microcápsula em agregados.....	15
Figura 1.7. Esquema de microencapsulação por secagem por atomização.	18
Figura 1.8. Microcápsulas com polifenóis produzidas por secagem por atomização.	19
Figura 1.9. Estrutura química do método de gelificação iônica do quitosano com TPP.....	20
Figura 1.10. Esquema de microencapsulação por gelificação iônica.	21
Figura 1.11. Esquema de microencapsulação por coacervação.	22
Figura 1.12. Esquema de microencapsulação por liofilização.....	24
Figura 1.13. Microcápsulas formadas por liofilização.	24
Figura 1.14. Consumo mundial de peixe por pessoa (2007-2009).....	25
Figura 2.1. Esquemática do trabalho experimental.	30
Figura 2.2. Filme de quitosano.....	31
Figura 2.3. Filmes de quitosano com microcápsulas de extrato de grão de uva e carvacrol.	33
Figura 2.4. Grupos de diferentes amostras de salmão..	36
Figura 3.1. Espectro de Infravermelhos com Transformação de Fourier.....	45
Figura 3.2. Espectro de Infravermelhos com Transformação de Fourier.....	47
Figura 3.3. Evolução do parâmetro Luminosidade ao longo do armazenamento das amostras de salmão.	51
Figura 3.4. Evolução do parâmetro a ao longo do armazenamento das amostras de salmão.....	53
Figura 3.5. Evolução do parâmetro b ao longo do armazenamento das amostras de salmão.....	55

Figura 3.6. Determinação do pH ao longo do armazenamento das amostras de salmão.	57
Figura 3.7. Determinação do ABVT ao longo do armazenamento das amostras de salmão.....	61
Figura 3.8. Evolução do parâmetro Humidade ao longo do armazenamento das amostras de salmão.....	66
Figura 3.9. Evolução da Atividade da Água ao longo do armazenamento das amostras de salmão.....	67
Figura 3.10. Evolução dos microrganismos Mesófilos ao longo do armazenamento das amostras de salmão.	69
Figura 3.11. Evolução dos microrganismos Psicrotróficos ao longo do armazenamento a 5 °C das amostras de salmão.	74
Figura 3.12. Evolução de <i>Pseudomonas spp.</i> ao longo do armazenamento a 5 °C das amostras de salmão.	77

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Propriedades físico-químicas dos filmes desenvolvidos.	41
Tabela 3.2. Parâmetros físico-químicos do salmão fresco controlo.	49
Tabela 3.3. Textura do salmão fresco controlo.	49
Tabela 3.4. Amostras de salmão ao longo do armazenamento refrigerado.	50
Tabela 3.5. Parâmetros microbiológicos do salmão fresco controlo.	68

1. Introdução

1.1. Embalagens Tradicionais

A embalagem é um elemento fundamental de quase todos os produtos alimentares. As principais funções da embalagem de alimentos são proteger de forma mecânica o conteúdo contra o ambiente externo, manter a qualidade e segurança do produto durante o armazenamento, retardar a deterioração e prolongar o seu tempo de vida útil, o que é essencial nos produtos perecíveis, como peixe, carne, frutas e vegetais (Aguirre et al., 2013; Restuccia et al., 2010).

A embalagem protege o alimento contra influências externas que causam a sua deterioração, como o calor, a luz, a presença ou ausência de humidade, oxigénio, pressão, enzimas, odores, microrganismos, insetos, sujidade, emissões de gases, entre outros fatores. Para prolongar a vida útil dos alimentos é necessária a aplicação de várias estratégias, tais como o controlo de temperatura e de humidade, a adição de produtos químicos, tais como sal, açúcar, dióxido de carbono ou ácidos naturais, a remoção do oxigénio em contacto com o produto ou uma combinação destes fatores para o desenvolvimento de uma embalagem eficaz. Contudo, a embalagem tem ainda as funções de ser conveniente para o consumidor, nomeadamente para o seu transporte, mas também tem as funções a nível de marketing e comunicação (Restuccia et al., 2010).

Quanto à forma da embalagem esta pode ser flexível ou rígida, as embalagens flexíveis incluem materiais como películas ou folhas de papel e a embalagem rígida inclui vidro, metal rígido e madeira. O mercado de embalagens flexíveis deve crescer cerca de 3,2% ao ano até 2019. Substituindo a forma rígida, mais tradicional, devido à vantagem de custo, flexibilidade e variedade de utilização (FAO, 2014).

Segundo a FAO (2014), do mercado total de embalagens o plástico é o segundo material mais utilizado (Figura 1.1). Durante muitos anos, os polímeros foram os constituintes de muitas das embalagens comuns, por apresentarem características desejadas como maciez, leveza e transparência. Os polímeros tais como o polietileno tereftalato (PET), policloreto de vinilo (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e poliamida (PA), normalmente designados por plásticos, têm sido bastante usados como materiais de embalagem, devido à sua elevada disponibilidade e

custo relativamente baixo, mas também devido às suas características mecânicas, tais como tensão e resistência ao corte, boa barreira ao oxigênio e dióxido de carbono (Siracusa et al., 2008). As permeabilidades destes polímeros devem ser inversamente proporcionais à espessura do filme. No entanto, a estrutura que leva a uma boa barreira ao gás, muitas vezes resulta numa baixa barreira ao vapor de água, por exemplo, os filmes polares como os que contém grupos hidroxilo de álcool polivinílico são excelentes barreiras ao gás e, essa barreira torna-se reduzida quando o polímero é plastificado por água. Por outro lado, os polímeros como polietileno são excelentes barreiras à água, mas com fracas propriedades de barreira aos gases. Para serem bons materiais barreira o filme deve conter: algum grau de polaridade, rigidez na cadeia, boa simetria ou ordem molecular e alguma ligação ou atração entre cadeias (Comyn, 2012).

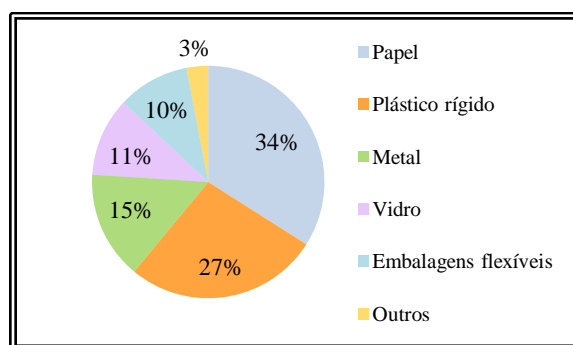


Figura 1.1. Mercado de embalagens (Adaptado de FAO, 2014).

No entanto, estes polímeros derivados de petróleo não são completamente recicláveis nem biodegradáveis no ambiente. Os milhares de toneladas de plásticos que são depositados em aterros aumentam a cada ano a dificuldade de eliminar os resíduos urbanos. Os impactos ambientais causados pela indústria de embalagens são elevados e muito preocupantes. Em particular, as embalagens poliméricas de alimentos devido ao seu tempo de vida relativamente curto gera uma enorme quantidade de resíduos de embalagens de alimentos, que é aproximadamente igual à quantidade de embalagens de alimentos no mercado. Outro inconveniente é a indústria de plástico ser muito dependente do petróleo e, conseqüentemente, com o aumento do preço do petróleo e do gás natural podem ter uma influência econômica sobre o mercado do plástico, como a subida do preço do mesmo (Leceta et al., 2013; Siracusa et al., 2008).

O objetivo de segurança destes materiais tradicionais em contato com os alimentos é ser o mais inerte possível, isto é, não deve ter um mínimo de interação entre o alimento e a embalagem. Por outro lado, as novas tecnologias de embalagem de alimentos desenvolvidas como resposta às exigências dos consumidores ou às tendências da produção industrial com o intuito de conservar os alimentos frescos com um prazo de validade prolongado e qualidade controlada (Restuccia et al., 2010).

Com base no que foi referido anteriormente, é cada vez mais importante utilizar-se matérias-primas como alternativas aos derivados do petróleo. Os consumidores estão mais conscientes e preferem cada vez mais filmes para embalagens com características amigas do ambiente (Aguirre et al., 2013; Kanmani & Rhim, 2014; Siracusa et al., 2008).

Quase todos os produtos, até mesmo alimentos hortícolas, precisam de algum tipo de embalagem durante a sua existência para a proteção durante o transporte, manipulação, armazenamento e utilização. Isto é, cerca de 99,8% de todos os alimentos e bebidas que são ao mesmo tempo incorporados em algum tipo de embalagem. Por esta razão, a indústria alimentar está em constante evolução com as novas tecnologias que melhoram a qualidade dos produtos, prolongam o tempo de prateleira e valorizam o produto, reduzindo o desperdício e deterioração do mesmo (Restuccia et al., 2010).

1.3. Embalagens Ativas

Uma embalagem ativa consiste na extensão do tempo de prateleira ou em melhorar as propriedades sensoriais e a segurança alimentar, mantendo ao mesmo tempo a qualidade do alimento embalado. Para isso, geralmente são adicionadas substâncias ativas aos materiais ativos de embalagem para melhorar a matriz da embalagem (Lee & Rahman, 2014).

O Regulamento (CE) 450/2009, define materiais ativos e substâncias ativas como:

- "... materiais ativos que se destinam a alargar o prazo de validade dos alimentos ou a manter ou melhorar o estado dos alimentos embalados. São concebidos de forma a incorporar deliberadamente componentes que libertem substâncias para os

alimentos embalados ou o ambiente que os envolve ou que absorvam tais substâncias desses alimentos ou do ambiente que os envolve.”

- “Substâncias ativas destinadas a ser libertadas de materiais ativos de libertação nos alimentos embalados ou no ambiente que os envolve e que cumprem uma função nos alimentos.”

Os materiais ativos utilizados para a preparação de embalagens são principalmente baseados em polissacáridos, proteínas e lípidos, que geralmente não são tóxicos e são barreiras eficazes de oxigênio e dióxido de carbono. De forma a serem utilizados como materiais de proteção para manter a qualidade dos alimentos, o que satisfaz a procura do consumidor por produtos perecíveis, minimamente processados, mas sem conservantes químicos (Aguirre et al., 2013; Alak et al., 2010; Kanmani & Rhim, 2014; Leceta et al., 2013; Moradi et al., 2012).

As substâncias responsáveis pela função ativa podem estar embaladas, por exemplo, numa saqueta de papel ou as substâncias que podem ser incorporadas diretamente no material de embalagem. Por conseguinte, o importante é que esta substância ativa possa agir ou ser libertada de uma forma controlada para o alimento, melhorando as suas propriedades (Regulamento (CE) 450/2009, Restuccia et al., 2010).

Os ácidos orgânicos, extratos de especiarias ou de óleos essenciais, ácidos gordos, enzimas, extratos de sementes de frutas e plantas, são substâncias ativas com propriedades antimicrobianas eficazes para produzir filmes ativos (Kanmani & Rhim, 2014).

Estas embalagens têm diversas aplicações como melhorar a função de preservação, como impedir a transmissão de oxigênio, vapor de água, dióxido de carbono, e ainda, a função de absorver etileno, humidade ou odores desagradáveis produzidos durante a degradação, libertando compostos antimicrobianos e antioxidantes para o alimento e ao mesmo tempo, reduzir danos e preservar a integridade dos alimentos (Restuccia et al., 2010).

Atualmente, vários cientistas têm estudado o desenvolvimento e a aplicação de filmes à base de biopolímeros, baseados numa variedade de produtos agrícolas e/ou de resíduos de produtos alimentares (Aguirre et al., 2013; Alak et al., 2010; Elsabee & Abdou, 2013; Leceta et al., 2013; Lee & Rahman, 2014; Moradi et al., 2012; Nowzari et al., 2013; Qiu et al., 2014; Sansone et al., 2014; Wu et al., 2014). Este aumento de

interesse foi intensificado devido a preocupações com os recursos naturais limitados como os combustíveis fósseis e o elevado impacto ambiental provocado pelos materiais utilizados nas embalagens à base de plástico não biodegradáveis, como referido anteriormente. Esses biopolímeros incluem amidos, derivados de celulose, quitosano, gomas, proteínas de origem animal ou à base de plantas e lípidos, materiais que oferecem a possibilidade de obtenção de filmes finos e revestimentos para cobrir os alimentos frescos ou transformados para prolongar o tempo de vida útil. (Aguirre et al., 2013; Alak et al., 2010; Elsabee & Abdou, 2013; Moradi et al., 2012). Estes filmes têm ainda benefícios nas características gerais do produto, a nível de qualidade e aparência do mesmo, mas também para a saúde pública o que aumenta o interesse por parte do consumidor (Kanmani & Rhim, 2014).

Broek et al., (2015), refere que em 2009 os polímeros de origem biológica eram apenas uma pequena fração (<1%) do mercado total dos plásticos, no entanto, prevê que aumente para 20% em 2020. Assim, estima-se o desenvolvimento rápido na aplicação e produção de materiais de base biológica na produção de embalagens. Devido às suas propriedades antimicrobianas o quitosano é um polímero promissor.

1.3.1. Biopolímero: Quitosano

Ao longo das últimas décadas, vários biopolímeros que ocorrem naturalmente na natureza como a dextrina, pectina, quitina e quitosano têm recebido maior atenção e foram extensivamente estudados para aplicação nas indústrias alimentares (Coles & Kirwan, 2011; Elsabee & Abdou, 2013).

A quitina é um biopolímero que é biodegradável e comestível. Depois da celulose, é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, de ocorrência natural e sintetizado pelo enorme número de organismos vivos, existe no exosqueleto de crustáceos e nas paredes celulares de fungos e de outros materiais biológicos. A estrutura química do quitosano é poli[(1,4)-N-acetil-D-glucose-2-amina] (Figura 1.2.), a qual é estruturalmente idêntica à celulose, exceto num derivado de hidroxilo no segundo átomo de carbono da unidade de repetição de hexoses que nesta molécula é substituído por um grupo acetamida (Coles & Kirwan, 2011; Corrales et al., 2014; Elsabee & Abdou, 2013; Sathivel et al., 2007; Vatavali et al., 2013).

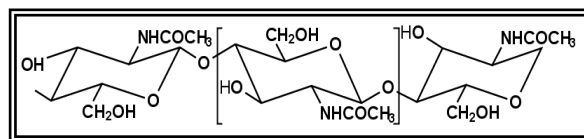


Figura 1.2. Estrutura química da quitina (Broek et al., 2015; Ma & Sahai, 2013).

A quitina ao sofrer a desacetilação num meio alcalino origina quitosano, um polímero natural poli[(1,4)-D-glucose-2-amina)] (Figura 1.3.), que é o principal constituinte do exosqueleto de crustáceos, de invertebrados marinhos, insetos, algumas algas e fungos. Devido à elevada quantidade disponível nos esqueletos marinhos funciona como subproduto no processamento de alimentos. É um polissacárido muito abundante na natureza com peso molecular médio e tem como características ser não tóxico e biodegradável num curto espaço de tempo, residindo a sua importância nas suas propriedades antimicrobianas, inibindo o crescimento de uma grande variedade de bactérias gram (+) e gram (-), bolores, leveduras e fungos. Num ambiente ácido, o quitosano é carregado positivamente e solúvel devido ao protão do grupo glucosamina (Abdou et al., 2012; Alak et al., 2010; Antoniou et al., 2015; Broek et al., 2015; Corrales et al., 2014; Cruz-Romero, et al., 2013; Higuera, et al., 2015; Hosseini et al., 2015a; Leceta et al., 2013; Moradi et al., 2012; Rubilar et al., 2013a,b; Sansone et al., 2014; Soares et al., 2015; Vatavali et al., 2013).

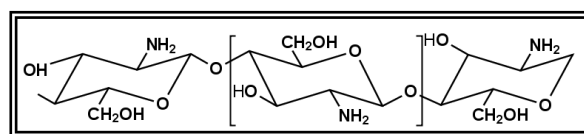


Figura 1.3. Estrutura química do quitosano (Boamah et al., 2015; Broek et al., 2015; Ma & Sahai, 2013).

O quitosano é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos e metais alcalinos. No entanto, o quitosano, ao contrário da quitina, é solúvel em ácidos fracos, (ácidos orgânicos diluídos), tais como ácido acético, ácido fórmico e ácido láctico e, portanto, mais favorável para aplicações industriais. Este polissacárido contém três

grupos polares funcionais diferentes, o grupo hidroxilo (OH), amina primária (NH₂), e grupos (COC) de éter (Ma & Sahai, 2013).

O quitosano tem a capacidade de formar uma película transparente com boas propriedades mecânicas, apresentando uma barreira eficaz aos gases (CO₂ e O₂), uma elevada permeabilidade ao vapor de água e o aumento da viscosidade com a hidratação tendo a capacidade de formar filmes estáveis, flexíveis e muito difíceis de quebrar com a aplicação numa diversa variedade de embalagens, pelo que tem sido utilizado para proteger, conservar, melhorar a qualidade e prolongar a vida de prateleira de alimentos frescos e processados. Deste modo, os produtos alimentares embalados com este polissacárido devem ser devidamente rotulados como um material hipoalergénico (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Corrales et al., 2014; Elsabee & Abdou, 2013; Fabra et al., 2014; Li et al., 2013a; Rubilar et al., 2013a; Sansone et al., 2014; Sathivel et al., 2007; Soares et al, 2015).

O custo material deste polissacárido é reduzido por isso permite desenvolver uma embalagem de baixo custo, o que é muito interessante para a indústria alimentar. Contudo, os filmes de quitosano não são termoplásticos e não podem ser extrudidos, moldados ou esticados, como nos polímeros termoplásticos de embalagens convencionais (Broek et al., 2015).

O quitosano tem sido bastante estudado para atuar como um conservante de alimentos de origem natural, quer em ensaios *in vitro*, quer através da aplicação direta nos alimentos. No entanto, o facto dos filmes de quitosano serem altamente permeáveis ao vapor de água limita a sua utilização, uma vez que põe em risco o controlo eficaz da transferência de humidade, propriedade importante para a maioria dos alimentos, especialmente em ambientes húmidos. Deste modo, têm sido utilizadas várias estratégias para melhorar as propriedades físicas dos filmes à base deste biopolímero. A permeabilidade do filme ao oxigénio é outro fator importante, pois no caso de alimentos com elevado teor lipídico, durante um armazenamento, com total exposição ao oxigénio, ocorre a oxidação alterando o sabor e cor do alimento sendo esta reação impedida se se reduzir a exposição através de filmes com baixa permeabilidade ao oxigénio, ou seja, que ofereçam uma barreira ao transporte do oxigénio do ambiente de armazenamento para o alimento (Elsabee & Abdou, 2013; Sansone et al., 2014; Sathivel et al., 2007).

As propriedades funcionais dos filmes à base de quitosano podem ser melhoradas combinando-os com outros hidrocolóides. Pode-se, por exemplo, obter uma diminuição da P_{VA} através da combinação dos grupos catiónicos de quitosano com os grupos aniônicos de pectina. Ainda, o aumento da hidrofobia do quitosano tem sido obtido através da adição de lípidos neutros, ácidos gordos de ceras e argila, apesar de muitas vezes comprometer a sua estabilidade mecânica e química e/ou as suas características organolépticas. Além disso, vários meios químicos e físicos têm sido demonstrados como uma estratégia para melhorar as suas propriedades mecânicas, tais como a adição de agentes de ligação cruzada, irradiação e tratamentos por ultrassons (Elsabee & Abdou, 2013).

Outra alternativa para melhorar as propriedades físicas e mecânicas de biofilmes é através da combinação de proteínas, por exemplo, proteínas do leite, proteína da soja, colagénio e gelatina, ou de polissacáridos, por exemplo, com quitosano, amidos, alginatos e celulose. A mistura de quitosano com gelatina permitiu obter um filme homogéneo, devido à boa miscibilidade entre ambos os biopolímeros conduzindo a melhores propriedades desta película, em comparação com os filmes obtidos a partir dos polímeros puros (Elsabee & Abdou, 2013). Contudo, o quitosano pode ser aplicado não só na área de engenharia alimentar, mas também em medicina, farmácia e engenharia do ambiente (Ma & Sahai, 2013).

O quitosano foi incorporado como um aditivo antimicrobiano em embalagens ativas com polímeros sintéticos, tais como PEBD ou PVOH e com os polímeros biodegradáveis, tais como amido e gelatina (Corrales et al., 2014). Vários estudos demonstraram que os filmes de PP apresentaram maior impacto ambiental do que os filmes de quitosano, uma vez que este último não é extraído de matéria prima poluente e portanto não contém substâncias cancerígenas (Leceta et al., 2013).

1.3.2. Filmes de Quitosano e o seu Efeito em Alimentos

A atividade antimicrobiana de quitosano em produtos à base de pescado está bem documentada na literatura, os filmes e revestimentos à base de quitosano foram utilizados numa variedade de espécies de peixes para reduzir os microrganismos e, consequentemente, melhorar a qualidade do peixe em geral, uma vez que eles funcionam como uma barreira à humidade e ao oxigénio. Num estudo realizado em

salmão conservado com revestimentos de quitosano conclui-se que este permitiu prolongar o tempo de prateleira de 5 para 9 dias (Fernández-Saiz, et al., 2013; Li et al., 2013a). Noutro estudo realizado em filetes de robalo (*Dicentrarchus labrax*) os resultados mostraram que o tempo de prateleira do controlo e dos grupos embalados a vácuo terminou no prazo de 5 dias, enquanto os filetes embalados com FQ permitiram prolongar o tempo de prateleira por 20 dias (Günlü & Koyun, 2013). Existem ainda diversos alimentos, como os brócolos onde os filmes de quitosano podem ser aplicados associados a outros compostos naturais para o aumento do tempo de prateleira, reduzindo a microbiota que conduz à deterioração (Alvarez et al., 2013).

O efeito de filmes de quitosano foi testado também em filetes de pescada (*Merluccius merluccius*) e de linguado (*Solea solea*) envolvidos numa matriz de quitosano em ar e sob vácuo e analisados durante um armazenamento de 15 dias a 4 °C. Foi verificada a eficácia do quitosano como camada interna do material de embalagem, como microbicida, que melhorou a qualidade destes peixes durante o armazenamento refrigerado (Fernández-Saiz et al., 2013).

O efeito do revestimento do quitosano a 2% (m/v) foi benéfico também para o aumento do tempo de prateleira de carne pronta a comer em comparação com as amostras controlo, armazenadas durante 14 dias, entre 0 e 3 °C ($p < 0,05$) (Kanatt et al., 2013). Filmes edíveis constituídos unicamente por quitosano ou combinado com outros biopolímeros, por exemplo, caseinato de sódio, foram aplicados em amostras de cenoura, queijo e salame devido ao seu efeito antimicrobiano. Os filmes exerceram ação bactericida sobre bactérias mesófilas e psicrotóficas e reduziram a contagem de leveduras e fungos (Cruz-Romero et al., 2013).

Os filmes de quitosano devido às características descritas anteriormente podem ser utilizados para transportar os compostos funcionais, tais como agentes de preservação, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes e nutracêuticos. Esta prática na indústria alimentar pode melhorar a vida útil dos alimentos e ainda, melhorar as características gerais do filme. As propriedades antioxidantes do quitosano foram muito estudadas e a maioria dos produtos alimentares podem beneficiar destas propriedades quando o quitosano é convertido em filme. Além disso, para reforçar ainda mais essas características inerentes, uma estratégia é a incorporação de extratos antimicrobianos e antioxidantes no FQ (Moradi et al., 2012; Sansone et al., 2014).

1.3.2.1. Aplicação de Extratos Naturais em Filmes de Quitosano

O melhoramento das propriedades funcionais dos filmes de quitosano pode ser conseguido através da incorporação de compostos antimicrobianos e/ou antioxidantes de origem natural nos filmes de quitosano como já referido anteriormente. A adição de outros compostos naturais, como óleos essenciais extraídos de especiarias e de ervas aromáticas e extratos de plantas, porque a sua composição e estrutura permitem aumentar o tempo de prateleira de produtos alimentares (Ramos et al., 2014; Rubilar et al., 2013a). Assim, a utilização de extratos com atividade antimicrobiana é de grande interesse no setor de embalagens de alimentos e estão a ser cada vez mais estudados para desenvolver tecnologias eficazes de embalagem de alimentos antimicrobianos que têm por base a incorporação de extratos ativos em matrizes poliméricas (Higueras, et al., 2015).

1.3.2.1.1. Extratos Naturais

A combinação de extratos naturais como óleos essenciais, que são extraídos de plantas e inseridos diretamente na matriz ativa de uma embalagem (filme) permite evitar a deterioração dos alimentos e alterar o aroma e odor, além de induzir características antimicrobianas à embalagem. Esta é uma forma de embalagem ativa e é considerada uma opção para os produtores e consumidores mais exigentes (Elsabee & Abdou, 2013; Fernández-Saiz et al., 2013; Hosseini et al., 2015a; Li et al., 2013b; Osheba et al., 2013; Ramos et al., 2014; Rubilar et al., 2013b; Valdés et al., 2014).

Os óleos essenciais categorizados como GRAS (geralmente reconhecidos como seguros), podem ser considerados como potenciais alternativas aos aditivos sintéticos. Os óleos essenciais extraídos de plantas, como ervas e especiarias são fontes ricas de compostos ativos biológicos, tais como terpenos e ácidos fenólicos, com elevada atividade antimicrobiana contra microrganismos patogénicos de origem alimentar (Aguirre et al., 2013; Costa et al., 2013, Higueras, et al., 2015; Hosseini et al., 2015a).

Os compostos fenólicos são compostos bioativos facilmente obtidos a partir de diferentes vegetais e subprodutos agroindustriais e desempenham um papel essencial na qualidade e segurança alimentar, bem como na saúde humana (Nazzaro et al., 2012). Geralmente, os compostos com grupos fenólicos, os óleos de cravo, orégão, tomilho, canela, alecrim, baunilha e extrato de grainha de uva mostraram ser eficazes contra o

desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e retardam a oxidação dos alimentos. O peso molecular e a estrutura dos compostos fenólicos podem variar bastante e conter diferentes números de grupos hidroxilo, capazes de formar ligações de hidrogénio com os grupos carbonilo de péptidos de proteínas (Aguirre et al., 2013; Elsabee & Abdou, 2013; Karre et al., 2013). Os polifenóis estão presentes nos grupos de metabolitos de muitas plantas, são parte integrante da dieta humana e possuem um elevado espectro de atividades biológicas, incluindo as antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais. Uma grande parte da investigação pré-clínica e dados epidemiológicos sugerem que os polifenóis de plantas podem retardar a progressão de certos tipos de cancro, reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes ou osteoporose (Fang & Bhandari, 2010).

Existem muitos estudos realizados com filmes de quitosano em que foram incorporados extratos, nomeadamente o extrato de chá verde, chá preto ou gel de *Aloe vera* que permitiram melhorar as propriedades do FQ (Khoshgozaran-Abras et al., 2012; Peng et al., 2013). O FQ com extrato de chá verde por exemplo, pode ser usado como embalagem ativa para a aumentar as qualidades e o tempo de prateleira de salsichas de porco (Siripatrawan & Noipha, 2012). Outro exemplo, é o caso do óleo de canela que quando incorporado com uma solução de quitosano pode manter até 16 dias filetes de truta, sem qualquer perda significativa de textura, odor, cor e sem crescimento microbiano significativo (Elsabee & Abdou, 2013).

Por outro lado, a atividade antioxidante do extrato de alecrim está associada à presença de vários di-terpenos fenólicos, os quais quebram reações em cadeia de radicais livres pela libertação de hidrogénios. O pré-tratamento de oxigénio e o revestimento de quitosano com extrato de alecrim a 0,03% permitiu melhorar a qualidade de peras frescas cortadas e aumentar o prazo de validade. Assim, a propriedade catiónica do quitosano permite estabelecer interações eletrostáticas com outros compostos. Devido a estas características, o quitosano combinado com extratos tem sido bastante utilizado para a produção de filmes edíveis na indústria alimentar (Elsabee & Abdou, 2013; Li et al., 2013b; Rubilar et al., 2013a).

1.3.2.1.2. Carvacrol

O orégão é uma erva aromática obtida por secagem de folhas e flores de *Origanum vulgare* as suas propriedades antimicrobianas têm sido demonstradas em diversos estudos. O orégão foi classificado como GRAS, contudo, a sua utilização é muitas vezes limitada pelo forte odor e gosto que transmite aos alimentos (Aguirre et al., 2013; Costa et al., 2013; Hosseini et al., 2015a; Ramos et al., 2014; Vatavali et al., 2013). Vários estudos revelaram que o orégão (*Origanum sp.*) é uma das plantas de onde se pode extrair mais óleos essenciais ricos em compostos ativos biológicos. Existe portanto, um interesse crescente na aplicação e avaliação desta erva aromática possivelmente para minimizar a contaminação das camadas superficiais de alimentos e reduzir ou mesmo inibir o crescimento de microrganismos responsáveis pela degradação destes (Aguirre et al., 2013; Karre et al., 2013). O seu efeito antibacteriano foi atribuído principalmente à fração terpenos presentes, o carvacrol e o timol (Corrales et al., 2014). Karre et al. (2013) descobriram que o extrato de orégão (0,02%) foi eficaz na redução da oxidação lipídica em amostras de carne cozida embalada a vácuo e armazenada a -18 °C durante 4 meses. Vatavali et al. (2013) refere ainda, este óleo essencial deve ser utilizado em baixas concentrações e em combinação com outras tecnologias.

O carvacrol (Figura 1.4) sendo o componente principal do orégão (50 a 86%), É um monoterpreno fenólico não tóxico, com atividade antimicrobiana comprovada contra bactérias, fungos e leveduras e ainda com atividade inseticida e antiparasita. Possuindo assim um elevado potencial natural para a conservação e segurança dos alimentos perecíveis mesmo quando aplicado isoladamente (Costa et al., 2013; Hosseini et al., 2015a; Ramos et al., 2014; Rubilar et al., 2013a, b).

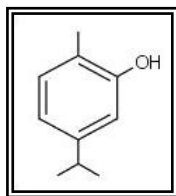


Figura 1.4. Estrutura química do carvacrol (Asbahani et al., 2015).

Existem vários estudos publicados com filmes de quitosano com carvacrol incorporado (0,04 a 10,75%) aplicados em diferentes produtos alimentares, como

pescado, sumos de frutas e carne que podem ser usados para melhorar as propriedades funcionais e antimicrobianas das películas (Costa et al., 2013; Kurek et al., 2013).

1.3.2.1.3. Extrato de Grainha Uva

O extrato de grainha uva é rico em polifenóis, taninos poliméricos e flavonóides monoméricos tais como, catequinas e epicatequinas, ácido gálico e procianidinas oligoméricas e poliméricas (Figura 1.5). Estes compostos polifenólicos têm vários efeitos biológicos, incluindo capacidade antimicrobiana e antioxidante (Corrales et al., 2014; Li et al., 2014; Li et al., 2013b; Reddy et al., 2013; Rubilar et al., 2013a, b; Terra et al., 2007).

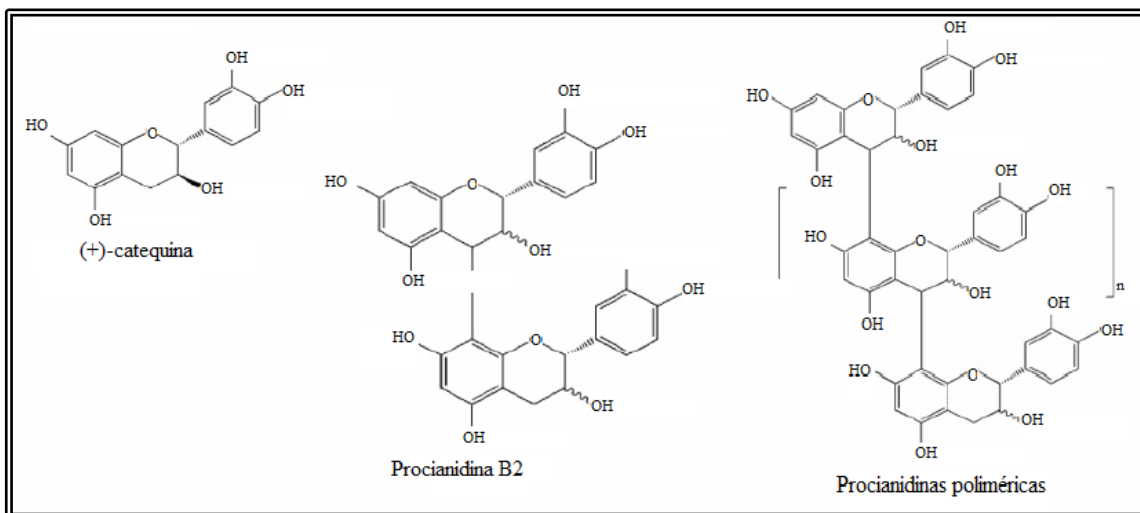


Figura 1.5. Estrutura química dos flavonoides (Terra et al., 2007).

Do ponto de vista da saúde, o extrato de grainha de uva tem demonstrado ser um anticancerígeno e ser ativo contra o vírus VIH pela inibição da expressão e replicação. Os dados clínicos mostraram que o potencial antioxidante da grainha de uva é 20 e 50 vezes superior do que as vitaminas C e E, respetivamente, devido ao aumento dos níveis de proantocianidinas de polifenóis e oligómeros, especialmente catequinas e epicatequinas no extrato de grainha de uva (Karre et al., 2013; Li et al., 2014; Reddy et al., 2013).

A capacidade do extrato de grainha de uva de retardar a oxidação lipídica foi evidenciada em fatias de carne de carneiro embalada a vácuo durante o armazenamento a 4 °C, tendo os autores deste artigo indicado o resultado positivo devido

provavelmente, aos compostos polifenólicos com ênfase nas proantocianidinas presentes no extrato (Reddy et al., 2013). Outro estudo revela ainda que a oxidação lipídica em salmão embalado com um filme incorporado com extrato de grainha de uva (0,5 a 1,2%) foi retardada significativamente (Song et al., 2012).

Com base no atrás referido, este extrato mostra ser uma excelente substância ativa com atividade antioxidante e com capacidade de retardar a oxidação de lípidos em várias matrizes alimentares, por isso é escolha ideal para ser adicionado para filmes produzidos à base de biopolímeros porque permite melhorar a qualidade e prolongar o tempo de vida útil de diversos alimentos (Li et al., 2014).

1.4. Metodologias de Microencapsulação

A microencapsulação foi desenvolvida em 1930, consistindo num processo em que pequenas partículas sólidas ou gotículas de líquidos são revestidas de forma homogênea ou heterogênea, formando microcápsulas que podem libertar o seu conteúdo de forma controlada e em condições específicas. As microcápsulas são partículas de pequena dimensão que podem ter até vários milímetros de tamanho (Nesterenko et al., 2013). O desenvolvimento de microcápsulas com boas propriedades para aplicar, por exemplo, em embalagens para alimentos, envolve um bom conhecimento sobre a estabilidade do componente a ser encapsulado, no núcleo da microcápsula e ainda as propriedades dos materiais utilizados no processo de encapsulação, ou seja a matriz encapsulante assim como a técnica de desenvolvimento das microcápsulas a aplicar de acordo com a aplicação final (Nazzaro et al., 2012). Existem várias morfologias que podem ser produzidas por microencapsulação, mas as duas principais são as microcápsulas mononucleares, que têm um único núcleo envolvido por uma concha e as microcápsulas em agregados, as quais têm vários núcleos envolvidos numa matriz (Figura 1.6). As suas formas específicas em diferentes sistemas são influenciadas pelo núcleo, pelo revestimento que o envolve e pelas tecnologias de processo a partir das quais as microcápsulas são produzidas (Figura 1.7). A matriz envolvente pode ser constituída por açúcares, gomas, proteínas, polissacáridos naturais e modificados, lípidos e polímeros sintéticos (Fang & Bhandari, 2010; Lupo et al., 2014; Nazzaro et al., 2012).

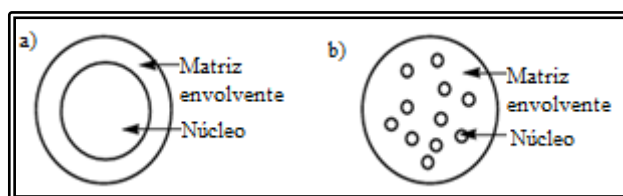


Figura 1.6. Formas comuns de microencapsulação. a) Microcápsula mononuclear; b) Microcápsula em agregados (Fang & Bhandari, 2010).

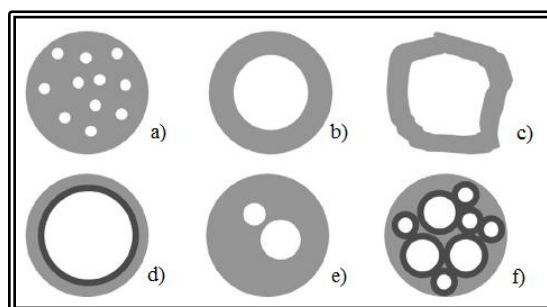


Figura 1.7. Morfologia dos diferentes tipos de microcápsulas. a) Matriz, b) Microcápsula simples, c) Microcápsula irregular, d) Microcápsula com multicamadas, e) Microcápsula com vários núcleos, f) Agregado de microcápsulas (Estevinho et al., 2013).

As metodologias de microencapsulação têm diversos fins como proteger substâncias sensíveis no núcleo da microcápsula de condições ambientais adversas, como dos efeitos indesejáveis de luz, humidade e oxigénio, o que contribui para um aumento da vida útil do produto e promove uma libertação controlada do encapsulado. Na indústria alimentar, o processo de microencapsulação pode ser aplicado em várias situações tais como: proteção do material do núcleo contra a degradação, reduzindo a sua reatividade ao ambiente exterior; a redução da taxa de transferência ou de evaporação do material do núcleo para o meio exterior; a modificação das características físicas do material original para permitir uma manipulação mais fácil; controlar a libertação do material de núcleo lentamente ao longo do tempo, ou a uma determinada hora; mascarar sabores e odores do núcleo por vezes indesejáveis; diluir o material do núcleo, quando são necessárias apenas pequenas quantidades, conduz à dispersão uniforme no material hospedeiro no alimento e, por fim, ajudar a separar os componentes da mistura. Podem ser encapsulados acidulantes, agentes aromatizantes, adoçantes, corantes, lípidos, vitaminas, minerais, enzimas e microrganismos, utilizando

diferentes tecnologias (Fabra et al., 2014; Fang & Bhandari, 2010; Fang & Bhandari, 2012; Nesterenko et al., 2013).

A principal vantagem da microencapsulação é a formação de uma barreira entre o composto e o ambiente. Esta barreira permite proteger contra o oxigénio, água e luz, e impedir o contacto com outros ingredientes que entrem na composição de um alimento, na difusão controlada do composto encapsulado. A eficiência da libertação controlada ou de proteção depende principalmente da composição e estrutura da parede estabelecida e das condições do processo, como a temperatura, pH, pressão e humidade durante a produção e utilização das partículas. A barreira é geralmente formada por componentes que criam uma rede através das propriedades hidrófilicas ou hidrófobicas (Costa et al., 2013; Liu et al., 2013).

A indústria alimentar é um setor que, através da microencapsulação de extratos naturais, pode beneficiar de novos materiais ou metodologias de embalagem capazes de prolongar o tempo de vida útil de alimentos frescos muito perecíveis como legumes, frutas, peixe e carne, aumentando as suas características em termos de qualidade e higiene (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Nazzaro et al., 2012). Na ciência de alimentos e na biotecnologia a incorporação de compostos como polifenóis, aditivos voláteis, enzimas e bactérias probióticas em pequenas cápsulas, permite-lhes que sejam não só estáveis, mas também protegidas e preservadas contra a perda da sua qualidade nutricional biológica, podendo atuar com as suas propriedades antimicrobianas e/ou antioxidantes (Lupo et al., 2014).

O quitosano tem sido utilizado na preparação de microcápsulas devido às suas propriedades intrínsecas, nomeadamente a elevada biocompatibilidade, ser biodegradável e não ser tóxico. (Estevinho et al., 2013; Hui et al., 2013; Song et al., 2013). A microencapsulação também pode ser aplicada com sucesso para aprisionar compostos naturais, como óleos essenciais e extratos vegetais que contenham, por exemplo, polifenóis com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas em embalagens para alimentos. Esta metodologia possibilita o aumento da eficácia dos óleos essenciais para diminuir o seu impacto sensorial dos alimentos. Para a microencapsulação dos óleos essenciais são realizadas duas etapas. Numa primeira fase, uma emulsão do composto volátil numa dispersão aquosa de um material que funciona também como emulsionante. De seguida, a emulsão do microencapsulado é desidratada

sob condições controladas, de modo a diminuir a perda do composto por volatilização (Nazzaro et al., 2012).

A microencapsulação permite criar uma barreira física entre o núcleo e os materiais de parede e a proteção dos compostos sensíveis como antioxidantes, óleos polinsaturados, aromas, vitaminas, fármacos, entre outros, a partir do meio externo, controlando a humidade, o pH e a oxidação. A libertação do conteúdo de micropartículas as velocidades controladas podem ser desencadeadas por cisalhamento, solubilização, aquecimento, pH ou por ação enzimática. Esta tecnologia tem diversas aplicações na indústria alimentar, biomédica, têxtil, farmacêutica e cosmética, bem como na agricultura (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Liu et al., 2013; Nesterenko et al., 2013).

A microencapsulação permite manter a bioatividade dos compostos encapsulados. No entanto, o grau de proteção fornecido pela microencapsulação é determinado pela escolha da técnica de microencapsulação. As técnicas mais importantes de microencapsulação são a secagem por atomização, gelificação iónica, emulsificação, coacervação, liofilização ou atomização de arrefecimento, extrusão, encapsulação de lipossomas, estes métodos foram aplicados com sucesso em extratos de plantas e são usados nas indústrias alimentares para o desenvolvimento de embalagens (Estevinho et al., 2013; Fabra et al., 2014; Fang & Bhandari, 2012; Malmo et al., 2011; Nesterenko et al., 2013; Rosa et al., 2013; Sansone et al., 2014). Portanto, consoante as propriedades físico-químicas e moleculares do encapsulante, como peso molecular, polaridade, solubilidade e a sua estabilidade, assim deve ser escolhido o método aplicado (Fang & Bhandari, 2012).

1.4.1. Secagem por Atomização

A técnica de secagem por atomização (*spray dryer*) consiste numa operação contínua de desidratação, flexível, que produz partículas de boa qualidade e de baixo custo (Estevinho et al., 2013; Fang & Bhandari, 2012). É a técnica de microencapsulação mais utilizada na indústria alimentar e é tipicamente utilizada para a preparação de aditivos alimentares secos e estáveis. O material do núcleo para a encapsulação é homogeneizado com a matriz ativa numa solução, emulsão ou suspensão

que é colocada no alimentador do secador e atomizado com uma roda de fiação ou bocal. O ar quente quando em contacto com a mistura evapora o solvente, que geralmente é água, formando-se as microcápsulas que são recolhidas no fundo do secador (Figura 1.8) (Asbahani et al., 2015; Dash et al., 2011; Estevinho et al., 2013; Fang & Bhandari, 2010; Fang & Bhandari, 2012; Malmo et al., 2011; Nesterenko et al., 2013; Sansone et al., 2014).

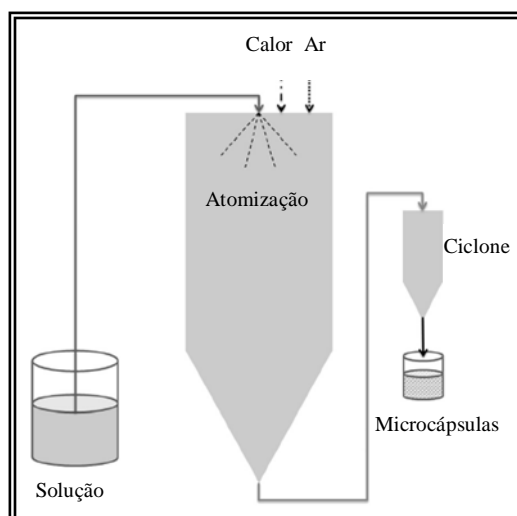


Figura 1.8. Esquema de microencapsulação por secagem por atomização (Estevinho et al., 2013).

Esta tecnologia tem várias vantagens porque é simples, relativamente barata, rápida, forma microcápsulas esféricas (Figura 1.9) e, portanto, bastante utilizada na indústria. O fator importante para a microencapsulação de sucesso por secagem por atomização é uma alta solubilidade do material de revestimento em água ou outro solvente e uma baixa viscosidade com alto teor de sólidos. As desvantagens desta técnica são a perda de uma quantidade significativa de produto devido a aderência das micropartículas para a parede do secador por atomização e a possibilidade de degradação de produtos sensíveis a temperaturas elevadas de secagem (Nesterenko et al., 2013).

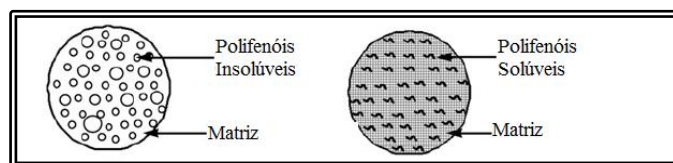


Figura 1.9. Microcápsulas com polifenóis produzidas por secagem por atomização (Fang & Bhandari, 2010).

Esta técnica é bastante usada como processo de microencapsulação na produção de alimentos para proteger os compostos bioativos da luz, variação da temperatura e oxidação. Assim, com a produção de produto final de boa qualidade com baixa atividade de água e peso reduzido resulta numa maior facilidade de armazenamento e transporte (Estevinho et al., 2013; Malmo et al., 2011; Sansone et al., 2014).

O encapsulante deve ter propriedades de formação de película, propriedades emulsionantes, ser biodegradável, resistente, com uma baixa viscosidade para teores de sólidos elevados, apresentar uma baixa higroscopicidade e ter um baixo custo. Contudo existe uma limitação, a de apenas existirem um número limitado de materiais de revestimento, uma vez que o material de revestimento deve ser solúvel em água (Fang & Bhandari, 2010; Silva et al., 2013). Podem ser usados diferentes materiais encapsulantes nesta técnica de secagem por atomização, tais como, polissacáridos, por exemplo amido, maltodextrina, extratos de milho e goma arábica; lípidos como ácido esteárico, mono e diglicéridos; e proteínas como gelatina, caseína, soro de leite, soja e trigo (Asbahani et al., 2015; Estevinho et al., 2013; Fang & Bhandari, 2010; Nazzaro et al., 2012).

1.4.2. Gelificação Iônica

A gelificação iônica é um método simples que utiliza um catião, como por exemplo um polissacárido, como o alginato, a pectina ou misturas e uma solução aniônica como o tripolifosfato de sódio (TPP) ou o sulfato de sódio para a formação microcápsulas reticuladas (Figura 1.10). Existem vários fatores que são determinantes na cinética e formação de gel, bem como no volume e a estabilidade das microcápsulas. esta técnica como a concentração do polissacárido e a proporção do polissacárido/TPP, a força iônica, a resistência ao corte, o tempo de agitação e o pH da solução. O tamanho de partícula e a densidade de carga de superfície podem ser controlados e modulados para melhorar a liberação e eficácia das microcápsulas (Aguilar et al., 2015; Dash et al., 2011; Fang & Bhandari, 2010; Zhang & Zhao, 2015).

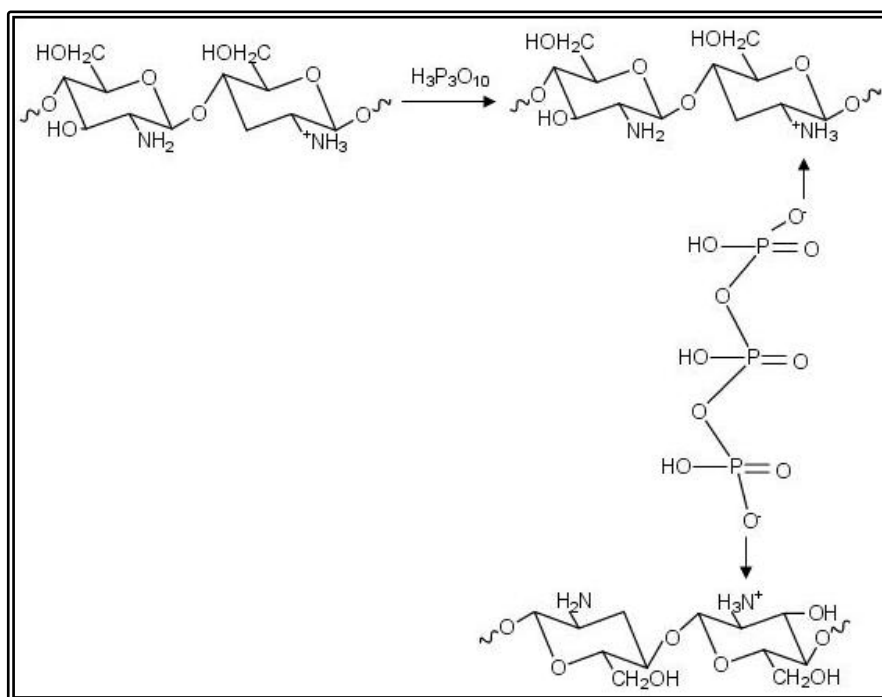


Figura 1.10. Estrutura química do método de gelificação iônica do quitosano com TPP (Shenvi et al., 2014).

Esta técnica de produção de microcápsulas e nanocápsulas de quitosano é uma alternativa a processos químicos de reticulação com glutaraldeído, glicoxal e éter diglicídico de etilenoglicol, embora estes tenham boas propriedades de reticulação. As micro e nanopartículas de quitosano/TPP são utilizadas para encapsular péptidos,

proteínas, antioxidantes, ADN e ARN (Bhumkar & Pokharkar, 2006; Zhang & Zhao, 2015; Tiwary & Rana, 2010; Vimal et al., 2013).

Este é o método mais comum para a formação de microcápsulas de quitosano, porque é uma técnica simples onde os grupos amina do quitosano carregados positivamente são reticulados por ligações inter e intramoleculares de macromoléculas polianiónicas com carga oposta, como referido anteriormente (Antoniou et al., 2015; Solval, et al., 2014; Vakili et al., 2014; Zhang & Zhao, 2015).

O TPP é um polianião muito utilizado porque não é tóxico, é isento de solventes, forma géis com propriedades desejáveis e pode interagir com o quitosano catiónico por forças eletrostáticas assim, as microcápsulas formadas são consideradas ecológicas. Em soluções ácidas (pK_a 6.5), a molécula de quitosano forma iões NH_3^+ que interagem com o TPP aniónico por interação iónica e transforma-se em gel. Esta técnica utiliza, geralmente, uma seringa em que a solução ácida de quitosano (pH 4 a 6) é adicionada gota a gota à solução de TPP (pH 7 a 9) e tem a capacidade de formar espontaneamente microcápsulas (Figura 1.11) de diferentes formas e tamanhos com elevado teor de água, que podem ser aplicadas em géis ou filmes (Aguilar et al., 2015; Antoniou et al., 2015; Broek et al., 2015; Shenvi et al., 2014; Zhang & Zhao, 2015). Tal como refere o estudo de Fang & Bhandari (2010), em que uma solução de quitosano com catequinas de chá quando adicionada à solução de TPP em agitação permitiu a formação de microcápsulas.

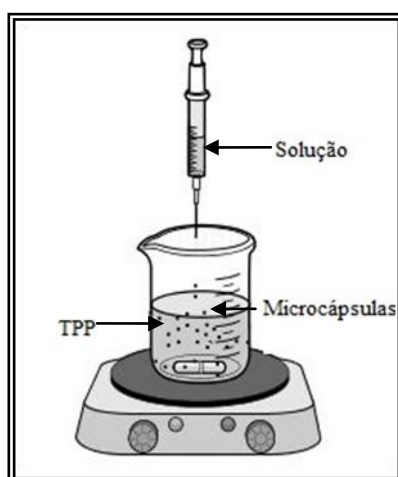


Figura 1.11. Esquema de microencapsulação por gelificação iónica (Adaptado de: Dash et al., 2011).

Assim, devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade nano e microcápsulas de quitosano com TPP de sódio têm sido frequentemente desenvolvidas com compostos bioativos, tais como, óleos essenciais, flavonoides e proteínas. As suas propriedades antimicrobianas podem ser melhoradas em relação ao quitosano devido à sua elevada área superficial e densidade de carga (Antoniou et al., 2015).

1.4.3. Coacervação

A microencapsulação por coacervação é uma técnica que resulta na formação de uma rede polimérica em torno do núcleo ativo que podem ser solidificados através de um agente de reticulação químico ou enzimático com a alteração do pH ou da temperatura (Figura 1.12). A coacervação ocorre através de um método simples ou complexo (Nesterenko et al., 2013).

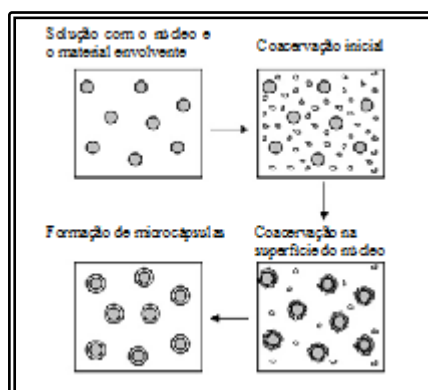


Figura 1.12. Esquema de microencapsulação por coacervação (Nesterenko et al., 2013).

1.4.3.1. Coacervação Simples

A coacervação simples baseia-se na adição de um solvente pobre numa solução coloidal hidrofílica o que resulta na formação de duas fases: uma rica em moléculas de colóides, denominado de coacervato, e outra quase sem coacervato. Por exemplo, quando uma solução de sulfato de sódio, a acetona ou o álcool é gradualmente

adicionado a uma solução de gelatina com agitação formando-se um coacervato (Asbahani et al., 2015).

1.4.3.2. Coacervação Complexa

A coacervação complexa ocorre espontaneamente entre dois polímeros de carga oposta. A neutralização desses dois polímeros induz a separação em duas fases, ou seja, uma fase rica em polímeros insolúveis e uma fase aquosa sem polímeros, como resultado de interações eletrostáticas atrativas entre polímeros de carga oposta (Asbahani et al., 2015).

A formação da parede das microcápsulas com um material hidrofóbico realiza-se através de um arrefecimento controlado abaixo da temperatura de gelificação. Pode ser adicionado um composto de reticulação com a finalidade de se obter microcápsulas rígidas. A gelatina e goma-arábica são os materiais da parede comuns usados para coacervação complexa (Asbahani et al., 2015). A coacervação complexa geralmente não apresenta formas definidas e é considerado um método caro para encapsular ingredientes alimentares (Fang & Bhandari, 2010).

As propriedades físico-químicas do quitosano permitem o desenvolvimento de microcápsulas através deste método uma vez que é insolúvel em meio de pH alcalino, mas quando em contacto com uma solução alcalina, como hidróxido de sódio, precipita e forma coacervados. (Dash et al., 2011).

1.4.4. Liofilização

A liofilização também chamada de refrigeração por atomização ou criosecagem é um processo simples utilizado para encapsular essências solúveis em água e aromas naturais. A liofilização é um processo de secagem em que o solvente e/ou meio de suspensão é congelado e através da redução de pressão e a adição de calor suficiente para permitir a sublimação, ou seja, permitir que a água em estado sólido evapore diretamente para a fase gasosa (Fang & Bhandari, 2010).

O processo de liofilização pode ser dividido em três fases: 1) congelação à temperatura de -20 °C a -40 °C; 2) secagem primária (secagem para sublimação a baixa pressão); e 3) secagem secundária (remoção da água adsorvida que encontra ligada mas

não congelada) (Figura 1.13) (Fang & Bhandari, 2012). Este processo geralmente resulta em formas indefinidas (Figura 1.14) (Fang & Bhandari, 2010).

Para se obter o produto com elevada qualidade, deve ser selecionado o material de parede que geralmente são proteínas, maltodextrinas, dissacáridos e gomas. Como o processo de liofilização pode destabilizar os núcleos devido ao congelamento e desidratação, os materiais da parede devem proteger e estabilizar os compostos ativos sensíveis como os probióticos ou os enzimas (Fang & Bhandari, 2012).

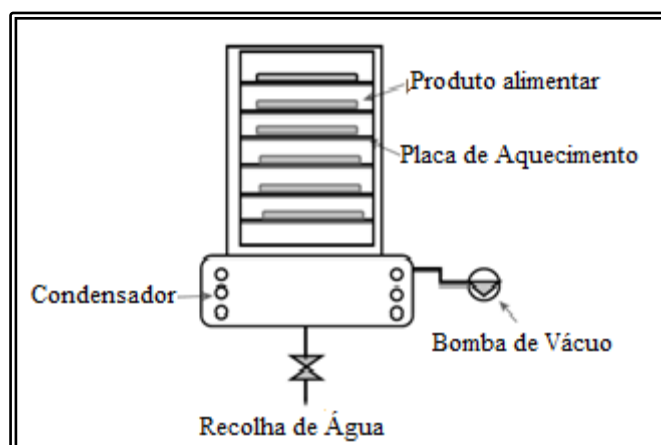


Figura 1.13. Esquema de microencapsulação por liofilização (Fang & Bhandari, 2012).



Figura 1.14. Microcápsulas formadas por liofilização (Fang & Bhandari, 2010).

1.5. Pescado

Os peixes frescos são alimentos essenciais na alimentação porque têm um elevado valor nutricional, são ricos em proteínas com aminoácidos essenciais, macroelementos, como cálcio e fósforo, microelementos como iodo, selênio e zinco, vitaminas e ainda ácidos gordos insaturados. Os peixes são considerados como uma

fonte importante de ácidos gordos n-3, tais como, ácido docosahexaenóico (22:6, n-3, DHA) e ácido eicosapentanóico (20:5, n-3, EPA). Contudo, estes nutrientes proporcionam um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos de degradação e patogênicos de origem alimentar, porque contêm quantidades relativamente elevadas de aminoácidos, bases azotadas voláteis (9 a 18%), ácidos gordos insaturados, teor de humidade (65 a 80%) e pH entre os 6 e os 7 em comparação com outros alimentos como que a carne de frango ou carnes vermelhas (Elsabee & Abdou, 2013; Li et al., 2013b; Nicorescu et al., 2014; Osheba et al., 2013; Sallam, 2007a, b; Vatavali et al., 2013; Vieira et al., 2015).

Os valores do consumo de peixes variam de acordo com as regiões e países, devido aos diferentes níveis de disponibilidade, incluindo a acessibilidade das áreas piscatórias nas águas adjacentes, bem como as tradições alimentares. A média anual por pessoa de consumo de peixe (2007-2009) no mundo pode variar entre países de menos de 1 kg a mais de 100 kg (Figura 1.15). Em relação aos 126 milhões de toneladas totais disponíveis para consumo humano em 2009, a Europa é um dos maiores consumidores de peixe com 22 kg/pessoa, a América do Norte com 24,1 kg/pessoa e Ásia, China, África com 20,7, 15,4, 9,1 kg/pessoa, respetivamente (FAO, 2012; Vieira et al., 2015).

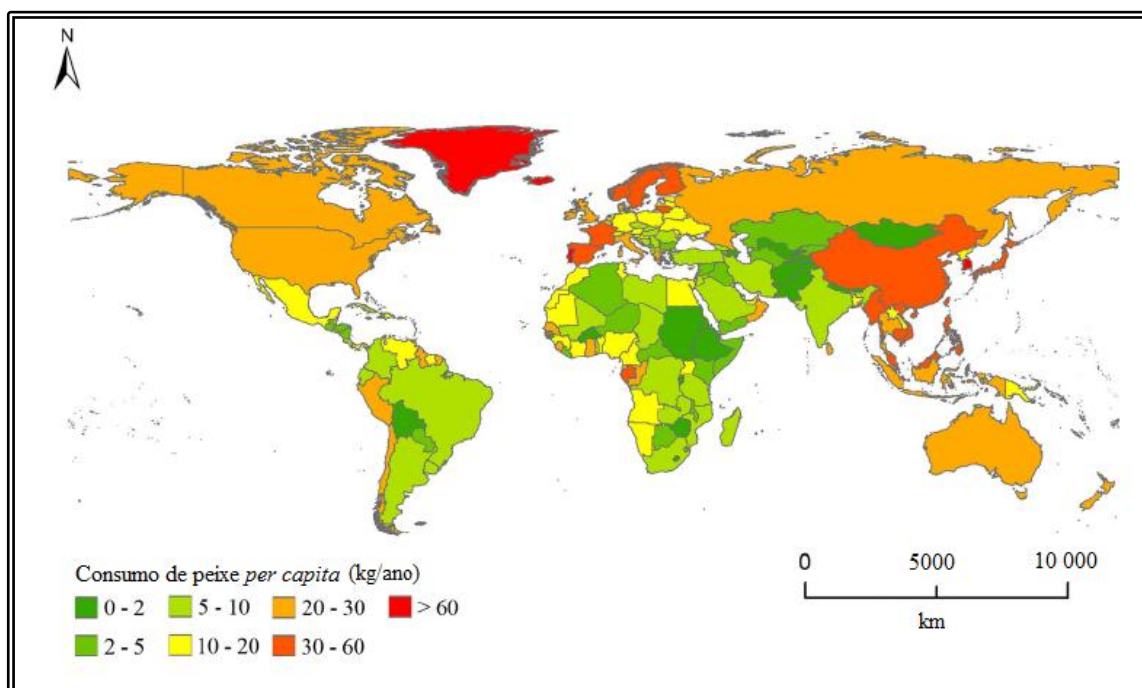


Figura 1.15. Consumo mundial de peixe por pessoa (2007-2009) (FAO, 2012; Vieira et al., 2015).

O peixe fresco é um dos produtos alimentares mais perecíveis. O controlo de qualidade do pescado e prolongamento do seu tempo de vida útil são os principais objetivos da indústria do pescado. Após a captura as alterações bioquímicas e microbianas nos tecidos do pescado dependem de forma significativa dos fatores que controlam a concentração de substratos e metabólitos associados com a contaminação microbiana e as condições após a captura. A degradação do pescado depende ainda de fatores como a natureza da espécie do pescado, tamanho, teor em lípidos, estado de alimentação no momento da captura, natureza da carga microbiana e da temperatura de armazenamento (Aubourg et al., 2007; Souza et al., 2010; Yang et al., 2014).

A manipulação inadequada após a captura induz tanto atividades microbianas como enzimas endógenas e a autólise do músculo, que conduz à degradação de proteínas e a perda de funcionalidade. O pescado contém elevados níveis de ácidos gordos polinsaturados, que são interagem facilmente com radicais livres de oxigénio, resultando na peroxidação lipídica e na rancificação do músculo, tornando o produto inaceitável para consumo humano. As reações enzimáticas e químicas são geralmente responsáveis pela perda inicial de frescura, enquanto a atividade microbiana é responsável pela deterioração subsequente (Aubourg et al., 2007; Concollato et al., 2014; Fernández-Saiz et al., 2013; Li et al., 2013; Souza et al., 2010; Vatavali et al., 2013).

Durante o armazenamento, ocorrem alterações indesejáveis pelo que a qualidade do peixe é rapidamente reduzida com reações químicas e enzimáticas como a desnaturação de proteínas e a oxidação de lípidos que podem levar à perda inicial de frescura o que limita o tempo de vida útil do produto e, portanto, associado ao elevado desperdício poderá levar a problemas económicos (Elsabee & Abdou, 2013; Fernández-Saiz et al., 2013; Li et al., 2013b; Osheba et al., 2013; Sallam, 2007a; Vatavali et al., 2013).

1.5.1. Salmão

O salmão é um peixe que contém alto teor de ácidos gordos polinsaturados, que são suscetíveis à oxidação lipídica que levam à deterioração dos alimentos durante o armazenamento. A oxidação lipídica altera o sabor e o odor do alimento o que, eventualmente reduz o prazo de validade. Este peixe é um produto de alta qualidade

com grande importância nutricional e econômica, que deve manter as suas características sensoriais, químicas, físicas, funcionais e microbiológicas. Grande parte do salmão fresco é comercializado inteiro, eviscerado e em filetes ou postas (Sallam, 2007a, b; Song et al., 2012).

A quantidade de salmão comercializado mundialmente aumentou consideravelmente nas últimas décadas, no geral, a procura de salmão de aquicultura tem vindo a crescer de forma constante, de ano para ano (FAO, 2012).

Além dos métodos tradicionais utilizados para prolongar o tempo de prateleira do peixe deve ser efetuado um arrefecimento rápido em gelo, ou utilizar várias estratégias que envolvem o embalamento em atmosfera modificada, a radiação ionizante e a utilização de ácidos orgânicos ou outros antimicrobianos para inibir a deterioração e microrganismos patogênicos (Fernández-Saiz et al., 2013).

Tendo em conta que a maioria das espécies de peixes são consumidas em fresco e com o aumento dos consumidores a preferirem alimentos minimamente processados, sem o uso de conservantes químicos, existe a necessidade de utilização de métodos e técnicas para melhorar a segurança e preservação do pescado. Uma das possibilidades e não muito explorada é a aplicação de películas edíveis, tendo em conta outros fatores como as características do peixe fresco e a microbiota no músculo do peixe (Elsabee & Abdou, 2013; Sallam, 2007a, b; Vatavali et al., 2013).

A utilização de polissacarídeos para revestir filetes de salmão permitiu preservar a qualidade deste alimento durante o armazenamento de 8 meses a -35 °C (Sathivel et al., 2007). Uma vez que a contaminação na superfície dos alimentos existe principalmente durante certas etapas do processamento dos alimentos, como o corte, as embalagens ativas podem ter uma função mais interessante que a aplicação de antimicrobianos diretamente nos alimentos, como os aditivos e conservantes que têm possíveis limitações devido à ingestão de compostos químicos prejudiciais à saúde e aos sabores desagradáveis produzidos pela sua adição direta nos alimentos (Aguirre et al., 2013).

1.6. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos: 1) o desenvolvimento de filmes de quitosano contendo na sua matriz microcápsulas de extrato de grainha de uva e carvacrol; 2) a caracterização físico-química dos filmes desenvolvidos; e 3) o estudo do efeito dos filmes quando aplicados em salmão refrigerado no prolongamento do seu tempo de vida útil através da avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Desenvolvimento de Filmes de Quitosano com Microcápsulas de Extrato de Grainha de Uva e Carvacrol

Para o desenvolvimento dos FQM de extratos naturais produziram-se, numa primeira fase, as microcápsulas com uma solução de quitosano, extrato de grainha de uva e carvacrol por secagem por atomização, mas devido à elevada solubilidade das microcápsulas nos filmes estudou-se a produção de microcápsulas através da técnica de gota a gota por gelificação iónica, que foram incorporadas no filme de forma eficaz, produzindo filmes com boas características físico-químicas.

De seguida, aplicaram-se estes filmes em amostras de salmão e estudou-se o seu efeito em termos físico-químicos e microbiológicos ao longo do armazenamento (Figura 2.1).

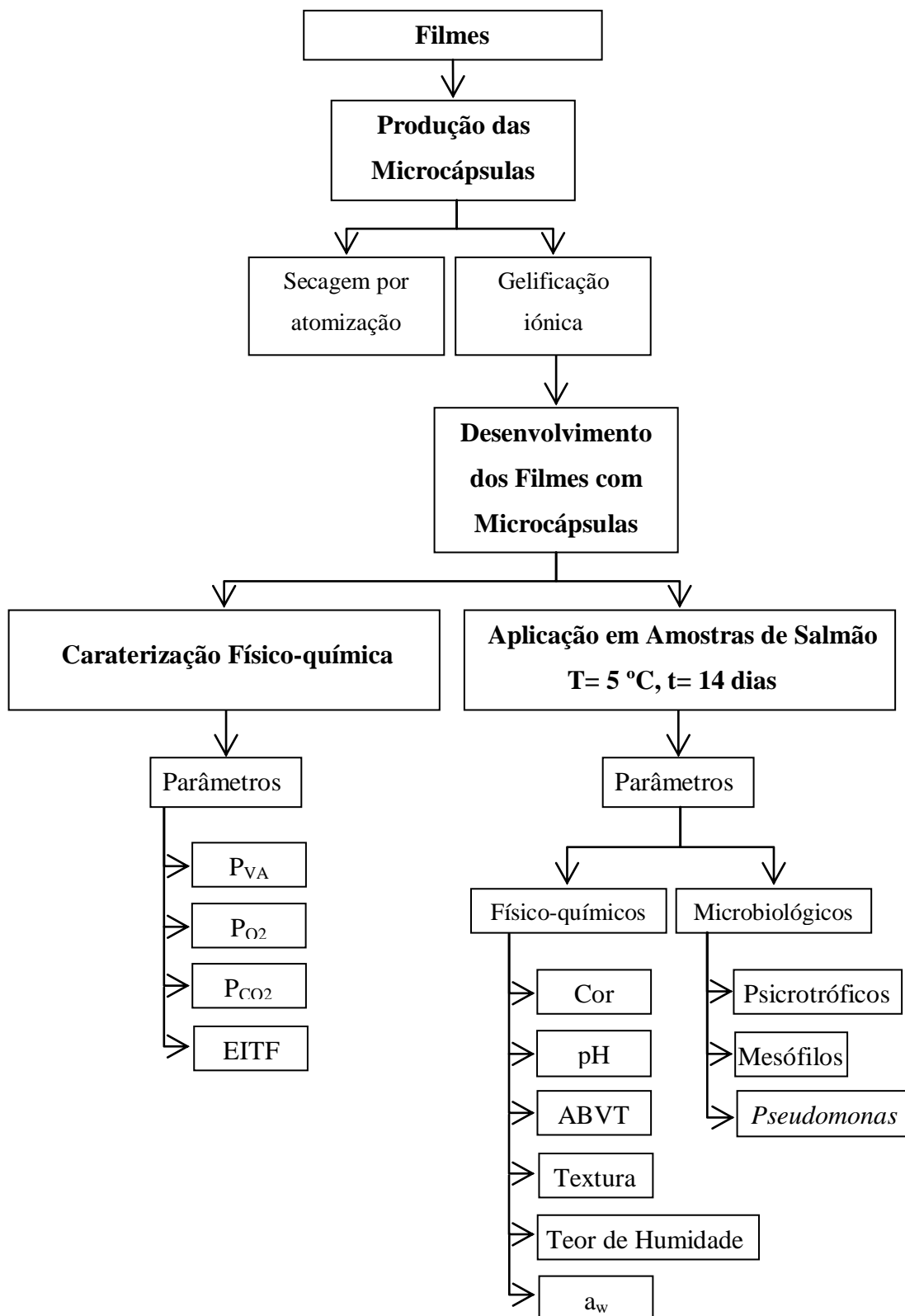


Figura 2.1. Esquematização do trabalho experimental.

2.1.1. Preparação da Solução Matriz de Quitosano

Preparou-se uma solução de quitosano a 1,25% (m/v) baseada na metodologia de Rubilar, *et al.* (2013a). Para a produção da solução matriz de quitosano pesaram-se 6,25 g de quitosano (Sigma-Aldrich) e adicionaram-se 500 mL de ácido acético (Panreac Química SA) a 1% (v/v) e homogeneizou-se a solução com um Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik), durante 20 min a 9500 rpm. A solução de quitosano foi armazenada durante 24 h a 20 °C, para permitir a total dissolução do quitosano no ácido acético. Posteriormente, a solução foi filtrada com o auxílio de uma gaze, para a remoção as partículas não dissolvidas.

2.1.2. Preparação dos Filmes de Quitosano (FQ)

Os FQ foram produzidos com uma solução matriz de quitosano descrita em 2.1.1., pesaram-se 498 g de matriz de quitosano aos quais se adicionou 2 g de glicerol, aqueceu-se a mistura a 40 °C e agitou-se durante 30 minutos. A solução de quitosano a 1,25% (m/v) foi desgaseificada durante 30 min no banho de ultrassons (Bandelin Sonorex Super RX102H). Posteriormente, colocaram-se 20 mL da solução em placas de Petri (Normax) de diâmetro 8,5 cm à temperatura de 20 °C.

Após a secagem dos FQ foi recortada a área de cada filme (4,5 x 4,5 cm) (Figura 2.2) e armazenados num exsiccador (NaBr, 57% de humidade relativa) à temperatura ambiente.

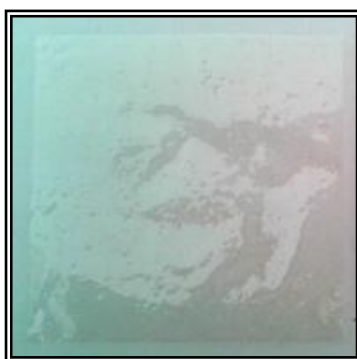


Figura 2.2. Filme de quitosano.

2.1.3. Preparação da Solução de Quitosano com Extrato de Grainha de Uva e Carvacrol

Baseado num estudo de Rubilar et al. (2013a). Utilizou-se a solução de quitosano a 1,25% (m/v) descrita na secção 2.1.1., de seguida, pesaram-se 473,3 g da solução matriz e adicionou-se 1,6 g de glicerol aqueceu-se a mistura a 40 °C e agitou-se durante 30 minutos. Adicionou-se 17,4 mL de Tween 80 (VWR) com agitação e aquecimento a 40 °C, durante 60 minutos. Depois, adicionaram-se 8,55 g de extrato de grainha de uva (Groupe Grap SUD) e 0,775 mL de carvacrol 1 M (Sigma-Aldrich). Homogeneizou-se a solução utilizando o Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik) durante 30 minutos a 9500 rpm e desgaseificou-se, durante 30 minutos, com um banho de ultrassons (Bandelin Sonorex Super RX102H).

2.1.4. Produção das Microcápsulas de Extrato de Grainha de Uva e Carvacrol

2.1.4.1. Secagem por Atomização

Numa primeira fase, desenvolveram-se microcápsulas de quitosano com extrato de grainha de uva e carvacrol com a solução produzida na secção 2.1.3. utilizando a técnica de secagem por atomização (Niro Atomizer), com uma pressão de 6 bar, temperatura de entrada de 130-140 °C e temperatura de saída 85-90 °C (Li et al., 2013a), contudo apesar da produção de microcápsulas esféricas a sua incorporação no filme não foi efetuada com sucesso, ou seja as microcápsulas não apresentaram as características desejadas.

2.1.4.2. Gelificação Iónica

As microcápsulas foram produzidas por gelificação iónica de acordo com o método adaptado de Wu & Yao (2013), através de uma seringa (BD Micro-Fine) de 0,3 mm de diâmetro interno. Foram colocados 6,3 mL da solução desenvolvida na secção 2.1.3. para 100 mL de uma solução a 0,8% (m/v) de tripolifostato de sódio (Sigma-Aldrich) com uma agitação de 700 rpm durante 30 minutos. Após o período de ligações cruzadas (*crosslinking*) as microcápsulas foram removidas da solução de

tripolifosfato de sódio e foram lavadas duas vezes em água destilada, para a remoção do excesso de TPP. Este método permitiu a incorporação eficaz das microcápsulas nos FQ.

2.1.5. Desenvolvimento dos Filmes de Quitosano com Microcápsulas (FQM)

Para a produção dos FQM com extrato de grainha de uva e carvacrol, após 24 h de secagem dos filmes de quitosano, como descrito na secção 2.1.2., foram colocadas as microcápsulas. Colocou-se um volume de 6,3 mL de microcápsulas em cada filme (aprox. 1400 microcápsulas) para permitir o preenchimento de 4,5 x 4,5 cm do filme.

Após a secagem dos FQ e dos FQM foi recortada a área de cada filme e armazenados num exsiccador (NaBr, 57% de humidade relativa) à temperatura ambiente (Figura 2.3).

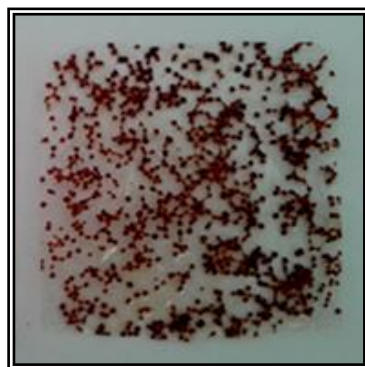


Figura 2.3. Filmes de quitosano com microcápsulas de extrato de grainha de uva e carvacrol.

2.2. Determinação dos Parâmetros Físico-químicos dos Filmes de Quitosano e dos Filmes de Quitosano com Microcápsulas

2.2.1. Permeabilidade ao Vapor de Água (P_{VA})

A P_{VA} foi determinada pelo método gravimétrico, com base na norma ASTM E96-92 (ASTM E96-92, 1990) e na metodologia descrita por Rubilar et al. (2013a). O filme foi colocado na parte superior de uma célula de permeação com água destilada com 100% de HR, 2337 Pa de pressão de vapor à temperatura de 20 °C, e de seguida, colocado num exsiccador com sílica, à temperatura de 20 °C, com 0% de HR e 0 Pa de pressão de vapor de água. As células foram pesadas a cada 2 horas, durante 10 horas. A constante pressão de água em estado estacionário foi obtida mantendo constante a circulação de ar no exterior da célula teste realizado utilizando um ventilador dentro do exsiccador.

A P_{VA} foi estimada utilizando a análise de regressão a partir da Eq. (1):

$$P_{VA} \times t = \frac{mx}{A\Delta P} \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo que, x é a espessura média do filme ($x_{FQ} = 0,0412 \pm 0,0053$ mm e $x_{FQM} = 0,4136 \pm 0,0415$ mm), A é a área de permeação ($0,0052$ m²), P é a diferença de pressão parcial de vapor da atmosfera (2337 Pa a 20 °C), e m/t foi calculado por regressão linear a partir do aumento de massa num período constante de tempo. Foram obtidas três réplicas para cada amostra de filme.

2.2.2. Permeabilidade ao Oxigénio e ao Dióxido de Carbono (P_{O_2} e P_{CO_2})

As P_{O_2} e a P_{CO_2} foram determinadas com base no método da norma ASTM-D-3985-02 (2002) e pelo método descrito por Rubilar et al. (2013a). As concentrações de O_2 e CO_2 foram determinadas por cromatografia gasosa (Chrompack 9001, Middleburg, Países Baixos) com uma coluna Porapak Q 80/100, malha de 2 m 1/8'' 2 mm SS para separar o CO_2 e com uma coluna molecular 5A 80/100, malha de 1 m 1/8'' 2 mm para separar o O_2 , utilizou-se um detetor de condutividade térmica, à temperatura de 110 °C, com 23 mL de hélio como gás condutor. A mistura de 10% de CO_2 , 20% de O_2 e 70%

de N₂ foi utilizada como padrão de calibração. Para cada amostra foram efetuadas duas medições.

2.2.3. Espectro de Infravermelhos com Transformação de Fourier (EITF)

Os EITF foram determinados pelo método descrito por Rubilar et al. (2013a), com um espectrômetro de infravermelhos com transformação de Fourier (espectrômetro Perkin Elmer 16 PC, Boston, EUA), utilizando o modo de reflexão total atenuante. Cada espectro resulta de 16 leituras com resolução de 4 cm⁻¹ para a faixa espectral de 650 a 4000 cm⁻¹. Todas as leituras foram realizadas à temperatura ambiente de 20 °C. O EITF foi utilizado para investigar as interações entre quitosano e polifenóis do extrato de grainha de uva e carvacrol.

No caso de sobreposição de picos, a separação foi realizada para calcular a contribuição dos picos individuais usando o *software* Peakfit versão 4.12 (SYSTAT Software Inc., Richmond, CA, EUA). A separação dos picos foi utilizada para estimar a área do pico relacionando com a espécie de vibração. Os espectros dos filmes foram separados com um filtro de 15%. A linha de base de cada espectro foi corrigida e a absorvância foi normalizada entre 0 e 1.

2.3. Efeito dos Filmes Desenvolvidos no Tempo de Prateleira de Salmão Refrigerado

2.3.1. Preparação das Amostras

O salmão (*salmo salar*) foi adquirido no mercado local de Faro, Portugal. As amostras foram cortadas com 4 x 4 x 1 cm, para os diferentes dias de amostragem, em triplicado. As amostras de salmão foram divididas em 3 grupos. O grupo 1 - amostras controlo, grupo 2 - FQ e, grupo 3 - FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol. Os filmes foram colocados na superfície superior do salmão (Figura 2.4).

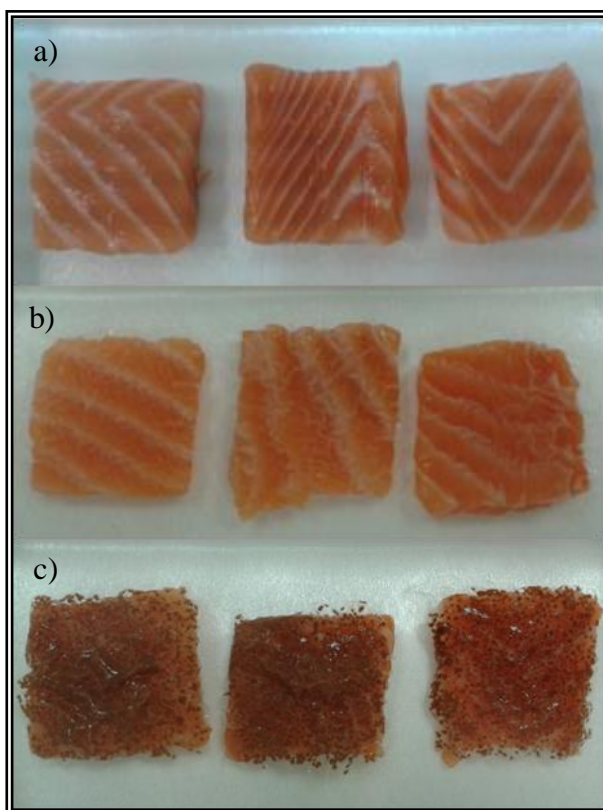


Figura 2.4. Grupos de diferentes amostras de salmão. a) Controlo; b) FQ; c) FQM.

As amostras de salmão foram colocadas em cuvetes de poliestireno com as dimensões 22,5x13,8x3,8 cm e envolvidas em película de polietileno. Foram preparados dois conjuntos de amostras, um para as análises físico-químicas e outro para as análises microbiológicas.

O estudo teve a duração de 14 dias, em que foram realizadas 7 amostragens, nos dias 0, 1, 2, 4, 7, 9 e 14, as amostras foram armazenadas numa câmara (Fitoclima ClimaPlus 400) com uma temperatura de armazenamento de 5 °C e 65% de humidade relativa.

2.3.3. Parâmetros Físico-Químicos

2.3.3.1. Cor

A cor foi medida utilizando um colorímetro com geometria d/8 (Dr. Lange, Spectro-colour, Germany), na escala de Hunter Lab, com o iluminante D65 e um ângulo de observação de 10°. Foram medidos os parâmetros *L*, *a* e *b*. O parâmetro *L*, luminosidade, mede de preto (0) a branco (100), *a* mede os tons de verde (-) a vermelho (+) e *b* mede tons de azul (-) a amarelo (+). Efetuaram-se leituras em triplicado para cada amostra de salmão.

2.3.3.2. Teor de Azoto Básico Volátil Total (ABVT)

O ABVT foi determinado baseado na norma NP 2930 (2009). Pesaram-se 10 g de amostra de salmão, adicionou-se à amostra 20 mL da solução a 5% (m/v) de ácido tricloroacético (Panreac Química, SA) e extraiu-se utilizando um Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik) durante 2 min. Filtrou-se o extrato com um papel de filtro nº 4 (VWR) para um erlenmeyer. De seguida, colocou-se 1 mL de ácido bórico com indicador e 2 gotas de indicador na parte central da célula de Conway. Transferiu-se 1 mL do filtrado e 0,5 mL de água destilada para a parte exterior da célula de Conway. Cobriu-se quase completamente com tampa vaselinada. Adicionou-se 1 mL da solução saturada de carbonato de potássio (Panreac Química, SA) e fechou-se rapidamente. Misturou-se com cuidado para misturar as soluções. E, colocou-se na estufa, durante 2 h a 35 °C. Por fim, titularam-se as bases voláteis libertadas no ácido bórico com a solução de ácido clorídrico a 0,02 N (Merck) até a coloração ficar rosa. Efetuou-se um ensaio de controlo de difusão, paralelamente à determinação, seguindo-se a técnica anterior substituindo-se o volume da amostra de salmão por igual volume da solução de sulfato de amónio (Panreac Química, SA) a 0,1% (m/v). Efetuou-se também um ensaio em branco, seguindo a técnica descrita anteriormente substituindo o volume da amostra de

salmão por igual volume de água destilada. Realizou-se uma análise em cada amostra de salmão.

Calculou-se o valor de ABVT utilizando a equação 2.

$$ABVT = \frac{21 \times (V_2 - V_0)}{(V_1 - V_0) \times V_3 \times m} \left(100 + \frac{m}{h_1} \times 100 \right) \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que V designa o volume de solução de ácido clorídrico gasto no ensaio (cm^3) nas condições definidas pelo respetivo índice: 0 refere-se ao branco, 1 à solução no controlo de difusão, 2 à amostra de salmão e 3 à amostra filtrada utilizada na determinação, m a massa da amostra de salmão em análise (g) e h_1 a humidade da amostra em análise (g/100 g).

2.3.3.3. Textura

A textura das amostras foi medida utilizando um texturómetro (Brookfield, LFRA Texture Analyzer 1500) com uma sonda em aço de 4 mm de diâmetro (TA34). Em termos de dureza foi medida a carga máxima aplicada, e através da análise do perfil de textura foram medidos os parâmetros coesividade, gomosidade, mastigabilidade, deformação, adesividade e elasticidade. Efetuaram-se três medições por amostra de salmão.

2.3.3.4. pH

A determinação do pH foi efetuada utilizando um potenciómetro (Crison, micro pH 2001) equipado com um elétrodo de pH (crison, Instruments, S.A.). Foram efetuadas seis medições para cada amostra.

2.3.3.5. Teor de Humidade

O teor de humidade foi determinado utilizando uma balança de infravermelhos (Mettler LP16 e PM100). Colocaram-se 4 g de amostra de salmão nesta balança à temperatura 160 °C até se atingir a estabilidade no valor de % de humidade. Efetuou-se uma medição por cada amostra.

2.3.3.6. Atividade da Água (a_w)

A determinação da atividade da água (a_w) foi efetuada com um medidor de a_w (Hygrolab) com um banho termoestatizado a 25 °C (Grant GD120). Realizou-se uma medição em cada amostra.

2.3.4. Parâmetros Microbiológicos

Para as análises microbiológicas misturaram-se 10 g de amostra de salmão com 90 mL de água peptonada (Merck). Homogeneizou-se durante 1 min em sacos de polietileno estéreis num homogeneizador (Stomacher). Após a homogeneização efetuaram-se diluições sucessivas com tubos de 9 mL de água peptonada (Merck) posteriormente, procedeu-se à inoculação nos meios de cultura adequados.

2.3.4.1. Contagem de Microrganismos Mesófilos

A contagem de mesófilos foi realizada com base na norma NP 4405 (2002). Inoculou-se por espalhamento 0,1 mL das diluições apropriadas para o centro das placas de Petri (Normax) com meio de cultura *Plate Count Agar* (Liofilchem, s.r.l. Bacteriology products), em duplicado. De seguida, utilizando um espalhador, homogeneizou-se o inóculo por toda a placa. Após a secagem das placas, estas foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas.

2.3.4.2. Contagem de Microrganismos Psicotróficos

A contagem de psicotróficos foi realizada baseada na norma ISO 17410 (2001). Inoculou-se por espalhamento 0,1 mL das diluições apropriadas para o centro das placas de Petri (Normax) com meio de cultura *Plate Count Agar* (Liofilchem, s.r.l. Bacteriology products), em duplicado. De seguida, utilizando um espalhador, homogeneizou-se o inóculo por toda a placa. Após a secagem das placas, estas foram incubadas a 6,5 °C, durante 10 dias.

2.3.4.3. Contagem de *Pseudomonas spp.*

Para a contagem de *Pseudomonas spp.*, inocularam-se por espalhamento 0,1 mL das diluições apropriadas para o centro das placas de Petri (Normax) com meio de cultura Cetrimine Agar (Scharlau), em duplicado. De seguida, utilizando um espalhador, homogeneizou-se o inóculo por toda a placa. Após a secagem das placas, estas foram incubadas a 44 °C, durante 48 horas.

2.3.5. Análise Estatística

Os dados experimentais foram tratados com o software IBM SPSS – Statistical Product and Service Solutions versão 22. Foi efetuada uma análise de variância (ANOVA) para detetar diferenças significativas entre as amostras. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Foi utilizado também o método da diferença mínima significativa (LSD) para detetar qual ou quais o(s) par/pares de amostras que apresentavam diferenças significativas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos Filmes de Quitosano e dos Filmes de Quitosano com Microcápsulas

Na caracterização dos FQ e dos FQM determinaram-se as permeabilidades ao vapor de água, ao oxigênio e ao dióxido de carbono, cujos resultados se encontram na Tabela 3.1., e analisou-se o espectro de infravermelhos com transformação de Fourier.

Tabela 3.1. Propriedades físico-químicas dos filmes desenvolvidos.

Filme	FQ	FQM
P_{VA} (gPa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻¹)	$(4,43 \pm 0,41) \times 10^{-11}$	$(4,39 \pm 0,41) \times 10^{-10}$
P_{O_2} (gPa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻¹)	$(9,80 \pm 1,01) \times 10^{-15}$	$(1,32 \pm 0,31) \times 10^{-12}$
P_{CO_2} (gPa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻¹)	$(4,98 \pm 2,37) \times 10^{-15}$	$(1,34 \pm 3,22) \times 10^{-12}$

3.1.1. Permeabilidade ao Vapor de Água (P_{VA})

Na permeabilidade ao vapor de água (P_{VA}) os resultados obtidos para os FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol foram de $(4,39 \pm 0,41) \times 10^{-10}$ gPa⁻¹s⁻¹m⁻¹ e para os FQ foram de $(4,43 \pm 0,41) \times 10^{-11}$ gPa⁻¹s⁻¹m⁻¹ (Tabela 3.1). A P_{VA} pretendida para um filme ativo depende do alimento a ser estudado que, geralmente, deve ser baixa para evitar ou diminuir a transferência de humidade entre a atmosfera envolvente e o alimento (Bourdon et al., 2011; Li et al., 2014). A transferência de vapor de água ocorre geralmente através da parte hidrofílica do filme e depende da razão entre os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos constituintes do filme (Bourdon et al., 2011; Jouki et al., 2014; Wu et al., 2014). Existem vários fatores que podem afetar a P_{VA} dos filmes, como por exemplo, a espessura do filme e a cristalinidade (Jouki et al., 2014). Assim, a transferência de vapor de água através de um polímero semicristalino ocorre principalmente na fase amorfa, porque a fase cristalina exerce um impedimento muito maior à passagem das moléculas de água. Por isso, à medida que a percentagem de cristalinidade de um polímero aumenta, a permeabilidade aos gases diminui (Bourdon et al., 2011; Rubilar et al., 2013a). Quanto maior a concentração de extrato de grainha de

uva que é hidrofílico, mais facilmente as moléculas de água se ligam por pontes de hidrogénio, como são moléculas complexas existe a presença de muitos grupos hidroxilo que, por sua vez, são bastante permeáveis e permitem facilmente a absorção de moléculas de água ao filme (Comyn, 2012; Rubilar et al., 2013a). Além disso, a presença de extrato de grainha de uva pode originar filmes menos cristalinos, levando também ao aumento da P_{VA} (Rubilar et al., 2013a), tal como se observou nos resultados deste estudo que a P_{VA} do FQM é maior em relação ao FQ. No entanto, o óleo de orégão contém na sua constituição misturas hidrofóbicas e hidrocarbonetos monoterpenos, que contribuem para aumentar a hidrofobicidade do filme, ou seja, diminuir a P_{VA} (Wu et al., 2014). O estudo de Rubilar et al., (2013a) demonstrou também que concentrações mais baixas de extrato de grainha de uva e mais elevadas de carvacrol levou à redução da P_{VA} , devido à natureza hidrofóbica do carvacrol, o que afeta o equilíbrio hidrofílico e hidrofóbico do filme.

No estudo de Rubilar et al., (2013a) os FQ incorporados com as mesmas concentrações de extrato de grainha de uva e carvacrol que as microcápsulas do FQM do presente estudo, permitiram observar que os filmes foram mais permeáveis, com P_{VA} de $(2,51 \pm 0,003) \times 10^{-7} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ para os FQ incorporados com os extratos naturais e para os FQ a 1,25% os valores foram de $(2,17 \pm 0,09) \times 10^{-7} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$, que os filmes os FQM e FQ desenvolvidos.

Os filmes estudados foram mais permeáveis que os FQ incorporados com 1,2% de óleo de orégão e nos FQ a 2%, com $(8,796 \pm 0,208) \times 10^{-12} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ e $(4,745 \pm 0,008) \times 10^{-12} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$, respetivamente (Hosseini et al., 2015a).

A P_{VA} do FQ com diferentes concentrações de extrato de orégão diminuíram de $11,66 \times 10^{-11}$ para $9,58 \times 10^{-11} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ com o aumento da concentração do óleo de orégão de 0 para 4%, respetivamente. Os FQ a 1% apresentaram um valor de $(11,66 \pm 0,03) \times 10^{-11} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$, o que permitiu concluir que os filmes desenvolvidos (FQM e FQ) apresentaram uma permeabilidade mais elevada (Wu et al., 2014).

No entanto, no estudo de Bourdon et al., (2011) produziram filmes mais permeáveis que os FQM e FQ desenvolvidos. Produziram FQ com extrato de grainha de uva e verificaram que a P_{VA} não foi influenciada com a incorporação do extrato de grainha de uva em relação aos FQ a 3% $(2,49 \pm 0,23) \times 10^{-9}$ e $(2,63 \pm 0,35) \times 10^{-9} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$, repetivamente ($p > 0,05$) (Li et al., 2014). Outro estudo demonstra que os FQ a 2%

apresentaram uma P_{VA} de $(1,64 \pm 0,19) \times 10^{-10} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$, pelo que são mais permeáveis que os filmes produzidos.

Noutro estudo realizado com nanocápsulas de quitosano a 2% formadas por gelificação iónica com TPP a 0,4%, incorporadas num filme com gelatina de peixe a 4% verificaram resultados semelhantes comparativamente com este estudo em que filme controlo apresentou uma P_{VA} de $(1,64 \pm 0,10) \times 10^{-11} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ e o filme com microcápsulas uma permeabilidade de $(1,16 \pm 0,20) \times 10^{-11} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (Hosseini et al., 2015b).

3.1.2. Permeabilidade ao Oxigénio e ao Dióxido de Carbono (P_{O_2} e P_{CO_2})

A permeabilidade ao oxigénio (P_{O_2}) do FQM foi de $(1,32 \pm 0,31) \times 10^{-12} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ e de $(9,80 \pm 1,01) \times 10^{-15} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ para o filme controlo de quitosano (Tabela 3.1). A P_{O_2} dos materiais de embalagem de alimentos é de grande importância para a conservação de alimentos, uma vez que o oxigénio é o fator que pode originar oxidação e que inicia várias reações de deterioração. Por natureza, os filmes de polissacarídeos oferecem uma boa barreira ao oxigénio, uma vez que a sua rede de hidrogénios é organizada (Bourdon et al., 2011; Jouki, et al., 2014; Rubilar et al., 2013a). A P_{O_2} depende da cristalinidade dos filmes, diminuindo a transmissão de oxigénio com o aumento da cristalinidade (Rubilar et al., 2013a). Segundo Rubilar et al., (2013a) a P_{O_2} dos filmes aumenta com a incorporação de elevada concentração de extrato de grainha de uva.

A P_{O_2} foi estudada em FQ como as mesmas concentrações de extratos naturais das microcápsulas deste estudo, contudo estes foram incorporados no filme. Assim, verificaram que os filmes com o extrato de grainha de uva e carvacrol apresentaram uma P_{O_2} de $(6,20 \pm 0,67) \times 10^{-13} \text{ g Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-1}$, sendo menos permeável que o FQM. Os filmes controlo de quitosano apresentaram uma P_{O_2} de $(5,33 \pm 0,65) \times 10^{-13} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ pelo que foram mais permeáveis em comparação com o FQ do presente estudo (Rubilar et al., 2013a).

O estudo realizado por Bourbon et al. (2011), desenvolveram FQ a 2% mais permeáveis com uma P_{O_2} de $(5,17 \pm 0,41) \times 10^{-14} \text{ g Pa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$.

Em relação à permeabilidade ao dióxido de carbono (P_{CO_2}) no FQM verificou-se que a permeabilidade foi de $(1,34 \pm 3,22) \times 10^{-12} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$, enquanto o FQ apresentou uma permeabilidade de $(4,98 \pm 2,37) \times 10^{-15} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ (Tabela 3.1). A permeabilidade ao gás está relacionada com a cristalinidade do filme e o seu aumento leva à diminuição da P_{CO_2} (Bourdon et al., 2011; Rubilar et al., 2013a).

No estudo de Rubilar et al., (2013a) desenvolveram FQ incorporados com extrato de grainha de uva e carvacrol que apresentaram uma P_{CO_2} de $(3,73 \pm 0,40) \times 10^{-13} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ que foi menos permeável que o FQM. Os FQ a 1,25% apresentaram uma P_{CO_2} de $(4,23 \pm 0,65) \times 10^{-13} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$, logo mais permeáveis que os filmes desenvolvidos. Outro FQ a 2% também foi mais permeável com uma P_{CO_2} de $(5,86 \pm 1,09) \times 10^{-13} \text{ gPa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$ (Bourdon et al., 2011).

Geralmente os valores obtidos para a P_{CO_2} são mais elevados quando comparados com os valores da P_{O_2} , devido à solubilidade destes gases na água. O dióxido de carbono é mais solúvel do que o oxigénio, conduzindo à difusão mais rápida do gás, aumentando assim a sua permeabilidade, tal como se observou no FQ do presente estudo (Bourdon et al., 2011).

3.1.3. Espectro de Infravermelhos com Transformação de Fourier (EITF)

O espectro de infravermelhos com transformação de Fourier (EITF) do FQ e do FQM encontra-se na Figura 3.1.

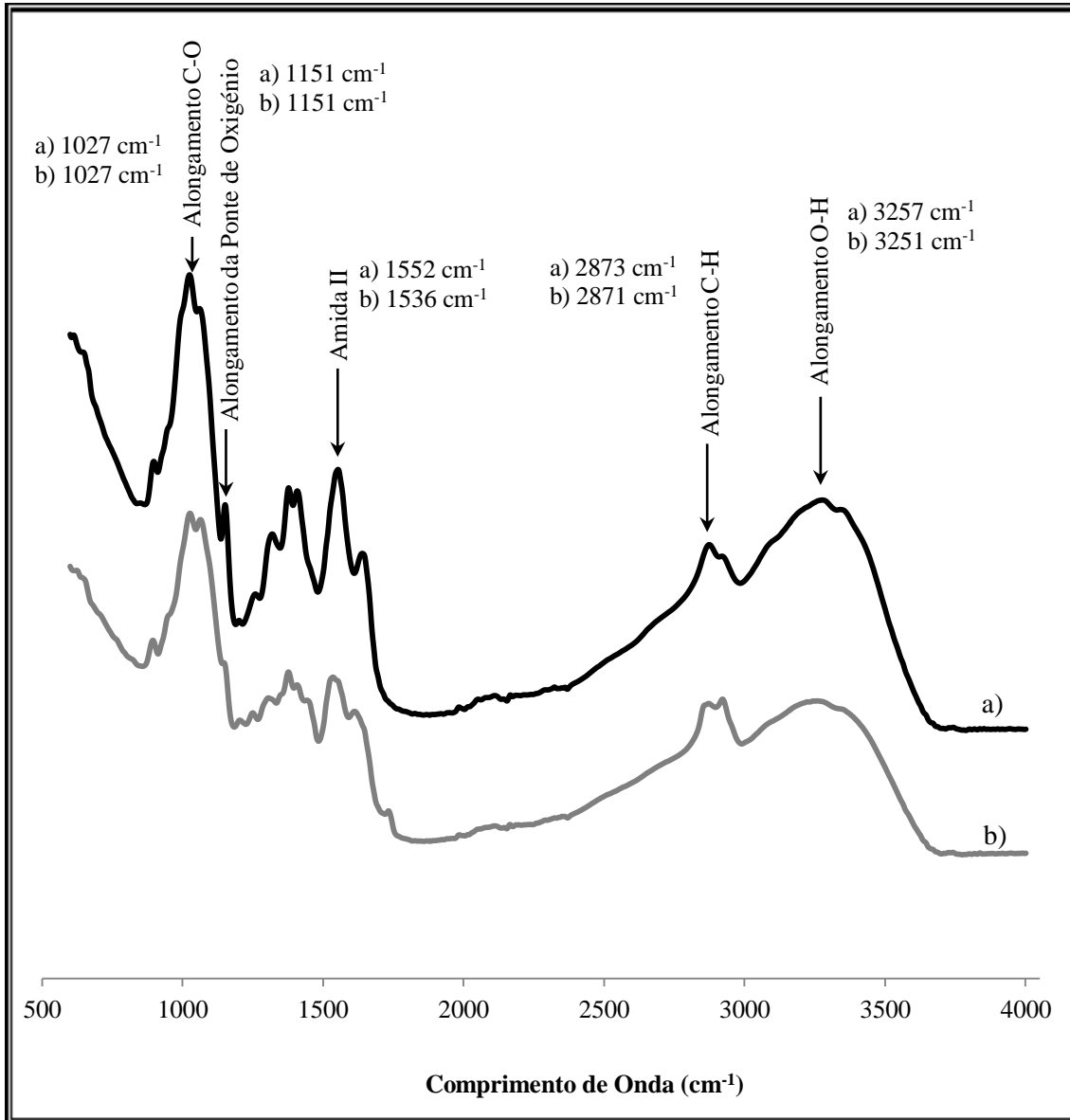


Figura 3.1. Espectro de Infravermelhos com Transformação de Fourier. a) FQ; b) FQM de extrato de gralha de uva e carvacrol.

O EITF foi utilizado para avaliar possíveis interações químicas entre o FQ e os compostos bioativos introduzidos nas microcápsulas do filme (Bourdon et al., 2011). Os picos obtidos no EITF apresentaram o mesmo comportamento no FQ e no FQM de extratos naturais, mas verificou-se um achatamento do espectro do FQM devido à

existência das microcápsulas. Como o filme é bastante heterogénio as amplitudes dos picos correspondem a uma média de valores, assim as amplitudes dos picos diferem ligeiramente entre os dois filmes estudados (FQ e FQM), tal como descrito por vários autores que dependendo da quantidade de extratos adicionados assim são as amplitudes do espetro (Hosseini et al., 2015a; Rubilar et al., 2013a). Analisando os espetros observou-se no comprimento de onda de 1027 cm^{-1} um alongamento C-O para o FQ e FQM, este pico corresponde ao grupo hidroxilo (OH) que representa estruturas sacarinas (Arancibia, et al., 2015; Bonilla, et al., 2014; Silva-Weiss et al., 2013), nomeadamente o glicerol utilizado como plastificante (Hosseini et al., 2015a). Verificou-se um alongamento da ponte de oxigénio em 1151 cm^{-1} para ambos os filmes (FQ e FQM), que representa também estruturas sacarinas (Arancibia, et al., 2015; Bonilla, et al., 2014; Hosseini et al., 2015a) e indica que o comprimento da cadeia glicosídica foi ligeiramente modificado com a adição das microcápsulas no filme (Silva-Weiss et al., 2013). Com a incorporação dos extratos alguns dos picos foram transferidos para comprimentos de onda mais baixos, tal como verificado no presente estudo (Figura 3.1), por exemplo, nos picos 1552 cm^{-1} e 1536 cm^{-1} para os FQ e FQM, respetivamente, que correspondem ao grupo Amida II (NH) (Bonilla, et al., 2014; Hosseini et al., 2015a; Rubilar et al., 2013a). Constatou-se ainda, a presença de um novo pico em 1712 cm^{-1} apenas no FQM que Silva-Weiss et al., (2013) atribui ao flavonóide quercetina presente nas microcápsulas do filme, mas também à ligação éster entre o quitosano e os extratos de polifenóis. Refere ainda, que este pico poderá ser mais acentuado de acordo com a concentração do extrato (Silva-Weiss et al., 2013). Observou-se também um alongamento do grupo C-H em 2873 cm^{-1} e 2871 cm^{-1} sugerindo que ligações de hidrogénio podem ocorrer entre o grupos de carbono do quitosano e os grupos hidroxilos dos polifenóis presentes nos extratos (Silva-Weiss et al., 2013). Por fim, verificou-se um alongamento do grupo hidroxilo (O-H) no comprimento de onda para o FQ e o FQM entre os 3257 cm^{-1} e os 3251 cm^{-1} , respetivamente, que representam ligações intermoleculares de moléculas de quitosano, nomeadamente ligações poliméricas de hidrogénio (Arancibia, et al., 2015; Hosseini et al., 2015a; Silva-Weiss et al., 2013; Vodnar, 2012) e a amplitude do pico diminuiu no FQM com extrato de grainha de uva e carvacrol, devido aos polifenóis presentes que

têm ligações O-H para formar a ligação de hidrogénio intramolecular e intermolecular (Li et al., 2014).

Os espectros dos filmes foram muito semelhantes aos espectros descritos no estudo de Rubilar et al. (2013a) como observado na Figura 3.2, cujo filme controlo é idêntico ao FQ e o filme 1 incorporado com o extrato de grainha de uva e carvacrol tem as mesmas quantidades de extratos que as existentes nas microcápsulas do FQM. Assim, os picos obtidos foram nos mesmos comprimentos de onda nomeadamente a presença do grupo hidroxilo nos filmes, em 1027 e 1151 cm^{-1} . Verificou a presença de amida II em 1560 cm^{-1} enquanto que no presente estudo foi em 1552 cm^{-1} e 1536 cm^{-1} para os FQ e FQM. Em ambos os estudos verificou-se a presença de picos entre 3500 e 3000 cm^{-1} , que corresponde ao alongamento grupo hidroxilo.

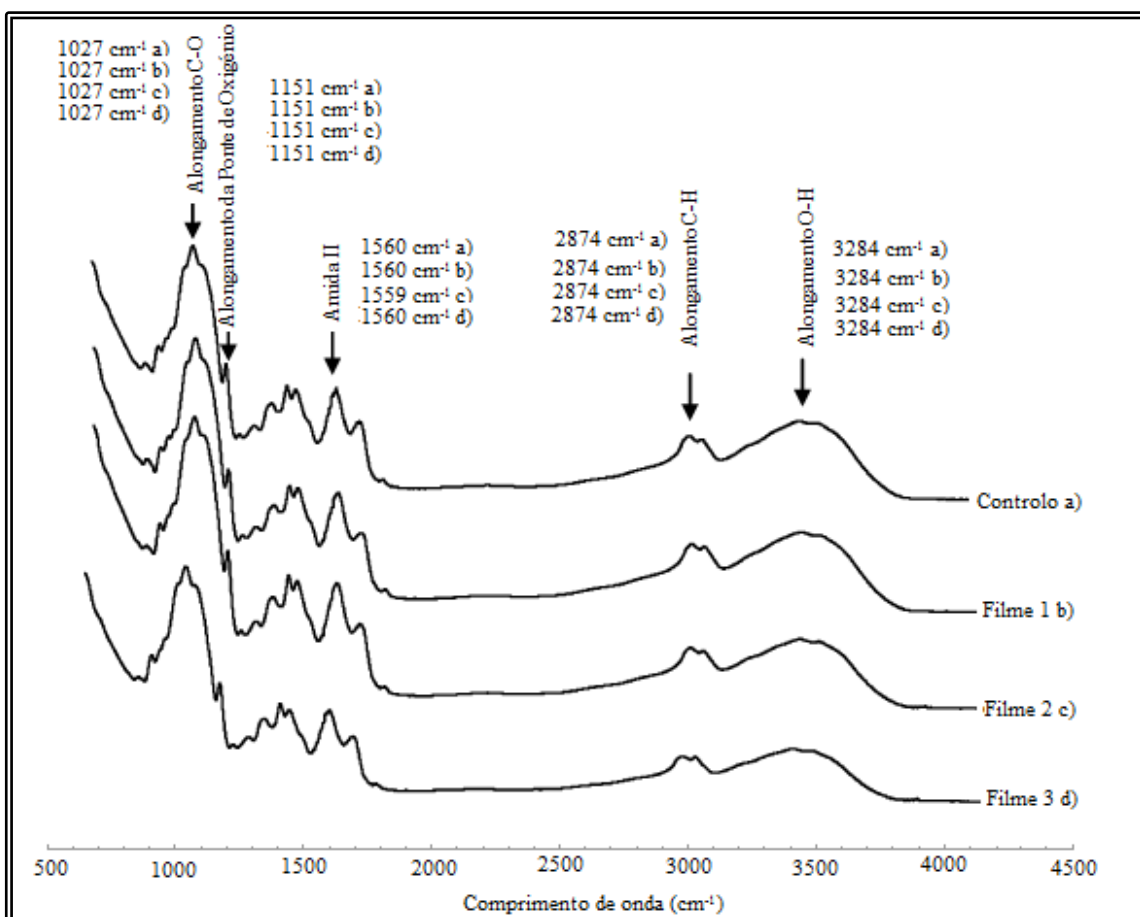


Figura 3.2. Espectro de Infravermelhos com Transformação de Fourier. a) Filme Controlo de quitosano a %; b) Filme 1 (3,2% carvacrol e 34,2% extrato grainha de uva); c) Filme 2 (20% carvacrol e 20% extrato grainha de uva); d) Filme 3 (30% carvacrol e 8% extrato grainha de uva) (Rubilar et al., 2013a).

Li et al. (2014) estudaram FQ a 3% e FQ incorporados com extrato de grainha de uva, pelo que comprovam os resultados deste trabalho. Com a adição deste extrato, verificou a presença de ligações C-O e C-C entre os 1000 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} , respetivamente. E ainda, alongamento C=O e N-H que representa a Amida II entre 1500 cm^{-1} e 1675 cm^{-1} , para o FQ a 3% e FQ incorporados com extrato de grainha de uva, respetivamente. Noutro estudo realizado com FQ a 2% e FQ com 1,2% de óleo de orégão verificaram espetros idênticos aos obtidos. Os filmes apresentaram um pico em 3327 cm^{-1} que é um alongamento do grupo hidroxilo (OH), no comprimento de onda de 1546 cm^{-1} o grupo amida II, os picos localizados entre $1042\text{-}1045\text{ cm}^{-1}$ correspondentes ao grupo hidroxilo (Hosseini et al., 2015a).

3.2. Efeito dos Filmes Desenvolvidos no Tempo de Prateleira de Salmão Refrigerado

3.2.1. Parâmetros Físico-Químicos

Efetuarão-se análises físico-químicas a diversos parâmetros, nomeadamente à cor, ABVT, pH, teor de humidade, a_w e textura nas amostras de salmão controlo e embaladas com FQ e FQM de extratos naturais, cujos valores iniciais encontram-se representados na Tabela 3.2 e 3.3 (Anexo A).

Tabela 3.2. Parâmetros físico-químicos do salmão fresco controlo.

Cor	<i>L</i>	41,66 ± 1,62
	<i>a</i>	15,32 ± 2,01
	<i>b</i>	13,57 ± 1,68
ABVT (mg ABVT/100 g)		12,42 ± 3,25
pH		6,21 ± 0,06
Teor de Humidade (%)		59,52 ± 3,24
a_w		0,977 ± 0,001






















Tabela 3.3. Textura do salmão fresco controlo.

Carga Aplicada (g)	123,01 ± 25,77
Coesividade	0,19 ± 0,02
Gomosidade (g)	23,39 ± 5,56
Mastigabilidade (gmm)	45,78 ± 17,78
Adesividade (gs)	-60,56 ± 26,51
Elasticidade (mm)	1,92 ± 0,37

3.2.1.1. Cor

Para uma melhor percepção registaram-se imagens das amostras de salmão que possibilitaram observar a degradação das amostras de salmão controlo, com FQ e com FQM ao longo do armazenamento (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Amostras de salmão ao longo do armazenamento refrigerado.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0			
1			
2			
4			
7			
9			
14			

3.2.1.2. *L*

A luminosidade das amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo dos 14 dias de armazenamento encontra-se representada na Figura 3.3 (Anexo B, Tabela I a III).

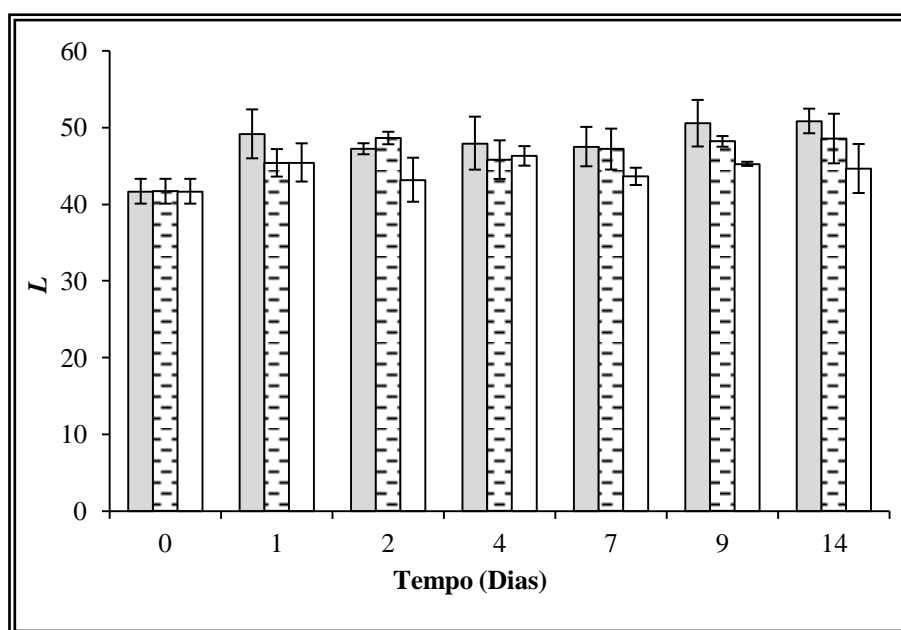


Figura 3.3. Evolução do parâmetro Luminosidade ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ▤ FQ; □ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol.

A luminosidade das amostras controlo, do FQ e do FQM apresentaram o mesmo comportamento (Figura 3.3). Nas três situações em estudo do dia 0 para o dia 1 observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) de 41,66 para valores entre os 45 e os 50, ou seja, as amostras de salmão ficaram mais claras. Ao longo dos restantes dias, do dia 1 ao dia 14, as médias de valores de luminosidade das amostras foram aproximadamente constantes. Contudo, as amostras com o FQM ao longo do armazenamento apresentaram valores mais próximos do valor inicial do que as restantes amostras. Verificou-se então que amostras embaladas com FQM não se apresentaram tão claras como as amostras controlo e com FQ (Tabela 3.3). Este facto poderá estar relacionado com a presença de polifenóis, em especial, às proantocianidinas presentes no extrato de grainha de uva que ao serem transferidos do filme para a amostra a mantiveram com valores de *L* inferiores. Confirmando que o quitosano só por si não provoca efeito positivo nas amostras (Rubilar et al., 2013a).

Num estudo em que amostras de pargo vermelho (*Pagrus pagrus*) foram revestidas por duas soluções, uma solução de quitosano a 2% (m/v) e outra solução de quitosano a 2% (m/v) e óleo de orégão 0,1% (m/v) armazenadas a 4 °C durante 20 dias, verificou-se que, os valores *L*, apesar de apresentarem pequenas variações nos dois tratamentos, o revestimento de quitosano com ou sem a adição de óleo de orégão não afetou significativamente ($p>0,05$) a luminosidade das amostras, tal como obtido no presente estudo (Vatavali et al., 2013).

Num trabalho realizado com salmão, os valores de *L* estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Ao dia 0 as amostras apresentavam um valor de aproximadamente 46 e ao 7º dia de refrigeração a 4 °C de $47,03 \pm 3,73$ e de $46,59 \pm 1,68$ para o controlo e para as amostras irradiadas com 30 J/cm^2 , respetivamente, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Nicorescu et al., 2014).

Noutro trabalho realizado com salmão armazenado a 7,3 °C verificou-se que as amostras controlo apresentavam um valor de *L* de 50,7 e as amostras tratadas com CO apresentavam um valor de 52,8 no dia 0, e no dia 14 apresentavam valores de *L* de 49,8 nas amostras controlo e de 50,7 nas amostras tratadas com monóxido de carbono, sem diferenças significativas ($p>0,05$) (Concollato et al., 2014).

3.2.1.3. *a*

O parâmetro *a* das amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo dos 14 dias de armazenamento encontra-se representado na Figura 3.4 (Anexo B, Tabela IV a VI).

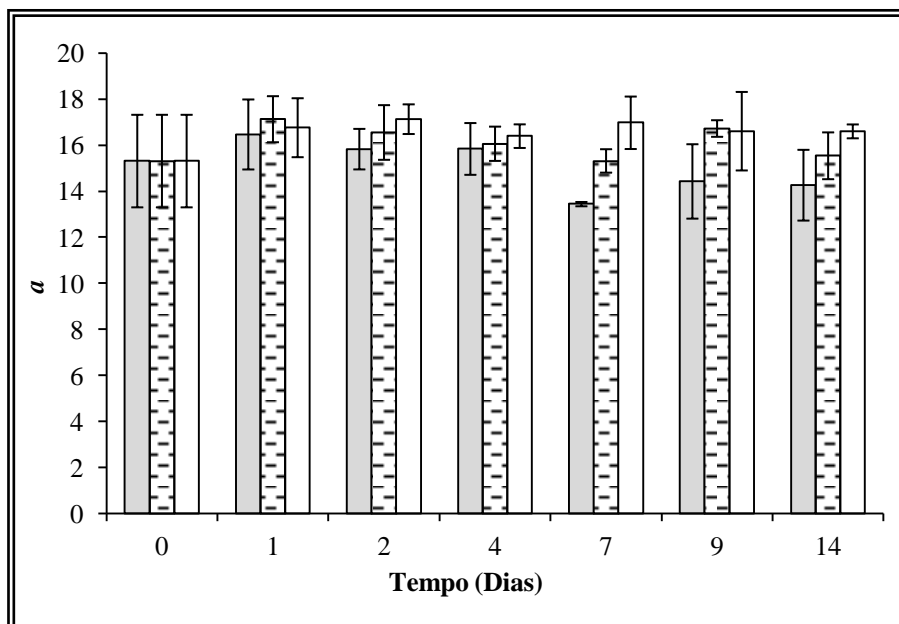


Figura 3.4. Evolução do parâmetro *a* ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ▤ FQ; □ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol.

Relativamente ao parâmetro *a*, nas três situações em estudo do dia 0 para o 14º dia de armazenamento as médias de valores das amostras neste parâmetro foram aproximadamente constantes, com valores entre os 14,27 e os 17,14. A cor avermelhada do salmão manteve-se ao longo do armazenamento. Contudo, os valores das médias das amostras de salmão com o FQM, apesar de não serem significativos, são ligeiramente mais elevados que os valores das médias das amostras controlo e com FQ (Figura 3.4). Ou seja, as amostras embaladas com FQM apresentaram uma melhor conservação da cor vermelha, característica do salmão, tal como se pode observar na Tabela 3.3. o que pode ser atribuído aos polifenóis, em especial, as proantocianidinas presentes no extrato de grainha de uva (Rubilar et al., 2013a).

Num trabalho realizado com salmão os valores de *a* estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo. Inicialmente as amostras apresentaram um valor de aproximadamente 16 e ao 7º dia de armazenamento a 4 °C os valores mantiveram-se nos

16,79 ± 0,89 e de 15,20 ± 0,69 para o controlo e para as amostras irradiadas com 30 J/cm², respetivamente, não apresentaram diferenças significativas (p> 0,05) (Nicorescu et al., 2014).

Segundo Vatavali *et al.* (2013) os valores *a* apresentaram tendência decrescente com o tempo de armazenamento. Entre os dias 6 e 20 de armazenamento a 4 °C, o revestimento com quitosano a 2% (m/v) e óleo de orégão 0,1% (m/v) protegeu a cor vermelha do pargo (*Pagrus pagrus*) que de outra forma se perdeu.

Num estudo realizado por Concollato et al. (2014), as amostras controlo de salmão armazenadas a 7,3 °C apresentaram um valor de *a* de 19,9 e as amostras tratadas com CO apresentaram inicialmente um valor de 21,1 e no 14º dia apresentaram valores de 21,2 nas amostras controlo e de 21,2 nas amostras tratadas com CO (Concollato et al., 2014).

3.2.1.4. *b*

O parâmetro *b* das amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo dos 14 dias de armazenamento encontra-se representado na Figura 3.5 (Anexo B, Tabela VII a IX).

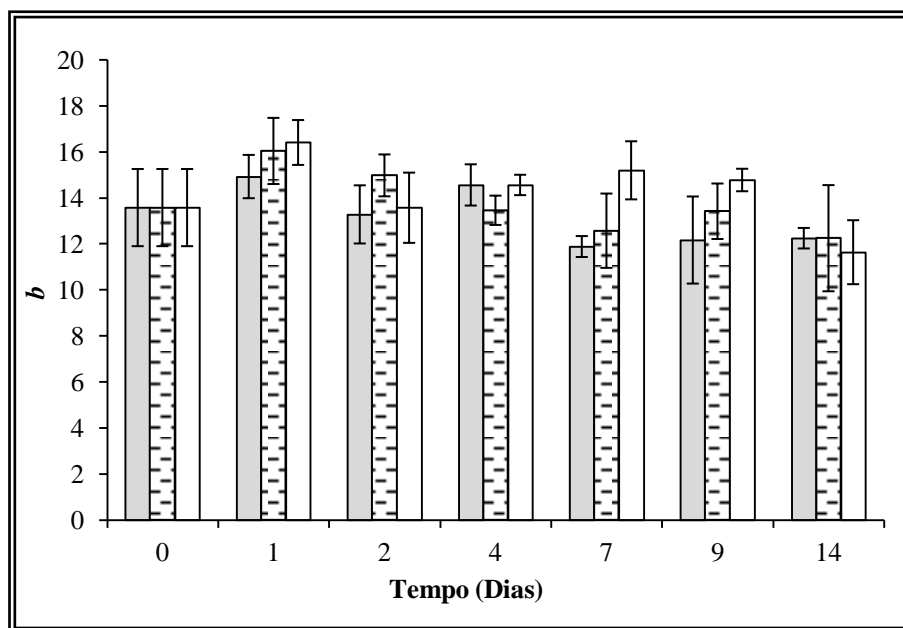


Figura 3.5. Evolução do parâmetro *b* ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ▤ FQ; □ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol.

No que diz respeito ao parâmetro *b*, as amostras apresentaram valores entre 11 e 16. As amostras controlo apresentaram um ligeiro decréscimo entre o valor inicial e o 7º dia de armazenamento, por outro lado as amostras embaladas com FQ e FQM que apresentaram um aumento do ponto inicial para o 1º dia de armazenamento. De uma maneira geral a cor das amostras controlo, com FQ e com FQM mantiveram-se praticamente constantes ao longo do seu armazenamento.

Os valores estão de acordo com um estudo aplicado por Vatavali et al., (2013) em pargo (*Pagrus pagrus*) em que os valores de *b* variaram entre 7,5 e 12,4, sem diferenças significativas entre os tratamentos controlo, revestimento com quitosano a 2% (m/v) e quitosano a 2% (m/v) + óleo de orégão 0,1% (m/v).

Resultados similares foram obtidos no estudo de Nicorescu et al. (2014) realizado em salmão refrigerado a 4 °C em que os valores de *b* estão em concordância

com os resultados obtidos neste trabalho. Ao dia 0 as amostras apresentavam um valor de aproximadamente 15 e ao 7º dia de armazenamento de $15,50 \pm 1,64$ e de $14,33 \pm 1,12$ para o controlo e para as amostras irradiadas com 30 J/cm^2 , respetivamente, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Noutro trabalho realizado a salmão verificou-se que as amostras controlo armazenadas a $7,3 \text{ }^\circ\text{C}$ apresentaram um valor de b de 18,2 e as amostras tratadas com CO apresentaram um valor de 19,3 no dia 0, e no dia 14 apresentavam valores de L de 19,8 nas amostras controlo e de 19,2 nas amostras tratadas com CO, contudo sem diferenças significativas tal como no presente estudo ($p > 0,05$) (Concollato et al., 2014).

3.2.1.5. pH

O pH das amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo do tempo de armazenamento encontra-se representado na Figura 3.6 (Anexo B, Tabela X a XII).

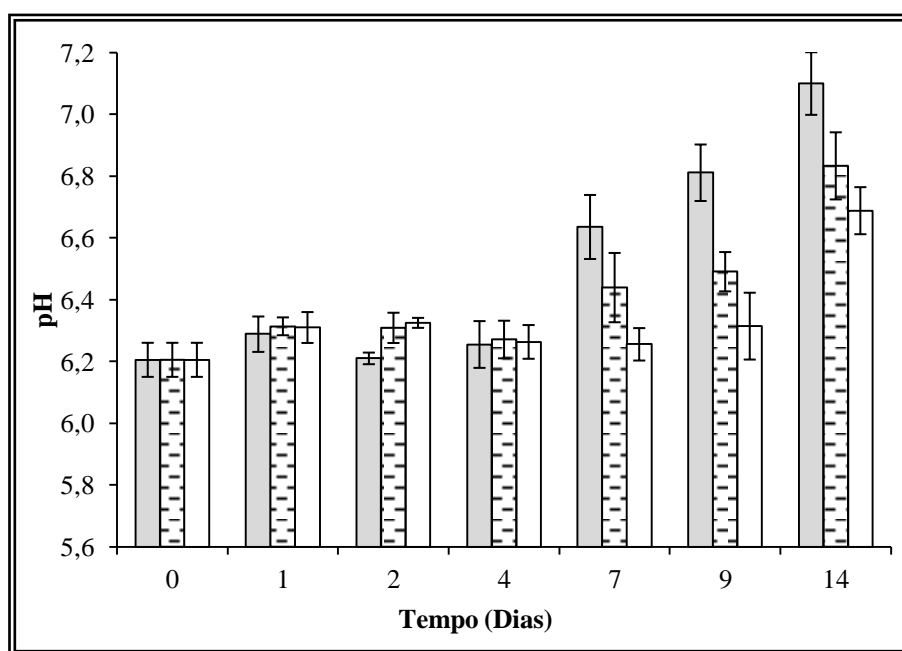


Figura 3.6. Determinação do pH ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ▨ FQ; □ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol.

Entre o 4º e o 7º dias de armazenamento verificou-se um aumento significativo do valor de pH nas amostras controlo ($p < 0,05$), de $6,26 \pm 0,08$ para $6,64 \pm 0,10$. Estas amostras apresentaram um valor máximo de $7,10 \pm 0,10$ ao 14º dia de armazenamento. O que permitiu verificar que as amostras controlo foram-se degradando ao longo do tempo de prateleira. O pH mais elevado nas amostras controlo pode ser relacionado com a deterioração rápida do produto com a produção de compostos alcalinos como a autólise de compostos azotados, tais como amoníaco, trimetilamina e outras aminas biogénicas, e ainda, devido à deterioração por proliferação de bactérias durante o período após a captura. O que também foi demonstrado com a tendência crescente do ABVT ao longo do tempo de armazenamento, como posteriormente discutido na secção 3.2.2. (Li et al., 2013a; Qiu et al., 2014; Souza et al., 2010; Vatavali et al., 2013).

Nas amostras embaladas com FQ verificou-se um aumento no pH de $6,27 \pm 0,06$ para $6,44 \pm 0,11$ do 4º para o 7º dias de armazenamento, respetivamente. As amostras foram se degradando mais lentamente que as amostras controlo.

No entanto, nas amostras embaladas com o FQM verificou-se um aumento mais acentuado no pH entre o 9º e 14º dias de armazenamento, de $6,31 \pm 0,11$ para $6,69 \pm 0,08$. Este filme foi o que permitiu manter o pH mais baixo durante mais tempo. Deste modo este foi o filme que melhor permitiu retardar a degradação das amostras ao longo de 9 dias encontrando-se os valores médios de pH entre os $6,21 \pm 0,06$ e os $6,31 \pm 0,11$.

Resultados semelhantes foram relatados para outras espécies de peixes revestidos com quitosano. Num estudo efetuado com pargo vermelho armazenado a 4 °C verificou-se que o pH inicial foi de 6,6. O pH das amostras revestidas com quitosano a 2% (m/v) com ou sem óleo de orégão 0,1% (m/v) aumentou ao longo do armazenamento (6,7 ao 13º dia de armazenamento), mas foi um aumento mais baixo do que o das amostras de controlo (6,9 ao 13º dia de armazenamento) ($p < 0,05$). Estes valores de pH mais baixos das amostras com quitosano a 2% (m/v) são justificados pela ação antimicrobiana do quitosano inibindo as bactérias que causam a degradação de proteínas e na produção de compostos básicos responsáveis pelo aumento do pH (Vatavali et al., 2013).

Num estudo realizado com peixe vermelho (*Sciaenops ocellatus*) os resultados estão de acordo com os deste trabalho experimental, em que o pH da amostra de controlo foi mais elevado do que o pH das amostras revestidas com quitosano a 1,5% (m/v) e extrato de grainha de uva a 0,2% (m/v) ($p < 0,05$) durante o armazenamento a 4 °C. O revestimento de quitosano a 1,5% (m/v) com extrato de grainha de uva a 0,2% (m/v) atrasou a atividade enzimática e, portanto, manteve os valores de pH mais baixos (Li et al., 2013a).

Outro estudo realizado com revestimento de quitosano em filetes de salmão refere que o pH inicial da amostra de peixe foi de 6,30. Após 6 dias de armazenamento a 0 °C, o valor do pH das amostras controlo (6,58), foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que o das amostras tratadas com um revestimento de quitosano (6,47). Este aumento do pH tem um efeito pronunciado sobre a qualidade do produto durante o

armazenamento, especialmente em termos de características sensoriais, tais como odor, cor e textura, as quais são afetadas negativamente (Souza et al., 2010).

De acordo com o estudo de Wu et al. (2014) o músculo de carpa (*Ctenopharyngodon idellus*) durante o período de armazenamento de 12 dias a 4 °C, apresentou um pH final nas amostras controlo de 7,34 e nas amostras embaladas com FQ com óleo de orégão a 4% (v/v) apenas de 6,98.

Num estudo efetuado com robalo (*Lateolabrax japonicas*), o pH do peixe no dia 0 foi de 6,70 e no dia 12 as amostras de robalo revestidas com quitosano a 1,5% (m/v) apresentaram um pH de 7,5 enquanto o controlo de 7,8, à temperatura de 4 °C (Qiu et al., 2014).

Noutro estudo realizado a salmão refrigerado a 4 °C, o pH inicial das amostras foi de $6,11 \pm 0,06$ e ao longo de 12 dias de armazenamento aumentou para $6,25 \pm 0,06$ nas amostras controlo e para $6,25 \pm 0,04$ nas amostras irradiadas com 3 kGy (Yang et al., 2014).

Foram estudados filetes de pregado (*Psetta maxima*) embalados em atmosfera modificada armazenadas a 4 °C que apresentavam um pH inicial de $6,28 \pm 0,03$. A evolução do pH revelou diferenças significativas no dia 15 entre os filetes controlo de aproximadamente 6,8 e com 80% de CO₂ de aproximadamente 7 ($p < 0,05$) (Santos, 2008).

Segundo Liu et al., (2010) o pH do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*) coberto com uma fina película de polietileno de elevada permeabilidade ao oxigénio aumentou de 6,4 para aproximadamente 7,5 do início ao fim do tempo de armazenamento de 29 dias a 0 °C, confirmando o aumento dos resultados observados no presente estudo.

De acordo com Sallam et al. (2007a) as amostras de salmão (*Onchorhynchus nerka*) apresentaram um pH inicial de aproximadamente 6,4. Ao 15º dia de armazenamento observaram-se diferenças significativas nos valores de pH entre o controlo (7,1) e todas as outras amostras tratadas com acetato de sódio, lactato de sódio e citrato de sódio, que apresentaram valores entre 6,47 e 6,6.

Outro estudo realizado a robalo (*Dicentrarchus labrax*) o pH inicial das amostras de peixe foi de 6,61, aumentando significativamente ($p \leq 0,05$) durante o armazenamento a 4 °C, para 6,90 e 6,65 nas amostras controlo e nas amostras embaladas a vácuo com FQ, respetivamente (Günlü & Koyun, 2013).

Verificou-se assim que vários autores realizaram estudos em diversas espécies de peixes concluíram o que foi verificado neste estudo, que o pH aumentou ao longo do armazenamento devido à degradação do pescado, contudo os filmes desenvolvidos permitem retardar esse aumento.

3.2.2. Teor de Azoto Básico Volátil Total (ABVT)

O ABVT das amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo do tempo de armazenamento encontra-se representado na Figura 3.7 (Anexo B, Tabela XIII a XV).

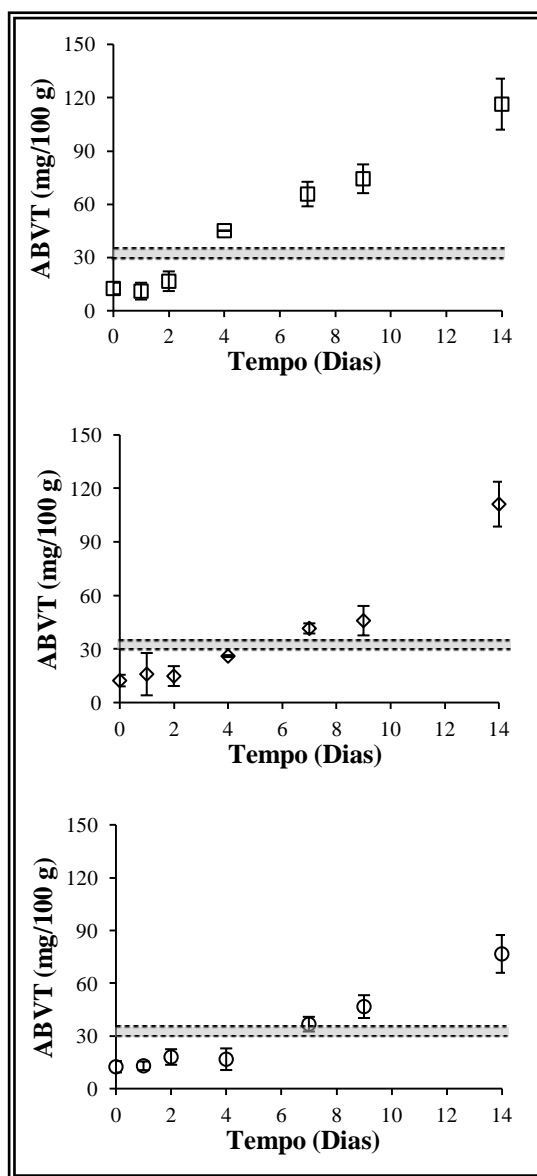


Figura 3.7. Determinação do ABVT ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ◇ FQ; ○ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol. A zona sombreada representa o limite de rejeição do peixe, que é de 30 a 35 mg de azoto volátil total (ABVT)/100 g de peixe (Regulamento (CE) N.º 2074/2005).

Com a determinação do ABVT verificou-se que a média dos valores iniciais foram de $12,42 \pm 3,25$ mg ABVT/100 g de salmão e aumentaram ao longo do armazenamento em todas as situações em estudo atingindo no dia 14 $116,29 \pm 14,37$, $111,24 \pm 12,55$ e $76,65 \pm 10,76$ mg ABVT/100 g de peixe para as amostras controlo, FQ e FQM, respetivamente. O FQM apresentou ao longo do armazenamento valores mais baixos que as restantes situações estudadas, indicando o retardamento da deterioração do salmão. As diferenças entre o controlo e as amostras embaladas podem ser atribuídas à atividade antimicrobiana do quitosano e dos extratos presentes nas microcápsulas, à redução da população bacteriana ou à diminuição da capacidade das bactérias em realizarem a desaminação oxidativa (Souza et al., 2010).

Nas três situações estudadas os valores de ABVT mantiveram-se estáveis nos 2 dias primeiros de armazenamento, contudo, ao 4º dia observou-se um aumento das amostras controlo ultrapassando as 35 mg de azoto/100 g estabelecidas como limite de aceitabilidade de salmão pelo Regulamento (CE) N.º 2074/2005. O ABVT é considerado como um índice de qualidade para os peixes e o seu aumento ao longo do armazenamento pode ser atribuído à atividade de bactérias de deterioração, às enzimas endógenas e ao catabolismo bacteriano de aminoácidos no músculo do peixe devido à acumulação de amónia, monoetilamina, dimetilamina, trimetilamina e outras bases voláteis, que conferem odores desagradáveis ao peixe fresco (Nowzari, Shábanpour, & Ojagh, 2013; Vatavali et al., 2013).

As amostras embaladas com FQ apresentaram um aumento significativo do 4º para o 7º dias ($p < 0,05$) de $26,12 \pm 0,55$ para $41,64 \pm 2,83$ mg ABVT/100 g de peixe, ultrapassando o limite máximo de 35 mg ABVT/100 g de peixe. As amostras de salmão embaladas com FQM, apresentaram também um aumento significativo do 4º para o 7º dias ($p < 0,05$). Contudo o valor de ABVT ao 7º dia ($36,66 \pm 4,18$ mg/100 g de salmão) ainda se encontra dentro do limite máximo de 35 mg ABVT/100 g de peixe, indicando uma menor degradação do salmão armazenado a 5 °C. A atividade antimicrobiana do FQM poderá permitido manter ou retardar o crescimento microbiano de microrganismos que realizam a desaminação oxidativa de compostos de azoto não proteicos (Li et al., 2013a).

Os valores das amostras controlo e com FQ estão de acordo com estudos como a investigação feita a pargo vermelho em que o valor inicial foi de 15,2 mg ABVT/100 g

e aumentou progressivamente ao longo de armazenamento a 4 °C em todos os tratamentos. O ABVT atingiu valores entre 30 e 35 mg ABVT/100 g, considerado como o limite máximo de aceitabilidade nas amostras controlo no dia 13, contudo as amostras revestidas com quitosano a 2% (m/v) e orégão 0,1% (m/v) ao 20º e último dia de análise ainda não tinham excedido o limite máximo. O estudo revelou que começaram a existir diferenças significativas do controlo em relação às amostras revestidas com quitosano 2% (m/v) com orégão 0,1% (m/v) logo a partir do segundo dia de armazenamento ($p < 0,05$) (Vatavali et al., 2013).

Num estudo com filetes de peixe vermelho (*Sciaenops ocellatus*) os valores de ABVT também aumentaram progressivamente ($p < 0,05$) como neste trabalho experimental. Os valores iniciais foram de 5,87 e 5,69 mg ABVT/100 g e os valores finais, ao 20º dia de armazenamento a 4 °C, de 51,25 e 38,17 mg ABVT/100 g para o controlo e quitosano a 1,5% (m/v) + extrato de grainha de uva a 0,2% (m/v), respetivamente (Li et al., 2013b).

Segundo Souza et al. (2010) os valores iniciais de ABVT foram de 8,05 e 8,06 mg ABVT/100 g para o controlo e amostras revestidas de quitosano armazenadas a 0 °C, respetivamente, indicando a boa qualidade do salmão (*Salmo salar*) utilizado. O conteúdo de ABVT aumentou gradualmente, atingindo valores finais de 32,70 e 28,09 mg/100 g para as amostras de controlo e revestidas de quitosano, respetivamente, no final do período de armazenamento (18 dias).

Noutra investigação realizada em amostras de carpa (*Ctenopharyngodon idellus*) durante 12 dias de armazenamento a 4 °C as alterações no ABVT apresentaram o mesmo comportamento que o presente estudo. Inicialmente o valor de ABVT foi de 7,84 mg ABVT/100 g. Aumentando continuamente até 55 mg ABVT/100 g nas amostras controlo e embaladas com parafilme, enquanto que, as amostras embaladas com FQ com óleo essencial de orégão a 4% (v/v) foram significativamente menores ($p < 0,05$), chegando próximo das 40 mg ABVT/100 g no último dia de análise. Com estes resultados e considerando o valor limite de 35 mg ABVT/100 g, o prazo de validade da carpa com FQ com óleo de orégão a 4 % (v/v) foi alargado para 12 dias (Wu et al., 2014).

Num estudo realizado em filetes de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) refere que ao longo do armazenamento a 4 °C durante 16 dias o valor inicial de ABVT foi de

aproximadamente 17 mg ABVT/100 g e no final do armazenamento as amostras de truta embaladas com FQ apresentavam um valor de aproximadamente 19 mg ABVT/100 g, enquanto que as amostras controlo atingiram um valor de 42,93 mg ABVT/100 g (Nowzari et al., 2013).

O ABVT de um estudo efetuado a robalo (*Lateolabrax japonicas*) refrigerado apresentou um aumento de 11,07 mg ABVT/100 g no dia 0 para 100,21 mg ABVT/100 g no dia 12 a 4 °C, ultrapassando ao 8º dia o limite máximo de 35 mg ABVT/100 g. Contudo, o valor das amostras revestidas de quitosano a 1,5% (m/v) no final do armazenamento (dia 12) foi de 60,53 mg ABVT/100 g. Por outro lado, as amostras revestidas de quitosano 1,5% (m/v) e com ácido cítrico a 0,5% (m/v) apresentaram um valor de 47,95 mg ABVT/100 g (Qiu et al., 2014).

Noutra investigação realizada a filetes de salmão armazenado a $4 \pm 0,5$ °C verificaram que os valores iniciais de ABVT nas amostras não irradiadas e irradiadas foram de aproximadamente 17 mg ABVT/100 g. No entanto, durante o armazenamento, o teor de ABVT atingiu um máximo de $28,03 \pm 2,02$ mg ABVT/100 g para o controlo, enquanto nas amostras irradiadas com 2 kGy foi apenas de $20,57 \pm 0,89$ mg ABVT/100 g ao 12º dia de armazenamento (Yang et al., 2014).

Noutro estudo realizado a pregado (*Psetta maxima*) embalados em atmosfera modificada armazenados a 4 °C, o aumento do ABVT revelou que o valor limite de 35 mg ABVT/100g foi ultrapassado após 15 dias, enquanto que as amostras embaladas com 40, 60 e 80% de CO₂ não atingiram esse limite máximo durante o armazenamento (Santos, 2008).

Segundo Liu et al., (2010) o ABVT do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*) coberto com uma película de polietileno de elevada permeabilidade ao oxigénio aumentou de 6,5 para 61,3 mg ABVT/100 g do início ao fim do tempo de armazenamento de 29 dias a 0 °C, e ultrapassou o limite máximo de 35 mg ABVT/100 g ao 13º dia de armazenamento.

De acordo com Sallam et al. (2007a) as amostras de salmão (*Onchorhynchus nerka*) apresentaram um teor de ABVT de aproximadamente 9 mg ABVT/100 g e ao 9º dia de armazenamento a 1 °C as diferentes amostras tratadas com acetato de sódio, lactato de sódio e citrato de sódio apresentaram um aumento acentuado para 14,6, 15,8 e

17,8 mg ABVT/100 g, respetivamente, enquanto as amostras de salmão controlo apresentaram um valor de 22,7 mg ABVT/100 g.

No estudo Günlü & Koyun (2013), realizado a robalo (*Dicentrarchus labrax*) o ABVT inicial foi de 18,68 mg ABVT/100 g. Os valores de ABVT foram aumentando progressivamente como no presente estudo. As amostras controlo ultrapassaram o limite de 30 mg ABVT/100 g após 5 dias de armazenamento a 4 °C, enquanto as amostras embaladas a vácuo com FQ atingiram esse limite apenas após 25 dias de armazenamento.

3.2.3. Textura

Relativamente à textura das amostras, os parâmetros estudados, carga aplicada, coesividade, gomosidade, mastigabilidade, adesividade e elasticidade não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Anexo A, Tabelas VI à XI) ao longo do armazenamento, contudo as amostras embaladas com FQM apresentavam-se visivelmente mais coesas e a desagregação não era tão elevada como nas amostras embaladas com FQ ou controlo.

3.2.4. Teor de Humidade

O teor de humidade nas amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo do tempo de armazenamento encontra-se representado na Figura 3.8 (Anexo B, Tabela XVI a XVIII).

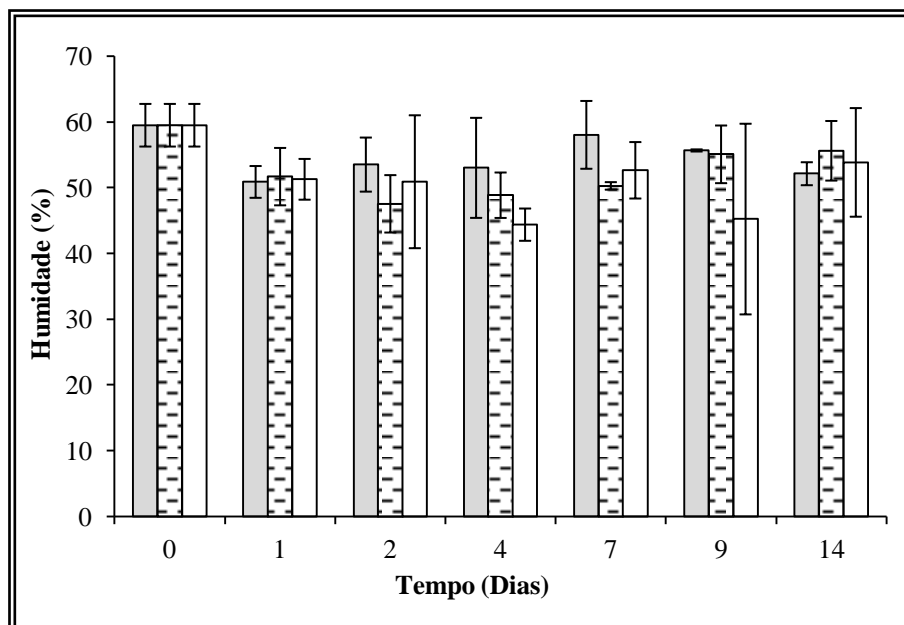


Figura 3.8. Evolução do parâmetro Humidade ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ▨ FQ; ▩ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol.

As amostras controlo, FQ e FQM apesar de apresentarem alguma variação na humidade ao longo do armazenamento devido à libertação de exsudado, os valores das amostras de salmão mantiveram-se praticamente constantes, entre os $45,40 \pm 2,46\%$ e os $59,52 \pm 3,24\%$. No entanto, observou-se uma diminuição mais acentuada do dia 0 para o dia 1, indicando uma maior perda de água nas amostras dos diferentes filmes em estudo.

Resultados similares foram observados num estudo realizado a filetes de pregado (*Psetta maxima*) embalados em atmosfera modificada que apresentaram um teor inicial de humidade de $79,36 \pm 1,67\%$. Contudo este parâmetro não sofreu alterações significativas ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento em cada grupo testado e entre os filetes embalados em diferentes atmosferas de 40, 60 e 80% de CO_2 (Santos, 2008).

3.2.5. Atividade da Água (a_w)

O a_w das amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo dos 14 dias de armazenamento encontra-se representado na Figura 3.9 (Anexo B, Tabela XIX a XXI).

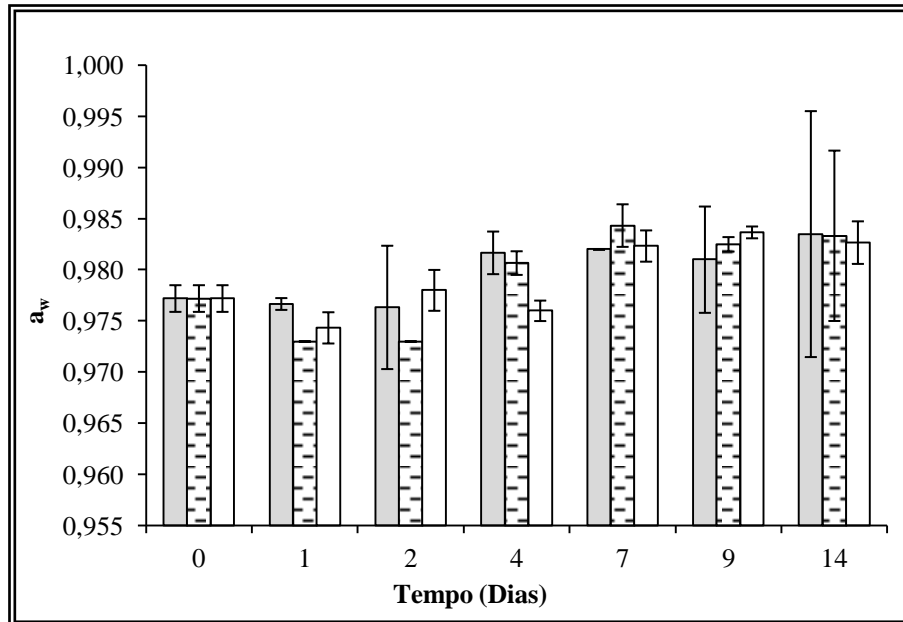


Figura 3.9. Evolução da Atividade da Água ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ▨ FQ; ▩ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol.

Os valores da atividade da água das amostras de salmão mantiveram-se praticamente constantes nas diferentes situações em estudo, no controlo, no FQ e no FQM (Figura 3.9).

Em suma, com as análises físico-químicas verificou-se que as amostras embaladas com FQM mantiveram as amostras aceitáveis até entre o 4º e o 7º dias de armazenamento nos parâmetros pH, ABVT e cor.

3.3. Parâmetros Microbiológicos

Através das análises microbiológicas observou-se a evolução dos microrganismos mesófilos, dos psicotróficos e das *Pseudomonas spp.*, nas amostras de salmão embaladas com FQ, FQM e controle, cujos valores iniciais encontram-se na Tabela 3.5 (Anexo C).

Tabela 3.5. Parâmetros microbiológicos do salmão fresco controle.

Mesófilos (log(UFC/g))	3,86 ± 0,33
Psicotróficos (log(UFC/g))	0,81 ± 0,49
<i>Pseudomonas spp.</i> (log(UFC/g))	4,89 ± 0,45

3.3.1. Contagem de Microrganismos Mesófilos

As contagens de mesófilos totais presentes nas amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo dos 14 dias de armazenamento encontram-se representadas na Figura 3.10 (Anexo D, Tabela I a III).

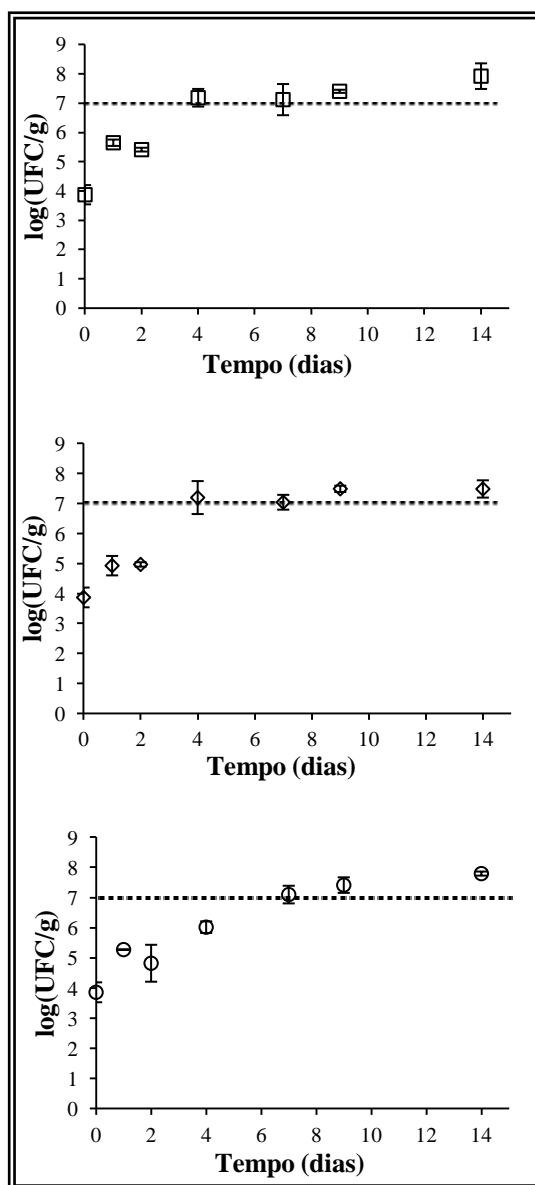


Figura 3.10. Evolução dos microrganismos Mesófilos ao longo do armazenamento das amostras de salmão. □ Controlo; ◇ FQ; ○ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol. O limite máximo permitido para o consumo é de 7,0 log(UFC/g) encontra-se representado pela linha horizontal (Liu et al., 2010; Nowzari et al., 2013; Souza et al., 2010; Vatavali et al., 2013).

Em relação à contagem de mesófilos, verificou-se que nas três situações em estudo, houve um aumento significativo do valor inicial para os restantes pontos de amostragem ($p < 0,05$), ou seja as amostras controlo, amostras embaladas com FQ e com FQM apresentaram degradação logo após as primeiras 24 h de armazenamento. O valor inicial de microrganismos presente nas amostras pode ser devido à manipulação dos filetes durante o corte e acondicionamento (Nowzari et al., 2013).

O limite máximo recomendável para peixes crus é de 7 log(UFC/g) (Nowzari et al., 2013; Souza et al., 2010; Vatavali et al., 2013). No que diz respeito às amostras controlo e às amostras embaladas com quitosano esse valor foi alcançado logo ao 4º dia de armazenamento a 5 °C com $7,18 \pm 0,30$ log(UFC/g) e $7,19 \pm 0,55$ log(UFC/g), respetivamente, enquanto que as amostras com FQM chegaram ao limite máximo apenas ao 7º dia de armazenamento com $7,10 \pm 0,29$ log(UFC/g). As amostras controlo e embaladas com FQ, aumentaram do 2º para o 4º dia, o que revelou um aumento da degradação das amostras de salmão ao 4º dia, indicando ainda, que a temperatura de 5 °C não inibiu completamente o crescimento de microrganismos. O aumento progressivo das contagens microbianas nas situações em estudo deve-se à composição do peixe rica em nutrientes, nomeadamente azoto básico, que torna favorável ao crescimento microbiano (Nowzari et al., 2013; Souza et al., 2010).

No entanto, em relação às amostras embaladas com o FQM, observou-se um aumento pronunciado entre o 4º e o 7º dias de armazenamento, de $4,83 \pm 0,61$ para $7,10 \pm 0,29$ log(UFC/g), respetivamente. Apesar de existir um aumento significativo do 2º dia para o 4º dia ($p < 0,05$) de $4,83 \pm 0,61$ para $6,02 \pm 0,19$ log(UFC/g), estes valores são inferiores aos valores médios ao 4º dia das amostras controlo com $7,18 \pm 0,30$ log(UFC/g) e do FQ com $7,19 \pm 0,55$ log(UFC/g). Verificou-se assim, que o FQM permitiu retardar a deterioração das amostras de salmão devido aos compostos ativos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes que desequilibram as membranas celulares e retardam o crescimento microbiano. Ou seja, o carvacrol foi capaz de desintegrar a membrana externa das bactérias Gram (-), libertando lipopolissacarídeos nestes microrganismos, restringindo a difusão de compostos hidrofóbicos o que pode aumentar a permeabilidade do trifosfato de adenosina na membrana citoplasmática e, conseqüentemente, alterar a permeabilidade passiva da célula (Rubilar et al., 2013b).

Tal como refere o estudo efetuado por Alak et al. (2010) em que o número total de bactérias aeróbias mesófilas foi maior no grupo de controlo do que a do grupo de quitosano. Após 6 dias, o total de bactérias mesófilas aeróbias nos filetes de grupo de controlo foram superiores a 2,03 log(UFC/g). No entanto, o crescimento de mesófilos nos filetes de *Sarda sarda* embalados com FQ a 1,5% (m/v) foi mais lento do que nos filetes controlo e com tratamento a vácuo durante os 15 dias de armazenamento a 4 °C, pelo que, não chegou a atingir os 2,03 log(UFC/g) (Alak et al., 2010).

Resultados similares foram encontrados no estudo de Wu et al. (2014) realizado em carpa (*Ctenopharyngodon idellus*) embalado com FQ incorporado com 4% (v/v) de óleo de orégão que revelou ter uma boa atividade antimicrobiana. A contagem inicial de microrganismos aeróbios foi de 4,23 log(UFC/g), o que representa uma carga bacteriana relativamente baixa. A microbiota presente no músculo de carpa embalado com FQ e óleo de orégão foi sempre menor do que as amostras controlo e das amostras embaladas com parafilme, ao longo dos 12 dias de armazenamento a 5 °C.

O trabalho realizado a salmão (*Salmo salar*), durante o armazenamento a 0 °C as contagens iniciais de microrganismos aeróbios foram de 3,02 log(UFC/g) e ao 6º dia foi observado um aumento mais lento de microrganismos aeróbios nas amostras de salmão embalado com FQ de quitosano quando comparado com o controlo, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho experimental. As amostras controlo atingiram o valor limite de 7 log(UFC/g) ao 12º dia com 7,05 log(UFC/g) enquanto que as amostras com FQ apenas se aproximaram de valor limite ao 15º dia de refrigeração com 6,88 log(UFC/g) (Souza et al., 2010).

Num estudo realizado a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) armazenada a 4 °C, o aumento de microrganismos totais foi de 3,08 log(UFC/g) para aproximadamente 7 log(UFC/g) ao 16º dia nas amostras embaladas com FQ enquanto que o controlo apresentou um aumento mais acentuado de 3,08 log(UFC/g) para aproximadamente 10 log(UFC/g) (Nowzari et al., 2013).

Qiu et al., (2014) revelou que a contagem total inicial efetuada a robalo (*Lateolabrax japonicas*) armazenado a 4 °C durante 12 dias foi de 3,33 log(UFC/g) e aumentou nas amostras de peixe revestidas por quitosano a 1,5% (m/v), quitosano a 1,5% (m/v) e ácido cítrico a 0,5% (m/v) e controlo até 6,06 log(UFC/g), 5,54

log(UFC/g) e 6,44 log(UFC/g), respetivamente, semelhante ao que ocorreu no presente trabalho experimental.

Num estudo realizado por Yang et al. (2014) a salmão observou que a contagem total de microrganismos no dia 0 foi de 4,7 log(UFC/g), atingindo 9,2 log(UFC/g) nas amostras controlo ao fim de 12 dias de armazenamento a 4 °C e 5,5 log(UFC/g) para amostras irradiadas a 3 kGy com embalamento a vácuo.

Noutro estudo efetuado por Nicorescu et al. (2014) a salmão refrigerado a 4 °C foi realizado um tratamento por irradiação com 30 J/cm² que permitiu a inativação microbiana de 0,99 ± 0,24 log(UFC/g) no dia 0, de 1,6 ± 0,32 log(UFC/g) no dia 4, e ao 7º dia uma redução ainda superior da população microbiana de 3,4 ± 0,23 log(UFC/g).

Segundo Santos (2008), os filetes de pregado (*Psetta maxima*) embalados em atmosfera modificada apresentaram inicialmente uma contagem de microrganismos totais de 4 log(UFC/g) e que a vida útil o grupo controlo foi inferior a 10 dias porque ultrapassou o limite máximo de 7 log(UFC/g). Nas embalagens com 40% de CO₂ a vida útil prolongou-se por mais alguns dias, mas foi inferior a 15 dias. As embalagens como maior concentração de CO₂ (80%) não ultrapassaram o limite de aceitabilidade de 7 log(UFC/g) durante os 30 dias de armazenamento a 4 °C.

De acordo com Sallam et al. (2007b) as amostras de salmão (*Onchorhynchus nerka*) apresentaram uma contagem inicial microrganismos mesófilos totais de aproximadamente 3 log(UFC/g) e ao 6º dia de armazenamento a 1 °C as diferentes amostras tratadas com acetato de sódio, lactato de sódio e citrato de sódio apresentaram contagens abaixo de 6 log(UFC/g) enquanto que as amostras de salmão controlo apresentaram um valor de 6,53 log(UFC/g) próximo do limite máximo recomendado de 7 log(UFC/g) em peixe cru.

No estudo realizado por Günlü & Koyun (2013) as contagens iniciais dos microrganismos mesófilos em robalo (*Dicentrarchus labrax*) foram de 5,69 log(UFC/g). O limite aceitável de 7 log(UFC/g) foi alcançado nas amostras controlo após 5 dias de armazenamento a 4 °C, contudo as amostras armazenadas a vácuo com FQ apenas chegaram perto do limite após 30 dias de armazenamento.

Outro estudo realizado em salmão (*Salmo salar*) armazenado a 5,9 °C, as amostras controlo apresentaram valores mais elevados que as amostras revestidas com 1,5% de quitosano. O quitosano permitiu proteger as amostras de se degradarem

mantendo os valores em $2,86 \pm 2,45 \log(\text{UFC/g})$ mesmo após 250 dias de refrigeração (Soares et al., 2015).

3.3.2. Contagem de Microrganismos Psicrotróficos

Os microrganismos Psicrotróficos presentes nas amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo do tempo de armazenamento encontram-se representados na Figura 3.11 (Anexo D, Tabela IV a VI).

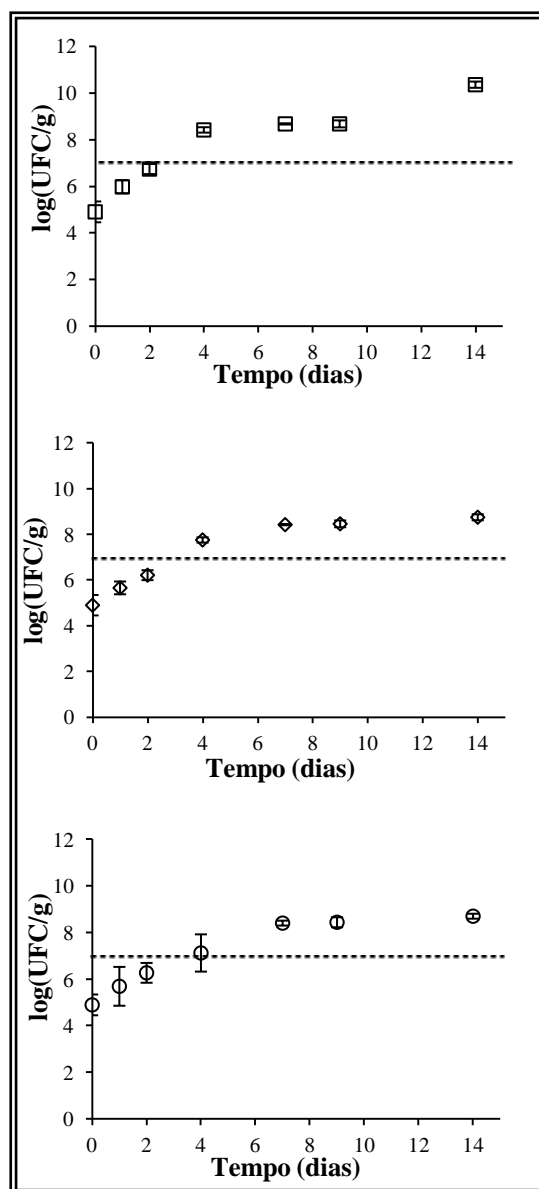


Figura 3.11. Evolução dos microrganismos Psicrotróficos ao longo do armazenamento a 5 °C das amostras de salmão. □ Controlo; ◇ FQ; ○ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol. O limite máximo permitido para o consumo é de 7,0 log(UFC/g) encontra-se representado pela linha horizontal (Alak et al., 2010; Liu et al., 2010; Nowzari et al., 2013).

Os microrganismos psicrotróficos são um grupo importante responsável pela deterioração aeróbia de peixes frescos armazenados em temperaturas de refrigeração (Günlü & Koyun, 2013). O limite máximo recomendável de microrganismos psicrotróficos para peixes crus é de 7 log(UFC/g) (Alak et al., 2010; Liu et al., 2010; Nowzari et al., 2013). As amostras controlo ultrapassaram esse valor ao 4º dia de armazenamento a 5 °C com $8,41 \pm 0,24$ log(UFC/g), as amostras embaladas com FQ também atingiram o valor limite ao 4º dia com $7,75 \pm 0,29$ log(UFC/g), enquanto que as amostras com FQM chegaram ao limite máximo também ao 4º dia de refrigeração mas com um valor mais baixo que as restantes situações em estudo $7,12 \pm 0,80$ log(UFC/g).

Na contagem de psicrotróficos observou-se que do dia 0 ao dia 2 registaram-se diferenças significativas no controlo e FQ ($p < 0,05$), os valores variaram de $4,89 \pm 0,45$ para $6,73 \pm 0,10$ log(UFC/g) e $6,21 \pm 0,22$ log(UFC/g), respetivamente.

Em relação às amostras controlo observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) do dia 2 para o dia 4 de $6,73 \pm 0,10$ para $8,41 \pm 0,24$ log(UFC/g), respetivamente. No que diz respeito ao FQ também se verificou um aumento do 2º para o 4º dias de armazenamento, de $6,21 \pm 0,22$ para $7,75 \pm 0,12$ log(UFC/g), respetivamente. O que permitiu verificar a degradação ao 4º dia das amostras a nível microbiológico nas amostras controlo e FQ. Estas bactérias são o principal grupo de microrganismos responsáveis pela deterioração dos peixes frescos armazenados em temperaturas refrigeradas (Nowzari et al., 2013).

Para o FQM nos primeiros 4 dias de armazenamento as amostras não apresentaram uma variação menor nas contagens de microrganismos psicrotróficos comparativamente com as amostras embaladas controlo e FQ. As amostras embaladas com FQM apenas ultrapassaram o limite máximo de 7,0 log(UFC/g) ao 7º dia de armazenamento apresentando um valor de $8,40 \pm 0,11$ log(UFC/g). O que permitiu constatar que a libertação dos agentes naturais para as amostras de salmão transmitiu um efeito benéfico ao salmão. Ou seja, a ação dos compostos polifenólicos e os ácidos fenólicos com atividade antibacteriana e antioxidante foi significativa. Estes compostos conferem um efeito inibitório principalmente contra microrganismos Gram positivos. Os polifenóis podem penetrar a membrana semipermeável bacteriana e reagir com citoplasma ou proteínas celulares, desestabilizando as células microbianas (Corrales et al., 2014).

Num estudo com filetes de peixe Bonito (*Sarda sarda*) refere que as amostras controlo ao 6º dia de armazenamento a 4 °C apresentaram 7 log(UFC/g) de bactérias psicrotróficas. No entanto, o crescimento das bactérias psicrotróficas embaladas com FQ a 1,5% (m/v) foi mais lento do que no grupo de amostras controlo, atingindo 7 log(UFC/g) no último dia de análise, 15º dia (Alak et al., 2010).

Os psicrotróficos iniciais de filetes de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram de 2,75 log(UFC/g) e de aproximadamente 7 log(UFC/g) no 16º dia nos filetes embalados com quitosano, no entanto o controlo apresentou no último dia de análise próximo de 9 log(UFC/g) (Nowzari et al., 2013).

Segundo Liu et al., (2010) a contagem de psicrotróficos do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*) coberto com uma fina película de polietileno de elevada permeabilidade ao oxigénio aumentou de 3,4 para 7,0 log(UFC/g) ao 13º dia e até 9,0 log(UFC/g) no final do armazenamento (29 dias) a 0 °C, confirmando o aumento das contagens de psicrotróficos no presente estudo.

De acordo com Sallam et al. (2007b) os resultados das amostras de salmão (*Onchorhynchus nerka*) estão de acordo com o presente trabalho experimental. Apresentaram uma contagem inicial microrganismos psicrotróficos de aproximadamente 4 log(UFC/g) e ao 15º dia de armazenamento a 1 °C as diferentes amostras tratadas com acetato de sódio, lactato de sódio e citrato de sódio apresentaram contagens de 7,12, 8,17 e 8,46 log(UFC/g), respetivamente, enquanto que as amostras de salmão controlo apresentaram um valor de 10,38 log(UFC/g).

Estudo similar, efetuado a robalo (*Dicentrarchus labrax*) observaram a presença de 4,87 log(UFC/g) inicialmente. As amostras controlo ultrapassaram esse limite antes do 5º dia de armazenamento, no entanto só passados 30 dias de armazenamento a 4 °C é que as amostras embaladas a vácuo com FQ atingiram o limite de 7 log(UFC/g), (Günlü & Koyun, 2013).

3.3.3. Contagem de *Pseudomonas spp.*

As *Pseudomonas spp.* presentes nas amostras de salmão controlo e salmão embalado com FQ e FQM ao longo do tempo de armazenamento encontram-se representadas na Figura 3.12 (Anexo D, Tabela VII a IX).

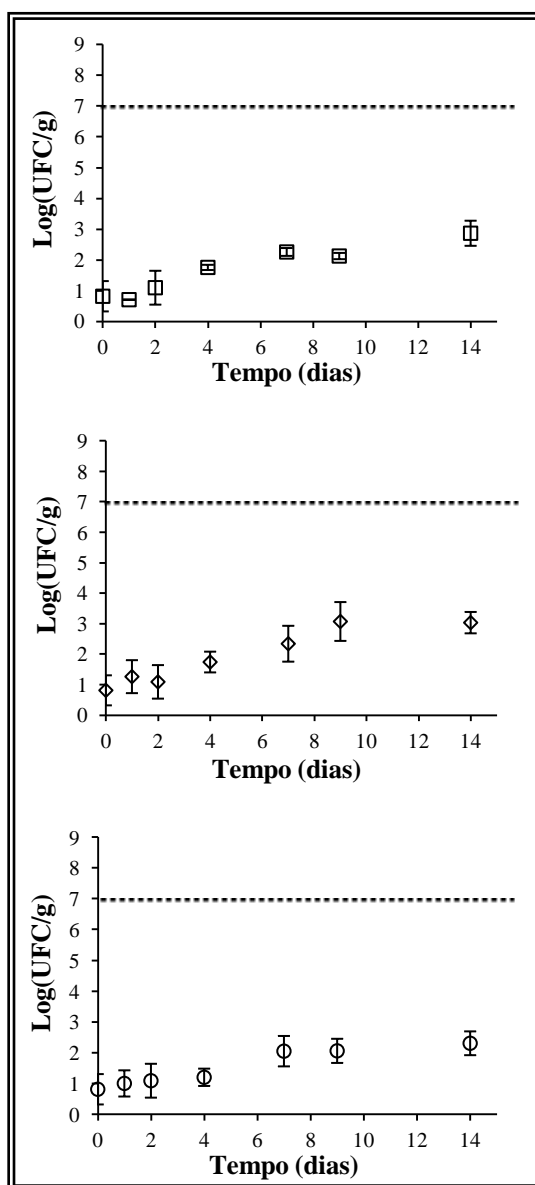


Figura 3.12. Evolução de *Pseudomonas spp.* ao longo do armazenamento a 5 °C das amostras de salmão. □ Controlo; ◇ FQ; ○ FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol. O limite máximo permitido para o consumo é de 7,0 log(UFC/g) encontra-se representado pela linha horizontal (Monitoring & Surveillance Series, 2010).

Em relação às *Pseudomonas spp.* não se observaram diferenças significativas entre o dia 0 e o dia 2 ($p>0,05$) no controlo, FQ e FQM, os valores variaram entre um mínimo de $0,70 \pm 0,00$ e um máximo de $1,09 \pm 0,55$ log(UFC/g).

Nas amostras controlo observou-se um aumento do dia 4 para o dia 7 de $1,75 \pm 0,08$ para $2,25 \pm 0,13$ log(UFC/g). No que diz respeito ao FQ verificaram-se diferenças significativas ($p<0,05$) do dia 2 para o dia 4 de $1,09 \pm 0,55$ para $1,74 \pm 0,34$ log(UFC/g), possivelmente derivado à variabilidade das amostras. Nas amostras embaladas com FQM do dia 0 ao dia 4 não existiram diferenças significativas ($p>0,05$), pelo que as amostras não se degradaram ao longo dos primeiros 4 dias de armazenamento. A partir do 4º dia de armazenamento verificou-se um aumento significativo ($p<0,05$) nas contagens de *Pseudomonas spp.*, ou seja a partir do 7º dia de armazenamento as amostras apresentaram um maior estado de degradação. Verificou-se ainda, que o crescimento dos microrganismos no FQM foi mais lento em relação aos valores médios das amostras controlo e das amostras revestidas com o FQ. Assim, o limite máximo permitido de $7,0$ log(UFC/g) não foi ultrapassado em nenhuma das três situações em estudo (Monitoring & Surveillance Series, 2010). O que está de acordo com o estudo de Vatavali et al. (2013) o peixe pargo vermelho as *Pseudomonas spp.* apresentaram uma contagem inicial de $3,4$ log(UFC/g) e seguiram uma tendência de aumento durante o armazenamento. No dia 13 de armazenamento a 4°C , as amostras revestidas com uma solução de quitosano a 2% (m/v) e óleo de orégão 0,1% (m/v) diminuíram $2,3$ log(UFC/g) ($p<0,05$) em relação ao controlo.

Num estudo realizado em filetes de peixe Bonito (*Sarda sarda*) a contagem de *Pseudomonas* ao 15º dia foi de $2,03$ log(UFC/g) nos filetes embalados com FQ a 1,5% (m/v). As amostras controlo e embaladas a vácuo atingiram esse valor ao 6º e 9º dias, respetivamente. A contagem de *Pseudomonas* em filetes com quitosano a 1,5 (m/v) apresentaram 1 e 2 log(UFC/g) mais baixo que o controlo ao longo do armazenamento a 4°C (Alak et al., 2010).

Segundo Liu et al., (2010) a contagem de *Pseudomonas spp* do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*) coberto com uma fina película de polietileno de elevada permeabilidade ao oxigénio aumentou de $3,4$ para $7,0$ log(UFC/g) ao 13º dia e até $9,0$ log(UFC/g) no final do armazenamento (29 dias) a 0°C , confirmando os resultados do presente estudo.

De acordo com Sallam et al. (2007b) as amostras de salmão (*Onchorhynchus nerka*) apresentaram uma contagem inicial *Pseudomonas spp* de aproximadamente 3 log(UFC/g) e ao 15º dia de armazenamento a 1 °C, as diferentes amostras tratadas com acetato de sódio, lactato de sódio e citrato de sódio apresentaram uma contagem de 6,08, 6,36 e 6,68 log(UFC/g), respetivamente, inferior às amostras de salmão controlo (8,73).

Em suma, através das análises microbiológicas verificou-se que as amostras de salmão embaladas com FQM mantiveram valores aceitáveis de microrganismos mesófilos totais, nos microrganismos psicrótróficos e nas *Pseudomonas spp*, até entre o 4º e o 7º dias de armazenamento.

4. Conclusões Finais

Este trabalho permitiu desenvolver os filmes de quitosano com microcápsulas de extrato de grainha de uva e carvacrol, pelo método de gelificação iônica que foi eficaz para a produção de microcápsulas esféricas capazes de serem incorporadas no FQ.

Concluiu-se que a incorporação das microcápsulas com extrato de grainha de uva e carvacrol influenciaram as propriedades físico-químicas dos filmes aumentando a P_{VA} , P_{O_2} e P_{CO_2} no FQM comparativamente com o FQ. Relativamente à análise do EITF o FQM modificou o espectro achatando ligeiramente os picos devido aos extratos naturais presentes nas microcápsulas dos FQM.

Por outro lado este estudo permitiu comprovar o efeito benéfico dos FQM nas amostras de salmão armazenadas a nível físico-químico, sobretudo no ABVT e no pH, cujos valores estão em concordância, o FQM permitiu manter as amostras com valores mais baixos durante mais tempo, comparativamente com as amostras embaladas com FQ e na luminosidade também se concluiu que o FQM manteve os valores mais próximos dos valores iniciais que as amostras embaladas com FQ. A nível microbiológico concluiu-se que as amostras controlo e FQ degradaram-se mais rapidamente que as amostras embaladas com FQM. Relativamente à carga microbiana dos mesófilos totais, psicrotróficos e às *Pseudomonas spp.* observou-se que as amostras embaladas com FQM mantiveram os valores médios mais baixos que as amostras controlo e embaladas com FQ, demonstrando o efeito das propriedades antimicrobianas e antioxidantes do extrato de grainha de uva e carvacrol presentes nas microcápsulas, que permitiram retardar a degradação diminuindo a velocidade de desnaturação das proteínas e a oxidação de lípidos que ocorrem normalmente nas amostras de salmão refrigerado e que levam à sua deterioração, mantendo-as aceitáveis entre o 4º e 7º dias de armazenamento, aumentando assim o tempo de vida útil de salmão refrigerado.

Pode-se ainda concluir que os FQM poderão ser uma alternativa sustentável aos materiais de plástico derivados de petróleo, que não são biodegradáveis, uma vez que os biopolímeros são derivados de recursos renováveis e baratos. A produção destes FQM poderá valorizar os subprodutos de indústrias e aumentar o tempo de vida útil de alimentos.

Assim, o grande desafio destes filmes será posteriormente desenvolvê-los a nível industrial para uma substituição a médio longo prazo dos filmes tradicionais.

5. Perspetivas de Trabalho Futuro

Após o estudo realizado seria interessante dar continuidade a esta investigação e variar as concentrações, por exemplo, do TPP na produção das microcápsulas para formar microcápsulas mais e/ou menos resistentes dependendo do alimento em estudo.

Estas microcápsulas podem ainda ser estudadas noutros filmes tanto bioativos como sintéticos e estudar o efeito desses filmes em alimentos.

Diminuir o tamanho destas microcápsulas, produzindo nanocápsulas com extrato de grainha de uva e carvacrol para serem incorporadas no FQ.

Estudar o efeito de filmes incorporados com estes extratos naturais em salmão refrigerado.

Estudar o efeito deste filme embalando a posta de salmão completamente com o FQM de extrato de grainha de uva e carvacrol. Seria ainda interessante, aplicar este FQM noutras matrizes alimentares, para verificar qual o efeito em amostras armazenadas com vista a uma extensão da vida útil.

6. Referências Bibliográficas

- Abdou, E. S., Osheba, A., & Sorour, M. (2012). Effect of chitosan and chitosan-nanoparticles as active coating on microbiological characteristics of fish fingers. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2(7), 158–169.
- Aguilar, K., Tello, F., Bierhalz, A. C. K., Romo, M. G., Flores, H. E., & Grosso, C. R. F. (2015). Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. *Journal of Food Engineering*, 154, 17–24. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.12.020.
- Aguirre, a., Borneo, R., & León, a. E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2–9. doi:10.1016/j.fbio.2012.12.001.
- Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A., (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes, *Food Chemistry*, 190, 614–621. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.117.
- Alak, G., Hisar, S. A., Hisar, O., Kaban, G., & Kaya, M. (2010). Microbiological and chemical properties of Bonito fish (*Sarda sarda*) fillets packaged with chitosan film, modified atmosphere and vacuum. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 73–80.
- Alvarez, M. V., Ponce, A. G., & Moreira, R. (2013). LWT - Food Science and Technology Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli, 50, 78–87.
- Antoniu, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137–146. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.10.040.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2015). Development of active films of chitosan isolated by mild extraction with added protein concentrate from shrimp waste. *Food Hydrocolloids* 43. 91-99. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.05.006.
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., & Lyon, C. B. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220–243.
- ASTM E96-92, 1990. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. In: Annual Book of ASTM. American Society for Testing & Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM-D-3985-02, 2002. Standard Test Method for Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor. In: Annual Book of ASTM. American Society for Testing & Materials, Philadelphia, PA.
- Aubourg, S. P., Quitral, V., Angélica Larraín, M., Rodríguez, A., Gómez, J., Maier, L., & Vinagre, J. (2007). Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chemistry*, 104(1), 369–375. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.066.
- Bhumkar, D. R., & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *AAPS PharmSciTech*, 7(2), E50. doi:10.1208/pt070250.

- Boamah, P. O., Huang, Y., Hua, M., Zhang, Q., Wu, J., Onumah, J., Sam-Amoah, L. K., & Boamah, P. O. (2015). Sorption of heavy metal ions onto carboxylate chitosan derivatives—A mini-review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *116*, 113–120. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.01.012.
- Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids* *35*. 463-470. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.07.002.
- Bourdon A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M. R., Avides, M. C., Quintas, M. C. A., & Vicente, A. A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*. *106*. 111–118. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.03.024.
- Broek, L. A. M., Knoop, R. J. I., Kappen, F. H. J., & Boeriu, C. G. (2015). Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, *116*, 237–242. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.039.
- Coles, R., & Kirwan, M. (2011). *Food and Beverage Packaging Technology* (Second.). Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd.
- Commission Regulation (EC) N° 450. (2009). On active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*.
- Concollato, A., Parisi, G., Olsen, R. E., Kvamme, B. O., Slinde, E., & Dalle Zotte, A. (2014). Effect of carbon monoxide for Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) slaughtering on stress response and fillet shelf life. *Aquaculture*, *433*, 13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.05.040.
- Corrales, M., Fernández, A. ., & Han, J. H. (2014). *Antimicrobial Packaging Systems*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-12-394601-0.00007-2.
- Costa, J. M. G., Borges, S. V., Hijo, A. A. C. T., Silva, E. K., Marques, G. R., Cirillo, M. Â., & Azevedo, V. M. De. (2013). Matrix structure selection in the microparticles of essential oil oregano produced by spray dryer. *Journal of Microencapsulation*, *30*(8), 717–27. doi:10.3109/02652048.2013.778909.
- Cruz-Romero, M. C., Murphy, T., Morris, M., Cummins, E., & Kerry, J. P. (2013). Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control*, *34*(2), 393–397. doi:10.1016/j.foodcont.2013.04.042.
- Dash, M. Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. *36*. 981–1014. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science & Engineering. C*, *33*(4), 1819–41. doi:10.1016/j.msec.2013.01.010.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science & Technology*, *31*. doi:10.1016/j.tifs.2013.04.001.
- Fabra, M. J., López-Rubio, A., Lagaron, J. M. (2014). *Smart Polymers and their Applications: Biopolymers for food packaging*. doi:10.1533/9780857097026.2.476.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(10), 510–523. doi:10.1016/j.tifs.2010.08.003.

- Fang, Z. & Bhandari, B. (2012). Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals, Chapter 4. Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation, in *Food Science, Technology and Nutrition*, Pages 73–109. doi:10.1533/9780857095909.2.73.
- FAO. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- FAO. (2014). Appropriate food packaging solutions for developing. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J. M., & Ocio, M. J. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control*, 34(1), 61–68. doi:10.1016/j.foodcont.2013.03.047.
- Günlü, A., & Koyun, E. (2013). Effects of Vacuum Packaging and Wrapping with Chitosan-Based Edible Film on the Extension of the Shelf Life of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets in Cold Storage (4 °C). *Food and Bioprocess Technology*, 6(7), 1713–1719. doi:10.1007/s11947-012-0833-6.
- Higueras, L., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2015). Incorporation of hydroxypropyl- β -cyclodextrins into chitosan films to tailor loading capacity for active aroma compound carvacrol. *Food Hydrocolloids*, 43, 603–611. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.07.017.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015a). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare L.* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403–413. doi:10.1016/j.indcrop.2015.01.062.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015b). Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids* 44, 172–182. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.09.004.
- Hui, P. C.-L., Wang, W.-Y., Kan, C.-W., Ng, F. S.-F., Zhou, C.-E., Wat, E., & Leung, P.-C. (2013). Preparation and Characterization of chitosan/sodium alginate (CSA) microcapsule containing Cortex Moutan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 434, 95–101. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.05.043.
- ISO 17410 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *psychrotrophic* microorganisms.
- Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Koocheki, A. (2014). Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 99, 537–546. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.077.
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2013). Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 321–326. doi:10.1016/j.lwt.2013.01.019.
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 708–716. doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.099.
- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K. J. K. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94(2), 220–7. doi:10.1016/j.meatsci.2013.01.007.
- Khoshgozaran-Abras, S., Azizi, M. H., Hamidy, Z., & Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a

- function of Aloe vera gel incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2058–2062. doi:10.1016/j.carbpol.2011.10.020.
- Kurek, M., Moundanga, S., Favier, C., Galić, K., & Debeaufort, F. (2013). Antimicrobial efficiency of carvacrol vapour related to mass partition coefficient when incorporated in chitosan based films aimed for active packaging. *Food Control*, 32(1), 168–175. doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.049.
- Leceta, I., Guerrero, P., Cabezudo, S., & Caba, K. D. La. (2013). Environmental assessment of chitosan-based films. *Journal of Cleaner Production*, 41, 312–318. doi:10.1016/j.jclepro.2012.09.049.
- Lee & Rahman, 2014, *Innovations in Food Packaging*. 8 - Intelligent Packaging for Food Products. *Elsevier*. doi: 10.1016/B978-0-12-394601-0.00008-4.
- Li, J., Miao, J., Wu, J., Chen, S., & Zhang, Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37, 166–173. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.015.
- Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013a). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, 138(2-3), 821–8. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.092.
- Li, Y., Ai, L., Yokoyama, W., Shoemaker, C. F., Wei, D., Ma, J., & Zhong, F. (2013b). Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(13), 3311–9. doi:10.1021/jf305074q.
- Liu, J., Liu, C., Liu, Y., Chen, M., Hu, Y., & Yang, Z. (2013). Study on the grafting of chitosan-gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 109, 103–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.03.040.
- Liu, S., Fan, W., Zhong, S., Ma, C., Li, P., & Zhou, K. (2010). Quality evaluation of tray-packed tilapia fillets stored at C based on sensory, microbiological, biochemical and physical attributes, 9, 692–701. doi:10.5897/AJB09.1369
- Lupo, B., Maestro, A., Gutiérrez, J. M., & González, C. (2014). Preparation of alginate microspheres by emulsification internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 38, 56–65.
- Ma, J., & Sahai, Y. (2013). Chitosan biopolymer for fuel cell applications. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 955–975. doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.015.
- Malmo, C., Storia, A., & Mauriello, G. (2011). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate soufflé. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 795–805. doi:10.1007/s11947-011-0755-8.
- Monitoring & Surveillance Series (2010). Microbiological quality of raw chicken fillets that are sold loose, but were previously distributed in gas flushed packaging (10NS3). *Food Safety*.
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S. M., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 477–484. doi:10.1016/j.lwt.2011.11.020.

- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182–6. doi:10.1016/j.copbio.2011.10.001.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 469–479. doi:10.1016/j.indcrop.2012.06.035.
- Nicorescu, I., Nguyen, B., Chevalier, S., & Orange, N. (2014). Effects of pulsed light on the organoleptic properties and shelf-life extension of pork and salmon. *Food Control*. doi:10.1016/j.foodcont.2014.03.052.
- Nowzari, F., Shábanpour, B., & Ojagh, S. M. (2013). Comparison of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 141(3), 1667–72. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.022.
- NP 2930. (1988). Pescado, Determinação do teor de azoto básico volátil total (A.B.V.T.). Método de Conway. Instituto Português da Qualidade.
- NP 4405. (2002). Microbiologia alimentar, Regras gerais para a contagem de microrganismos, Contagem de colónias a 30 °C.
- Osheba, A., Sorour, M. A., & Abdou, S. (2013). Effect of chitosan nanoparticles as active coating on chemical quality and oil uptake of fish fingers, 2(June), 1–14.
- Peng, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 282–9. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.04.019.
- Qiu, X., Chen, S., Liu, G., & Yang, Q. (2014). Quality enhancement in the Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets stored at 4 °C by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract. *Food Chemistry*, 162, 156–60. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.037.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., & Garrigós, M. D. C. (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 470–477. doi:10.1016/j.lwt.2014.04.019.
- Reddy, G. V. B., Sen, a R., Nair, P. N., Reddy, K. S., Reddy, K. K., & Kondaiah, N. (2013). Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices. *Meat Science*, 95(2), 288–94. doi:10.1016/j.meatsci.2013.04.016.
- Regulamento (CE) N.º 450/2009. Relativo aos materiais e objetos ativos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Regulamento (CE) N.º 2074/2005, da Comissão de 5 de Dezembro de 2005, Jornal Oficial da União Europeia.
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., & Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425–1435. doi:10.1016/j.foodcont.2010.04.028.
- Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Nunes, M. R., Benvenuti, E. V., Suzane R. L.; Roseane, F. D.; Rutz, J. K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46, 138–146. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.053.

- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., & Vieira, M. C. (2013a). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, *115*(4), 466–474. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.07.009.
- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Khmelinskii, I., & Vieira, M. (2013b). Effect of antioxidant and optimal antimicrobial mixtures of carvacrol, grape seed extract and chitosan on different spoilage microorganisms and their application as coatings on different food matrices, *2*(April), 22–38.
- Sallam, K. I. (2007a). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry*, *101*(2), 592–600. doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.019.
- Sallam, K. I. (2007b). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, *18*(5): 566–575.
- Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Porta, A., Lauro, M. R., Russo, P., & Aquino, R. P. (2014). Technological properties and enhancement of antifungal activity of a *Paeonia rockii* extract encapsulated in a chitosan-based matrix. *Journal of Food Engineering*, *120*, 260–267. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.07.039.
- Santos, J. (2008). Filetes de pregado (*Psetta maxima*) embalados em atmosfera modificada: avaliação da qualidade física, química e microbiológica. *Dissertação Para Obtenção Do Grau de Mestre Em Controle de Qualidade*.
- Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J., & Prinyawiwatkul, W. (2007). The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage, *83*, 366–373. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.03.009.
- Shenvi, S., Ismail, a. F., & Isloor, A. M. (2014). Preparation and characterization study of PPEES/chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate. *Desalination*, *344*, 90–96. doi:10.1016/j.desal.2014.02.026.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 538–544. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.08.039.
- Silva-Weiss, Bifani, V., Ihl, M., Sobral P. J. A., Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids* *31*. 458-466. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.028.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Rosa, M. D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *19*(12), 634–643. doi:10.1016/j.tifs.2008.07.003.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 102–108. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.08.011.
- Soares, N. M. F., Oliveira, M. S. G., & Vicente A. A. (2015). LWT - Food Science and technology effects of glazing and chitosan-based coating application on frozen salmon preservation during six-month storage in industrial freezing chambers, *61*, 524–531. doi:10.1016/j.lwt.2014.12.009.
- Solval, K. M., Espinoza Rodezno, L. A., Moncada, M., Bankston, J. D., & Sathivel, S. (2014). Evaluation of chitosan nanoparticles as a glazing material for cryogenically

- frozen shrimp. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 172–180. doi:10.1016/j.lwt.2013.12.033.
- Song, H. Y., Shin, Y. J., & Song, K. Bin. (2012). Preparation of a barley bran protein–gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 541–547. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.07.010.
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., & Ma, X. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 181–9. doi:10.1016/j.carbpol.2013.03.068.
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. a, Ruiz, H. a, Martins, J. T., Casariego, A., Teixeira, J. a, & Vicente, A. a. (2010). Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11456–62. doi:10.1021/jf102366k.
- Tiwary, A. K., & Rana, V. (2010). Cross-linked chitosan films: effect of cross-linking density on swelling parameters. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(4), 443–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20884460>.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Mérrilon, J., Arola, L., Ardèvol, A, Bladé, C., Fernandez-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Blay, M., (2007). Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated raw 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4357-4365. doi: 10.1021/jf0633185.
- Vakili, M., Rafatullah, M., Salamatinia, B., Abdullah, A. Z., Ibrahim, M. H., Tan, K. B., Gholami, Z., Amouzgar, P. (2014). Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers*, 113, 115–130. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.007.
- Valdés, A., Mellinas, A. C., Ramos, M., Garrigós, M. C., & Jiménez, A. (2014). Natural additives and agricultural wastes in biopolymer formulations for food packaging. *Frontiers in Chemistry*, 2(February), 6. doi:10.3389/fchem.2014.00006.
- Vatavali, K., Karakosta, L., Nathanailides, C., Georgantelis, D., & Kontominas, M. G. (2013). Combined effect of chitosan and oregano essential oil dip on the microbiological, chemical, and sensory attributes of red porgy (*Pagrus pagrus*) stored in ice. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3510–3521. doi:10.1007/s11947-012-1034-z.
- Vieira H. C., Morgado F., Soares, A. M. V. M., & Abreu, S.N. (2015). Fish consumption recommendations to conform to current advice in regard to mercury intake. *Environmental Science and Pollution Research*. Springer. doi:10.1007/s11356-015-4635-z.
- Vimal, S., Majeed S., Taju, G., Nambi, K. S. N., Raj, N. S., Madan, N., Farrok, M A., Rajkumar, T., Gopinath, D., & Hameed, A. S. S. (2013). Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. *Acta Tropica*, 128(3), 486–93. doi:10.1016/j.actatropica.2013.07.013.
- Vodnar, D. C. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 on ham steak by tea bioactive compounds incorporated into chitosan-coated plastic films. *Chemistry Central Journal*. 6:74.
- Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J., & Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish

- preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(1), 7–16. doi:10.1016/j.fpsl.2014.04.004.
- Wu, Q. X., & Yao, S. J. (2013). Novel NaCS-CS-PPS microcapsules as a potential enzyme-triggered release carrier for highly-loading 5-ASA. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 109, 147–53. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.03.035.
- Yang, Z., Wang, H., Wang, W., Qi, W., Yue, L., & Ye, Q. (2014). Effect of 10 MeV E-beam irradiation combined with vacuum-packaging on the shelf life of Atlantic salmon fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 145, 535–41. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.095.
- Zhang, H., & Zhao, Y. (2015). Preparation, characterization and evaluation of tea polyphenol–Zn complex loaded β -chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 48, 260–273. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.02.015.

Anexos

Anexo A – Resultados dos Parâmetros Físico-químicos

Tabela I. Resultados do parâmetro Luminosidade ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	41,66 ± 1,62	41,66 ± 1,62	41,66 ± 1,62
1	49,14 ± 3,19	45,36 ± 1,79	45,41 ± 2,49
2	47,19 ± 0,72	48,60 ± 0,82	43,16 ± 2,87
4	47,93 ± 3,46	45,78 ± 2,52	46,27 ± 1,27
7	47,48 ± 2,57	47,15 ± 2,67	43,60 ± 1,12
9	50,53 ± 3,04	48,16 ± 0,67	45,23 ± 0,27
14	50,82 ± 1,60	48,53 ± 3,23	44,62 ± 3,19

Tabela II. Resultados do parâmetro *a* ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	15,32 ± 2,01	15,32 ± 2,01	15,32 ± 2,01
1	16,47 ± 1,52	17,14 ± 1,00	16,77 ± 1,28
2	15,84 ± 0,88	16,56 ± 1,19	17,14 ± 0,64
4	15,84 ± 1,22	16,07 ± 0,74	16,40 ± 0,51
7	13,45 ± 0,09	15,32 ± 0,51	16,98 ± 1,14
9	14,43 ± 1,62	16,73 ± 0,36	16,62 ± 1,71
14	14,27 ± 1,54	15,55 ± 1,02	16,61 ± 0,30

Tabela III. Resultados do parâmetro *b* ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	13,57 ± 1,68	13,57 ± 1,68	13,57 ± 1,68
1	14,91 ± 0,94	16,03 ± 1,44	16,40 ± 0,97
2	13,27 ± 1,26	14,97 ± 0,91	13,56 ± 1,53
4	14,55 ± 0,90	13,45 ± 0,64	14,55 ± 0,44
7	11,88 ± 0,46	12,56 ± 1,61	15,19 ± 1,26
9	12,16 ± 1,89	13,41 ± 1,21	14,77 ± 0,49
14	12,24 ± 0,45	12,24 ± 2,31	11,63 ± 1,39

Tabela IV. Resultados do parâmetro pH ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	6,21 ± 0,06	6,21 ± 0,06	6,21 ± 0,06
1	6,29 ± 0,06	6,31 ± 0,03	6,31 ± 0,05
2	6,21 ± 0,02	6,31 ± 0,05	6,33 ± 0,02
4	6,26 ± 0,08	6,27 ± 0,06	6,26 ± 0,05
7	6,64 ± 0,10	6,44 ± 0,11	6,26 ± 0,05
9	6,81 ± 0,09	6,49 ± 0,06	6,31 ± 0,11
14	7,10 ± 0,10	6,83 ± 0,11	6,69 ± 0,08

Tabela V. Resultados do ABVT ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo (mg ABVT/100 g)	FQ (mg ABVT/100 g)	FQM (mg ABVT/100 g)
0	12,42 ± 3,25	12,42 ± 3,25	12,42 ± 3,25
1	10,91 ± 4,74	16,01 ± 11,86	12,96 ± 2,46
2	16,50 ± 5,55	14,93 ± 5,57	17,99 ± 4,44
4	44,98 ± 0,15	26,12 ± 0,55	16,71 ± 6,16
7	65,62 ± 6,92	41,64 ± 2,83	36,66 ± 4,18
9	74,23 ± 8,10	45,98 ± 8,26	46,67 ± 6,48
14	116,29 ± 14,37	111,24 ± 12,55	76,65 ± 10,76

Tabela VI. Resultados da carga aplicada das amostras de salmão ao longo do armazenamento.

Tempo (dias)	Controlo (g)	FQ (g)	FQM (g)
0	123,01 ± 25,77	123,01 ± 25,77	123,01 ± 25,77
1	125,02 ± 34,38	120,10 ± 43,09	143,53 ± 17,67
2	128,24 ± 29,95	118,60 ± 18,75	123,69 ± 13,72
4	136,60 ± 34,31	124,33 ± 23,04	125,53 ± 17,85
7	120,73 ± 31,32	123,18 ± 32,48	130,04 ± 35,53
9	103,36 ± 40,80	102,51 ± 23,04	138,58 ± 31,74
14	123,02 ± 24,66	87,16 ± 20,74	118,18 ± 26,73

Tabela VII. Resultados da coesividade das amostras de salmão ao longo do armazenamento.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02
1	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,17 ± 0,03
2	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,17 ± 0,03
4	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,03
7	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,03
9	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,03
14	0,22 ± 0,05	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,04

Tabela VIII. Resultados da gomosidade das amostras de salmão ao longo do armazenamento.

Tempo (dias)	Controlo (g)	FQ (g)	FQM (g)
0	23,39 ± 5,56	23,39 ± 5,56	23,39 ± 5,56
1	27,41 ± 8,28	36,89 ± 20,18	21,85 ± 8,12
2	25,13 ± 7,13	25,38 ± 6,94	18,77 ± 7,06
4	27,29 ± 7,72	23,60 ± 2,46	24,40 ± 6,37
7	25,44 ± 6,99	30,02 ± 9,62	34,31 ± 9,53
9	25,55 ± 11,63	26,14 ± 3,79	33,15 ± 8,52
14	27,65 ± 10,81	23,10 ± 6,02	31,91 ± 8,34

Tabela IX. Resultados da mastigabilidade das amostras de salmão ao longo do armazenamento.

Tempo (dias)	Controlo (gmm)	FQ (gmm)	FQM (gmm)
0	45,78 ± 17,78	45,78 ± 17,78	45,78 ± 17,78
1	54,04 ± 24,74	77,07 ± 57,69	43,50 ± 7,78
2	45,68 ± 14,53	47,95 ± 21,16	41,81 ± 11,75
4	48,79 ± 13,87	46,15 ± 12,29	44,70 ± 17,57
7	49,40 ± 22,54	62,25 ± 24,32	76,17 ± 26,02
9	38,81 ± 23,12	48,02 ± 14,04	72,88 ± 25,58
14	42,09 ± 13,98	42,57 ± 14,61	70,75 ± 18,60

Tabela X. Resultados da adesividade das amostras de salmão ao longo do armazenamento.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	-60,56 ± 26,51	-60,56 ± 26,51	-60,56 ± 26,51
1	-30,38 ± 17,11	-25,66 ± 12,28	-29,94 ± 7,62
2	-27,18 ± 7,17	-18,20 ± 10,29	-32,93 ± 12,63
4	-29,77 ± 5,50	-30,05 ± 16,09	-30,81 ± 15,26
7	-33,26 ± 7,68	-38,31 ± 14,62	-32,89 ± 12,00
9	-16,81 ± 7,82	-23,70 ± 4,53	-41,72 ± 13,32
14	-24,35 ± 4,61	-45,02 ± 8,70	-37,89 ± 14,52

Tabela XI. Resultados da elasticidade das amostras de salmão ao longo do armazenamento.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	1,92 ± 0,37	1,92 ± 0,37	1,92 ± 0,37
1	1,89 ± 0,35	1,94 ± 0,42	1,76 ± 0,24
2	1,81 ± 0,23	1,83 ± 0,28	2,01 ± 0,34
4	1,82 ± 0,30	1,94 ± 0,39	1,78 ± 0,27
7	1,88 ± 0,43	2,06 ± 0,29	2,21 ± 0,28
9	1,29 ± 0,62	1,81 ± 0,31	2,19 ± 0,42
14	1,56 ± 0,26	1,80 ± 0,32	2,23 ± 0,18

Tabela XII. Resultados do teor de humidade ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo (%)	FQ (%)	FQM (%)
0	59,52 ± 3,24	59,52 ± 3,24	59,52 ± 3,24
1	50,90 ± 2,42	51,71 ± 4,36	51,30 ± 3,10
2	53,53 ± 4,11	47,57 ± 4,36	50,93 ± 10,10
4	53,04 ± 7,61	48,88 ± 3,45	44,40 ± 2,46
7	58,06 ± 5,15	50,30 ± 0,57	52,67 ± 4,29
9	55,69 ± 0,16	55,10 ± 4,38	45,25 ± 14,50
14	52,15 ± 1,75	55,63 ± 4,53	53,87 ± 8,26

Tabela XIII. Resultados do atividade da água ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo	FQ	FQM
0	0,977 ± 0,001	0,977 ± 0,001	0,977 ± 0,001
1	0,977 ± 0,001	0,973 ± 0,000	0,974 ± 0,002
2	0,976 ± 0,006	0,973 ± 0,000	0,978 ± 0,002
4	0,982 ± 0,002	0,981 ± 0,001	0,976 ± 0,001
7	0,982 ± 0,000	0,984 ± 0,002	0,982 ± 0,002
9	0,981 ± 0,005	0,983 ± 0,001	0,984 ± 0,001
14	0,984 ± 0,012	0,983 ± 0,008	0,983 ± 0,002

Anexo B – Análise Estatística dos Parâmetros Físico-químicos

Tabela I. Teste da diferença mínima significativa da Luminosidade das amostras controlo ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias	Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%			
				Limite Inferior	Limite Superior		
<i>L</i> Controlo	0	1	-7,4791*	1,02230	,000	-9,5227	-5,4356
		2	-5,5358*	1,02230	,000	-7,5793	-3,4922
		4	-6,2680*	1,02230	,000	-8,3116	-4,2244
		7	-5,8191*	1,02230	,000	-7,8627	-3,7756
		9	-8,8680*	1,02230	,000	-10,9116	-6,8244
		14	-9,1591*	1,02230	,000	-11,2027	-7,1156
	1	0	7,4791*	1,02230	,000	5,4356	9,5227
		2	1,9433	1,14297	,094	-,3414	4,2281
		4	1,2111	1,14297	,293	-1,0736	3,4959
		7	1,6600	1,14297	,151	-,6248	3,9448
		9	-1,3889	1,14297	,229	-3,6736	,8959
		14	-1,6800	1,14297	,147	-3,9648	,6048
	2	0	5,5358*	1,02230	,000	3,4922	7,5793
		1	-1,9433	1,14297	,094	-4,2281	,3414
		4	-,7322	1,14297	,524	-3,0170	1,5525
		7	-,2833	1,14297	,805	-2,5681	2,0014
		9	-3,3322*	1,14297	,005	-5,6170	-1,0475
		14	-3,6233*	1,14297	,002	-5,9081	-1,3386
	4	0	6,2680*	1,02230	,000	4,2244	8,3116
		1	-1,2111	1,14297	,293	-3,4959	1,0736
		2	,7322	1,14297	,524	-1,5525	3,0170
		7	,4489	1,14297	,696	-1,8359	2,7336
		9	-2,6000*	1,14297	,026	-4,8848	-,3152
		14	-2,8911*	1,14297	,014	-5,1759	-,6064
	7	0	5,8191*	1,02230	,000	3,7756	7,8627
		1	-1,6600	1,14297	,151	-3,9448	,6248
		2	,2833	1,14297	,805	-2,0014	2,5681
		4	-,4489	1,14297	,696	-2,7336	1,8359
9		-3,0489*	1,14297	,010	-5,3336	-,7641	
14		-3,3400*	1,14297	,005	-5,6248	-1,0552	
9	0	8,8680*	1,02230	,000	6,8244	10,9116	
	1	1,3889	1,14297	,229	-,8959	3,6736	
	2	3,3322*	1,14297	,005	1,0475	5,6170	
	4	2,6000*	1,14297	,026	,3152	4,8848	
	7	3,0489*	1,14297	,010	,7641	5,3336	
	14	-,2911	1,14297	,800	-2,5759	1,9936	
14	0	9,1591*	1,02230	,000	7,1156	11,2027	
	1	1,6800	1,14297	,147	-,6048	3,9648	
	2	3,6233*	1,14297	,002	1,3386	5,9081	
	4	2,8911*	1,14297	,014	,6064	5,1759	
	7	3,3400*	1,14297	,005	1,0552	5,6248	
	9	,2911	1,14297	,800	-1,9936	2,5759	

Tabela II. Teste da diferença mínima significativa da Luminosidade das amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
L FQ	0	1	-3,7036*	,86789	,000	-5,4384	-1,9687
		2	-6,9391*	,86789	,000	-8,6740	-5,2042
		4	-4,1191*	,86789	,000	-5,8540	-2,3842
		7	-5,4924*	,86789	,000	-7,2273	-3,7576
		9	-6,4991*	,86789	,000	-8,2340	-4,7642
		14	-6,8691*	,86789	,000	-8,6040	-5,1342
	1	0	3,7036*	,86789	,000	1,9687	5,4384
		2	-3,2356*	,97033	,001	-5,1752	-1,2959
		4	-,4156	,97033	,670	-2,3552	1,5241
		7	-1,7889	,97033	,070	-3,7285	,1508
		9	-2,7956*	,97033	,005	-4,7352	-,8559
		14	-3,1656*	,97033	,002	-5,1052	-1,2259
	2	0	6,9391*	,86789	,000	5,2042	8,6740
		1	3,2356*	,97033	,001	1,2959	5,1752
4		2,8200*	,97033	,005	,8803	4,7597	
7		1,4467	,97033	,141	-,4930	3,3863	
9		,4400	,97033	,652	-1,4997	2,3797	
14		,0700	,97033	,943	-1,8697	2,0097	
4	0	4,1191*	,86789	,000	2,3842	5,8540	
	1	,4156	,97033	,670	-1,5241	2,3552	
	2	-2,8200*	,97033	,005	-4,7597	-,8803	
	7	-1,3733	,97033	,162	-3,3130	,5663	
	9	-2,3800*	,97033	,017	-4,3197	-,4403	
	14	-2,7500*	,97033	,006	-4,6897	-,8103	
7	0	5,4924*	,86789	,000	3,7576	7,2273	
	1	1,7889	,97033	,070	-,1508	3,7285	
	2	-1,4467	,97033	,141	-3,3863	,4930	
	4	1,3733	,97033	,162	-,5663	3,3130	
	9	-1,0067	,97033	,304	-2,9463	,9330	
	14	-1,3767	,97033	,161	-3,3163	,5630	
9	0	6,4991*	,86789	,000	4,7642	8,2340	
	1	2,7956*	,97033	,005	,8559	4,7352	
	2	-,4400	,97033	,652	-2,3797	1,4997	
	4	2,3800*	,97033	,017	,4403	4,3197	
	7	1,0067	,97033	,304	-,9330	2,9463	
	14	-,3700	,97033	,704	-2,3097	1,5697	
14	0	6,8691*	,86789	,000	5,1342	8,6040	
	1	3,1656*	,97033	,002	1,2259	5,1052	
	2	-,0700	,97033	,943	-2,0097	1,8697	
	4	2,7500*	,97033	,006	,8103	4,6897	
	7	1,3767	,97033	,161	-,5630	3,3163	
	9	,3700	,97033	,704	-1,5697	2,3097	

Tabela III. Teste da diferença mínima significativa da Luminosidade das amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
Dependente ao longo dos dias					Limite Inferior	Limite Superior	
<i>L FQM</i>	0	1	-3,7536*	,85883	,000	-5,4703	-2,0368
		2	-1,4991	,85883	,086	-3,2159	,2177
		4	-4,6091*	,85883	,000	-6,3259	-2,8923
		7	-1,9369*	,85883	,028	-3,6537	-,2201
		9	-3,5680*	,85883	,000	-5,2848	-1,8512
		14	-2,9636*	,85883	,001	-4,6803	-1,2468
	1	0	3,7536*	,85883	,000	2,0368	5,4703
		2	2,2544*	,96020	,022	,3350	4,1739
		4	-,8556	,96020	,376	-2,7750	1,0639
		7	1,8167	,96020	,063	-,1027	3,7361
		9	,1856	,96020	,847	-1,7339	2,1050
		14	,7900	,96020	,414	-1,1294	2,7094
	2	0	1,4991	,85883	,086	-,2177	3,2159
		1	-2,2544*	,96020	,022	-4,1739	-,3350
	4	-3,1100*	,96020	,002	-5,0294	-1,1906	
	7	-,4378	,96020	,650	-2,3572	1,4816	
	9	-2,0689*	,96020	,035	-3,9883	-,1495	
	14	-1,4644	,96020	,132	-3,3839	,4550	
4	0	4,6091*	,85883	,000	2,8923	6,3259	
	1	,8556	,96020	,376	-1,0639	2,7750	
	2	3,1100*	,96020	,002	1,1906	5,0294	
	7	2,6722*	,96020	,007	,7528	4,5916	
	9	1,0411	,96020	,282	-,8783	2,9605	
	14	1,6456	,96020	,092	-,2739	3,5650	
7	0	1,9369*	,85883	,028	,2201	3,6537	
	1	-1,8167	,96020	,063	-3,7361	,1027	
	2	,4378	,96020	,650	-1,4816	2,3572	
	4	-2,6722*	,96020	,007	-4,5916	-,7528	
	9	-1,6311	,96020	,094	-3,5505	,2883	
	14	-1,0267	,96020	,289	-2,9461	,8927	
9	0	3,5680*	,85883	,000	1,8512	5,2848	
	1	-,1856	,96020	,847	-2,1050	1,7339	
	2	2,0689*	,96020	,035	,1495	3,9883	
	4	-1,0411	,96020	,282	-2,9605	,8783	
	7	1,6311	,96020	,094	-,2883	3,5505	
	14	,6044	,96020	,531	-1,3150	2,5239	
14	0	2,9636*	,85883	,001	1,2468	4,6803	
	1	-,7900	,96020	,414	-2,7094	1,1294	
	2	1,4644	,96020	,132	-,4550	3,3839	
	4	-1,6456	,96020	,092	-3,5650	,2739	
	7	1,0267	,96020	,289	-,8927	2,9461	
	9	-,6044	,96020	,531	-2,5239	1,3150	

Tabela IV. Teste da diferença mínima significativa do parâmetro *a* das amostras de salmão controlo ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
<i>a</i> Controlo	0	1	-2,5360*	,94721	,011	-4,4489	-,6231
		2	-,0177	,72344	,981	-1,4787	1,4434
		4	-,5271	,63147	,409	-1,8024	,7482
		7	1,8707	,94721	,055	-,0423	3,7836
		9	,0457	,72344	,950	-1,4154	1,5067
		14	1,2940	,72344	,081	-,1670	2,7550
	1	0	2,5360*	,94721	,011	,6231	4,4489
		2	2,5183*	1,05901	,022	,3796	4,6571
		4	2,0089	,99845	,051	-,0075	4,0253
		7	4,4067*	1,22284	,001	1,9371	6,8762
		9	2,5817*	1,05901	,019	,4429	4,7204
		14	3,8300*	1,05901	,001	1,6913	5,9687
	2	0	,0177	,72344	,981	-1,4434	1,4787
		1	-2,5183*	1,05901	,022	-4,6571	-,3796
	4	-,5094	,78934	,522	-2,1036	1,0847	
	7	1,8883	1,05901	,082	-,2504	4,0271	
	9	,0633	,86468	,942	-1,6829	1,8096	
	14	1,3117	,86468	,137	-,4346	3,0579	
4	0	,5271	,63147	,409	-,7482	1,8024	
	1	-2,0089	,99845	,051	-4,0253	,0075	
	2	,5094	,78934	,522	-1,0847	2,1036	
	7	2,3978*	,99845	,021	,3814	4,4142	
	9	,5728	,78934	,472	-1,0213	2,1669	
	14	1,8211*	,78934	,026	,2270	3,4152	
7	0	-1,8707	,94721	,055	-3,7836	,0423	
	1	-4,4067*	1,22284	,001	-6,8762	-1,9371	
	2	-1,8883	1,05901	,082	-4,0271	,2504	
	4	-2,3978*	,99845	,021	-4,4142	-,3814	
	9	-1,8250	1,05901	,092	-3,9637	,3137	
	14	-,5767	1,05901	,589	-2,7154	1,5621	
9	0	-,0457	,72344	,950	-1,5067	1,4154	
	1	-2,5817*	1,05901	,019	-4,7204	-,4429	
	2	-,0633	,86468	,942	-1,8096	1,6829	
	4	-,5728	,78934	,472	-2,1669	1,0213	
	7	1,8250	1,05901	,092	-,3137	3,9637	
	14	1,2483	,86468	,156	-,4979	2,9946	
14	0	-1,2940	,72344	,081	-2,7550	,1670	
	1	-3,8300*	1,05901	,001	-5,9687	-1,6913	
	2	-1,3117	,86468	,137	-3,0579	,4346	
	4	-1,8211*	,78934	,026	-3,4152	-,2270	
	7	,5767	1,05901	,589	-1,5621	2,7154	
	9	-1,2483	,86468	,156	-2,9946	,4979	

Tabela V. Teste da diferença mínima significativa do parâmetro *a* das amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
<i>a</i> FQ	0	1	-,9293	,85445	,283	-2,6549	,7963
		2	-1,2427	,65259	,064	-2,5606	,0753
		4	-,8738	,56963	,133	-2,0242	,2766
		7	-,3927	,85445	,648	-2,1183	1,3329
		9	-1,4143*	,65259	,036	-2,7323	-,0964
		14	-,2293	,65259	,727	-1,5473	1,0886
		1	0	,9293	,85445	,283	-,7963
		2	-,3133	,95530	,745	-2,2426	1,6159
		4	,0556	,90067	,951	-1,7634	1,8745
		7	,5367	1,10309	,629	-1,6911	2,7644
		9	-,4850	,95530	,614	-2,4143	1,4443
		14	,7000	,95530	,468	-1,2293	2,6293
	2	0	1,2427	,65259	,064	-,0753	2,5606
		1	,3133	,95530	,745	-1,6159	2,2426
		4	,3689	,71204	,607	-1,0691	1,8069
		7	,8500	,95530	,379	-1,0793	2,7793
		9	-,1717	,78000	,827	-1,7469	1,4036
		14	1,0133	,78000	,201	-,5619	2,5886
	4	0	,8738	,56963	,133	-,2766	2,0242
		1	-,0556	,90067	,951	-1,8745	1,7634
		2	-,3689	,71204	,607	-1,8069	1,0691
		7	,4811	,90067	,596	-1,3378	2,3000
		9	-,5406	,71204	,452	-1,9785	,8974
		14	,6444	,71204	,371	-,7935	2,0824
	7	0	,3927	,85445	,648	-1,3329	2,1183
		1	-,5367	1,10309	,629	-2,7644	1,6911
		2	-,8500	,95530	,379	-2,7793	1,0793
		4	-,4811	,90067	,596	-2,3000	1,3378
		9	-1,0217	,95530	,291	-2,9509	,9076
		14	,1633	,95530	,865	-1,7659	2,0926
	9	0	1,4143*	,65259	,036	,0964	2,7323
		1	,4850	,95530	,614	-1,4443	2,4143
		2	,1717	,78000	,827	-1,4036	1,7469
		4	,5406	,71204	,452	-,8974	1,9785
		7	1,0217	,95530	,291	-,9076	2,9509
		14	1,1850	,78000	,136	-,3902	2,7602
	14	0	,2293	,65259	,727	-1,0886	1,5473
		1	-,7000	,95530	,468	-2,6293	1,2293
		2	-1,0133	,78000	,201	-2,5886	,5619
		4	-,6444	,71204	,371	-2,0824	,7935
		7	-,1633	,95530	,865	-2,0926	1,7659
		9	-1,1850	,78000	,136	-2,7602	,3902

Tabela VI. Teste da diferença mínima significativa do parâmetro a das amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%			
					Limite Inferior	Limite Superior		
a FQM	0	1	-2,5793*	,79026	,002	-4,1753	-,9834	
		2	-2,1160*	,60357	,001	-3,3349	-,8971	
		4	-1,0827*	,52684	,046	-2,1466	-,0187	
		7	-,6493	,79026	,416	-2,2453	,9466	
		9	-2,3577*	,60357	,000	-3,5766	-1,1387	
		14	-1,2760*	,60357	,041	-2,4949	-,0571	
		1	0	2,5793*	,79026	,002	,9834	4,1753
			2	,4633	,88354	,603	-1,3210	2,2477
			4	1,4967	,83301	,080	-,1856	3,1790
			7	1,9300	1,02022	,066	-,1304	3,9904
			9	,2217	,88354	,803	-1,5627	2,0060
			14	1,3033	,88354	,148	-,4810	3,0877
		2	0	2,1160*	,60357	,001	,8971	3,3349
			1	-,4633	,88354	,603	-2,2477	1,3210
		4	1,0333	,65855	,124	-,2966	2,3633	
		7	1,4667	,88354	,105	-,3177	3,2510	
		9	-,2417	,72140	,739	-1,6986	1,2152	
		14	,8400	,72140	,251	-,6169	2,2969	
	4	0	1,0827*	,52684	,046	,0187	2,1466	
		1	-1,4967	,83301	,080	-3,1790	,1856	
		2	-1,0333	,65855	,124	-2,3633	,2966	
		7	,4333	,83301	,606	-1,2490	2,1156	
		9	-1,2750	,65855	,060	-2,6050	,0550	
		14	-,1933	,65855	,771	-1,5233	1,1366	
	7	0	,6493	,79026	,416	-,9466	2,2453	
		1	-1,9300	1,02022	,066	-3,9904	,1304	
		2	-1,4667	,88354	,105	-3,2510	,3177	
		4	-,4333	,83301	,606	-2,1156	1,2490	
		9	-1,7083	,88354	,060	-3,4927	,0760	
		14	-,6267	,88354	,482	-2,4110	1,1577	
	9	0	2,3577*	,60357	,000	1,1387	3,5766	
		1	-,2217	,88354	,803	-2,0060	1,5627	
		2	,2417	,72140	,739	-1,2152	1,6986	
		4	1,2750	,65855	,060	-,0550	2,6050	
		7	1,7083	,88354	,060	-,0760	3,4927	
		14	1,0817	,72140	,141	-,3752	2,5386	
	14	0	1,2760*	,60357	,041	,0571	2,4949	
		1	-1,3033	,88354	,148	-3,0877	,4810	
		2	-,8400	,72140	,251	-2,2969	,6169	
		4	,1933	,65855	,771	-1,1366	1,5233	
		7	,6267	,88354	,482	-1,1577	2,4110	
		9	-1,0817	,72140	,141	-2,5386	,3752	

Tabela VII. Teste da diferença mínima significativa do parâmetro *b* das amostras de salmão controle ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
<i>b</i> Controle	0	1	-1,3504*	,54775	,016	-2,4454	-,2555
		2	,2962	,54775	,591	-,7987	1,3912
		4	-,9838	,54775	,077	-2,0787	,1112
		7	2,3096*	,54775	,000	1,2146	3,4045
		9	1,4096*	,54775	,012	,3146	2,5045
		14	1,3307*	,54775	,018	,2357	2,4256
	1	0	1,3504*	,54775	,016	,2555	2,4454
		2	1,6467*	,61240	,009	,4225	2,8708
		4	,3667	,61240	,552	-,8575	1,5908
		7	3,6600*	,61240	,000	2,4358	4,8842
		9	2,7600*	,61240	,000	1,5358	3,9842
		14	2,6811*	,61240	,000	1,4569	3,9053
	2	0	-,2962	,54775	,591	-1,3912	,7987
		1	-1,6467*	,61240	,009	-2,8708	-,4225
		4	-1,2800*	,61240	,041	-2,5042	-,0558
		7	2,0133*	,61240	,002	,7892	3,2375
		9	1,1133	,61240	,074	-,1108	2,3375
		14	1,0344	,61240	,096	-,1897	2,2586
	4	0	,9838	,54775	,077	-,1112	2,0787
		1	-,3667	,61240	,552	-1,5908	,8575
		2	1,2800*	,61240	,041	,0558	2,5042
		7	3,2933*	,61240	,000	2,0692	4,5175
		9	2,3933*	,61240	,000	1,1692	3,6175
		14	2,3144*	,61240	,000	1,0903	3,5386
	7	0	-2,3096*	,54775	,000	-3,4045	-1,2146
		1	-3,6600*	,61240	,000	-4,8842	-2,4358
		2	-2,0133*	,61240	,002	-3,2375	-,7892
		4	-3,2933*	,61240	,000	-4,5175	-2,0692
9		-,9000	,61240	,147	-2,1242	,3242	
14		-,9789	,61240	,115	-2,2031	,2453	
9	0	-1,4096*	,54775	,012	-2,5045	-,3146	
	1	-2,7600*	,61240	,000	-3,9842	-1,5358	
	2	-1,1133	,61240	,074	-2,3375	,1108	
	4	-2,3933*	,61240	,000	-3,6175	-1,1692	
	7	,9000	,61240	,147	-,3242	2,1242	
	14	-,0789	,61240	,898	-1,3031	1,1453	
14	0	-1,3307*	,54775	,018	-2,4256	-,2357	
	1	-2,6811*	,61240	,000	-3,9053	-1,4569	
	2	-1,0344	,61240	,096	-2,2586	,1897	
	4	-2,3144*	,61240	,000	-3,5386	-1,0903	
	7	,9789	,61240	,115	-,2453	2,2031	
	9	,0789	,61240	,898	-1,1453	1,3031	

Tabela VIII. Teste da diferença mínima significativa do parâmetro *b* das amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
<i>b</i> FQ					Limite Inferior	Limite Superior
0	1	-2,4604*	,62198	,000	-3,7038	-1,2171
	2	-1,3982*	,62198	,028	-2,6415	-,1549
	4	,1173	,62198	,851	-1,1260	1,3607
	7	1,0051	,62198	,111	-,2382	2,2484
	9	,1596	,62198	,798	-1,0838	1,4029
	14	1,4251*	,62198	,025	,1818	2,6684
	1	0	2,4604*	,62198	,000	1,2171
2		1,0622	,69539	,132	-,3278	2,4523
4		2,5778*	,69539	,000	1,1877	3,9678
7		3,4656*	,69539	,000	2,0755	4,8556
9		2,6200*	,69539	,000	1,2299	4,0101
14		3,8856*	,69539	,000	2,4955	5,2756
2		0	1,3982*	,62198	,028	-,1549
	1	-1,0622	,69539	,132	-2,4523	-,3278
	4	1,5156*	,69539	,033	,1255	2,9056
	7	2,4033*	,69539	,001	1,0133	3,7934
	9	1,5578*	,69539	,029	,1677	2,9478
	14	2,8233*	,69539	,000	1,4333	4,2134
	4	0	-,1173	,62198	,851	-1,3607
1		-2,5778*	,69539	,000	-3,9678	-1,1877
2		-1,5156*	,69539	,033	-2,9056	-,1255
7		,8878	,69539	,206	-,5023	2,2778
9		,0422	,69539	,952	-1,3478	1,4323
14		1,3078	,69539	,065	-,0823	2,6978
7		0	-1,0051	,62198	,111	-2,2484
	1	-3,4656*	,69539	,000	-4,8556	-2,0755
	2	-2,4033*	,69539	,001	-3,7934	-1,0133
	4	-,8878	,69539	,206	-2,2778	-,5023
	9	-,8456	,69539	,229	-2,2356	-,5445
	14	,4200	,69539	,548	-,9701	1,8101
	9	0	-,1596	,62198	,798	-1,4029
1		-2,6200*	,69539	,000	-4,0101	-1,2299
2		-1,5578*	,69539	,029	-2,9478	-,1677
4		-,0422	,69539	,952	-1,4323	1,3478
7		,8456	,69539	,229	-,5445	2,2356
14		1,2656	,69539	,074	-,1245	2,6556
14		0	-1,4251*	,62198	,025	-2,6684
	1	-3,8856*	,69539	,000	-5,2756	-2,4955
	2	-2,8233*	,69539	,000	-4,2134	-1,4333
	4	-1,3078	,69539	,065	-2,6978	-,0823
	7	-,4200	,69539	,548	-1,8101	-,9701
	9	-1,2656	,69539	,074	-2,6556	-,1245

Tabela IX. Teste da diferença mínima significativa do parâmetro *b* das amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
<i>b</i> FQM					Limite Inferior	Limite Superior
0	1	-2,8282*	,82084	,001	-4,4691	-1,1874
	2	1,4518	,82084	,082	-,1891	3,0926
	4	-,9827	,82084	,236	-2,6235	,6582
	7	-1,6182	,82084	,053	-3,2591	,0226
	9	-1,1982	,82084	,149	-2,8391	,4426
	14	1,9384*	,82084	,021	,2976	3,5793
	1	0	2,8282*	,82084	,001	1,1874
2		4,2800*	,91773	,000	2,4455	6,1145
4		1,8456*	,91773	,049	,0110	3,6801
7		1,2100	,91773	,192	-,6245	3,0445
9		1,6300	,91773	,081	-,2045	3,4645
14		4,7667*	,91773	,000	2,9321	6,6012
2		0	-1,4518	,82084	,082	-3,0926
	1	-4,2800*	,91773	,000	-6,1145	-2,4455
	4	-2,4344*	,91773	,010	-4,2690	-,5999
	7	-3,0700*	,91773	,001	-4,9045	-1,2355
	9	-2,6500*	,91773	,005	-4,4845	-,8155
	14	,4867	,91773	,598	-1,3479	2,3212
	4	0	,9827	,82084	,236	-,6582
1		-1,8456*	,91773	,049	-3,6801	-,0110
2		2,4344*	,91773	,010	,5999	4,2690
7		-,6356	,91773	,491	-2,4701	1,1990
9		-,2156	,91773	,815	-2,0501	1,6190
14		2,9211*	,91773	,002	1,0866	4,7556
7		0	1,6182	,82084	,053	-,0226
	1	-1,2100	,91773	,192	-3,0445	,6245
	2	3,0700*	,91773	,001	1,2355	4,9045
	4	,6356	,91773	,491	-1,1990	2,4701
	9	,4200	,91773	,649	-1,4145	2,2545
	14	3,5567*	,91773	,000	1,7221	5,3912
	9	0	1,1982	,82084	,149	-,4426
1		-1,6300	,91773	,081	-3,4645	,2045
2		2,6500*	,91773	,005	,8155	4,4845
4		,2156	,91773	,815	-1,6190	2,0501
7		-,4200	,91773	,649	-2,2545	1,4145
14		3,1367*	,91773	,001	1,3021	4,9712
14		0	-1,9384*	,82084	,021	-3,5793
	1	-4,7667*	,91773	,000	-6,6012	-2,9321
	2	-,4867	,91773	,598	-2,3212	1,3479
	4	-2,9211*	,91773	,002	-4,7556	-1,0866
	7	-3,5567*	,91773	,000	-5,3912	-1,7221
	9	-3,1367*	,91773	,001	-4,9712	-1,3021

Tabela X. Teste da diferença mínima significativa do pH nas amostras de salmão controle ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
pH Controle	0	1	-,0830*	,02203	,000	-,1267	-,0393
		2	-,0047	,02203	,833	-,0483	,0390
		4	-,0447	,02391	,064	-,0921	,0027
		7	-,4163*	,02524	,000	-,4663	-,3663
		9	-,5980*	,02336	,000	-,6443	-,5517
		14	-,8983*	,02604	,000	-,9499	-,8467
	1	0	,0830*	,02203	,000	,0393	,1267
		2	,0783*	,02463	,002	,0295	,1271
		4	,0383	,02633	,148	-,0138	,0905
		7	-,3333*	,02754	,000	-,3879	-,2788
		9	-,5150*	,02583	,000	-,5662	-,4638
		14	-,8153*	,02828	,000	-,8713	-,7593
	2	0	,0047	,02203	,833	-,0390	,0483
		1	-,0783*	,02463	,002	-,1271	-,0295
4		-,0400	,02633	,132	-,0922	,0122	
7		-,4117*	,02754	,000	-,4662	-,3571	
9		-,5933*	,02583	,000	-,6445	-,5421	
14		-,8936*	,02828	,000	-,9497	-,8376	
4	0	,0447	,02391	,064	-,0027	,0921	
	1	-,0383	,02633	,148	-,0905	,0138	
	2	,0400	,02633	,132	-,0122	,0922	
	7	-,3717*	,02907	,000	-,4293	-,3141	
	9	-,5533*	,02746	,000	-,6077	-,4989	
	14	-,8536*	,02977	,000	-,9126	-,7946	
7	0	,4163*	,02524	,000	,3663	,4663	
	1	,3333*	,02754	,000	,2788	,3879	
	2	,4117*	,02754	,000	,3571	,4662	
	4	,3717*	,02907	,000	,3141	,4293	
	9	-,1817*	,02862	,000	-,2384	-,1250	
	14	-,4820*	,03084	,000	-,5431	-,4209	
9	0	,5980*	,02336	,000	,5517	,6443	
	1	,5150*	,02583	,000	,4638	,5662	
	2	,5933*	,02583	,000	,5421	,6445	
	4	,5533*	,02746	,000	,4989	,6077	
	7	,1817*	,02862	,000	,1250	,2384	
	14	-,3003*	,02933	,000	-,3584	-,2422	
14	0	,8983*	,02604	,000	,8467	,9499	
	1	,8153*	,02828	,000	,7593	,8713	
	2	,8936*	,02828	,000	,8376	,9497	
	4	,8536*	,02977	,000	,7946	,9126	
	7	,4820*	,03084	,000	,4209	,5431	
	9	,3003*	,02933	,000	,2422	,3584	

Tabela XI. Teste da diferença mínima significativa do pH nas amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%			
					Limite Inferior	Limite Superior		
pH FQ	0	1	-,1086*	,01914	,000	-,1465	-,0706	
		2	-,1036*	,01914	,000	-,1415	-,0656	
		4	-,0375	,02078	,074	-,0787	,0036	
		7	-,2447*	,02192	,000	-,2881	-,2012	
		9	-,2853*	,02030	,000	-,3256	-,2451	
		14	-,6374*	,02263	,000	-,6822	-,5926	
		1	0	,1086*	,01914	,000	,0706	,1465
			2	,0050	,02140	,816	-,0374	,0474
			4	,0710*	,02287	,002	,0257	,1164
			7	-,1361*	,02392	,000	-,1835	-,0887
			9	-,1768*	,02244	,000	-,2212	-,1323
			14	-,5288*	,02457	,000	-,5775	-,4802
		2	0	,1036*	,01914	,000	,0656	,1415
			1	-,0050	,02140	,816	-,0474	,0374
		4	,0660*	,02287	,005	,0207	,1114	
		7	-,1411*	,02392	,000	-,1885	-,0937	
		9	-,1818*	,02244	,000	-,2262	-,1373	
		14	-,5338*	,02457	,000	-,5825	-,4852	
	4	0	,0375	,02078	,074	-,0036	,0787	
		1	-,0710*	,02287	,002	-,1164	-,0257	
		2	-,0660*	,02287	,005	-,1114	-,0207	
		7	-,2071*	,02525	,000	-,2572	-,1571	
		9	-,2478*	,02385	,000	-,2951	-,2005	
		14	-,5999*	,02586	,000	-,6511	-,5486	
	7	0	,2447*	,02192	,000	,2012	,2881	
		1	,1361*	,02392	,000	,0887	,1835	
		2	,1411*	,02392	,000	,0937	,1885	
		4	,2071*	,02525	,000	,1571	,2572	
		9	-,0407	,02486	,105	-,0899	,0086	
		14	-,3927*	,02679	,000	-,4458	-,3396	
	9	0	,2853*	,02030	,000	,2451	,3256	
		1	,1768*	,02244	,000	,1323	,2212	
		2	,1818*	,02244	,000	,1373	,2262	
		4	,2478*	,02385	,000	,2005	,2951	
		7	,0407	,02486	,105	-,0086	,0899	
		14	-,3521*	,02548	,000	-,4026	-,3016	
	14	0	,6374*	,02263	,000	,5926	,6822	
		1	,5288*	,02457	,000	,4802	,5775	
		2	,5338*	,02457	,000	,4852	,5825	
		4	,5999*	,02586	,000	,5486	,6511	
		7	,3927*	,02679	,000	,3396	,4458	
		9	,3521*	,02548	,000	,3016	,4026	

Tabela XII. Teste da diferença mínima significativa do pH nas amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%			
					Limite Inferior	Limite Superior		
pH FQM	0	1	-,1119*	,01894	,000	-,1494	-,0744	
		2	-,1130*	,01894	,000	-,1505	-,0755	
		4	-,0561*	,02056	,007	-,0968	-,0154	
		7	-,0497*	,02169	,024	-,0927	-,0067	
		9	-,1053*	,02008	,000	-,1451	-,0655	
		14	-,5010*	,02239	,000	-,5454	-,4567	
		1	0	,1119*	,01894	,000	,0744	,1494
			2	-,0011	,02117	,958	-,0431	,0408
			4	,0558*	,02263	,015	,0109	,1006
			7	,0622*	,02367	,010	,0153	,1091
			9	,0066	,02220	,768	-,0374	,0506
			14	-,3891*	,02431	,000	-,4373	-,3410
		2	0	,1130*	,01894	,000	,0755	,1505
			1	,0011	,02117	,958	-,0408	,0431
		4	,0569*	,02263	,013	,0121	,1018	
		7	,0633*	,02367	,009	,0164	,1102	
		9	,0077	,02220	,731	-,0363	,0517	
		14	-,3880*	,02431	,000	-,4362	-,3399	
	4	0	,0561*	,02056	,007	,0154	,0968	
		1	-,0558*	,02263	,015	-,1006	-,0109	
		2	-,0569*	,02263	,013	-,1018	-,0121	
		7	,0064	,02499	,797	-,0431	,0559	
		9	-,0492*	,02360	,039	-,0960	-,0025	
		14	-,4449*	,02559	,000	-,4956	-,3942	
	7	0	,0497*	,02169	,024	,0067	,0927	
		1	-,0622*	,02367	,010	-,1091	-,0153	
		2	-,0633*	,02367	,009	-,1102	-,0164	
		4	-,0064	,02499	,797	-,0559	,0431	
		9	-,0557*	,02460	,026	-,1044	-,0069	
		14	-,4514*	,02651	,000	-,5039	-,3988	
	9	0	,1053*	,02008	,000	,0655	,1451	
		1	-,0066	,02220	,768	-,0506	,0374	
		2	-,0077	,02220	,731	-,0517	,0363	
		4	,0492*	,02360	,039	,0025	,0960	
		7	,0557*	,02460	,026	,0069	,1044	
		14	-,3957*	,02521	,000	-,4457	-,3457	
	14	0	,5010*	,02239	,000	,4567	,5454	
		1	,3891*	,02431	,000	,3410	,4373	
		2	,3880*	,02431	,000	,3399	,4362	
		4	,4449*	,02559	,000	,3942	,4956	
		7	,4514*	,02651	,000	,3988	,5039	
		9	,3957*	,02521	,000	,3457	,4457	

Tabela XIII. Teste da diferença mínima significativa do ABVT nas amostras de salmão controle ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias	Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%			
				Limite Inferior	Limite Superior		
ABVT Controlo	0	1	-7,2851	6,76840	,301	-21,9074	7,3371
		2	-4,0795	6,76840	,557	-18,7017	10,5428
		4	-32,5618*	7,75418	,001	-49,3137	-15,8099
		7	-53,2008*	7,75418	,000	-69,9527	-36,4489
		9	-61,8083*	7,75418	,000	-78,5602	-45,0564
		14	-103,8688*	6,76840	,000	-118,4910	-89,2466
	1	0	7,2851	6,76840	,301	-7,3371	21,9074
		2	3,2057	7,56731	,679	-13,1425	19,5538
		4	-25,2767*	8,46051	,010	-43,5545	-6,9989
		7	-45,9157*	8,46051	,000	-64,1935	-27,6379
		9	-54,5232*	8,46051	,000	-72,8010	-36,2454
		14	-96,5837*	7,56731	,000	-112,9318	-80,2355
	2	0	4,0795	6,76840	,557	-10,5428	18,7017
		1	-3,2057	7,56731	,679	-19,5538	13,1425
	4	-28,4823*	8,46051	,005	-46,7601	-10,2045	
	7	-49,1213*	8,46051	,000	-67,3991	-30,8435	
	9	-57,7288*	8,46051	,000	-76,0066	-39,4510	
	14	-99,7893*	7,56731	,000	-116,1375	-83,4412	
4	0	32,5618*	7,75418	,001	15,8099	49,3137	
	1	25,2767*	8,46051	,010	6,9989	43,5545	
	2	28,4823*	8,46051	,005	10,2045	46,7601	
	7	-20,6390*	9,26802	,044	-40,6613	-,6167	
	9	-29,2465*	9,26802	,008	-49,2688	-9,2242	
	14	-71,3070*	8,46051	,000	-89,5848	-53,0292	
7	0	53,2008*	7,75418	,000	36,4489	69,9527	
	1	45,9157*	8,46051	,000	27,6379	64,1935	
	2	49,1213*	8,46051	,000	30,8435	67,3991	
	4	20,6390*	9,26802	,044	-,6167	40,6613	
	9	-8,6075	9,26802	,370	-28,6298	11,4148	
	14	-50,6680*	8,46051	,000	-68,9458	-32,3902	
9	0	61,8083*	7,75418	,000	45,0564	78,5602	
	1	54,5232*	8,46051	,000	36,2454	72,8010	
	2	57,7288*	8,46051	,000	39,4510	76,0066	
	4	29,2465*	9,26802	,008	9,2242	49,2688	
	7	8,6075	9,26802	,370	-11,4148	28,6298	
	14	-42,0605*	8,46051	,000	-60,3383	-23,7827	
14	0	103,8688*	6,76840	,000	89,2466	118,4910	
	1	96,5837*	7,56731	,000	80,2355	112,9318	
	3	99,7893*	7,56731	,000	83,4412	116,1375	
	4	71,3070*	8,46051	,000	53,0292	89,5848	
	7	50,6680*	8,46051	,000	32,3902	68,9458	
	9	42,0605*	8,46051	,000	23,7827	60,3383	

Tabela XIV. Teste da diferença mínima significativa do ABVT nas amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
ABVT FQ	0	1	-3,5943	5,52042	,528	-15,7447	8,5561
		2	-2,5101	4,81862	,613	-13,1158	8,0956
		4	-13,6993*	5,52042	,030	-25,8497	-1,5489
		7	-29,2163*	5,52042	,000	-41,3667	-17,0659
		9	-33,5573*	5,52042	,000	-45,7077	-21,4069
		14	-98,8248*	5,52042	,000	-110,9752	-86,6744
	1	0	3,5943	5,52042	,528	-8,5561	15,7447
		2	1,0842	6,02327	,860	-12,1730	14,3413
		4	-10,1050	6,59816	,154	-24,6275	4,4175
		7	-25,6220*	6,59816	,003	-40,1445	-11,0995
		9	-29,9630*	6,59816	,001	-44,4855	-15,4405
		14	-95,2305*	6,59816	,000	-109,7530	-80,7080
	2	0	2,5101	4,81862	,613	-8,0956	13,1158
		1	-1,0842	6,02327	,860	-14,3413	12,1730
4		-11,1892	6,02327	,090	-24,4463	2,0680	
7		-26,7062*	6,02327	,001	-39,9633	-13,4490	
9		-31,0472*	6,02327	,000	-44,3043	-17,7900	
14		-96,3147*	6,02327	,000	-109,5718	-83,0575	
4	0	13,6993*	5,52042	,030	1,5489	25,8497	
	1	10,1050	6,59816	,154	-4,4175	24,6275	
	2	11,1892	6,02327	,090	-2,0680	24,4463	
	7	-15,5170*	6,59816	,038	-30,0395	-,9945	
	9	-19,8580*	6,59816	,012	-34,3805	-5,3355	
	14	-85,1255*	6,59816	,000	-99,6480	-70,6030	
7	0	29,2163*	5,52042	,000	17,0659	41,3667	
	1	25,6220*	6,59816	,003	11,0995	40,1445	
	2	26,7062*	6,02327	,001	13,4490	39,9633	
	4	15,5170*	6,59816	,038	-,9945	30,0395	
	9	-4,3410	6,59816	,524	-18,8635	10,1815	
	14	-69,6085*	6,59816	,000	-84,1310	-55,0860	
9	0	33,5573*	5,52042	,000	21,4069	45,7077	
	1	29,9630*	6,59816	,001	15,4405	44,4855	
	2	31,0472*	6,02327	,000	17,7900	44,3043	
	4	19,8580*	6,59816	,012	5,3355	34,3805	
	7	4,3410	6,59816	,524	-10,1815	18,8635	
	14	-65,2675*	6,59816	,000	-79,7900	-50,7450	
14	0	98,8248*	5,52042	,000	86,6744	110,9752	
	1	95,2305*	6,59816	,000	80,7080	109,7530	
	3	96,3147*	6,02327	,000	83,0575	109,5718	
	4	85,1255*	6,59816	,000	70,6030	99,6480	
	7	69,6085*	6,59816	,000	55,0860	84,1310	
	9	65,2675*	6,59816	,000	50,7450	79,7900	

Tabela XV. Teste da diferença mínima significativa do ABVT nas amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
ABVT FQM	0	1	-,5428	5,51691	,923	-12,3754	11,2898
		2	-5,5665	4,81556	,267	-15,8948	4,7619
		4	-4,2935	4,81556	,388	-14,6218	6,0349
		7	-24,2358*	5,51691	,001	-36,0684	-12,4032
		9	-36,5011*	4,81556	,000	-46,8295	-26,1728
		14	-64,2285*	4,81556	,000	-74,5568	-53,9001
	1	0	,5428	5,51691	,923	-11,2898	12,3754
		2	-5,0237	6,01945	,418	-17,9341	7,8868
		4	-3,7507	6,01945	,543	-16,6611	9,1598
		7	-23,6930*	6,59397	,003	-37,8357	-9,5503
		9	-35,9583*	6,01945	,000	-48,8688	-23,0479
		14	-63,6857*	6,01945	,000	-76,5961	-50,7752
	2	0	5,5665	4,81556	,267	-4,7619	15,8948
		1	5,0237	6,01945	,418	-7,8868	17,9341
	4	1,2730	5,38396	,817	-10,2744	12,8204	
	7	-18,6693*	6,01945	,008	-31,5798	-5,7589	
	9	-30,9347*	5,38396	,000	-42,4821	-19,3872	
	14	-58,6620*	5,38396	,000	-70,2094	-47,1146	
4	0	4,2935	4,81556	,388	-6,0349	14,6218	
	1	3,7507	6,01945	,543	-9,1598	16,6611	
	2	-1,2730	5,38396	,817	-12,8204	10,2744	
	7	-19,9423*	6,01945	,005	-32,8528	-7,0319	
	9	-32,2077*	5,38396	,000	-43,7551	-20,6602	
	14	-59,9350*	5,38396	,000	-71,4824	-48,3876	
7	0	24,2358*	5,51691	,001	12,4032	36,0684	
	1	23,6930*	6,59397	,003	9,5503	37,8357	
	2	18,6693*	6,01945	,008	5,7589	31,5798	
	4	19,9423*	6,01945	,005	7,0319	32,8528	
	9	-12,2653	6,01945	,061	-25,1758	,6451	
	14	-39,9927*	6,01945	,000	-52,9031	-27,0822	
9	0	36,5011*	4,81556	,000	26,1728	46,8295	
	1	35,9583*	6,01945	,000	23,0479	48,8688	
	2	30,9347*	5,38396	,000	19,3872	42,4821	
	4	32,2077*	5,38396	,000	20,6602	43,7551	
	7	12,2653	6,01945	,061	-,6451	25,1758	
	14	-27,7273*	5,38396	,000	-39,2748	-16,1799	
14	0	64,2285*	4,81556	,000	53,9001	74,5568	
	1	63,6857*	6,01945	,000	50,7752	76,5961	
	3	58,6620*	5,38396	,000	47,1146	70,2094	
	4	59,9350*	5,38396	,000	48,3876	71,4824	
	7	39,9927*	6,01945	,000	27,0822	52,9031	
	9	27,7273*	5,38396	,000	16,1799	39,2748	

Tabela XVI. Teste da diferença mínima significativa do Teor de Humidade nas amostras de salmão controlo ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
% Humidade Controlo	0	1	8,6200*	3,51956	,029	1,0164	16,2236
		2	5,9867	3,07213	,073	-,6503	12,6236
		4	6,4833	3,07213	,055	-,1536	13,1203
		7	1,4650	3,51956	,684	-6,1386	9,0686
		9	3,8350	3,51956	,296	-3,7686	11,4386
		14	7,3733*	3,07213	,032	,7364	14,0103
	1	0	-8,6200*	3,51956	,029	-16,2236	-1,0164
		2	-2,6333	3,84016	,505	-10,9295	5,6628
		4	-2,1367	3,84016	,587	-10,4328	6,1595
		7	-7,1550	4,20668	,113	-16,2430	1,9330
		9	-4,7850	4,20668	,276	-13,8730	4,3030
		14	-1,2467	3,84016	,751	-9,5428	7,0495
	2	0	-5,9867	3,07213	,073	-12,6236	,6503
		1	2,6333	3,84016	,505	-5,6628	10,9295
	4	,4967	3,43474	,887	-6,9236	7,9170	
	7	-4,5217	3,84016	,260	-12,8178	3,7745	
	9	-2,1517	3,84016	,585	-10,4478	6,1445	
	14	1,3867	3,43474	,693	-6,0336	8,8070	
4	0	-6,4833	3,07213	,055	-13,1203	,1536	
	1	2,1367	3,84016	,587	-6,1595	10,4328	
	2	-,4967	3,43474	,887	-7,9170	6,9236	
	7	-5,0183	3,84016	,214	-13,3145	3,2778	
	9	-2,6483	3,84016	,503	-10,9445	5,6478	
	14	,8900	3,43474	,800	-6,5303	8,3103	
7	0	-1,4650	3,51956	,684	-9,0686	6,1386	
	1	7,1550	4,20668	,113	-1,9330	16,2430	
	2	4,5217	3,84016	,260	-3,7745	12,8178	
	4	5,0183	3,84016	,214	-3,2778	13,3145	
	9	2,3700	4,20668	,583	-6,7180	11,4580	
	14	5,9083	3,84016	,148	-2,3878	14,2045	
9	0	-3,8350	3,51956	,296	-11,4386	3,7686	
	1	4,7850	4,20668	,276	-4,3030	13,8730	
	2	2,1517	3,84016	,585	-6,1445	10,4478	
	4	2,6483	3,84016	,503	-5,6478	10,9445	
	7	-2,3700	4,20668	,583	-11,4580	6,7180	
	14	3,5383	3,84016	,374	-4,7578	11,8345	
14	0	-7,3733*	3,07213	,032	-14,0103	-,7364	
	1	1,2467	3,84016	,751	-7,0495	9,5428	
	2	-1,3867	3,43474	,693	-8,8070	6,0336	
	4	-,8900	3,43474	,800	-8,3103	6,5303	
	7	-5,9083	3,84016	,148	-14,2045	2,3878	
	9	-3,5383	3,84016	,374	-11,8345	4,7578	

Tabela XVII. Teste da diferença mínima significativa do Teor de Humidade nas amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
% Humidade FQ	0	1	7,8150*	3,18418	,028	,9856	14,6444
		2	11,9500*	2,77938	,001	5,9888	17,9112
		4	10,6433*	2,77938	,002	4,6822	16,6045
		7	9,2250*	3,18418	,012	2,3956	16,0544
		9	4,4233	2,77938	,134	-1,5378	10,3845
		14	3,8867	2,77938	,184	-2,0745	9,8478
	1	0	-7,8150*	3,18418	,028	-14,6444	-,9856
	2	4,1350	3,47423	,254	-3,3165	11,5865	
	4	2,8283	3,47423	,429	-4,6231	10,2798	
	7	1,4100	3,80582	,717	-6,7527	9,5727	
	9	-3,3917	3,47423	,346	-10,8431	4,0598	
	14	-3,9283	3,47423	,277	-11,3798	3,5231	
2	0	-11,9500*	2,77938	,001	-17,9112	-5,9888	
	1	-4,1350	3,47423	,254	-11,5865	3,3165	
	4	-1,3067	3,10744	,681	-7,9715	5,3581	
	7	-2,7250	3,47423	,446	-10,1765	4,7265	
	9	-7,5267*	3,10744	,030	-14,1915	-,8619	
	14	-8,0633*	3,10744	,021	-14,7281	-1,3985	
4	0	-10,6433*	2,77938	,002	-16,6045	-4,6822	
	1	-2,8283	3,47423	,429	-10,2798	4,6231	
	2	1,3067	3,10744	,681	-5,3581	7,9715	
	7	-1,4183	3,47423	,689	-8,8698	6,0331	
	9	-6,2200	3,10744	,065	-12,8848	,4448	
	14	-6,7567*	3,10744	,047	-13,4215	-,0919	
7	0	-9,2250*	3,18418	,012	-16,0544	-2,3956	
	1	-1,4100	3,80582	,717	-9,5727	6,7527	
	2	2,7250	3,47423	,446	-4,7265	10,1765	
	4	1,4183	3,47423	,689	-6,0331	8,8698	
	9	-4,8017	3,47423	,189	-12,2531	2,6498	
	14	-5,3383	3,47423	,147	-12,7898	2,1131	
9	0	-4,4233	2,77938	,134	-10,3845	1,5378	
	1	3,3917	3,47423	,346	-4,0598	10,8431	
	2	7,5267*	3,10744	,030	,8619	14,1915	
	4	6,2200	3,10744	,065	-,4448	12,8848	
	7	4,8017	3,47423	,189	-2,6498	12,2531	
	14	-,5367	3,10744	,865	-7,2015	6,1281	
14	0	-3,8867	2,77938	,184	-9,8478	2,0745	
	1	3,9283	3,47423	,277	-3,5231	11,3798	
	2	8,0633*	3,10744	,021	1,3985	14,7281	
	4	6,7567*	3,10744	,047	,0919	13,4215	
	7	5,3383	3,47423	,147	-2,1131	12,7898	
	9	,5367	3,10744	,865	-6,1281	7,2015	

Tabela XVIII. Teste da diferença mínima significativa do Teor de Humidade nas amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
% Humidade FQM	0	1	8,2233	4,00330	,058	- ,3095	16,7562
		2	8,5933*	4,00330	,049	,0605	17,1262
		4	15,1200*	4,00330	,002	6,5872	23,6528
		7	6,8533	4,00330	,108	-1,6795	15,3862
		9	4,0200	4,58636	,395	-5,7556	13,7956
		14	5,6533	4,00330	,178	-2,8795	14,1862
		1	0	-8,2233	4,00330	,058	-16,7562
		2	,3700	4,47583	,935	-9,1700	9,9100
		4	6,8967	4,47583	,144	-2,6433	16,4367
		7	-1,3700	4,47583	,764	-10,9100	8,1700
		9	-4,2033	5,00413	,414	-14,8694	6,4627
		14	-2,5700	4,47583	,574	-12,1100	6,9700
	2	0	-8,5933*	4,00330	,049	-17,1262	-,0605
		1	-,3700	4,47583	,935	-9,9100	9,1700
		4	6,5267	4,47583	,165	-3,0133	16,0667
		7	-1,7400	4,47583	,703	-11,2800	7,8000
		9	-4,5733	5,00413	,375	-15,2394	6,0927
		14	-2,9400	4,47583	,521	-12,4800	6,6000
	4	0	-15,1200*	4,00330	,002	-23,6528	-6,5872
		1	-6,8967	4,47583	,144	-16,4367	2,6433
		2	-6,5267	4,47583	,165	-16,0667	3,0133
		7	-8,2667	4,47583	,085	-17,8067	1,2733
		9	-11,1000*	5,00413	,042	-21,7661	-,4339
		14	-9,4667	4,47583	,052	-19,0067	,0733
	7	0	-6,8533	4,00330	,108	-15,3862	1,6795
		1	1,3700	4,47583	,764	-8,1700	10,9100
		2	1,7400	4,47583	,703	-7,8000	11,2800
		4	8,2667	4,47583	,085	-1,2733	17,8067
		9	-2,8333	5,00413	,580	-13,4994	7,8327
		14	-1,2000	4,47583	,792	-10,7400	8,3400
	9	0	-4,0200	4,58636	,395	-13,7956	5,7556
		1	4,2033	5,00413	,414	-6,4627	14,8694
		2	4,5733	5,00413	,375	-6,0927	15,2394
		4	11,1000*	5,00413	,042	,4339	21,7661
		7	2,8333	5,00413	,580	-7,8327	13,4994
		14	1,6333	5,00413	,749	-9,0327	12,2994
	14	0	-5,6533	4,00330	,178	-14,1862	2,8795
		1	2,5700	4,47583	,574	-6,9700	12,1100
		2	2,9400	4,47583	,521	-6,6000	12,4800
		4	9,4667	4,47583	,052	-,0733	19,0067
		7	1,2000	4,47583	,792	-8,3400	10,7400
		9	-1,6333	5,00413	,749	-12,2994	9,0327

Tabela XIX. Teste da diferença mínima significativa do a_w nas amostras de salmão controle ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
a_w Controlo	0	1	,0002	,00362	,957	-,0077	,0081
		2	,0037	,00362	,327	-,0042	,0116
		4	-,0045	,00316	,183	-,0114	,0024
		7	-,0048	,00316	,155	-,0117	,0021
		9	-,0023	,00362	,537	-,0102	,0056
		14	-,0063	,00362	,108	-,0142	,0016
	1	0	-,0002	,00362	,957	-,0081	,0077
		2	,0035	,00433	,435	-,0059	,0129
		4	-,0047	,00395	,261	-,0133	,0039
		7	-,0050	,00395	,230	-,0136	,0036
		9	-,0025	,00433	,574	-,0119	,0069
		14	-,0065	,00433	,159	-,0159	,0029
	2	0	-,0037	,00362	,327	-,0116	,0042
		1	-,0035	,00433	,435	-,0129	,0059
		4	-,0082	,00395	,061	-,0168	,0004
		7	-,0085	,00395	,053	-,0171	,0001
		9	-,0060	,00433	,191	-,0154	,0034
		14	-,0100*	,00433	,040	-,0194	-,0006
	4	0	,0045	,00316	,183	-,0024	,0114
		1	,0047	,00395	,261	-,0039	,0133
		2	,0082	,00395	,061	-,0004	,0168
		7	-,0003	,00354	,926	-,0080	,0074
		9	,0022	,00395	,594	-,0064	,0108
		14	-,0018	,00395	,651	-,0104	,0068
	7	0	,0048	,00316	,155	-,0021	,0117
		1	,0050	,00395	,230	-,0036	,0136
		2	,0085	,00395	,053	-,0001	,0171
		4	,0003	,00354	,926	-,0074	,0080
9		,0025	,00395	,539	-,0061	,0111	
14		-,0015	,00395	,711	-,0101	,0071	
9	0	,0023	,00362	,537	-,0056	,0102	
	1	,0025	,00433	,574	-,0069	,0119	
	2	,0060	,00433	,191	-,0034	,0154	
	4	-,0022	,00395	,594	-,0108	,0064	
	7	-,0025	,00395	,539	-,0111	,0061	
	14	-,0040	,00433	,374	-,0134	,0054	
14	0	,0063	,00362	,108	-,0016	,0142	
	1	,0065	,00433	,159	-,0029	,0159	
	2	,0100*	,00433	,040	,0006	,0194	
	4	,0018	,00395	,651	-,0068	,0104	
	7	,0015	,00395	,711	-,0071	,0101	
	9	,0040	,00433	,374	-,0054	,0134	

Tabela XX. Teste da diferença mínima significativa do a_w nas amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
a_w FQ	0	1	,0042	,00230	,093	-,0008	,0092
		2	,0042	,00230	,093	-,0008	,0092
		4	-,0035	,00201	,110	-,0078	,0009
		7	-,0071*	,00201	,004	-,0115	-,0028
		9	-,0053*	,00230	,040	-,0103	-,0003
		14	-,0028	,00230	,247	-,0078	,0022
	1	0	-,0042	,00230	,093	-,0092	,0008
		2	0,0000	,00275	1,000	-,0060	,0060
		4	-,0077*	,00251	,010	-,0131	-,0022
		7	-,0113*	,00251	,001	-,0168	-,0059
		9	-,0095*	,00275	,005	-,0155	-,0035
		14	-,0070*	,00275	,026	-,0130	-,0010
	2	0	-,0042	,00230	,093	-,0092	,0008
		1	0,0000	,00275	1,000	-,0060	,0060
	4	-,0077*	,00251	,010	-,0131	-,0022	
	7	-,0113*	,00251	,001	-,0168	-,0059	
	9	-,0095*	,00275	,005	-,0155	-,0035	
	14	-,0070*	,00275	,026	-,0130	-,0010	
4	0	,0035	,00201	,110	-,0009	,0078	
	1	,0077*	,00251	,010	,0022	,0131	
	2	,0077*	,00251	,010	,0022	,0131	
	7	-,0037	,00224	,128	-,0086	,0012	
	9	-,0018	,00251	,479	-,0073	,0036	
	14	,0007	,00251	,795	-,0048	,0061	
7	0	,0071*	,00201	,004	,0028	,0115	
	1	,0113*	,00251	,001	,0059	,0168	
	2	,0113*	,00251	,001	,0059	,0168	
	4	,0037	,00224	,128	-,0012	,0086	
	9	,0018	,00251	,479	-,0036	,0073	
	14	,0043	,00251	,110	-,0011	,0098	
9	0	,0053*	,00230	,040	,0003	,0103	
	1	,0095*	,00275	,005	,0035	,0155	
	2	,0095*	,00275	,005	,0035	,0155	
	4	,0018	,00251	,479	-,0036	,0073	
	7	-,0018	,00251	,479	-,0073	,0036	
	14	,0025	,00275	,381	-,0035	,0085	
14	0	,0028	,00230	,247	-,0022	,0078	
	1	,0070*	,00275	,026	,0010	,0130	
	2	,0070*	,00275	,026	,0010	,0130	
	4	-,0007	,00251	,795	-,0061	,0048	
	7	-,0043	,00251	,110	-,0098	,0011	
	9	-,0025	,00275	,381	-,0085	,0035	

Tabela XXI. Teste da diferença mínima significativa do a_w nas amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
a_w FQM	0	1	,0027*	,00109	,029	,0003	,0051
		2	,0002	,00109	,858	-,0022	,0026
		4	,0012	,00095	,232	-,0009	,0033
		7	-,0051*	,00095	,000	-,0072	-,0031
		9	-,0068*	,00109	,000	-,0092	-,0044
		14	-,0043*	,00109	,002	-,0067	-,0019
	1	0	-,0027*	,00109	,029	-,0051	-,0003
		2	-,0025	,00131	,080	-,0053	,0003
		4	-,0015	,00119	,232	-,0041	,0011
		7	-,0078*	,00119	,000	-,0104	-,0052
		9	-,0095*	,00131	,000	-,0123	-,0067
		14	-,0070*	,00131	,000	-,0098	-,0042
	2	0	-,0002	,00109	,858	-,0026	,0022
		1	,0025	,00131	,080	-,0003	,0053
	4	,0010	,00119	,418	-,0016	,0036	
	7	-,0053*	,00119	,001	-,0079	-,0027	
	9	-,0070*	,00131	,000	-,0098	-,0042	
	14	-,0045*	,00131	,005	-,0073	-,0017	
4	0	-,0012	,00095	,232	-,0033	,0009	
	1	,0015	,00119	,232	-,0011	,0041	
	2	-,0010	,00119	,418	-,0036	,0016	
	7	-,0063*	,00107	,000	-,0087	-,0040	
	9	-,0080*	,00119	,000	-,0106	-,0054	
	14	-,0055*	,00119	,001	-,0081	-,0029	
7	0	,0051*	,00095	,000	,0031	,0072	
	1	,0078*	,00119	,000	,0052	,0104	
	2	,0053*	,00119	,001	,0027	,0079	
	4	,0063*	,00107	,000	,0040	,0087	
	9	-,0017	,00119	,187	-,0043	,0009	
	14	,0008	,00119	,498	-,0018	,0034	
9	0	,0068*	,00109	,000	,0044	,0092	
	1	,0095*	,00131	,000	,0067	,0123	
	2	,0070*	,00131	,000	,0042	,0098	
	4	,0080*	,00119	,000	,0054	,0106	
	7	,0017	,00119	,187	-,0009	,0043	
	14	,0025	,00131	,080	-,0003	,0053	
14	0	,0043*	,00109	,002	,0019	,0067	
	1	,0070*	,00131	,000	,0042	,0098	
	2	,0045*	,00131	,005	,0017	,0073	
	4	,0055*	,00119	,001	,0029	,0081	
	7	-,0008	,00119	,498	-,0034	,0018	
	9	-,0025	,00131	,080	-,0053	,0003	

Anexo C – Resultados dos Parâmetros Microbiológicos

Tabela I. Resultados dos microrganismos mesófilos totais ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo (log(UFC/g))	FQ (log(UFC/g))	FQM (log(UFC/g))
0	3,86 ± 0,33	3,86 ± 0,33	3,86 ± 0,33
1	5,64 ± 0,11	4,92 ± 0,32	5,28 ± 0,00
2	5,40 ± 0,06	4,96 ± 0,07	4,83 ± 0,61
4	7,18 ± 0,30	7,19 ± 0,55	6,02 ± 0,19
7	7,11 ± 0,53	7,04 ± 0,25	7,10 ± 0,29
9	7,40 ± 0,05	7,49 ± 0,11	7,42 ± 0,26
14	7,91 ± 0,44	7,48 ± 0,29	7,80 ± 0,07

Tabela II. Resultados dos microrganismos psicrotróficos ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo (log(UFC/g))	FQ (log(UFC/g))	FQM (log(UFC/g))
0	4,89 ± 0,45	4,89 ± 0,45	4,89 ± 0,45
1	5,97 ± 0,64	5,65 ± 0,28	5,69 ± 0,83
2	6,73 ± 0,10	6,21 ± 0,22	6,27 ± 0,43
4	8,41 ± 0,24	7,75 ± 0,12	7,12 ± 0,80
7	8,67 ± 0,22	8,42 ± 0,03	8,40 ± 0,11
9	8,67 ± 0,04	8,45 ± 0,15	8,44 ± 0,21
14	10,35 ± 1,13	8,74 ± 0,13	8,70 ± 0,11

Tabela III. Resultados das *Pseudomonas spp* ao longo do armazenamento das amostras de salmão.

Tempo (dias)	Controlo (log(UFC/g))	FQ (log(UFC/g))	FQM (log(UFC/g))
0	0,81 ± 0,49	0,81 ± 0,49	0,81 ± 0,49
1	0,70 ± 0,00	1,26 ± 0,54	1,00 ± 0,43
2	1,09 ± 0,55	1,09 ± 0,55	1,09 ± 0,55
4	1,75 ± 0,08	1,74 ± 0,34	1,20 ± 0,28
7	2,25 ± 0,13	2,34 ± 0,59	2,05 ± 0,49
9	2,12 ± 0,10	3,07 ± 0,64	2,06 ± 0,39
14	2,86 ± 0,41	3,03 ± 0,35	2,31 ± 0,39

Anexo D – Análise Estatística dos Parâmetros Microbiológicos

Tabela I. Teste da diferença mínima significativa dos microrganismos Mesófilos nas amostras de salmão controlo ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
Mésófilos Controlo	0	1	-1,7740*	,27248	,000	-2,3548	-1,1932
		2	-1,5373*	,23784	,000	-2,0443	-1,0304
		4	-3,3107*	,23784	,000	-3,8176	-2,8037
		7	-3,2440*	,23784	,000	-3,7509	-2,7371
		9	-3,5273*	,23784	,000	-4,0343	-3,0204
		14	-4,0440*	,23784	,000	-4,5509	-3,5371
	1	0	1,7740*	,27248	,000	1,1932	2,3548
		2	,2367	,29730	,438	-,3970	,8703
		4	-1,5367*	,29730	,000	-2,1703	-,9030
		7	-1,4700*	,29730	,000	-2,1037	-,8363
		9	-1,7533*	,29730	,000	-2,3870	-1,1197
		14	-2,2700*	,29730	,000	-2,9037	-1,6363
	2	0	1,5373*	,23784	,000	1,0304	2,0443
		1	-,2367	,29730	,438	-,8703	,3970
	4	-1,7733*	,26591	,000	-2,3401	-1,2066	
	7	-1,7067*	,26591	,000	-2,2734	-1,1399	
	9	-1,9900*	,26591	,000	-2,5568	-1,4232	
	14	-2,5067*	,26591	,000	-3,0734	-1,9399	
4	0	3,3107*	,23784	,000	2,8037	3,8176	
	1	1,5367*	,29730	,000	,9030	2,1703	
	2	1,7733*	,26591	,000	1,2066	2,3401	
	7	,0667	,26591	,805	-,5001	,6334	
	9	-,2167	,26591	,428	-,7834	,3501	
	14	-,7333*	,26591	,015	-1,3001	-,1666	
7	0	3,2440*	,23784	,000	2,7371	3,7509	
	1	1,4700*	,29730	,000	,8363	2,1037	
	2	1,7067*	,26591	,000	1,1399	2,2734	
	4	-,0667	,26591	,805	-,6334	,5001	
	9	-,2833	,26591	,303	-,8501	,2834	
	14	-,8000*	,26591	,009	-1,3668	-,2332	
9	0	3,5273*	,23784	,000	3,0204	4,0343	
	1	1,7533*	,29730	,000	1,1197	2,3870	
	2	1,9900*	,26591	,000	1,4232	2,5568	
	4	,2167	,26591	,428	-,3501	,7834	
	7	,2833	,26591	,303	-,2834	,8501	
	14	-,5167	,26591	,071	-1,0834	,0501	
14	0	4,0440*	,23784	,000	3,5371	4,5509	
	1	2,2700*	,29730	,000	1,6363	2,9037	
	3	2,5067*	,26591	,000	1,9399	3,0734	
	4	,7333*	,26591	,015	,1666	1,3001	
	7	,8000*	,26591	,009	,2332	1,3668	
	9	,5167	,26591	,071	-,0501	1,0834	

Tabela II. Teste da diferença mínima significativa dos microrganismos Mesófilos nas amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
Mesófilos FQ	0	1	-1,0690*	,27117	,001	-1,6470	-,4910
		2	-1,0973*	,23670	,000	-1,6018	-,5928
		4	-3,3273*	,23670	,000	-3,8318	-2,8228
		7	-3,1673*	,23670	,000	-3,6718	-2,6628
		9	-3,6207*	,23670	,000	-4,1252	-3,1162
		14	-3,6173*	,23670	,000	-4,1218	-3,1128
	1	0	1,0690*	,27117	,001	,4910	1,6470
		2	-,0283	,29587	,925	-,6590	,6023
		4	-2,2583*	,29587	,000	-2,8890	-1,6277
		7	-2,0983*	,29587	,000	-2,7290	-1,4677
		9	-2,5517*	,29587	,000	-3,1823	-1,9210
		14	-2,5483*	,29587	,000	-3,1790	-1,9177
	2	0	1,0973*	,23670	,000	,5928	1,6018
		1	,0283	,29587	,925	-,6023	,6590
4		-2,2300*	,26463	,000	-2,7941	-1,6659	
7		-2,0700*	,26463	,000	-2,6341	-1,5059	
9		-2,5233*	,26463	,000	-3,0874	-1,9593	
14		-2,5200*	,26463	,000	-3,0841	-1,9559	
4	0	3,3273*	,23670	,000	2,8228	3,8318	
	1	2,2583*	,29587	,000	1,6277	2,8890	
	2	2,2300*	,26463	,000	1,6659	2,7941	
	7	,1600	,26463	,554	-,4041	,7241	
	9	-,2933	,26463	,285	-,8574	,2707	
	14	-,2900	,26463	,290	-,8541	,2741	
7	0	3,1673*	,23670	,000	2,6628	3,6718	
	1	2,0983*	,29587	,000	1,4677	2,7290	
	2	2,0700*	,26463	,000	1,5059	2,6341	
	4	-,1600	,26463	,554	-,7241	,4041	
	9	-,4533	,26463	,107	-1,0174	,1107	
	14	-,4500	,26463	,110	-1,0141	,1141	
9	0	3,6207*	,23670	,000	3,1162	4,1252	
	1	2,5517*	,29587	,000	1,9210	3,1823	
	2	2,5233*	,26463	,000	1,9593	3,0874	
	4	,2933	,26463	,285	-,2707	,8574	
	7	,4533	,26463	,107	-,1107	1,0174	
	14	,0033	,26463	,990	-,5607	,5674	
14	0	3,6173*	,23670	,000	3,1128	4,1218	
	1	2,5483*	,29587	,000	1,9177	3,1790	
	2	2,5200*	,26463	,000	1,9559	3,0841	
	4	,2900	,26463	,290	-,2741	,8541	
	7	,4500	,26463	,110	-,1141	1,0141	
	9	-,0033	,26463	,990	-,5674	,5607	

Tabela III. Teste da diferença mínima significativa dos microrganismos Mesófilos nas amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%			
					Limite Inferior	Limite Superior		
Mesófilos FQM	0	1	-1,4140*	,27111	,000	-1,9919	-,8361	
		2	-,9607*	,23665	,001	-1,4651	-,4563	
		4	-2,1573*	,23665	,000	-2,6617	-1,6529	
		7	-3,2373*	,23665	,000	-3,7417	-2,7329	
		9	-3,5507*	,23665	,000	-4,0551	-3,0463	
		14	-3,9307*	,23665	,000	-4,4351	-3,4263	
		1	0	1,4140*	,27111	,000	,8361	1,9919
			2	,4533	,29581	,146	-,1772	1,0838
			4	-,7433*	,29581	,024	-1,3738	-,1128
			7	-1,8233*	,29581	,000	-2,4538	-1,1928
			9	-2,1367*	,29581	,000	-2,7672	-1,5062
			14	-2,5167*	,29581	,000	-3,1472	-1,8862
		2	0	,9607*	,23665	,001	,4563	1,4651
			1	-,4533	,29581	,146	-1,0838	,1772
		4	-1,1967*	,26458	,000	-1,7606	-,6327	
		7	-2,2767*	,26458	,000	-2,8406	-1,7127	
		9	-2,5900*	,26458	,000	-3,1539	-2,0261	
		14	-2,9700*	,26458	,000	-3,5339	-2,4061	
	4	0	2,1573*	,23665	,000	1,6529	2,6617	
		1	,7433*	,29581	,024	,1128	1,3738	
		2	1,1967*	,26458	,000	,6327	1,7606	
		7	-1,0800*	,26458	,001	-1,6439	-,5161	
		9	-1,3933*	,26458	,000	-1,9573	-,8294	
		14	-1,7733*	,26458	,000	-2,3373	-1,2094	
	7	0	3,2373*	,23665	,000	2,7329	3,7417	
		1	1,8233*	,29581	,000	1,1928	2,4538	
		2	2,2767*	,26458	,000	1,7127	2,8406	
		4	1,0800*	,26458	,001	,5161	1,6439	
		9	-,3133	,26458	,255	-,8773	,2506	
		14	-,6933*	,26458	,019	-1,2573	-,1294	
	9	0	3,5507*	,23665	,000	3,0463	4,0551	
		1	2,1367*	,29581	,000	1,5062	2,7672	
		2	2,5900*	,26458	,000	2,0261	3,1539	
		4	1,3933*	,26458	,000	,8294	1,9573	
		7	,3133	,26458	,255	-,2506	,8773	
		14	-,3800	,26458	,171	-,9439	,1839	
	14	0	3,9307*	,23665	,000	3,4263	4,4351	
		1	2,5167*	,29581	,000	1,8862	3,1472	
		2	2,9700*	,26458	,000	2,4061	3,5339	
		4	1,7733*	,26458	,000	1,2094	2,3373	
		7	,6933*	,26458	,019	,1294	1,2573	
		9	,3800	,26458	,171	-,1839	,9439	

Tabela IV. Teste da diferença mínima significativa dos microrganismos Psicrotróficos nas amostras de salmão controlo ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
Psicrotróficos Controlo	0	1	-1,0780*	,38294	,012	-1,8898	-,2662
		2	-1,8413*	,38294	,000	-2,6531	-1,0295
		4	-3,5213*	,38294	,000	-4,3331	-2,7095
		7	-3,7747*	,38294	,000	-4,5865	-2,9629
		9	-3,7780*	,38294	,000	-4,5898	-2,9662
		14	-5,4613*	,38294	,000	-6,2731	-4,6495
	1	0	1,0780*	,38294	,012	,2662	1,8898
		2	-,7633	,42814	,094	-1,6710	,1443
		4	-2,4433*	,42814	,000	-3,3510	-1,5357
		7	-2,6967*	,42814	,000	-3,6043	-1,7890
		9	-2,7000*	,42814	,000	-3,6076	-1,7924
		14	-4,3833*	,42814	,000	-5,2910	-3,4757
	2	0	1,8413*	,38294	,000	1,0295	2,6531
		1	,7633	,42814	,094	-,1443	1,6710
	4	-1,6800*	,42814	,001	-2,5876	-,7724	
	7	-1,9333*	,42814	,000	-2,8410	-1,0257	
	9	-1,9367*	,42814	,000	-2,8443	-1,0290	
	14	-3,6200*	,42814	,000	-4,5276	-2,7124	
4	0	3,5213*	,38294	,000	2,7095	4,3331	
	1	2,4433*	,42814	,000	1,5357	3,3510	
	2	1,6800*	,42814	,001	,7724	2,5876	
	7	-,2533	,42814	,562	-1,1610	,6543	
	9	-,2567	,42814	,557	-1,1643	,6510	
	14	-1,9400*	,42814	,000	-2,8476	-1,0324	
7	0	3,7747*	,38294	,000	2,9629	4,5865	
	1	2,6967*	,42814	,000	1,7890	3,6043	
	2	1,9333*	,42814	,000	1,0257	2,8410	
	4	,2533	,42814	,562	-,6543	1,1610	
	9	-,0033	,42814	,994	-,9110	,9043	
	14	-1,6867*	,42814	,001	-2,5943	-,7790	
9	0	3,7780*	,38294	,000	2,9662	4,5898	
	1	2,7000*	,42814	,000	1,7924	3,6076	
	2	1,9367*	,42814	,000	1,0290	2,8443	
	4	,2567	,42814	,557	-,6510	1,1643	
	7	,0033	,42814	,994	-,9043	,9110	
	14	-1,6833*	,42814	,001	-2,5910	-,7757	
14	0	5,4613*	,38294	,000	4,6495	6,2731	
	1	4,3833*	,42814	,000	3,4757	5,2910	
	2	3,6200*	,42814	,000	2,7124	4,5276	
	4	1,9400*	,42814	,000	1,0324	2,8476	
	7	1,6867*	,42814	,001	,7790	2,5943	
	9	1,6833*	,42814	,001	,7757	2,5910	

Tabela V. Teste da diferença mínima significativa dos microrganismos Psicrotróficos nas amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite Inferior	Limite Superior
Psicrotróficos FQ	0					
	1	-,7580*	,19644	,001	-1,1744	-,3416
	2	-1,3147*	,19644	,000	-1,7311	-,8982
	4	-2,8580*	,19644	,000	-3,2744	-2,4416
	7	-3,5280*	,19644	,000	-3,9444	-3,1116
	9	-3,5613*	,19644	,000	-3,9778	-3,1449
	14	-3,8513*	,19644	,000	-4,2678	-3,4349
1	0	,7580*	,19644	,001	,3416	1,1744
	2	-,5567*	,21963	,022	-1,0223	-,0911
	4	-2,1000*	,21963	,000	-2,5656	-1,6344
	7	-2,7700*	,21963	,000	-3,2356	-2,3044
	9	-2,8033*	,21963	,000	-3,2689	-2,3377
	14	-3,0933*	,21963	,000	-3,5589	-2,6277
2	0	1,3147*	,19644	,000	,8982	1,7311
	1	,5567*	,21963	,022	,0911	1,0223
	4	-1,5433*	,21963	,000	-2,0089	-1,0777
	7	-2,2133*	,21963	,000	-2,6789	-1,7477
	9	-2,2467*	,21963	,000	-2,7123	-1,7811
	14	-2,5367*	,21963	,000	-3,0023	-2,0711
4	0	2,8580*	,19644	,000	2,4416	3,2744
	1	2,1000*	,21963	,000	1,6344	2,5656
	2	1,5433*	,21963	,000	1,0777	2,0089
	7	-,6700*	,21963	,008	-1,1356	-,2044
	9	-,7033*	,21963	,006	-1,1689	-,2377
	14	-,9933*	,21963	,000	-1,4589	-,5277
7	0	3,5280*	,19644	,000	3,1116	3,9444
	1	2,7700*	,21963	,000	2,3044	3,2356
	2	2,2133*	,21963	,000	1,7477	2,6789
	4	,6700*	,21963	,008	,2044	1,1356
	9	-,0333	,21963	,881	-,4989	,4323
	14	-,3233	,21963	,160	-,7889	,1423
9	0	3,5613*	,19644	,000	3,1449	3,9778
	1	2,8033*	,21963	,000	2,3377	3,2689
	2	2,2467*	,21963	,000	1,7811	2,7123
	4	,7033*	,21963	,006	,2377	1,1689
	7	,0333	,21963	,881	-,4323	,4989
	14	-,2900	,21963	,205	-,7556	,1756
14	0	3,8513*	,19644	,000	3,4349	4,2678
	1	3,0933*	,21963	,000	2,6277	3,5589
	2	2,5367*	,21963	,000	2,0711	3,0023
	4	,9933*	,21963	,000	,5277	1,4589
	7	,3233	,21963	,160	-,1423	,7889
	9	,2900	,21963	,205	-,1756	,7556

Tabela VI. Teste da diferença mínima significativa dos microrganismos Psicrotróficos nas amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
Psicrotróficos FQM	0	1	-,7980*	,36352	,043	-1,5686	-,0274
		2	-1,3780*	,36352	,002	-2,1486	-,6074
		4	-2,2280*	,36352	,000	-2,9986	-1,4574
		7	-3,5113*	,36352	,000	-4,2820	-2,7407
		9	-3,5480*	,36352	,000	-4,3186	-2,7774
		14	-3,8080*	,36352	,000	-4,5786	-3,0374
	1	0	,7980*	,36352	,043	,0274	1,5686
		2	-,5800	,40642	,173	-1,4416	,2816
		4	-1,4300*	,40642	,003	-2,2916	-,5684
		7	-2,7133*	,40642	,000	-3,5749	-1,8518
		9	-2,7500*	,40642	,000	-3,6116	-1,8884
		14	-3,0100*	,40642	,000	-3,8716	-2,1484
	2	0	1,3780*	,36352	,002	,6074	2,1486
		1	,5800	,40642	,173	-,2816	1,4416
		4	-,8500	,40642	,053	-1,7116	,0116
		7	-2,1333*	,40642	,000	-2,9949	-1,2718
		9	-2,1700*	,40642	,000	-3,0316	-1,3084
		14	-2,4300*	,40642	,000	-3,2916	-1,5684
	4	0	2,2280*	,36352	,000	1,4574	2,9986
		1	1,4300*	,40642	,003	,5684	2,2916
		2	,8500	,40642	,053	-,0116	1,7116
		7	-1,2833*	,40642	,006	-2,1449	-,4218
		9	-1,3200*	,40642	,005	-2,1816	-,4584
		14	-1,5800*	,40642	,001	-2,4416	-,7184
	7	0	3,5113*	,36352	,000	2,7407	4,2820
		1	2,7133*	,40642	,000	1,8518	3,5749
		2	2,1333*	,40642	,000	1,2718	2,9949
		4	1,2833*	,40642	,006	,4218	2,1449
		9	-,0367	,40642	,929	-,8982	,8249
		14	-,2967	,40642	,476	-1,1582	,5649
	9	0	3,5480*	,36352	,000	2,7774	4,3186
		1	2,7500*	,40642	,000	1,8884	3,6116
		2	2,1700*	,40642	,000	1,3084	3,0316
		4	1,3200*	,40642	,005	,4584	2,1816
		7	,0367	,40642	,929	-,8249	,8982
		14	-,2600	,40642	,531	-1,1216	,6016
	14	0	3,8080*	,36352	,000	3,0374	4,5786
		1	3,0100*	,40642	,000	2,1484	3,8716
		2	2,4300*	,40642	,000	1,5684	3,2916
		4	1,5800*	,40642	,001	,7184	2,4416
		7	,2967	,40642	,476	-,5649	1,1582
		9	,2600	,40642	,531	-,6016	1,1216

Tabela VII. Teste da diferença mínima significativa das *Pseudomonas spp.* nas amostras de salmão controlo ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável Dependente ao longo dos dias		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
					Limite Inferior	Limite Superior	
<i>Pseudomonas spp.</i> Controlo	0	1	,3453	,30569	,275	-,3027	,9934
		2	,0853	,30569	,784	-,5627	,7334
		4	-,9380*	,30569	,007	-1,5860	-,2900
		7	-1,4413*	,30569	,000	-2,0894	-,7933
		9	-1,3080*	,30569	,001	-1,9560	-,6600
		14	-2,0480*	,30569	,000	-2,6960	-1,4000
	1	0	-,3453	,30569	,275	-,9934	,3027
		2	-,2600	,34178	,458	-,9845	,4645
		4	-1,2833*	,34178	,002	-2,0079	-,5588
		7	-1,7867*	,34178	,000	-2,5112	-1,0621
		9	-1,6533*	,34178	,000	-2,3779	-,9288
		14	-2,3933*	,34178	,000	-3,1179	-1,6688
	2	0	-,0853	,30569	,784	-,7334	,5627
		1	,2600	,34178	,458	-,4645	,9845
	4	-1,0233*	,34178	,009	-1,7479	-,2988	
	7	-1,5267*	,34178	,000	-2,2512	-,8021	
	9	-1,3933*	,34178	,001	-2,1179	-,6688	
	14	-2,1333*	,34178	,000	-2,8579	-1,4088	
4	0	,9380*	,30569	,007	,2900	1,5860	
	1	1,2833*	,34178	,002	,5588	2,0079	
	2	1,0233*	,34178	,009	,2988	1,7479	
	7	-,5033	,34178	,160	-1,2279	,2212	
	9	-,3700	,34178	,295	-1,0945	,3545	
	14	-1,1100*	,34178	,005	-1,8345	-,3855	
7	0	1,4413*	,30569	,000	,7933	2,0894	
	1	1,7867*	,34178	,000	1,0621	2,5112	
	2	1,5267*	,34178	,000	,8021	2,2512	
	4	,5033	,34178	,160	-,2212	1,2279	
	9	,1333	,34178	,702	-,5912	,8579	
	14	-,6067	,34178	,095	-1,3312	,1179	
9	0	1,3080*	,30569	,001	,6600	1,9560	
	1	1,6533*	,34178	,000	,9288	2,3779	
	2	1,3933*	,34178	,001	,6688	2,1179	
	4	,3700	,34178	,295	-,3545	1,0945	
	7	-,1333	,34178	,702	-,8579	,5912	
	14	-,7400*	,34178	,046	-1,4645	-,0155	
14	0	2,0480*	,30569	,000	1,4000	2,6960	
	1	2,3933*	,34178	,000	1,6688	3,1179	
	2	2,1333*	,34178	,000	1,4088	2,8579	
	4	1,1100*	,34178	,005	,3855	1,8345	
	7	,6067	,34178	,095	-,1179	1,3312	
	9	,7400*	,34178	,046	,0155	1,4645	

Tabela VIII. Teste da diferença mínima significativa das *Pseudomonas spp.* nas amostras de salmão embaladas com FQ ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%			
Dependente ao longo dos dias					Limite Inferior	Limite Superior		
<i>Pseudomonas spp.</i> FQ	0	1	-,4480	,39382	,272	-1,2829	,3869	
		2	,0853	,39382	,831	-,7495	,9202	
		4	-,9280*	,39382	,032	-1,7629	-,0931	
		7	-1,5280*	,39382	,001	-2,3629	-,6931	
		9	-2,2580*	,39382	,000	-3,0929	-1,4231	
		14	-2,2213*	,39382	,000	-3,0562	-1,3865	
		1	0	,4480	,39382	,272	-,3869	1,2829
			2	,5333	,44030	,243	-,4001	1,4667
			4	-,4800	,44030	,292	-1,4134	,4534
			7	-1,0800*	,44030	,026	-2,0134	-,1466
			9	-1,8100*	,44030	,001	-2,7434	-,8766
			14	-1,7733*	,44030	,001	-2,7067	-,8399
		2	0	-,0853	,39382	,831	-,9202	,7495
			1	-,5333	,44030	,243	-1,4667	,4001
		4	-1,0133*	,44030	,035	-1,9467	-,0799	
		7	-1,6133*	,44030	,002	-2,5467	-,6799	
		9	-2,3433*	,44030	,000	-3,2767	-1,4099	
		14	-2,3067*	,44030	,000	-3,2401	-1,3733	
	4	0	,9280*	,39382	,032	,0931	1,7629	
		1	,4800	,44030	,292	-,4534	1,4134	
		2	1,0133*	,44030	,035	,0799	1,9467	
		7	-,6000	,44030	,192	-1,5334	,3334	
		9	-1,3300*	,44030	,008	-2,2634	-,3966	
		14	-1,2933*	,44030	,010	-2,2267	-,3599	
	7	0	1,5280*	,39382	,001	,6931	2,3629	
		1	1,0800*	,44030	,026	,1466	2,0134	
		2	1,6133*	,44030	,002	,6799	2,5467	
		4	,6000	,44030	,192	-,3334	1,5334	
		9	-,7300	,44030	,117	-1,6634	,2034	
		14	-,6933	,44030	,135	-1,6267	,2401	
	9	0	2,2580*	,39382	,000	1,4231	3,0929	
		1	1,8100*	,44030	,001	,8766	2,7434	
		2	2,3433*	,44030	,000	1,4099	3,2767	
		4	1,3300*	,44030	,008	,3966	2,2634	
		7	,7300	,44030	,117	-,2034	1,6634	
		14	,0367	,44030	,935	-,8967	,9701	
	14	0	2,2213*	,39382	,000	1,3865	3,0562	
		1	1,7733*	,44030	,001	,8399	2,7067	
		2	2,3067*	,44030	,000	1,3733	3,2401	
		4	1,2933*	,44030	,010	,3599	2,2267	
		7	,6933	,44030	,135	-,2401	1,6267	
		9	-,0367	,44030	,935	-,9701	,8967	

Tabela IX. Teste da diferença mínima significativa das *Pseudomonas spp.* nas amostras de salmão embaladas com FQM ao longo do armazenamento.

Comparação da Variável		Diferença das Médias	Desvio Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%		
Dependente ao longo dos dias					Limite Inferior	Limite Superior	
<i>Pseudomonas spp.</i> FQM	0	1	,1453	,42792	,739	-,7618	1,0525
		2	,0853	,42792	,844	-,8218	,9925
		4	,0120	,42792	,978	-,8952	,9192
		7	-1,5747*	,42792	,002	-2,4818	-,6675
		9	-1,2480*	,42792	,010	-2,1552	-,3408
		14	-1,4947*	,42792	,003	-2,4018	-,5875
	1	0	-,1453	,42792	,739	-1,0525	,7618
		2	-,0600	,47843	,902	-1,0742	,9542
		4	-,1333	,47843	,784	-1,1476	,8809
		7	-1,7200*	,47843	,002	-2,7342	-,7058
		9	-1,3933*	,47843	,010	-2,4076	-,3791
		14	-1,6400*	,47843	,003	-2,6542	-,6258
	2	0	-,0853	,42792	,844	-,9925	,8218
		1	,0600	,47843	,902	-,9542	1,0742
	4	-,0733	,47843	,880	-1,0876	,9409	
	7	-1,6600*	,47843	,003	-2,6742	-,6458	
	9	-1,3333*	,47843	,013	-2,3476	-,3191	
	14	-1,5800*	,47843	,004	-2,5942	-,5658	
4	0	-,0120	,42792	,978	-,9192	,8952	
	1	,1333	,47843	,784	-,8809	1,1476	
	2	,0733	,47843	,880	-,9409	1,0876	
	7	-1,5867*	,47843	,004	-2,6009	-,5724	
	9	-1,2600*	,47843	,018	-2,2742	-,2458	
	14	-1,5067*	,47843	,006	-2,5209	-,4924	
7	0	1,5747*	,42792	,002	,6675	2,4818	
	1	1,7200*	,47843	,002	,7058	2,7342	
	2	1,6600*	,47843	,003	,6458	2,6742	
	4	1,5867*	,47843	,004	,5724	2,6009	
	9	,3267	,47843	,505	-,6876	1,3409	
	14	,0800	,47843	,869	-,9342	1,0942	
9	0	1,2480*	,42792	,010	,3408	2,1552	
	1	1,3933*	,47843	,010	,3791	2,4076	
	2	1,3333*	,47843	,013	,3191	2,3476	
	4	1,2600*	,47843	,018	,2458	2,2742	
	7	-,3267	,47843	,505	-1,3409	,6876	
	14	-,2467	,47843	,613	-1,2609	,7676	
14	0	1,4947*	,42792	,003	,5875	2,4018	
	1	1,6400*	,47843	,003	,6258	2,6542	
	2	1,5800*	,47843	,004	,5658	2,5942	
	4	1,5067*	,47843	,006	,4924	2,5209	
	7	-,0800	,47843	,869	-1,0942	,9342	
	9	,2467	,47843	,613	-,7676	1,2609	