

**Mestrado Integrado em Bioengenharia**

**Ramo de Engenharia Biológica**

**Efeitos sinérgicos entre biopolímeros: aplicação a filmes e revestimentos edíveis para embalagem alimentar**

**Dissertação de Mestrado**

de

**Loleny Tavares**

**Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação**

Realizado em Julho de 2015

Orientador na FEUP: **Cristina Rocha**

Co-Orientador na FEUP: **Hiléia Souza**

**Departamento de Química**

**Junho de 2015**

(Página intencionalmente deixada em branco)

## **Agradecimentos**

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a todos que contribuíram na realização deste trabalho e no sonho de ser Engenheiro.

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pelo abençoado e pelos bons momentos que me tem proporcionado.

À Doutora Cristina Rocha, orientadora desta dissertação, pelos conhecimentos, atenção, motivação e disponibilidade ao longo do trabalho. Quero deixar aqui um muito obrigado pelos ensinamentos adquiridos que com certeza serão essenciais no futuro próximo.

À Doutora Hiléia Souza, co-orientadora desta dissertação, pela confiança, motivação e conhecimentos durante a execução deste trabalho. Obrigado pelos ensinamentos adquiridos e pela forma carinhosa que sempre me tratou.

Aos meus colegas de laboratório, Andreia, Raquel, João, Júlia pelos suportes e ensinamentos partilhados. Obrigado por tornarem o meu trabalho mais facilitado.

À minha mãe, minha melhor amiga e guerreira! Por tudo o que fez e faz por mim. Obrigado pelo amor e carinho demonstrados ao longo desta caminhada.

Ao meu irmão, meu melhor amigo, pelo suporte e companheirismo demonstrado ao longo da minha vida. Irmão obrigado por tudo!

Ao meu grande amigo Manuel Pina, pelo companheirismo e pelas longas horas de chamadas telefónicas.

A todos os meus amigos e companheiros Cabo-verdianos da Feup pelos bons e merecidos momentos vividos.

Ao meu amigo Engenheiro José Borges, pela amizade, companheirismo e revisão deste trabalho.

Aos meus colegas de curso pela partilha de conhecimentos e ensinamentos desde os primeiros dias na Feup.

A todos os meus Professores, desde infância até a esta data, pelos ensinamentos. Queria dizer-vos o seguinte: nunca deixem de lutar pelos vossos merecidos direitos.

E por fim, não menos importante, à minha família em geral pela amizade e apoios.

(Página intencionalmente deixada em branco)

## Resumo

O presente trabalho tem como principal objetivo realizar o estudo do potencial de aplicação dos efeitos sinérgicos entre biopolímeros a filmes e revestimentos para embalagem. Como é sabido, a utilização de plásticos de origem sintética para formulação de embalagens tem causado sérios problemas ecológicos devido a sua não biodegradabilidade. Para colmatar este flagelo ambiental uma das alternativas recorrentes é a utilização de biopolímeros devido a sua biodegradabilidade e disponibilidade.

Na primeira fase do trabalho, efetuaram-se estudos preliminares de dispersão ótica para a determinação do ponto isoelétrico das proteínas, razão ótima da interação entre os biopolímeros e influência da quantidade de água adicional (no coacervato) nas propriedades mecânicas e de vapor de água dos filmes, tendo-se previamente escolhido proteína do soro do leite (PSL) e proteína de soja (PS), ambas com cargas negativas, e quitosano (Q), polissacarídeo com carga positiva, para formular filmes compósitos recorrendo à técnica de “casting” e mecanismo de coacervação. Chegou-se a conclusão de que os filmes com maior percentagem de água, devido ao seu efeito plastificante, possuíam maior alongamento e menor tensão e barreira ao vapor de água. Com o intuito de averiguar se a incorporação de pequenas quantidades de quitosano na matriz proteica provocaria uma melhoria nas características dos filmes, foram realizados estudos das suas propriedades mecânicas (forças de tensão e deformação), permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, microestrutura, cor, opacidade e a sua isotérmica de sorção de água. Verificou-se que a mistura dos biopolímeros resultou em filmes com melhores características e propriedades justificado pela existência de efeitos sinérgicos. Obtiveram-se filmes com boas propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água, homogeneidade, transparência e sem odores.

Revestimentos à base de PSL, PSL+Q e Q foram aplicados às cerejas pelo mecanismo de imersão a fim de verificar sua viabilidade na manutenção da qualidade pós-colheita. Foram avaliadas a sua firmeza, pH, cor, perda de peso e análises microbiológicas a bolores, leveduras e mesófilos totais. Verificaram-se reduções mais acentuadas na firmeza e perda de peso e um ligeiro aumento de pH e crescimento de leveduras e bolores nas cerejas sem revestimento (controlo), enquanto a cor manteve-se praticamente constante para todas as amostras.

**Palavras-chave:** filmes, revestimentos, proteína do soro de leite, quitosano, sinérgicos

(Página intencionalmente deixada em branco)

## Abstract

This project has as main objective to make a study of the potential application of synergic effects between the biopolymer films and coatings for packaging. As it is known, the use of plastic of synthetic sources to containers formulation have caused serious ecological problems due to their non-biodegradability. To address this environmental scourge, one of the alternatives is the use of biopolymers due to its biodegradability and availability.

In the first stage of the work, preliminary studies were performed about the optical dispersion to determine the isoelectric point of the protein, find the optimal interaction between the biopolymers and the influence of the excess water (in the coacervate) in the mechanical properties and barrier of water vapor in the films. Whey protein isolate (PSL) and soy protein (SP), both with negative charges and chitosan (Q) with a positive charge, were chosen to formulate composite films using the technique of casting and coacervation mechanism. It was concluded that films with higher percentage of water, due to its plasticizing effect, have higher elongations and lower voltage barrier to water vapor. In order to investigate whether the incorporation of small amount of chitosan in the polymeric matrix would result in an improvement in the characteristics of the films, studies were made of their mechanical properties (stress and strain forces), water vapor permeability, solubility, microstructure color, opacity and its sorption isotherm in water. It was found that the mixture of biopolymers resulted in films with improved properties and characteristics, explained by the existence of synergistic effects. Films were obtained with good mechanical properties and permeability to water vapor, homogeneity, transparency and without odor.

Coatings with solutions of PSL, PSL+Q and Q were applied to cherries by immersion technology, to check their viability in maintaining or improving postharvest quality. Cherries were evaluated in the second, third and seventh day by means firmness, pH, color, weight loss and microbiology to test for yeast, mold and mesophilic total in the seventh day. Reductions in loss of weight and growth of yeasts and molds were observed as well a slight increase in pH and firmness in coated cherries when compared with uncoated cherries (control). It was verified that colour remained almost constant in all of samples.

**Keywords:** films, coatings, whey protein isolate, chitosan, synergistic

(Página intencionalmente deixada em branco)

## Notação e Glossário

E	Alongamento	(m)
$a_w$	Atividade de água	Adimensional
Op	Opacidade	%
T	Tensão de corte	(N/m <sup>2</sup> )
C	Constante de Guggenheim	Adimensional
X	Teor de humidade de equilíbrio na atividade da água $a_w$	(g H <sub>2</sub> O/g sólido seco)
$X_0$	Teor de humidade na monocamada	(g H <sub>2</sub> O/g sólido seco)
A	Área do filme	(m <sup>2</sup> )
x	Espessura	(m)
WVP	Permeabilidade ao vapor de água	(g m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> )
$P_m$	Perda de massa	(%)
k	Constante de correlação	Adimensional
pI	Ponto isoelétrico	Adimensional
D.O	Densidade ótica	Adimensional

### Letras Gregas

$\Delta t$	Varição de tempo	(h)
$\Delta L$	Varição de Comprimento	(m)
$\Delta m$	Varição de massa	(g)
$\Delta L$	Varição de Comprimento	(m)
$\Delta p$	Varição de pressão	(Pa)
$\Delta E$	Diferença de cor	Adimensional

### Lista de Siglas

SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento
Q	Quitosano
PSL	Proteína de Soro de Leite
PS	Proteína de Soja
S	Sobrenadante
PET	Politereftalato de etileno
POM	Polióxido de metileno
C	Coacervato

(Página intencionalmente deixada em branco)

## Índice

<i>Agradecimentos</i> .....	<i>iii</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>v</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>vii</i>
<i>Notação e Glossário</i> .....	<i>ix</i>
<b>Capítulo 1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enquadramento geral.....	2
1.2 Objetivos .....	3
1.3 Estrutura da tese .....	3
<b>Capítulo 2 Filmes e revestimentos edíveis</b> .....	<b>5</b>
2.1 Filmes e Revestimentos.....	6
2.1.1 História e definição.....	6
2.1.2 Funções e requisitos.....	6
2.1.3 Caracterização e avaliação das propriedades.....	7
2.1.3.1 Propriedades de barreira .....	7
2.1.3.2 Propriedades mecânicas .....	8
2.1.3.3 Solubilidade .....	9
2.1.3.4 Propriedades óticas .....	9
2.1.4 Técnicas e mecanismos de formulação.....	9
2.1.4.1 Interação entre proteínas-polissacarídeos .....	9
2.1.4.2 Mecanismo de coacervação .....	10
2.1.4.3 Efeitos sinérgicos entre biopolímeros .....	11
<b>Capítulo 3 Formulações e caracterização de filmes comestíveis</b> .....	<b>13</b>
3.1 Introdução .....	14
3.1.1 Componentes dos filmes formulados .....	14
3.1.1.1 Quitosano .....	14
3.1.1.2 Proteína do soro de leite .....	15
3.1.1.3 Proteínas de soja.....	16
3.1.2 Preparação de filmes edíveis .....	17
3.2 Materiais e métodos .....	18
3.2.1 Materiais.....	18
3.2.2 Preparação de soluções .....	18
3.2.2.1 Quitosano, proteína de soja e de soro de leite .....	18
3.2.3 Turbidimetria.....	19
3.2.3.1 Determinação do ponto isoelétrico das proteínas.....	19
3.2.3.2 Razão ótima de quitosano/proteína .....	19
3.2.4 Crio-Microscopia Eletrônica de Varrimento (Cryo SEM).....	20
3.2.5 Formulações de filmes.....	20
3.2.5.1 PSL + Q a pH 6.....	20

3.2.5.2	PSL a pH 6.....	21
3.2.5.3	PSL a pH 7.....	21
3.2.5.4	Q a pH 6.....	21
3.2.5.5	PS a pH 7.....	21
3.2.5.6	PS + Q a pH 5,5.....	21
3.2.6	Caracterização dos filmes preparados.....	22
3.2.6.1	Barreira ao vapor de água.....	22
3.2.6.2	Propriedades mecânicas.....	23
3.2.6.3	Solubilidade em água.....	24
3.2.6.4	Cor.....	24
3.2.6.5	Opacidade.....	24
3.2.6.6	Isotérmicas de sorção.....	25
3.2.6.7	Análise por microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	25
3.1	Resultados e discussão.....	27
3.1.1	Turbidimetria.....	27
3.1.1.1	Ponto isoelétrico das proteínas.....	27
3.1.1.2	Razão ótima quitosano/proteínas.....	28
3.1.2	Cryo SEM.....	29
3.1.2.1	Sistema PSL+Q.....	29
3.1.2.2	Sistema PS+Q.....	29
3.1.3	Aparência dos filmes obtidos.....	30
3.1.4	Filmes obtidos com a PSL.....	31
3.1.4.1	Influência de quantidade de sobrenadante.....	31
3.1.4.1.1	Propriedades mecânicas e WVP.....	31
3.1.4.2	Análise de efeito sinérgico.....	33
3.1.4.2.1	Propriedades mecânicas e WVP.....	33
3.1.4.2.2	Cor.....	35
3.1.4.2.3	Opacidade.....	36
3.1.4.2.4	Solubilidade.....	36
3.1.4.2.5	Isotérmicas de sorção.....	37
3.1.4.2.6	SEM.....	39
3.1.5	Filmes obtidos com PS.....	41
3.1.5.1	Propriedades mecânicas e WVP.....	41
3.1.5.2	Propriedades óticas.....	42
3.1.5.2.1	Cor e opacidade.....	42
3.1.5.3	Solubilidade.....	43
3.1.5.4	SEM.....	43
<b>Capítulo 4 Aplicação de revestimentos em cerejas.....</b>		<b>45</b>
4.1	Introdução.....	46
4.1.1	Cerejas.....	46
4.1.2	Análise microbiológica.....	47
4.1.3	Preparação de revestimentos edíveis.....	47
4.2	Materiais e métodos.....	49
4.2.1	Aquisição e Seleção.....	49
4.2.2	Preparo das soluções e aplicação do revestimento.....	49
4.2.3	Avaliações.....	50
3.1.5.5	Cor e perda de peso.....	50

3.1.5.6	pH .....	50
3.1.5.7	Textura.....	50
3.1.5.8	Análise microbiológica .....	50
4.3	Resultados e discussão .....	52
4.3.1	Perdas de peso .....	52
4.3.2	Firmeza.....	52
4.3.3	Cor.....	53
4.3.4	pH.....	54
4.3.5	Análise microbiológica.....	55
4.3.5.1	Mesofilos totais.....	55
4.3.5.2	Leveduras e bolores .....	56
<b>5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>60</b>
	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>61</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>68</b>

(Página intencionalmente deixada em branco)

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Interação proteína- polissacarídeo (McClements, 2006). .....	10
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do mecanismo da coacervação (Semenova & Dickinson, 2013). .	11
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do quitosano (Peniche-Covas et al., 1993). .....	15
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do mecanismo de coacervação .....	20
<b>Figura 5:</b> Montagem experimental do exsiccador .....	22
<b>Figura 6:</b> Curva tensão vs. deformação de um filme comestível. Adaptado:(Skurtys et al., 2010b).....	23
<b>Figura 7:</b> Ponto isoelétrico das proteínas obtidas pelo método da turbidimetria .....	27
<b>Figura 8:</b> Turbidez das amostras a pH 6, 25 °C tamponada em tampão de acetato (100 mM: Δ- mistura de quitosano com proteína de soro de leite; □- mistura de quitosano com a proteína de soja. ....	28
<b>Figura 9:</b> Microscopia eletrônica de varrimento a baixa temperatura (Cryo SEM) de soluções: a) Coacervato (3% PSL + 3% Q); b) Quitosano a 3%; c) Proteína a 3 %. Amplificações de x5000, 15kV WD=15mm.....	29
<b>Figura 10:</b> Microscopia eletrônica de varrimento a baixa temperatura (Cryo SEM) de soluções: a) Coacervato (0,12% PS + 3% Q); b) Quitosano a 3%; c) Proteína a 3 %. Amplificações de x5000, 15kV WD=15mm.....	30
<b>Figura 11:</b> Aparência visuais dos filmes formulados: a) PSL, b) Q, c) PSL + Q, d) PS .....	30
<b>Figura 12:</b> Representação tridimensional do sistema CIELab .....	35
<b>Figura 13:</b> Isotérmica de sorção a 25 °C dos filmes de Q, PSL + Q e PSL, e os respetivos ajustes ao modelo de GAB para diferentes atividades de água. ....	38
<b>Figura 14:</b> Microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos filmes: a) Coacervato (3% PSL + 3% Q); b) Q a 3%; c) PSL a 3 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm.....	40
<b>Figura 15:</b> Microscopia eletrônica de varrimento da secção transversal dos filmes: a) Coacervato (3% PSL + 3% Q); b) Q a 3%; c) PSL a 3 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm. ....	40
<b>Figura 16:</b> Microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos filmes: a) Coacervato (0,12% PS + 3% Q); b) Q a 3%; c) PS a 5 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm. ....	44
<b>Figura 17:</b> Microscopia eletrônica de varrimento da secção transversal dos filmes: a) Coacervato (0,12% PS + 3% Q); b) Q a 3%; c) PS a 5 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm. ....	44
<b>Figura 18:</b> Representação gráfica dos valores de perda de peso (%) obtidos para as amostras de cereja com e sem revestimento .....	52
<b>Figura 19:</b> Firmeza ( $N/g_{\text{cerejas}}$ ) de cerejas obtidas para as amostras com e sem revestimento. ....	53
<b>Figura 20:</b> Avaliação do parâmetro $\Delta E$ (diferença de cor) nas amostras de cerejas sem revestimento (controlo) e com revestimento (PSL, PSL+Q, e Q) ao longo de 7 dias. ....	54
<b>Figura 21:</b> Evolução do pH das amostras de cerejas com e sem tratamento ao longo de 7 dias. ....	55
<b>Figura 22:</b> Imagem representativa dos resultados obtidos para as amostras de cerejas: a) controlo b) PSL+Q c) Q d) PSL.....	55
<b>Figura 23:</b> Imagens de amostras de cerejas com e sem tratamento. ....	57
<b>Figura I:</b> Imagens das amostras de cerejas sem tratamento (controlo) e com tratamento (PSL, PSL+Q e Q) utilizadas para a quantificação e detenção de bolores e leveduras. ....	69

(Página intencionalmente deixada em branco)

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Principais propriedades e características de quitosano.....	15
<b>Tabela 2:</b> Características físicas das principais proteínas de soro de leite bovino.....	16
<b>Tabela 3:</b> Características físicas das principais proteínas de soja.....	16
<b>Tabela 4:</b> soluções saturadas de sais a 25 °C em diferentes atividades de água. ....	25
<b>Tabela 5:</b> Resultados da influência de quantidade de sobrenadante nas propriedades dos filmes (ambiente controlado): C-Coacervato, S-sobrenadante. ....	31
<b>Tabela 6:</b> Resultados da influência de quantidade de sobrenadante nas propriedades dos filmes (secos ao ar livre). C-Coacervato, S-sobrenadante.....	32
<b>Tabela 7:</b> Propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água dos filmes Q, PSL+Q e PSL (ambiente controlado) .....	33
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros para a caracterização da cor dos filmes.....	35
<b>Tabela 9:</b> Opacidade dos filmes preparados (Q, PSL+Q e PSL) .....	36
<b>Tabela 10:</b> Solubilidade dos filmes preparados (Q, PSL + Q e PSL).....	37
<b>Tabela 11:</b> Valores das constantes da equação de GAB a 25°C e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) calculados por regressão não linear para os filmes Q, PSL+Q e PSL. ....	39
<b>Tabela 12:</b> propriedades mecânicas e de vapor ao vapor de água dos filmes Q, PS + Q e PS. ....	41
<b>Tabela 13:</b> parâmetros da cor dos filmes Q, PS + Q e PS.....	42
<b>Tabela 14:</b> Opacidade dos filmes Q, PS + Q e PS .....	43
<b>Tabela 15:</b> Solubilidade dos filmes Q, PS + Q e PS.....	43
<b>Tabela 16:</b> Amostras preparadas para o revestimento dos morangos .....	49
<b>Tabela 17:</b> Quantificação de microrganismos mesófilos em cerejas com e sem revestimentos. ....	55
<b>Tabela 18:</b> Avaliação de bolores e leveduras em cerejas sem revestimento (contro) e com revestimento (PSL, PSL+Q e Q).....	56
<b>Tabela I:</b> Tabela utilizada na quantificação dos microrganismos.....	68

(Página intencionalmente deixada em branco)

# Capítulo 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento geral

Após a fase final de confeção ou colheita dos alimentos, são necessários meios que permitam a sua conservação, proteção e o seu transporte em segurança por longas distâncias de forma a ainda estar saudável no momento que chegue aos consumidores (Dainelli et al. (2008) ).

No século XIX começaram a ser fabricados as primeiras embalagens para a conserva desenvolvidas por Nicholas Appert (Brody et al., 2008). No entanto, a utilização de embalagens para a conservação dos alimentos não é um meio tão recente. Na antiguidade o homem já utilizava bexigas e estômagos de animais, sacos de couro, folhas de plantas, pedaços de bambu e vasos de barro cozido como embalagem alimentar (Subramanian, 2000). A crescente criação e utilização de embalagens aumentou de forma exponencial no período entre a primeira e a segunda guerra mundial devido à necessidade de fazer chegar os bens essenciais aos soldados em missão de guerra (Brody et al., 2008).

Atualmente a segurança alimentar dos consumidores e a ampliação do mercado de venda produtos e conseqüente aumento do número de venda dos produtos são os principais objetivos das indústrias alimentares e agrícolas. Como tal, têm sido desenvolvidas embalagens de diversos materiais, nomeadamente vidro, papel/cartão, metal, plástico ou multicamada constituída por dois ou mais materiais.

O plástico é o material mais usado no fabrico de embalagens para a indústria alimentar devido às suas características de durabilidade, flexibilidade de design, leveza e baixo preço. No entanto, a sua reduzida taxa de degradação e conseqüente acumulação no meio ambiente tem originado sérios problemas ecológicos e muitos debates nos últimos tempos (Marsh and Bugusu, 2007). Neste sentido, têm vindo a ser desenvolvidos vários estudos de forma a encontrar alternativas viáveis que permitam colmatar este flagelo ambiental. Uma das alternativas recorrentes é a formulação de embalagens utilizando biopolímeros, que por serem biodegradáveis, permitem criar alternativas aos 288 milhões de toneladas de plásticos não biodegradáveis produzidos anualmente (Colwill et al., 2012). Estes biopolímeros são normalmente derivados de subprodutos das indústrias alimentares, agrícolas e fontes renováveis. Se nas formulações dos filmes para embalagem se usarem apenas componentes comestíveis, o filme designa-se por filme edível.

Os filmes edíveis, tendo em conta a natureza dos componentes constituintes, podem ser classificados em três categorias: hidrocolóides, lípidos e compósitos. Os hidrocolóides

---

incluem proteínas (de soja, de soro de leite, de milho, de amendoim, glúten do trigo e colagénio, entre outras) e polissacarídeos (amido, alginatos, celulose e derivados, quitosano e agar, entre outros). Os lípidos englobam ceras, acilgliceróis e ácidos gordos. Os compósitos são misturas que contêm tanto hidrocolóides como lípidos (Bourtoom, 2008).

A formulação de filmes constituídos por dois biopolímeros, filmes compósitos, tem como vantagem a agregação dos aspetos particulares positivos dos biopolímeros tendo em vista a formulação de filmes com melhores propriedades no geral.

## **1.2 Objetivos**

O objetivo geral deste trabalho consistiu na avaliação do potencial de aplicação dos efeitos sinérgicos entre biopolímeros a filmes e revestimentos para embalagem. Tendo em conta o objetivo geral, a realização do trabalho teve as seguintes etapas:

- ✓ Pesquisar e encontrar, nas publicações bibliográficas, biopolímeros com possíveis efeitos sinérgicos aquando da mistura;
- ✓ Efetuar estudos preliminares de dispersão ótica para a determinação do ponto isoelétrico das duas proteínas escolhidas;
- ✓ Determinar a razão ótima da interação e consequente formação de coacervato entre as proteínas e o quitosano;
- ✓ Fazer estudos e consequente averiguação do comportamento dos biopolímeros na solução e consequente formação da matriz polimérica;
- ✓ Fazer a caracterização dos dois sistemas de filmes e filmes constituídos por um só componente através de estudos das suas propriedades mecânicas (forças de tensão e deformação), permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, microestrutura, cor, opacidade e a sua isoterma de sorção em água;
- ✓ Fazer a aplicação das soluções de biopolímeros como revestimento em cerejas e averiguar as suas potencialidades.

## **1.3 Estrutura da tese**

Este relatório é composto por quatro capítulos, conforme passa-se a explicar a seguir.

O primeiro capítulo é dedicado ao enquadramento geral do projeto, objetivos traçados e alcançados ao longo da realização deste trabalho.

No segundo capítulo “ Filmes e revestimentos edíveis” são abordados os temas, de forma mais abrangente, relacionados com os filmes e revestimento, desde as suas origens, funções, mecanismos utilizados para as suas formulações, até à caracterização das suas propriedades. Também é dado um especial destaque aos filmes compostos por dois componentes já desenvolvidos, com principal foco nos sistemas de formulação utilizando mecanismo de coacervação por interação eletrostática.

No terceiro capítulos “ formulações e caracterização de filmes comestíveis” são abordados os temas relacionados com os filmes, e são apresentados os componentes utilizados neste trabalho experimental, bem como as técnicas existentes para as suas formulações. Está dividido em 3 subcapítulos. No primeiro subcapítulo são abordados os temas citados anteriormente (componentes e técnicas de formulação). No segundo subcapítulo “Materiais e métodos”, são explicados de forma detalhada os procedimentos e a metodologia utilizados para a formulação e caracterização dos filmes composto por um ou dois biopolímeros. No terceiro subcapítulo” Resultados e discussão” são apresentados e discutidos os resultados obtidos antes e após a formulação dos filmes. Este subcapítulo está dividido em 3 partes: na primeira são apresentados os resultados para PSL e PS, e na segunda e terceira são apresentados os resultados para os filmes com PSL e PS, respetivamente. É de salientar que o Q está presente nos dois sistemas, daí a não referencia anteriormente.

O quarto capítulo “Aplicação de revestimento em cerejas” está focado com mais detalhes nos revestimentos. Está dividido em três subcapítulos: No primeiro subcapítulo “ introdução” são apresentados o objetivo do capítulo e uma abordagem sobre as cerejas e as principais técnicas de preparação de filmes, bem como a técnica de análise microbiológica usado. Também é dado uma especial atenção aos revestimentos de frutos relatados pela literatura. No segundo subcapítulo “Materiais e métodos ” são apresentados os procedimentos utilizados para a formulação dos diferentes revestimentos e as técnicas de avaliação utilizadas para o estudo da evolução das características das cerejas durante os dias de testes. No terceiro subcapítulo” Resultados e discussão ” são apresentados e discutidos os resultados das alterações das características das cerejas.

No final são apresentadas as conclusões gerais do trabalho, para os filmes e revestimentos, e as respostas às questões inicialmente colocadas bem como sugestões de estudos por realizar de forma a perceber melhor os sistemas de formulações de filmes usados.

## **Capítulo 2** Filmes e revestimentos edíveis

## **2.1 Filmes e Revestimentos**

### **2.1.1 História e definição**

Nos anos 5000 a.C. a conservação de produtos com folhas e cascas de árvores era bastante utilizada pelo homem para reduzir a perda de alimentos devido a deterioração. Na China nos séculos XII e XIII a utilização de ceras em várias frutas era comum para evitar a perda de humidade e para criar uma superfície de fruta brilhante para fins estéticos (Embuscado and Huber, 2009). Na Europa, o processo era conhecido como "larding" - armazenar várias frutas em cera ou gorduras para o consumo mais tarde. Esta proteção impedia perdas contínuas de água; no entanto, a camada espessa do filme intervinha na troca de gases, alterando a qualidade e os aspetos sensoriais destes alimentos (Embuscado and Huber, 2009). No século XV, uma película comestível, Yuba, feita a partir de leite de soja, foi utilizada em Japão para a manutenção da qualidade dos alimentos e melhorar a sua aparência (Wang, 1981). No século XIX, nos EUA, foi desenvolvida e patenteada uma técnica de conservação de produtos derivados de carne, utilizando a proteína gelatina (Skurtys et al., 2010b).

Os revestimentos edíveis podem ser considerados um caso particular dos filmes edíveis. Contudo, os filmes edíveis são normalmente pré-formados e só depois aplicados ao alimento enquanto os revestimentos edíveis são formados diretamente sobre a superfície do alimento (Skurtys et al., 2010a). Sendo assim, os filmes edíveis são definidos como uma camada fina e comestível formada sobre a superfície de um alimento como revestimento ou colocada entre componentes do mesmo (Kester and Fennema, 1986). A utilização destes filmes e revestimentos edíveis tem vindo a ganhar um forte interesse nos últimos anos devido a biodegradabilidade e disponibilidade dos seus componentes. O pressuposto da utilização destes filmes e revestimentos é a redução da dependência da utilização dos materiais sintéticos não biodegradáveis para formulações de plásticos devido aos sérios problemas ecológicos e crescente preocupação ambiental cada vez mais evidenciada nos últimos tempos.

### **2.1.2 Funções e requisitos**

A aplicação de filmes e revestimentos edíveis tem como função principal proteger os alimentos do ambiente externo e se possível aumentar o tempo de prateleira desses alimentos. Estes filmes quando aplicados em alimentos permitem (Tharanathan, 2003):

- Reduzir a taxa de absorção de oxigénio (respiração lenta);

- Constituir uma barreira seletiva para os gases (dióxido de carbono e vapor de água);
- Atenuar a migração de lípidos e aromas;
- Melhorar as suas propriedades mecânicas;
- Prevenir contra o desenvolvimento de microrganismos durante o armazenamento;

Para além das propriedades funcionais apresentadas, estes filmes podem ser usados para incrementar novas propriedades aos alimentos, como por exemplo, por incorporação de agentes antimicrobianos, antioxidantes, enzimas ou outros ingredientes funcionais, melhorando as suas características (Skurtys et al., 2010b).

### **2.1.3 Caracterização e avaliação das propriedades**

Devido ao fato dos alimentos estarem sujeitos a condições ambientais adversas, durante o transporte e o armazenamento, como por exemplo, a variação de humidade relativa, temperatura e manuseio, a composição química das suas superfícies altera-se, ficando muitas vezes os conteúdos internos expostos ao meio ambiente (Cha and Chinnan, 2004). Deste modo, é usual fazerem-se estudos preliminares de propriedades dos filmes, para adaptar a sua funcionalidade à aplicação pretendida: poderá ser exigido que o filme tenha boas propriedades mecânicas, sirva como boa barreira aos gases, que tenha uma boa espessura e solubilidade, dentre outros (Kester and Fennema, 1986). Os filmes, quando aplicados em frutos, por exemplo, criarão uma atmosfera controlada ou modificada no interior dos alimentos, que vai atrasar o amadurecimento, permitindo um aumento do seu tempo de vida de prateleira (Skurtys et al., 2010b).

#### **2.1.3.1 Propriedades de barreira**

A difusão dos gases simples (por exemplo, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), por meio da película formada à superfície do alimento, geralmente obedece as leis de Fick e de Henry. Esta difusão é influenciada pela solubilidade, difusividade e diâmetro cinético destes gases (Skurtys et al., 2010b). A propriedade de barreira dos filmes é avaliada pela taxa de transmissão do vapor de água (WVTR) e a permeabilidade destes ao vapor de água (WVP). A WVTR é definida como quantidade de água que passa pela membrana, por unidade de tempo, nas condições de humidade relativa e temperatura previamente definida. A WVP refere-se ao produto do fluxo pela espessura, dividido pelo gradiente de pressão de vapor e a área do filme (Chen, 1995).

A permeabilidade dos filmes depende de vários fatores, tais como: a integridade dos filmes, das propriedades e características dos constituintes dos filmes e do tipo de interação entre os biopolímeros. Deve-se ter cuidado na comparação dos valores de WPV publicados, porque estas propriedades variam muito tanto com a formulação como com as condições operatórias. Por exemplo, diferenças nos plastificantes utilizados ou temperaturas e humidades relativas do teste conduzem a filmes com permeabilidades muito distintas. Os filmes e os revestimentos constituídos por compostos hidrofílicos, devido a afinidade com a água, apresentam permeabilidade ao vapor de águas superiores aos filmes que apresentam lípidos, hidrofóbicos, na sua composição (Morillon et al., 2002).

### **2.1.3.2 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas são determinadas através de teste de aplicação de tensão uniaxial, em que os filmes são submetidos a uma deformação crescente, sendo os parâmetros obtidos e registados ao longo do ensaio (Skurtys et al., 2010b). O conhecimento da resistência mecânica é utilizado para diversos fins, nomeadamente para proteger os alimentos durante o seu manuseamento e transporte (Chen, 1995).

A resistência mecânica dos filmes é estudada tendo em conta três parâmetros determinados a partir da curva tensão vs. deformação: tensão de rutura, o módulo de Young (Y) e alongamento na tensão máxima de rutura ou deformação na rutura (Skurtys et al., 2010b). As propriedades mecânicas dos filmes variam muito com o tipo de biopolímeros usado na sua formulação: por exemplo, polissacarídeos apresentam resistência moderada a tração e baixo alongamento. Estas diferenças devem-se a diferenças de estrutura da matriz polimérica: por exemplo, no caso dos polissacáridos é geralmente linear (embora com ramificações) enquanto as proteínas apresentam uma estrutura complexa devido às interações intramoleculares dos seus grupos amins e carboxílicos (Chen, 1995).

O aumento da concentração de plastificante provoca redução na tensão e o aumento do alongamento dos filmes devido ao aumento do volume livre existente na matriz polimérica, por redução de ligações de hidrogénio entre as cadeias poliméricas (Myllärinen et al., 2002).

### **2.1.3.3 Solubilidade**

A solubilidade em água de filmes edíveis é um indicador da resistência do revestimento quando exposto a um meio contendo água. Dependendo da sua aplicação pode requerer insolubilidade, para proteger a integridade do produto sendo resistente à água, ou solubilidade no caso de encapsulação de alimento ou de aditivo (Fakhouri et al., 2007). Uma maior solubilidade poderá indicar uma menor resistência do filme, ou seja, na presença de água o filme poderá dissolver-se perdendo o seu efeito protetor à superfície do alimento (Maizura et al., 2007). Em alguns casos, a solubilização total dos filmes em água não inviabiliza a sua aplicação, pois existem produtos pré-cozidos que necessitam de contato posterior com a água, onde a dissolução instantânea no meio é importante. A solubilidade também é vantajosa em casos onde o filme é consumido junto como o produto (Turhan and Şahbaz, 2004). A adição de plastificantes, como glicerol, devido ao grupo (-OH), aumentam os valores de solubilidade do filme (Skurtys et al., 2010b).

### **2.1.3.4 Propriedades óticas**

A cor e a transparência (opacidade) dos alimentos são dois critérios utilizados pelos consumidores na aceitação ou rejeição de produtos. As indústrias alimentares sentiram por isso a necessidade de confeccionarem produtos que satisfaçam estes requisitos (Nielsen, 2010). As análises da cor e da opacidade dos filmes edíveis são essenciais de forma a produzir filmes que não interferem diretamente nas características sensoriais dos produtos aplicados (Chen, 1995). Filmes transparentes são mais aceites mas, em alguns casos a aplicação de filmes corados pode tornar-se interessante caso o objetivo seja a proteção contra incidência da luz nos alimentos, prevenindo a sua deterioração (Fakhouri et al., 2007). Um filme diz-se transparente quando a luz incidente o atravessa com o mínimo de absorção ou reflexão. No caso de filmes opacos a luz incidente não atravessa a espessura do filme, não sendo possível ver a superfície do alimento (Nielsen, 2010).

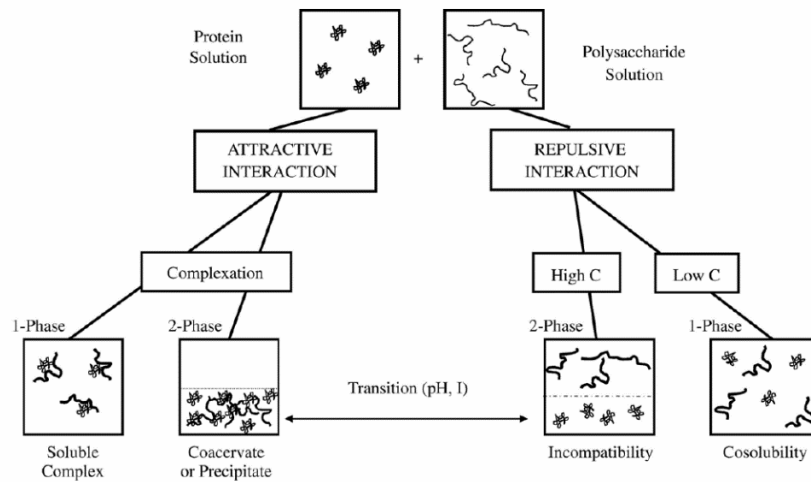
## **2.1.4 Técnicas e mecanismos de formulação**

### **2.1.4.1 Interação entre proteínas-polissacarídeos**

A mistura de soluções de proteína e polissacarídeo pode conduzir a uma de várias situações de acordo com as interações polímero-polímero e solvente-polímero, atrativas ou repulsivas, dependendo essencialmente da carga dos biopolímeros em solução (McClements, 2006). A interação entre dois biopolímeros depende da contribuição entrópica e da entalpia da mistura. Como tal, o conhecimento dos fenômenos de separação

e agregação das duas fases são de extrema importância para uma melhor compreensão dos fenômenos que ocorrem na mistura (Doublier et al., 2000)

Na figura 1 são representadas várias situações que ocorrem quando são misturadas soluções de proteínas e soluções de polissacarídeos (McClements, 2006).



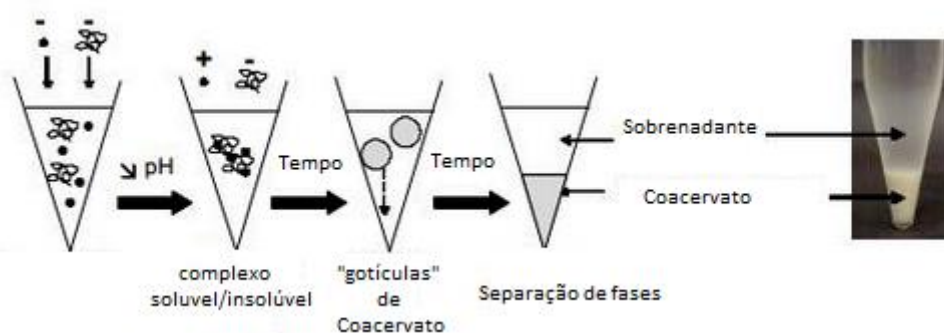
**Figura 1:** Interação proteína- polissacarídeo (McClements, 2006).

As soluções de proteínas e polissacarídeos quando misturadas, dependendo do pH da mistura, podem ou não ter cargas iguais. Se as cargas forem contrárias ocorrem interações eletrostáticas entre os biopolímeros, levando a formação de um complexo. O complexo formado pode formar uma fase separada, precipitando ou formando um coacervato (mecanismo de coacervação), ou ficar em solução quando a concentração de biopolímeros é baixa (McClements, 2006). Se os biopolímeros tiverem cargas iguais há repulsão e o sistema pode ser co-solúvel ou incompatível. O sistema é co-solúvel quando as concentrações de biopolímeros estão abaixo do limiar para haver separação de fases, ocorrendo a formação de uma única fase. O sistema é incompatível quando os biopolímeros têm concentrações altas, havendo a formação de duas fases diferentes cada uma enriquecida com um dos polímeros (Rocha et al., 2014).

#### 2.1.4.2 Mecanismo de coacervação

Os filmes e os revestimentos comestíveis podem ser formados por diversos mecanismos, dependendo dos componentes utilizados para a sua formulação, bem como o tipo de interações existentes entre estes. A coacervação é um dos métodos utilizados e baseia-se na separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais (Somasundaran, 2006). A coacervação pode ser simples ou complexa. A coacervação simples consiste na

precipitação de um único hidrocolóide disperso numa solução aquosa (Semenova and Dickinson, 2013). Esta precipitação pode ser obtida pela adição de um eletrólito, como o sulfato de sódio, em que o aumento da sua concentração leva à diminuição da solubilidade das cadeias poliméricas, levando à formação de agregados que precipitam com o passar do tempo. A coacervação complexa consiste na separação espontânea de fases em solução, e ocorre através de interações eletrostáticas entre dois polímeros com cargas elétricas opostas, levando a formação e precipitação de polímeros complexos com cargas neutras (McClements, 2006). A formação de coacervatos é influenciado por vários fatores, tais como: a estequiometria, o pH, a força iónica, a temperatura, tempo de agitação e pressão. Na figura 2 encontra-se representado o esquema, adaptado, deste mecanismo (Semenova and Dickinson, 2013).



**Figura 2:** Representação esquemática do mecanismo da coacervação (Semenova and Dickinson, 2013).

O mecanismo de gelificação é também bastante utilizado na formulação de filmes e revestimentos comestíveis. Este mecanismo consiste no aquecimento das macromoléculas que envolvem desnaturação, formação de gel e precipitação ou resfriamento de uma dispersão de hidrocolóides (Fakhouri et al., 2007).

### 2.1.4.3 Efeitos sinérgicos entre biopolímeros

A combinação dos biopolímeros pode ter como vantagem a agregação dos pontos positivos de cada um dos biopolímeros utilizados, como forma de proporcionar melhores características aos novos filmes produzidos (Li et al., 2006). Por exemplo, os polissacáridos e proteínas são biopolímeros hidrofílicos, sendo por isso excelentes barreiras ao oxigénio e aromas. Já os lípidos são hidrofóbicos e por isso dão origem a filmes com melhores propriedades de barreira à humidade do que os polissacáridos e proteínas (Sapru and Labuza, 1994a). A combinação destes biopolímeros possibilita a formação de novos filmes com propriedades singulares, designados de filmes compósitos

(Kester and Fennema, 1986). Nos filmes e revestimentos compósitos, os biopolímeros existentes em menores quantidades ficam normalmente retidos na matriz polimérica, havendo interações intramoleculares cruzadas entre cadeias de biopolímeros para formar uma matriz tridimensional rígida. Como tal, espera-se que as propriedades dos filmes sejam reforçadas. As principais interações que ocorrem entre os biopolímeros dos compósitos são (McClements, 2006):

- **Interações eletrostáticas:** esta interação é importante em biopolímeros que apresentam carga elétrica nas condições em que são utilizados (pH e força iônica). As interações podem ser de atração ou repulsão dependendo da carga dos biopolímeros;

- **Interações hidrofóbicas:** esta interação ocorre normalmente em soluções aquosas, por associação de biopolímeros que contêm grupos não polares;

- **Ligação por pontes de hidrogénio:** esta interação é importante quando os biopolímeros possuem cadeias com segmentos onde ocorre ligações de hidrogénio.

Existem diversos estudos publicados acerca da mistura dos biopolímeros com efeitos sinérgicos tendo em vista esta melhoria das propriedades dos filmes. Normalmente a incorporação de lípidos melhoram as propriedades de barreira de água, os polissacáridos melhoram as propriedades mecânicas quando incorporados nos filmes com proteínas. Por exemplo, a combinação de metilcelulose e ácidos gordos melhorou a barreira ao vapor de água dos filmes de celulose (Kamper and Fennema, 1984). No referido trabalho, fez-se o estudo da propriedade de barreira ao vapor de água para diferentes concentrações de ácidos gordos, temperatura e humidade.

Outros trabalhos referem a mistura de lípidos e hidroxipropil-metilcelulose (Hagenmaier and Shaw, 1990), metilcelulose e lípidos (Greener and Fennema, 1989), metilcelulose e ácidos gordos (Sapru and Labuza, 1994b), zeína de milho, metilcelulose e ácido gordo (Park et al., 1994), proteínas do soro de leite e lípidos (McHugh et al., 1994), caseína e lípidos (Avena-Bustillos and Krochta, 1993), gelatina e amido solúvel (Arvanitoyannis et al., 1998), hidroxipropilamido e gelatina (Arvanitoyannis et al., 1997), zeína de milho e amido (Ryu et al., 2002), gelatina e ácidos gordos (Bertan et al., 2005), proteínas do soro de leite e gelatina (Cao et al., 2007) e quitosano e ácido polilático (Suyatma et al., 2004).

## **Capítulo 3** Formulações e caracterização de filmes comestíveis

## **3.1 Introdução**

A formulação e consequente caracterização das propriedades dos filmes edíveis permitem identificar os seus potenciais de aplicação em alimentos. O objetivo deste capítulo foi formular e estudar a viabilidade de aplicação de filmes constituídos por dois componentes, e averiguar se, no caso dos filmes com um só componente, as suas propriedades gerais são melhoradas após a mistura.

### **3.1.1 Componentes dos filmes formulados**

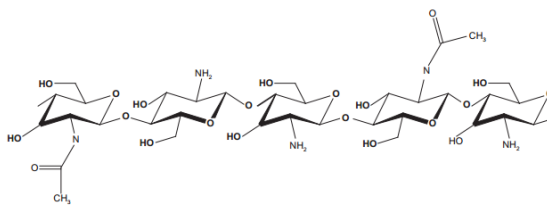
Neste trabalho experimental fez-se a formulação de filmes utilizando 3 biopolímeros: proteína de soro do leite (PSL), proteína de soja (PS) e quitosano (Q). A escolha das referidas proteínas deveu-se à sua disponibilidade em abundância como subprodutos de algumas indústrias alimentares e agrícolas; o seu aproveitamento permite reduzir a quantidade destes resíduos no meio ambiente. A seguir serão apresentadas as características e propriedades funcionais de cada biopolímero em particular.

#### **3.1.1.1 Quitosano**

A escolha do quitosano deveu-se à sua abundância na natureza, uma vez que este provém da quitina, segundo biopolímero mais abundante na terra depois da celulose (Elsabee and Abdou, 2013). O quitosano destaca-se também por apresentar carga global positiva em pH biológico, enquanto a maioria dos polissacarídeos encontram-se negativamente carregados nas mesmas condições, e por possuir propriedades antimicrobianas (Skurtys et al., 2010b).

O quitosano é um polissacarídeo catiónico produzido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exosqueleto de crustáceos, através de um processo de hidrólise dos grupos acetil-amino em meio alcalino forte e à temperatura elevada (Shahidi et al., 1999). O processo de desacetilação em meio ácido não é aconselhado, uma vez que as ligações glicosídicas são suscetíveis à hidrólise ácida (Elsabee and Abdou, 2013). Estruturalmente é composto por unidades de glucosamina, 2-Amino-2-desoxi-D-glucose, unidas às unidades de acetilglucosamina, N-Acetyl-D-Glucosamine, por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ .

Na figura 3 é apresentada uma possível configuração química de quitosano que depende do grau de desacetilação (Peniche-Covas et al., 1993).



**Figura 3:** Estrutura química do quitosano (Peniche-Covas et al., 1993).

O quitosano apresenta características e propriedades físico-químicas e biológicas únicas, que incluem (Shahidi et al., 1999), tabela 1:

**Tabela 1:** Principais propriedades e características de quitosano

Propriedades físico-químicas	Propriedades biológicas
Solubilidade em água e em meio ácido	Biocompatibilidade
Massa molecular elevada	Polímero natural
Estabilidade a pH <5,5	Biodegradável
Alta densidade de carga	Seguro e não tóxico
Reage com hidróxido	Acelera a formação de osteoclasto
	Fungicida

Estas propriedades aliadas à sua atividade antimicrobiana levam a que o quitosano seja muito utilizado para formulações de filmes (Skurtys et al., 2010b).

### 3.1.1.2 Proteína do soro de leite

O isolado de proteína do soro de leite (PSL) contém ~90% de proteína e 4-6% de água. Os restantes 4-6% do ingrediente consistem numa combinação de gorduras e lactose (Pérez-Gago and Krochta, 2002). O soro é um subproduto da indústria dos laticínios, obtido durante a produção industrial de queijo ou caseína. Possui alto valor funcional e nutritivo, capacidade de gelatinização, emulsificação, solubilidade, formação de espuma, viscosidade, sendo utilizado em larga escala industrial como ingrediente para a produção de produtos alimentares. Os filmes obtidos a partir de proteínas de soro de leite caracterizam-se pela transparência, flexibilidade, ausência de odor e sabor, favorecendo a sua aceitação por parte dos consumidores (Chen, 1995). Estes filmes também são menos permeáveis a substâncias apolares, tais como, oxigénio, compostos aromáticos e óleos (Gennadios, 2002). Contudo, os filmes à base de PSL não constituem barreiras eficientes para o vapor de água devido a natureza hidrofílica das proteínas (Cao et al., 2007).

PSL é na realidade uma mistura de proteínas que podem ser divididas em quatro classes principais:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albumina do soro e várias imunoglobulinas (Pérez-Gago and Krochta, 2002). A maior parte destas proteínas têm uma conformação globular e são suscetíveis à desnaturação e agregação a temperatura e pressão elevada. Na tabela 2 são apresentadas as principais características das proteínas que compõem a PSL (Haraguchi et al., 2006).

**Tabela 2:** Características físicas das principais proteínas de soro de leite bovino

Proteína	Ponto isoeletrico	Peso molecular (kDa)	Composição (%)	Temperatura Desnaturação
$\beta$ -globulina	5,2	18,400	60	78
$\alpha$ -lactoalbumina	4,8-5,1	14,200	22	62
Albumina	4,8 – 5,1	66	5,5	64
Imunoglobulinas	5,5 - 6,8	150-1000	9,1	72

### 3.1.1.3 Proteínas de soja

As proteínas de soja (PS) existem comercialmente sob a forma de isolado proteico de soja e, à semelhança da PSL, são na realidade uma mistura complexa de proteínas com diferentes propriedades e pesos moleculares que variam entre 200 a 600 kDa (Nishinari et al., 2014). As globulinas são a classe de proteínas encontrada em maior quantidade, representado mais de 90 % do total da mistura proteica (Skurtys et al., 2010b). O ponto isoeletrico da proteína de soja encontra-se entre pH 4-5 (Liyanage et al., 2001). As propriedades físico-químicas das duas maiores globulinas da proteína de soja encontram-se representado na tabela 3 (Nishinari et al., 2014).

**Tabela 3:** Características físicas das principais proteínas de soja

Proteínas	Subunidades	Peso molecular (kDa)	Ponto isoeletrico
$\beta$ -conglucina	A (alfa)	84	4,90
	$\alpha'$ (alfa')	72	5,18
	$\beta$ (beta)	51	5,66 - 6,00
Glicina	Ácida	36 – 40	4,80- 5,40
	Básica	18 – 20	8,00 - 5, 50

À semelhança dos filmes de PSL, os filmes à base de proteínas de soja, devido a sua natureza hidrofílica, não apresentam propriedades mecânicas e de barreiras a vapor de água satisfatórias, em condições de alta humidade (Wittaya, 2012). No entanto, com a

adição de agentes de reticulação, como o glutaraldeído e/ou o formaldeído, estas propriedades podem ser melhoradas (Skurtys et al., 2010b). A adição de glicerol como plastificante melhora a sua flexibilidade (Tharanathan, 2003).

### 3.1.2 Preparação de filmes edíveis

Na preparação dos filmes edíveis podem ser usadas duas vias: a via húmida, em que os vários componentes são solubilizados e misturados num solvente que depois tem que ser evaporado (“*casting*” e “*knife coating*”), ou a via seca, em que os vários componentes são misturados, fundidos e depois solidificam com a forma final desejada (neste caso, sob a forma de filme); a técnica de extrusão acoplada ao “*film blowing*” é a mais comum a nível industrial. Todavia é necessária a adição de plastificantes, como o polietileno-glicol, sorbitol e glicerol, de forma a tornar o filme mais deformável e flexível (Cao et al., 2007).

“*Casting*” ou espalhamento é a técnica mais utilizada na preparação dos filmes por via húmida. Consiste no espalhamento da solução numa placa e posterior evaporação do(s) solvente(s) aquando da secagem, levando à diminuição da solubilidade do(s) biopolímero(s) que alinham para formar filmes (Somasundaran, 2006). Normalmente a secagem dos filmes ocorre ao ar livre ou numa estufa com ventilação, eventualmente com humidade controlada (Skurtys et al., 2010b).

A técnica de **extrusão** é mais utilizada na indústria dos plásticos para a formulação de filmes de polímeros sintéticos. No entanto já existem filmes biodegradáveis preparados por esta técnica (Willett and Finkenstadt, 2003). O processo de extrusão é baseado nas propriedades termoplásticas de polímeros, onde o material é forçado através de uma matriz adquirindo assim a forma pré determinada.

## 3.2 Materiais e métodos

### 3.2.1 Materiais

Quitosano com grau de deacetilação 92% (234.7 kDa) foi adquirido à Primex (Siglufjordur, Iceland). O isolado proteico de proteína do soro de leite comercial (PSL, LACTOPRODAN DI-9224,) foi cedido pela Arla Foods Ingredients Ambh, e de acordo com o fabricante tem as seguintes especificações: composição mínima de proteína total de 93,5%, com 74% de  $\beta$ -lactoglobulina (18,36 kDa) 18% de  $\alpha$ -lactalbumina (14,5 kDa), 6% de soro de bovinoalbumina (BSA, 69 kDa) e minerais, tais como sódio (0,5%), de potássio (1%), e de cálcio (0,1%).

Isolado proteico de soja (ref. 20120201) foi adquirido à Formulab. Ácido acético glacial (Merck), acetato de sódio trihidratado (Merck, suprapur, glicerol (Sigma-Aldrich). Os restantes reagentes usados eram de grau analítico.

### 3.2.2 Preparação de soluções

#### 3.2.2.1 Quitosano, proteína de soja e de soro de leite

O procedimento experimental iniciou-se com a preparação do tampão acetato de sódio (100mM) em água destilada a pH 5,5 e 6. Quando necessário, o pH foi ajustado por adição de gotas de ácido acético glacial ou NaOH.

Soluções-mãe de quitosano (3% p/p) foram preparadas dissolvendo o polissacárido em tampão acetato de sódio a pH 6. Posteriormente as soluções ficaram em repouso, num frigorífico a 4 °C, durante 24 horas para uma completa hidratação. Após o tempo de repouso, as soluções foram centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos para eliminar impurezas e o quitosano não solubilizado.

As soluções de proteínas de soro de leite a 0,25 e 3% foram preparadas em tampão acetato de sódio a pH 6. As soluções foram deixadas em agitação e repouso durante a noite para uma completa hidratação.

As soluções de proteínas de soja, para a formulação por coacervação, foram preparadas em água destilada depois de verificada que esta apresentava pouca solubilidade em tampão acetato e uma maior solubilidade em água a pH 5,5. Estas soluções foram preparadas a 1, 1,5, 2, e 2,5 % e centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos para a remoção das impurezas e as proteínas que não solubilizaram. Fez-se a quantificação da proteína de soja existente no sobrenadante pelo método Bradford. Verificou-se que a solução preparada a 1 % foi aquela que apresentou uma maior quantidade de proteínas no

sobrenadante com a concentração de 0,116 %. Utilizou-se esta concentração como referência nos cálculos da razão ótima de interação entre o Q e PS e na formulação de filmes Q + PS.

### **3.2.3 Turbidimetria**

A dispersão ótica (D.O.) das soluções de Q/PSL, Q/PS, PSL e PS foi medida usando um espectrofotômetro de UV-visível (Jasco, V630Bio spectrophotometer) num comprimento de onda de 400 nm numa célula de amostra de quartzo com luz caminho 10 mm, inserido num bloco termostaticado a 25°C por meio de um banho de água. O tampão acetato foi usado como branco. Fizeram-se análises em triplicado e os valores obtidos representam a média de três leituras consecutivas. No que se refere a dispersão ótica das soluções de quitosano contendo as proteínas e a solução de proteínas, duas diferentes abordagens foram usadas.

#### **3.2.3.1 Determinação do ponto isoelétrico das proteínas**

O conhecimento do ponto isoelétrico das proteínas, que corresponde ao intervalo de pH em que a proteína apresenta uma estrutura com carga nula, é importante uma vez que permite determinar em que intervalo de pH os dois biopolímeros (proteína e polissacarídeos) têm cargas opostas. Para a obtenção do ponto isoelétrico de ambas as proteínas, prepararam-se amostras contendo cada uma delas 900 microlitros de soluções proteicas. Adicionaram-se alíquotas de ácido acético (3-15 microlitros) de modo a ter amostras com variação de pH entre 3 e 6.

Depois fez-se a leitura da dispersão ótica das amostras em triplicado no espectrofotômetro de UV-visível (Jasco, V630Bio spectrophotometer).

#### **3.2.3.2 Razão ótima de quitosano/proteína**

Para a determinação da razão ótima entre quitosano e proteína do soro de leite, a ser usada para a formulação de filmes, prepararam-se várias amostras contendo cada uma 900 microlitros da solução de proteína de soro de leite a 0,25% (w/w) e adicionaram-se alíquotas de quitosano (2-70 microlitros) a 0,4 % (w/w) em cada uma das amostras. As amostras foram então agitadas medindo-se de seguida a dispersão ótica (que está relacionada com a turbidez das amostras). Foi seguido o mesmo procedimento para a determinação da razão ótima entre quitosano e proteína de soja.

### 3.2.4 Crio-Microscopia Eletrônica de Varrimento (Cryo SEM)

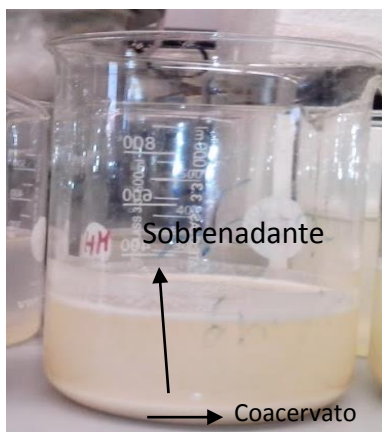
A observação da estrutura dos coacervatos e soluções de biopolímeros respectivas (PSL + Q, PSL, Q e PS) foram efetuadas a  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 kV e 15 mm de distância de trabalho num microscópio eletrônico de varrimento JEOL JSM 6301F equipado com uma câmara de crio-preparação Gatan ALTO 2500, localizado no CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto). Inicialmente as amostras foram congeladas a  $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$  em azoto líquido e revestidas com Au/Pd. Depois foi feita a sublimação a  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1,5 min. Em seguida as amostras foram colocadas e fraturadas numa camara a  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  e por fim revestidas a  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos.

### 3.2.5 Formulações de filmes

#### 3.2.5.1 PSL + Q a pH 6

Uma vez determinado o ponto isoelétrico das duas proteínas e a razão ótima de quitosano/proteínas, seguiu-se a preparação dos filmes PSL + Q. Verificou-se que uma certa quantidade de sobrenadante, deixada no coacervato, permitia eliminar com maior eficácia as bolhas que formavam aquando do espalhamento do coacervato na placa de petri. Sendo assim, fez-se o estudo da influência desta quantidade de sobrenadante nas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água dos filmes formulados.

Assim sendo, foram considerados quatro casos de estudo: no primeiro caso, fez-se a



adição, gota a gota, da solução de quitosano a 3 % (w/w) na solução de proteína a 3% (w/w), ambas a pH 6. O coacervato formado foi aproveitado e descartado todo o sobrenadante, figura 4. O mesmo procedimento foi seguido nos restantes três casos mas deixou-se 2, 5 e 10 % de sobrenadante adicional, respetivamente. Depois fez-se a determinação do peso seco da mistura com o coacervato, em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para determinar a quantidade de plastificante (glicerol) que se deveria

**Figura 4:** Representação esquemática do mecanismo de coacervação

adicionar ao coacervato. Adicionou-se glicerol como plastificante até perfazer 30% da massa de biopolímeros (PSL+Q), tendo em conta o valor do peso seco determinado. Depois fez-se a homogeneização da solução no homogeneizador (Ultra-Turrax®, IKA) a 5000 rpm durante 5 minutos. De seguida levou-se esta solução para sonicador e a solução ficou em

banho-maria de ultrassons durante 15 minutos para a remoção de pequenas bolhas formadas aquando da agitação. De seguida espalhou-se a solução em placa de petri de polióxido de metileno (POM) e deixou-se secar numa camara com ventilação, a 25 °C e humidade relativa de 40 %, durante 48 horas. O procedimento designado por “LT”, desde a adição de glicerol até o espalhamento do coacervato em placa de petri de polióxido de metileno (POM), manteve-se igual em relação às formulações dos filmes de Q e Q + PS.

### **3.2.5.2 PSL a pH 6**

Os filmes de PSL foram preparados com uma solução a 5 % (w/w) em tampão acetado de sódio (pH 6): Adicionou-se glicerol até perfazer 30% em massa de PSL, como plastificante. Depois fez-se a homogeneização da solução na placa de agitação a 50 rpm vortex durante 1 horas. De seguida levou-se esta solução para sonicador e a solução ficou em banho-maria de ultrassons durante 15 minutos. Em seguida espalharam-se 40 g desta solução em placa de petri de POM e deixou-se secar numa camara com ventilação, a 25 °C e humidade relativa de 40 %, durante 48 horas.

### **3.2.5.3 PSL a pH 7**

Prepararam-se soluções de proteínas a 5 % em água ultra deixando-o em agitação durante a noite. No dia seguinte foi feito o ajuste do pH para 7. Depois fez-se a desnaturação da solução proteica a 70 °C durante 20 minutos. De seguida adicionaram-se 30 % de glicerol (calculado com base na massa de proteína) como plastificante. Espalharam-se 30 g desta solução em placa de petri de POM e deixou-se secar numa camara com ventilação, a 25°C e humidade relativa de 40 %, durante 24 horas.

### **3.2.5.4 Q a pH 6**

Os filmes de Q foram preparados à 3 % em tampão acetato de sódio (pH 6). Seguiram-se os mesmos procedimentos experimentais finais designado anteriormente por “LT”.

### **3.2.5.5 PS a pH 7**

Os filmes de proteínas de soja foram preparadas seguindo os mesmos procedimentos descritos na secção 3.2.5.3 relativo a PSL.

### **3.2.5.6 PS + Q a pH 5,5**

A mistura de PS com Q foi feita a partir de uma solução de proteínas de soja a 1 % e pH 5,5 após a centrifugação e determinação da concentração proteica no sobrenadante pelo método Bradford, em que obteve-se uma concentração de PSL no sobrenadante de 0,12

% . Fez-se a mistura desta solução à solução de quitosano à 3 % e pH 6. Neste caso fez-se a remoção total do sobrenadante aquando da formação do coacervato, não tendo sido feito o estudo da influência da quantidade de água na formação de filmes. Após a formação do coacervato, seguiu-se o procedimento anteriormente designado por “LT”.

### 3.2.6 Caracterização dos filmes preparados

#### 3.2.6.1 Barreira ao vapor de água

Para a determinação da permeabilidade ao vapor de água recorreu-se ao método descrito na norma ASTM 96-95. Os filmes, anteriormente preparados, foram deixados a acondicionar no exsiccador durante pelo menos 7 dias, com humidade relativa de 53 %. Depois fez-se a medição da espessura destes filmes no micrómetro digital. Em seguida estes filmes foram fixados e selados na parte superior das células de permeabilidade, tendo sido previamente colocado cloreto de cálcio anidro no interior de forma a tornar a atividade da água praticamente nula. Colocaram-se as células de permeabilidade no interior de um exsiccador com água destilada no fundo e ventoinha de forma a promover a circulação do vapor de água, figura 5. Fez-se a pesagem das células de permeabilidade de hora em hora, durante 7 horas. A determinação da permeabilidade ao vapor de água foi realizada em três filmes diferentes de cada formulação.



**Figura 5:** Montagem experimental do exsiccador

Determinou-se a permeabilidade ao vapor de água através da seguinte equação:

$$WVP = \frac{\Delta m \times x}{\Delta t \times A \times \Delta P} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:  $\Delta m$  é o ganho de massa ao longo do tempo,  $\Delta t$  é o intervalo de tempo das pesagens,  $A$  é a área do filme,  $x$  é a espessura do filme e  $\Delta P$  corresponde à variação da pressão calculada por:

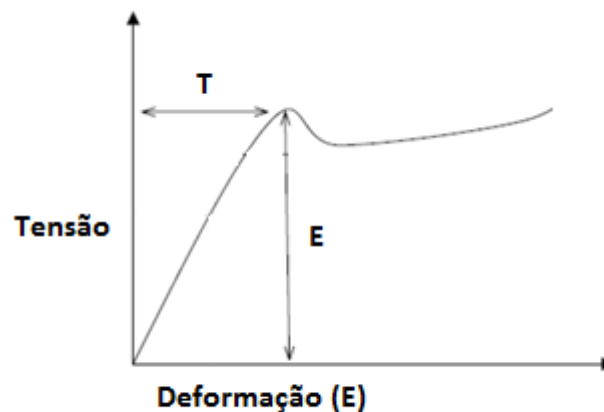
$$\Delta P = P_s \times (W_1 - W_2) \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo  $P_s$  a pressão de saturação de vapor de água,  $W_1$  e  $W_2$  as atividades da água no interior e no exterior da célula de permeabilidade, respetivamente.

### 3.2.6.2 Propriedades mecânicas

Para a determinação das propriedades mecânicas, os filmes foram cortados em forma retangular com dimensões de  $8 \times 1,5$  cm. Procedeu-se à determinação da espessura dos filmes no micrómetro digital, em cinco pontos diferentes de cada filme, num total de 8 réplicas.

De seguida as amostras foram colocadas na vertical entre duas garras revestidas com borracha, deixando 6 cm de filme exposto entre as garras. Os filmes foram submetidos a uma deformação extensional devido à aplicação de uma taxa de deslocamento de 0,2 mm/s até à sua rutura. Estes ensaios de tração basearam-se no método descrito na norma ASTM D 882-83. Foram determinados a tensão de rutura e deformação máxima na tensão de rutura, figura 6.



**Figura 6:** Curva tensão vs. deformação de um filme comestível. Adaptado:(Skurtys et al., 2010b).

A tensão máxima na rutura é indicada pelo ponto máximo de uma curva tensão-deformação (TE). O alongamento na tensão máxima de rutura (E) permite conhecer a capacidade de extensão do filme. É determinado no ponto da rutura do filme e vem expresso em percentagem relativamente a altura inicial da amostra (Cha and Chinnan, 2004).

A tensão na rutura foi determinada pela relação entre força exercida para romper o filme e a área da seção transversal do filme.

$$T = \frac{F}{A} \quad (\text{Equação 3})$$

A deformação máxima na tensão de rutura foi determinada pela razão entre a variação do comprimento do filme durante o ensaio e o comprimento inicial do filme.

$$\Delta L = \frac{L_f - L_i}{L_i} \quad (\text{Equação 4})$$

### 3.2.6.3 Solubilidade em água

Os procedimentos para a determinação da solubilidade realizaram-se em triplicado. Prepararam-se 3 amostras com pedaços de filme (2,5 × 2,5 cm). Em seguida estas amostras foram colocadas em estufa à 105 °C durante 24 horas. Depois pesaram-se as amostras ( $m_i$ ) e inseriram-se num gobelé com 50 ml de água destilada à temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente colocou-se novamente o filme em estufa à 105 °C durante 24 horas para secagem e posterior pesagem do mesmo para obter o peso final ( $m_f$ ).

Determinou-se a perda de massa do filme por solubilização através da seguinte equação:

$$p_m = \frac{m_i - m_f}{m_i} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que:  $p_m$  corresponde à perda de massa,  $m_i$  e  $m_f$ , massa inicial e final, respetivamente.

### 3.2.6.4 Cor

A determinação da cor dos filmes fez-se utilizando um colorímetro e a escala CIELab, tendo sido preparadas 7 amostras. Antes de se efetuarem as determinações, calibrou-se o colorímetro com um padrão branco ( $L_0$ ,  $a_0$ ,  $b_0$ ). Os filmes foram aplicados na superfície de uma placa branca padrão e mediram-se os valores  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .  $L^*$ , varia de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$ , do verde (-) ao vermelho (+); e  $b^*$ , do azul (-) ao amarelo (+) (Gennadios, 2002). Calculou-se a diferença de cor ( $\Delta E$ ) de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)} \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:  $\Delta L = L^* - L_0$ ;  $\Delta a = a^* - a_0$ ;  $\Delta b = b^* - b_0$

### 3.2.6.5 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada utilizando um colorímetro (CR 400; Minolta, Japan). Prepararam-se 7 amostras, as mesmas utilizadas para a determinação da cor, e

fez-se a leitura de cor na escala X,Y,Z colocando o filme numa placa padrão branca. Em seguida fez-se o mesmo procedimento mas utilizando uma placa padrão preta, e determinou-se  $X^*$ ,  $Y^*$  e  $Z^*$ . Calculou-se a opacidade dos filmes, em percentagem, através da seguinte equação:

$$Op = \frac{Y^*}{Y} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

### 3.2.6.6 Isotérmicas de sorção

As isotérmicas de sorção de água foram determinadas pelo método gravimétrico e os resultados dos parâmetros foram ajustados de acordo com o modelo GAB, equação 8, utilizando o software Statistica (Sousa et al., 2010).

$$X = \frac{CkX_0a_w}{[(1-ka_w)(1-ka_w+Cka_w)]} \quad (\text{Equação 8})$$

Em que: X é o conteúdo de humidade de equilíbrio na atividade da água  $a_w$ ,  $X_0$  é o teor de humidade na monocamada, C é a constante de Guggenheim e k é a constante de correção tendo em conta as propriedades das moléculas.

Prepararam-se as amostras de filmes em triplicado com dimensões  $2,5 \times 2,5$  cm. As amostras dos filmes foram pesadas e deixadas, durante 5 dias, em pequenos potes de alumínio no interior de câmaras que continham diferentes soluções de sais saturadas e atividades de água de acordo com a tabela 4. Passados os 5 dias, foram feitas pesagens em cada 24 horas até ter peso constante das amostras dos filmes. Fez-se depois a determinação do peso seco das amostras dos filmes numa câmara de vácuo a  $60^\circ\text{C}$  durante 24h.

**Tabela 4:** soluções saturadas de sais a  $25^\circ\text{C}$  em diferentes atividades de água.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8
Sais	LiCl	MgCl <sub>2</sub>	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	SiCl <sub>2</sub>	NaCl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KCl	BaCl <sub>2</sub>
$a_w$	0,112	0,3273	0,5286	0,577	0,7532	0,803	0,8432	0,9026

### 3.2.6.7 Análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A análise da microestrutura dos filmes de Q + PSL, PSL, Q e PS foi efetuada num microscópio eletrónico de varrimento FEI Quanta 400 FEG localizado no CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto). As amostras foram fixadas em suportes

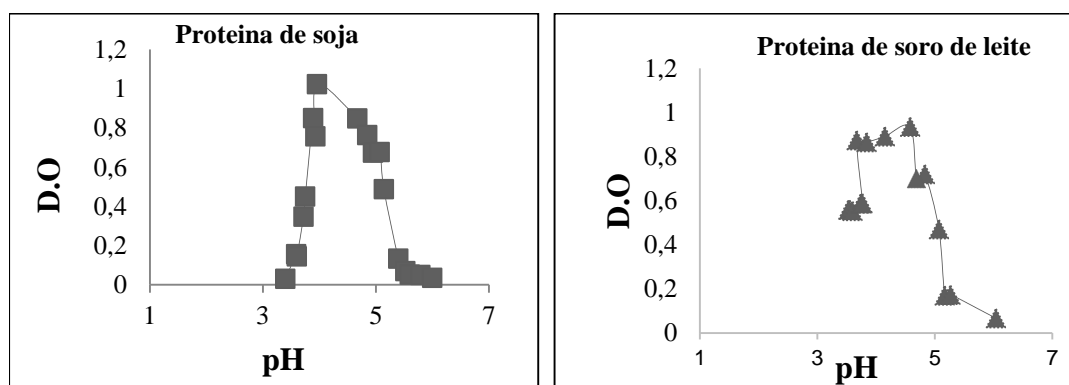
de alumínio com fita-cola de dupla face de carbono. Foram analisadas a superfície superior e a secção transversal dos filmes após fratura com azoto líquido.

### 3.1 Resultados e discussão

#### 3.1.1 Turbidimetria

##### 3.1.1.1 Ponto isoelétrico das proteínas

O conhecimento do ponto isoelétrico da proteína, que corresponde ao intervalo de pH em que a proteína apresenta carga elétrica líquida nula, é um dado muito importante quando de formulações de filmes com base em interações eletrostáticas entre os biopolímeros. Neste sentido, determinou-se o pI das proteínas por meio de adição de pequenas alíquotas de ácido acético às soluções proteicas. Na figura 7 está representada a variação da dispersão ótica das soluções contendo PSL (0,5 %) e PS (0,25%) em função do pH. A dispersão ótica das soluções de PSL e PS claramente mostra como a solubilidade da proteína decresce rapidamente quando o pH da solução aproxima-se do seu ponto isoelétrico (~ 4.9 para PSL e ~4.6 para PS nas condições usadas neste trabalho, tampão acetato 100mM).



**Figura 7:** Ponto isoelétrico das proteínas obtidas pelo método da turbidimetria

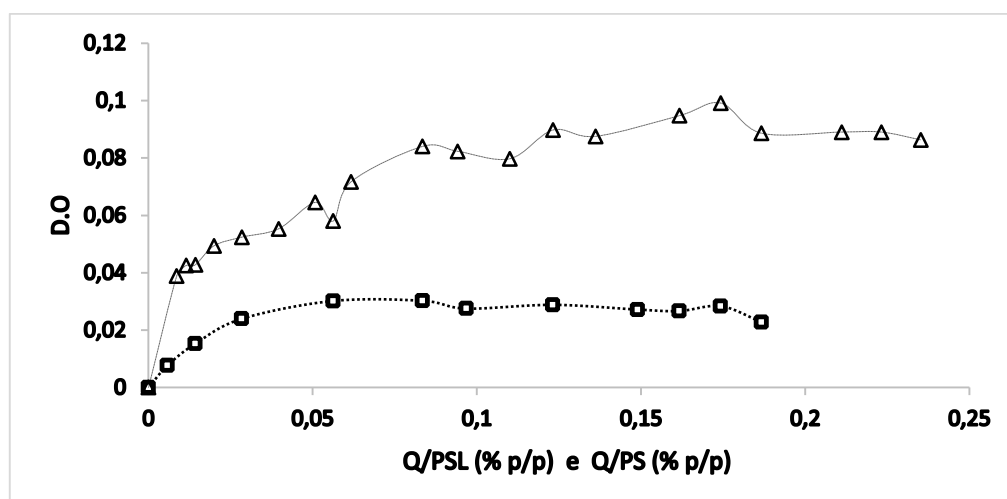
Analisando detalhadamente a Figuras 7, verifica-se que as soluções de PSL e PS se encontravam inicialmente a pH 6 (pH do tampão). Com a acidificação houve um aumento da dispersão ótica (D.O) para o valor máximo de 1 para ambas as soluções, seguida de uma diminuição brusca para valores de D.O semelhante à inicialmente encontrada a pH 6. Este aumento D.O deveu-se à neutralização das cargas por proximidade do ponto isoelétrico, tornando as proteínas insolúveis em água devido a uma maior hidrofobicidade. Nos intervalos  $\text{pH} < 3,5$  e  $\text{pH} > 6$  há repulsões eletrostáticas devidas a cargas iguais, entre as proteínas carregadas positivamente ( $\text{pH} < 3,5$ ) ou negativamente ( $\text{pH} > 6$ ) e as proteínas tendem a ficar em solução (de Souza et al., 2009). Assim sendo, as soluções de PSL e PS são bastantes mais transparentes apresentando por isso valores de dispersão óticas baixas. Verifica-se um pI de proteína a entre pH 4,9 a 5,2 para a PSL

e entre 3,7 e 4,6 para a PS. Estes valores estão de acordo com o publicado pela literatura em que pI de PSL variam entre 4,9-5,6 e PS entre 4-5 (Haraguchi et al., 2006) e (Shahidi et al., 1999), respetivamente.

Este conhecimento, dos pontos isoelétricos das proteínas, tornou-se útil durante a formulação de filmes, onde era requerido uma interação entre a proteína carregada negativamente e o quitosano, um polissacarídeo catiónico. Esta interação permitiu a formação do coacervato, que por evaporação do solvente contido na mistura, leva a formação do filme.

### 3.1.1.2 Razão ótima quitosano/proteínas

A razão ótima da quantidade de solução de quitosano a ser misturado com a solução de proteína de soro de leite e proteína de soja foi determinado tendo em conta os valores da dispersão ótica das amostras preparadas.



**Figura 8:** Turbidez das amostras a pH 6, 25 °C tamponada em tampão de acetato (100 mM): Δ- mistura de quitosano com proteína de soro de leite; □- mistura de quitosano com a proteína de soja.

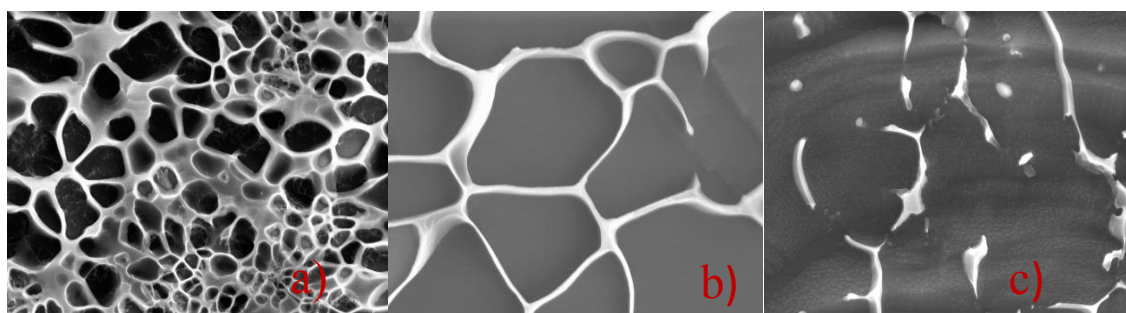
A pH 6, a adição de quitosano à solução tamponada contendo proteína de soro de leite (0,25 % em peso) induz um rápido aumento da turbidez da solução atingindo um máximo quando a proporção de % em peso é de cerca de 0,10, figura 8. O aumento da turbidez da solução pode ser atribuída à formação de coacervatos contendo complexos de proteína-quitosano (Bastos et al., 2010). A partir deste ponto, as cargas positivas do quitosano são estequiometricamente iguais às cargas negativas da proteína e, a adição de quantidades crescente de Q não vai corresponder à formação de mais coacervato por não existirem mais cargas negativas disponíveis na proteína. A razão de máxima interação entre o Q e PS foi de 0,07, sendo a análise dos resultados semelhante ao explicado para a proteína do

soro de leite. O conhecimento destes valores, para ambos os casos, permitiu formular filmes com quantidades de biopolímeros estequiometricamente adequadas, não havendo gastos por adição de quantidades desnecessárias de Q.

### 3.1.2 Cryo SEM

#### 3.1.2.1 Sistema PSL+Q

Cryo-SEM de soluções dos biopolímeros e dos coacervatos formados foi utilizado para caracterizar a microestrutura e intensidade das interações envolvidas. Na figura 9 são mostradas as microestruturas das soluções de coacervato, quitosano e proteínas.

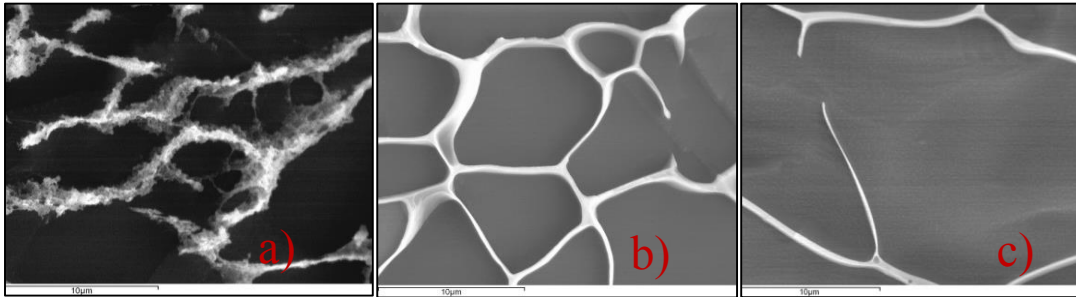


**Figura 9:** Microscopia eletrônica de varrimento a baixa temperatura (Cryo SEM) de soluções: a) Coacervato (3% PSL + 3% Q); b) Quitosano a 3%; c) Proteína a 3 %. Amplificações de x5000, 15kV WD=15mm

A solução de coacervato apresenta uma estrutura aparentemente equilibrada e compacta, sob a forma de uma rede contínua e espessa, fazendo prever uma rede forte, com uma malha de rede apertada. Em relação à solução de Q verifica-se a formação de uma rede contínua e homogênea com estrutura da matriz bem definida mas bem mais larga. Na solução de PSL verifica-se uma distribuição aleatória, descontínua e irregular. Os resultados encontram-se de acordo com os obtidos nas secções posteriores (3.1.4.2 e 3.1.5), em que a permeabilidade e as propriedades mecânicas dos filmes estão de acordo com a organização e composição dos biopolímeros na matriz polimérica.

#### 3.1.2.2 Sistema PS+Q

Na figura 10 encontram-se representadas as imagens obtidos por microscopia eletrônica de varrimento a baixa temperatura das soluções de PS, PS+Q e Q.



**Figura 10:** Microscopia eletrônica de varrimento a baixa temperatura (Cryo SEM) de soluções: a) Coacervato (0,12% PS + 3% Q); b) Quitosano a 3%; c) Proteína a 3 %. Amplificações de x5000, 15kV WD=15mm

Analisando a imagem resultante da solução de PS+Q verifica-se a formação de matriz polímera pouco coesa em relação às imagens obtidas pelo sistema PSL+Q, embora quase contínua, com mais agregados e menos espaçados que no caso da PSL. Em relação a PSL verifica-se a formação de uma rede polimérica muito aberta e bastante dispersa e com estruturas pouco ramificadas e definidas. Durante a formulação dos filmes PS+Q verificaram-se a formação de um coacervato bastante frágil, muito viscoso e com quantidades significativas de água, daí este resultado da matriz polimérica pouco definida. É de referir a imagem de Q é a mesma representada e discutida na secção corresponde anterior (3.1.21).

### 3.1.3 Aparência dos filmes obtidos

A partir dos dados obtidos nas seções anteriores, obteve-se filmes de Q, PSL, PS, PSL+Q e PS+Q pelo método de casting. Todos os filmes de coacervatos de PSL+Q e PS+Q obtidos apresentavam uma aparência relativamente semelhante em termos da transparência, homogeneidade e textura. Os filmes de quitosano também são transparentes e apresentam uma cor pálida amarelada. Já os filmes de PSL e PS apresentam uma cor branca e amarelada, respetivamente. Na Figura 11 são apresentados alguns exemplos dos filmes obtidos.



**Figura 11:** Aparência visuais dos filmes formulados: a) PSL, b) Q, c) PSL + Q, d) PS

### 3.1.4 Filmes obtidos com a PSL

#### 3.1.4.1 Influência de quantidade de sobrenadante

Para os filmes de Q/PSL observou-se que a quantidade de sobrenadante é um parâmetro importante na formulação final do filme. Desta forma, fez-se um estudo sobre a influência deste parâmetro nas propriedades de mecânica e de barreira ao vapor de água nos filmes de coacervatos Q/PSL.

##### 3.1.4.1.1 Propriedades mecânicas e WVP

A partir das curvas de tensão versus deformação obtidas a partir dos filmes de coacervatos preparados com diferentes % de sobrenadante, foi possível determinar dois parâmetros mecânicos: tensão no ponto de ruptura e deformação no ponto da ruptura. Na tabela 5 encontram-se representados os resultados dos parâmetros mecânicos e WVP para os filmes Q + PSL com diferentes quantidades de sobrenadante em ambiente controlado (25 °C, humidade relativa 40% e ventilação a 25 %).

**Tabela 5:** Resultados da influência de quantidade de sobrenadante nas propriedades dos filmes (ambiente controlado): C-Coacervato, S-sobrenadante.

Filmes	WVP ( $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )	Propriedades mecânicas	
		Tensão (T) (MPa)	Deformação (E) (%)
C	$1,02\text{E-}09 \pm 5,72\text{E-}11$	$3,87 \pm 0,46$	$4,60 \pm 0,45$
C + 2 % S adicional	$1,04\text{E-}09 \pm 1,06\text{E-}10$	$2,73 \pm 0,57$	$8,59 \pm 1,61$
C + 5 % S adicional	$1,08\text{E-}09 \pm 1,51\text{E-}10$	$1,45 \pm 0,32$	$12,03 \pm 2,37$
C + 10 % S adicional	$1,12\text{E-}09 \pm 1,05\text{E-}10$	$0,95 \pm 0,13$	$22,13 \pm 1,34$

Analisando os resultados da tabela 5 verifica-se que o aumento da percentagem de sobrenadante leva a uma diminuição na tensão e um aumento da deformação dos filmes até haver a ruptura. Obteve-se uma maior deformação, flexibilidade e maleabilidade nos filmes com maiores quantidades de sobrenadante, devido ao aumento do efeito plastificante exercida pela água em excesso. Nestes casos, a água em excesso, aumenta o volume dos filmes, diminuindo as atrações intermoleculares entre cadeias poliméricas adjacentes, por redução de ligações entre cadeias de polímeros constituintes do filme (Skurtys et al., 2010b). Esta redução de ligações resultou em filmes com resistência à

tração menor, sendo a sua aplicação em alimentos sujeitos a choques ou transporte não indicada.

Em relação a WVP verificou-se que o aumento da quantidade de sobrenadante, no coacervato, permitiu uma maior difusão de vapor de água para o interior das células de permeabilidade, resultando em filmes mais permeáveis e com maiores afinidades para o vapor de água devido à formação de pontes de hidrogénio resultante da ligação dos grupos OH da água. Esta característica poderia ser melhorada através da incorporação de agentes hidrofóbicos, por exemplo, lípidos.

Na tabela 6 encontra-se os resultados da propriedade mecânica dos filmes secos ao ar livre.

**Tabela 6:** Resultados da influência de quantidade de sobrenadante nas propriedades dos filmes (secos ao ar livre). C-Coacervato, S-sobrenadante.

Filmes	Tensão (T) (MPa)	Deformação E (%)
C	4,07 ± 0,52	4,65 ± 0,42
C + 5 % S adicional	2,14 ± 0,57	35,58 ± 4,42
C + 8 % S adicional	0,69 ± 0,15	42,48 ± 3,98

Comparando os resultados da tabela 5 e 6, verifica-se que o ambiente de secagem dos filmes tem uma grande influência nas propriedades dos filmes. Comparando os filmes com 5 % de sobrenadante nas duas tabelas, verifica-se que os filmes secos em ambiente controlado tiveram melhores resultados de tensão de corte e verifica-se uma redução de 65 % na deformação no ponto de rutura. Esta redução poderá dever-se a uma maior organização e interações entre os biopolímeros uma vez que a temperatura manteve-se constante ao longo da secagem, e haverá por isso uma maior vaporização da água (atua como plastificante), resultando em filmes menos flexíveis. Segundo (Ferreira et al., 2009) os parâmetros mecânicos de filmes compósitos são influenciados pelo arranjo dos biopolímeros durante o processo da secagem, em que se formam estruturas heterogêneas com matrizes dos dois biopolímeros separados, o que se verifica nestes casos.

### 3.1.4.2 Análise de efeito sinérgico

#### 3.1.4.2.1 Propriedades mecânicas e WVP

Tendo em conta o objetivo deste trabalho, estudar possíveis efeitos sinérgicos entre os biopolímeros, na tabela 7 são apresentados os valores de WVP e propriedades mecânicas para os filmes constituídos por dois componentes (PSL+Q) e por um só componente (Q e PSL). É de salientar que os filmes PSL+Q, nesta secção, corresponde ao filme em que removeu-se a totalidade do sobrenadante, citado anteriormente, para uma melhor comparação entre si e com valores da literatura.

**Tabela 7:** Propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água dos filmes Q, PSL+Q e PSL (ambiente controlado)

Filmes	WVP ( $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )	Propriedades mecânicas		Espessura (mm)
		Tensão (T) (MPa)	Deformação (E)(%)	
<b>Q</b>	$8,76\text{E}-10 \pm 6,73\text{E}-10$	$1,24 \pm 0,27$	$25,42 \pm 4,74$	$0,27 \pm 0,02$
<b>PSL + Q</b>	$1,02\text{E}-09 \pm 5,72\text{E}-11$	$3,87 \pm 0,46$	$4,60 \pm 0,45$	$0,35 \pm 0,03$
<b>PSL a pH 6</b>	$1,05\text{E}-09 \pm 4,21\text{E}-11$	$0,19 \pm 0,045$	$42,36 \pm 7,89$	$0,20 \pm 0,01$
<b>PSL a pH 7</b>	$1,78\text{E}-09 \pm 3,27\text{E}-10$	$2,04 \pm 0,31$	$9,34 \pm 1,71$	$0,25 \pm 0,04$

Analisando os resultados da WVP, verifica-se que o filme PSL+Q, apresentou um valor intermédio entre os outros dois filmes constituídos por um só componente. Verifica-se também que este valor assemelha-se com o encontrado para o filme só com PSL. Este resultado vai de encontro ao esperado, uma vez que durante as etapas de formulação dos filmes, se adicionaram maiores quantidades de soluções de proteína de soro de leite, na razão Q/PSL de 0,1. Os filmes formulados só com proteínas de soro de leite (PSL) a pH 6 apresentaram um valor de WVP ligeiramente superior aos restantes, sendo por isso menos eficaz na barreira ao vapor de água. Este resultado deve-se sobretudo a natureza hidrofílica destes filmes, favorecendo a interação com a água (Anker et al., 2001). Em relação aos filmes de PSL formuladas a pH 7 e por desnaturação, condições recomendadas pela literatura, verifica-se mesmo assim que a mistura dos dois biopolímeros favorecem as propriedades mecânicas e WVP dos filmes (Skurtys et al., 2010a). Verifica-se que a adição de uma pequena quantidade de quitosano permitiu uma diminuição de cerca de 4 % no valor da WVP. Isto pode ser explicado pelo facto de as condições usadas corresponderem às condições em que a carga do quitosano e a carga da

proteína se anulam. Assim sendo, é de prever que os filmes resultantes tenham menor carga e, por consequência, um caráter mais hidrofóbico.

Em relação às propriedades mecânicas verifica-se uma maior resistência a força de tração para o filme com dois componentes. Este aumento deve-se sobretudo ao reforço da matriz polimérica com pequenas quantidades de quitosano incorporado. Uma diminuição na deformação também foi conseguida, devido a menor maleabilidade e flexibilidade destes filmes, promovida pela melhor homogeneização e formação de camadas mais espesas devido à interação eletrostática entre os biopolímeros (Sapru and Labuza, 1994a). Valores de tensão e alongamento no ponto de rutura de  $0,60 \text{ MPa} \pm 1,67$  e  $33,90 \pm 6,37 \%$ , respetivamente, com filmes de quitosano e PSL foram recentemente publicados (Kurek et al., 2014). Os filmes PSL + Q preparados apresentaram melhor resultado de tensão no ponto de rutura do que os filmes reportados, sendo o comportamento mais próximo o do filme com 10 % de sobrenadante adicional apresentado na secção anterior. O mecanismo da coacervação utilizado neste trabalho também contribui para estes melhores resultados, já que na literatura, fez-se a mistura das soluções de PSL + Q, ambas carregadas positivamente. No entanto a comparação dos valores das propriedades dos filmes com outros trabalhos publicados não se pode considerar conclusiva, na medida em que os procedimentos adotadas são diferentes, e, por exemplo, como foi demonstrado em cima, uma variação de apenas 2% da quantidade de água resultou em filmes com propriedades completamente diferentes.

Em relação aos filmes PSL, o baixo valor da tensão de corte, deve-se sobretudo às condições de preparação, em que preparou-se a solução a pH 6, perto do ponto isoelétrico, região pela qual não ocorre estabelecimento de pontes dissulfureto entre as PSL em número suficientes (Cagri et al., 2001).

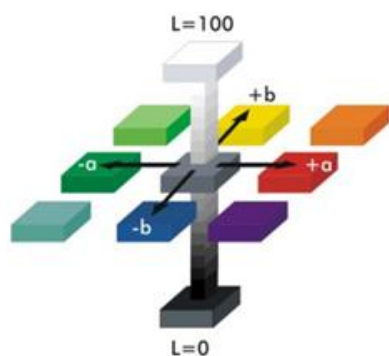
Verifica-se que uma maior espessura dos filmes PSL+Q favoreceram as propriedades mecânicas e WVP em relação aos demais filmes.

De referir também que na maioria dos estudos efetuados com PSL, os filmes são formados após desnaturação térmica da proteína, a pH próximo da neutralidade, aproveitando as interações hidrofóbicas e pontes dissulfureto que se tornam possíveis com essa desnaturação. A adição de uma pequena quantidade de quitosano à PSL, a pH 6, permitiu obter filmes com propriedades mecânicas da mesma ordem de grandeza sem a

necessidade de aplicação de calor (e, conseqüentemente, gastos energéticos acrescidos), com vantagens importantes a nível de tensão na rutura e permeabilidade ao vapor de água.

### 3.1.4.2.2 Cor

A determinação da cor dos filmes é importante na medida em que não se quer que os filmes interfiram, quando aplicados, nas propriedades dos alimentos. Na maioria dos



**Figura 12:** Representação tridimensional do sistema CIElab

casos são desejáveis filmes transparentes, com um certo brilho, mas a não satisfação destas características sensoriais não limita o seu uso. A cor dos filmes está diretamente ligada com o tipo e concentração de matéria-prima utilizada para a sua elaboração (Nielsen, 2010). A escala usada na determinação da cor dos filmes foi a do sistema CIElab, e encontra-se representada na figura 12, adaptado (Barnett, 2014).

Na tabela 8 encontram-se os dados médios dos parâmetros que permitiram comparar a cor dos filmes Q, PSL + Q e PSL.

**Tabela 8:** Parâmetros para a caracterização da cor dos filmes

Filmes	a*	b*	L*	$\Delta E$
Q	$-1,32 \pm 0,25$	$9,46 \pm 2,02$	$96,91 \pm 1,29$	$7,89 \pm 2,07$
PSL + Q	$-0,85 \pm 0,13$	$9,34 \pm 0,65$	$92,94 \pm 0,77$	$8,89 \pm 0,76$
PSL	$1,33 \pm 0,02$	$-4,78 \pm 0,29$	$99,8 \pm 0,15$	$7,19 \pm 0,31$

Tendo em conta os dados da tabela 8 e a representação na figura 9 pode concluir que ambos os filmes são claros (brancos), uma vez que o eixo L\* apresentou um valor mais próximo 100, valor referência para filmes claros. Em relação aos filmes PSL, devido a coloração branca da proteína do soro de leite, apresentaram valores de luminosidade (L\*) e transparência superior. A alta transparência verificada permite aumentar a sua gama de aplicações, uma vez que haverá pouca interferência nas características óticas dos produtos aplicados. Obtiveram-se valores positivos e negativos dos eixos a\* e b\*, respetivamente. Ou seja, os filmes apresentaram aspetos e tonalidades mais avermelhada e azuladas. No entanto, os valores para os eixos L\* e a\* são superiores, e menores para o eixo b\*, resultando em valores de diferença de cor ( $\Delta E$ ) um pouco inferior em relação aos restantes filmes. Em relação aos filmes Q e PSL+Q obtiveram-se valores do eixo a\* negativos e

valores do eixo  $b^*$  positivos. Isto quer dizer que os filmes apresentam tonalidade mais esverdeada, no caso de valores de  $a^*$  e, um aspeto mais amarelado de acordo com os resultados do eixo  $b^*$ .

Verifica-se que a adição de uma pequena quantidade de quitosano resultou em filmes com aspetos de coloração mais próximos aos filmes de quitosano sozinhos. O quitosano (acastanhado) incorpora na matriz proteica de PSL, resultando em filmes com aspetos mais amarelada/acastanhada/esverdeada. Estes resultados estão de acordo com pressuposto para a cor dos filmes, em que esta varia consoante o tipo e a concentração do material (Nielsen, 2010).

### 3.1.4.2.3 Opacidade

A opacidade dos filmes edíveis é um elemento importante que permite controlar a incidência da luz sobre o produto revestido e tem impacto direto sobre sua aparência (Carneiro-da-Cunha et al., 2009). Os resultados da opacidade dos filmes Q, PSL+Q e PSL encontram-se representados na tabela 9.

**Tabela 9:** Opacidade dos filmes preparados (Q, PSL+Q e PSL)

Filmes	Opacidade (Op) (%)
Q	14,66 ± 1,14
PSL + Q	14,58 ± 0,94
PSL	12,85 ± 0,65

Analisando os dados da tabela 9 verifica-se que a opacidade dos filmes Q é superior aos dos filmes PSL + Q e PSL. Isto quer dizer que os filmes Q permitiram a passagem da luz em menores proporções devido sobretudo às suas colorações menos transparente. Em relação aos filmes PSL+Q, a sua opacidade é parecida com as dos filmes Q sozinhos. Este resultado deveu-se sobretudo aos pequenos grânulos de proteínas, que não solubilizaram, à superfície dos filmes formados, o que contribuiu para a redução da passagem da luz. Valores inferiores da opacidade dos filmes PSL devem-se ao tipo do material utilizado, sendo a sua coloração branca e aspeto transparente dos filmes resultantes, não interferiram muito na incidência da luz.

### 3.1.4.2.4 Solubilidade

O estudo da solubilidade dos filmes em água revelou-se ser indispensável pois a sua aplicação depende em alguns casos desta propriedade. Na tabela 10 encontram-se os resultados da solubilidade dos filmes PSL + Q, PSL e Q em água.

**Tabela 10:** Solubilidade dos filmes preparados (Q, PSL + Q e PSL)

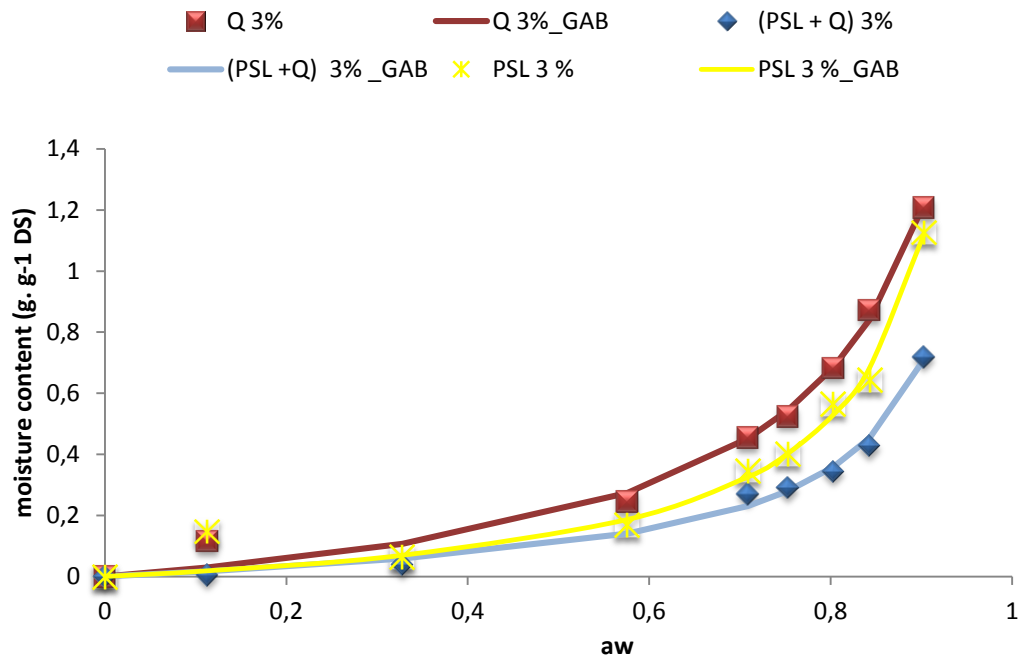
Filmes	Solubilidade (%)
Q	41,82 ± 1,20
PSL + Q	14,58 ± 0,94
PSL	100 %

A solubilidade dos filmes PSL + Q é bastante inferior aos obtidos pelos filmes Q e PSL. Esta baixa solubilidade, em comparação com os restantes, deve-se sobretudo a anulação de cargas à superfície dos filmes, passando estes a ser mais hidrofóbico, havendo por isso poucas atrações entre os grupos OH da água e possíveis cargas à superfície. Esta redução poderá dever-se também a uma maior consistência e rigidez destes filmes, não havendo espaços suficientes na matriz polimérica que pudessem ser ocupados pela água. Em relação aos filmes Q, a sua alta solubilidade deve-se aos grupos amina que se encontram protonados (pH 6). Daí, as repulsões entre as cadeias são maiores, permitindo uma maior solvatação em água (dos Santos et al., 2003).

O filme de PSL é totalmente solúvel em água. Isto deve-se a sua alta hidrofilicidade, havendo grande afinidade com a água, e também à sua pouca consistência, o que provoca a sua rutura e desintegração com alguma facilidade. A sua aplicação em alimentos desidratados sujeitos a hidratação antes do consumo e alimentos que são cozidos na presença de água poderá ser interessantes.

#### 3.1.4.2.5 Isotérmicas de sorção

As isotérmicas de sorção de água dos filmes é um dos parâmetros importantes a serem conhecidos, pois poderá fornecer informações importantes acerca da estabilidade e as condições ótimas de armazenamento dos produtos. Os resultados da isotérmica de sorção dos diferentes filmes (Q, PSL + Q e PSL) foram ajustados de acordo com modelo de GAB por regressão não linear utilizando o software Statistica (figura 11). É de referir que o equilíbrio de peso para os diferentes filmes foram conseguidos passados 7 dias.



**Figura 13:** Isotérmica de sorção a 25 °C dos filmes de Q, PSL + Q e PSL, e os respectivos ajustes ao modelo de GAB para diferentes atividades de água.

Analisando o resultado da figura 13, verifica-se que em ambos os filmes as variações do teor da humidade para diferentes atividades de água tem um aspeto Sigmoide (isoterma do tipo II) e verifica-se um bom ajuste pelo modelo GAB (Brunauer et al., 1938). Em ambos os casos a humidade de equilíbrio aumenta lentamente com o aumento da  $a_w$  e para 0,7, acontece uma subida íngreme em teores de humidades. Os filmes Q e PSL atingem o equilíbrio com teores de humidade relativamente iguais, embora os ajustes ao modelo GAB são diferentes. Uma maior solubilidade em água dos filmes Q e PSL explicam estes resultados que estão de acordo com o obtido na secção anterior. Nestes filmes verificaram-se uma maior teor de humidade, e conseqüentemente uma maior retenção de água para as  $a_w$  maiores, devido a uma maior afinidade para com a água.

Na tabela 11 encontra-se descritos os valores dos parâmetros do modelo GAB e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) dos filmes Q, PSL + Q e PSL determinados pelo modelo não linear.

**Tabela 11:** Valores das constantes da equação de GAB a 25°C e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) calculados por regressão não linear para os filmes Q, PSL+Q e PSL.

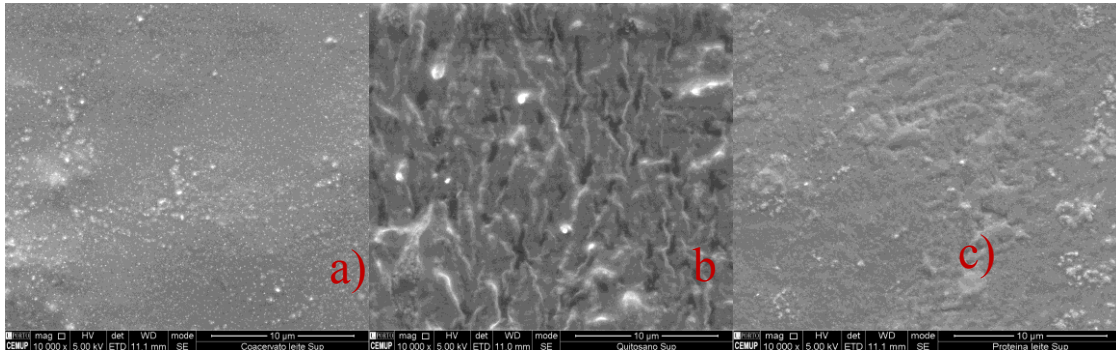
Filmes	C	k	X <sub>0</sub>	r <sup>2</sup>
Q	1,183	0,937	0,217	0,996
PSL + Q	1,697	0,978	0,089	0,996
PSL	1,095	0,986	0,137	0,998

Verifica-se, em ambos os casos, um bom ajuste dos dados experimentais pelo modelo de GAB, obtendo-se para todos os filmes um coeficiente de correlação superior a 0,99 e coeficiente k (relacionada com a energia que é essencial para o transporte de uma mole de um líquido na camada de adsorbato que já existiu)  $<1$  (Berg, 1981). Em relação aos filmes PSL + Q, obteve-se um valor de humidade na monocamada ( $X_0$ ) inferior aos restantes filmes. Este resultado deve-se essencialmente à menor hidrofílicidade destes filmes, conseguida pela anulação de cargas à superfície devido às interações eletrostática entre os dois biopolímeros. Apesar dos filmes PSL serem mais hidrofílicos, e com valores de solubilidade e WVP superiores aos dos filmes de Q, obteve-se valor superior de  $X_0$  para os filmes Q. Isto poderá dever-se a uma maior espessura destes filmes, retendo por isso maiores quantidades de água na monocamada. Valores de  $X_0$  para os filmes Q estão de acordo com o publicado por (Souza et al., 2013), em que segundo estes autores, os valores de  $X_0$  são influenciados pelo espaço intersticial existente nas matrizes dos filmes, que aumenta a taxa de difusão da água para o interior da monocamada. O parâmetro C, que está relacionado com a diferença de energia entre a adsorção sob a forma de uma monocamada e / ou em diversos multicamadas (Souza et al., 2013), é superior para os filmes PSL + Q. O que indica que a adsorção de uma monocamada é favorecida no que diz respeito a uma maior formação de multicamadas resultante da mistura dos dois biopolímeros. Menores valores de C para PSL e k está relacionada com menores valores de  $X_0$  também obtidos, sendo os filmes hidrofílicos, em que a formação de multicamadas não favorece a adsorção na monocamada.

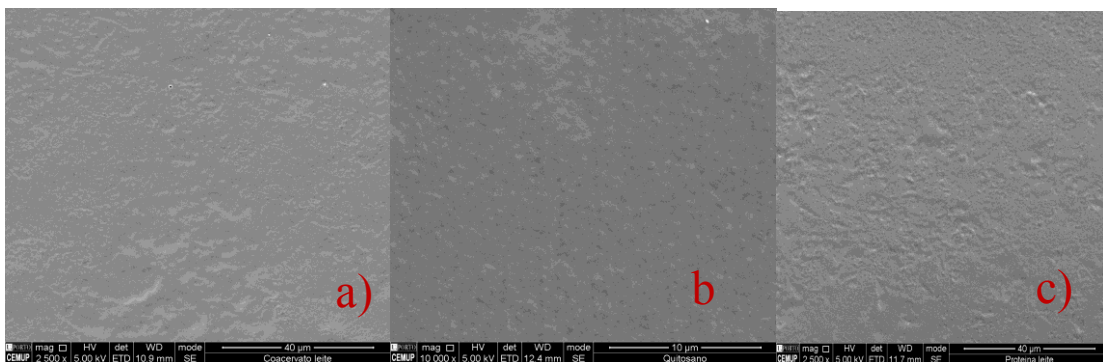
### 3.1.4.2.6 SEM

A microscopia eletrónica de varrimento é um poderoso instrumento utilizado no apoio a investigação científica, que permite determinar a espessura, analisar a microestrutura, identificar defeitos e impurezas, realizar estudos de adesão, corrosão e fratura (Sá, 2006). O princípio de funcionamento baseia-se na incidência de um feixe de elétrons num ponto

da superfície da amostra-alvo, e a subsequente recolha dos sinais eletrónicos emitidos pelo material-alvo (Kuo, 2007). Na figura 14 e 15 encontram-se representadas imagens da superfície superior e transversal dos filmes de PSL, PSL+Q e Q, respetivamente



**Figura 14:** Microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos filmes: a) Coacervato (3% PSL + 3% Q); b) Q a 3%; c) PSL a 3 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm



**Figura 15:** Microscopia eletrônica de varrimento da secção transversal dos filmes: a) Coacervato (3% PSL + 3% Q); b) Q a 3%; c) PSL a 3 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm.

De um modo geral, verifica-se a formação de uma textura rugosa e pequenos cristais de sais (do tampão) em todas as superfícies dos filmes. Em relação aos filmes PSL+Q a sua estrutura superficial é mais densa, coesa e homogénea, resultado de uma maior acomodação dos biopolímeros na matriz polimérica. Em relação à sua secção transversal, verificam-se ausências de locais de fissuras e ranhuras que pudessem torna-los quebradiços. A estrutura superficial de quitosano apresentou zonas opacas na sua estrutura devido a formação de pequenas bolhas de ar à sua superfície que eventualmente diminuiriam as suas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água. Na sua secção transversal é possível verificar pequenos locais vazios de bolhas de ar. Em relação à superfície de PSL verifica-se, em alguns sítios, locais de maior concentração de rugosidade que dever-se-á essencialmente a não solubilidade de algumas proteínas na

solução tampão ou eventualmente a não dissolução de alguns materiais presentes no isolado da proteína. Na sua seção transversal, embora menos definida, em relação às outras duas, verifica-se também ausência de zonas de fissuras ou ranhuras.

Embora tenha sido feita a análise da superfície superior dos filmes (que não estavam em contato com a placa) diferenças são comumente observado, em que a superfície em contato com a placa tem estrutura essencialmente suave, enquanto a superfície de topo é geralmente mais áspero devido ao processo de secagem ocorrer em contacto com o ar (Ferreira et al., 2009).

### 3.1.5 Filmes obtidos com PS

#### 3.1.5.1 Propriedades mecânicas e WVP

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para a formulação de filmes PS + Q, PS e Q. É de referir que antes de definir a formulação de filmes PS + Q, se fez um estudo prévio variando o pH das soluções de PS (5,5, 6, 6,5 e 7). Escolheu-se, para a análise das propriedades e caracterização, os filmes formulados a pH 5,5 visto apresentarem melhores propriedades físicas (mais resistente e maleável) e uma estrutura homogênea e consistente. A pH 7 os filmes obtidos apresentaram um aspeto menos consistente e muito frágil, partindo com muita facilidade e a pH 6 e 6,5 não foram possíveis remover os filmes da placa de petri.

Na tabela 12 encontram-se representados os valores dos parâmetros mecânicos e WVP dos filmes Q, PS + Q e PS.

**Tabela 12:** propriedades mecânicas e de vapor ao vapor de água dos filmes Q, PS + Q e PS.

Filmes	WVP (g m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> )	Propriedades mecânicas		Espessura (mm)
		Tensão (T) (MPa)	Deformação (E)(%)	
Q	8,76E-10 ± 6,73E-10	1,24 ± 0,27	25,42 ± 4,74	0,27 ± 0,02
PS+ Q	7,32E-10 ± 1,81E-10	1,79 ± 0,31	54,60 ± 4,40	0,29 ± 0,02
PS	1,74E-09 ± 4,43E-11	0,65 ± 0,19	34,61 ± 5,76	0,26 ± 0,01

Analisando as propriedades mecânicas, os filmes de PS + Q apresentaram resistência à tração superior à dos filmes de quitosano, mas deformaram muito antes da rutura. Uma maior deformação destes filmes podem dever-se a uma baixa quantidade de coacervato

formado, aquando da mistura de biopolímeros (PS e Q), não sendo possível separar todo o sobrenadante do coacervato que apresentavam pouca consistência e viscosidade. Por conseguinte, os filmes continham bastante água, que atua como plastificante e interfere nas interações nas matrizes poliméricas, apresentando por isso valores elevados de alongamentos e baixa resistência à tração. Em relação aos filmes PS, a tensão de rutura é bastante inferior aos restantes filmes, no entanto a deformação é superior à dos filmes de quitosano. Valores de T e E para os filmes PS são bastantes inferiores aos encontrados por (Kim et al., 2002),  $7,56 \pm 0,13$  e  $134,6 \pm 28,5$ , respetivamente.

Em relação a WVP, verifica-se uma menor permeabilidade ao vapor de água para os filmes com mistura por interação eletrostática entre os biopolímeros (PS + Q). Os filmes PS apresentaram valores de WVP bastante superior aos restantes filmes. Nestes filmes, as proteínas foram desnaturadas a pH 7, havendo modificação na estrutura tridimensional das proteínas por exposição de grupos funcionais, ocorrendo interações hidrofóbicas durante a secagem. Segundo (Perez-gago and Krochta, 2001), a desnaturação proteica promove a formação de filmes mais coesos e com volumes e espaços intermoleculares moleculares menores, resultando em filmes menos permeáveis ao vapor de água.

### 3.1.5.2 Propriedades óticas

#### 3.1.5.2.1 Cor e opacidade

Os parâmetros da cor e a opacidade dos filmes Q, PS + Q e PS encontram-se representados na tabela 13 e 14, respetivamente.

**Tabela 13:** parâmetros da cor dos filmes Q, PS + Q e PS

Filmes	a*	b*	L*	$\Delta E$
Q	$-1,32 \pm 0,25$	$9,46 \pm 2,02$	$96,91 \pm 1,29$	$7,89 \pm 2,07$
PS + Q	$-0,91 \pm 0,12$	$10,39 \pm 0,42$	$92,75 \pm 0,51$	$9,72 \pm 0,52$
PS	$-0,49 \pm 0,13$	$16,84 \pm 0,39$	$91,03 \pm 1,37$	$15,92 \pm 0,16$

Tendo em conta os dados da tabela 13 conclui-se que todos os filmes são transparentes apresentando valores de eixo L\* próximo 100. Em relação aos valores do eixo a\*, verifica-se que ambos os filmes apresentaram tonalidades esverdeada. Em relação ao eixo b\*, os valores também em ambos os casos, o que se conclui que os filmes têm um aspeto mais amarelado sendo este valor mais acentuado para os filmes PS devido a sua coloração nativa mais forte e acastanhada/amarelado. Também verifica-se uma maior diferença de

cor ( $\Delta E$ ) nestes filmes, devido essencialmente a sua colorações muito mais amarelada ( $b^*$  bastante superior).

Tabela 14: Opacidade dos filmes Q, PS + Q e PS

Filmes	Opacidade (%)
Q	14,66 $\pm$ 1,14
PS + Q	21,17 $\pm$ 2,22
PS	17,46 $\pm$ 0,62

Verifica-se uma maior opacidade dos filmes PS + Q em comparação com os filmes Q e PS formulados separadamente. Os filmes PS +Q apresentaram pequenos grânulos de proteínas, que não solubilizaram, à superfície dos filmes formados, o que contribuiu para a redução da passagem da luz e opacidade aumentada. Valores superiores da opacidade dos filmes PS + Q devem-se também ao tipo do material utilizado, já que se misturaram dois biopolímeros com colorações acastanhadas.

### 3.1.5.3 Solubilidade

Os resultados da solubilidade dos filmes Q, PS + Q e PS encontram-se representados na tabela 15.

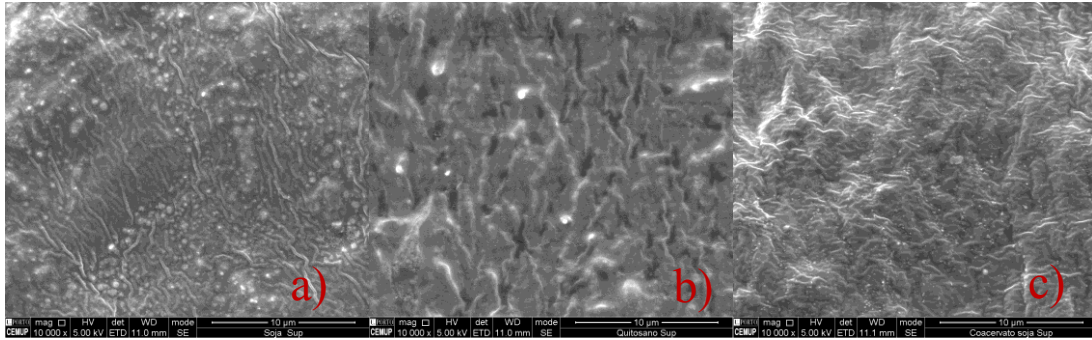
Tabela 15: Solubilidade dos filmes Q, PS + Q e PS

Filmes	Solubilidade (%)
Q	41,82 $\pm$ 1,20
PS + Q	65,4 $\pm$ 4,2
PS	35,34 $\pm$ 2,47

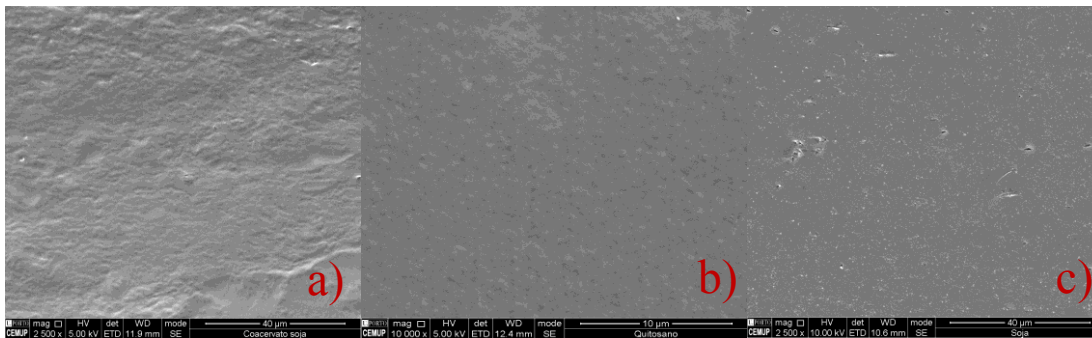
Analisando a tabela 15 verifica-se que os filmes PS + Q apresentaram um valor de solubilidade bastante superior aos dos filmes PS e Q. Isto deve-se sobretudo à composição do filme e a maiores quantidades de água presente no coacervato resultando em filmes com maior tendência para interagir com as moléculas de água. O resultado obtido para PS é ~ 46 % inferior ao obtido por (González et al., 2011), mas neste caso a concentração de glicerol adicionada foi de 50 %. Em relação ao filme Q o resultado encontra-se de acordo com (Bourbon et al., 2011).

### 3.1.5.4 SEM

Nas figuras 16 e 17 encontram-se representadas imagens da superfície superior e transversal dos filmes de PS+Q, Q e PS, respetivamente.



**Figura 16:** Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes: a) Coacervato (0,12% PS + 3% Q); b) Q a 3%; c) PS a 5 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm.



**Figura 17:** Microscopia eletrônica de varredura da secção transversal dos filmes: a) Coacervato (0,12% PS + 3% Q); b) Q a 3%; c) PS a 5 %. Amplificações de x10000, 5kV WD=15mm.

Analisando a figura 16 verifica-se a formação de uma estrutura granulosa e rugosa em todas as superfícies dos filmes. No caso da superfície PS+Q verifica-se uma com ranhuras e alguns espaços vazios na matriz polimérica. Isto dever-se-á essencialmente a formação de um coacervato pouco consistente, com muitos espaços preenchidos por água, resultando em filmes com estruturas pouca homogénea e com pequenos grânulos de proteínas de soja que não solubilizaram bem no tampão. Em relação à sua secção transversal, verifica-se a formação de uma estrutura com algumas irregularidades mas não foram detetadas regiões propícias de ocorrer rompimento ou fissuras. No caso de proteína de soja, verifica-se que a sua estrutura é pouca homogénea, irregular e pouco coesa. Obteve-se a formação, embora irregular, de redes semelhantes em todas as regiões da superfície do filme analisada. Em relação à sua secção transversal, verifica-se a formação de fissuras e espaços vazios, que devido a concentração de tensão nestes pontos quando são-lhes aplicadas forças de tração, levam ao rompimento do filme.

## **Capítulo 4** Aplicação de revestimentos em cerejas

## 4.1 Introdução

A aplicação de revestimentos em alimentos permitem aumentar os seus tempos de prateleira (Tharanathan, 2003). O objetivo deste capítulo foi testar a aplicação de quitosano, proteína de soro de leite e de uma mistura destes dois biopolímeros como revestimento de frutas inteiras. Para isso foi escolhida a cereja, por ter um tempo de vida relativamente curto e foram avaliados ao longo do tempo parâmetros físico-químicos (cor, textura, firmeza e PH) e microbiológicos (microrganismos mesófilos totais e leveduras e bolores), indicadores da evolução da qualidade do fruto.

### 4.1.1 Cerejas

Cerejas, de científico *Prunus avium*, é um fruto proveniente de diferentes espécies da planta cerejeira de origem Asiática (Iezzoni, 2008). A planta cerejeira é cultivada essencialmente em regiões de clima fria, e pertence à família Rosaceae e género *Prunus* (Faust and Surányi, 1997). Em Portugal existem diferentes variedades de cerejeiras, destacando as seguintes: Saco da Cova da Beira, Saco do Douro, Lisboaeta, São Julião, Big Burlat, Maring, Napoleão Pé Comprido, e Big Windsor (Roxa), sendo as primeiras quatro de origem nacional. A distribuição da sua cultura está dividida em três grandes regiões: Trás-os-Montes (Alfândega da Fé, Macedo de Cavaleiros e Mirandela, Valpaços, Vinhais e Lamego); Beira Interior (concelhos do Fundão e da Covilhã); Douro e Minho (quase exclusivamente no concelho de Resende). Nestas regiões são produzidas mais de 15 mil toneladas de bagas por ano e é no nordeste do país, nomeadamente na região de "Beira Interior", que esta fruta é mais cultivada (Serra et al., 2011).

A cereja é um fruto bastante apreciado pelos consumidores pelo seu sabor, aparência e a sua riqueza de nutrientes, nomeadamente vitamina A, ferro, cálcio, fósforos e compostos fenólicos. A cereja é um produto rico em antioxidantes naturais, que incluem carotenóides e os flavonóides (antocianinas) que reparam os danos causados pelos radicais livres que estão ligados a processos degenerativos como o cancro e o envelhecimento (Kerch et al., 2011). A conservação e o armazenamento da cereja é feita sobretudo em camaras de frio, em que a temperatura (T) é mantida entre -1°C e 1°C e humidade relativa de 95 %, prolongando o seu tempo de vida pós-colheita em 2 a 3 semanas (Serra et al., 2011). Atendendo a que apenas cerca de 70 % do total de cerejas produzidas a nível mundial chega aos consumidores em condições ideais para o consumo, a aplicação de

revestimentos de forma a prolongar o seu período de vida útil pode ser um meio eficaz para reduzir esta perda.

#### 4.1.2 Análise microbiológica

A contaminação e consequente deterioração dos produtos durante o armazenamento por parte dos microrganismos tem revelado sérios problemas devido às intoxicações, infeções e perdas de colheitas por parte dos produtores. Neste sentido, têm vindo a ser desenvolvidos métodos de análise microbiológicas que permitem reduzir o tempo de análise, custo e simplificação das tarefas de quantificação e deteção de microrganismos. Um desses métodos é o sistema SimPlate TPC-CI (Total - Indicador de Color) foi desenvolvido pela IDEXX Laboratories Inc, e que permite a deteção e quantificação da concentração de microrganismos em alimentos pela metodologia do número mais provável (NMP), cavidades positivas, em vez da contagem convencional em placas de Petri de agar. Este método fundamenta-se na redução bioquímica do corante resazurina (azul) para resorufina (rosa) ou dehidro-resorufina (claras) (de Souza Sant'ana et al., 2002). Estudos de comprovação deste método foram realizados em 5 laboratórios diferentes e os coeficientes de correlação obtidos variaram entre 0,94-0,98 em comparação com a contagem em placas padrão. Estes resultados sugerem que TPC-CI é uma alternativa adequada para métodos de contagem de placa existentes devido aos seus requisitos de facilidade de leitura, quantificação e baixo custo (Smith and Townsend, 1999).

#### 4.1.3 Preparação de revestimentos edíveis

No caso dos revestimentos edíveis são utilizadas as técnicas de **imersão** e **pulverização** (Skurtys et al., 2010b).

A **imersão** é uma técnica muito utilizada para aplicações de revestimentos de frutos e vegetais (Vargas et al., 2008). Nesta técnica os alimentos são imersos nas soluções de biopolímeros, formando-se um filme sobre a superfície do produto após a remoção do excesso e secagem do revestimento.

A técnica de “**pulverização**” é mais utilizada quando as soluções de biopolímeros não são muitas viscosas. Esta técnica permite a formação de espessuras finas e uniformes a volta do alimento. Pulverização, ao contrário da imersão, é apropriada quando é requerida

a cobertura de um dos lados do alimento. Isto é desejável, por exemplo, nas pizzas, onde pretende-se separar o molho da crosta da pizza (Skurtys et al., 2010b).

Na literatura são encontrados diversos tipos de aplicação de revestimentos em frutos pela técnica de imersão utilizando biopolímeros como quitosano, proteína de soro de leite entre outros, a citar: revestimento de maçãs utilizando quitosano (Santana, 2012), revestimentos de morangos com quitosano (COSTA, 2009), revestimento de morangos com misturas de quitosano e aloe vera (Silva, 2010), revestimento de Truta-arco-íris com quitosano enriquecido com óleo de canela (Ojagh et al., 2010), revestimento de uvas com quitosano e hidroxipropilmetilcelulose (Sánchez-González et al., 2011), revestimento de peru assado com proteína do soro de leite e lactoperoxidase (Min et al., 2006), revestimento de amendoins com proteína de soro de leite,  $\alpha$ -tocoferol e palmitato de ascorbilo (Han et al., 2008), revestimento de salmão com proteína de soro de leite e monoglicérides acetilados (STUCHELL and KROCHTA, 1995), revestimento de fatias de morangos com proteína de soro de leite (Huang et al., 2009), revestimento de pêssegos inteiros utilizando e goma gelana e mistura de goma gelana e sorbitol (Jacometti et al., 2003), revestimento de fatias de abacaxis utilizando alginato e gelatina (Brandelero et al., 2005), revestimento de mangas com dextrina (Ribeiro et al., 2009).

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Aquisição e Seleção

As cerejas foram adquiridas no dia seguinte à sua colheita, num estabelecimento comercial no Porto (Fruta do João). Fez-se uma seleção criteriosa de modo a que estes apresentassem homogeneidade em relação à cor, peso, tamanho e danos visíveis. Após a fase de aquisição, as cerejas foram lavadas com água destilada e higienizadas com solução de hipoclorito de sódio no laboratório.

### 4.2.2 Preparo das soluções e aplicação do revestimento

Para o estudo do potencial de aplicação da combinação quitosano/proteína do soro de leite em revestimentos edíveis, foram preparadas soluções de Q e PSL em tampão acetato de sódio, ambas a 1 %, pH 6 e com adição de 30 % de glicerol (%p/p), seguindo o mesmo procedimento apresentado na secção 2.2.4. Foram avaliados 3 casos de estudos: no primeiro, as cerejas já higienizadas foram imersas durante 1 minuto na solução de quitosano. No segundo, foram imersas na solução de PSL. No terceiro caso, para simular o mecanismo de coacervação, as cerejas foram inseridas primeiramente na solução de PSL durante 30 segundos e mais passados 30 segundos (para escorrer o excesso), foram inseridas durante 1 minuto na solução de quitosano. As cerejas com os revestimentos aplicados foram escorridos num peneiro para retirar as soluções em excesso. Depois foram deixadas a secar a temperatura ambiente durante 3 horas nas suas respetivas bandejas de politereftalato de etileno (PET), com buracos na tampa e nas superfícies laterais de modo a permitir a entrada e saída dos gases. Passado este tempo, foram armazenadas durante 7 dias numa camara de estufa climática a 10 °C e 80 % de humidade. Avaliaram-se a perda de peso, cor, pH, textura e crescimento microbológico (exposição aos bolores e fungos) em 4 caixas, preparadas em sextuplicado de acordo com a tabela 16.

**Tabela 16:** Amostras preparadas para o revestimento dos morangos

<b>Amostras</b>	<b>Soluções</b>
Caixa 1	Controlo
Caixa 2	WPI
Caixa 3	WPI + Q
Caixa 4	Q

## 4.2.3 Avaliações

### 3.1.5.5 Cor e perda de peso

Para a determinação da cor, utilizou-se um colorímetro (CR 400; Minolta, Japan) e o sistema de escala CIELab, tal como descrito na secção 3.2.4. Mediram-se os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e a diferença da cor ( $\Delta E$ ) de 8 cerejas em 3 locais e para 3 caixas diferentes nos dias 0, 2, 5 e 7. Na determinação da perda de peso, pesaram-se inicialmente as caixas contendo as cerejas, e avaliaram-se os seus pesos nos dias 0, 2, 5 e 7 em 3 caixas diferentes.

### 3.1.5.6 pH

As cerejas foram cortadas, descaroadas e trituradas no liquidificador durante 1 minuto. Depois obteve-se o sumo deste, sendo o seu pH analisado num medidor de pH (Thermo Orion 320 PerpHect LogR Meter). As análises foram feitas no dia 0, 2, 5 e 7 em caixas triplicadas.

### 3.1.5.7 Textura

A análise da textura foi realizada num texturômetro (TA.XTplus texture analyser). Utilizou-se uma sonda cilíndrica de 2 mm de diâmetro e analisou-se a força de perfuração em superfície cerejas. Os resultados foram expressos em newtons (N) por grama de cerejas.

### 3.1.5.8 Análise microbiológica

Os ensaios microbiológicos foram feitas em condições assépticas, e todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados numa autoclave a 125 °C durante 15 minutos. Retiraram-se pequenas amostras de diferentes cerejas, total de 25 g, e depois foram inseridas em sacos estéreis de 400 ml (VWR, Leuven, Bélgica). As amostras foram esmagadas por compressão com a mão, e de seguida foram suspensas em 225 ml de solução estéril de peptona (Scharlau, Sharlab, S.L., Sentmenat, Barcelona, Espanha), composta por 4 % de peptona e 4% de cloreto de sódio. O saco foi fixado num agitador horizontal a 180 rpm durante 15 minutos para uma completa mistura. Foram feitas varias diluições ( $1:10^i$ ,  $2 \leq i \leq 10$ ) em tubos estéreis com 9 ml da solução de peptona.

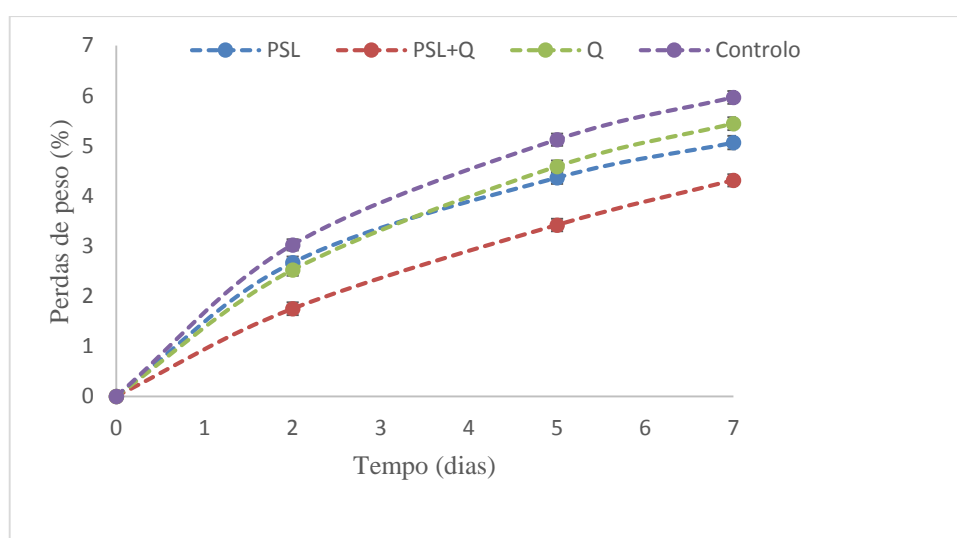
Após a preparação das amostras, foram seguidas as instruções fornecidas e disponibilizadas pelo fabricante relativas à preparação dos kits microbiológicos. As placas de SimplateR foram inoculadas com 1mL da amostra de cereja e 9mL do meio de

cultura previamente hidratado com água destilada estéril. O meio de cultura e a amostra foram distribuídos no centro da placa e posteriormente distribuídas pelas 84 cavidades existente na placa através com um ligeira homogeneização com a mão. O excesso de líquido foi descartado através de uma esponja absorvente localizada na superfície lateral da própria placa. As placas Simplate, contendo o meio de cultura para as leveduras e bolores foram incubadas a 25 °C durante 72 horas e os mesofilos totais a 30 °C durante 24 horas. É de referir que as amostras foram preparadas em triplicado e fizeram-se diluições 1:10<sup>4</sup> e 1:10<sup>6</sup> para mesofilos totais, 1:10<sup>3</sup> e 1:10<sup>6</sup> para bolores e leveduras e as quantificações desses microrganismos foram feitas de acordo com a tabela I disponibilizado pelo fabricante e apresentada em anexo. Determinou-se o número provável de microrganismos por multiplicação da população de microrganismo (depois da conversão de acordo com a tabela I) pelo fator de diluição (10).

## 4.3 Resultados e discussão

### 4.3.1 Perdas de peso

A cereja é um fruto não climatérico, em que a sua taxa respiratória está em constante decréscimo desde a sua colheita até a fase final de senescência. A sua perda de peso durante o armazenamento ocorre devido ao processo contínuo de respiração, em que o  $O_2$  é consumido enquanto a  $H_2O$  e  $CO_2$  são libertados. Os valores de perda de peso (% em relação ao peso inicial) obtidos para as cerejas sem revestimento (controlo) e com revestimentos (PSL, PSL+Q e Q), em ambiente controlado, estão representados graficamente na Figura 18.

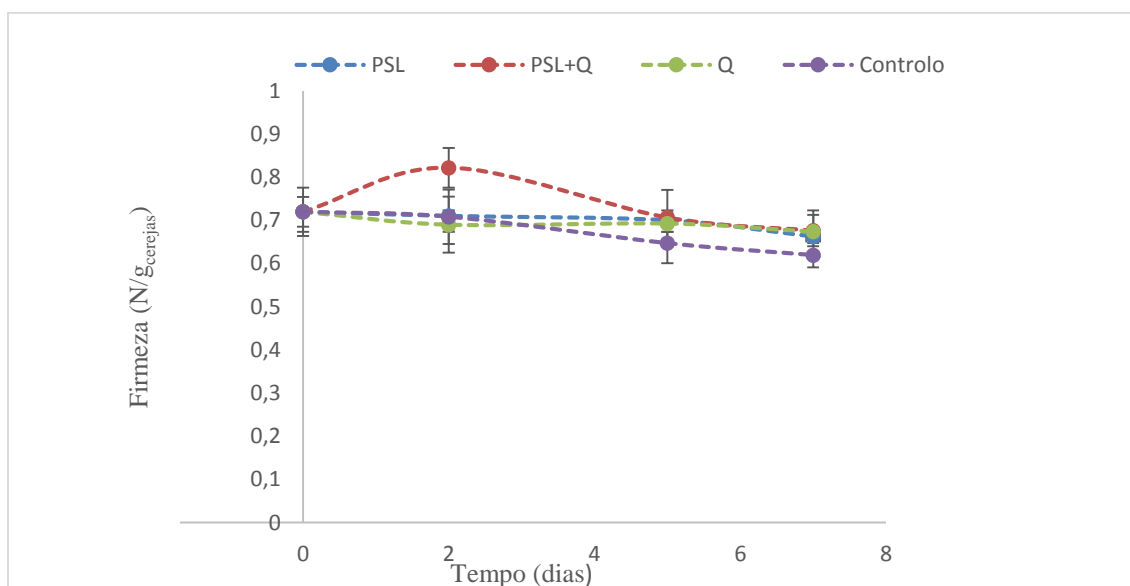


**Figura 18:** Representação gráfica dos valores de perda de peso (%) obtidos para as amostras de cereja com e sem revestimento

Analisando a figura 18 verifica-se a ocorrência de perda de peso, devido à transpiração de cerejas, em todas as amostras. Obtiveram-se uma menor perda de peso em todas as cerejas revestidas, em comparação com as não revestidas. A amostra revestida com PSL+Q foi aquela que apresentou melhor resultado, sendo que Q e PSL apresentaram variação de perdas semelhantes. Melhores resultados para PSL+Q devem essencialmente às melhores propriedades da película/filme que se formou à superfície das cerejas, servindo como barreira ao vapor de água e atenuando a migração dos gases.

### 4.3.2 Firmeza

Na figura 19 encontram-se representados os resultados dos ensaios de penetração no texturómetro a que foram sujeitos as diferentes amostras de cerejas sem e com revestimentos.

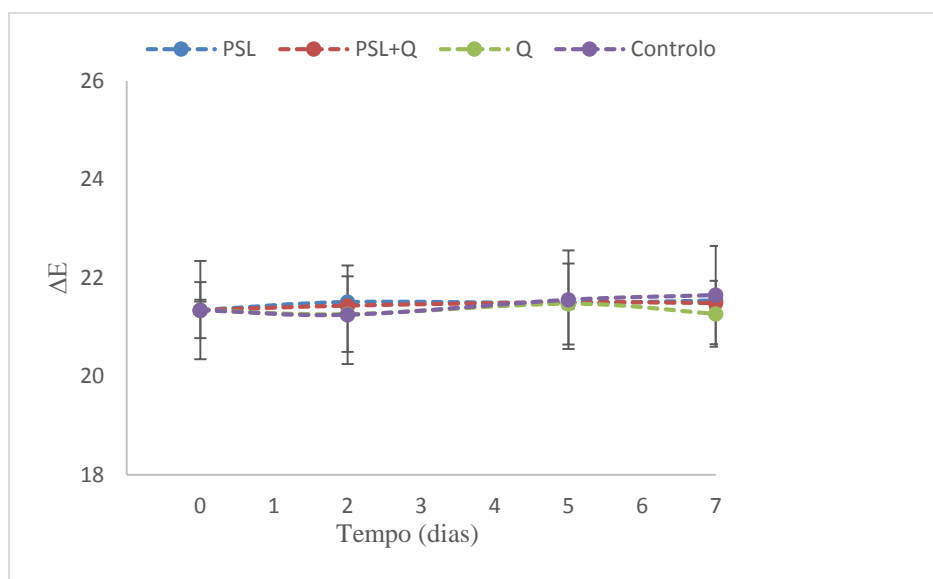


**Figura 19:** Firmeza ( $N/g_{\text{cerejas}}$ ) de cerejas obtidas para as amostras com e sem revestimento.

Verifica-se uma maior firmeza para as amostras de cerejas revestidas com PSL+Q nos três primeiros dias de teste em relação às restantes amostras. O aumento inicial pode dever-se com o “filme” formado à volta do fruto, e esse efeito pode-se ir atenuando ao longo do tempo. Obtiveram-se valores de firmezas semelhantes para todas as amostras a partir do quinto dia de teste (Figura 19), embora aparentemente o controlo seja aquele que se comportou pior. Estes resultados podem dever-se essencialmente a maior degradação da parede celular das cerejas por parte de enzimas poligalacturonase, que degradam a pectina, e possíveis alterações metabólicas e perda de eficácia dos revestimentos (Manning, 1993).

### 4.3.3 Cor

A alteração da cor nos frutos ocorre essencialmente devido à síntese ou alteração de pigmentos existentes na sua composição, nomeadamente: carotenoides, antocianinas e clorofilas. No caso de cerejas as antocianinas são os pigmentos responsáveis pela sua coloração avermelhada. Optou-se por apresentar apenas o parâmetro  $\Delta E$ , uma vez que os valores de todos os parâmetros que caracterizam a cor pelo sistema CIElab ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ) se mantiveram praticamente constantes ao longo das avaliações (figura 20).

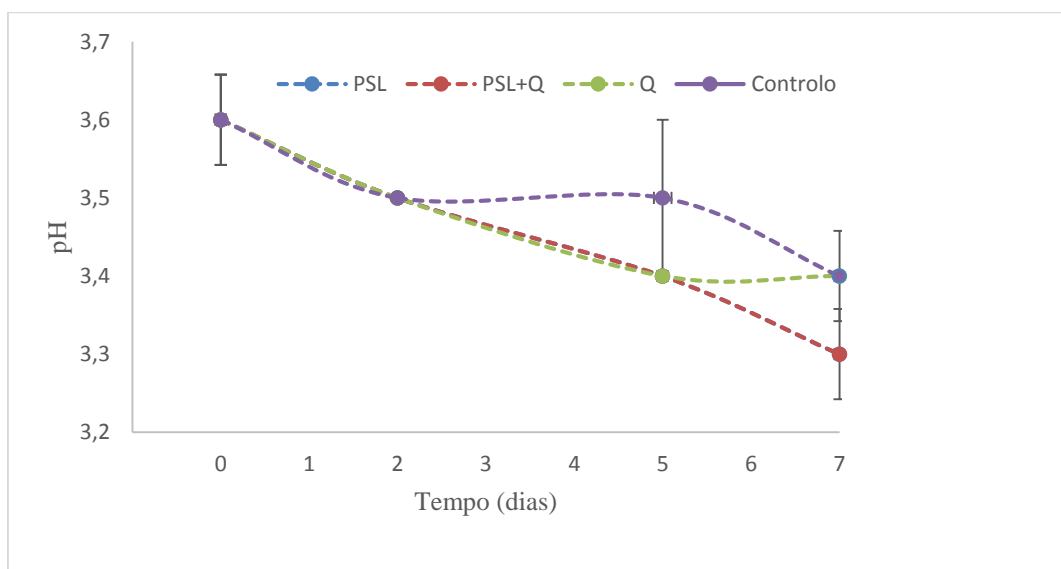


**Figura 20:** Avaliação do parâmetro  $\Delta E$  (diferença de cor) nas amostras de cerejas sem revestimento (controle) e com revestimento (PSL, PSL+Q, e Q) ao longo de 7 dias.

Analisando a Figura 20 verifica-se que a coloração das cerejas manteve constante ao longo dos 7 dias. Estes resultados devem-se essencialmente à tonalidade forte (vermelho muito escuro) das cerejas utilizadas neste trabalho experimental, espécie *prunus serotina* (cerejas negras), que mantêm a sua cor praticamente constante nas primeiras semanas após as colheitas (Faust and Surányi, 1997).

#### 4.3.4 pH

O conhecimento do pH dos frutos e alimentos, e consequente acidez, permite adotar medidas e tratamentos necessários para conservar o alimento após a sua colheita. Na Figura 21 encontram-se representados os valores de pH para as amostras de cerejas com (PSL, PSL+Q e Q) e sem tratamento (controle).



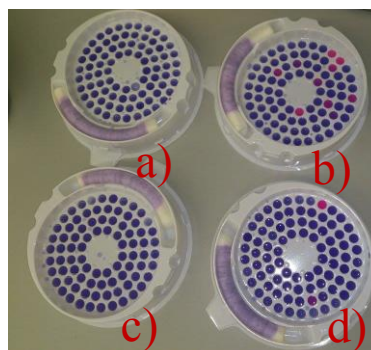
**Figura 21:** Evolução do pH das amostras de cerejas com e sem tratamento ao longo de 7 dias.

Verificam-se reduções de pH em todas as amostras, sendo mais acentuada para os tratamentos com PSL+Q e PSL e menos acentuada para as amostras sem tratamento (controle). Isto poderá dever-se a uma maior perda de peso no controle, causada pela maior transpiração com libertação de H<sub>2</sub>O, o que leva a uma redução de concentração do íão hidrogénio e conseqüente redução de pH. Segundo (Antunes et al., 2003) a redução do pH dos frutos revestidos devem-se essencialmente a redução do seu acesso ao oxigénio, e conseqüente aumento de CO<sub>2</sub>, causada pela atmosfera modificada que provoca a redução da atividade enzimática e conseqüente diminuição de pH.

### 4.3.5 Análise microbiológica

#### 4.3.5.1 Mesófilos totais

As quantificações de microrganismos mesófilos em alimentos servem como indicador da qualidade higiênica dos alimentos e fornece uma ideia sobre seu tempo útil de conservação (Carvalho et al., 2005). Na Figura 22 e Tabela 17 encontram-se representados os resultados obtidos para a análise de mesófilos totais aeróbios em cerejas sem revestimento (controle) e cerejas com revestimentos (PSL,PSL+Q e Q).



**Figura 22:** Imagem representativa dos resultados obtidos para as amostras de cerejas: a) controle b) PSL+Q c) Q d) PSL.

**Tabela 17:** Quantificação de microrganismos mesófilos em cerejas com e sem revestimentos.

Amostras	NMP/ml	
	Diluições 10 <sup>-3</sup>	Diluições 10 <sup>-6</sup>
Controlo	0	0
PSL	40	0
PSL+Q	210	0
Q	0	0

Analisando a figura 22 e os resultados da tabela 17 verificam-se que a amostra de cerejas com revestimento PSL+Q apresentou maior crescimento de mesófilos, sendo que nas amostras com PSL o crescimento é bastante inferior, enquanto no controlo e Q não foram detetados crescimentos. A presença de proteínas nos revestimentos PSL e PSL+Q podem ter sido usadas como nutrientes por parte desses microrganismos, daí maiores crescimentos verificados.

O maior crescimento de microrganismo na amostra PSL+Q está também ligado ao maior decréscimo de pH para estas amostras, justificado pela produção de substâncias ácidas por parte dos desses microrganismos (Siqueira, 1995). Nas amostras com Q a não deteção e quantificação de mesófilos pode dever-se sobretudo às suas propriedades antifúngicas e capacidade de induzir enzimas de defesa e fitoalexinas em plantas (Ribeiro et al., 2007).

#### 4.3.5.2 Leveduras e bolores

Bolores e leveduras são fungos que podem estar presentes nos alimentos fabricados e/ou armazenados de forma inadequada. A diferença dos dois fungos reside no facto dos bolores pertencerem a fungos filamentosos e leveduras a não filamentosos. Os seus crescimentos são mais comuns em alimentos com baixa  $a_w$  e ou elevada porção de lípidos. Na tabela 18 encontram-se representados os resultados da quantificação de bolores e leveduras em cerejas sem revestimento (controlo) e com revestimentos (PSL, PSL+Q e Q). As imagens correspondentes às análises microbiológicas para leveduras e bolores encontram-se representadas na Figura I em anexo.

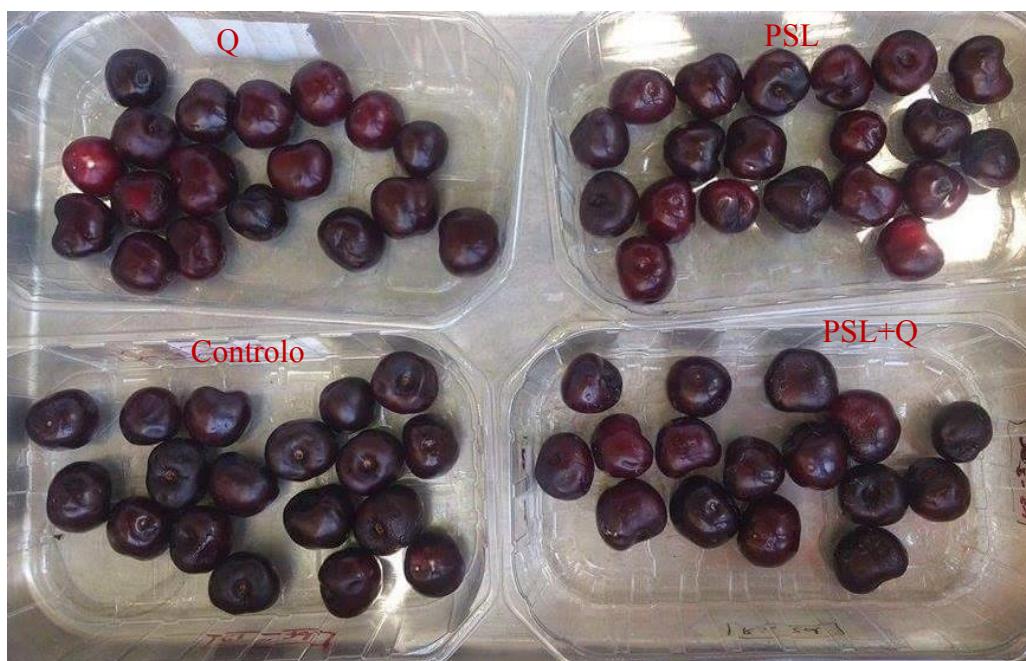
**Tabela 18:** Avaliação de bolores e leveduras em cerejas sem revestimento (controlo) e com revestimento (PSL, PSL+Q e Q)

Amostras	NMP/ml	
	Diluições ( $10^{-4}$ )	Diluições ( $10^{-6}$ )
Controlo	$2,4 \times 10^3$	$1,78 \times 10^3$
PSL	$1,7 \times 10^3$	$7,6 \times 10^3$
PSL+Q	$2,3 \times 10^3$	$7,4 \times 10^3$
Q	$7,4 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$

Analisando a tabela 18 verifica-se maiores crescimentos para a amostra de cereja sem revestimento. A amostra revestida com quitosano foi aquela que apresentou menores

crescimentos desses microrganismos, devido essencialmente a sua propriedade antifúngica. O pH entre 3 e 4 das cerejas tornam-se propício o crescimento de leveduras e bolores, daí melhores resultados para as amostras com revestimento mostra a eficiência de proteção desses revestimentos (Park, 1999). É de referir que todos os resultados analíticos obtidos indicam que o produto se encontra dentro dos limites aceitáveis estabelecidos para o consumo ( $\leq 10^5$ ) (Santos et al., 2005).

Na figura 23 encontram-se as imagens de amostras de cerejas com e sem tratamentos obtidas no final do décimo dia.



**Figura 23:** Imagens de amostras de cerejas com e sem tratamento.

Analisando a figura verifica-se uma corroboração dos resultados da tabela 18, na medida em que a amostra de cerejas sem tratamentos foi aquela que apresentou maiores danos visíveis, mudanças de cor e possíveis locais de contaminações.

## 5 Conclusões

Durante o trabalho apresentado nesta tese foram desenvolvidos e caracterizados dois sistemas para formulações de filmes utilizando quitosano (polissacarídeo) carregado positivamente e duas proteínas carregadas negativamente (PSL e PS) através de interações eletrostáticas e mecanismo de coacervação complexa entre estes biopolímeros.

Com a realização deste trabalho experimental, chegou-se à conclusão que a formulação de filmes contendo dois biopolímeros, permitiu melhorar as suas propriedades funcionais em comparação com os filmes contendo um só componente. Esta melhoria deveu-se essencialmente aos efeitos sinérgicos verificados entre os biopolímeros. Verificou-se que os filmes formulados PSL+Q apresentaram propriedades mecânicas razoáveis (flexíveis e resistência mecânica boa), propriedades de barreira a vapor de água razoavelmente boa e apresentaram um aspeto transparente e pouca solubilidade em água. A análise sua microestrutura revelou melhores aspetos morfológicos e formação de uma estrutura coesa com matriz polimérica bem definida. Pela análise do Cryo SEM das soluções, verificou-se que uma pequena quantidade de quitosano na matriz polimérica permitiu melhorar a sua estrutura aumentando a coesão dos biopolímeros e conseqüente homogeneidade.

No caso do sistema PSL+Q, verificou-se que os filmes formulados com maiores percentagens de água adicional no coacervato apresentaram melhores propriedades visuais, homogeneidade e textura. No entanto, a resistência mecânicas destes filmes foi reduzida enquanto o seu alongamento e permeabilidade foram aumentadas. Conclui-se que água exerce um efeito plastificante na matriz polimérica e este efeito é tanto maior quanto maior for a quantidade de água retida nesta matriz. A remoção de bolhas de ar existente nos filmes recorrendo a outras técnicas, nomeadamente por filtração.

Em relação aos filmes PS + Q, estes revelaram ser muitos flexíveis, poucos resistentes, pouco transparentes e muito solúveis em água. Apresentaram também valores de opacidade superior aos dos filmes Q e PS formulados em separado. Por comparação dos dois sistemas, pode-se dizer que os filmes PSL+Q apresentaram melhores propriedades no geral, em comparação com os filmes PS + Q, sendo a sua aplicação mais indicadas em produtos sujeitos ao transporte, choques mecânicos, e ambiente de baixa solubilidade. Todavia a sua aplicação não deve ser posta de parte, uma vez que a aplicação de produtos de origem animal em produtos vegetais, no caso de sistemas PSL+Q, podem trazer alguns constrangimentos para os consumidores piscitariano.

Numa perspectiva geral, chegou-se a conclusão que os filmes formulados apesar de possuírem boas propriedades mecânicas e de barreiras têm propriedades ainda inferiores aos filmes de polímeros sintéticos. Esta é a razão para qual estes filmes e embalagens sintéticos são muitos utilizados atualmente, mesmo não sendo biodegradáveis. Deve-se ter a noção que os filmes elaborados permitem criar alternativas aos plásticos sintéticos, mas pelo menos por agora, não se pode falar numa substituição por completo (que não seria de qualquer modo possível, mesmo que em termos funcionais e de preço fossem semelhantes, devido à muito menor disponibilidade dos biopolímeros em relação à quantidade de petróleo existente). Em casos particulares em que é importante ter alguma permeabilidade ao vapor de água (frutos e vegetais), a sua aplicação pode ser interessante.

Os revestimentos edíveis à base de PSL, PSL+Q e Q aplicados à superfície de cerejas de revelaram ser excelentes protetores para a manutenção das suas características durante o armazenamento. A firmeza e a consistência das cerejas com revestimento foram superiores aos do controlo e verificou-se uma redução na perda de peso devido à formação de uma camada protetora envolto a superfície das cerejas revestidas. Obtiveram-se melhores resultados para as cerejas revestidas com PSL+Q, comprovando as melhores propriedades encontradas nesses filmes. Verificou-se um ligeiro aumento no pH das cerejas não revestidas, devido a essencialmente a perda de peso por transpiração e alterações metabólicas a volta da sua superfície protetora, e uma diminuição em cerejas revestidas. Em relação a cor verificou-se que esta propriedade manteve-se praticamente constante ao longo dos 7 dias de testes. No entanto, verificou-se uma alteração da cor de controlo em relação aos demais ao fim de 10 dias. Conclui-se que a análise ao longo dos 7 dias não foram suficientes para a comprovação da variação desta propriedade.

Por outro lado, os revestimentos a base de PSL e Q mostraram não ser muitos eficientes na proteção e minimização de crescimento de mesófilos totais. No entanto, são eficientes na proteção e minimização de crescimento de bolores e leveduras. A atividade antifúngica do quitosano foi comprovada devido a menor taxa de crescimento de bolores, leveduras e também de mesófilos totais. No geral a aplicação dos revestimentos revelou ser eficiente na proteção da superfície dos alimentos contra os microrganismos.

## 6 Sugestões para trabalhos futuros

Apesar dos resultados obtidos, o presente estudo não está finalizado. Por exemplo, para trabalhos futuros é possível identificar e sugerir alguns estudos ou alterações de forma a melhorar a aplicabilidade destes sistemas, nomeadamente:

- O estudo da estrutura por SEM da superfície inferior dos filmes (em contacto com a placa) poderá revelar-se interessante na medida em que serão extraídos informações importantes que podem alterar a forma de secagem das soluções para a obtenção dos filmes;
- Fazer medições do ângulo de contato para verificar se as formulações usadas são adequadas para revestir a superfície dos alimentos e formar uma película contínua junto à superfície destes;
- Estudar a influência do grau de desacetilação do quitosano no desempenho dos filmes formulados;
- Otimizar os procedimentos de formulação de filmes, alterando o pH das soluções dos biopolímeros e/ou a temperatura, de forma a obter filmes com propriedades cada vez mais melhoradas, alargando a sua gama de aplicação.
- Na formulação de filmes PS+Q, fazer a sua preparação utilizando soluções tampão diferentes, tentando aumentar a sua solubilidade.
- No caso dos filmes, utilizar agente reticulante, de forma a obter matriz polimérica mais coesa e homogénea.

## Referências bibliográficas

- Anker, M., Stading, M., and Hermansson, A.M. (2001). Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 989-995.
- Antunes, L.E.C., Duarte Filho, J., and Souza, C.D. (2003). Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 413-419.
- Arvanitoyannis, I., Nakayama, A., and Aiba, S.I. (1998). Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate polymers* 36, 105-119.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., and Yamamoto, N. (1997). Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Food Chemistry* 60, 593-604.
- Avena-Bustillos, R.J., and Krochta, J.M. (1993). Water Vapor Permeability of Caseinate-Based Edible Films as Affected by pH, Calcium Crosslinking and Lipid Content. *Journal of food science* 58, 904-907.
- Bastos, D.S., Barreto, B.N., Souza, H.K., Bastos, M., Rocha-Leão, M.H.M., Andrade, C.T., and Gonçalves, M.P. (2010). Characterization of a chitosan sample extracted from Brazilian shrimps and its application to obtain insoluble complexes with a commercial whey protein isolate. *Food Hydrocolloids* 24, 709-718.
- Berg, C.V.D. (1981). Vapour sorption equilibria and other water-starch interactions: a physico-chemical approach. (Doctoral dissertation, Wageningen Agricultural University.).
- Bertan, L.C., Tanada-Palmu, P.S., Siani, A.C., and Grosso, C.R.F. (2005). Effect of fatty acids and "Brazilian Elemi" on composite films base gelatin. *Food Hydrocolloids* 19, 73-82.
- Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Cerqueira, M.A., Rocha, C.M., Avides, M.C., Quintas, M.A., and 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.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15.
- Brandelero, R.P.H., Vieira, A.P., Telis, V.R.N., Telis-Romero, J., and Yamashita, F. (2005). Aplicação de revestimento comestível em abacaxis processados por métodos combinados: isoterma de sorção e cinética de desidratação osmótica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25, 285-290.
- Brody, A.L., Bugusu, B., Han, J.H., Sand, C.K., and McHugh, T.H. (2008). Scientific status summary. *Journal of Food Science* 73, 107-116.

Brunauer, S., Emmett, P.H., and Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 309-319.

Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E. (2001). Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal of Food Science* 66, 865-870.

Cao, N., Fu, Y., and He, J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids* 21, 1153-1162.

Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W., Souza, M.P., Teixeira, J.A., and Vicente, A.A. (2009). Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Journal of Food Engineering* 95, 379-385.

Carvalho, A., Cortez, A., Salotti, B., Bürger, K., and Vidal-Martins, A. (2005). Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. *Arquivos do Instituto de Biologia* 72, 303-307.

Cha, D.S., and Chinnan, M.S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 223-237.

Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of dairy science* 78, 2563-2583.

Colwill, J.A., Wright, E.I., Rahimifard, S., and Clegg, A.J. (2012). Bio-plastics in the context of competing demands on agricultural land in 2050. *International Journal of Sustainable Engineering* 5, 3-16.

Costa, C.S.D. (2009). Coberturas à base de quitosana na qualidade pós-colheita de morangos cv. Aromas.

Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., and Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology* 19, S103-S112.

de Souza, H.K., Bai, G., do Pilar Gonçalves, M., and Bastos, M. (2009). Whey protein isolate-chitosan interactions: A calorimetric and spectroscopy study. *Thermochimica Acta* 495, 108-114.

De Souza Sant'ana, A., da Conceição, C., and PerdomoAzeredo, D.R. (2002). Comparação entre os métodos rápidos SimplateR TPC-CI e PetrifilmR AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 22.

Dos Santos, J.E., da PSoares, J., Dockal, E.R., Filho, S.P.C., and Cavalheiro, É.T. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polimeros ciencia e tecnologia* 13, 242-249.

Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D., and Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current opinion in Colloid & interface Science* 5, 202-214.

- Elsabee, M.Z., and Abdou, E.S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering: C* 33, 1819-1841.
- Embuscado, M.E., and Huber, K.C. (2009). *Edible films and coatings for food applications* (Springer).
- Fakhouri, F.M., Fontes, L.C.B., Gonçalves, P.V.d.M., Milanez, C.R., Steel, C.J., and Collares-Queiroz, F.P. (2007). Films and edible coatings based on native starches and gelatin in the conservation and sensory acceptance of Crimson gra. *Food Science and Technology (Campinas)* 27, 369-375.
- Faust, M., and Surányi, D. (1997). Origin and dissemination of cherry. *Horticultural Reviews* 19, 263-317.
- Ferreira, C.O., Nunes, C.A., Delgadillo, I., and Lopes-da-Silva, J. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International* 42, 807-813.
- Gennadios, A. (2002). *Protein-based films and coatings* (CRC Press).
- González, A., Strumia, M.C., and Igarzabal, C.I.A. (2011). Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of food engineering* 106, 331-338.
- Greener, I.K., and Fennema, O. (1989). Evaluation of edible, bilayer films for use as moisture barriers for food. *Journal of food science* 54, 1400-1406.
- Hagenmaier, R.D., and Shaw, P.E. (1990). Moisture permeability of edible films made with fatty acid and hydroxypropyl methyl cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1799-1803.
- Han, J., Hwang, H.M., Min, S., and Krochta, J. (2008). Coating of Peanuts with Edible Whey Protein Film Containing  $\alpha$ -Tocopherol and Ascorbyl Palmitate. *Journal of food science* 73, E349-E355.
- Haraguchi, F.K., ABREU, W.C., and Paula, H.d. (2006). Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nutr* 19, 479-488.
- Huang, L.-l., Zhang, M., Yan, W.-q., Mujumdar, A.S., and Sun, D.-f. (2009). Effect of coating on post-drying of freeze-dried strawberry pieces. *Journal of food engineering* 92, 107-111.
- Iezzoni, A. (2008). Cherries. In *Temperate fruit crop breeding* (Springer), pp. 151-176.
- Jacometti, G.d.A., Meneghel, R.F.d.A., and Yamashita, F. (2003). Aplicação de revestimentos comestíveis em pêssego (*Prunus persica*). *Ciência e Tecnologia de alimentos* 23, 95-100.
- Kamper, S.L., and Fennema, O. (1984). Water vapor permeability of an edible, fatty acid, bilayer film. *Journal of food science* 49, 1482-1485.

Kerch, G., Sabovics, M., Kruma, Z., Kampuse, S., and Straumite, E. (2011). Effect of chitosan and chitoooligosaccharide on vitamin C and polyphenols contents in cherries and strawberries during refrigerated storage. *European Food Research and Technology* 233, 351-358.

Kester, J., and Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food technology (USA)*.

Kim, K.M., Hwang, K.T., Weller, C.L., and Hanna, M.A. (2002). Preparation and characterization of soy protein isolate films modified with sorghum wax. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 615-619.

Kuo, J. (2007). *Electron microscopy: methods and protocols*, Vol 369 (Springer Science & Business Media).

Kurek, M., Galus, S., and Debeaufort, F. (2014). Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life* 1, 56-67.

Li, J., Eleya, M.O., and Gunasekaran, S. (2006). Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties. *Food Hydrocolloids* 20, 678-686.

Liyanage, D.S., Tillekeratne, M., and Hewage, S. (2001). Preparation and characterization of edible soy protein films. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 29, 137-145.

Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M., and Karim, A. (2007). Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch–alginate edible film containing lemongrass oil. *Journal of Food Science* 72, C324-C330.

Manning, K. (1993). Soft fruit. In *Biochemistry of fruit ripening* (Springer), pp. 347-377. Marsh, K., and Bugusu, B. (2007). Food packaging—roles, materials, and environmental issues. *Journal of food science* 72, R39-R55.

McClements, D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology advances* 24, 621-625.

McHugh, T.H., Aujard, J.F., and Krochta, J.M. (1994). Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. *Journal of food science* 59, 416-419.

Min, S., Harris, L.J., and Krochta, J.M. (2006). Inhibition of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 on roasted turkey by edible whey protein coatings incorporating the lactoperoxidase system. *Journal of Food Protection®* 69, 784-793.

Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., and Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 42, 67-89.

- Myllärinen, P., Partanen, R., Seppälä, J., and Forssell, P. (2002). Effect of glycerol on behaviour of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers* 50, 355-361.
- Nielsen, S.S. (2010). *Food analysis* (Springer).
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., and Phillips, G. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids* 39, 301-318.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., and Hosseini, S.M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food chemistry* 120, 193-198.
- Park, H.J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology* 10, 254-260.
- Park, H.J., Bunn, J.M., Weller, C.L., Vergano, P.J., and Testin, R.F. (1994). Water Vapor Permeability and Mechanical Properties of Grain Protein-Based Films as Effected by Mixtures of Polyethylene Glycol and Glycerin Plasticizers. *Biological Systems Engineering: Papers and Publications*, 93.
- Peniche-Covas, C., Argüelles-Monal, W., and San Román, J. (1993). A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability* 39, 21-28.
- Pérez-Gago, M.B., and Krochta, J.M. (2002). Formation and properties of whey protein films and coatings. *Protein-based films and coatings*, 159-180.
- Perez-gago, M., and Krochta, J. (2001). Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science* 66, 705-710.
- Ribeiro, C., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., and Miranda, C. (2007). Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology* 44, 63-70.
- Ribeiro, T.P., Lima, M.A.C.d., Trindade, D.C.G.d., Santos, A.C.N.d., and Amariz, A. (2009). Uso de revestimentos à base de dextrina na conservação pós-colheita de manga 'Tommy Atkins'. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31, 343-351.
- Rocha, C.M., Souza, H.K., Magalhães, N.F., Andrade, C.T., and Gonçalves, M.P. (2014). Rheological and structural characterization of agar/whey proteins insoluble complexes. *Carbohydrate polymers* 110, 345-353.
- Ryu, S.Y., Rhim, J.W., Roh, H.J., and Kim, S.S. (2002). Preparation and physical properties of zein-coated high-amylose corn starch film. *LWT-Food Science and Technology* 35, 680-686.
- Sá, C. (2006). Caracterização morfológica, microestrutural e microanalítica de materiais por: microscopia electrónica de varrimento (SEM) e microanálise por raios-X-EPMA: EDS. WDS, CEMUP.

Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., and Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology* 60, 57-63.

Santana, A.I. (2012). Aplicação de revestimentos comestíveis à base de quitina desacetilada extraída de subprodutos da indústria de pescado em maçã Fuji de IV gama. Santos, M.I., Correia, C., Cunha, M.I.C., Saraiva, M.M., and Novais, M.R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da ordem dos Farmacêuticos* 64, 66-68.

Sapru, V., and Labuza, T.P. (1994a). Dispersed phase concentration effect on water vapor permeability in composite methyl cellulose-stearic acid edible films. *Journal of food processing and preservation* 18, 359-368.

Sapru, V., and Labuza, T.P. (1994b). Dispersed phase concentration effect on water vapor permeability in composite methyl cellulose- stearic acid edible films. *Journal of food processing and preservation* 18, 359-368.

Semenova, M.G., and Dickinson, E. (2013). *Biopolymers in food colloids: Thermodynamics and molecular interactions* (CRC Press).

Serra, A.T., Duarte, R.O., Bronze, M.R., and Duarte, C.M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry* 125, 318-325. Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & Technology* 10, 37-51.

Silva, É.R.D. (2010). Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e Aloe vera em morangos.

Siqueira, R.d. (1995). *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: Embrapa. Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., and Aguilera, J. (2010a). *Food hydrocolloid edible films and coatings* (Nova Science Publishers).

Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., and Aguilera, J.M. (2010b). *Food hydrocolloid edible films and coatings* (Nova Science Publishers).

Smith, C., and Townsend, D. (1999). A new medium for determining the total plate count in food. *Journal of Food Protection®* 62, 1404-1410.

Somasundaran, P. (2006). *Encyclopedia of surface and colloid science, Vol 1* (CRC Press).

Sousa, A.M., Sereno, A.M., Hilliou, L., and Gonçalves, M.P. (2010). Biodegradable agar extracted from *Gracilaria vermiculophylla*: Film properties and application to edible coating. In *Materials Science Forum* (Trans Tech Publ), pp. 739-744.

Souza, H.K., Campiña, J.M., Sousa, A.M., Silva, F., and Gonçalves, M.P. (2013). Ultrasound-assisted preparation of size-controlled chitosan nanoparticles: characterization and fabrication of transparent biofilms. *Food Hydrocolloids* 31, 227-236.

Stuchell, Y.M., and Krochta, J.M. (1995). Edible coatings on frozen king salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. *Journal of food science* 60, 28-31.

Subramanian, P. (2000). Plastics recycling and waste management in the US. *Resources, Conservation and Recycling* 28, 253-263.

Suyatma, N.E., Copinet, A., Tighzert, L., and Coma, V. (2004). Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *Journal of Polymers and the Environment* 12, 1-6.

Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology* 14, 71-78.

Turhan, K.N., and Şahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering* 61, 459-466.

Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D.J., and González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 496-511.

Wang, H. (1981). Oriental soybean foods. *Food Devel* 15, 29-34.

Willett, J., and Finkenstadt, V. (2003). Preparation of starch-graft-polyacrylamide copolymers by reactive extrusion. *Polymer Engineering & Science* 43, 1666-1674.

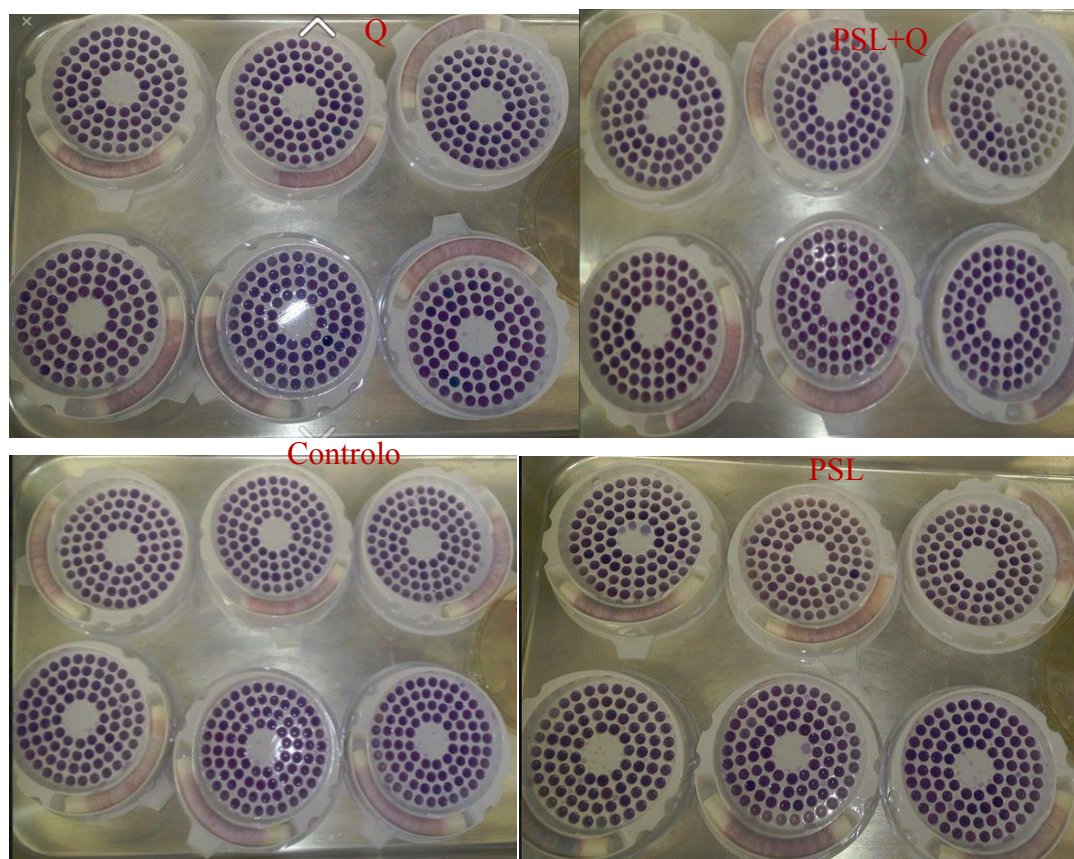
Wittaya, T. (2012). Protein-based edible films: characteristics and improvement of properties (INTECH Open Access Publisher).

## Anexos

Tabela I: Tabela utilizada na quantificação dos microrganismos.

**SimPlate<sup>®</sup> Conversion Table**

positive wells = population*	positive wells = population	positive wells = population
1 = 2	29 = 70	57 = 190
2 = 4	30 = 74	58 = 196
3 = 6	31 = 76	59 = 202
4 = 8	32 = 80	60 = 208
5 = 10	33 = 84	61 = 216
6 = 12	34 = 86	62 = 224
7 = 14	35 = 90	63 = 232
8 = 16	36 = 94	64 = 240
9 = 18	37 = 96	65 = 248
10 = 22	38 = 100	66 = 256
11 = 24	39 = 104	67 = 266
12 = 26	40 = 108	68 = 276
13 = 28	41 = 112	69 = 288
14 = 30	42 = 116	70 = 298
15 = 32	43 = 120	71 = 312
16 = 36	44 = 124	72 = 324
17 = 38	45 = 128	73 = 338
18 = 40	46 = 132	74 = 354
19 = 42	47 = 136	75 = 372
20 = 46	48 = 142	76 = 392
21 = 48	49 = 146	77 = 414
22 = 50	50 = 150	78 = 440
23 = 54	51 = 156	79 = 470
24 = 56	52 = 160	80 = 508
25 = 58	53 = 166	81 = 556
26 = 62	54 = 172	82 = 624
27 = 64	55 = 178	83 = 738
28 = 68	56 = 184	84 = >738



**Figura I:** Imagens das amostras de cerejas sem tratamento (controlo) e com tratamento (PSL, PSL+Q e Q) utilizadas para a quantificação e deteção de bolores e leveduras.