



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

LORENA BARBOSA DE SOUZA ALMEIDA

**PROPRIEDADES FÍSICAS E ANTIMICROBIANAS DO FILME E DO
REVESTIMENTO COMESTÍVEL DE QUITOSANA E GALACTOMANANA DE
Adenantha pavonina L.**

**FORTALEZA
2014**

LORENA BARBOSA DE SOUZA ALMEIDA

PROPRIEDADES FÍSICAS E ANTIMICROBIANAS DO FILME E DO REVESTIMENTO
COMESTÍVEL DE QUITOSANA E GALACTOMANANA DE *Adenanthera pavonina* L.

Defesa de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza

Co-orientadora: Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A444p Almeida, Lorena Barbosa de Souza.
Propriedades físicas e antimicrobianas do filme e do revestimento comestível de quitosana e galactomanana de *Adenantha pavonina* L. – 2015.
68f. : il., color. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Orientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.
Coorientação: Prof. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.
1. Alimentos – embalagens. 2. Embalagem biodegradável. 3. Revestimento comestível. I. Título.

LORENA BARBOSA DE SOUZA ALMEIDA

PROPRIEDADES FÍSICAS E ANTIMICROBIANAS DO FILME E DO REVESTIMENTO
COMESTÍVEL DE QUITOSANA E GALACTOMANANA DE *Adenanthera pavonina* L.

Defesa de Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências
Agrárias, da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Aprovada em: 30/07/2014.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Orientador)
Departamento de Engenharia de Pesca/ UFC

Prof^ª. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Co-orientadora)
Departamento de Tecnologia de Alimentos/ UFC

Prof^ª. Ph.D Elisabeth Mary Cunha da Silva
Departamento de Tecnologia de Alimentos/ UFC

Prof. Ph.D. André Luis Coelho da Silva
Departamento de Bioquímica/ UFC

Prof^ª. Dra. Maria Lúcia Nunes
Departamento de Tecnologia de Alimentos/ UFC

Aos meus pais, ao meu irmão João,
ao meu esposo Marcos Robson e
ao meu querido irmão Davi (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me amparar quando não tinha mais forças e por permitir a realização deste sonho, mesmo diante das adversidades da vida. Obrigada Pai, por ser o meu socorro.

Ao meu esposo Marcos Robson, pelo carinho, sempre me incentivando a prosseguir.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por sempre acreditarem em meu potencial e por me ajudarem em tudo. Vocês muito contribuíram para o meu êxito.

À Universidade Federal do Ceará, por intermédio do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste mestrado.

Ao meu orientador, Professor Bartolomeu, minha eterna gratidão por todo apoio, compreensão, paciência e conhecimento transmitido. Obrigada pelo encorajamento e por não me deixar desistir. Deus te conceda inúmeras bênçãos.

À Professora Evânia, pela co-orientação e pelos ensinamentos durante todo este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e críticas construtivas, especialmente ao Professor André Luis, por também fornecer a galactomanana liofilizada de *A. pavanina* L. utilizada no experimento.

À Natália e ao Diego, do Laboratório de Tecnologia do Pescado, que não se furtaram a prestar significativa ajuda no início do trabalho.

À Flayanna, Elaine Cristina, Gisane e Daniele, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade e pelo auxílio nas análises microbiológicas.

À minha querida amiga Adriana, pela valiosa ajuda na análise estatística dos dados.

Ao André Luís, pela grande ajuda na realização da caracterização mecânica dos filmes.

À Leilanne, por compartilhar comigo tantos acontecimentos e me acolhido várias vezes em sua casa em momentos que muito precisei.

Ao Paulo Mendes, secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por ser sempre tão solícito. Muito obrigada!

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para meu desempenho acadêmico e pessoal.

RESUMO

O desenvolvimento de materiais de embalagem, como filmes e revestimentos comestíveis à base de biopolímeros, tem sido uma tendência promissora, pois além de manter a qualidade dos alimentos, são também biodegradáveis, sendo uma alternativa eficaz frente ao uso de materiais sintéticos, como os plásticos, por contribuir na redução do impacto ambiental que estes têm causado por não serem biodegradáveis. O principal objetivo do estudo foi produzir filmes e revestimentos comestíveis à base de quitosana e galactomanana de *A. pavonina* L., com a incorporação de acetato de sódio e caracterizá-los quanto às suas propriedades físicas e antimicrobianas. Os filmes foram obtidos por *casting* e caracterizados quanto à permeabilidade ao vapor de água, ao oxigênio (O₂) e ao dióxido de carbono (CO₂), tensão máxima, tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de Young, solubilidade em água, opacidade e cor. A atividade antimicrobiana dos revestimentos contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1026 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 1132 também foi analisada. O filme de quitosana-galactomanana com a adição de acetato de sódio foi um dos filmes menos solúveis em água e apresentou menores valores de permeabilidade ao vapor de água e de deformação na ruptura, sendo o filme mais rígido por apresentar o maior módulo de Young. As blendas apresentaram os maiores valores de tensão máxima e tensão de ruptura. Foi observada a redução da permeabilidade ao O₂ e o aumento da permeabilidade ao CO₂ nos filmes de galactomanana com a incorporação de acetato de sódio. Filmes com galactomanana em sua composição são mais opacos e apresentam maiores valores de luminosidade. Os filmes que contém quitosana apresentaram baixa solubilidade em água e altos valores do componente b*. Nenhum dos revestimentos preparados foram efetivos contra o crescimento de *S. aureus* e os revestimentos à base de galactomanana não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana contra os micro-organismos estudados. O revestimento de quitosana de alto peso molecular (1%) foi efetivo contra bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa* e *S. Enteritidis*) e Gram positiva (*L. monocytogenes*). Porém, observou-se que não há efeito bactericida da blenda contra *S. Enteritidis*, sugerindo-se que a atividade antimicrobiana da quitosana foi diminuída.

Palavras-chave: Filme comestível. Embalagem de alimentos. Filmes biodegradáveis.

ABSTRACT

The development of packaging materials such as edible films and coatings based on biopolymer, has been a promising trend, as well as maintaining the quality of food, are also biodegradable, being an effective alternative against the use of synthetic materials such as plastics for contributing to reducing the environmental impact that these have caused by not being biodegradable. The main objective of the study was to produce edible films and coatings based on chitosan and galactomannan of *A. pavonina* L., with the incorporation of sodium acetate and characterize them as to their physical and antimicrobial properties. The films were obtained by casting and characterized as its water vapor permeability, oxygen permeability (O₂) and carbon dioxide (CO₂), maximum stress, tensile strength, elongation at break and Young's modulus, solubility in water, opacity and color. The antimicrobial activity of the coatings against *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1026 and *Salmonella* Enteritidis ATCC 1132 was also analyzed. The film of chitosan-galactomannan with the addition of sodium acetate was one of the least water solubility and showed lower water vapor permeability and elongation at break, being the most rigid film for presenting the highest Young's modulus. The blends showed the highest values of maximum stress and tensile strength. Reducing the permeability to O₂ and the increase to CO₂ permeability in films galactomannan with the addition of sodium acetate was observed. Films with galactomannan in their composition are more opaque and have higher brightness values. The films containing chitosan exhibited low water solubility and high b* component values. None of the prepared coatings were effective against the growth of *S. aureus* and coatings based on galactomannan showed no antimicrobial activity against the microorganisms studied. The coating of high molecular weight chitosan (1%) was effective against Gram negative (*P. aeruginosa* and *S. Enteritidis*) and Gram positive (*L. monocytogenes*) bacteria. However, it was observed that the blend does not have bactericidal effect against *S. Enteritidis*, suggesting that the antimicrobial activity of chitosan was decreased.

Keywords: Edible films. Food Packaging. Biodegradable films.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação das estruturas primárias de quitina e quitosana.....	19
Figura 2 - Estrutura molecular geral de galactomananas.....	23
Figura 3 - Folhas e sementes de <i>Adenantha pavonina</i> L.....	23
Figura 4 - Representação da estrutura química do glicerol.....	26
Figura 5 - Representação da estrutura química do acetato de sódio.....	26
Figura 6 - Representação esquemática do modelo CIELAB.....	32
Figura 7 - Obtenção do endosperma bruto de sementes quiescentes de <i>A. pavonina</i> L..	38
Figura 8 - Fluxograma de preparação dos revestimentos comestíveis.....	41
Figura 9 - Fluxograma de preparação das blendas comestíveis.....	41
Figura 10 - Prensa estampadora pneumática usada para corte dos corpos de prova.....	46
Figura 11 - Corpo de prova fixado nas garras do equipamento EMIC.....	47
Figura 12 - Permeabilidade ao vapor de água dos filmes comestíveis elaborados.....	49
Figura 13 - Solubilidade em água dos filmes comestíveis elaborados.....	50
Figura 14 - Permeabilidade ao O ₂ dos filmes comestíveis elaborados.....	52
Figura 15 - Permeabilidade ao CO ₂ dos filmes comestíveis elaborados.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos materiais utilizados na produção de filmes e revestimentos comestíveis.....	39
Tabela 2 - Meio seletivo/ diferencial, tempo e temperatura de incubação dos micro-organismos.....	42
Tabela 3 - Tensão máxima, tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade dos filmes comestíveis elaborados.....	54
Tabela 4 - Opacidade e cor dos filmes comestíveis elaborados.....	55
Tabela 5 - Valores de pH dos revestimentos comestíveis com e sem adição dos meios de cultura.....	57
Tabela 6 - Efeito antimicrobiano dos revestimentos comestíveis estudados contra as bactérias.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CDC	US Center for Disease Control and Prevention
ASM	American Society for Microbiology
OMS	Organização Mundial de Saúde
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
ASTM	American Society for Testing and Materials
QSA	Quitosana sem acetato
QCA	Quitosana com acetato
GSA	Galactomana sem acetato
GCA	Galactomana com acetato
QGSA	Quitosana- Galactomana sem acetato
QGCA	Quitosana- Galactomana com acetato
TM	Tensão máxima
TR	Tensão de ruptura
DR	Deformação na ruptura
ME	Módulo de elasticidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Filmes e revestimentos comestíveis	15
3.1.1 Materiais utilizados na elaboração de filmes/revestimentos comestíveis	17
3.1.1.1 <i>Lipídios</i>	17
3.1.1.2 <i>Hidrocolóides</i>	17
3.1.1.3 <i>Compósitos ou blendas</i>	24
3.1.1.4 <i>Aditivos usados em filmes e revestimentos comestíveis</i>	25
3.1.1.5 <i>Métodos de obtenção de filmes comestíveis</i>	27
3.2 Escolha do revestimento	27
3.2.1 Propriedades de transporte	28
3.2.1.1 <i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	28
3.2.1.2 <i>Permeabilidade ao O₂ e ao CO₂</i>	29
3.2.2 Propriedades mecânicas	30
3.2.3 Solubilidade em água	30
3.2.4 Opacidade e cor	31
3.3 Segurança microbiológica dos alimentos	32
3.3.1 Micro-organismos importantes em alimentos (patogênicos/ deteriorantes)	33
3.3.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	33
3.3.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.3.1.3 <i>Pseudomonas spp.</i>	34
3.3.1.4 <i>Salmonella spp.</i>	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda do consumidor por alimentos com maior qualidade e prolongado prazo de validade, em conjunto com políticas de gestão do meio ambiente têm intensificado a busca de novos métodos e tecnologias para a melhor conservação de alimentos (PEREDA *et al.*, 2011; VÁSCONEZ *et al.*, 2009).

Com o intuito de substituir parcialmente as embalagens plásticas, que por não serem biodegradáveis tem causado sérios problemas ambientais, as indústrias de alimentos e embalagens têm buscado alternativas. Alguns dos resíduos de embalagens poderiam ser reduzidos, por exemplo, se filmes e revestimentos comestíveis forem utilizados na indústria alimentar, devido à sua biodegradabilidade (AIDER, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2010; SCHOU *et al.*, 2005).

São exemplos de materiais utilizados para produzir filmes e revestimentos comestíveis e biodegradáveis os polissacarídeos, como quitosana, que tem apresentado atividade antimicrobiana contra alguns micro-organismos, e galactomanana, que é uma goma presente no endosperma de espécies de vegetais, particularmente as leguminosas (AIDER, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2010; VICENTE *et al.*, 2010).

Além de seus efeitos protetores, filmes e revestimentos comestíveis podem também atuar como transportadores de uma ampla gama de aditivos alimentares, incluindo antimicrobianos, como o acetato de sódio, que têm sido usado inclusive em pescado (VICENTE *et al.*, 2010; SALLAM, 2007 a e b).

Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de produzir filmes e revestimentos comestíveis à base de quitosana e galactomanana de *A. pavanina* L., com a incorporação de acetato de sódio, e caracterizá-los quanto às suas propriedades físicas e antimicrobianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir filmes e revestimentos comestíveis à base de quitosana e galactomanana de *A. pavanina* L., com a incorporação de acetato de sódio, e caracterizá-los quanto às suas propriedades físicas e antimicrobianas.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar filmes comestíveis à base de quitosana e galactomanana de *A. pavanina* L. e realizar sua caracterização física;
- Estudar a interação de diferentes componentes (quitosana/ galactomanana/ acetato de sódio) nos filmes/ revestimentos comestíveis elaborados;
- Verificar o efeito dos revestimentos comestíveis contra os micro-organismos (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1026 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 1132).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Filmes e revestimentos comestíveis

A embalagem desempenha um papel decisivo na melhoria da vida de prateleira de alimentos (BOURBON *et al.*, 2011), apresentando como funções a proteção do conteúdo em relação ao ambiente externo e manutenção da qualidade do produto durante o armazenamento. Além disso, o retardo da deterioração do produto, devido à embalagem, significa uma redução no desperdício de alimentos, o que implica num significativo benefício que deve ser considerado na cadeia de fornecimento de alimentos (LECETA *et al.*, 2013).

Por apresentarem excelentes propriedades termomecânicas, são largamente utilizados materiais de embalagem convencionais elaborados a partir de polímeros sintéticos à base de petróleo, tais como plásticos e seus derivados, e, embora sejam eficazes para a conservação de alimentos, estes materiais têm causado sérios problemas ambientais, mostrando-se na indústria alimentar como uma fonte de poluição e de preocupação social, pelo fato de não serem biodegradáveis (AIDER, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2010; SHARMIN *et al.*, 2012).

Tal problemática tem feito as indústrias de alimentos e embalagens se esforçarem com o propósito de reduzir a quantidade de materiais não biodegradáveis em embalagem de alimentos, exigindo assim a busca de alternativas que superem este grave problema, a fim de substituir parcialmente as embalagens plásticas. Alguns destes resíduos de embalagens poderiam ser reduzidos, por exemplo, se filmes e revestimentos comestíveis forem utilizados na indústria alimentar (AIDER, 2010; SCHOU *et al.*, 2005). Acredita-se que os biopolímeros constituem uma fonte alternativa promissora para o desenvolvimento de embalagens devido à sua biodegradabilidade (MA *et al.*, 2012; KHWALDIA, ARAB-TEHRANY, DESOBRY, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2010, TONGNUANCHAN, BENJAKUL, PRODPRAN, 2012).

Sendo o uso de filmes e revestimentos comestíveis como materiais de embalagens ainda uma das formas mais promissoras de manutenção da qualidade de alimentos, eles têm sido investigados pela capacidade de evitar a desidratação ou a absorção de água pelo alimento, a perda de aromas e por limitar a penetração do oxigênio para o material alimentar, reduzindo as reações de oxidação e, por estas razões, têm atraído atenção especial na conservação de alimentos, pois podem ser utilizados como materiais de revestimento para prolongar a vida de prateleira de diferentes produtos (AIDER, 2010; DHANAPAL *et al.*, 2012, GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2007).

Filmes e revestimentos comestíveis são finas camadas de materiais comestíveis aplicadas em produtos alimentares que desempenham um papel importante na sua distribuição, conservação e comercialização, pois protegem o produto contra danos mecânicos, físicos, químicos e de atividades microbiológicas (FALGUERA *et al.*, 2011). Na indústria de alimentos, apresentam algumas vantagens, tais como comestibilidade, aparência estética, biocompatibilidade com tecidos humanos, propriedades de barreira, sendo não-tóxico, não-poluente e de baixo custo (VÁSCONEZ *et al.*, 2009).

Revestimentos e filmes comestíveis são dois termos usados em embalagens de alimentos, às vezes sem qualquer distinção. No entanto, é importante distingui-los: o filme, também denominado de película, é uma camada fina pré-formada, preparada separadamente dos alimentos e mais tarde aplicada a ele, enquanto o revestimento (também conhecido como solução formadora de filme ou solução filmogênica) pode ser uma suspensão ou uma emulsão aplicada diretamente sobre a superfície do alimento, levando à posterior formação de um filme (FALGUERA *et al.*, 2011; VICENTE *et al.*, 2010).

Alguns autores têm utilizado o termo “biofilme” para se referirem à filme comestível biodegradável. Tal alusão é feita erroneamente. Devido a falhas nos procedimentos de higienização, resíduos acumulam-se em equipamentos e superfícies, tornando-se uma potencial fonte de contaminação. Os micro-organismos se aderem, interagem com a superfície e iniciam o crescimento celular. Colônias são originadas desta multiplicação e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, está formado o que se denomina biofilme (MACÊDO, 2000).

Além de seus efeitos protetores, filmes e revestimentos comestíveis podem também atuar como transportadores de uma ampla gama de aditivos alimentares, incluindo antioxidantes, agentes anti-escurecimento, antimicrobianos¹, corantes e sabores. Como resultado, a vida útil dos alimentos poderia ser estendida, o risco do crescimento de patógenos em superfícies de alimentos poderia ser reduzido e a qualidade sensorial reforçada (VICENTE *et al.*, 2010).

¹ O uso de antimicrobianos em filmes e revestimentos comestíveis pode ser mais eficiente do que a adição de agentes antimicrobianos diretamente no alimento, uma vez que estes podem seletivamente e gradualmente migrar do filme e revestimento para a superfície dos alimentos, mantendo assim altas concentrações (ELSABEE, ABDON, 2013).

3.1.1 Materiais utilizados na elaboração de filmes/revestimentos comestíveis

Os materiais utilizados para elaborar filmes e revestimentos comestíveis e biodegradáveis podem ser originários de diversas fontes naturais, que são em muitos casos resíduos da pesca, agricultura ou pecuária (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010). Esses materiais caracterizam-se pela sua complexidade estrutural e diversidade funcional e são classificados como lipídios e hidrocolóides (proteínas e polissacarídeos), com a adição de plastificantes e surfactantes (DHANAPAL *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2010; VICENTE *et al.*, 2010).

3.1.1.1 Lipídios

Normalmente, os compostos hidrofóbicos, tais como óleos essenciais, ácidos graxos e ceras, são incorporados a filmes à base de hidrocolóides para melhorar as suas propriedades de barreira à água (RUIZ-NAVAJAS *et al.*, 2013; TONGNUANCHAN, BENJAKUL, PRODPRAN, 2012). Existem desvantagens de empregar lipídios em materiais de embalagem comestível, pois podem conferir ao alimento sabor e textura de cera, superfície gordurosa e potencializar o desenvolvimento de ranço (JANJARASSKUL, KROCHTA, 2010).

3.1.1.2 Hidrocolóides

São polímeros hidrofílicos de origem vegetal, animal, microbiana ou de origem sintética, que geralmente contêm muitos grupos hidroxila e podem ser polieletrólitos (por exemplo, alginato, carragenana, carboximetilcelulose, goma arábica, pectina e goma de xantana). Todos os hidrocolóides utilizados são total ou parcialmente solúveis em água e são usados principalmente para aumentar a viscosidade da fase contínua (fase aquosa), ou seja, como agente de gelificação ou espessante. Eles também podem ser utilizados como agentes emulsionantes, devido ao seu efeito de estabilização de emulsões derivado de um aumento na viscosidade da fase aquosa da película comestível (DHANAPAL *et al.*, 2012; SCIARINI *et al.*, 2009).

a) Proteínas: como colágeno, gelatina, proteínas do leite e glúten do trigo, são heteropolímeros contendo uma variedade de aminoácidos, que podem ser submetidos a uma ampla gama de interações e de reações químicas. Filmes à base

de proteínas geralmente têm boas propriedades mecânicas, ópticas e são excelentes barreiras contra o transporte de oxigênio e dióxido de carbono, aromas e lipídios, porém possuem elevada permeabilidade ao vapor de água. Devido à natureza hidrofílica das proteínas, as propriedades de barreira e as mecânicas dos filmes à base deste polímero são comprometidas pela umidade (JANJARASSKUL, KROCHTA, 2010; TONGNUANCHAN, BENJAKUL, PRODPRAN, 2012).

b) Polissacarídeos: são polímeros naturais que dependendo da sua fonte podem ser neutros ou carregados. Estão envolvidos no metabolismo energético de plantas (amido) e animais (glicogênio), agindo também na função estrutural de células vegetais (celulose, pectina) ou no esqueleto de insetos e outros animais (quitina) (NELSON, COX, 2000). Os polissacarídeos usados na produção de filmes e revestimentos incluem: amido, alginatos, carragenatos, quitosana e gomas. Como fonte de gomas naturais existe, por exemplo, os extratos de algas marinhas (alginatos, ágar), as gomas de sementes (galactomananas) ou raízes (PINHEIRO *et al.*, 2010). Uma variedade de polissacarídeos e seus derivados têm sido testados para o uso potencial como embalagem comestível por serem abundantes, de baixo custo e de fácil manuseio. Os polissacarídeos apresentam boas propriedades de formação de filme, mecânicas e de barreira a gás, sendo também barreiras eficazes contra óleo e lipídios, mas oferecem pouca resistência à umidade, o que afeta suas propriedades funcionais, pois são hidrofílicos (BOURBON *et al.*, 2011; JANJARASSKUL, KROCHTA, 2010).

3.1.1.2.1 Quitosana

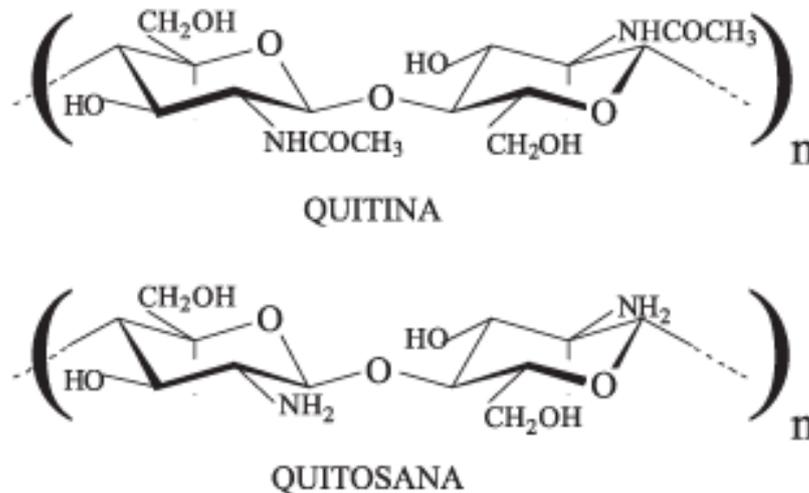
A quitina, que é o principal componente do exoesqueleto de artrópodes, como lagostas, camarões e caranguejos, tem sido extraída a partir de resíduos sólidos gerados devido ao processamento na indústria de pescado. Através do processo de desacetilação, a quitina pode ser convertida em um outro polissacarídeo denominado quitosana² (FIGURA 1) e, desta forma, a utilização de quitosana traria uma vantagem adicional por minimizar os

² A única diferença entre a quitosana e a quitina é a substituição do grupo acetoamino, na posição 2, pelo grupo amino (GONÇALVES, 2011).

resíduos sólidos gerados pela indústria pesqueira, além de ser economicamente viável (PINHEIRO *et al.*, 2010; ZIANE *et al.*, 2008).

A quitosana é o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza depois da celulose, conhecida por ser biodegradável, biofuncional, biocompatível e não-tóxica (ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012; DUTTA *et al.*, 2009). É insolúvel na maioria dos solventes, mas é solúvel em ácidos orgânicos diluídos, tais como ácido acético³, ácido fórmico, ácido succínico, ácido lático e ácido málico. Apresenta uso limitado devido à sua insolubilidade na água, alta viscosidade e tendência a coagular com proteínas a um pH elevado (RABEA *et al.*, 2003).

Figura 1 - Representação das estruturas primárias de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.



Fonte: Battisti, M. V., Campana-Filho, 2008.

Os materiais à base de quitosana podem ser utilizados para produzir filmes e revestimentos comestíveis devido às suas características viscoelásticas, dando origem a filmes resistentes, duradouros e flexíveis e a maioria das propriedades mecânicas de filmes de quitosana são comparáveis as de muitos polímeros comerciais (PINHEIRO *et al.*, 2010; RABEA *et al.*, 2003). Além disso, a quitosana traz algumas vantagens sobre outros polímeros utilizados como materiais de embalagem, devido ao seu comportamento antibacteriano e à sua capacidade quelante de minerais bivalentes (AIDER, 2010). Porém, os filmes de quitosana

³ O ácido acético tem sido frequentemente utilizado como solvente para a produção de filmes de quitosana, mas confere um forte aroma e sabor ácido aos alimentos (CASARIEGO *et al.*, 2008).

apresentam uma baixa permeabilidade a gases (CO_2 e O_2) e são altamente permeáveis ao vapor de água (BOURBON *et al.*, 2011).

Apesar do conveniente e universal uso de conservantes, os processadores de alimentos e os consumidores têm desejado reduzir o uso de produtos químicos sintéticos em conservação de alimentos. Por conseguinte, tem havido um interesse crescente na aplicação de agentes naturais como bio-conservantes (CAO *et al.*, 2012).

Filmes de quitosana têm sido utilizados com sucesso como material de embalagem para conservação da qualidade de uma variedade de alimentos, pois vários estudos mostraram que a quitosana é caracterizada por apresentar atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de micro-organismos, incluindo fungos, algas e algumas bactérias, podendo ser utilizada a fim de aumentar o tempo de armazenamento de produtos (RABEA *et al.*, 2003; AIDER, 2010; JAYATHILAKAN *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013).

A atividade antimicrobiana da quitosana varia consideravelmente com o tipo de quitosana, particularmente com o grau de desacetilação, o peso molecular, o organismo alvo e as condições do meio no qual é aplicada, especialmente o pH, a força iônica e a presença de solutos susceptíveis a reagir com a quitosana através da interação eletrostática e/ou ligação covalente, que podem bloquear totalmente a reatividade do grupo amina ativo, tendo demonstrado maior efeito bactericida contra bactérias Gram positivas (AIDER, 2010; ELSABEE, ABDU, 2013).

O grau de polimerização de sete unidades monoméricas, no mínimo, é necessário para obter efeito antibacteriano significativo. Frações de peso molecular muito baixo têm pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana. Também foi demonstrado que a quitosana altamente desacetilada apresentou atividade antimicrobiana maior do que a quitosana com maior proporção de grupos amino acetilados. A solubilidade da quitosana e a densidade de carga que permitem o aparecimento do efeito antimicrobiano é diretamente afetada pelo grau de desacetilação, pois o alto grau de desacetilação aumenta a solubilidade da quitosana e a densidade de carga. Estes dois fatores são importantes para a adesão da quitosana à célula bacteriana (AIDER, 2010).

A viscosidade das soluções contendo quitosana é afetada pelo grau de desacetilação, pelo peso molecular, pela concentração, pela força iônica, pelo pH e pela temperatura. Geralmente, à medida que a temperatura aumenta, a viscosidade da solução de quitosana diminui. O efeito do pH na viscosidade das soluções depende do ácido usado, o que pode afetar o filme ou revestimento resultante (RABEA *et al.*, 2003, NO *et al.*, 2007).

Devido ao seu caráter catiônico, a quitosana tem a particularidade de se ligar a parede celular bacteriana através de interação eletrostática e pode causar danos por perturbar o transporte de nutrientes para a célula. A quitosana tem o potencial de se ligar a muitos componentes de alimentos diferentes, tais como alginatos, pectinas, proteínas, polieletrólitos inorgânicos, tais como polifosfatos e espécies de íons carregados positivamente. Em matrizes alimentares complexas, a particularidade acima mencionada pode diminuir o efeito antimicrobiano da quitosana, sendo este fator uma boa indicação de que os resultados promissores obtidos *in vitro*, com sistemas modelo em tampões ou meios microbiológicos, não são necessariamente aplicáveis em sistemas alimentares reais, que são matrizes complexas (AIDER, 2010).

Tem sido demonstrado que a atividade antimicrobiana da quitosana e filmes à base de quitosana aumenta quando se diminui o pH. Os valores de pH baixos (até 5,5) aumentam a atividade antimicrobiana de quitosana devido à sua maior solubilidade e protonação no intervalo de pH ácido (AIDER, 2010).

Como teoria, tem-se sugerido que a carga positiva do grupo amina (NH_3^+) a valores de pH mais baixo do que o pKa ($\text{pH} < 6,3$), em que este grupo funcional carrega 50% da sua carga elétrica total, permite interações com a carga negativa das membranas celulares microbianas, um fenômeno que é suscetível de causar um vazamento de constituintes intracelulares. No entanto, mesmo sendo esta uma explicação bem reconhecida quanto ao efeito antimicrobiano da quitosana, não há evidência direta que demonstre este comportamento contra as bactérias (AIDER, 2010).

3.1.1.2.2 Galactomananas

Entre os vários tipos de polissacarídeos encontrados na natureza estão as galactomananas, também conhecidas como gomas. Quimicamente, são polissacarídeos constituídos por uma cadeia linear de unidades de manose unidas por ligações α -(1→4), ramificados por unidades de D-galactose unidas por ligações β -(1→6) (FIGURA 2). Presentes no endosperma de várias espécies de vegetais, particularmente em leguminosas, possuem diferentes funções, incluindo reserva de carboidratos. Estes hidrocolóides não são tóxicos e nem poluem durante a produção e a aplicação (JIANG *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2010).

A estrutura polimérica das galactomananas é principalmente influenciada pela proporção de unidades de manose/galactose, pela distribuição de resíduos de galactose na cadeia principal e pelo peso molecular, o que também difere uma galactomanana de outra e

causa variações reológicas, na solubilidade e em outras propriedades (AZERO, ANDRADE, 2002; FALGUERA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2007).

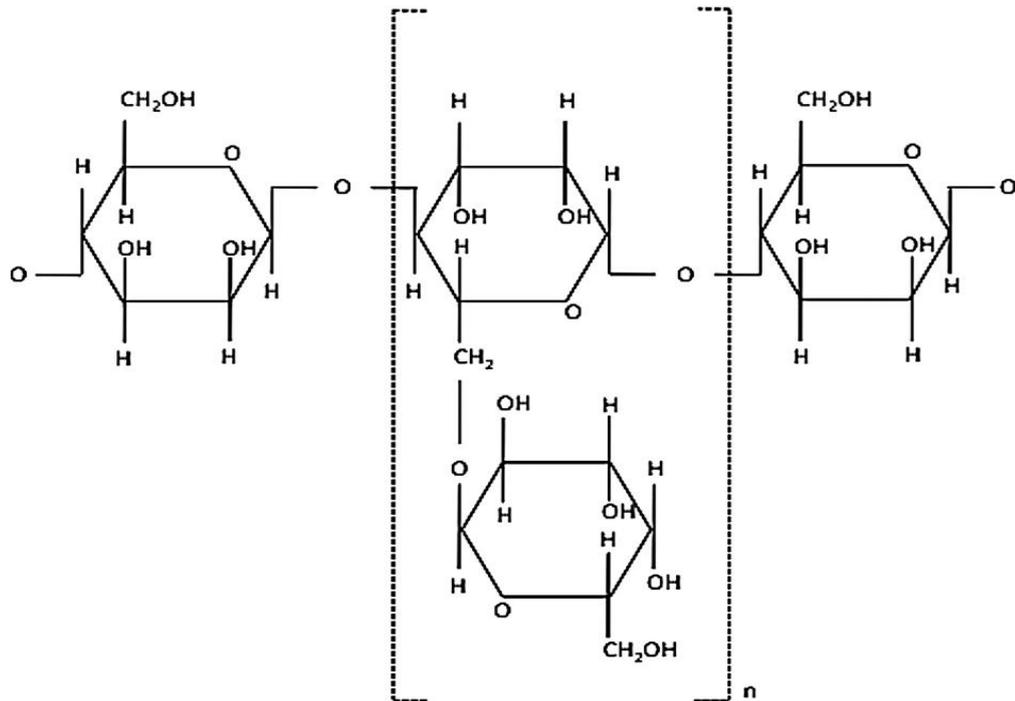
Em geral, galactomananas com valores mais elevados de galactose (G) são prontamente solúveis em H₂O, porém apresentam menor capacidade de formação de gel, enquanto galactomananas com superior conteúdo de manose (M) têm a tendência de interagir com polissacarídeos gelificantes. Fatores como o grau de maturação das sementes, o local de cultivo e as diferenças nos procedimentos de extração e purificação são conhecidos por desempenhar um papel determinante na relação M/G e podem justificar as diferenças encontradas na literatura (SRISVASTAVA, KAPOOR, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2009a). Galactomananas extraídas de *A. pavonina* L. por Cerqueira *et al.* 2009a apresentaram uma relação de manose/galactose de 1,35, sendo este valor inferior ao relatado por Tavares (1998), que foi de 1,8.

As galactomananas são ingredientes extremamente importantes na indústria alimentar, uma vez que resultam em soluções com elevada viscosidade, atuam como emulsificantes e interagem efetivamente com outros polissacarídeos para formar géis. Uma das maiores vantagens dos galactomananas é a sua capacidade de formar soluções bastante viscosas a baixas concentrações, sendo ligeiramente afetadas pelo pH, pela força iônica e pelo calor (CERQUEIRA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2010). O aquecimento de galactomananas a temperaturas superiores a 60 °C proporciona uma elevada viscosidade inicial, mas ocasiona uma baixa estabilidade (CERQUEIRA *et al.*, 2011).

Devido ao caráter neutro de suas moléculas, a viscosidade das soluções de galactomananas tende a permanecer constante ao longo de uma ampla faixa de pH (1-10,5) (CERQUEIRA *et al.*, 2011).

A Carolina (*Adenanthera pavonina* L.), espécie arbórea que apresenta até 15 metros de altura, pertencente à família das leguminosas, nativa da Ásia tropical e popularmente também conhecida como olho-de-dragão, é usada em reflorestamento e também constitui uma importante fonte de madeira. O cozimento das sementes e da madeira permite a sua utilização no tratamento de infecções pulmonares e também no tratamento da oftalmia crônica. Além disso, foi recentemente utilizada para desenvolver revestimentos de novas fontes de galactomananas (CERQUEIRA *et al.*, 2009a, FONSECA, PEREZ, 2003; LIMA *et al.*, 2010). As folhas e sementes de *Adenanthera pavonina* L. são mostradas na FIGURA 3.

Figura 2 - Estrutura molecular geral de galactomananas.



Fonte: Cerqueira *et al.*, 2011.

Figura 3 - Folhas e sementes de *Adenanthera pavonina* L.



Fonte: <http://www.jacarandamimoso.com.br/2012/08/pau-brasil-madeira-e-resina-uma-patria.html>.

Na obtenção do endosperma bruto de sementes quiescentes de *A. pavonina* L., ocorre uma etapa de secagem. Este processo pode determinar a cor do produto final. De acordo com Frank e Hofmann (2000), a combinação de uma atividade de água relativamente baixa e temperatura elevada pode favorecer a reação de Maillard, causando o escurecimento da galactomanana no caso de secagem realizada em estufa, por exemplo. No presente trabalho, a galactomanana de *A. pavonina* L. foi liofilizada, minimizando assim o escurecimento e a umidade durante o armazenamento a longo prazo.

3.1.1.3 Compósitos ou blendas

A mistura de biopolímeros ou blenda, isto é, a produção de filmes e revestimentos comestíveis combinando diferentes polissacarídeos, proteínas e lipídios, é um dos métodos úteis para a obtenção de novos materiais com propriedades funcionais desejadas e tem havido grande progresso científico e comercial nas aplicações realizadas na área de alimentos (RAO *et al.*, 2010).

Do ponto de vista tecnológico, as blendas são normalmente classificadas em compatíveis e incompatíveis. Diz-se que são compatíveis quando suas propriedades finais apresentam um comportamento aditivo ou sinérgico em relação aos valores apresentados pelos componentes individuais. Já um sistema incompatível é aquele que apresenta valores das propriedades inferiores aos apresentados pelos componentes em separado, tratando-se de um efeito antagônico (JACOB, 2006).

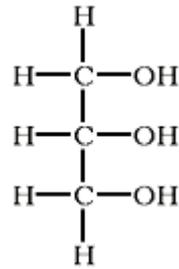
O objetivo de produzir filmes e revestimentos comestíveis a partir de blendas de biopolímeros é o de potencializar as diferentes características funcionais (propriedades) de cada composto, alcançando assim um efeito de sinergia entre eles. A partir de mudanças conformacionais e de interações químicas entre os dois polímeros, propriedades físicas e mecânicas podem ser melhoradas, em comparação com aqueles obtidos a partir de polímeros puros (CAMPOS, GERSCHENSON, FLORES, 2011). Isto não depende apenas dos compostos utilizados na matriz polimérica, mas também da compatibilidade destes (ELSABEE, ABDU, 2013; FALGUERA *et al.*, 2011; GALUS, LENART, 2013; MARTINS *et al.*, 2012).

3.1.1.4 Aditivos usados em filmes e revestimentos comestíveis

Os aditivos são incorporados à solução formadora de filme para melhorar as propriedades estruturais, mecânicas e de manuseio (JANJARASSKUL, KROCHTA, 2010). Alguns aditivos utilizados estão relacionados abaixo:

a) Plastificantes: são uma importante classe de compostos de baixo peso molecular (não-volátil) que são amplamente utilizados em indústrias de polímeros como aditivos. É de grande importância a compatibilidade entre o plastificante e o polímero e vários parâmetros podem indicar esse recurso, incluindo a polaridade, ligações de hidrogênio, constante dielétrica e parâmetros de solubilidade (VIEIRA *et al.*, 2011). Os mais comumente usados são os oligossacarídeos (sacarose), polióis (propilenoglicol, sorbitol, polietilenoglicol, glicerol) e água. Na verdade, a água é um diluente natural, que plastifica ou não plastifica alguns filmes dependendo da quantidade sorvida sobre a matriz de filmes (SKURTYYS *et al.*, 2012). O plastificante mais utilizado é o glicerol (FIGURA 4), por causa da sua maior estabilidade e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas hidrofílicas, em comparação com sorbitol, polietilenoglicol (PEG) e os açúcares (CAMPOS, GERSCHENSON, FLORES, 2011). Com o objetivo de aumentar a flexibilidade, diminuir a fragilidade e melhorar o seu manuseio, os plastificantes são adicionados em filmes de polissacarídeos, pois reduzem as forças intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias poliméricas, permitindo uma maior absorção de moléculas de água. Alguns dos filmes de polissacarídeos sem plastificantes na sua constituição tornam-se bastante quebradiços (BOURBON *et al.*, 2011; CERQUEIRA *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2010). Sabe-se que a adição de plastificante diminui a presença de fendas e poros, melhora a dispersão e reduz a permeabilidade a gases (LIMA *et al.*, 2010).

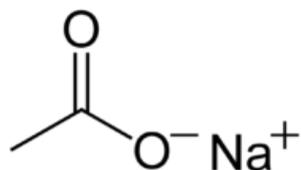
Figura 4 - Representação da estrutura química do glicerol.



Fonte: http://isite.lps.org/sputnam/biology/u2biochemistry/lipid_lab.htm.

b) Antimicrobianos: muitos agentes antimicrobianos têm sido utilizados na formulação de filmes e revestimentos comestíveis a fim de inibir a microbiota deteriorante e reduzir o risco de patógenos. Os antimicrobianos mais comumente usados são alguns polipeptídeos como a nisina, o sistema lactoperoxidase, alguns extratos vegetais e seus óleos essenciais e ácidos orgânicos, tais como acetato de sódio. O acetato de sódio, também chamado de etanoato de sódio, é um composto cristalino, de fórmula CH_3COONa (FIGURA 5), que além de controlar o crescimento microbiano, melhora atributos sensoriais e estende a vida de prateleira, sob diferentes condições de armazenamento, de vários sistemas de alimentos, incluindo pescado. Além de impedir o crescimento de bactérias de deterioração de alimentos, o acetato de sódio apresentou atividade antibacteriana contra vários patógenos de origem alimentar, incluindo *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Estes sais estão amplamente disponíveis, são econômicos e GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) (CAMPOS, GERSCHENSON, FLORES, 2011; SALLAM, 2007a). Além dos métodos tradicionais usados, tais como o armazenamento sob refrigeração e gelo, várias estratégias que envolvem o uso de ácidos orgânicos ou outros agentes antimicrobianos para estender a vida útil de pescado, por exemplo, têm sido propostas para inibir o crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (FERNANDEZ-SAIZ *et al.*, 2013).

Figura 5 - Representação da estrutura química do acetato de sódio.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Acetato_de_s%C3%B3dio.

3.1.1.5 Métodos de obtenção de filmes comestíveis

Os filmes comestíveis podem ser obtidos através de dois processos principais, isto é, pela evaporação do solvente (*casting*) e por extrusão. O processo de formação de filme mais frequentemente relatado na literatura científica é o método de *casting*, onde o biopolímero é dissolvido no solvente e homogeneizado com plastificantes e/ou aditivos, formando uma solução filmogênica. Esta solução é levada para secar, sobre um suporte, até a evaporação de todo o solvente. A escolha do suporte é importante para a obtenção de filmes, pois estes devem ser facilmente retirados, sem qualquer dano, depois que o solvente é evaporado. Essa evaporação também pode ser acelerada com a utilização de aquecedores, tais como estufas (DHANAPAL *et al.*, 2012; GENNADIOS, 2002; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2009; JESUS, 2009).

Quando se produzem filmes por *casting*, o controle da espessura depende largamente da viscosidade da solução homogênea. Esta técnica exige um controle rigoroso da forma do suporte e do nível da estufa para evitar diferenças na espessura provocadas por desníveis durante a secagem (TEIXEIRA, 2013).

Porém, para a produção em escala industrial, o método de *casting* apresenta algumas desvantagens, como o tempo de processo. Conforme Fishman *et al.* (2000), a utilização do processo de extrusão para a produção de filmes comestíveis em escala industrial seria uma solução para o problema, por apresentar como vantagens a rapidez e menores custos de produção. Outro fator a ser considerado é que este processo já é empregado na produção de embalagens sintéticas convencionais, como as de polietileno, polipropileno, polietileno tereftalato, dentre outras. Contudo, o método de extrusão pode afetar as propriedades do filme comestível devido às altas temperaturas empregadas, que são geralmente superiores a 80 °C (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2009).

3.2 Escolha do revestimento

Uma série de critérios devem ser considerados a fim de se escolher um revestimento adequado para um determinado tipo de produto alimentar (PINHEIRO *et al.*, 2010), tais como os descritos a seguir:

3.2.1 Propriedades de transporte

O potencial dos revestimentos e filmes comestíveis é essencialmente baseado numa combinação de propriedades tais como: barreira ao vapor de água, oxigênio, dióxido de carbono, sabores, aromas e cor que permitem a extensão do tempo de prateleira de alimentos. Muitas vezes essas propriedades dependem do polímero usado, dos constituintes adicionados, das condições de armazenamento, do tipo de aplicação, etc. Mediante a grande variedade de materiais existentes, torna-se necessário determinar as suas propriedades de transporte sempre que existam mudanças na formulação do revestimento ou filme (PINHEIRO *et al.*, 2010).

A permeabilidade é um fluxo, medido em estado estacionário, que descreve em que extensão um soluto se difunde, e em qual taxa este composto se difunde através do filme, estando a difusão relacionada com a concentração do soluto nos dois lados do filme. As propriedades de transporte mais estudadas são: a permeabilidade a vapor de água, a permeabilidade ao oxigênio e a permeabilidade ao dióxido de carbono (VICENTE *et al.*, 2010).

As propriedades de barreira em embalagens de alimentos são de grande importância. A interação entre o produto e o vapor de água, o oxigênio e o dióxido de carbono pode deteriorar a qualidade dos alimentos. Uma das principais funções dos filmes e revestimentos como embalagem para alimentos é o retardo da transferência de oxigênio, dióxido de carbono e umidade entre o alimento e o ambiente, devendo a permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio ser tão baixa quanto possível a fim de aumentar a vida útil do produto (LECETA, GUERRERO, CABA, 2013).

3.2.1.1 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água é a propriedade mais estudada com relação aos filmes comestíveis, devido à importância da água nas reações de deterioração de alimentos (CERQUEIRA *et al.*, 2009c), sendo um parâmetro chave para assegurar a qualidade sensorial dos alimentos, como também para verificar a capacidade que o filme apresenta contra desidratação ou a reidratação (MOHAMED *et al.*, 2013).

A permeabilidade ao vapor de água de filmes comestíveis tem sido estudada em detalhes, não só devido à sua importância ao permitir controlar a umidade presente nos

alimentos, mas também devido ao fato de ser calculada com exatidão (PINHEIRO *et al.*, 2010). Corresponde à quantidade de vapor de água (Δm) transferida através de um filme de área (A), de espessura l durante um tempo finito (Δt). O ΔP é a diferença de pressão de vapor em todo o filme. Os valores publicados de permeabilidade ao vapor de água para filmes comestíveis devem ser comparados com cautela por causa da diferença de plastificantes, temperatura, umidade relativa de gradiente, etc (SKURTYS *et al.*, 2012).

As propriedades hidrofílicas dos filmes de polissacarídeos são responsáveis pela sua elevada permeabilidade ao vapor de água. Esta hidrofilicidade é uma das desvantagens, já que muitas vezes é necessário um controle da transferência de vapor de água. No entanto, a baixa permeabilidade ao vapor de água pode ser benéfica em alguns casos, prevenindo a condensação do vapor de água, que pode ser uma possível origem da contaminação microbiana (PINHEIRO *et al.*, 2010).

A adição de outros compostos, tais como plastificantes, nos filmes de polissacarídeos têm sido extensamente estudados nos últimos anos, o que permite indicar como esses constituintes podem afetar a sua estrutura e conseqüentemente os valores de permeabilidade. Quando plastificantes não são adicionados, a existência de microfissuras que aumentam a permeabilidade dos filmes é observada, enquanto que, em outros casos, a sua adição leva ao aumento dos valores de permeabilidade a vapor de água devido à maior afinidade do sistema para atrair água, já que os plastificantes apresentam uma estrutura hidrofílica (PINHEIRO *et al.*, 2010).

3.2.1.2 Permeabilidade ao O_2 e ao CO_2

Quando um filme/ revestimento comestível é aplicado sobre os alimentos, a concentração de gás da superfície pode mudar durante o armazenamento. A composição química da superfície do alimento é dinâmica e mudanças ocorrem principalmente devido ao metabolismo dos alimentos, respiração microbiana, solubilidade do gás e permeabilidade do filme comestível. Os alimentos e o metabolismo microbiano são responsáveis pelo consumo de oxigênio e produção de CO_2 . A atividade microbiana pode afetar a composição de oxigênio e CO_2 , porém esta só é significativa quando o produto está no fim da vida útil e a deterioração é evidente (SKURTYS *et al.*, 2012).

O oxigênio é o fator chave que pode causar oxidação, induzindo a várias mudanças indesejáveis nas características dos alimentos, como alterações do odor, cor e sabor, bem como a deterioração de nutrientes. Por conseguinte, os filmes que fornecem uma

adequada barreira ao oxigênio podem ajudar na melhoria da qualidade e aumentar a vida útil dos alimentos (ELSABEE, ABDON, 2013).

Os filmes e revestimentos hidrofílicos, como aqueles de natureza polissacarídica, geralmente fornecem uma boa barreira à transmissão de oxigênio e dióxido de carbono, diferente do que ocorre com a permeabilidade ao vapor de água (VICENTE *et al.*, 2010).

3.2.2 Propriedades mecânicas

Filmes e revestimentos comestíveis com propriedades mecânicas satisfatórias e boa aparência são potenciais alternativas aos filmes sintéticos usados. Alguns testes aplicados nos filmes sintéticos comerciais são também usados para caracterizar os filmes comestíveis, como é o caso da resistência à tração (tensão máxima e tensão na ruptura), da deformação na ruptura e do módulo de Young, também conhecido como módulo de elasticidade. Nos últimos anos, têm surgido alguns estudos onde as propriedades mecânicas dos filmes comestíveis são caracterizadas e relacionadas com a estrutura do polímero, a concentração de plastificante, as condições de armazenamento e a incorporação de compostos (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Os filmes comestíveis apresentam baixos valores de resistência à tração, porém o aumento da concentração de polímero leva a um aumento dos valores de resistência à tração, levando a uma estrutura mais forte no filme. O valor de deformação pode variar muito dependendo dos materiais usados, tendo em alguns casos valores comparáveis com os valores obtidos para os filmes sintéticos comerciais. A presença e o aumento da concentração de plastificante levam ao aumento dos valores de deformação e à diminuição da resistência à tração. A presença de plastificante e as condições de umidade relativa são os fatores mais importantes que afetam as propriedades mecânicas de filmes comestíveis (PINHEIRO *et al.*, 2010; VICENTE *et al.*, 2010).

Em umidade relativa elevada, os filmes são flexíveis, porém frágeis, enquanto que se tornam quebradiços quando encontram-se em baixa umidade relativa (LAWTON, 1996). Neste caso, a água atua como plastificante, aumentando a mobilidade polimérica, o que leva ao decréscimo das interações intermoleculares, ocasionando a redução na força necessária para romper o filme e também, no aumento da deformação (FORSSELL *et al.*, 1999).

3.2.3 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes fornece informações sobre a sua integridade em sistemas aquosos e indica qual a sua resistência à água. Além disso, pode fornecer uma indicação sobre a biodegradabilidade do filme, que é uma característica importante se este for usado como embalagem (PINHEIRO *et al.*, 2010; VICENTE *et al.*, 2010).

Quando o objetivo é proporcionar a preservação de alimentos com grande quantidade de água e liberação de antimicrobianos, são necessários filmes de baixa solubilidade, pois um filme antimicrobiano com baixa resistência à água dissolver-se-á rapidamente, resultando em baixas concentrações do agente antimicrobiano na superfície do alimento, onde deveria agir. No entanto, em alguns casos, uma solubilidade moderada é desejada, podendo ser vantajosa, por exemplo, ao cozinhar alimentos revestidos, já que o filme será ingerido juntamente com o produto que é aquecido antes do consumo. Além da presença de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos na composição dos filmes, a estrutura dos polissacarídeos é um dos fatores que mais afeta a sua solubilidade em água (ELSABEE, ABDON, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2010; VICENTE *et al.*, 2010).

3.2.4 Opacidade e cor

Em alimentos, os aspectos sensoriais dos produtos são essenciais para garantir que a aplicação de tecnologias emergentes, tais como filmes e revestimentos comestíveis, torne-se bem sucedida. Assim, a cor é um dos mais importantes parâmetros que tem de ser controlado, pois influencia diretamente a aceitabilidade do consumidor. Filmes e revestimentos comestíveis devem ser tão incolores quanto possível para simular a aparência de filmes poliméricos comuns (FALGUERA *et al.*, 2011; GALUS, LENART, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2010).

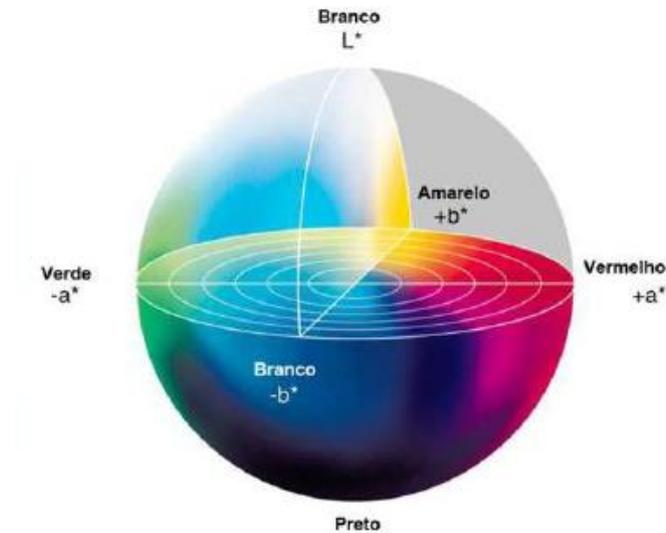
No sistema de cor CIELAB (ou CIE $L^* a^* b^*$), que define três coordenadas tridimensionais, L^* representa a luminosidade, que varia entre 0 (preto) e 100 (branco), o a^* e o b^* representam as coordenadas de cor, que indicam, respectivamente, o valor associado ao vermelho/verde e o valor associado ao amarelo/azul (FONSECA, 2012).

Os filmes comestíveis devem ser visualmente atraentes e não devem alterar a sua cor ao longo do tempo de armazenamento, para que a aceitação do produto no qual são aplicados não seja prejudicada (SOUZA *et al.*, 2009).

A avaliação da opacidade de um material demonstra sua maior ou menor transparência. Para o desenvolvimento de materiais feitos para serem usados como filmes ou revestimento de alimentos, o aumento da transparência tende a ser melhor, uma vez que o

objetivo é para manter as características originais do produto, tais como a cor (SOUZA *et al.*, 2009).

Figura 6 - Representação esquemática do modelo CIELAB.



Fonte: Fonseca, 2012.

A opacidade de um filme é um indicador da quantidade de luz que o atravessa. Quanto maior o valor de opacidade, menor será a quantidade de luz que atravessa o filme podendo esta barreira ser importante para controlar a incidência de luz nos produtos alimentares (PINHEIRO *et al.*, 2010). Para avaliação dos parâmetros de cor e opacidade, é recomendado que todas as amostras sejam avaliadas com a mesma data de fabricação, para que possíveis degradações do material não interfiram nos resultados (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2005).

3.3 Segurança microbiológica dos alimentos

A segurança microbiológica dos alimentos em geral é um aspecto de extrema importância na indústria de alimentos, podendo ser considerada como o principal fator que influencia na qualidade do produto, devido a efeitos que incidem sobre a vida de prateleira e especialmente pelos efeitos adversos que pode causar à saúde humana. Um dos principais riscos é a presença de micro-organismos patogênicos, que podem causar doenças humanas, diretamente, quando são consumidos em conjunto com o produto (infecção) ou quando produzem toxinas ou substâncias químicas no produto antes de ser consumidos (intoxicação) (JAMES, NGARMSAK, 2010).

3.3.1 Micro-organismos importantes em alimentos (patogênicos/ deteriorantes)

3.3.1.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, patogênica, de origem alimentar. Produtos como pescado são vulneráveis a conter níveis elevados de *L. monocytogenes*. A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* normalmente causa listeriose, uma doença que é uma ameaça significativa à saúde, caracterizando-se por causar septicemia⁴, infecção intra-uterina e meningite, quando acomete idosos e adultos com comprometimento no sistema imunológico. Em mulheres grávidas, a doença pode causar abortos espontâneos ou bebês natimortos. Nestes grupos, a taxa de mortalidade por listeriose é alta, normalmente 20 a 30% (ELSABEE, ABDU, 2013; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 200-?a; GIALAMAS *et al.*, 2010; HASTEIN *et al.*, 2006; ITURRIAGA, OLABARRIETA, MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, 2012).

Amplamente distribuída no ambiente (solo, água, fezes, esgotos e vegetação em decomposição e silagem), *L. monocytogenes* é considerado um agente zoonótico, tendo sido isolado a partir do trato intestinal de animais domésticos e seres humanos, de produtos crus e de ambientes onde alimentos são processados, particularmente em áreas úmidas e frias. Este micro-organismo pode também ser transmitido por aerossóis e pelas mãos dos trabalhadores (HASTEIN *et al.*, 2006; JAMES, NGARMSAK, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

Existe uma dificuldade no controle deste patógeno por este micro-organismo ser psicrotrófico⁵ e ser tolerante a valores baixos de pH e a certos conservantes, tais como o cloreto de sódio, que são inibitórios contra outros patógenos de alimentos (HEALTH CANADA, 2010; GIALAMAS *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

3.3.1.2 *Staphylococcus aureus*

⁴ Estado determinado pela presença e multiplicação de micro-organismos no sangue. Também se denomina infecção séptica (MICHAELIS, 2014).

⁵ Os micro-organismos psicrotróficos ou psicrotrófilos são um subgrupo dos mesófilos, pois se multiplicam em alimentos refrigerados, mas se desenvolvem melhor nas temperaturas da faixa mesófila. Os psicrófilos geralmente morrem à temperatura ambiente (SILVA *et al.*, 2010).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae*. A espécie *S. aureus* é a que está associada mais frequentemente às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. Quando este micro-organismo infecta o alimento, pode provocar intoxicações no consumidor se alguns fatores externos contribuírem para a pré-formação da toxina. A ingestão de uma dose menor que 1µg pode provocar os sintomas da intoxicação e esta quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* alcança valores acima de 10⁶ UFC/g de alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

S. aureus não é resistente ao calor, sendo facilmente destruído na pasteurização ou na cocção de alimentos; as toxinas, ao contrário, são termorresistentes. O reservatório de *S. aureus* são os seres humanos e os animais de sangue quente, sendo a cavidade nasal o principal habitat dos estafilococos no homem e, a partir deste foco, atingem epiderme e feridas como ar, solo, água, esgoto e qualquer superfície que tenha entrado em contato com o homem, ocorrendo nas vias nasais, garganta, pele e cabelos de 50% ou mais de pessoas saudáveis. Logo, os manipuladores são a fonte mais frequente de contaminação, embora equipamentos e superfícies também possam contaminar os alimentos. Os alimentos muito manipulados durante o preparo e/ou os que permanecem à temperatura ambiente depois da preparação são os que apresentam maior risco (SILVA *et al.*, 2010).

Os principais sintomas são náuseas, vômitos, câibras abdominais, diarreia e sudorese, podendo ainda ocorrer dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e raríssimas vezes febre quando a quantidade de toxina ingerida é grande. A doença não é fatal, porém indivíduos debilitados são um grupo de risco (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.3.1.3 *Pseudomonas spp.*

As espécies de *Pseudomonas spp.* são bastonetes Gram negativos, que não formam esporos. A temperatura ótima da maioria das espécies é cerca de 28 °C, mas algumas espécies crescem a 45 °C e várias são psicotróficas (crescem bem a 4 °C), podendo alterar alimentos sob refrigeração. Estes micro-organismos não toleram condições ácidas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A ocorrência de *Pseudomonas spp.* em alimentos é extremamente comum e está associada com a deterioração de carnes, leite, peixe e frutos do mar e ovos, por possuir intensa atividade metabólica, produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas. *Pseudomonas spp.* é um dos gêneros que fazem parte da microbiota natural do pescado, estando relacionados com a

deterioração destes alimentos por causar alterações sensoriais devido à formação de trimetilamina, ésteres, substâncias voláteis redutoras e outros compostos com aroma pronunciado, além do aparecimento de limosidade superficial nestes produtos (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GAVA, SILVA, FRIAS, 2008).

Conforme Silva *et al.* (2010), *Pseudomonas spp.* podem ser encontrados na água (doce, salobra ou salgada), no solo, na poeira em suspensão, no ar e nos vegetais. Raramente são encontrados na pele ou nos músculos de humanos e animais, mas são comuns na microbiota intestinal.

Várias espécies de *Pseudomonas spp.* são patógenos de plantas. *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um patógeno oportunista para humanos, estando associado com infecções em indivíduos com o sistema imunológico debilitado, como é o caso de pessoas que sofreram queimaduras (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GAVA, SILVA, FRIAS, 2008).

3.3.1.4 *Salmonella spp.*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram negativos não produtores de esporos que representam um grande risco para a saúde humana, por ser o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo⁶, inclusive no Brasil. Apresentam como principal habitat o trato intestinal de humanos e animais, porém estes micro-organismos encontram-se amplamente distribuídos na natureza. No ambiente, as principais fontes são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

O pH ótimo para multiplicação deste micro-organismo fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. A temperatura ideal para o crescimento de *Salmonella* é 35-37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

De acordo com Franco e Landgraf (2008), as doenças causadas por *Salmonella spp.* são divididas em três grupos: febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*, febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. As doenças geralmente são contraídas através do consumo

⁶ Estima-se que *Salmonella* cause 93,8 milhões de casos de gastroenterite e 155.000 mortes em todo o mundo a cada ano (TIGHE *et al.*, 2012).

de alimentos contaminados de origem animal, já tendo sido implicados em salmoneloses os pescados. Infecções por *Salmonella spp.* podem ser fatais, especialmente para crianças, idosos e pessoas com sistema imunológico comprometido. As salmoneloses caracterizam-se por sintomas que incluem diarreia, vômitos, febre e dores abdominais (NWIYI, ONYEABOR 2012; SILVA *et al.*, 2010).

Conforme a classificação taxonômica e a nomenclatura proposta por Ellermeier e Slauch (2005 *apud* SILVA *et al.*, 2010), adotadas pelo CDC (US Center for Disease Control and Prevention), pela ASM (American Society for Microbiology) e pela OMS (Organização Mundial de Saúde), o gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo a última subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Os quatro sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* são *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, grafando-se os nomes dos sorotipos com a primeira letra maiúscula e não em itálico, forma esta utilizada pela CDC, ASM e OMS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A quitosana de alto peso molecular, com grau de desacetilação de 90 %, foi obtida na POLYMAR Indústria e Comércio LTDA. O ácido lático, o nitrato de magnésio hexahidratado, o acetato de sódio e o glicerol (usado como plastificante) foram obtidos da VETEC Química Fina (Sigma-Aldrich).

4.2 Material vegetal

A galactomanana foi extraída do endosperma de sementes de *Adenanthera pavonina* L., que foram coletadas no campus da Universidade Federal do Ceará, com o propósito de explorar a biomassa existente.

4.2.1 Obtenção da goma endospermica de sementes de *Adenanthera pavonina* L.

Inicialmente, 100 g de sementes foram lavadas para retirar as sujidades (areia), submetidas à fervura em 400 mL de água destilada por 20 minutos e, depois disto, novamente lavadas (FIGURA 7). Visando aumentar o intumescimento, as sementes foram mantidas sob embebição em 400 mL de água destilada por mais 24 h, na geladeira (~ 8 °C). Em seguida, as sementes foram separadas nos seguintes componentes: tegumento, endosperma e embrião. Os endospermas brutos de sementes quiescentes⁷ de *Adenanthera pavonina* L. foram desidratados por liofilização. O material seco (denominado goma bruta) foi triturado em um multiprocessador, peneirado (30 mesh), homogeneizado e armazenado em frascos hermeticamente fechados até a sua posterior utilização.

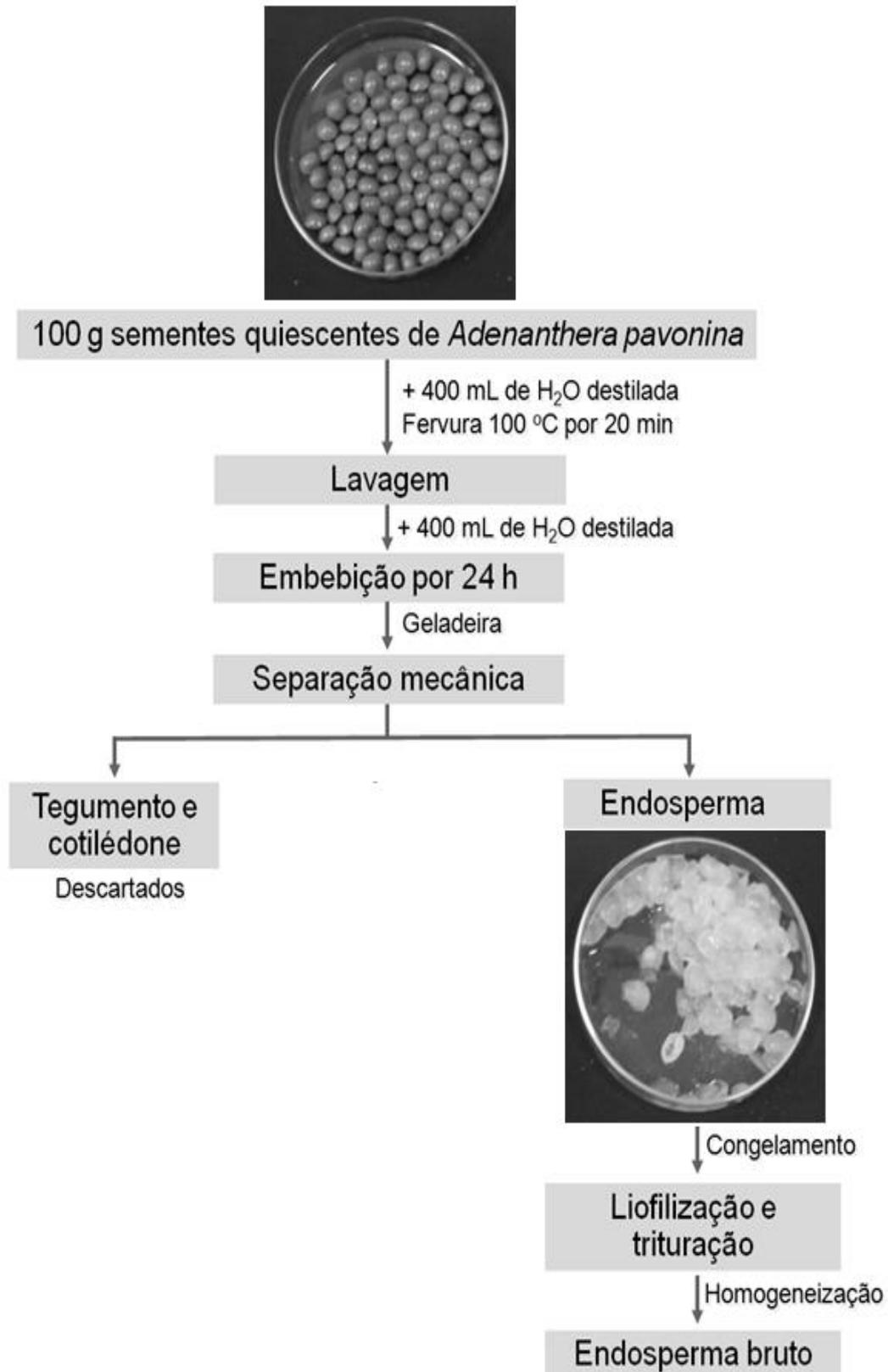
4.3 Material biológico

Foram utilizadas cepas padrão liofilizadas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1026) e

⁷ Neste estado de quiescência, a semente resiste a condições adversas do ambiente, podendo voltar à atividade metabólica (crescimento e desenvolvimento) quando as condições do ambiente forem favoráveis, ou seja, quando re-hidratadas (GUIMARÃES, DIAS, LOUREIRO, 2008).

Salmonella Enteritidis (ATCC 1132).

Figura 7 - Fluxograma para obtenção do endosperma bruto de sementes quiescentes de *A. pavonina* L.



Fonte: Própria do autor (2014).

4.4 Delineamento experimental

O efeito da adição de acetato de sódio aos revestimentos e filmes de quitosana e galactomanano foi avaliado no desempenho antimicrobiano e propriedades físicas. O experimento foi preparado usando um projeto fatorial 3^3 que incluía quitosana, galactomanana de *A. pavonina* L. e acetato de sódio (TABELA 1).

Tabela 1- Concentração dos materiais utilizados na produção de filmes e revestimentos comestíveis.

MATERIAL	CONCENTRAÇÃO (g/100 g de solução)
QUITOSANA	0,00 e 1,00
GALACTOMANANA	0,00 e 1,00
ACETATO DE SÓDIO	0,00 e 0,05

Fonte: Própria do autor (2014).

4.5. Preparação do revestimento comestível

4.5.1 Preparação do revestimento comestível de quitosana

Os revestimentos, assim como também os filmes comestíveis, foram preparados no Laboratório de Tecnologia do Pescado, da Universidade Federal do Ceará. A metodologia utilizada está de acordo com SOUZA *et al.* (2010), com adaptações e VÁSCONEZ *et al.* (2009). Quitosana 1 % (p/v) foi dissolvida em solução de ácido láctico a 1 % (v/v) em agitador magnético durante 1 hora, à temperatura ambiente (FIGURA 8). Glicerol⁸ foi adicionado a uma concentração de 0,6 % (v/v). Com o objetivo de estudar a influência da presença de acetato de sódio, outra solução de composição semelhante foi preparada, com adição de 0,05 % (p/v) de acetato de sódio. Estas soluções foram chamadas de solução de quitosana e solução quitosana-acetato de sódio, respectivamente.

⁸ Um estudo, realizado por Cerqueira *et al.*, 2009b, indicou que a adição de glicerol em valores inferiores a 0,5 % tornaria o filme muito frágil.

4.5.2 Preparação do revestimento comestível de galactomanana de *A. pavonina* L.

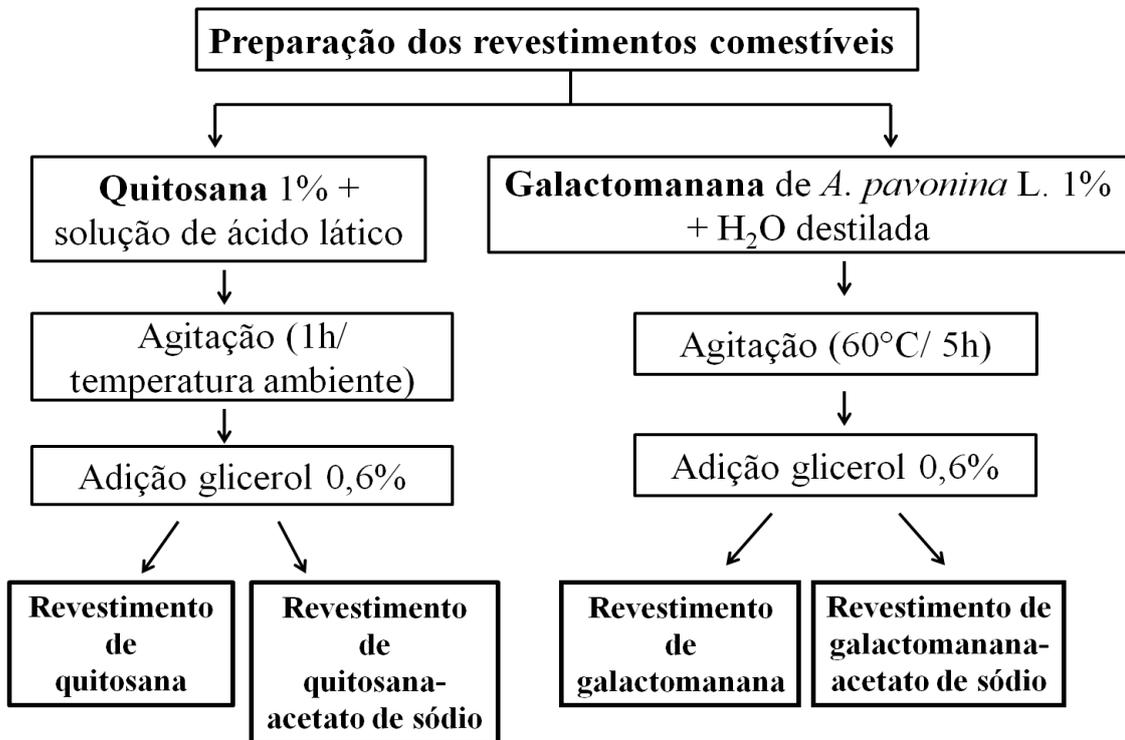
Conforme metodologia descrita por CERQUEIRA *et al.* (2009b), com adaptações e VÁSCONEZ *et al.*, 2009, a galactomanana de *A. pavonina* L. 1 % (p/v)⁹ foi diluída em água destilada, sendo homogeneizada em agitador magnético com aquecimento (60 °C) por 5 horas (FIGURA 8). Glicerol foi adicionado a uma concentração de 0,6 % (v/v). Com o objetivo de estudar a influência da presença de acetato de sódio, outra solução de composição semelhante foi preparada, com adição de 0,05 % (p/v) de acetato de sódio. Estas soluções foram chamadas de solução de galactomanana e solução galactomanana-acetato de sódio, respectivamente.

4.5.3 Preparação das blendas comestíveis

As blendas comestíveis foram obtidas pela adição da solução de galactomanana de *A. pavonina* L. 1 % a solução de quitosana-ácido láctico 1 %, com glicerol (FIGURA 9). As misturas foram homogeneizadas usando agitador magnético. As soluções preparadas foram chamadas de blendas de quitosana-galactomanana e, quando o acetato de sódio foi adicionado, de blendas de quitosana-galactomanana-acetato de sódio (VÁSCONEZ *et al.*, 2009).

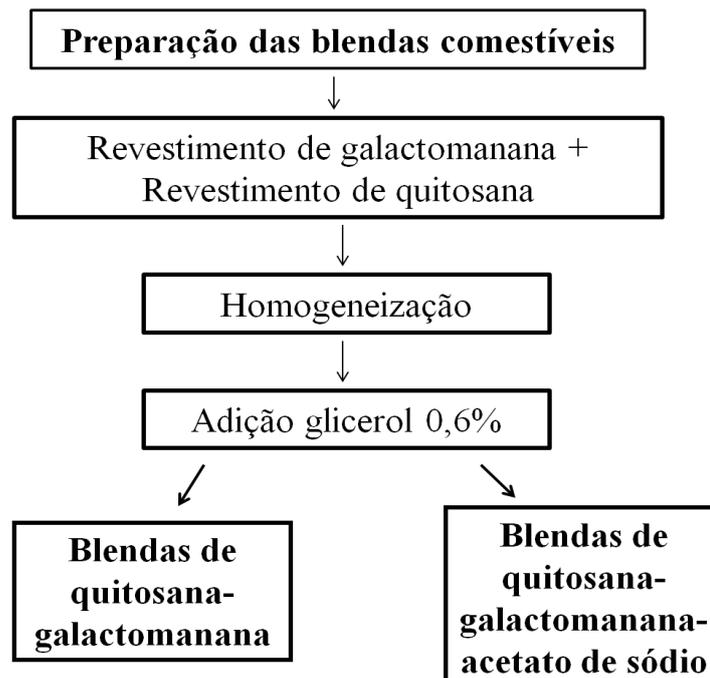
⁹ Conforme Cerqueira *et al.*, 2009b, a dissolução de galactomanana em concentração acima de 1,5% (p/v) é extremamente difícil.

Figura 8 – Fluxograma de preparação dos revestimentos comestíveis de quitosana e galactomanana de *A. pavonina* L.



Fonte: Própria do autor (2014).

Figura 9 – Fluxograma de preparação das blendas comestíveis de quitosana e galactomanana de *A. pavonina* L.



Fonte: Própria do autor (2014).

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis

4.6.1 Preparo dos inóculos

As cepas foram submetidas ao protocolo conforme indicação do fabricante Microbiologics.

1. A partir de um cultivo de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis* em ágar tripticase de soja (TSA/ Difco) e de *L. monocytogenes* em ágar tripticase de soja-extrato de levedura (TSA-YE/ Difco), de 24 horas de incubação a 35 °C, foi selecionada uma colônia bem isolada de cada micro-organismo, de tamanho padronizado (*L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*: 1 mm; *S. aureus*: 2 mm; *P. aeruginosa*: 4 mm). *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis* foram transferidos para tubos contendo 5 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) e *L. monocytogenes* foi inoculada em tubo contendo 5 mL de caldo tripticase de soja (TSB/ Difco);
2. As culturas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para obtenção de uma concentração final em torno de 10⁸ UFC/mL para *L. monocytogenes* e 10⁹ UFC/mL para os demais micro-organismos¹⁰;
3. As concentrações dos inóculos foram ajustadas com água peptonada 0,1% (Difco) fazendo-se diluições até 10⁵ UFC/mL;
4. As concentrações foram confirmadas, após incubação, pela contagem de colônias viáveis em meios seletivos/ diferenciais para cada micro-organismo (TABELA 2):

Tabela 2 - Meio seletivo/ diferencial, tempo e temperatura de incubação dos micro-organismos.

MICRO-ORGANISMO	MEIO SELETIVO/ DIFERENCIAL	INCUBAÇÃO
<i>L. monocytogenes</i>	PALCAM Agar Base	35 °C/ 48 horas
<i>S. aureus</i>	Ágar Baird-Parker (BP)	35 °C/ 48 horas
<i>S. Enteritidis</i>	Ágar entérico de Hecktoen (HE)	35 °C/ 24 horas
<i>P. aeruginosa</i>	Pseudomonas Agar Base (PAB)	25 °C/ 24 horas

Fonte: Própria do autor (2014).

¹⁰ Este tipo de crescimento foi padronizado após a realização de testes preliminares.

4.6.2 Atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis

A determinação da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis contra os micro-organismos foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, em dias distintos e em duplicata, utilizando-se métodos de diluição descritos por Kim, Marshall e Wei, 1995 (com modificações).

- a) Em tubos de ensaio contendo 3,95 mL de caldo tripticase de soja (TSB/ Difco) estéril, foi adicionada uma alíquota de 50 μ L da suspensão bacteriana¹¹ em concentração de 10^5 UFC/ mL. Depois disto, adicionou-se 1,0 mL da solução de revestimento;
- b) Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 horas sob agitação (200 rpm), utilizando-se uma incubadora de bancada com agitação (CT712/ Cientec);
- c) Após o período de incubação, foram inoculados 100 μ L da cultura em placas com ágar contendo meios seletivos/ diferenciais para cada microrganismo, distribuindo-se tal conteúdo com o auxílio de alça de Drigalski (spread plate). As placas foram incubadas de acordo com o tempo e a temperatura descritos anteriormente (TABELA 2), sendo posteriormente analisadas visualmente para verificar se houve crescimento bacteriano, expressando-se o resultado como: (+): presença ou (-) ausência de micro-organismos.
- d) Foram realizados os seguintes controles:
 - meio de cultura + acetato de sódio;
 - meio de cultura + acetato de sódio + inóculo;
 - controle positivo (meio de cultura + inóculo).
- e) O pH dos revestimentos e o pH dos revestimentos + meio de cultura foram determinados através de leitura direta, em potenciômetro calibrado previamente com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

4.7 Preparação de filmes comestíveis

Os filmes comestíveis foram produzidos através da técnica de *casting* (ou evaporação do solvente), conforme SOUZA *et al.* (2010), com adaptações: 28 mL de cada revestimento (quitosana, quitosana-acetato de sódio, galactomanana, galactomanana-acetato

¹¹ Segundo Health Canada (2010), o volume de inóculo recomendado para avaliação de agentes antimicrobianos é até 1% do volume total.

de sódio, quitosana-galactomanana e quitosana-galactomanana-acetato de sódio) foram dispensados sobre a superfície de placas de Petri de 9 cm de diâmetro e secos em uma estufa de temperatura controlada a 35 °C por 16 h. Todas as amostras foram acondicionadas dentro de dessecadores contendo sílica gel, que forneceram uma umidade relativa de 10%¹² a 25 °C.

4.8 Propriedades físicas dos filmes comestíveis

4.8.1. Permeabilidade ao vapor de água

A medição da permeabilidade do vapor de água (PVA) foi determinada por gravimetria baseada no método da ASTM-D-3985-02 (2002) com modificações. O filme a ser testado foi selado no topo de uma célula de permeação contendo água destilada (100 % UR; 2337 Pa, pressão de vapor a 20 °C), colocado num dessecador a 25 °C e 10 % UR contendo sílica gel. A água transferida através do filme e adsorvido pelo dessecante foi determinada a partir da perda de peso da célula de permeação. As células foram pesadas em intervalos de 2 horas durante 8 horas. Condições de pressão de água em estado estacionário e uniforme foram assumidas, mantendo a circulação de ar constante fora da célula de teste usando um ventilador em miniatura dentro do dessecador. A inclinação da curva que representa a perda de peso em função do tempo foi obtida por regressão linear. A medida (PVA) dos filmes foi determinada conforme Equação 1:

$$PVA = \frac{(TTVA \times L)}{\Delta P} \quad (1)$$

onde TTVA é a taxa de transmissão de vapor de água ($\text{g} \times \text{m}^{-2}\text{h}^{-1}$) medida através do filme (calculado a partir da inclinação da curva dividida pela área do filme), L é a espessura média do filme (m) e ΔP é a diferença de pressão parcial de vapor da água (atm) nos dois lados do filme. Para cada tipo de filme foram realizadas três repetições. A espessura de cada amostra foi medida utilizando-se um micrômetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil), em três diferentes posições de cada amostra avaliada. Os valores médios foram utilizados para calcular a permeabilidade ao vapor de água.

¹² Este é o teor de umidade relativa desejável em um filme seco, de acordo com Skurtys *et al.*, 2012.

4.8.2 Permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono

As análises de permeabilidade ao oxigênio (O₂P) e permeabilidade ao dióxido de carbono (CO₂P) foram realizadas no Laboratório de Indústria e Processos, na Universidade do Minho, Portugal. Tais determinações foram feitas com base no método da ASTM-D-3985-02 (2002). Os filmes foram selados entre duas câmaras, tendo cada um dois canais. Na parte inferior da câmara O₂ (ou CO₂) foi fornecida uma taxa de fluxo controlado para manter pressão constante no compartimento. A outra câmara foi purificada por um fluxo de nitrogênio, também controlado. Nitrogênio agiu como um transportador de O₂ (ou CO₂). No caso da medição da O₂P, o fluxo deixado da câmara foi conectado a um sensor de O₂ que mediu a concentração de O₂ em fluxo on-line. No caso de CO₂P, o fluxo deixado da câmara foi coletado em uma seringa para a quantificação de CO₂. Para determinar a concentração de CO₂, 1 mL da amostra foi injetada em um cromatógrafo a gás a 110 °C com uma coluna Porapak Q 80/ 100 mesh 2 m x 1/8" x 2 mm SS, usando um detector de ionização de chama (FID) a 110 °C. Hélio 23 mL min⁻¹ foi usado como gás de transporte. Uma mistura padrão contendo 10 % de CO₂, 20% de O₂ e 70 % de N₂ foi usada para a calibração. Os fluxos das duas câmaras foram conectados a um manômetro para garantir a igualdade de pressões (ambos em 1 atm) entre os dois compartimentos. Como a permeabilidade do O₂ (e CO₂) foi realizada continuamente pelo fluxo de nitrogênio, foi considerada que a pressão parcial de O₂ (e CO₂) no compartimento superior é nulo. Foram feitas três repetições para cada amostra, em cada caso (O₂P e CO₂P).

4.8.3 Solubilidade em água dos filmes comestíveis

A solubilidade é definida como a porcentagem da matéria seca do filme após 24 h de imersão em água destilada (GONTARD, GUILBERT, CUQ, 1992). A matéria seca inicial dos filmes foi determinada por secagem de discos com 2 cm de diâmetro em uma estufa, a 100 °C, durante 24 h. Após este período, os discos foram pesados e imersos em 50 mL de água destilada, com agitação periódica, por 24 h a 25 °C. Finalmente, os filmes foram retirados e secos (100 °C por 24 h) para determinar a matéria seca final.

A solubilidade foi expressa como sendo a diferença entre a matéria seca inicial e final em relação à matéria seca inicial, conforme Equação 2. Os testes foram realizados em triplicata.

$$\text{SOL} = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

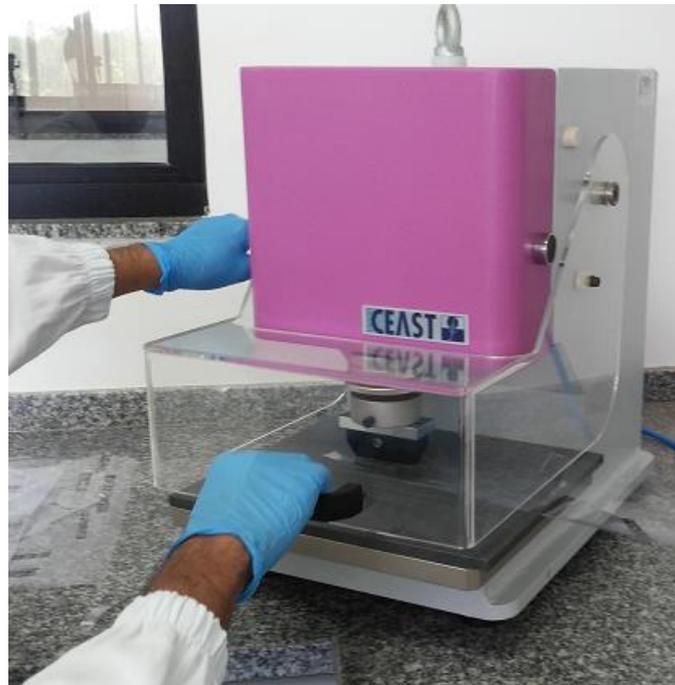
4.8.4 Caracterização mecânica dos filmes comestíveis

Foram realizados ensaios de tração para a caracterização mecânica dos filmes (tensão máxima, tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade), no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da EMBRAPA Agroindústria Tropical, Fortaleza - CE.

4.8.4.1 Obtenção dos corpos de prova

Os corpos de prova utilizados para os ensaios mecânicos foram cortados por uma prensa estampadora pneumática marca CEAST (FIGURA 10), cuja pressão de operação utilizada foi 7 bar.

Figura 10 - Prensa estampadora pneumática usada para corte dos corpos de prova.



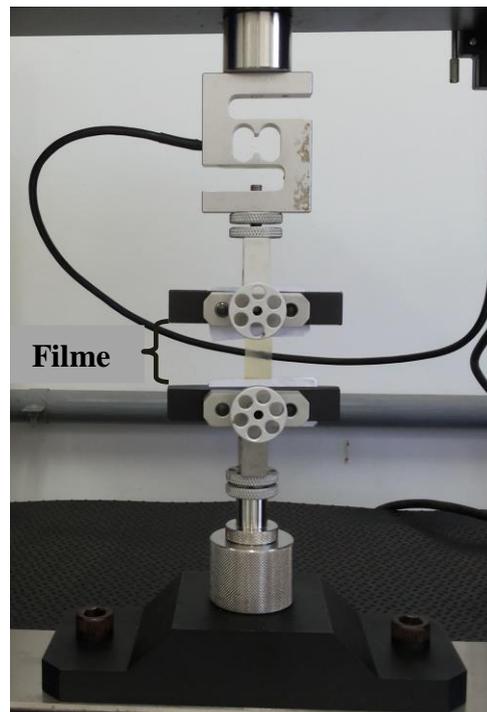
Fonte: Própria do autor (2014).

4.8.4.2 Ensaio de tração

Antes da realização dos testes, os filmes foram acondicionados em um dessecador contendo nitrato de magnésio hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) para mantê-los em um

ambiente com umidade relativa e temperatura em torno, respectivamente, de $50 \pm 5 \%$ e $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por no mínimo 40 horas. Nos ensaios de tração, os corpos de prova com comprimento de 63,24 mm e largura de 12,86 mm foram afixados por meio de garras acopladas a uma travessa móvel da Máquina Universal de Ensaio, seguindo as orientações da ASTM-D-882-91 (1991). A taxa de deformação de tração é controlada pelo mecanismo de direcionamento, enquanto a tensão de tração sustentada pela amostra é registrada pela célula de carga, ambos acoplados à travessa fixa. O equipamento utilizado para análise foi o EMIC (Máquina Universal de Ensaio, modelo DL-3000), com uma célula de carga de 100 N. A velocidade de tracionamento utilizada foi de 50 mm/min, sendo a distância inicial entre as garras de 30 mm. A FIGURA 11 mostra a forma de fixação do corpo de prova nas garras do equipamento.

Figura 11 - Corpo de prova fixado nas garras do equipamento EMIC.



Fonte: Própria do autor (2014).

A tensão máxima foi expressa em MPa e calculada dividindo a força máxima (N) necessária para romper o corpo de prova pela área inicial transversal (m^2) da amostra. A tensão de ruptura (MPa) é a resistência oferecida pelo material no ponto da ruptura. A deformação na ruptura foi calculada como sendo a razão entre o comprimento final no ponto de ruptura da amostra pelo comprimento inicial da amostra (30 mm) e expressa em porcentagem. O módulo de Young ou módulo de elasticidade, que é um indicador da rigidez do material, também foi determinado. Os ensaios foram realizados cinco vezes para cada amostra.

4.9 Opacidade e cor

A cor dos filmes foi determinada com um colorímetro Minolta (CR 400, Minolta, Japão). Uma placa de cor branca foi usada como um padrão de calibração e como uma base para as medições de cor dos filmes. Os valores de L^* , a^* e b^* de cada filme foram avaliados pelas medidas de refletância (MARTINS *et al.*, 2012).

A opacidade dos filmes foi determinada usando um medidor de cor e de acordo com a escala de cores Hunterlab. Seguindo este método, a opacidade (Y) será calculada como a razão entre a opacidade de cada amostra sobre o padrão preto (Y_b) e a opacidade de cada amostra no padrão branco (Y_w). De três repetições de cada amostra de filme foram determinados aleatoriamente três Y_b e Y_w e a média deles foram usadas para os cálculos. Os resultados foram expressos em porcentagem, conforme Equação 3 (CERQUEIRA *et al.*, 2010).

$$\text{Opacidade (Y\%)} = \frac{Y_b}{Y_w} \times 100 \quad (3)$$

4.9 Análise estatística

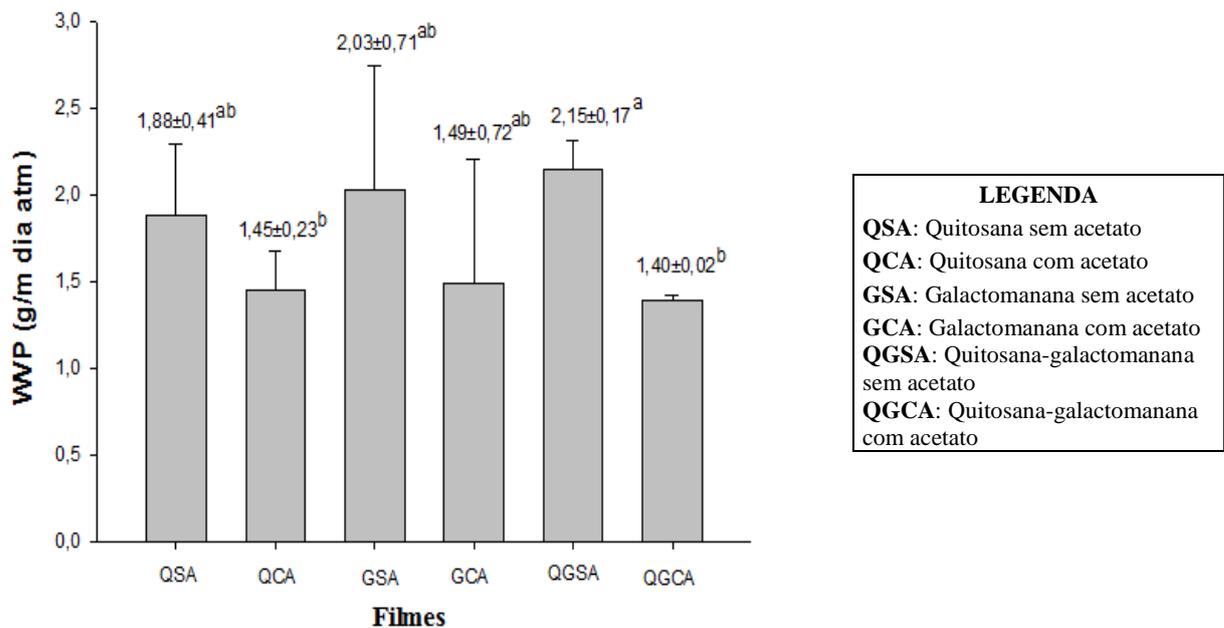
Os resultados foram avaliados usando a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 %. A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaStat (versão 3.5).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Permeabilidade ao vapor de água

A FIGURA 12 apresenta os valores obtidos para a permeabilidade ao vapor de água dos filmes comestíveis elaborados.

Figura 12 - Permeabilidade ao vapor de água dos filmes comestíveis.



Fonte: Própria do autor (2014).

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Espessura (mm) - QSA: $0,132 \pm 0,031$; QCA: $0,131 \pm 0,015$; GSA: $0,115 \pm 0,039$; GCA: $0,092 \pm 0,048$; QGSA: $0,176 \pm 0,013$; QGCA: $0,124 \pm 0,003$.

A blenda sem a adição de acetato de sódio apresentou maior permeabilidade ao vapor de água, diferindo significativamente da blenda em que foi acrescentado o acetato de sódio ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que houve uma redução de 34,9 % da permeabilidade do filme ao vapor de água com a incorporação de acetato de sódio à blenda. Esta, além de exibir um menor resultado de permeabilidade, não diferiu estatisticamente dos demais filmes ($p > 0,05$). Um dos maiores propósitos dos filmes comestíveis é bloquear a transferência de umidade entre o alimento e o ambiente circundante. Por isto, a permeabilidade ao vapor de água deve ser tão baixa quanto possível (BOURBON *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2012).

Filmes de quitosana têm permeabilidade relativamente alta ao vapor de água (VARGAS *et al.*, 2009), resultante de sua hidrofília (BUTLER *et al.*, 1996; BOURBON *et al.*,

2011). Dentre os filmes em que houve a incorporação de acetato de sódio, o filme à base de galactomanana exibiu maior permeabilidade ao vapor de água ($p>0,05$).

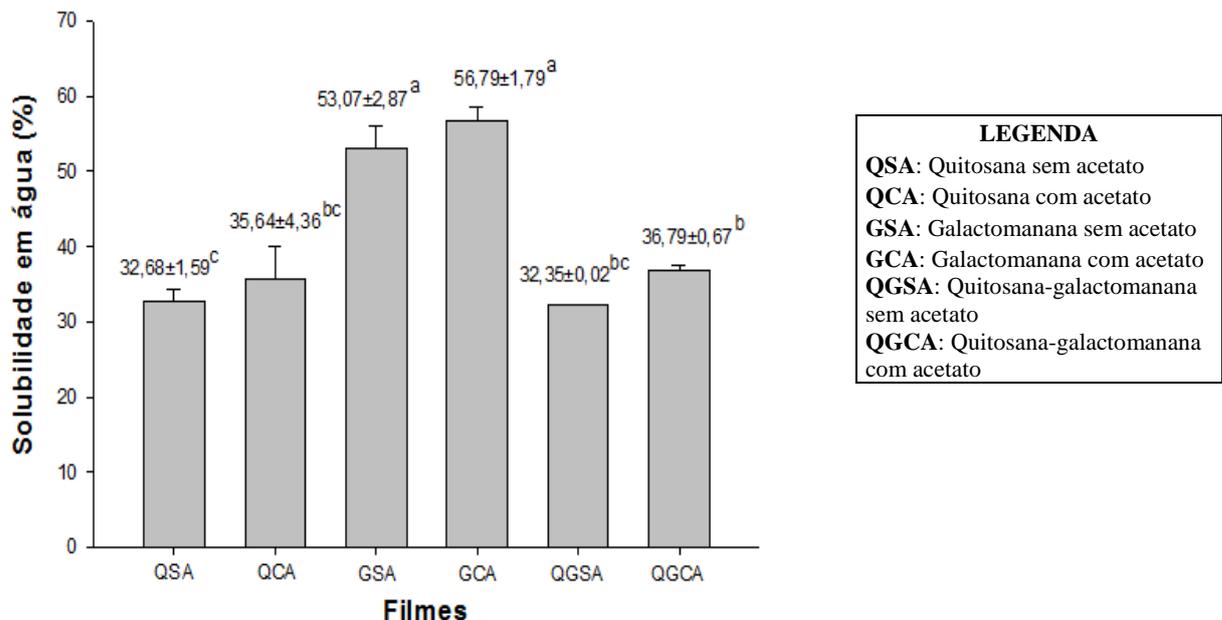
O valor de permeabilidade ao vapor de água do filme à base de quitosana sem a incorporação de acetato de sódio foi maior ($1,88 \pm 0,41$ g/m.dia.atm) que o valor encontrado por Souza *et al.* (2009) ($0,3228 \pm 0,027$ g/m.dia.atm).

A permeabilidade ao vapor de água de filmes preparados a partir de biopolímeros depende da espessura do filme (PEREDA *et al.*, 2011). O controle da espessura de filmes é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting* (SOBRAL, 2000). Foi observado o aumento da taxa de permeabilidade ao vapor de água dos filmes com o aumento da espessura, indicando uma afinidade do filme à água que poderia ser atribuída aos compostos hidrofílicos (SKURTYYS *et al.*, 2012), contrariando CUQ *et al.* (1996), que afirmam que, quanto maior a espessura, menor a taxa de permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

5.2 Solubilidade em água

A FIGURA 13 apresenta os valores obtidos para a solubilidade em água dos filmes comestíveis elaborados.

Figura 13 - Solubilidade em água dos filmes comestíveis elaborados.



Fonte: Própria do autor (2014).

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($p>0,05$).

A solubilidade dos filmes em água é uma medida de sua resistência à água, sendo este também um fator importante, que determina a biodegradabilidade de filmes comestíveis quando estes são utilizados como materiais de embalagem (MARTINS, CERQUEIRA, VICENTE, 2012).

Pode-se observar que a presença de quitosana reduziu a solubilidade em água dos filmes comestíveis em torno de 37,5 %. Esse fato pode ser atribuído à fraca solubilidade de quitosana em pH neutro, como água (RABEA *et al.*, 2003; FERNANDEZ-SAIZ *et al.*, 2010; FENG, 2012). Tal resultado já era esperado, visto que a galactomanana é solúvel em água, enquanto a quitosana é solúvel em ácidos orgânicos diluídos.

De acordo com Vásconez *et al.* (2009), a hidrofobia da quitosana pode ser responsável pela existência de uma menor interação entre a matriz do filme e a água. De acordo com SOUZA *et al.* (2009), a solubilidade dos filmes de quitosana está relacionada à cristalinidade da amostra, onde a fraca solubilidade da quitosana é atribuída à sua estrutura parcialmente cristalina. Filmes que exibem baixa solubilidade em água são necessários para proteger alimentos com alta atividade da água, onde podemos citar como exemplo o pescado.

O valor da solubilidade em água do filme de quitosana ($32,68 \pm 1,59$ %) é menor que o valor encontrado por Bourbon *et al.* (2011) ($42,05 \pm 3,46$ %). A solubilidade em água dos filmes à base de galactomanana da *A. pavonina* L. diferiu significativamente dos demais filmes produzidos ($p < 0,05$) e a incorporação de acetato de sódio não os fez diferirem entre si.

5.3 Permeabilidade ao O₂

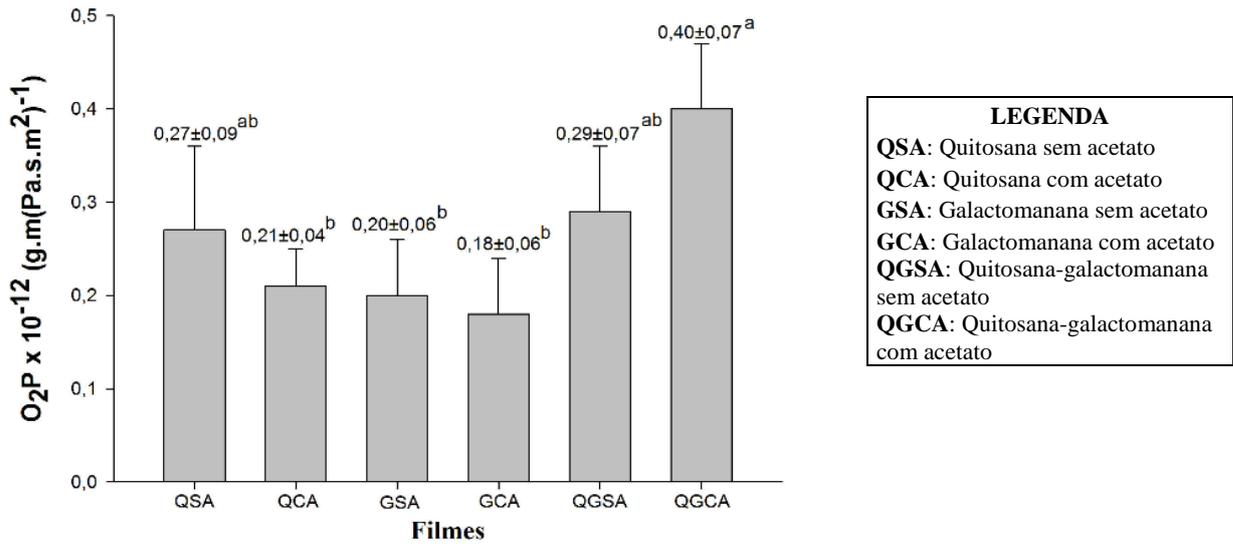
A FIGURA 14 apresenta os valores obtidos para a permeabilidade ao oxigênio (O₂) dos filmes comestíveis elaborados.

Os filmes à base apenas de galactomanana tiveram sua permeabilidade reduzida em 10 % com a incorporação de 0,05 % de acetato de sódio.

O valor de permeabilidade ao oxigênio da blenda aumentou 37 % com a incorporação de acetato de sódio ($p > 0,05$) e diferiu significativamente dos filmes que continham apenas galactomanana de *A. pavonina* L. e do filme de quitosana em que foi adicionado acetato de sódio ($p < 0,05$).

Butler *et al.* (1996) relataram que filmes de quitosana são altamente impermeáveis ao oxigênio. Em estudos que avaliaram a permeabilidade ao O₂ de filmes de quitosana, foram obtidos os seguintes resultados: $10,60 \pm 0,42 \times 10^{-16}$ (g.m (Pa.s.m²)⁻¹) e $5,17 \times 10^{-14} \pm 4,06 \times 10^{-15}$ (g.m (Pa.s.m²)⁻¹), por Souza *et al.* (2009) e Bourbon *et al.* (2011), respectivamente.

Figura 14 - Permeabilidade ao O₂ dos filmes comestíveis elaborados.



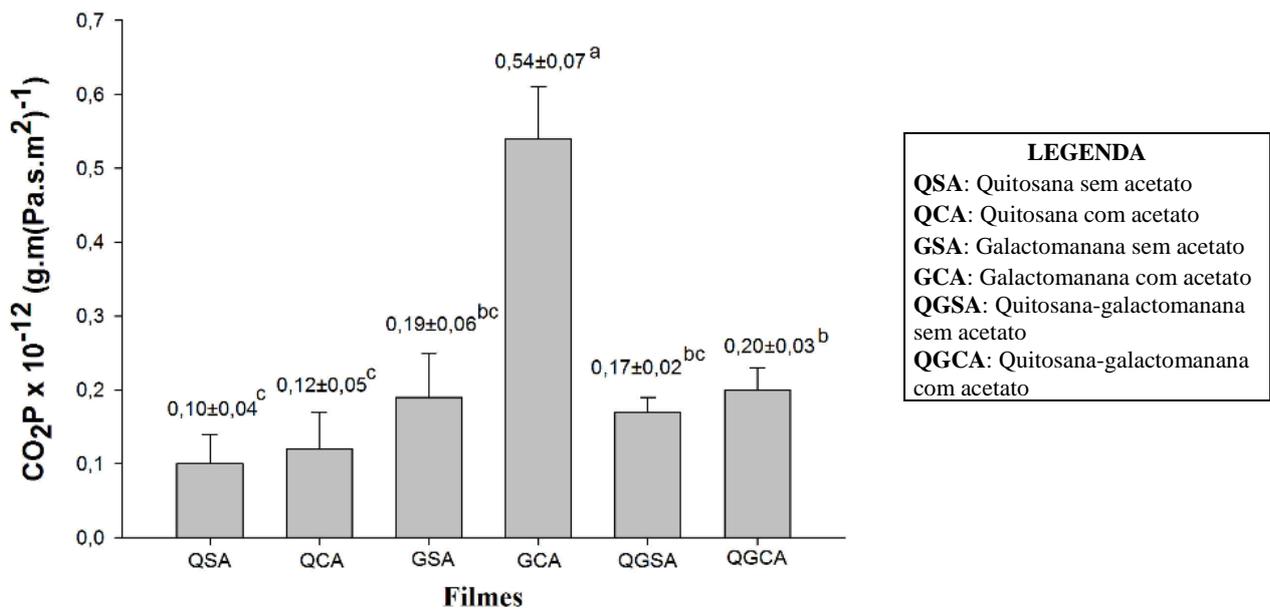
Fonte: Própria do autor (2014).

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($p>0,05$).

5.4 Permeabilidade ao CO₂

A FIGURA 15 apresenta os valores obtidos para a permeabilidade ao dióxido de carbono (CO₂) dos filmes comestíveis elaborados.

Figura 15 - Permeabilidade ao CO₂ dos filmes comestíveis elaborados.



Fonte: Própria do autor (2014).

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($p>0,05$).

A permeabilidade ao CO₂ aumentou 184 % quando o acetato de sódio foi incorporado ao filme de galactomanana de *A. pavanina* L., diferindo significativamente dos demais filmes elaborados ($p < 0,05$). Filmes com elevada permeabilidade ao CO₂ podem ser usados em alimentos cuja finalidade seja aumentar o período de adaptação (fase lag) para o crescimento de coliformes e outras bactérias de deterioração Gram negativas, além de bolores e leveduras (CERQUEIRA *et al.*, 2009c).

Os filmes à base apenas de quitosana apresentaram os menores valores de permeabilidade ao CO₂, não diferindo dos outros filmes em que não houve a incorporação de acetato. Em estudos que avaliaram a permeabilidade ao CO₂ de filmes de quitosana, foram obtidos os seguintes resultados: $6,98 \pm 0,030 \times 10^{-14}$ (g.m (Pa.s.m²)⁻¹) e $5,86 \pm 1,09 \times 10^{-13}$ (g.m (Pa.s.m²)⁻¹), por Souza *et al.* (2009) e Bourbon *et al.* (2011), respectivamente.

5.5 Propriedades mecânicas

Com o intuito de se verificar as propriedades mecânicas dos filmes elaborados, na TABELA 3 são apresentados os resultados das análises de tensão máxima, tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade. O comportamento mecânico de um dado material é caracterizado pela resposta que o mesmo apresenta quando submetido a tensões ou deformações (JACOB, 2006).

Os filmes com galactomanana em sua composição exibiram valores reduzidos de deformação na ruptura quando comparados aos filmes de quitosana, sendo que a blenda com a incorporação de acetato de sódio apresentou menor valor de deformação na ruptura ($67,11 \pm 0,89$ %), diferindo significativamente dos demais filmes ($p < 0,05$). Os filmes de quitosana têm uma condutividade elétrica muito baixa. Este resultado sugere que a adição do sal pode ter aumentado a condutividade do filme, alterando um pouco a forma como as cadeias de quitosano estão dispostas (WAN *et al.*, 2003; HAFIZA; ISA, 2014). O mesmo não acontece com a galactomanana, que é menos influenciado por ser não iônico.

Conforme Sobral (2000), de maneira geral, os filmes mais resistentes são os menos flexíveis, isto é, apresentam menor deformação na ruptura.

Os filmes à base de quitosana exibiram os maiores valores de deformação na ruptura. Tal propriedade foi comprovada também durante a realização das análises, pois estes eram relativamente frágeis e precisavam ser manuseados com muito cuidado.

Tabela 3 - Tensão máxima, tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade dos filmes comestíveis elaborados.

Tratamentos	Tensão Máxima – TM (MPa)	Tensão na Ruptura – TR (MPa)	Deformação na Ruptura – DR (%)	Módulo de Elasticidade – ME (MPa)
QSA	1,29 ± 0,03 ^c	1,18 ± 0,01 ^c	145,47 ± 9,49 ^a	1,21 ± 0,01 ^d
QCA	0,82 ± 0,30 ^c	0,46 ± 0,10 ^d	105,64 ± 6,68 ^b	1,02 ± 0,28 ^d
GSA	4,24 ± 0,31 ^b	4,22 ± 0,30 ^b	81,85 ± 1,04 ^b	10,27 ± 0,18 ^c
GCA	3,71 ± 0,40 ^b	3,70 ± 0,30 ^b	85,31 ± 1,81 ^b	10,12 ± 0,34 ^c
QGSA	7,18 ± 0,22 ^a	6,98 ± 0,34 ^a	82,21 ± 3,12 ^b	23,79 ± 1,38 ^b
QGCA	6,91 ± 0,53 ^a	6,99 ± 0,77 ^a	67,11 ± 0,89 ^c	35,68 ± 0,64 ^a

Fonte: Própria do autor (2014).

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Espessuras (mm) – QSA: 0,062 ± 0,004; QCA: 0,046 ± 0,004; GSA: 0,064 ± 0,003; GCA: 0,036 ± 0,001; QGSA: 0,065 ± 0,003; QGCA: 0,055 ± 0,003.

A incorporação de acetato de sódio reduziu o valor da tensão máxima dos filmes de quitosana ($p > 0,05$). Este resultado sugere que a incorporação de acetato de sódio nos filmes de quitosana levou a uma diminuição das interações intermoleculares e, portanto, da força coesiva dos filmes. O comportamento mecânico das matrizes poliméricas também depende da cristalinidade. Um aumento na cristalinidade de filmes pode ser associado a filmes mais quebráveis (menor tensão máxima) e elásticos (maior deformação na ruptura) (BOURBON *et al.*, 2011).

Pode-se observar que o módulo de elasticidade dos filmes aumenta com a presença de galactomanana de *A. pavonina* L. na composição destes, sendo verificado que maiores valores foram obtidos nas blendas. O módulo de elasticidade da blenda de quitosana - galactomanana de *A. pavonina* L. aumentou 50 % quando houve a incorporação de acetato de sódio. Em termos práticos, o módulo de Young ou o módulo de elasticidade é um indicador da rigidez do material, sendo que quanto maior o módulo, mais rígido é o material (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2002).

Os resultados exibidos na TABELA 3 também mostram que a presença de galactomanana de *A. pavonina* L. na composição dos filmes exerce influência nas propriedades de tensão máxima e tensão na ruptura, sendo que as blendas apresentaram os maiores valores em tais propriedades.

A comparação com dados de outros autores é difícil, pois existe uma grande dispersão da literatura associada a diferentes composições e fontes de quitosana, o grau de desacetilação, peso molecular, solubilização, presença de plastificantes, métodos de preparação e acondicionamento dos filmes antes do teste (RIVERO, GARCÍA, PINOTTI, 2009; RUBILAR *et al.*, 2013).

Blendas de galactomanana de *A. pavonina* L. com colágeno elaborados por Lima *et al.*, 2010 apresentaram maiores valores de tensão máxima (8,34 MPa) e baixos valores de deformação na ruptura (47,17 %) quando comparados com as blendas sem adição de acetato de sódio preparadas neste trabalho (7,18 MPa e 82,21 %), respectivamente.

5.6 Opacidade e cor

Na TABELA 4 são apresentados os resultados das análises de opacidade e de cor dos filmes comestíveis elaborados.

Tabela 4 - Opacidade e cor dos filmes comestíveis elaborados.

Filme	L*	a*	b*	Opacidade (%)
QSA	81,23 ± 1,43 ^d	3,90 ± 0,97 ^a	33,90 ± 1,14 ^{ab}	8,15 ± 1,46 ^e
QCA	83,70 ± 1,39 ^{cd}	2,95 ± 0,57 ^a	33,14 ± 0,07 ^{ab}	4,60 ± 0,23 ^f
GSA	95,27 ± 0,20 ^a	0,73 ± 0,05 ^c	5,89 ± 0,19 ^d	10,28 ± 0,89 ^d
GCA	93,86 ± 0,24 ^b	1,01 ± 0,17 ^c	6,89 ± 0,17 ^c	15,70 ± 0,52 ^a
QGSA	82,81 ± 1,15 ^d	3,01 ± 0,55 ^a	35,85 ± 1,27 ^a	12,86 ± 0,13 ^c
QGCA	85,71 ± 0,97 ^c	1,71 ± 0,37 ^b	32,45 ± 1,47 ^b	13,61 ± 0,08 ^b

Fonte: Própria do autor (2014).

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

O valor da luminosidade L* (81,23 ± 1,43) e do componente a* (3,90 ± 0,97) do filme de quitosana sem incorporação de acetato de sódio foram inferiores aos encontrados por Souza *et al.*, 2009 (93,80 ± 0,38 e 4,04 ± 0,11, respectivamente). Um baixo valor de luminosidade pode ajudar a evitar a deterioração oxidativa em alimentos embalados, causada pela exposição à luz visível e à luz ultravioleta, levando a perdas de nutrientes, descoloração e off-flavors (RUBILAR *et al.*, 2013). Os filmes à base de galactomanana de *A. pavonina* L. apresentaram os maiores valores de luminosidade, porém a incorporação de acetato de sódio os fez diferirem entre si, sendo observada uma redução de 95,27 ± 0,20 para 93,86 ± 0,24 ($p < 0,05$).

Observa-se que os filmes que contém quitosana apresentaram altos valores do componente b^* , que indicam a predominância de coloração amarelada. A blenda em que o acetato não foi adicionado diferiu significativamente da blenda em que foi incorporado o acetato de sódio ($p < 0,05$). Os filmes de galactomanana de *A. pavonina* L. apresentaram baixos valores do componente b^* .

A opacidade variou significativamente com os tratamentos. Os filmes produzidos à base de quitosana eram visivelmente transparentes. Como mostrado na TABELA 4, o filme de quitosana sem adição de acetato de sódio apresentou maior valor opacidade quando comparado com o filme contendo acetato. Estes resultados sugerem que a incorporação de acetato de sódio aumenta a transparência do filme de quitosana.

Os filmes que contém galactomanana de *A. pavonina* L. em sua composição apresentaram altos valores de opacidade, indicando que este hidrocolóide confere aos filmes uma menor transparência, assim como também a incorporação de acetato de sódio tornam estes filmes mais opacos ($p < 0,05$). Logo, os filmes de quitosana tiveram sua transparência reduzida quando foram produzidas as blendas.

5.7 Atividade antimicrobiana dos revestimentos

5.7.1 Determinação do pH dos revestimentos com e sem adição dos meios de cultura.

Os valores de pH dos revestimentos comestíveis com e sem adição dos meios de cultura são apresentados na TABELA 5. Devido ao fato da quitosana ser solúvel apenas em meio ácido, foi necessário determinar o pH dos revestimentos com e sem adição dos meios de cultura - caldo infusão cérebro coração (BHI) e caldo tripticase de soja (TSB), a fim de verificar se este fator exercia algum efeito adverso no crescimento dos micro-organismos.

É válido salientar que, segundo Franco e Landgraf (2008), os limites de pH para o crescimento de *S. Enteritidis* e *S. aureus* estão entre 4,0 e 9,0, enquanto *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* não crescem em pH menor ou igual a 4,5.

As medições de pH dos meios de cultura BHI e TSB foram 6,61 e 6,95, respectivamente. De acordo com os resultados apresentados na TABELA 5, observou-se que o pH aumenta quando o revestimento de quitosana é adicionado ao meio de cultura, possibilitando a existência de uma faixa de pH em que os micro-organismos estudados possam se desenvolver.

Tabela 5 – Valores de pH dos revestimentos comestíveis com e sem adição dos meios de cultura.

Amostra	pH		
	Revestimento	Revestimento +BHI	Revestimento +TSB
Quitosana (1%)	2,98 ± 0,18 ^e	4,95 ± 0,15 ^c	5,34 ± 0,09 ^c
Quitosana (1%) + acetato (0,05%)	3,06 ± 0,17 ^e	4,90 ± 0,18 ^c	4,99 ± 0,06 ^d
Galactomanana de <i>A. pavonina</i> L. (1%)	5,65 ± 0,20 ^b	6,60 ± 0,04 ^a	6,99 ± 0,07 ^a
Galactomanana (1%) + acetato (0,05%)	6,47 ± 0,04 ^a	6,60 ± 0,03 ^a	6,99 ± 0,05 ^a
Quitosana (1%) - Galactomanana (1%)	3,72 ± 0,06 ^d	6,02 ± 0,12 ^b	6,08 ± 0,03 ^b
Quitosana (1%) - Galactomanana (1%) + acetato (0,05%)	3,84 ± 0,01 ^c	6,08 ± 0,13 ^b	6,12 ± 0,04 ^b

Fonte: Própria do autor (2014).

No *et al.* (2002) mostraram que a atividade antibacteriana da quitosana foi inversamente afetada pelo pH, apresentando maior atividade em valores de pH mais baixos, pois a fisiologia da célula fica mais propensa a sofrer danos, já que, em condições de pH mais ácido, os grupos carboxila e fosfato da superfície bacteriana são aniônicos, sendo potenciais locais para ligação eletrostática com a quitosana (HELANDER *et al.*, 2001).

Fernandez-Saiz, Lagaron e Ocio (2009) elaboraram filmes que foram adicionados a caldos MHB (Mueller - Hinton Broth), com diferentes pHs - 6,2 e 7,4, sendo os tubos subsequentemente inoculados com *S. aureus*. O estudo confirmou que as propriedades antimicrobianas de filmes de quitosana são afetadas pelo pH. Nos testes efetuados a um pH mais baixo, ou seja, 6,2, observou-se uma menor contagem bacteriana, indicando forte efeito biocida. Esta descoberta está relacionada com o pKa = 6,4 deste biopolímero, que está perto do valor de pH 6,2. A este pH, a quantidade de grupos amino carregados positivamente (grupos ativos) está perto de 75 %, enquanto que a um pH de 7,4 essa quantidade cai até aproximadamente 10 %.

5.7.2 Efeito antimicrobiano dos revestimentos comestíveis

Na TABELA 6 são apresentados os resultados do efeito dos revestimentos estudados contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas que podem fazer parte da microbiota de alimentos como o pescado, por exemplo.

Conforme os dados expostos na Tabela 4, nenhum dos revestimento preparados foram efetivos contra o crescimento de *S. aureus*. Segundo Zheng e Zhu (2003), uma maior

atividade antimicrobiana contra *S. aureus* é observada com o aumento do peso molecular da quitosana. Contudo, a quitosana de alto peso molecular a 1% utilizada neste experimento não foi efetiva contra o crescimento de *S. aureus*.

Os revestimentos à base de galactomanana de *A. pavanina* L. não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana contra os micro-organismos estudados.

Tabela 6 – Efeito antimicrobiano dos revestimentos comestíveis estudados contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas.

REVESTIMENTO	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Quitosana (1 %)	+	-	-	-
Quitosana (1 %) + acetato (0,05 %)	+	-	-	-
Galactomanana de <i>A. pavanina</i> L. (1 %)	+	+	+	+
Galactomanana (1 %) + acetato (0,05 %)	+	+	+	+
Quitosana (1 %) - galactomanana (1 %)	+	-	+	-
Quitosana (1 %)- galactomanana (1%) + acetato (0,05 %)	+	-	+	-
Controle (Acetato (0,05 %) + BHI + Inóculo)	+	+	+	+
Controle (Acetato (0,05 %) + TSB + Inóculo)	+	+	+	+
Controle (BHI + Inóculo)	+	+	+	+
Controle (TSB + Inóculo)	+	+	+	+
Controle (BHI + Acetato (0,05 %))	-	-	-	-
Controle (TSB + Acetato (0,05 %))	-	-	-	-

Fonte: Própria do autor (2014).

+: presença de micro-organismos.

-: ausência de micro-organismos.

Pode ser observado na TABELA 6 que o revestimento de quitosana de alto peso molecular (1 %) e sua associação com acetato (0,05 %) foram efetivas contra bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa* e *S. Enteritidis*) e Gram positivas (*L. monocytogenes*). Porém, esse efeito pode ser atribuído somente à ação da quitosana, uma vez que os controles contendo os meios de cultura, inóculos e acetato (0,05 %) não apresentaram ação antibacteriana.

Sallam (2007b) avaliou a qualidade microbiológica de fatias de salmão fresco tratados por imersão em 2,5 % (p/v) de solução aquosa de acetato de sódio armazenados a 1 °C. Os resultados revelaram que esta concentração do sal foi eficiente contra a proliferação de vários tipos de micro-organismos deteriorantes, incluindo bactérias aeróbias e psicrótróficas, *Pseudomonas spp.*, bactérias produtoras de H₂S, bactérias lácticas e *Enterobacteriaceae*. O prazo de validade dos produtos tratados foi prorrogado por 4-7 dias em comparação ao controle.

A atividade antimicrobiana da quitosana tem sido relacionada à presença de grupos amino carregados positivamente em pH ácido que interagem com as membranas das células microbianas carregadas negativamente (MOHAMED *et al.*, 2013; PEREDA *et al.*, 2011). Esta interação, além de poder alterar um pouco a permeabilidade da membrana, também neutraliza e até mesmo reverte a carga superficial das bactérias. O aumento da permeabilidade da membrana leva a desestabilização da membrana celular e extravasamento de substâncias intracelulares, o que ocasiona a morte de células (KONG *et al.*, 2010).

Entretanto, quando a quitosana é adicionada à solução de galactomanana, observou-se que o revestimento mostrou-se eficaz contra *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*. Porém, não há efeito bactericida da blenda contra *S. Enteritidis*, sugerindo-se que a atividade antimicrobiana da quitosana foi diminuída. Segundo VÁSCONEZ *et al.* (2009), isto ocorre devido à redução da disponibilidade do grupo NH_3 da quitosana na interação com a membrana da célula do micro-organismo.

Estudos demonstraram que o revestimento de quitosana é mais eficaz contra os micro-organismos do que o filme de quitosana (VÁSCONEZ *et al.*, 2009; GÓMEZ-ESTACA, 2010; PEREDA *et al.*, 2011), pelo fato de que, no revestimento, a quitosana se difunde através do ágar, enquanto que, na forma de filme, somente os micro-organismos que estão em contato direto com os sítios ativos da quitosana são inibidos, pois a quitosana é incapaz de se difundir através do ágar e, como não ocorre a migração de agentes ativos, a sua capacidade antimicrobiana é reduzida (PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2005; NOWZARI; SHÁBANPOUR; OJAGH, 2013).

6 CONCLUSÕES

- O filme de quitosana-galactomanana com a adição de acetato de sódio foi um dos filmes menos solúveis em água e apresentou menores valores de permeabilidade ao vapor de água e de deformação na ruptura, sendo o filme mais rígido por apresentar o maior módulo de Young.
- As blendas apresentaram os maiores valores de tensão máxima e tensão de ruptura.
- Houve a redução da permeabilidade ao O₂ e o aumento da permeabilidade ao CO₂ nos filmes de galactomanana com a incorporação de acetato de sódio. Filmes com galactomanana em sua composição são mais opacos e apresentam maiores valores de luminosidade.
- Os filmes que contém quitosana apresentaram baixa solubilidade em água e altos valores do componente b*.
- Nenhum dos revestimentos preparados foram efetivos contra o crescimento de *S. aureus* e os revestimentos à base de galactomanana não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana contra os micro-organismos estudados.
- O revestimento de quitosana de alto peso molecular (1%) foi efetivo contra bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa* e *S. Enteritidis*) e Gram positiva (*L. monocytogenes*). Porém, observou-se que não há efeito bactericida da blenda contra *S. Enteritidis*, sugerindo-se que a atividade antimicrobiana da quitosana foi diminuída.
- O uso de quitosana em combinação com acetato de sódio pode ser utilizado no desenvolvimento de revestimentos e filmes antimicrobianos para aplicações de alimentos e embalagens, com possivelmente contribuições para preservação de alimentos e prateleiras.
- A escolha do filme ou revestimento comestível para a realização de sua aplicabilidade dependerá da finalidade.
- Trabalhos futuros devem incluir estudos de vida de prateleira para demonstrar os efeitos positivos esperados com a aplicação desses filmes e revestimentos comestíveis em sistemas alimentares reais.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporation rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, [s.l], v. 111, p. 343-350, 2012.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT - Food Science and Technology**, Switzerland, v. 43, p. 837-842, 2010.
- ASTM-D-3985-02. Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. *In: Annual book of ASTM*. American Society for Testing & Materials, Philadelphia, PA, 2002.
- ASTM-D-882-91. Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. *In: Annual book of ASTM standards*. American Society for Testing & Materials, Philadelphia, PA, 1991.
- AZERO, E. G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, [s.l], v. 21, p. 551-556, 2002.
- BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosembergii*. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 2014-2019, 2008.
- BOURBON, A. I. *et al.* Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. **Journal of Food Engineering**, Washington, v. 106, p. 111-118, 2011.
- BUTLER, B. L. *et al.* Mechanical and barrier properties of edible chitosan film as affected by composition and storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, p. 953-961, 1996.
- CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. **Food Bioprocess Technology**, [s.l], v. 4, p.849-875, 2011.
- CAO, R. *et al.* Chitosan Extends the Shelf-life of Filleted Tilapia (*Oreochromis niloticus*) During Refrigerated Storage. **Journal of Ocean University of China**, China, v. 11, p. 408-412, 2012.
- CASARIEGO, A. *et al.* Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 22, p. 1452-1459, 2008.
- CERQUEIRA, M. A. *et al.* Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 75, p. 408-414, 2009a.
- CERQUEIRA, M. A. *et al.* Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. **Journal of Food Engineering**, Washington, v. 94, p. 372-378, 2009b.
- CERQUEIRA, M. A. *et al.* Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 1456-1462, 2009c.

CERQUEIRA, M. A. et al. Seed extracts of *Gleditsia triacanthos*: Functional properties evaluation and incorporation into galactomannan films. **Food Research International**, Ontario, v. 43, p. 2031-2038, 2010.

CERQUEIRA, M. A. et al. Galactomannans use in the development of edible films/ coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 22, p. 662-671, 2011.

CUQ, B. et al. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, p. 580-584, 1996.

DHANAPAL, A. et al. Edible films from Polysaccharides. **Food Science and Quality Management**, [s.l], v.3, p. 9-17, 2012.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, [s.l], v.114, p.1173-1182, 2009.

ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, [s.l], v. 33, p. 1819-1841, 2013.

FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 22, p. 292-303, 2011.

FENG, F. et al. Characterization of half N-acetylated chitosan powders and Films. **Procedia Engineering**, [s.l], v. 27, n. 718 – 732, 2012.

FERNÁNDEZ-SAIZ, P.; LAGARON, J.M.; OCIO, M.J. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 23, p. 913-921, 2009.

FERNÁNDEZ-SAIZ et al. Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* in laboratory media and in fish soup. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, p. 287–294, 2010.

FERNÁNDEZ-SAIZ, P. et al. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. **Food Control**, [s.l], v. 34, p. 61-68, 2013.

FISHMAN, M. L. et al., Extrusion of pectin/ starch blends plasticized with glycerol. **Carbohydrate Polymers**. Oxford, v. 41, p. 317-325, 2000.

FONSECA, S. C. L.; PEREZ, S. C. J. G. A. Ação do polietilenoglicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina*, L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, p. 1-6, 2003.

FONSECA, J. P. C. G. Q. **Revestimentos comestíveis à base de quitosano e cera de abelha: aplicação na conservação da uva de mesa**. 2012. 110 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Processing Parameters Needed to Control Pathogens in Cold Smoked Fish Chapter II. Potential Hazards in Cold-Smoked Fish:**

Listeria monocytogenes. United States, [200-?a]. Page Last Updated: 06/03/2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm092286.htm>>. Acesso em: 28. set. 2013.

FORSSELL, P.M. *et al.* Ageing of rubbery thermoplastic barley and oat starches. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.39, p.43-51, 1999.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRANK, O.; HOFMANN, T. On the influence of the carbohydrate moiety on chromophore formation during food-related Maillard reactions of pentoses, hexoses, and disaccharides. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 83, p. 3246-3261, 2000.

GALUS, S.; LENART, A. Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. **Journal of Food Engineering**, Washington, v. 115, p. 459-465, 2013.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e aplicações**. São Paulo: Editora Nobel, 2008.

GENNADIOS, A. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press, 2002. 650 p.

GIALAMAS, H. *et al.* Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Research International**, Ontario, v. 43, p. 2402-2408, 2010.

GÓMEZ-ESTACA, J. *et al.* Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, [s.l], v. 105, p. 511–520, 2007.

GÓMEZ-ESTACA, J. *et al.* Biodegradable gelatinechitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, [s.l], v. 27, p. 889-896, 2010.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. *et al.* Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 20, p. 3-16, 2009.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.-L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, p.190-199, 1992.

GUIMARÃES, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; LOUREIRO, M. E. Hidratação de sementes. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Maranhão, v. 2, p. 31-39, 2008.

HAFIZA, M. N.; ISA, M.I.N. Ionic Conductivity and Conduction Mechanism Studies of CMC/Chitosan Biopolymer Blend Electrolytes. **Research Journal of Recent Sciences**, Índia, v. 3, p. 50-56, 2014.

HASTEIN, T. *et al.* Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, Paris, v. 25, p. 607-625, 2006.

HEALTH CANADA. *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Refrigerated Ready-to-Eat Foods. v. 1, 2010. Disponível em: <http://www.hc.sc.gc.ca/fnan/alt_formats/pdf/legislation/pol/listeria_monocytogenes-test-eng.pdf>. Acesso em: 28. set. 2013.

HELANDER, I. M. *et al.* Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, p. 235-244, 2001.

ITURRIAGA, L.; OLABARRIETA, I.; MARAÑÓN, I. M. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 158, p. 58-64, 2012.

ISITE. Disponível em: <http://isite.lps.org/sputnam/biology/u2biochemistry/lipid_lab.htm>. Acesso em: 12. jun. 2014.

JACARANDA MIMOSO. Disponível em: <<http://www.jacarandamimoso.com.br/2012/08/pau-brasil-madeira-e-resina-uma-patria.html>>. Acesso em: 13. out. 2012.

JACOB, R. F. **Estudo das propriedades das blendas de amido termoplástico e látex natural**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências – Físico-químicas). Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

JAMES, J.; NGARMSAK, T. Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A technical guide. **FAO**, Bangkok, p.102, 2010.

JANJARASSKUL, T.; KROCHTA, J. M. Edible Packaging Materials. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 1, p. 415-448, 2010.

JAYATHILAKAN, K. *et al.* Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, Índia, v. 49, p. 278-293, 2012.

JESUS, G.C. **Filmes Automontados do Cloreto de 3-npropilpiridínio Silsesquioxano e Ftalocianina de cobre obtidos pela técnica LbL**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2009.

JIANG, J. *et al.* Structural and thermal characterization of galactomannans from genus *Gleditsia* seeds as potential food gum substitutes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.91, p.732-737, 2011.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 2839-2845, 1995.

KONG, M. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, p. 51-63, 2010.

KHWALDIA, K.; ARAB-TEHRANY, E.; DESOBRY, S. Biopolymer coatings on paper packaging materials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Massachusetts, vol. 9, p. 82-91, 2010.

LAWTON, J.W. Effect of starch type on the properties of starch containing films. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.29, p. 203-208, 1996.

LECETA, I. *et al.* Environmental assessment of chitosan-based films. **Journal of Cleaner Production**, [s.l], v. 41, p. 312-318, 2013.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; CABA, K. de la. Functional properties of chitosan-based films. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.93, p. 339-346, 2013.

LI, T. *et al.* Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. **Food Chemistry**, [s.l], v. 138, p. 821-826, 2013.

LIMA, A. M. *et al.* New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits - Influence on fruits gas transfer rate. **Journal of Food Engineering**, Washington, v. 97, p. 101-109, 2010.

MA, W. *et al.* Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. **Food Research International**, Ontario, v. 49, p. 572-579, 2012.

MÂCEDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação na indústria farmacêutica. **Revista FÁrmacos e Medicamentos**, [s.l], v. 2, p. 19-24, 2000.

MARTINS, J. T. *et al.* Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 1884-1891, 2010.

MARTINS, J. T. *et al.* Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 29, p. 280-289, 2012.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 27, p. 220-227, 2012.

MICHAELIS. Disponível em: <http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php?lingua=portugues-portugues&palavra=septicemia>. Acesso em: 30. mai. 2014.

- MOHAMED, C. *et al.* Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 30, p. 576-580, 2013.
- NELSON, L. N.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3rd ed., New York: Worth Publishers, 2000.
- NWIYI, P.; ONYEABOR, A. Occurrence of *Salmonella spp.* from fresh fish (*Tilapia nilotica Linn*) using improved isolation methods. **Journal of Animal and Feed Research**, [s.l], v. 2, p. 475-478, 2012.
- NO, H. K. *et al.* Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, p. 65-72, 2002.
- NO, H. K. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A Review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, p. 87-100, 2007.
- NOWZARI, F.; SHÁBANPOUR, B.; OJAGH, S. M. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, [s.l], v. 141, p. 1667-1672, 2013.
- PEREDA, M. *et al.* Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 25, p. 1372-1381, 2011.
- PINHEIRO, A. C. *et al.* Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, [s.l], v. 85, n. 18, p. 18-28, 2010.
- PINTO, A. L. *et al.* Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 50-58, 2009.
- PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Food Science and Technology**, London, v. 38, p. 859-865, 2005.
- RABEA, E. I. *et al.* Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 457-465, 2003.
- RAO, M.S. *et al.* Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 82, p. 1243-1247, 2010.
- RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, Washington, v. 90, p. 531-539, 2009.
- RUBILAR, J. F. *et al.* Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, Washington, v. 115, p. 466-474, 2013.
- RUIZ-NAVAJAS, Y. *et al.* In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. **Food Control**, [s.l], v.30, p. 386-392, 2013.

SALLAM, K. I. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acid. **Food Chemistry**, [s.l], v. 101, p. 592-600, 2007a.

SALLAM, K. I. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. **Food Control**, [s.l], v. 18, p. 566-575, 2007b.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Flexible Plastic Packaging**: main polymers and valuation of properties. 1. ed. Campinas: Cetea Ital. p.267, 2002.

SCHOU, M. *et al.* Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. **Food Science & Technology**, London, v. 38, p. 605-610, 2005.

SCIARINI, L. S., *et al.* Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 23, p. 306-313, 2009.

SHARMIN, N. *et al.* Effectiveness of silane monomer on chitosan films and PCL based tri-layer films. **Journal of Applied Polymer Science**, [s.l], v. 125, p. 224 -232, 2012.

SILVA, N. da. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632 p.

SKURTYYS, O. *et al.* **Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings**. Disponível em: <http://intrawww.ing.puc.cl/siding/datos/public_files/profes/fpedreschi_GTSNWOEDCWJOGDA/Food%20Hydrocolloid%20Edible%20Films%20and%20Coatings.pdf>. Acesso em: 09. out. 2012.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p.1251-1259, 2000.

SOUZA, B.W.S. *et al.* Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 23, p. 2110–2115, 2009.

SOUZA, B.W.S. *et al.* Effect of Chitosan-Based Coatings on the Shelf Life of Salmon (*Salmo salar*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 11456-11462, 2010.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seed galactomannans: an overview. **Chemistry & Biodiversity**, Switzerland, v. 2, p. 295-317, 2005.

TAVARES, R. O. **Galactomanana de *A. pavanina* L.:** Aplicação para o isolamento de Lectinas galactose-específicas. 1998. 92 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

TEIXEIRA, P. R. S. **Filmes híbridos nanoestruturados a base de celulose microcristalina fosfatada: síntese e caracterização**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

TIGHE, M-K *et al.* The epidemiology of travel-related *Salmonella enteritidis* in Ontario, Canada, 2010-2011. **BMC Public Health** [s.l], v. 12, p. 1-9, 2012.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chemistry**, [s.l], v. 134, p. 1571-1579, 2012.

VARGAS, M. *et al.* Characterization of chitosan–oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 23, p. 536-547, 2009.

VÁSCONEZ, M. B. *et al.* Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, Ontario, v. 42, p. 762-769, 2009.

VEIGA-SANTOS, P. *et al.* Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 19, p. 341-349, 2005.

VICENTE, A. A. *et al.* Improved hydrocolloid-based edible coatings/films systems for food applications. **Polysaccharides: Development, Properties and Applications**. Ed. Ashutosh Tiwari, 2010.

VIEIRA, I. G. P. *et al.* NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, [s.l], v. 101, p. 70-73, 2007.

VIEIRA, M. G. A. *et al.* Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, [s.l], v. 47, p. 254-263, 2011.

WAN, Y. *et al.* Synthesis, Characterization and Ionic Conductive Properties of Phosphorylated Chitosan Membranes. **Macromolecules Chemistry and Physics**, Weinheim, v. 204, 850–858, 2003.

WIKIPEDIA. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Acetato_de_s%C3%B3dio>. Acesso em: 09. out. 2012.

ZHENG, L.-Y.; ZHU, J.-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 54, p. 527-530, 2003.

ZIANE, K. *et al.* Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT - Food Science and Technology**, Switzerland, v. 41, p. 2159-2165, 2008.