



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

RODRIGO DE ARAÚJO SOARES

**REVESTIMENTO PROTEICO DE SORO DE LEITE COM NANOPARTÍCULA DE
MONTMORILONITA INCORPORADO DE ANTIMICROBIANO PARA
APLICAÇÃO EM OVOS**

FORTALEZA

2018

RODRIGO DE ARAÚJO SOARES

REVESTIMENTO PROTEICO DE SORO DE LEITE COM NANOPARTÍCULA DE
MONTMORILONITA INCORPORADO DE ANTIMICROBIANO PARA APLICAÇÃO EM
OVOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva.

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Soraia Vilela Borges.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S656r Soares, Rodrigo de Araújo.
Revestimento proteico de soro de leite com nanopartícula de montmorilonita incorporado de antimicrobiano para aplicação em ovos / Rodrigo de Araújo Soares. – 2018.
179 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profª. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva.
Coorientação: Profª. Dra. Soraia Vilela Borges.
1. Biopolímeros. 2. Nanocompósitos. 3. Qualidade do ovo. I. Título.

CDD 664

RODRIGO DE ARAÚJO SOARES

REVESTIMENTO PROTEICO DE SORO DE LEITE COM NANOPARTÍCULA DE
MONTMORILONITA INCORPORADO DE ANTIMICROBIANO PARA APLICAÇÃO EM
OVOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Produtos de Origem Animal.

Aprovada em: 25 / 05 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Soraia Vilela Borges (Co-orientadora)
Universidade Federal de Lavras (UFLA)

Prof. Dr. Ednardo Rodrigues Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Cristiane Ayala de Oliveira
Instituto Federal Sertão Pernambucano (IF Sertão PE)

Dra. Selene Daiha Benevides
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)

Prof^a. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Neuma Maria de Souza Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Agradeço à Deus, por sempre guiar meus caminhos e me dar forças nos momentos de fraqueza e pouca fé.

Aos meus pais Geraldo Soares Silva Filho e Carmelita Diniz Araújo (in memoriam), pelo amor incondicional.

À minha amada esposa Gláucia, que sempre me deu apoio nesta e em outras caminhadas. Pelo Amor, Carinho e Dedicção. Onze anos se passaram e você continua a mesma... Meu Amor Eterno!!

AGRADECIMENTOS

Às minhas queridas orientadoras Elisabeth Mary Cunha e Soraia Vilela Borges, por serem, além de excelentes profissionais, pessoas tão humanas e iluminadas, colocadas em minha vida por Deus. A caminhada só chegou até aqui graças à vocês. Minha Eterna Gratidão e Carinho!

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por proporcionar a realização do curso de Doutorado,

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela valiosa parceria na realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF Sertão PE), pela oportunidade de me dedicar integralmente ao curso.

Às professoras Marali Vilela Dias e Roberta Hilsdorf Piccoli, pela amizade, amor e paciência. Vocês também tiveram participação importantíssima nesta caminhada.

À banca avaliadora, pela colaboração com sugestões que enriqueceram o trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Carnes e Pescados do DTA (UFC/CE), Rozelúcia Barroso, Luiz Bitu e Norma Perdigão pela amizade e disposição em ajudar sempre.

Às amigas do Laboratório de Embalagens para Alimentos (UFLA), Natália de Mani, Viviane Azevedo, Laura e Taline, pelas valiosas dicas e pronta colaboração sempre.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (UFLA), em especial à laboratorista Eliane Alcântara e aos alunos de pós-graduação Heloísa e Jorge, pelo convívio e amizade.

Aos doutorandos Luiz Eduardo (Engenharia de Biomateriais) e Isabelle Neves (Ciência dos Alimentos) pela valiosa ajuda nas análises.

À todos do Departamento de Ciência dos Alimentos (UFLA), em especial aos professores Eduardo Mendes, Eduardo Valério, Ana Carla Marques, Luís Roberto e Fabiana Queiroz, e às laboratoristas Tina e Creusa, pelo apoio, colaboração e amizade.

Ao professor Edison Fassani, do Departamento de Zootecnia (UFLA), pela valiosa ajuda no fornecimento dos ovos brancos e suas preciosas sugestões.

Ao professor Gustavo Henrique Denzin Tonoli, do Departamento de Ciências Florestais (UFLA), pelo apoio e sugestões nas análises estruturais dos ovos.

Ao Supermercado Rex (Lavras-MG), pela presteza na execução da análise sensorial dos ovos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (UFLA), Finep, Capes, Fapemig e CNPq pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

“Ao olho mostra a integridade
de uma coisa num bloco, um ovo.
Numa só matéria, unitária,
maciçamente ovo, num todo.

Sem possuir um dentro e um fora,
tal como as pedras, sem miolo:
é só miolo: o dentro e o fora
integralmente no contorno.

No entanto, se ao olho se mostra
unânime em si mesmo, um ovo,
a mão que o sopesa descobre
que nele há algo suspeito:

que seu peso não é o das pedras,
inanimado, frio, goro;
que o seu é um peso morno, túmido,
um peso que é vivo e não morto (...)

O ovo da galinha - João Cabral de Melo Neto

RESUMO

Desenvolveu-se uma solução filmogênica de isolado proteico de soro de leite (IPS) com nanopartícula de montmorilonita (MMT) incorporado do antimicrobiano metabissulfito de sódio. A escolha do antimicrobiano se deu a partir da determinação da concentração inibitória mínima de sete conservantes (metabissulfito de sódio, ácido málico, sulfito de sódio, nitrito de sódio, ácido benzoico, benzoato de sódio e bissulfito de sódio) sobre a *Salmonella* Enteritidis. A solução foi otimizada (0,01 mg de MMT. mg⁻¹ de IPS e 0,41 de mg glicerol. mg⁻¹ de IPS) por meio de delineamento composto central rotacional, e aplicada em ovos brancos na forma de revestimento. Assim, esta pesquisa objetivou avaliar o efeito do revestimento sobre a qualidade interna, externa, microbiológica e aparência visual dos ovos. Para avaliação da qualidade interna dos ovos foram utilizados 324 ovos brancos, de classe A, tipo Extra, oriundos de poedeiras com 76 semanas de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 9, sendo 2 tratamentos (ovos revestidos e sem revestimento) e 9 tempos de armazenamento (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias), com três repetições de 108 ovos. Os ovos foram armazenados à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %, e analisados quanto aos seguintes parâmetros: perda de peso; porcentagem de casca, gema e albúmen; unidade Haugh (UH); índice de gema (IG); pH da gema e albúmen; estabilidade e *overrun* de espuma. A avaliação da qualidade externa foi realizada em 150 ovos brancos, classe A, tipo Extra, oriundos de poedeiras com 77 semanas de idade, distribuídos igualmente entre os dois tratamentos. Determinou-se a cor, estrutura e hidrofobicidade da casca, além da resistência dos ovos à quebra. Para avaliação microbiológica foram utilizadas cascas de 20 ovos brancos, classe A, tipo Extra, oriundos de poedeiras com 78 semanas de idade, sendo inoculadas com *Salmonella* Enteritidis, *Aspergillus sydowii* e *Penicillium paxilli*, e distribuídas entre os tratamentos. As cascas foram estocadas à temperatura de 25 ± 5 °C e umidade relativa de 75 ± 5 % por até cinco dias, sendo analisados a cada 24 horas quanto ao crescimento microbiano. O experimento sensorial foi realizado com 20 ovos brancos, classe A, tipo Grande, adquiridos no comércio da cidade de Lavras – MG. Os ovos foram divididos entre os dois tratamentos e avaliados quanto a aparência por clientes de um supermercado. Os ovos revestidos apresentaram menores valores de pH de albúmen, porcentagem de gema e perda de peso, e maiores valores de UH, IG, estabilidade e *overrun* de espuma, quando comparados aos ovos sem revestimento. O revestimento não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhum dos micro-organismos testados. A análise sensorial mostrou que os ovos revestidos foram preferidos em relação aos ovos sem revestimento. O

revestimento não influenciou a medida instrumental de cor da casca e nem a resistência à quebra, porém aumentou a hidroflicidade da casca. O revestimento desenvolvido pode ser uma alternativa para manutenção da qualidade de ovos brancos estocados à temperatura ambiente (~ 25 °C).

Palavras-chave: Biopolímeros. Nanocompósitos. Qualidade do ovo.

ABSTRACT

A film-forming solution was developed from a whey protein isolate (WPI) with montmorillonite nanocomposite (MMT) and sodium metabisulfite incorporated as an antimicrobial. The choice of antimicrobial was based on the determination of the minimum inhibitory concentration of seven preservatives (sodium metabisulfite, malic acid, sodium sulfite, sodium nitrite, benzoic acid, sodium benzoate and sodium bisulfite) against *Salmonella* Enteritidis. The solution was optimized (0.01 mg MMT. mg⁻¹ WPI and 0.41 mg glycerol. mg⁻¹ WPI) through a rotational central composite design and applied to white eggs in the form of coating. Thus, this work aimed to evaluate the effect of this coating effect on the internal, external, microbiological quality and visual appearance of the eggs. In order, to evaluate the internal quality of the eggs, 324 white eggs, class A, Extra type, from 76-week-old laying hens were used in a completely randomized design, following an 2 x 9 factorial scheme (2 treatments – coated and uncoated eggs; and 9 storage time – 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 days), with three replicates of 108 eggs. The eggs were stored at 25 ± 3 °C and relative humidity of 70 ± 5%, and analyzed for the following parameters: weight loss; percentage of shell, yolk and albumen; Haugh unit (HU); yolk index (GI); pH of the yolk and albumen; foam stability and overrun. The external quality evaluation was performed with 150 white eggs, Class A, Extra type, from 77-week-old laying hens, equally distributed between the two treatments. The color, structure and hydrophilicity of the shell were determined, as well as the eggs' resistance to breaking. For the microbiological evaluation, shells of 20 white eggs, class A, Extra type, from 78-week-old laying hens were used, being inoculated with *S. Enteritidis*, *Aspergillus sydowii* and *Penicillium paxilli*, and distributed among the treatments. The egg shells were stored at 25 ± 5 °C and relative humidity of 75 ± 5% for up to five days and analyzed every 24 hours for microbial growth. For the sensory experiment 20 white eggs, class A, large type, acquired in the Lavras city were used. The eggs were divided between the two treatments and evaluated about appearance by customers of a supermarket. The coated eggs had lower values of albumen pH, yolk percentage and weight loss, and higher values of UH, IG, foam stability and overrun, when compared to uncoated eggs. The coating showed no antimicrobial activity against any of the microorganisms tested. Sensory analysis showed that coated eggs were preferred over uncoated ones. The coating neither influenced the shell color nor the breaking resistance, but had its hydrophilicity increased. WPI coating may be an alternative for maintaining the quality of white eggs stored at room temperature (~ 25 °C).

Keywords: Biopolymers. Nanocomposites. Egg quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Tipo de compostos que podem ser formados pela inserção de silicatos entre as camadas de polímeros	32
Figura 2	– Diagrama esquemático do Modelo do Caminho Tortuoso (<i>Tortous path Model</i>)	33
Figura 3	– Estrutura da Montmorilonita	34
Figura 4	– Estrutura do ovo	37
Figura 5	– Classificação de ovos de acordo com o peso	41
Figura 6	– Halo inibitório formado por discos de filme a base de IPS/MMT/MBS sobre <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis S64	80
Figura 7	– Análise de Componentes Principais (PCA) dos filmes de isolado proteico de soro	86
Figura 8	– Curva de escoamento da solução filmogênica nº 3, à 25 °C	87
Figura 9	– Eixos do ovo para determinação da resistência à quebra	101
Figura 10	– Perda de peso (%) de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 56 dias à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %	111
Figura 11	– Porcentagem de casca gema e albúmen de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 56 dias à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %	113
Figura 12	– Unidade Haugh de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 56 dias à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %	115
Figura 13	– Índice de gema de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 56 dias à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %	116
Figura 14	– pH da gema e do albúmen de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 56 dias à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa	

	de 70 ± 5 %	118
Figura 15	– Estabilidade de espuma (%) de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 56 dias à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %	121
Figura 16	– <i>Overrun</i> de espuma (%) de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 56 dias à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %	124
Figura 17	– Eletromicrografias de varredura das cascas dos ovos	126
Figura 18	– Imagens de gotas de água e os respectivos ângulos de contato laterais (°) formados com as superfícies de cascas de ovos (Método da gota séssil)	131
Figura 19	– Contagem da população de <i>Salmonella</i> Enteritidis em cascas de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 96 horas à temperatura de 25 ± 3 °C e umidade relativa de 75 ± 3 %	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo nutritivo de um ovo inteiro, albúmen e gema	39
Tabela 2 – Concentrações testadas para determinação da CIM de conservantes alimentares	77
Tabela 3 – Matriz do delineamento experimental	79
Tabela 4 – Valores médios para permeabilidade ao vapor de água (PVA) e diâmetro de halo inibitório (DHI) dos filmes testados	84
Tabela 5 – Valores médios das propriedades mecânicas dos ovos revestidos e sem revestimento	127
Tabela 6 – Parâmetros de cor de ovos revestidos e sem revestimento	129
Tabela 7 – Ângulo de contato da água com a superfície da casca de ovos	130
Tabela 8 – Monitoramento da superfície da casca de ovos revestidos e sem revestimento, inoculada com os fungos <i>Aspergillus sydowii</i> e <i>Penicillium paxilli</i>	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFC/CE	Universidade Federal do Ceará
UFLA	Universidade Federal de Lavras
IPS	Isolado proteico de soro de leite
CPS	Concentrado proteico de soro de leite
UFC	Unidades formadores de colônia
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
MMT	Montmorilonita
MBS	Metabissulfito de sódio
PM	Peso molecular
Pi	Ponto isoelétrico
Ph	Potencial hidrogeniônico
DCA	Departamento de Ciência dos Alimentos
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
WHO	<i>World Health Organization</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MS	Ministério da Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IDA	Ingestão Diária Aceitável
ASTM	<i>American Society Standard Testing and Materials</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
USDA	<i>United State Department of Agriculture</i>
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitros
mL	Mililitros
mL	Miligramas
Nm	Nanômetro
Pa	Pascal
rpm	Rotações por minutos
gpm	Golpes por minutos
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
mEq	Miliequivalentes
kgf	Quilograma força
kGy	Quilogray

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	Proteínas do soro de leite	22
2.2	Embalagens para alimentos	24
2.2.1	<i>Embalagens antimicrobianas</i>	26
2.3	Conservantes alimentares	28
2.4	Nanocompósitos e nanoargila montmorilonita	31
2.5	Filmes e revestimentos a base de proteínas do soro de leite	35
2.6	Ovos	37
2.6.1	<i>Qualidade de ovos</i>	40
2.6.2	<i>Microbiologia dos ovos</i>	42
2.6.3	<i>Embalagens tradicionais para ovos</i>	48
2.6.4	<i>Revestimentos para ovos</i>	49
3	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE SOLUÇÃO FILMOGÊNICA A BASE DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE	72
3.1	Introdução	75
3.2	Material e métodos	75
3.2.1	<i>Material</i>	75
3.2.2	<i>Manutenção e padronização da cepa de Salmonella</i>	75
3.2.3	<i>Determinação da concentração inibitória mínima de conservantes alimentares</i>	76
3.2.4	<i>Elaboração da solução filmogênica de isolado proteico de soro</i>	77
3.2.5	<i>Otimização da solução filmogênica de isolado proteico de soro</i>	78
3.2.6	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	79
3.2.7	<i>Diâmetro de halo inibitório (DHI): atividade antimicrobiana dos filmes</i>	80
3.2.8	<i>Viscosidade da solução filmogênica</i>	81
3.3	Resultados e discussão	81
3.3.1	<i>Concentração inibitória mínima dos conservantes alimentares</i>	81
3.3.2	<i>Otimização da solução filmogênica de isolado proteico de soro</i>	83
3.3.3	<i>Viscosidade da solução filmogênica</i>	87

3.4	Conclusão	89
4	AVALIAÇÃO DE OVOS BRANCOS REVESTIDOS COM ISOLADO PROTEICO DE SORO	93
4.1	Introdução	96
4.2	Material e métodos	97
4.2.1	<i>Avaliação de qualidade interna dos ovos</i>	97
4.2.1.1	<i>Escolha dos ovos para o experimento</i>	97
4.2.1.2	<i>Aplicação do revestimento nos ovos</i>	97
4.2.1.3	<i>Análise dos ovos</i>	98
4.2.1.3.1	Perda de peso	98
4.2.1.3.2	Porcentagem de casca, gema e albúmen	98
4.2.1.3.3	Unidade Haugh (UH)	99
4.2.1.3.4	Índice de gema (IG)	99
4.2.1.3.5	pH da gema e albúmen	99
4.2.1.3.6	Qualidade da espuma	100
4.2.2	<i>Avaliação da qualidade externa dos ovos</i>	100
4.2.2.1	<i>Escolha dos ovos para o experimento</i>	100
4.2.2.2	<i>Análises</i>	101
4.2.2.2.1	Resistência à quebra	101
4.2.2.2.2	Mensuração da cor das cascas	102
4.2.2.2.3	Hidrofilicidade e estrutura das cascas	103
4.2.3	<i>Avaliação microbiológica das cascas dos ovos</i>	104
4.2.3.1	<i>Escolha dos ovos para o experimento</i>	104
4.2.3.2	<i>Análise de Salmonella na casca dos ovos</i>	104
4.2.3.2.1	Manutenção e padronização da cepa de <i>Salmonella</i>	104
4.2.3.2.2	Montagem do experimento e inoculação da <i>Salmonella</i>	104
4.2.3.2.3	Monitoramento do crescimento bacteriano	105
4.2.4	<i>Análise de fungos na casca dos ovos</i>	106
4.2.4.1	<i>Manutenção dos fungos</i>	106
4.2.4.2	<i>Preparo das soluções de esporos</i>	106
4.2.4.3	<i>Montagem do experimento e monitoramento do crescimento fúngico</i>	106
4.2.5	<i>Análise sensorial dos ovos</i>	107
4.2.5.1	<i>Escolha dos ovos para o experimento</i>	107

4.2.5.2	<i>Aplicação de teste com consumidores</i>	108
4.2.6	<i>Análises estatísticas</i>	108
4.3	Resultados e discussão	109
4.3.1	<i>Perda de peso</i>	109
4.3.2	<i>Porcentagem de casca, gema e albúmen</i>	111
4.3.3	<i>Unidade Haugh</i>	113
4.3.4	<i>Índice de gema</i>	115
4.3.5	<i>pH do albúmen e gema</i>	117
4.3.6	<i>Qualidade de espuma</i>	120
4.3.7	<i>Estrutura das cascas e resistência dos ovos à quebra</i>	125
4.3.8	<i>Cor das cascas</i>	128
4.3.9	<i>Hidrofilicidade das cascas</i>	130
4.3.10	<i>Análise de Salmonella na casca dos ovos</i>	131
4.3.11	<i>Análise de fungos na casca dos ovos</i>	133
4.3.12	<i>Análise sensorial dos ovos</i>	136
4.4	Conclusão	138
4.5	Considerações finais	138
	REFERÊNCIAS	139
	APÊNDICE A – TABELAS REFERENTES À ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS DADOS DA PESQUISA	152
	APÊNDICE B – FIGURAS REFERENTES AO TESTE SENSORIAL DOS OVOS	161
	APÊNDICE C – TABELAS COM OS VALORES MÉDIOS PARA OS PARÂMETROS DE QUALIDADE INTERNA E MICROBIOLÓGICO DOS OVOS	169
	APÊNDICE D – IMAGENS DOS OVOS	175