



Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Caracterização estrutural e potencial da galactomanana de *Adenanthera pavonina* L. como matéria-prima para produção de filmes comestíveis
bioativos

Carlos Eduardo Alves Soares

Fortaleza-CE

2009

Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Carlos Eduardo Alves Soares

Caracterização estrutural e potencial da galactomanana de *Adenanthera pavonina* L. como matéria-prima para produção de filmes comestíveis
bioativos

Tese submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Orientador: Renato de Azevedo Moreira

Fortaleza-CE

2009

S653c Soares, Carlos Eduardo Alves

Caracterização estrutural e potencial da Galactomanana de *Adenanthera Pavonina L.* como matéria-prima para produção de filmes comestíveis bioativos / Carlos Eduardo Alves Soares, 2009.

261 f. ;il. color. enc.

Acompanha lista de publicações e resumos.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Área de concentração: Bioquímica vegetal

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2009.

1. Atividade de água 2. Reologia 3. Nisina 4. Bioensaio I. Moreira, Renato de Azevedo (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta obra é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Tese aprovada em: 31/03/2009

Carlos Eduardo Alves Soares

Banca examinadora:

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal do Ceará

Orientador

Profa. Dra. Nágila Maria Pontes S. Ricardo

Dep. de Química Orgânica e Inorgânica

Universidade Federal do Ceará

Conselheiro

Profa. Dra. Ana Cristina de O. M. Moreira

Centro de Ciências da Saúde

Universidade de Fortaleza

Conselheiro

Prof. Dr. Ícaro Gusmão Pinto Vieira

Parque de Desenvolvimento Tecnológico

Conselheiro

Profa. Dra. Diana Magalhães de Oliveira

Faculdade de Medicina Veterinária

Universidade Estadual do Ceará

Conselheiro

“I have no spur to prick the sides of my intent,
but only vaulting ambition, which o’erleaps
itself.”

Macbeth, ato I, cena 7.

À minha família dedico

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira orientador, amigo e grande incentivador, e que permitiu minha saída do país para realizar um trabalho de qualidade e, sobretudo, deu orientação científica para que esta Tese fosse conduzida da melhor forma possível.

Ao Prof. Dr. Lorenzo Miguel Pastrana Castro, co-orientador e amigo, sobretudo, dono de um humor e carisma únicos.

Ao Prof. Dr. Ícaro P. Gusmão Vieira pela colaboração e auxílio na interpretação dos experimentos de RMN e por sua amizade.

A Profa Dra. Nágila Maria Pontes S. Ricardo pela valiosa colaboração e por aceitar convite em participar desta banca.

A Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira M. Moreira por aceitar o convite em participar desta banca.

A Profa. Dra. Diana Magalhães de Oliveira por aceitar participar desta banca e pela sua estimada amizade.

As Professoras Doutoras Marisa Rúa, Ana Torrado e Clara Tovar pelas orientações, sugestões e colaboração durante minha estadia em Ourense na Espanha;

Ao Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados, Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza;

Ao Laboratório de Biotecnoloxia, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidade de Vigo, Campus de Ourense, Ourense, Espanha;

Ao Centro de Apoio Científico e Tecnolóxico á Investigación, Universidade de Vigo, Ourense, Espanha;

Departamento de Física Aplicada, Facultade de Ciencias de Ourense, Universidade de Vigo, Campus de Ourense, Ourense, Espanha;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará;

A Facultade de Ciencias de Ourense da Universidade de Vigo, Campus de Ourense, Ourense, Espanha;

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará;

Ao Parque de Desenvolvimento Tecnológico;

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará;

Ao curso de Farmácia da Universidade de Fortaleza;

Ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal;

Às Instituições:

Ao Programa de Valorização de produtos Naturais αLFA-VALNATURA do Europe Aid-Cooperation Office pela concessão da bolsa de estágio doutorado na Espanha;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado ao aluno;

Ao Conselho Nacional de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos auxílios fornecidos;

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos auxílios fornecidos;

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia.

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1 – Principais características dos polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC). 33

Tabela 1.2 – Razão manose/galactose para galactomananas de sementes de leguminosas. 42

Capítulo 2

Tabela 2.1 – Aplicações alimentícias das galactomananas de sementes. 29

Tabela 2.2 – Comparação de composição elementar para amostras de galactomanana de *A. pavonina* (GLMAP), locust bean (LB) goma guar (GG) e goma tara (GT). 73

Tabela 2.3 – Composição monossacarídica da galactomanana de sementes de *A. pavonina* estimada pela integração das áreas relativas da região anomérica no espectro de RMN ^1H . 78

Tabela 2.4 – Composição monossacarídica da galactomanana de *A. pavonina* estimada por diferentes métodos. 79

Tabela 2.5 – Deslocamentos químicos (em ppm) dos picos no espectro RMN ^{13}C -BB da galactomanana de sementes de *A. pavonina*. 81

Tabela 2.6 – Correlação entre os deslocamentos químicos obtidos do diagrama de contorno HSQC (RMN ^1H X RMN ^{13}C -BB, ppm) para a galactomanana de *A. pavonina*.

92

Capítulo 3

Tabela 3.1 – Efeito da concentração de galactomanana de <i>A. pavonina</i> sobre as propriedades do espectro mecânico medido a 25 °C.	142
Tabela 3.2 – Efeito do glicerol sobre as propriedades da curva de escoamento a 20 °C da suspensão de amido de milho gelatinizado.	150
Tabela 3.3 – Efeito do glicerol sobre as propriedades da curva de escoamento medida a 20 °C de suspensões da blenda galactomanana-amido.	155
Tabela 3.4 – Efeito do glicerol sobre as propriedades do espectro mecânico medido a 20 °C de suspensões de amido de milho gelatinizado e da blenda galactomanana-amido.	166
Tabela 3.5 – Teste gravimétrico de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido.	168
Tabela 3.6 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis de galactomanana de <i>A. pavonina</i> .	171
Tabela 3.7 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis feitos de galactomanana de <i>A. pavonina</i> .	175
Tabela 3.8 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis feitos de amido de milho gelatinizado.	177
Tabela 3.9 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis feitos de amido de milho gelatinizado.	180
Tabela 3.10 – Equações da umidade (H%) e da a_w relacionadas às quantidades de amido e de galactomanana (GLMAp) adicionada aos filmes comestíveis estudados.	184
Tabela 3.11 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para medida da atividade de água em filmes produzidos a partir da blenda galactomanana-amido (7,0-3,0) em distintas temperaturas (15 °C, 25 °C e 35 °C).	191
Tabela 3.12 – Ajustes de filmes comestíveis obtidos a partir da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 com distintas concentrações de glicerol.	194

Tabela 3.13 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para curvas de adsorção/desorção de filmes da blenda galactomanana-amido (7,0-3,0).197

Tabela 3.14 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para curvas de adsorção de filmes da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0. 208

Tabela 3.15 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para curvas de adsorção de filmes da blenda galactomanana-amido-nisina 7,0-3,0. 209

Capítulo 4

Tabela 4.1 – Diâmetro da zona de inibição de crescimento (em cm) determinado no bioensaio com diferentes microorganismos em distintas condições de preparo do antimicrobiano nisina. 242

Lista de Quadros

Capítulo 3

Quadro 3.1 – Matriz experimental desenhada para preparo das blendas de galactomanana-amido. O volume final para todos os tratamentos é igual a 10 mL. 139

Capítulo 5

Quadro 5.1 – Resumo geral dos resultados obtidos nesta Tese para as matérias-primas e os filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina. 263

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 – Modelo proposto para a arquitetura da parede celular vegetal mostrando a distribuição das matrizes e a organização dos distintos polissacarídeos que a constituem.

34

Figura 1.2 – Estrutura parcial das galactomananas.

35

Figura 1.3 – Estrutura molecular da galactomanana de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*).

36

Figura 1.4 – Modelo proposto para a arquitetura da parede celular vegetal mostrando a distribuição das matrizes e a organização dos distintos polissacarídeos que a constituem.

37

Figura 1.5 – Estrutura parcial das galactomananas.

41

Capítulo 2

Figura 2.1 – Parede celular vegetal mostrando a área de localização das hemiceluloses e da celulose.

62

Figura 2.2 – Diagramas adiabáticos de fragmentos oligoméricos de galactomananas resultantes dos ângulos de rotação Φ e Ψ para a ligação glicosídica e suas respectivas representações moleculares nas conformações de mais baixa energia. (I) resíduos de MAN-MAN-, (II) MAN(GAL)-MAN-, (II) MAN-MAN(GAL)- e (III) MAN(GAL)-MAN(GAL)-, respectivamente. (Adaptada de Petkowicz *et al.*, 1998a).

63

Figura 2.3 – Fluxograma do método 1 (Mt1) de extração da galactomanana do endosperma de sementes de *A. pavonina*.

68

- Figura 2.4** – Fluxograma do método 2 (Mt2) de extração da galactomanana do endosperma de sementes de *A. pavonina*. 69
- Figura 2.5** – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O . 77
- Figura 2.6** – Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O . 80
- Figura 2.7** – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O , mostrando o desdobramento da região anomérica do carbono 1 de resíduos de D-manose e D-galactose. 86
- Figura 2.8** – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O , mostrando o desdobramento da região dos carbonos 2, 3, 4, 5 e 6 dos resíduos de D-manose e D-galactose. 87
- Figura 2.9** – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -BB mostrando a região do carbono 4 do resíduo de D-manose (M4) da galactomanana de *A. pavonina* (L.). 88
- Figura 2.10** – Estruturas possíveis para os padrões de substituição no resíduo de D-manose da galactomanana de *A. pavonina* (L.). 89
- Figura 2.11** – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (135°) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O . 90
- Figura 2.12** – Diagrama de contorno HSQC ^1H -RMN X ^{13}C -BB da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O . 91
- Figura 2.13** – Espectro de absorção na região IV da galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.). 94

Figura 3.1 – Espectro mecânico de uma solução diluída de dextrana 5% (Fonte: STEFFE, 1992).	115
Figura 3.2 – Espectro mecânico de uma solução concentrada de λ -carragenana 5% (Fonte: STEFFE, 1992).	116
Figura 3.3 – Espectro mecânico de um gel feito de ágar 1% (Fonte: STEFFE, 1992).	117
Figura 3.4 – Variação do ângulo de fase (δ) em função da freqüência (ω) para materiais típicos.	118
Figura 3.5 – Mapa de estabilidade química e bioquímica em função da ativida água.	120
Figura 3.6 – Tipos de isotermas de adsorção. Em (A) isoterma tipo I, em (B) isoterma tipo II e em (C) isoterma tipo III.	123
Figura 3.7 – Modelo proposto para caracterizar a dinâmica da água na superfície da monocamada dos materiais.	126
Figura 3.8 – Módulos de armazenamento (G' , em A) e de dissipação de energia (G'' , em B) em função da freqüência para soluções de galactomanana de <i>Adenanthera pavonina</i> em distintas concentrações.	141
Figura 3.9 – Perda de tangente de δ (em A) e sobreposição dos módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') de energia, (em B), ambos em função da freqüência para solução de galactomanana de <i>Adenanthera pavonina</i> 1,4% (m/v).	143
Figura 3.10 – Sobreposição dos módulos de armazenamento (G') e dissipação de energia (G'') em função da freqüência para solução de galactomanana de <i>Adenanthera pavonina</i> 1,0% (m/v).	147
Figura 3.11 – Curvas de escoamento de dispersões de amido de milho (5%) gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). Em A e C temos o escoamento ascendente e em B e D temos o escoamento descendente.	148

Figura 3.12 – Viscosidade aparente em função da taxa de deformação de dispersões de amido (5%) gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). Em A e C temos o escoamento ascendente e em B e D temos o escoamento descendente.

149

Figura 3.13 – Curvas de escoamento de blendas de galactomanana-amido gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). Em A e C temos o escoamento ascendente e em B e D temos o escoamento descendente. 153

Figura 3.14 – Viscosidade aparente em função da deformação de blendas de galactomanana-amido gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). 154

Figura 3.15 – Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado sem glicerol (30%). 157

Figura 3.16 – Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado com glicerol (A) e (B).

158

Figura 3.17 – Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da freqüência de blenda de galactomanana-amido gelatinizado com glicerol (A) e (B). 159

Figura 3.18 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado sem glicerol. 162

Figura 3.19 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado com glicerol. 163

Figura 3.20 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de blenda de galactomanana-amido gelatinizado sem glicerol. 164

Figura 3.21 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de blenda de galactomanana-amido gelatinizado com glicerol. 165

Figura 3.22 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) de filmes comestíveis feitos a partir da blenda galactomanana-amido (7,0-3,0) secas por dois métodos de secagem. A diferença entre as isotermas quando comparadas é marcante no limite superior de a_w . 170

Figura 3.23 – Plot da isoterma B.E.T. para filmes comestíveis produzidos a partir da galactomanana de *A. pavonina*. 173

Figura 3.24 – Isoterma de adsorção (a 25 °C) de filme comestível de galactomanana de *Adenanthera pavonina*. 174

Figura 3.25 – Plot da isoterma B.E.T. para filmes comestíveis produzidos a partir de amido de milho gelatinizado. 178

Figura 3.26 – Isoterma de adsorção (a 25 °C) de filme comestível de amido de milho gelatinizado. 179

Figura 3.27 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido. 183

Figura 3.28 – Evolução da umidade (%) estimada na a_w de 0,11 em relação às quantidades de dispersão de amido (mL) e de solução de galactomanana de *A. pavonina* (mL) adicionadas aos filmes comestíveis. 185

Figura 3.29 – Evolução dos valores experimentais da $a_w=0,75$ em relação às quantidades de dispersão de amido (mL) e de solução de galactomanana de *A. pavonina* (mL) adicionadas em filmes comestíveis. 186

Figura 3.30 – Evolução dos valores experimentais da $a_w=0,90$ em relação às quantidades de dispersão de amido (mL) e de solução de galactomanana de *A. pavonina* (mL) adicionadas em filmes comestíveis. 187

Figura 3.31 – Isotermas de adsorção de filmes comestíveis baseados na blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 medidas em temperaturas distintas. 190

Figura 3.32 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) de filmes comestíveis obtidos a partir da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 preparados com distintas concentrações de glicerol.

Figura 3.33 – Isotermas de adsorção/desorção (a 25 °C) do filme comestível feito a partir da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0. O fenômeno da histerese é evidenciado.

196

Figuras 3.34 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) dos filmes comestíveis baseados nos complexos galactomanana-amido 7,0-3,0 (símbolos abertos) e galactomanana-amido-nisina 7,0-3,0 (símbolos cheios).

207

Figura 3.35 – Plots das isotermas B.E.T. para filmes comestíveis baseados nos complexos galactomanana-amido 7,0-3,0 (A) e galactomanana-amido-nisina 7,0-3,0 (B).

210

Figura 3.36 – Termograma por DSC da galactomanana de *Adenanthera pavonina*.²¹²

Figura 3.37 – Termograma por DSC do filme comestível feito a partir da blenda galactomanana-amido de milho.

213

Figura 3.38 – Termograma por DSC do filme feito a partir da blenda galactomanana-amido de milho contendo o antimicrobiano nisina ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$).

214

Capítulo 4

Figura 4.1 – Embalagem bioativa (A) contendo antimicrobiano incorporado e sistema de cobertura comestível (B).

232

Figura 4.2 – Representação do teste do halo de inibição em placa de Petri para estudo da ação de bacteriocinas. Em a temos o poço controle, em b temos a dose 1 que é maior que a dose 2 (em c).

235

Figura 4.3 – Bioensaio de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina contra *Lysteria monocitogenes*. A concentração de nisina utilizada foi de $0,1 \text{ mg/mL}$.

246

Figura 4.4 – Bioensaio de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina contra *Lysteria monocitogenes*. A concentração de nisina utilizada foi de $0,25 \text{ mg/mL}$.

247

Figura 4.5 – Número de unidades formadoras de colônias visualizadas em placas de bioensaio dos filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amidonisina contra *Lysteria monocitogenes*. 248

Abreviações, siglas e definições

a_w – Atividade de água.

B.E.T. – Brunauer-Emmet-Teller.

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CGL – Cromatografia Líquido Gás

RMN ¹³C – Ressonância Magnética do Carbono.

DEPT 135° – *Distortionless Enhacement by Polarization Transfer*

D₂O – Óxido de deutério.

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial.

G – Resíduo de galactose.

G.A.B. – Guggenheim-Anderson-de Boer.

GG – Goma guar.

GLB – Goma de *locust bean*.

GLMAp – Galactomanana de *A. pavonina*.

G-M – Resíduo de manose ramificado.

G' – Módulo de armazenamento de energia ou módulo elástico.

G'' – Módulo de dissipação de energia ou módulo viscoso.

GT – Goma Tara.

Q_s – Calor de sorção.

RMN ¹H – Ressonância Magnética do Próton.

IR – Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho

LAB – Bactérias do Ácido Lático.

PRPC – Polissacarídeo de Reserva de Parede Celular.

M – Resíduo de manose.

M/G – Razão manose/galactose.

mM – milimolar.

ω – Ômega ($2\pi f$).

tang (δ) – Tangente da razão G'/G'' .

Resumo geral

Neste trabalho de Tese, filmes comestíveis bioativos foram produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina. A galactomanana do endosperma de sementes de *Adenanthera pavonina* foi extraída e sua estrutura fina foi estudada através de técnicas de RMN. Sua razão M/G (=1,46) determinada e sua estrutura estão de acordo com o que foi relatado na literatura para galactomananas. Estudo de IR corroboram os dados de RMN obtidos nesse trabalho. Essa galactomanana apresentou comportamento reológico típico de gomas de sementes. Amido de milho gelatinizado foi empregado para produzir blendas com a galactomanana. Nos testes reológicos, o esforço aplicado para curvas de escoamento da dispersão de amido de milho gelatinizado e das misturas de galactomanana-amido não permitiu caracterizar adequadamente esses sistemas de polímeros em solução. Os ensaios oscilatórios, por sua vez, foram mais sensíveis para detectar as diferenças entre os distintos sistemas avaliados permitindo uma caracterização de maneira mais adequada. A construção de isotermas de sorção foi numa abordagem interessante para caracterizar filmes comestíveis produzidos a partir dos sistemas de blendas de polissacarídeos e do complexo galactomanana-amido-nisina. Diferenças significativas foram detectadas nesses filmes e permitiram relacionar o comportamento da água ao arranjo estrutural dos diferentes filmes comestíveis produzidos. A umidade foi observada como dependente de importantes parâmetros avaliados nos filmes, tais como a temperatura e o conteúdo de glicerol. O fenômeno da histerese foi evidenciado para os filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido. Finalmente, o modelo matemático de sorção descrito pela equação G.A.B. é sugerido como aquele que melhor representa os dados obtidos nas condições experimentais testadas aqui. As curvas de estabilidade térmica obtidas por DSC para a galactomanana e os filmes comestíveis, produzidos sem o antimicrobiano e contendo a nisina, permitiram associar os dados de DSC aos obtidos pelas medias de a_w , corroborando, no caso do filme contendo nisina, que o antimicrobiano contribui para uma maior hidratação do filme comestível. A presença de nisina nos filmes comestíveis produzidos com a blenda galactomanana-amido e glicerol reduziu o crescimento de *L. monocitogenes*, diminuindo o número de unidades formadoras de colônias e atuando como barreira para a contaminação. O estudo da ação da nisina através do teste do halo

de inibição e do bioensaio permitiu caracterizar os filmes comestíveis através do uso de técnicas satisfatórias. Finalmente, mais estudos devem ser conduzidos a fim de determinar se mudanças adicionais na composição ou na estrutura dos filmes poderiam modificar a atividade antimicrobiana devido à inativação da nisina ou alterando sua liberação.

Palavras-chaves: galactomananas, filmes comestíveis, atividade de água, amido, nisina, bioensaio

Abstract

In this thesis work, bioactive edible films were produced by using a galactomannan-starch-nisin blend. The galactomannan from the endosperm of seeds of *Adenanthera pavonina* was extracted and the fine structure of the gum endospermic was studied by NMR techniques. The reason M / G (= 1.46) was determined and its structure is in agreement with those reported in the literature for galactomannans. Study of IR data supported the NMR data obtained in this work. This galactomannan showed rheological behavior typical of seed gums. Gelatinized corn starch was used to produce blends with the galactomannans. In rheological tests, the force applied to the flow curves to the dispersion of gelatinized corn starch and mixtures of starch-galactomannan did not adequately characterize these polymer systems in solution. The oscillatory tests, in turn, were more sensitive to detect differences between the different systems evaluated allowing for a more appropriate characterization. The construction of the sorption isotherms was an interesting approach to characterize edible films produced from blends of systems of polysaccharides and starch-galactomannan-nisin blend. Significant differences were detected in these films and have to relate the behavior of water to the structural arrangement of various edible films produced. The humidity was as dependent on key parameters measured in films such as temperature and content of glycerol. The hysteresis phenomenon was shown to the edible films of starch-galactomannan blend. Finally, the mathematical model of sorption described by the G.A.B. equation is suggested as one that best represents the data obtained in experimental conditions tested here. Thermal stability curves obtained by DSC for galactomannan and edible films which produced without and with the antimicrobial agent nisin, led to associate the data with those obtained by aw, corroborating, in the case of the film containing nisin, the antimicrobial contributes to an increased hydration of the edible film. The presence of nisin in edible films produced with the starch-galactomannan blend and glycerol reduced the growth of *L. monocitogenes*, reducing the number of colony-forming units and acting as a barrier to contamination. The study of action of nisin through the test of the inhibition zone and the bioassay enabled characterization of the edible films through the using of good techniques. Finally, more studies should be conducted to determine whether additional changes in the composition

or the structure of the films could modify the antimicrobial activity due to inactivation of nisin or altering its release.

Keywords: galactomannans, edible films, water activity, starch, nisin, bioassay

Résumé

Dans ce travail de thèse, bio-films comestibles ont été produites à partir de mélanges d'amidon galactomananes-nisine. Les galactomananes de l'endosperme de graines d'*Adenanthera pavonina* ont été extraite et sa fine structure a été étudiée par des techniques RMN. La raison M / G (= 1,46) est déterminé et sa structure est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature pour galactomananes. Etude de l'IR a corroboré lesquelles données de RMN obtenus dans ce travail. Ce comportement rhéologique a montré typique comportement de solution des galactomananes. Amidon gélatinisé de maïs a été utilisé pour produire des mélanges avec les galactomananes. Dans les essais rhéologiques, a cause de la force appliquée aux courbes de flux de la dispersion d'amidon gélatinisé et de mélanges d'amidon-galactomannanes, les courbes n'ont pas représenté correctement les systèmes des polymères en solution. L'essai oscillatoire, à leur tour, ont été plus sensible pour détecter les différences entre les différents systèmes et il a permis une caractérisation plus approprié. La construction des sorption isothermes a été une approche intéressante pour caractériser les films comestibles produits à partir de mélanges de polysaccharides et d'amidon galactomananes-nisine. Des différences significatives ont été détectées dans ces films et ils sont rapportées le comportement de l'eau à la structure des différents films produits. L'humidité est aussi dépendante de paramètres clés (la température et la teneur de glycérol) mesurés dans des films. Le phénomène d'hystéresis est détecté dans les fims comestibles produit avec de la mélange d'amidon galactomananes. Enfin, le modèle mathématique de sorption décrite par l'équation de G.A.B. est proposé que celui qui représente les données obtenues dans des conditions expérimentales testées ici. Les courbes de la stabilité thermique obtenu par DSC des galactomananes et des films comestibles, sans et avec l'agent antimicrobien nisine, a conduit à associer les données avec celles obtenues par a_w , en corroborant, dans le cas du film contenant de la nisine que les antimicrobiens contribue à une augmentation de l'hydratation des films comestibles. La présence de la nisine dans les films comestibles produits avec la mélange d'amidon galactomananes et du glycérol réduit la croissance de *L. monocitogenes*, en réduisant le nombre d'unités formant des colonies et en agissant comme une barrière à la contamination. L'étude de l'action de la nisine par le test de

l'auréole d'inhibition et de l'essai biologique a permis la caractérisation des films comestibles par l'utilisation de bonnes techniques. Enfin, d'autres études devraient être menées pour déterminer si d'autres changements dans la composition ou la structure des films pourrait modifier l'activité antimicrobienne due à l'inactivation de la nisine ou de modifier sa libération.

Mots clés: galactomananes, films comestibles, activité de l'eau, amidon, nisine, bio-essais

Resumen

En este trabajo científico e Tesis, La estructura del polisacárido galactomanana del endospermo de semillas de *Adenanthera pavonina* fue estudiada a través de técnicas de RMN. Su razon M/G (=1,46) fue determinada y su estructura están en conformidad con lo que fue relatado en la literatura para galactomananas. El espectro de IR He confirmado los datos de RMN obtenidos en este trabajo. La galactomanana he presentado comportamiento reológico típico de gomas de semillas. Almidón de maíz gelatinizado fue empleado para producir blendas con la galactomanana. En las pruebas reológicas, El esfuerzo aplicado para curvas de flujo de la dispersión de almidón de maíz gelatinizado y de las mezclas de galactomanana-almidón non permitió caracterizar adecuadamente las mezclas en solución. Las pruebas oscilatorias, por su vez, fueron más sensibles para detectar las diferencias entre los distintos sistemas evaluados permitiendo una caracterización más adecuada. La construcción de isotermas de sorción represento una estrategia interesante para caracterizar los filmes comestibles producidos a partir de los sistemas de blendas de polisacáridos y del complejo galactomanana-almidón-nisina. Diferencias significativas fueron detectadas en estos films y permitieron relacionar el comportamiento del agua a la organización estructural de los diferentes films comestibles producidos. La humedad fue observada como dependiente de importantes parámetros evaluados en los films, tales como la temperatura y el contenido de glicerol. El fenómeno de la histéresis fue observado en los films comestibles de la blenda galactomanana-almidón. Finalmente, el modelo matemático de sorción descrito por la ecuación G.A.B. es sugerido como aquel que mejor ajusta los datos obtenidos en las condiciones experimentales probadas aquí. Las curvas de estabilidad térmica obtenidas por DSC para la galactomanana y los films comestibles, producidos sin el antimicrobiano y con la nisina, permitieron asociar los datos de DSC a los obtenidos por las mediciones de a_w , comprobando, en el caso del film con la nisina, que el antimicrobiano contribuye para una, más grande hidratación del film comestible. La presencia de la nisina en los filmes comestibles producidos con la blenda galactomanana-almidón y glicerol he reducido el crecimiento de *L. monocitogenes*, disminuyendo el número de las unidades formadoras de colonias y actuando como barrera para la contaminación. El estudio de la acción de la nisina a través de la prueba

del halo de inhibición y del bioensayo permitió caracterizar los films comestibles a través del uso de técnicas satisfactorias. Finalmente, mas estudios deben ser conducidos para determinar se mudanzas adicionales en la composición o en la estructura de los films podrían modificar la actividad antimicrobiana debido à la inactivación de la nisina o alterando su liberación.

Palabras clave: galactomananas, films comestibles, actividad del agua, almidón, nisina, bioensayo

Capítulo 1

Filmes comestíveis e Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular (PRPC) de *Adenanthera pavonina* L.

Sumário	Página
1. Introdução	30
1.1. Amido	31
1.2. Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular: o grupo das Galactomananas vegetais	32
1.3. Dinâmica da água em alimentos	43
1.4. Bateriocinas: Nisina	44
1.5. Caracterizaçao Botânica da planta <i>Adenanthera pavonina</i>	46
1.6. Potencial Biotecnológico de <i>A. pavonina</i>	46
1.7. Referências Bibliográficas	48

1. Introdução

A escolha e a elaboração dos materiais empregados para formar filmes comestíveis dependem, além do custo e da disponibilidade, de parâmetros como propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas (cor e opacidade), espessura, permeabilidade ao vapor d'água e gases como o CO₂ e O₂, solubilidade em água e propriedades sensoriais (GENNADIOS, 2002; NUSSINOVITCH, 2003; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006). Estas propriedades dependem do biopolímero utilizado (conformação, peso molecular, distribuição das cargas, polaridade), das condições de produção (pH, concentração do polímero, tratamento térmico da solução, tipo e teor de aditivos como plastificantes), bem como das condições ambientais, temperatura e umidade relativa, que são importantes devido à natureza higroscópica de biopolímero e do plastificante utilizados (GENNADIOS, 2002; AHVENAINEN, 2003; NUSSINOVITCH, 2003).

O uso de plastificantes é essencial para a produção de filmes comestíveis. Esses aditivos reduzem as interações intermoleculares das cadeias adjacentes do biopolímero, resultando no aumento da mobilidade destas cadeias e, consequentemente, um material flexível (GENNADIOS, 2002; AHVENAINEN, 2003). A diminuição da força e aumento da deformação na ruptura com o aumento da concentração do plastificante são comportamentos típicos desses tipos de filmes (NUSSINOVITCH, 2003). A presença de plastificantes diminui a intensidade das interações polímero-polímero com uma maior mobilidade de cadeias poliméricas e fazendo os filmes menos resistentes e mais deformáveis.

Os polissacarídeos consistem de longas cadeias contendo centenas e milhares de unidades de monossacarídeos. Os polissacarídeos mais abundantes, sintetizados pelas plantas são amido e celulose. Estes polissacarídeos consistem de recorrentes unidades de D-glucose, mas diferem entre si no tipo de ligação glicosídica. Outros polissacarídeos muito importantes são as hemiceluloses, componentes da parede celular de plantas que, além da função estrutural, podem também desempenhar um papel na defesa contra estresse hídrico (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Alguns dos polissacarídeos já utilizados na produção de filmes comestíveis são os amidos (FIGURA 1.1), especialmente os ricos em amilose, (PHAN *et al.*, 2005; BERTUZZI *et al.*, 2007a e 2007b; FLORES *et al.*, 2007a e 2007b; BOURTOOM; CHINNAN, 2008), quitosana (FIGURA 1.2, SIONKOWSKA *et al.*, 2004; BOURTOOM; CHINNAN, 2008; CASARIEGO *et al.*, 2008) e, mais recentemente as galactomananas (FIGURA 1.3, MIKKONEN *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.* 2009a e 2009b).

1.1.Amido

O amido é uma matéria-prima existente em abundância, de baixo custo e fácil manuseio, apresentando-se como uma alternativa na preparação de revestimentos comestíveis. Os grânulos de amido variam muito em sua forma e tamanho, dependendo do local da planta onde são obtidos (VANDAMME; DE BAETS; STEINBÜCHEL, 2002; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006). Na célula vegetal, o amido é armazenado em partículas sub-celulares chamadas grãos de amido. Os grãos de amido são compostos por duas estruturas poliméricas de D-glucose, amilose e amilopectina, contendo ainda água, lipídios, proteínas e íons minerais.

O filme desenvolvido a partir de amilose é descrito como isotrópico, inodoro, sem sabor, sem cor, e não tóxico podendo ser absorvido biologicamente. Exibe resistência física e propriedades mecânicas semelhantes ao filme plástico (STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006; BERTUZZI *et al.*, 2007a).

Procedimentos para a produção de revestimentos e filmes, com um elevado teor de amilose já foram desenvolvidos (RYU *et al.*, 2002; BERTUZZI *et al.*, 2007a; FLORES *et al.*, 2007a e 2007b). Entretanto, estes filmes têm baixa permeabilidade ao oxigênio (RYU *et al.*, 2002), em um intervalo de temperaturas de 5 a 45 ° C e uma umidade relativa com valores de até 50% (BERTUZZI *et al.*, 2007a). Com a adição de plastificantes aumenta a mobilidade da cadeia polimérica, a resistência à tensão, a flexibilidade e a permeabilidade ao vapor de água foram aumentadas (BERTUZZI *et al.*, 2007a). O revestimento baseado em amilose, quando aplicado às batatas e produtos derivados, melhora a aparência, textura, sabor e estabilidade (STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006).

A produção de ésteres como acetatos e fosfatos, e éteres, como os derivados do éter hidroxipropil pode ser induzida pela reação de grupos hidroxila do amido. Com ésteres foram produzidos filmes solúveis em água do amido de milho, com um teor de amilose hidroxipropilados em 1,1%, com um teor de amilose aparente em 71%. Este derivado hidroxipropil pode ser combinado com outros ingredientes para melhorar a sua flexibilidade e ajustar a taxa de resfriamento e/ou secagem, entre outros efeitos (AHVENAINEN, 2003; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006).

1.2. Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular: o grupo das Galactomananas vegetais

Dentre os principais produtos de reserva sintetizados pelas plantas, sem dúvida alguma os polímeros constituídos de unidades monossacarídicas são a estratégia evolutiva de maior sucesso. O amido é o mais amplamente distribuído, seguido pelos frutanos e depois pelos polissacarídeos de parede celular (PPC). Esses compostos de reserva apresentam características que os tornam mais convenientes para as células vegetais em determinadas situações (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Os polissacarídeos de parede celular são quimicamente inertes e sua solubilidade em água é bastante diferenciada. Por um lado, essas características representam uma vantagem quando comparados ao amido e aos frutanos, pois sugerem a existência de um compartimento celular especializado, ou seja, a própria parede celular, para o armazenamento daqueles polímeros. Por outro lado, isso implica num alto custo energético para sua síntese, secreção e montagem quando de sua deposição na parede celular. Esses polissacarídeos apresentam também outras funções tais como a dureza das sementes, participação em relações hídricas e expansão celular. Cabe aqui considerar que apenas para as galactomananas um caráter multifuncional foi demonstrado e do ponto de vista evolutivo é provável que essa segunda função tenha surgido e, ao longo do tempo, permanecido (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Com base em aspectos estruturais, os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) são agrupados em três grandes classes: as mananas, xiloglucanas e galactanas (REID *et al.*, 1979; BUCKERIDGE *et al.*, 2000). O grupo das mananas por

sua vez, é subdividido em mananas puras, glucomananas e galactomananas. As principais características dos PRPCs estão resumidas na Tabela 1.1.

Um recente modelo para a arquitetura da parede celular foi proposto (Figura 1.4) e com base nesse modelo, imagina-se que existam três matrizes básicas (celulose/hemicelulose, pectina e proteína). Os PRPCs são observados como as hemiceluloses constituintes da parede celular. Os diferentes componentes macromoleculares não celulósicos da parede celular se adaptaram, ao longo da evolução, ao papel de reserva nas sementes de diversas espécies. Ainda não se sabe por que tais adaptações surgiram, pois os polissacarídeos complexos da parede celular não oferecem qualquer vantagem aparente sobre amido, óleos ou proteínas estocadas intracelularmente como fontes de nutrientes para o desenvolvimento de plântulas (STEPHEN, 1995). Talvez a razão para a adaptação e permanência dos PRPCs tenha pouco a ver como material nutritivo, mas de fato seja mais relacionada às suas propriedades quanto materiais. As atuais aplicações industriais dos PRPCs estão baseadas na exploração de suas propriedades reológicas. É razoável supor que essas mesmas propriedades sejam importantes nas estratégias de germinação de sementes e evidência favorável acumula-se corroborando essa hipótese (STEPHEN, 1995).

Embora a funcionalidade comercial esteja ligada ao conteúdo e distribuição de galactose, nenhuma relação foi estabelecida entre o conteúdo de galactose e a função biológica. Pode ser considerado significativo que alguns grupos taxonômicos de leguminosas que são considerados mais primitivos têm galactomananas com os mais baixos graus de substituição e aquelas espécies nas tribos mais avançadas de Faboideae que são endospérmicas, possuem galactomananas com o mais alto grau de substituição. Polissacarídeos hemicelulósicos do tipo manana de parede celular são galactose substituídos, mas em pequenos percentuais. Isto talvez module sua interação com a celulose ou outros componentes da parede celular. Na parede celular de reserva da semente, que contém pouca ou nenhuma celulose ou outros polissacarídeos, interações moleculares mistas não são relevantes uma vez que as propriedades hidrofílicas das moléculas de galactomananas são importantes. Isto pode explicar aparentemente a tendência evolutiva através dos altos graus de substituição de galactose (STEPHEN, 1995).

Tabela 1.1 – Principais características dos polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC)^a.

Polissacarídeo	Cadeia principal	Ramificação	Localização na planta
Mananas	D-Manose	Nenhuma ou raramente D-Galactose	Sementes
Glucomananas	D-Manose e D-Glucose	D-Galactose	Sementes e órgãos subterrâneos
Galactomananas	D-Manose	D-Galactose	Sementes
Xiloglucanas	D-Glucose	D-Xilose, D-Galactose e D-Arabinose	Sementes
Galactanas	D-Galactose	D-Arabinose	Sementes

^aAdaptada de Buckeridge *et al.* (2000).

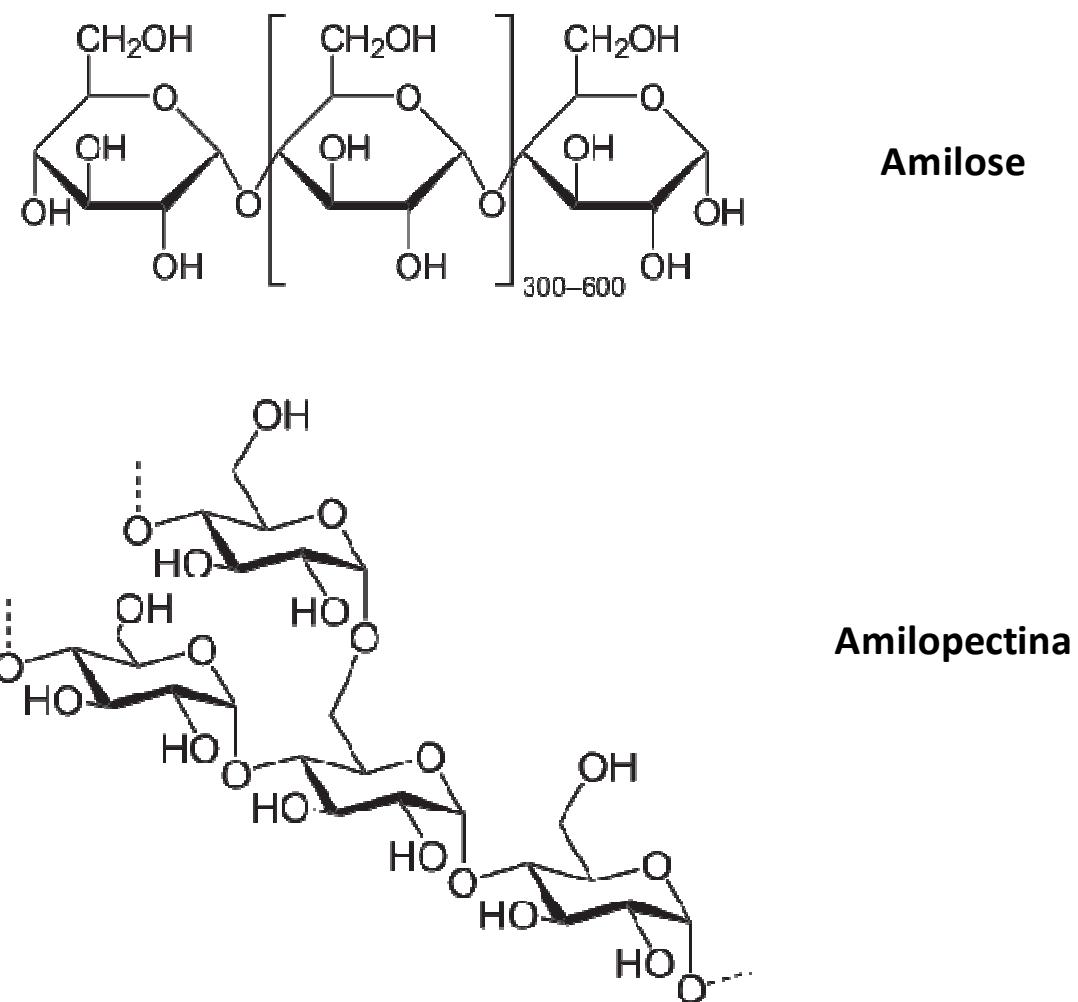
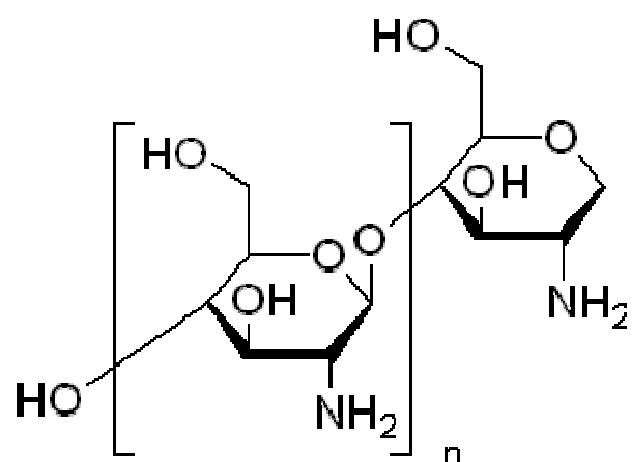
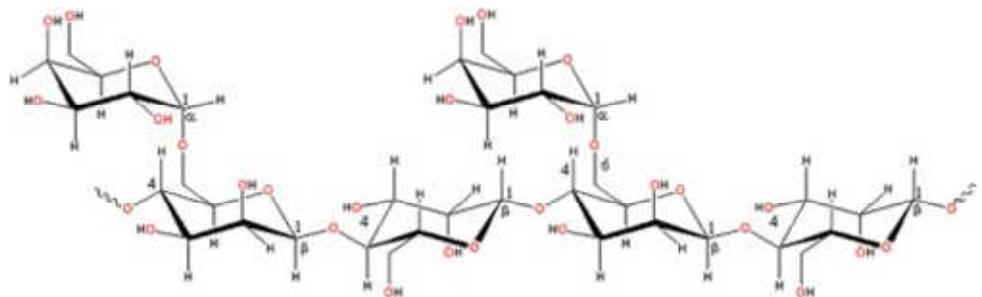


Figura 1.1 – Estrutura da molécula de amido. São mostrados os polímeros constituintes, amilose e amilopectina.



Quitosana

Figura 1.2 – Estrutura fundamental do biopolímero quitosana. A quitosana é obtida a partir da deacetilação parcial da quitina.



Goma de Guar

Figura 1.3 – Estrutura molecular da galactomanana de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*).

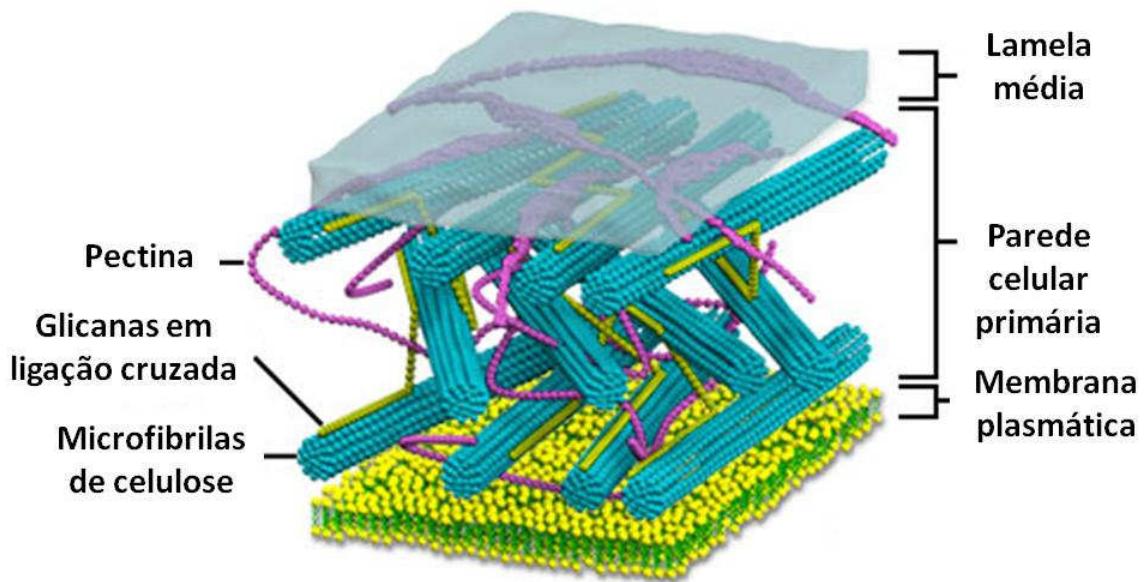


Figura 1.4 – Modelo proposto para a arquitetura da parede celular vegetal mostrando a distribuição das matrizes e a organização dos distintos polissacarídeos que a constituem. (Fonte: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>, acesso em 31/03/2009).

As galactomananas são consideradas polissacarídeos de reserva, normalmente presentes em endosperma de sementes da família Fabaceae (Leguminosae), (REID, 1985) e em menores quantidades das famílias Palmae, Annonaceae, Convolvulaceae, Ebenaceae e Loganiaceae (DEA; MORRISON, 1975; BUCKERIDGE *et al.* 2000). São ainda encontradas em fungos (DEA; MORRISON; 1975), liquens (RANOVICZ, 1997). Seu papel na planta também está relacionado com a manutenção e regulação da água durante a germinação além de proteção contra predadores (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). Durante a germinação, esses polissacarídeos são catabolisados para fornecer energia e esqueletos de carbono para o crescimento da planta (SINGHA *et al.* 1987).

A maioria dos estudos desenvolvidos com galactomananas visa, principalmente, o interesse comercial, com aplicações em diversas áreas da indústria (AZERO & ANDRADE, 2002). Estas aplicações são decorrentes das propriedades reológicas de soluções aquosas, formando soluções de alta viscosidade em baixas concentrações. As galactomananas são agentes amplamente utilizados como espessantes, estabilizantes, espessantes, encapsuladores, em uma variedade de aplicações industriais. Por que não serem digeríveis, podem ser utilizados para aumentar o teor de fibras nos alimentos (VANDAMME, DE BAETS; STEINBÜCHEL, 2002).

As galactomananas consistem de cadeias lineares de D-manose em ligação β - $(1 \rightarrow 4)$, com substituições de galactose unidas por ligações glicosídicas α - $(1 \rightarrow 6)$ às unidades de D-manose na cadeia linear (BUCKERIDGE *et al.*, 2000) como mostrado na Figura 1.2. As propriedades físico-químicas e conformação de galactomananas são estreitamente relacionadas com a relação M/G e a distribuição de galactose ao longo da principal cadeia. A solubilidade em água é afetada pelo grau de substituição de galactose na cadeia de manana. Apesar da relação M/G das galactomananas fornecer informações importantes, muitas vezes galactomananas com mesma relação podem apresentar propriedades muito distintas (BUCKERIDGE *et al.* 2000; AZERO; ANDRADE, 2002). Este fato pode ser explicado quando se observa a estrutura fina de cada um desses polissacarídeos. Esta distribuição de galactose ao longo da cadeia principal de manose pode se apresentar de forma aleatória, alternada ou em blocos (STEPHEN, PHILLIPS; WILLIAMS, 2006)

A galactomanana da goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) apresenta razão M/G de 3,5 e menor solubilidade em temperatura ambiente, quando comparado com a goma

Guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.), cuja relação M/G é de, aproximadamente, de 1,8 (VANDAMME, DE BAETS & STEINBÜCHEL, 2002). A Tabela 1.2 mostra a relação manose/galactose para galactomananas extraídas de diferentes espécies de leguminosas.

A relação M/G afeta as propriedades das galactomananas como solubilidade, susceptibilidade à degradação enzimática e interação molecular (PAI *et al.*, 2002; MAHAMMAD *et al.*, 2006; MAHAMMAD *et al.*, 2007). O teor de galactose no polissacarídeo também produz um efeito pronunciado sobre as suas propriedades reológicas. As galactomananas em água são soluções altamente viscosas, e as propriedades do polímero em solução, são controladas por características moleculares como o peso molecular e a estrutura química (MAHAMMAD *et al.*, 2007).

A investigação de novas fontes de galactomananas é da maior importância, tanto na área acadêmica e quanto na industrial. Países tropicais como o Brasil têm grande potencial como produtores de recursos renováveis, ainda não suficientemente explorados. O Brasil tem vastas áreas adequadas para o cultivo de leguminosas, uma importante fonte de galactomananas, como têm demonstrado as pesquisas que identificaram esses polissacarídeos em várias espécies desta família (AZERO & ANDRADE, 2002; EGOROV *et al.*, 2003; EGOROV *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2007). Embora muitas galactomananas tenham sido isoladas nos últimos anos, apenas as galactomananas de guar e de alfarroba são utilizados comercialmente. A goma alfarroba é a mais conhecida e uma das mais antigas gomas extraídas de sementes (STEPHEN, PHILLIPS; WILLIAMS, 2006).

As galactomananas também podem ser encontradas em fontes microbianas, leveduras e fungos, assim como D-manose e D-galactose são encontrados em outras plantas polissacarídeos, como glucomananas, mananas e galactanos (VANDAMME, DE BAETS & STEINBÜCHEL, 2002; STEPHEN, PHILLIPS & WILLIAMS, 2006).

A obtenção de galactomananas que possam substituir em parte ou totalmente as gomas tradicionais pode trazer muitos benefícios econômicos e sociais, levando-se em conta que estes polímeros não possuem nenhum valor agregado no momento. A demanda no Brasil por hidrocolóides e por polímeros biocompatíveis está crescendo, mas não obstante as condições favoráveis para a sua produção, as empresas nacionais dependem da importação de tais produtos. Pelo fato das galactomananas produzirem soluções aquosas de alta viscosidade, mesmo em baixas concentrações (0,5 a 1%) as tornam comercialmente úteis, especialmente como agentes espessantes). Suas

aplicações são múltiplas e encontram utilização em diversas áreas da indústria (MAHAMMAD *et al.*, 2007).

A galactomanana de *Adenanthera pavonina* (Carolina) foi usada como matriz de afinidade para o isolamento de lectinas ligantes de galactoses de sementes *Artocarpus incisa*, *Vitarea macrocarpa*, *Abrus precatorius*, *Abrus pulchellus*. Sua estrutura é típica das galactomananas de leguminosas, uma cadeia linear de D-manose com ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), e ramificações de galactose ligadas a unidades de D-manosil da cadeia principal por ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 6). A proporção M/G para *Adenanthera pavonina* é de 1,8:1 (TAVARES, 1998; MOREIRA *et al.* 2002).

Outras galactomananas, isoladas de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*, *Sophora japonica*, *Delonix regia*, *Schizolobium parahybae*, *Parkinsonia aculeata* (GARROS-ROSA, 2000; MATOS, 2000; BRAGA, 2002), também se mostraram capazes de se ligar a lectinas α -D-galactose ligantes e servirem de matrizes para isolamento das mesmas.

Estudos para caracterização estrutural de galactomananas também têm sido conduzidos por meio de RMN (EGOROV *et al.*, 2003; EGOROV *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2009). Através dessa técnica, esses polissacarídeos podem ser melhor caracterizados quanto à distribuição e variações nos padrões de ramificação dos resíduos α -D-galactopiranósil ao longo do esqueleto linear das unidades de β -D-manopiranósil. Vale destacar a natureza não destrutiva da espectroscopia de RMN o que possibilita a determinação da razão M/G de forma mais confiável. Esta razão pode ser facilmente obtida pelas áreas relativas dos sinais anoméricos dos resíduos de galactose e manose (VIEIRA, 2003).

Uma abordagem muito interessante da RMN consiste no estudo do comportamento de materiais em condições de fluxo, ou seja, caracterizar as mudanças de estrutura obtidas pela reologia tradicional por meio da análise dos espectros de RMN. Essa combinação de métodos de análise permite obter informações relevantes sobre mudanças estruturais induzidas pela dinâmica do fluxo (CALLAGAN & GIL, 1999; GABRIELE *et al.*, 2009).

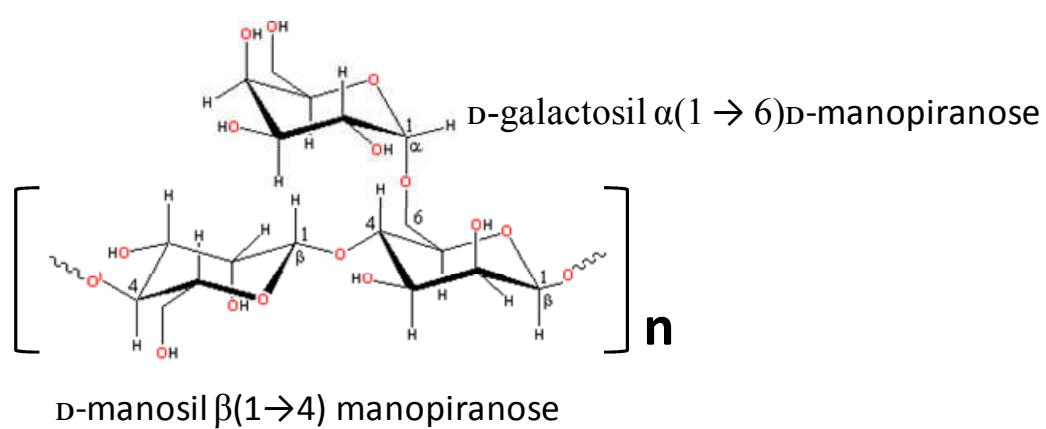


Figura 1.5 – Estrutura parcial das galactomananas.

Tabela 1.2 – Razão manose/galactose para galactomananas de sementes de leguminosas.

Espécie	M/G	Referência
<i>Adenanthera pavonina</i>	1,35	Cerqueira <i>et al.</i> 2009a
<i>Caesalpinea pulcherrima</i>	2,88	Cerqueira <i>et al.</i> 2009a
<i>Cassia fastuosa</i>	4,00	Reid, 1995
<i>Ceratonia siliqua</i>	3,50	Van Damme <i>et al.</i> 2002
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	1,80	Van Damme <i>et al.</i> 2002
<i>Dimorphandra gardneriana</i>	1,84	Cunha <i>et al.</i> 2009
<i>Dimorphandra mollis</i>	2,20- 2,70	Panagassi <i>et al.</i> 2000
<i>Gledtisia triacanthos</i>		
<i>Mimosa scabrella</i>	1,10	Ganter <i>et al.</i> 1995
<i>Schizolobium parahybum</i>	3,00	Ganter <i>et al.</i> 1995
<i>Senna multijuga</i>	2,30	Reid, 1995

1.3.Dinâmica da água em alimentos

O conceito sobre a atividade da água foi utilizado pela primeira vez para mostrar que microrganismos têm uma limitação quanto ao nível de atividade da água para seu crescimento e desenvolvimento. Atualmente este conceito ganhou grande importância de forma que, geral e intimamente, relacionam-se com propriedades microbianas, propriedades físicas e químicas dos gêneros alimentícios e/ou outros produtos dos quais a água faz parte estruturalmente (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

O papel da atividade de água (a_w) nos alimentos se relaciona com a estabilidade desses últimos e pode ser descrito de forma significativa, porque a água contribui de forma física e química nas reações deteriorativas. Este conceito é importante, útil e comumente utilizado para relacionar a segurança e a qualidade alimentar. Um dos métodos mais eficazes para preservação de alimentos é controlar o crescimento da deterioração microbiana e química por meio do controle da a_w (FENEMA, 2000).

A relação entre o teor de umidade de alimentos/água e alimento/atividade de água associa-se com o equilíbrio entre a atmosfera ao redor do alimento/amostra e uma solução saturada de sal. Assim, é possível a representação deste equilíbrio com a umidade neste relacionamento por meio de isotermas de sorção. Para compreender as relações da água em um sistema alimentar, é importante determinar a_w em níveis correspondentes a gama do conteúdo de água para o qual o produto alimentar pode ser objeto (FENEMA, 2000; BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

O intervalo de 0,2 a 0,3 de a_w em que a umidade da monocamada (Mo) representa o teor de umidade ideal corresponde à região onde os alimentos desidratados têm um prazo de validade máximo é crítico para muitas reações químicas e físicas. Acima da monocamada, muitas reações químicas requerem água livre para ocorrer, enquanto que abaixo dessa região, a taxa de oxidação de lipídeos aumenta o que pode comprometer o tempo de vida útil. Outra faixa em que mudanças de estado físico começam é de 0,35 para 0,45. Tais mudanças consistem basicamente de pegajosidade, dureza de textura e perda de *crispiness*, alteração para o estado amorfo que causa fenômenos irreversíveis como a recristalização de açúcares (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007). Essas alterações de estado físico também são controladas pela a_w que pode

definir com mais precisão os valores críticos de umidade, quando estas alterações começam (LABUZA *et al.*, 2004a).

Para se estudar a dinâmica da água em sistemas complexos como alimentos, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) desponta também como ferramenta indispensável. Trata-se de uma técnica termo analítica na qual a diferença da quantidade de calor requerida para aumentar a temperatura de uma amostra e um padrão são medidas como função da temperatura (GALLAGHER, 2002). Mudanças na distribuição da água podem ser correlacionadas com mudanças na textura do alimento. Assim, a transição de fase e a transição ao estado vítreo correspondem a duas abordagens que permitem melhor compreender as propriedades de textura de alimentos e ajudam a explicar mudanças que ocorrem durante o processamento e o armazenamento (LABUZA *et al.*, 2004b).

Morris e colaboradores (2009) estudaram os perfis de aquecimento e resfriamento de géis de gelatina e glucomanana Konjac por meio de DSC. Seus experimentos comparativos da gelatina (1 – 5 %) com uma blenda de Konjac e gelatina (0,2 e 5,0 %, respectivamente) utilizando calorimetria mostraram que existe interação entre os componentes da mistura o qual é consistente com a promoção de hélices triplas pela presença da glucomanana. Outros estudos envolvendo o uso da calorimetria na análise de misturas também mostraram que essa abordagem pode ser muito útil na elucidação de mecanismos do fenômeno da gelificação (ROGERS *et al.*, 2006; VITURAWONG *et al.*, 2008).

1.4.Bacteriocinas: Nisina

As bacteriocinas são pequenos peptídeos metabolicamente ativos sintetizados pelas bactérias do ácido láctico (LABs) que incluem os gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, entre outros. A produção de bacteriocinas se constitui em vantagem ao microrganismo produtor porque em quantidades suficientes podem inibir ou até mesmo matar outras bactérias competidoras pelo mesmo nicho ecológico ou pela mesma fonte de alimento (DEEGAN *et al.*, 2006).

Esses pequenos peptídeos antimicrobianos são sintetizados tanto por espécies de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, embora somente aqueles produzidos pelas LABs sejam de interesse da indústria alimentícia. Dessa maneira, bacteriocinas

podem ser exploradas como ferramentas naturais para controle de bactérias indesejadas em alimentos, o que provavelmente é mais aceitável para consumidores (NAIDU, 2000).

A maioria das bacteriocinas são agrupadas em duas classes, as bacteriocinas da classe I e as da classe II. As bacteriocinas da classe I são pequenos peptídeos, em geral menores que 5 kDa, termo-estáveis e extensivamente modificados após a tradução e que resulta na formação dos aminoácidos tioéter característicos lantionina e metilantionina. Baseado em sua similaridade estrutural, bacteriocinas da classe I são agrupadas em duas subclasses, as subclasses Ia (a nisina pertence a este grupo) e a subclasse Ib. Por outro lado, as bacteriocinas da classe II também são pequenos peptídeos, menores que 10 kDa, termo-estáveis, mas sem resíduos de lantionina. Sua natureza heterogênea faz qualquer subclassificação muito difícil (NAIDU, 2000).

Dentre as bacteriocinas disponíveis comercialmente, a Nisina, (ou group *N* inhibitory substance) produzida pela bactéria *Lactococcus lactis* e comercializada pelo nome NisaplinTM (descrição do produto-PD45003-7EN; Danisco, Copenhague, Dinamarca), tem sido efetiva em numerosos sistemas alimentícios, inibindo o crescimento de amplo espectro de bactérias Gram-positivas, tais como o importante patógeno de alimentos *Listeria monocytogenes*, bem como de esporos bacterianos (TAGG *et al.*, 1976).

Nisina é usada em mais de 48 países, sendo aprovada pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos e vendida como protetor natural de alimentos enlatados e laticínios e pelo Codex na União Européia (CODEX, 2008). Ela é especialmente efetiva quando usada no preparo de queijo processado e pasta de queijo onde protege contra organismos formadores de esporos, particularmente *Clostridium botulinum* (DEEGAN *et al.*, 2006).

Seu modo de ação envolve um mecanismo duplo: atua na formação de poros na membrana plasmática em espécies de bactérias alvo e na biosíntese de parede celular através da ligação ao lipídeo II, um passo que precede a formação do poro. O mecanismo duplo de ação confere a nisina uma atividade efetiva apenas com nM de concentração (BREUKINK *et al.*, 1999).

O uso de bacteriocinas na produção de embalagens bioativas de alimentos constitui uma aplicação potencial (LI *et al.*, 2006). Esse sistema combina as propriedades protetoras das bacteriocinas com materiais de embalagens convencionais as quais protegem o alimento de contaminação externa. Tais embalagens bioativas são

produzidas pela imobilização direta das bacteriocinas na embalagem do alimento ou pela introdução de um sachê contendo bacteriocina dentro da embalagem do alimento (NAIDU, 2000). Estudos envolvendo filmes bioativos feitos de amido de tapioca gelatinizado e nisina considerando a liberação gradual do antimicrobiano foram promissores (SANJURJO *et al.*, 2006). Um ponto muito importante a ser destacado diz respeito à estabilidade e habilidade de preservar a atividade da bacteriocina enquanto imobilizada no filme (SANJURJO *et al.*, 2006).

1.5.Caracterização botânica da planta *Adenanthera pavonina*

O gênero *Adenanthera* pertence à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Mimosoideae, tribo Mimosae. Compreende mais de 10 espécies tropicais da Ásia, Austrália e ilhas do Pacífico (HEGNAUER, 1996). Na Ásia, é conhecida como olho de dragão. Não existe qualquer registro oficial de quando essa planta foi introduzida no Brasil, mas ele encontrou um clima favorável para desenvolver-se e proliferar-se.

Apresenta crescimento rápido (alcançando de 15 a 20 metros de altura) e serve como bom dossel para plantas herbáceas, arbustivas e trepadeiras que não toleram altas intensidades luminosas. O cerne vermelho de *A. pavonina* é usado como um substituto da madeira do sândalo vermelho (*Pterocarpus sandalinus* L.), sendo assim, importante fonte fornecedora de madeira de boa qualidade para construções (BASU & CHAKRAVERTY, 1986). É utilizada em reflorestamentos, como planta ornamental e como forrageira na Tailândia, o cozimento das sementes e da madeira permite o seu uso no tratamento de infecções pulmonares, podendo também o produto ser aplicado externamente no tratamento da oftalmia crônica (BABURAJ & GUNASEKARAN, 1993).

1.6. Potencial biotecnológico de *A. pavonina*

Dois tipos de proteínas foram isoladas de sementes de *A. pavonina*: um inibidor de protease (RICHARDSON *et al.*, 1986; SILVA *et al.*, 1995) e uma quitinase

(SANTOS *et al.*, 2004). Esteróis glucosilados (MISRA *et al.*, 1973 e 1975), flavonóides (amelopsina, buteina, diidrorobinetina e robinetina; GENNARO *et al.*, 1972; HEGNAUER, 1996), triterpenoides (CHANDRA *et al.*, 1982) já foram isolados das sementes e da raiz desta planta, respectivamente.

Estudos de caracterização da goma de sementes de *A. pavonina* são escassos e nenhum estudo estrutural não foi relatado ainda. Somente Monteiro *et al.* (1997) e Moreira *et al.* (1998) relataram o uso da galactomanana como matriz de afinidade para purificar lectinas galactose ligantes. Embora esta planta mostre amplo potencial biotecnológico, seu potencial ainda é subexplorado, sobretudo, como fonte de polissacarídeos hemicelulósicos.

1.7.Referências Bibliográficas

- AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing** v. 21, pp. 551-556, 2002.
- AHVENAINEN, R (editor). **Novel Food Packaging Techniques**. 1st edition, New York, U.S.A., p.590, CRC Press, 2003.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FONTANA JR., A.; SCHMIDT, S.J.; LABUZA, T.P. **Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications**. IFT Press, BlackWell Publishing, Iowa, USA, 2007.
- BRAGA, R. C. **Goma endospérmica de Caesalpinia pulcherrima (L.): utilização como matriz de afinidade no isolamento de lectinas galactose-ligantes**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, pp. 88, 2002.
- BERTUZZI, M. A.; CASTRO VIDAURRE, E. F.; ARMADA, M.; GOTTFRED, J. C. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engeneering** 80, pp. 972-978, 2007a.
- BERTUZZI, M. A.; ARMADA, M.; GOTTFRED, J. C. Physicochemical characterization of starch based films. **Journal of Food Engineering**, 82, 17-25, 2007b.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, 38 (1/2), pp. 141–156, 2000.
- BOURTOOM, THAWIEN; CHINNAN, MANJEET S. Preparation and properties of rice starch - chitosan blend biodegradable film. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, 1633-1641, 2008.

BREUKINK, E.; WEIDEMANN, I.; VAN KRAAIJ, C.; KUIPERS, O. P.; SAHL, H.-G.; DE KRUIJFF, B. Use of cell wall precursor lipid II by a poreforming peptide antibiotic. **Science**, 286: 2361–2364, 1999.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B.W.S.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A.; CRUZ, L.; DIAZ, R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 8, pp. 1452-1459, 2008.

CALLAGHAN, P. T.; GIL, A. M. H-1 NMR spectroscopy of polymers under shear and extensional flow. **Rheologica Acta**, 38(6), pp. 528–536, 1999.

CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, in press**, 2009a.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; LIMA, A. M. P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; COIMBRA, M. A.; GONÇALVES, M. P.; VICENTE, A. A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers** 75, 408–414, 2009b.

CUNHA, P.L.R.; VIEIRA, I.G.P.; ARRIAGA, A.M.C.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Isolation and characterization o galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. Seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, 23, pp. 880-885, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS, **List Food Additives**, 2008.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal** 16:pp. 1058–1071, 2006.

EGOROV, A. V.; MESTECHKINA, N. M. ; SHCHERBUKHIN, V. D. Determination of the Primary and Fine Structures of a Galactomannan from the Seed of *Gleditsia triacanthos f. inermis* L. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 4, pp. 398–402, 2003.

EGOROV, A. V.; MESTECHKINA, N. M. ; SHCHERBUKHIN, V. D. Composition and Structure of Galactomannan from the Seed of *Gleditsia ferox* Desf. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 3, pp. 314–318, 2004.

FLORES; SILVIA; A. CONTE, C. CAMPOS, L. GERSCHENSON, M. DEL NOBILE. Mass transport properties of tapioca-based active edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 81, pp. 580–586, 2007a.

FLORES, SILVIA; FAMA, LUCIA; ROJAS, ANA M.; GOYANES, SILVIA; GERSCHENSON, LIA. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. **Food Research International**, v. 40, pp. 257–265, 2007b.

GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**. CRC Press LLC, 1st edition, p.650, 2002.

GALLAGHER, P.K. **Handbook of Thermal analysis and calorimetry**. Applications to polymers and plastics. v. 3. 1st edition, 2002.

GABRIELE, D.; MIGLIORI, M.; DI SANZO, R.; ROSSI, C. O.; RUFFOLO, S. A.; DE CINDIO., B. Characterisation of dairy emulsions by NMR and rheological techniques. **Food Hydrocolloids**, 23, pp. 619–628, 2009.

GARROS-ROSA, I. **Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* (L.): Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de lectinas ligantes de galactose**. Tese de

Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, pp. 114, 2000.

HARRINGTON, J. C.; MORRIS, E. R. An unusual manifestation of phase separation in mixtures of disordered gelatin with konjac glucomannan. **Food Hydrocolloids**, 23, 460– 467, 2009.

LABUZA, P.S., LABUZA, T.P. Cotton candy shelf-life. **Journal of Food Processing and Preservation** 28, pp. 274-287, 2004a.

LABUZA, T.; ROE, K.; PAYNE, C.; PANDA, F.; LABUZA, T. J.; LABUZA, P. S. & KRUSCH, L. Storage stability of dry food systems: influence of state changes during drying and storage. **Drying 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004)** São Paulo, Brazil, 22-25 August, vol. A, pp. 48-68, 2004b.

LI, B.; KENNEDY, J.F.; PENG, J.L.; YIE, X.; XIE, B.J. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. **Carbohydrate Polymers** 65 (4), 488-494, 2006.

MAHAMMAD, S.; PRUD'HOMME, R. K.; ROBERTS, G. W.; KHAN, S. A. Kinetics of Enzymatic Depolymerization of Guar Galactomannan. **Biomacromolecules**, 7 (9), pp 2583–2590, 2006.

MAHAMMAD, S.; COMFORT, D.A.; ROBERT M. K.; KHAN, S.A. Rheological Properties of Guar Galactomannan Solutions during Hydrolysis with Galactomannanase and alfa-Galactosidase Enzyme Mixtures. **Biomacromolecules** 8, pp. 949-956, 2007.

MATOS, V. C. **Gomas endospérmicas de Delonix regia e Schizolobium parahybae**. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, pp. 113, 2000.

MIKKONEN, KIRSI S.; RITA,HANNU; HELEN, HARRY; TALJA, RIKU A.; HYVONEN, LEA; TENKANEN, MAIJA. Effect of Polysaccharide Structure on Mechanical and Thermal Properties of Galactomannan-Based Films. **Biomacromolecules**, v. 8, pp. 3198-3205. 2007.

NAIDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC Press LLC, New York, U.S.A., 2000.

NUSSINOVITCH, A. **Water-soluble polymer applications in foods**. Blackwell Publishing, 1st edition, p.240, 2003.

PHAN, THE D.; DEBEAUFORT, F.; LUU, D.; VOILLEY, A. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, pp. 973-981, 2005.

PAI,V.; SRINIVASARAO, M.; KHAN, S.A. Evolution of Microstructure and Rheology in Mixed Polysaccharide Systems. **Macromolecules** 35, pp. 1699-1707, 2002.

REID, J. S. G. Structure and function in legume-seed polysaccharides, in: BRETT, C. HILLMAN, J .R. (Editors). **Biochemistry of the Plant Cell walls**, Cambridge University Press, pp.259-268, 1985.

ROGERS, M.A.; ROOS, Y.H.; GOFF, H.D. Structural heterogeneity and its effect on the glass transition in sucrose solutions containing protein and polysaccharide. **Food Hydrocolloids**, 20, 774–779.

RYU, S.Y.; RHIM, J. W.; ROH, H. J.; KIM, S. S. Preparation and physical properties of zein-coated high amylose corn starch film. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 35, 680-686, 2002.

SANJURJO, K.; FLORES, S.; GERSCHENSON, L.; JAGUS, R. Study of the performance of nisin supported in edible films. **Food Research International** 39, 749-754, 2006.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications**. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York, p.644, U.S.A., 2006.

STEPHEN, A. M. (Editor). **Food polysaccharides and their applications**. 1st Edition. Marcel Dekker, Inc. New York, p.644, U.S.A., 1995.

SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.J.; WESS, T.J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials** 25, 795-801, 2004.

TAGG, J. R., DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram- positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, 40: 722–756, 1976.

TAVARES, R. O. **Galactomanana de Adenanthera pavonina (L.) Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, pp. 95, 1998.

VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes**, vol. 6, Wiley-VCH; 1st Edition, p. 644, 2002.

VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; GALAO, M.I.; BRITO, E.S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry** 101, pp. 70–73, 2007.

VIEIRA, Í.G.P. **Estudo químico de Dimorphandra gardneriana (Leguminosae) e preparação de complexos de flavonóides com fosfolipídeos.** Fortaleza, Tese (doutorado) em Química Orgânica - Universidade Federal do Ceará, 2003.

VITURAWONG, Y.; ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M. Gelatinization and rheological properties of rice starch/xanthan mixtures: Effects of molecular weight of xanthan and different salts. **Food Chemistry**, 111, pp. 106–114, 2008.

Capítulo 2

Aspectos estruturais da galactomanana do endosperma de sementes *Adenanthera pavonina* L.

Sumário	Página
Resumo	56
Abstract	57
2.1. Introdução	58
2.1.1. O uso de galactomananas vegetais em alimentos	60
2.1.2. Métodos de extração de galactomananas vegetais	61
2.1.3. Aspectos estruturais de galactomananas	62
2.2. Hipótese e objetivos	64
2.3. Materiais e métodos	65
2.3.1. Material vegetal	65
2.3.2. Reagentes	65
2.3.3. Extração de galactomananas	65
2.3.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética do Próton (RMN ^1H)	65
2.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética do Carbono (^{13}C -BB)	67
2.3.6. Espectro DEPT 135° (<i>Distortionless Enhacement by Polarization Transfer</i>)	67
2.3.7. Espectro Bidimensional de Correlação Heteronuclear HSQC	67
2.3.8. Espectroscopia de Absorção na região do Infra Vermelho (IR)	70
2.4. Resultados e discussão	70
2.4.1. Isolamento e purificação da galactomanana	71
2.4.2. Interpretação do espectro de RMN ^1H	71
2.4.3. Interpretação do espectro de RMN ^{13}C -BB	74
2.4.4. Interpretação do espectro DEPT 135°	75
2.4.5. Interpretação do Diagrama de Contorno do espectro HSQC	76
2.4.6. Espectro de Absorção no IR	76
2.5. Conclusões	95
2.6. Referências	96

Resumo

No presente capítulo deste trabalho de tese, uma galactomanana de sementes de *Adenanthera pavonina* foi extraída, purificada e caracterizada por meio de técnicas de RMN e de espectroscopia de absorção na região de IR. Esta goma está localizada no endosperma de sementes de Leguminoseae. O rendimento obtido foi de 13% e está de acordo com o relatado na literatura para galactomananas vegetais. Foram empregados dois métodos de extração sendo que apenas um deles possibilitou obter uma goma livre de contaminação. O espectro RMN ^1H foi bem resolvido e a razão M/G (1,46) foi calculada pela integração das áreas relativas dos sinais da região anomérica. Os espectros ^{13}C -BB, DEPT 135° e HSQC da solução de galactomanana de *A. pavonina* em solução de D₂O também foram registrados. A cadeia principal desta galactomanana consiste de unidades $\beta(1\rightarrow4)$ -D-manoose ligadas com ramificações em $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-galactose. O espectro IR mostrou bandas comuns a polissacarídeos vegetais corroborando os dados obtidos com os experimentos de RMN. Concluindo, os resultados aqui apresentados sugerem a galactomanana de sementes de *A. pavonina* como uma nova fonte de gomas vegetais e com potencial para aplicações na indústria de alimentos.

Palavras-chaves: galactomananas, RMN, FT-IR, *Adenanthera pavonina*

Abstract

In the present study, a galactomannan from *Adenanthera pavonina* seeds was extracted, purified and characterized by NMR techniques and IR spectroscopy. This gum is located in endosperm of Leguminoseae seeds. The yield obtained was 13% and it is in agreement with that reported for plant galactomannans. Our procedure of extraction allows obtaining a gum without contamination. The ^1H -NMR spectrum was well resolved and the M/G ratio (1.46) was calculated by the relative area from signals of the anomeric region. The ^{13}C -BB, DEPT 135°, HSQC spectra of *A. pavonina* gum solution in D₂O were also recorded. The main chain of this galactomannan consists of $\beta(1\rightarrow4)$ -D-mannose units and $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-galactose linked. IR spectrum showed absorption bands common to plant polysaccharides and it corroborated the NMR data. In conclusion, our results suggest galactomannan from *A. pavonina* seeds as a new source of plant gum and with potential for food industry applications.

Keywords: galactomannans, NMR, FT-IR, *Adenanthera pavonina*

2.1. Introdução

Os hidrocolóides são materiais amplamente utilizados como agentes espessantes e estabilizantes na indústria de alimentos. Suas aplicações também se estendem a outros setores industriais tais como o farmacêutico, o de cosméticos, a produção de papel, explosivos e até mesmo a extração de petróleo. As propriedades dos hidrocolóides exploradas por esses diferentes setores industriais se fundamentam no comportamento daquelas substâncias quando em contato com água ou em produtos que possuem água em sua constituição/preparação.

Uma importante fonte de hidrocolóides são as sementes de algumas espécies vegetais, sobretudo as Leguminoseae (DIERCKX; DEWETTINCK, 2002). Algumas dessas espécies produtoras de gomas são bem conhecidas e têm sido plantadas e exploradas desde centenas até mesmo milhares de anos. Um dos exemplos melhor conhecidos é a goma de *locust bean* (GLB) extraída de sementes da planta *Ceratonia siliqua* L. que é originalmente nativa da área do Mediterrâneo e do Oriente Médio, mas que foi transportada para muitas outras partes do globo, incluindo Austrália e EUA.

De fato, o uso da GLB constitui uma prática bem antiga. Muito antes da Era Cristã, a pasta de *carob* já era utilizada pelos egípcios para embalsamar suas múmias, pelos gregos como laxativo e pelos árabes como padrão de pesagem. Nas Américas do Norte e Latina, a introdução da árvore *carob* se deu através de missionários espanhóis que a levaram e a introduziram na Califórnia e no México, respectivamente. Em 1856 mudas de *C. siliqua* foram trazidas da Espanha para os EUA e em 1859 de Israel. Naquele período, muitas árvores *carob* foram plantadas como ornamentais (DIERCKX; DEWETTINCK, 2002). Um fato interessante ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial quando o fornecimento de *locust bean* dos países do Mediterrâneo para os EUA sofreu uma acentuada redução. Diante de tal acontecimento, a busca por um substituto adequado para a GLB foi iniciada. A planta que eventualmente surgiu como uma rival da *locust bean* foi o guar (*Cyamopsis tetragonolobus*).

Como o locust bean, as sementes de guar rendem um alto nível de galactomanana do endosperma (*locust bean* 48%, guar 42%) e o rendimento de

galactomanana solúvel é cerca de 80%. A planta de guar é nativa do Nordeste da Índia e do Paquistão onde é de considerável importância. Guar significa “comida de vaca” em Híndi e na região asiática é histórico seu uso. Essa planta foi introduzida nos EUA no início do século XX (1903) e passou a ser explorada comercialmente em 1940. A tecnologia de extração do guar foi comercializada em 1953 nos EUA e dez anos mais tarde na Índia (DIERCKX; DEWETTINCK, 2002).

Dessa maneira, a grande importância das galactomananas para a indústria as torna um interessante tema sob aspectos estruturais o que justificaria as diferenças observadas nas distintas propriedades exploradas.

2.1.1. O uso de galactomananas vegetais em alimentos

Os Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular (PRPCs) são conhecidos como polissacarídeos comestíveis porque eles contribuem significativamente no incremento de fibras na dieta humana, além do fato de que são obtidos facilmente de sementes numa forma relativamente pura e são utilizados na indústria de alimentos como ingredientes, geralmente como espessantes ou estabilizantes ou devido as suas propriedades reológicas que são exploradas em produtos alimentícios. Dentre os principais PRPCs utilizados na indústria de alimentos estão as galactomananas desempenhando aquelas funções (STEPHEN, 1995). Galactomananas de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma de guar), *Ceratonia siliqua* (goma carob ou locust bean) e *Caesalpinia spinosa* (goma tara) têm sido bem exploradas comercialmente. Suas principais aplicações estão listadas na tabela 1.

A goma de locust bean (GLB) é totalmente solúvel quando aquecida a 80 °C em água, dessa maneira é utilizada como espessante pseudoplástico, mas também apresenta uma importante propriedade de sinergismo com a κ-carragenana (polissacarídeo de alga mainha) e xantana (polissacarídeo microbiano), formando géis que são elásticos, muito coesivos e relativamente livres de sinerese. Como estabilizante para sorvetes, as galactomananas são excelentes em conjunto com carragenana ou xantana. Em sorvetes, a ausência de gorduras é compensada pelo uso desses hidrocolóides conferindo textura adequada pela combinação dos polissacarídeos escolhidos. Misturas similares contendo GLB são utilizadas em géis que uma vez aquecidos formam soluções que são altamente recomendadas para molhos que acompanham preparados de carne, peixe ou mariscos (STEPHEN, 1995).

A goma de guar, que não forma géis com a xantana, é usada em preparações alimentícias similares. Quando na forma de pó, o guar apresenta coloração branca e propriedades de rápida hidratação e desenvolvimento de alta viscosidade. Um aspecto interessante é que a estabilidade do guar é função do tamanho de partícula (KRÖGER *et al.*, 1993). Por interações numa reação tipo Maillard, as galactomananas também podem ser usadas para melhorar a qualidade de proteínas de várias formas, tais como emulsificante, antioxidante ou como agente bactericida quando um antimicrobiano é

adicionado (lisozima, por exemplo), (NAKAMURA *et al.*, 1992a; NAKAMURA *et al.*, 1992b).

De modo particular, o grau de substituição de galactose do esqueleto de manana na goma de guar (que possui uma razão M/G=1,6) é consideravelmente mais alto que na GLB (M/G=3,5). Nenhuma delas é equivalente em suas funcionalidades comerciais. Ambas são efetivos espessantes (contudo o guar seja superior nesse aspecto), embora a GLB interaja mais com outros polissacarídeos que a goma de guar. As propriedades superiores de interação da GLB são relacionadas ao baixo grau de substituição de galactose e em geral gomas de galactomananas com baixo grau de substituição possuem propriedades interativas mais fortes que as gomas com alto grau de substituição. Essas diferenças têm sido observadas em galactomananas com idêntico grau de substituição. Isto tem sido atribuído a diferenças na estrutura fina envolvendo diferenças estatísticas na distribuição dos resíduos de galactose ao longo do esqueleto da molécula, interações sinergísticas sendo favorecidas pela alta freqüência de regiões contiguas de resíduos de D-manose não substituídos (DEA *et al.*, 1986).

O uso de galactomananas em preparações de filmes e coberturas comestíveis para alimentos é incipiente e poucos trabalhos na literatura podem ser encontrados (MIKKONEN *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2009 *in press*). Mikkonen *et al.* (2007) utilizaram galactomananas de guar e locust bean para produzir filmes. Nesse trabalho foi verificado que galactomananas com diferente razão M/G mostraram diferentes comportamentos das propriedades mecânica e térmica dos filmes produzidos. Cerqueira *et al.* (2009) trabalhando com galactomanana de *Gleditsia triacanthos* em distintas formulações (polissacarídeo, glicerol e óleo) produziram coberturas para queijo e verificaram que visualmente amostras de queijo cobertas com a preparação contendo galactomanana apresentaram menos contaminação por fungos que as amostras não cobertas. Desse modo, o resultado indica que coberturas baseadas em galactomananas constituem uma alternativa em relação às embalagens sintéticas.

Tabela 2.1 – Aplicações alimentícias das galactomananas de sementes*.

Uso alimentício	Função e aplicação
Produtos lácteos	Espessante para cremes e sobremesas láteas; sorvetes e queijo processado; retenção de umidade e aumento do flavour; substituto de gorduras.
Produtos diabéticos	Branqueador de café e formulações de comida infantil
Panificação	Misturas para sorvete e bolo; melhora a qualidade dos pães
Produtos em pó	Sobremesas e pudins de leite
Geléias e sobremesas	Solúveis em água quente, géis de frutas
Condimentados	Molhos e xaropes
Carne curada	Carne congelada enlatada (incluindo comida animal)
Bebidas	Espessante

*Adaptada de Stephen (1995).

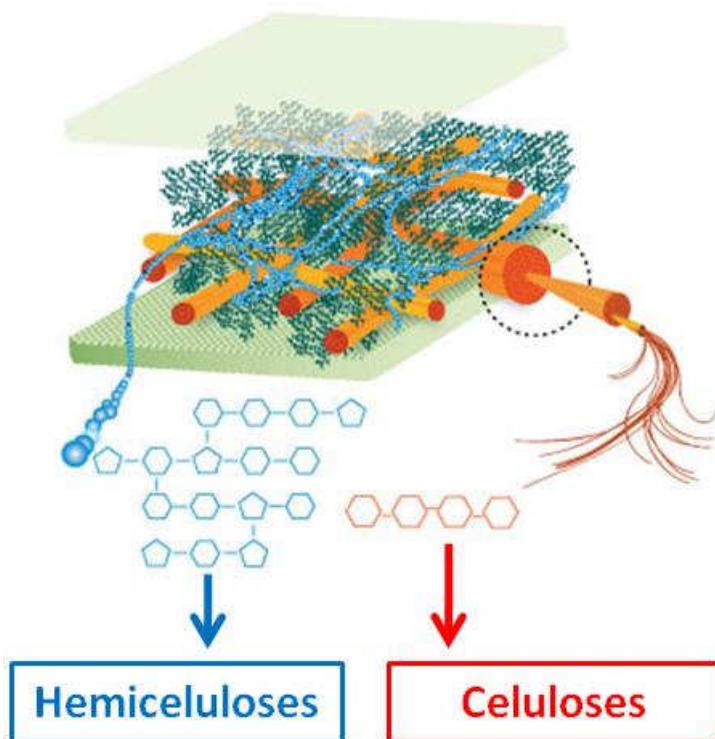


Figura 2.1 – Parede celular vegetal mostrando a área de localização das hemiceluloses e da celulose (Fontes: <http://www.ceres.net/AboutUs/AboutUs-Biofuels-Carbo.html>, acesso em 31/03/2009).

2.1.2. Métodos de extração de galactomananas vegetais

Nas sementes de fenugreek e guar, o endosperma não é vivo e suas células são praticamente preenchidas com galactomananas (McCLEDON *et al.*, 1976; REID, 1971). Em outras sementes como as de *C. siliqua* (goma locust bean), as células do endosperma são vivas e as galactomananas podem ser vistas como espessamento da parede celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Em alguns protocolos, a extração de galactomananas envolve primeiramente a moagem das sementes (STEPHEN, 1995; FRANCO *et al.*, 1996; CHAUBEY; KAPOOR, 2001; JOSHI; KAPOOR, 2003; ISHURD *et al.*, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2009). Em alguns casos, a farinha de sementes é delipidada (ISHURD *et al.*, 2004) antes que a galactomanana seja extraída. Embora Zawadki-Baggio *et al.* (1992) e Petkowicz *et al.* (1998b) recomendem que para a obtenção de uma galactomanana mais pura a película, tegumento e o embrião devam ser separados, esse procedimento não é uma abordagem fácil de se realizar para fins industriais.

A extração propriamente dita é feita com água quente (IKUTA *et al.*, 1997; ISHURD *et al.*, 2004; VIEIRA, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007) ou fria (STEPHEN, 1995) seguida de precipitação com álcool (para propósitos de pesquisa científica com etanol e para fins industriais com 2-propanol). Estes processos não diferem muito daqueles para outros PRPCs, tais como a maioria das xiloglucanas de parede celular primária que podem ser extraídas por soluções concentradas de hidróxido de sódio ou de potássio. Acredita-se que existe uma estreita ligação desta xiloglucana com a celulose. Alguns protocolos de extração de galactomananas também se baseiam em extrações com soluções básicas. Contrariamente, outra xiloglucana, a de reserva de parede celular de sementes, que contém pouca celulose, pode ser facilmente extraída com água quente (STEPHEN, 1995). A purificação das gomas pode ser realizada pela formação de complexos com íons Cu⁺² ou Ba⁺² e o fracionamento desses complexos é possível (CHAUBEY; KAPOOR, 2001; ISHURD *et al.*, 2004; EGOROV *et al.*, 2003; EGOROV *et al.*, 2004). Quanto aos métodos de secado para galactomananas purificadas, as amostras podem ser liofilizadas (JOSHI; KAPOOR, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2009) ou desidratadas com acetona (ANDRADE *et al.*, 1999).

2.1.3. Aspectos estruturais de galactomananas

Estudos sobre a estrutura de PRPCs como as galactomananas de sementes vegetais têm sido conduzidos pelo emprego de muitas técnicas, sobretudo, para estimar a composição monossacarídica e, consequentemente, sua razão M/G. Técnicas cromatográficas como CLAE e CGL (esta última através do método dos derivados alditóis acetatos) requerem hidrólise de amostras, em geral ácida, anterior à análise para determinação das quantidades relativas dos monossacarídeos constituintes (CHAUBEY; KAPOOR, 2001; ISHURD *et al.*, 2004; DAKIA *et al.*, 2008). Através de CG-MS, a composição dos açúcares constituintes é estimada por meio da razão m/z (DAAS *et al.*, 2000; CHAUBEY; KAPOOR, 2001). Vale ressaltar que uma etapa de derivatização dos monômeros liberados é fundamental no sucesso dessas técnicas.

Associadas às técnicas cromatográficas, a utilização de métodos enzimáticos permite caracterizar a distribuição dos padrões de ramificação da cadeia principal. Endomananases, α -galactosidases e β -mananases, enzimas participantes dos processos de mobilização desses polímeros durante a germinação de plântulas (BUCKERIDGE *et al.*, 2000), são comumente usadas para gerar fragmentos oligossacarídicos que depois são analisados por meio de cromatografia em coluna de troca iônica (DAAS *et al.*, 2000).

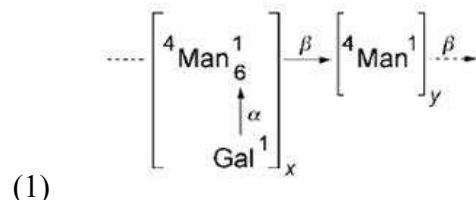
Outras técnicas tais como análise de metilação e oxidação com periodato podem ser empregadas. No caso da análise de metilação, os derivados metila produzidos podem ser separados em proporções equimolares por métodos cromatográficos e, assim, as ligações glicosídicas que unem os resíduos monossacarídicos podem ser determinadas.

Para investigar a estrutura fina desses polissacarídeos a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) desponta como ferramenta promissora. Espectros de RMN do próton (RMN ^1H) e do carbono (RMN ^{13}C) têm sido utilizados com sucesso para estudos estruturais de galactomananas (PETKOWICZ *et al.*, 1998a; JOSHI; KAPOOR, 2003; VIEIRA, 2003; RAKHMANBERDYEVA; SHASHKOV, 2005; CUNHA *et al.*, 2009).

Petkowicz *et al.* (1998a) num estudo de modelagem molecular com fragmentos de galactomananas estimaram teoricamente as constantes de acoplamento de espectroscopia de RMN bidimensional e as conformações mínimas de energia que são mais favoráveis (Figura 2). Tais conformações mínimas de energia foram observadas quando um ou ambos os resíduos de D-manosil da cadeia principal são substituídos por unidades de D-galactopiranosil.

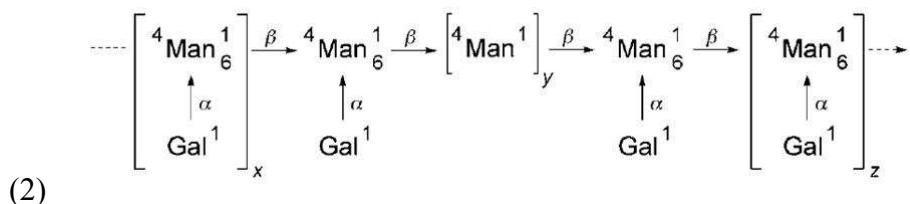
Srivastava e Kapoor (2005) subdividiram as galactomananas de acordo com os padrões de ramificação e distribuição dos resíduos D-galactosil em: (a) galactomananas clássicas pouco ramificadas, (b) galactomananas clássicas altamente ramificadas e (c) galactomananas de estruturas não clássicas.

No primeiro grupo, as galactomananas clássicas pouco ramificadas abrigam a goma de guar, um material comercialmente importante e que foi o primeiro estudado sobre análise estrutural de manopiranos de sementes vegetais. Outras gomas como a de *Gleditsia amorphoides* e a goma carob também são encontradas nesse grupo. Sua estrutura geral é dada pela fórmula abaixo:



Onde os valores de x variam de 1 a 10 e os de y de 1 a 33 resíduos.

Por sua vez o grupo das galactomananas clássicas altamente ramificadas alberga a goma de *fenugreek* e os polímeros a ela relacionados. Neste tipo de galactomanana, 85% da cadeia principal são ramificadas e sua fórmula geral é:



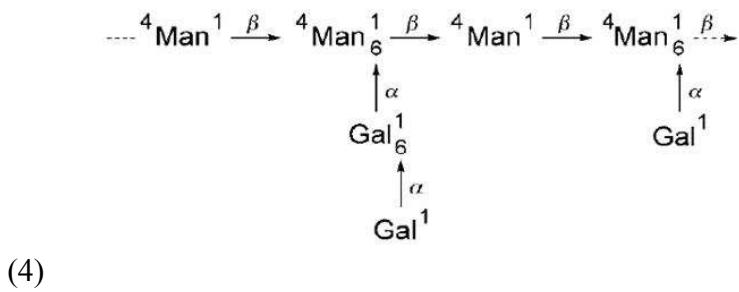
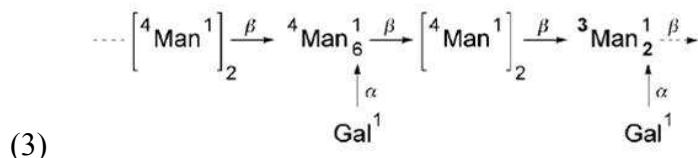
Para esta galactomanana os valores de x + z variam de 0 a 9 e os de y de 1 e 2 resíduos.

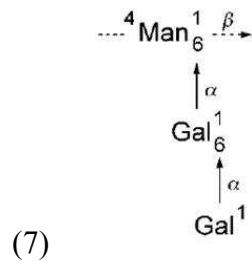
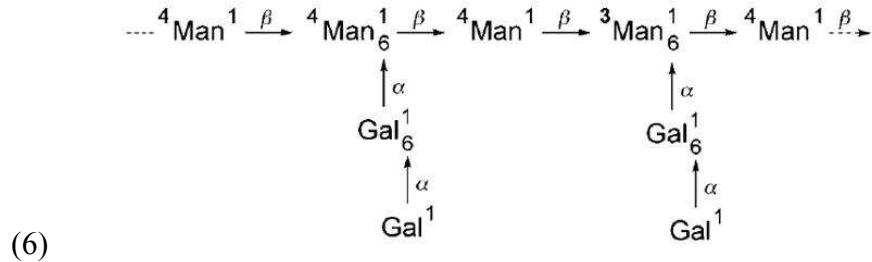
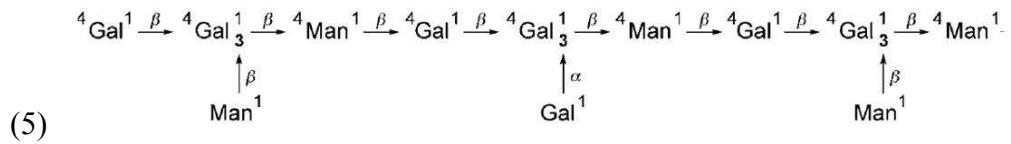
Poucas galactomananas que desviam da estrutura básica foram relatadas na literatura, diferindo principalmente na cadeia principal e no arranjo de ramificação.

Unrau e Choy (1970 e 1971) relataram variação estrutural em *Crotalaria mucronata* e *Caesalpinia pulcherrima*. Na primeira espécie, metilação e hidrólise da galactomanana indicou presença de D-manose em ligação (1→3) na cadeia principal. Esse fato foi suportado por um posterior experimento de oxidação com periodato onde foi observado que um em cada seis resíduos de manose foi resistente a essa reação. Os resultados da metilação também indicaram que cerca de 6% dos resíduos do esqueleto de manose estão em ligação (1→2).

Num experimento semelhante, Unrau e Choy (1971) mostraram que a estrutura da galactomanana isolada de *Caesalpinia pulcherrima* também difere do tipo clássico, mas em menor extensão, 4% das unidades de manose estão em ligação (1→3) e apenas 2% em ligação (1→2).

Em algumas espécies tais como *Cassia absus* (estrutura 3), *Gleditsia ferox*, *G. amorphoides*, *Trifolium repens*, (estrutura 4), *Cassia grandis* (estrutura 5), *C. corymbosa* (estrutura 6), *C. laviegata* (estrutura 7), *Indigofera tinctoria* e *Parkinsonia aculeata* foi verificada a existência de resíduos de galactose na cadeia principal (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). Particularmente, nas estruturas das galactomananas de *C. laviegata* e *Parkinsonia aculeata* além da presença de manose e galactose na cadeia principal unidas em ligação (1→4) e (1→3) também foi verificada a presença de ambos resíduos como unidades de ramificação em ligação (1→6), (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).





Considerando a evidência estrutural apenas, é racional inferir que existe uma relação evolutiva entre os PRPCs de sementes e outros polissacarídeos não celulósicos individuais de parede celular primária ou secundária (STEPHEN, 1995). Ao longo do tempo, esses materiais preservaram suas funções ecológicas e divergiram pouco do padrão básico observado (presença de resíduos de manose e galactose). Por outro lado, embora a maioria das galactomananas seja proveniente de sementes de leguminosas, por exemplo, goma de guar e a GLB que são de grande importância econômica, estruturalmente nenhuma dessas gomas é idêntica (STEPHEN, 1995).

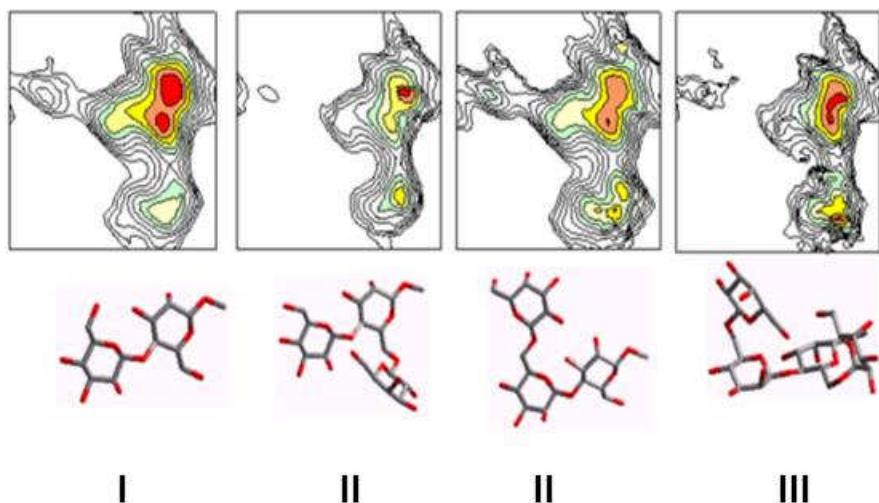


Figura 2.2. – Diagramas adiabáticos de fragmentos oligoméricos de galactomananas resultantes dos ângulos de rotação Φ e Ψ para a ligação glicosídica e suas respectivas representações moleculares nas conformações de mais baixa energia. (I) resíduos de MAN-MAN-, (II) MAN(GAL)-MAN-, (II) MAN-MAN(GAL)- e (III) MAN(GAL)-MAN(GAL)-, respectivamente. (Adaptada de Petkowicz *et al.*, 1998a).

2.2. Hipótese e objetivos

2.2.1. Hipótese: a galactomanana de *Adenanthera pavonina* é estruturalmente similar as galactomananas obtidas de fontes tradicionais?

2.2.2. Objetivo geral

Extrair, purificar e caracterizar estruturalmente a galactomanana do endosperma de sementes de *A. pavonina*.

2.2.3. Objetivos específicos:

- Extrair o endosperma de sementes de *Adenanthera pavonina*;
- Purificar a galactomanana do endosperma de sementes de *A. pavonina* por um processo de extração com água quente;
- Caracterizar estruturalmente a galactomanana de *A. pavonina* utilizando técnicas de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do Próton (RMN ^1H) e do Carbono (RMN ^{13}C);
- Determinar o espectro de absorção na região do infravermelho da goma de *A. pavonina*.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Material vegetal

Sementes maduras de *Adenanthera pavonina* L. foram coletadas no campo experimental do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus do Pici, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, durante os meses de julho a setembro de 2006.

2.3.2. Reagentes

Óxido de deutério (D_2O) foi adquirido junto à empresa Merck, EUA. Etanol absoluto PRS e acetona PA foram adquiridos junto à empresa Panreac, Barcelona, Espanha. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.3.3. Extração de galactomananas

Para realizar a extração dos polissacarídeos foram empregados dois métodos de extração cujas principais diferenças são exibidas nos fluxogramas das figuras 3 e 4. Ambos os métodos tem como passo inicial a fervura das sementes e posterior intumescimento durante 24 horas. O primeiro método (Mt1) foi empregado para obtenção de galactomananas puras (livres de contaminação com pentoses ou outros monossacarídeos) para serem utilizadas nos experimentos de RMN. Este método consistiu na liofilização dos endospermas removidos para se determinar o rendimento da massa de endospermas em relação à massa total de semente. Em seguida, as galactomananas foram extraídas utilizando água destilada aquecida à temperatura de 80-85 °C. À medida que a viscosidade da solução se modificava visualmente, o material era removido, filtrado em telas de náilon e estocado a 4 °C até que todo o gel fosse completamente desfeito. Ao final do processo de extração, o material foi filtrado novamente (em celite), liofilizado e armazenado para uso posterior.

O segundo método (Mt2) consistiu em triturar os endospermas obtidos com volume mínimo de água destilada (2:1, m/v) para isso utilizando um *blender*. Posteriormente, esse material foi centrifugado a 2.000 rpms por 15 minutos, precipitado em etanol (1:2, v/v) e o precipitado recuperado foi lavado com acetona. A galactomanana (designada por GLMAp) foi desidratada em dessecador até evaporar o solvente orgânico completamente e armazenada para uso em experimentos posteriores.

2.3.4. Caracterização da goma obtida

2.3.4.1. Conteúdo de Proteínas

Amostras de galactomananas (GLMAp) foram dissolvidas em água destilada e o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método espectrofotométrico de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972) utilizando um aparelho Spectronic Genesys 5 (Milton Roy Company, NY, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata.

2.3.4.2. Rendimento da extração

Amostras de açúcares solúveis foram coletadas durante a extração de galactomananas, logo após a etapa de centrifugação do método 2, com o intuito de determinar o rendimento de polissacarídeo extraído por aquele método. O conteúdo de açúcares foi determinado pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) em triplicata. Igualmente, o rendimento total do peso seco da galactomanana em relação à massa de sementes foi calculado para ambos os métodos (Mt1 e Mt2).

2.3.4.3. Cinzas e conteúdo de umidade

Umidade foi determinada através do aquecimento de 1 g de amostra de GLMAp (em triplicata) a 105 °C por 31 horas. Após isso, as amostras foram devidamente

acondicionadas em dessecador, pesadas e calcinadas a 550 °C em cadinhos de porcelana para determinação de cinzas.

2.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética do Próton (RMN ^1H)

Amostras de galatomananas (20 mg.mL^{-1}) foram dissolvidas em dióxido de deutério (água pesada, D_2O) de alta qualidade em tubos de RMN de 5 mm à temperatura de $80 - 85^\circ\text{C}$ sob agitação contínua durante algumas horas. Os espectros de ressonância do próton foram determinados em um equipamento Avance DRX-500 Bruker Spectrometers operando na freqüência do hidrogênio a 500 MHz, utilizando sonda dual de 5 mm. Os espectros foram registrados à temperatura de 85°C e para as aquisições foi utilizado período de relaxação de 5 s e seqüência de pulso zg30. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm).

2.3.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética do Carbono (RMN $^{13}\text{C-BB}$)

As condições de preparo de amostra de galactomanana foram às mesmas descritas no tópico acima. Os espectros de ressonância do carbono foram igualmente obtidos em um espetrômetro Avance DRX-500 sob a mesma temperatura de aquisição do próton (85°C), operando na freqüência do carbono a 125 MHz e também utilizando sonda dual de 5 mm. Nesses experimentos foram utilizados período de relaxação de 1,0 s, seqüência de pulso zgpg e desacoplamento por CPD (*Composite Pulse Decoupling*) utilizando a seqüência waltz16.

2.3.7. Espectro DEPT 135° (Distortionless Enhacement by Polarization Transfer)

O padrão de hidrogenação dos carbonos no experimento de $^{13}\text{C-RMN}$ foi obtido a partir do uso da técnica DEPT (*Distortionless Enhacement by Polarization Transfer*) com variação do ângulo de nutação de 135° , uso de seqüências de pulso dept135 e desacoplamento por CPD com seqüência waltz16.

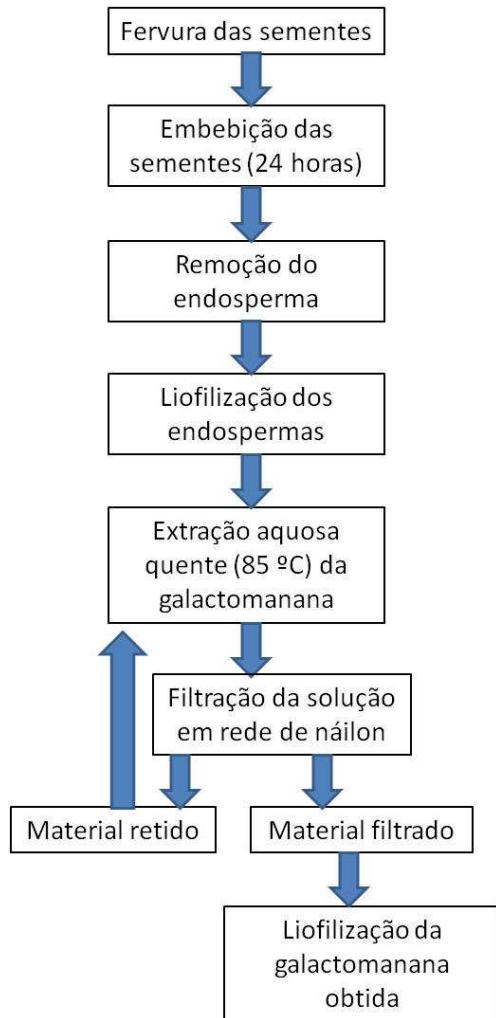


Figura 2.3. – Fluxograma do método 1 (Mt1) de extração da galactomanana do endosperma de sementes de *A. pavonina*.

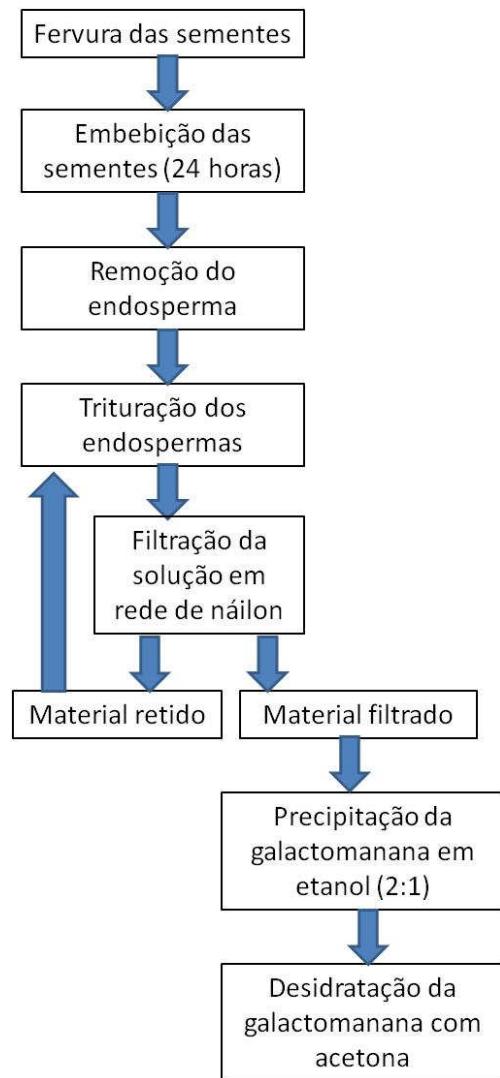


Figura 2.4 – Fluxograma do método 2 (Mt2) de extração da galactomanana do endosperma de sementes de *A. pavonina*.

2.3.8. Espectro Bidimensional de Correlação Heteronuclear HSQC

O espectro bidimensional HSQC foi obtido utilizando-se uma sonda inversa multinuclear de 5 mm, com gradiente no eixo z, seqüência de pulso hsqcgpph e desacoplamento por CPD com seqüência garp.

2.3.9. Espectroscopia de Absorção na região do Infra Vermelho (IR)

Os espectros na região do Infra Vermelho (IR) foram obtidos em um equipamento Perkin-Elmer 1320 com intervalo de comprimentos de onda entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} . As amostras da galactomanana foram analisadas em pastilhas de KBr. O experimento foi repetido duas vezes por amostra.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Isolamento e purificação da galactomanana

O endosperma de sementes de *A. pavonina* contém uma galactomanana solúvel em água. Este endosperma foi submetido à extração de galactomananas por meio de dois métodos. O primeiro deles (Mt1) consistiu em extrair com água quente (85 °C) a galactomanana do endosperma removido e liofilizado, desse modo, as principais substâncias presentes na casca e no embrião que poderiam contaminar o polissacarídeo foram separadas do endosperma antes do procedimento de extração da galactomanana. Existem muitos métodos que empregam solventes orgânicos, etanol ou quebra mecânica de toda a semente. Dessa maneira compostos de baixo peso molecular podem ser co-extraídos e contaminar a amostra, por exemplo, com outros monossacarídeos (xilose, arabinose, glucose, etc). Temperaturas mais baixas que 85 °C foram usadas para evitar hidrólise da galactomanana no procedimento de extração aquosa quente. Após esse procedimento, o produto filtrado foi liofilizado e uma galactomanana muito pura foi obtida.

Por esse método (Mt1), o rendimento da galactomanana obtida em relação à massa de sementes foi de 13 %. Este valor é similar aos rendimentos relatados na literatura para *A. pavonina* (17,1%) no trabalho de Cerqueira *et al.* (2009) e outras sementes tais como *Caesalpinia pulcherrima* (25%, ANDRADE *et al.*, 1999), *Gleditsia triacanthos* (15,4%, EGOROV *et al.*, 2003), *Gleditsia ferox* (18,9%, EGOROV *et al.*, 2004) e *Prosopis juliflora* (16%, AZERO; ANDRADE, 2000; 10-14%, VIEIRA *et al.*, 2007).

Na tabela 2, as principais características (cinzas, umidade, conteúdo de proteínas e rendimento) das amostras de GLMAp (obtida pelo método 2) são apresentadas. Os valores obtidos também estão de acordo com a literatura para outras galactomananas (SITTIKIYOTHIN *et al.*, 2005; AZERO; ANDRADE, 2000; ANDRADE *et al.*, 1999; DEA; MORRISON, 1975; CUNHA *et al.*, 2005). Por exemplo, de acordo com Stephen (1995) em preparações comerciais, o conteúdo de umidade não deve exceder 13%. O rendimento para GLMAp purificada (33%) é similar aos valores reportados para outras

espécies brasileiras (VENDRUSCOLO, 2005) e para aquele da goma guar (DEA; MORRISON, 1975).

Na preparação de amostras para análise através do uso de técnicas de espectroscopia de RMN é fundamental a obtenção de um material isento de contaminantes (outros monossacarídeos, sais, tampões, solventes orgânicos, etc), mas com boa solubilidade. Isso faz com que os espectros obtidos sejam livres de ou possuam menor ruído, o que propicia uma melhor interpretação dos dados obtidos. Técnicas cromatográficas (GPC) ou de precipitação costumam ser empregadas a fim de purificar a galactomanana antes de submetê-la a estudos mais refinados tais como aqueles por RMN (ABEYGUNAWARDANA; BUSH, 1990; IKUTA *et al.*, 1997). Ademais, com algumas galactomananas se faz necessária uma etapa de despolimerização parcial a fim de diminuir sua viscosidade nas soluções. Métodos químicos (hidrólise ácida) ou enzimáticos (uso de glicosidases) são requeridos nessa etapa de despolimerização.

Pelas razões acima expostas, dois métodos de extração do polissacarídeo hemicelulósico (galactomanana) foram empregados. O primeiro (Mt1) com o intuito de produzir um material adequado para a análise de RMN e o segundo (Mt2) a fim de ser empregado na produção de filmes comestíveis bioativos, ou seja, filmes contendo o antimicrobiano nisina para realizar bioensaios contra microorganismos patogênicos comumente encontrados em alimentos.

A galactomanana obtida com o método 1 se mostrou de difícil solubilização quando do procedimento de sua extração. Tal fato observado pode ser reflexo da interação da galactomanana com outras fibras de natureza insolúvel que são encontradas no endosperma. Dessa maneira, a remoção da goma endospérmica foi lenta e difícil. Por outro lado, o produto final desse método (filtrado e liofilizado) consistiu de um material isento de fibras insolúveis. Esse produto não exibiu a mesma dificuldade em dissolver-se na água e sua viscosidade também não representou um inconveniente quando do preparo de soluções para análises de RMN. As soluções preparadas nesses experimentos apresentaram-se límpidas e ausentes de precipitado.

Tabela 2.2 – Comparação de composição elementar para amostras de galactomanana de *A.pavonina* (GLMAp), locust bean (LB) goma guar (GG) e goma tara (GT).

Amostras	Cinzas (%)	Umidade (%)	Proteínas (%)	Rendimento (%)
GLMAp	0,24 ^a	13,82 ^a	n.d. ^a	33 ^a
LB	0,28 ^d -0,80 ^b	6,41 ^b -7,50 ^d	0,64 ^d	-
GG	0,35 ^c -0,65 ^f	8,90 ^c -13,00 ^f	0,64 ^c -3,60 ^f	24 ^e -35 ^e
GT	0,07 ^b	7,81 ^b	-	-

n.d. não determinado.

^a No presente trabalho

^b Sittikijyothin *et al.*, (2005)

^c Azero; Andrade, (2000)

^d Andrade *et al.*, (1999)

^e Dea; Morrison, (1975)

^f Cunha *et al.*, (2005)

2.4.2. Interpretação do espectro de RMN ^1H

A estrutura da galactomanana de *Adenanthera pavonina* foi estudada usando espectroscopia de RMN. O espectro de RMN ^1H (500 MHz) é mostrado na figura 5. A ressonância do próton foi relacionada com base nos dados reportados na literatura para galactomananas (GRASDALEN; PAINTER, 1980; CHAUBEY; KAPOOR, 2001; RAMESH *et al.*, 2001; EGOROV *et al.*, 2003; EGOROV *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2009).

A região anomérica no espectro de RMN ^1H é mostrada na figura 5. O espectro de RMN ^1H é complexo e os sinais dos prótons da região anomérica com os deslocamentos químicos de δ 5,02 e 4,74 ppm foram atribuídos aos prótons H-1 dos resíduos de α -D-galactose (G) e β -D-mannose (M), respectivamente. O singuleto em δ 5,02 ppm surge do H-1(G) e é compatível com a conformação esperada do anel α -D-galactopiranose. O sinal vizinho o qual surge do H-1(M) foi observado em δ 4,74 ppm e corresponde ao monômero β -D-manopiranose.

A razão M/G pode ser obtida diretamente das áreas relativas dos sinais para H-1(G) e H-1(M), (figura 5), e desse modo resultou num valor de 1,46 (tabela 3). Este valor difere daquele obtido em outro trabalho com a goma de *A. pavonina*, no qual um valor de M/G=1,80 foi obtido (TAVARES, 1998). Por outro lado, os resultados aqui apresentados estão de acordo com o trabalho de Cerqueira *et al.* (2009) cujo valor obtido foi de 1,35, similar ao apresentado aqui.

Para as amostras analisadas nas condições experimentais deste trabalho de tese, o valor M/G (1,46) é diferente daquele reportado por Tavares (1998), mas está de acordo com o valor obtido por Cerqueira *et al.*, (2009) o qual foi determinado por Cromatografia Gás Líquida (CGL), (tabela 4). Os distintos valores detectados nas razões M/G determinados no trabalho de Tavares (1,80) e a presente tese (1,46) poderiam ser explicados provavelmente por diferenças no procedimento de extração da galactomanana. Durante a extração e purificação do polissacarídeo, através do protocolo utilizado por Tavares, parte da amostra pode ser perdida. Esse protocolo fundamenta-se nos passos expostos no fluxograma da figura 4 (Mt2). Além disso, a Trituração do endosperma favorece a co-extração e, consequentemente, presença de resíduos

insolúveis no produto final. É importante enfatizar que a RMN trata-se de uma técnica de natureza não destrutiva e a análise por meio desta técnica para qualquer molécula orgânica não necessitaria de uma prévia hidrólise da amostra, a não ser que outros fatores interfiram com a solubilidade da amostra. Assim, aquelas diferenças encontradas na razão M/G podem ser fruto dos distintos métodos de obtenção do polissacarídeo.

2.4.3. Interpretação dos espectros de RMN ^{13}C -BB

Aos 125 MHz, o espectro de RMN ^{13}C -BB da galactomanana de *A. pavonina* é ilustrado na figura 6. A análise ^{13}C -BB deu um espectro bem resolvido pelos quais os atributos dos carbonos foram facilmente identificados. A região anomérica (95-110 ppm, figura 7) mostra três sinais (100,78; 100,62 e 99,48 ppm) os quais foram atribuídos ao C-1 da α -D-galactose em δ 99,48, C-1 do resíduo de β -D-manopiranosil ramificado na HO-6 em δ 100,62 e C-1 da β -D-manoose em δ 100,78. O sinal do C-1(G) indica que os resíduos de galactose estão na forma piranose, porque os sinais típicos da forma furanosídica não foram detectados.

Uma conclusão similar pode ser feita para a manose (figura 8). C-6(M) tem um segundo sinal, deslocado em +5,86 ppm, indicando substituição no C-6. Todas as diferentes linhagens de carbono e seus deslocamentos químicos são mostrados na tabela 5. As ressonâncias associadas com os resíduos de D-galactose e D-manoose foram diferenciadas pelo uso das distintas composições monoméricas das amostras, como determinado pelo experimento de RMN ^1H . A região dos carbonos metíleno (61,80 e 61,36 ppm) foi igualmente bem determinada. No presente trabalho, o experimento de RMN ^{13}C -BB da goma de *A. pavonina*, forneceu um espectro onde todas as linhagens do carbono foram bem resolvidas e seus deslocamentos químicos estão de acordo com aqueles relatados na literatura (GRASDALEN; PAINTER, 1980; CHAUBEY; KAPOOR, 2001; RAMESH *et al.*, 2001; EGOROV *et al.*, 2003, EGOROV *et al.*, 2004).

A expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB mostrando a região do carbono 4 do resíduo de manose (M4) é mostrada na figura 9. Essa expansão é meramente ilustrativa e serve como orientação para sugerir o padrão de substituição da cadeia principal de unidades de β -D-manoose. Esse padrão é muito similar ao relatado por Grasdalen e

Painter (1980) para a galactomanana de *Clover seed*. O pico I é o mais intenso, o pico II de intensidade intermediária e o pico III o de menor intensidade. Essas intensidades observadas para esses picos refletem uma provável configuração com maior presença de regiões completamente substituídas e com substituição simples de D-galactose entre dois resíduos de D-manose vizinhos (figura 10).

2.4.4. Interpretação do espectro DEPT 135°

Para investigar a presença de substituição O-6 nos resíduos de D-manose, um experimento DEPT 135° foi realizado (figura 11). Os sinais dos carbonos metileno mostraram amplitude oposta aquela dos carbonos metila. Uma região mais desprotegida, aproximadamente 6,12 ppm, foi observada para os valores de δ da D-manose O-6-substituída em relação aqueles atribuídos ao resíduo de D-manose não substituído. O espectro DEPT 135° apresentou cinco sinais CH₂. Os sinais em δ 60,60 e 61,31 ppm foram atribuídos aos carbonos primários C-6 dos resíduos de D-galactose e D-manose, respectivamente.

2.4.5. Interpretação do diagrama de contorno do espectro HSQC

O diagrama de contorno do espectro HSQC da goma de *A. pavonina* é mostrado na figura 12. Esse diagrama mostra a correlação entre os prótons e seus respectivos carbonos. A correlação entre H-1/C-1 para a α -D-galactose é mostrada em δ 5,02/99,52 ppm. Para o resíduo de D-manose, a correlação H-1/C-1 foi bem resolvida e um sinal em δ 4,74/100,83 ppm foi detectado. Os três átomos de carbono C-6, os quais mostram amplitude oposta no experimento DEPT 135° e foram relacionados aos resíduos de D-manose, D-manose substituída e D-galactose no diagrama, exibiram correlações com seus prótons em δ 3,90/61,23; 3,96/67,14 e 3,76/61,60 ppm, respectivamente. Todas as demais correlações detectadas entre os carbonos e seus prótons são apresentadas na tabela 6.

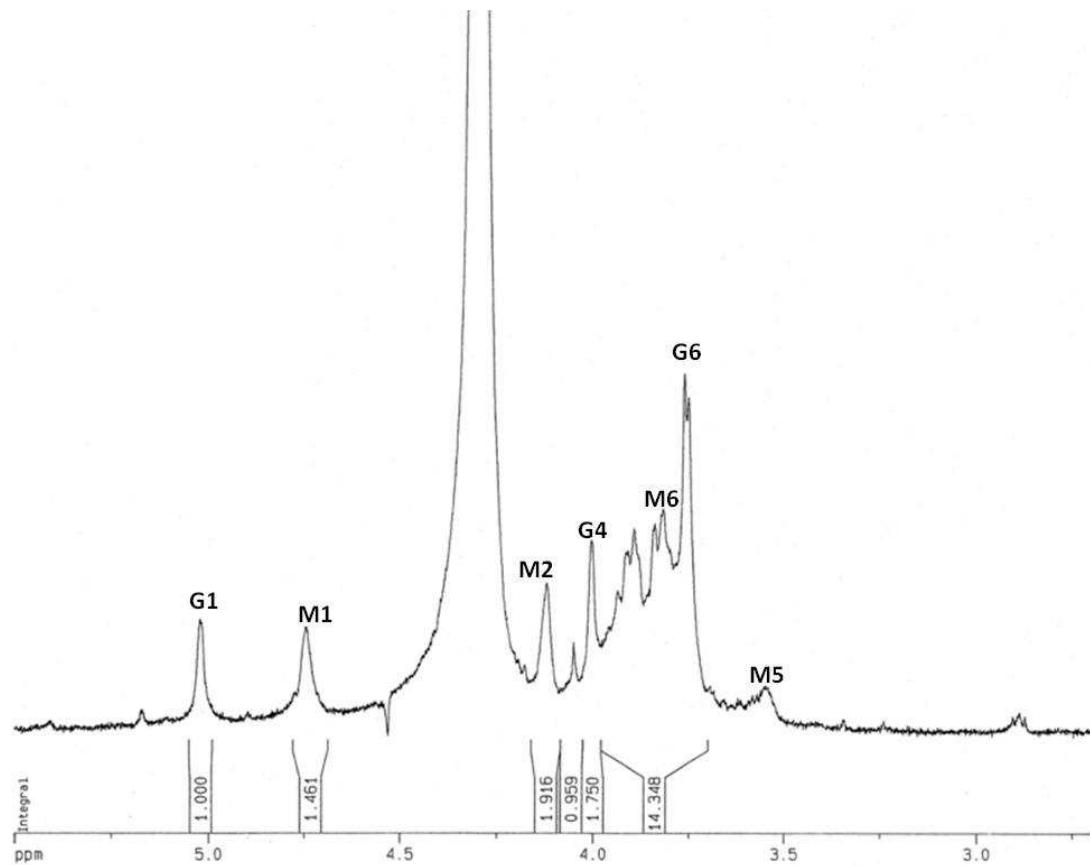


Figura 2.5 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O .

Tabela 2.3 – Composição monossacarídica da galactomanana de sementes de *A. pavonina* estimada pela integração das áreas relativas da região anomérica no espectro de RMN ^1H .

Monossacarídeo	RMN ^1H (área relativa dos picos)
D-Galactose	1,00
D-Mannose	1,46

Tabela 2.4 – Composição monossacarídica da galactomanana de *A. pavonina* estimada por diferentes métodos.

Método	Monossacarídeos		Razão M/G
	D-Manose	D-Galactose	
RMN ^1H ^a	1,46	1,00	1,46
CGL ^b	52,8	39,2	1,35
RMN ^{13}C ^c	1,80	1,00	1,80

^a No presente trabalho.

^b Cerqueira *et al.* (2009).

^c Tavares (1998).

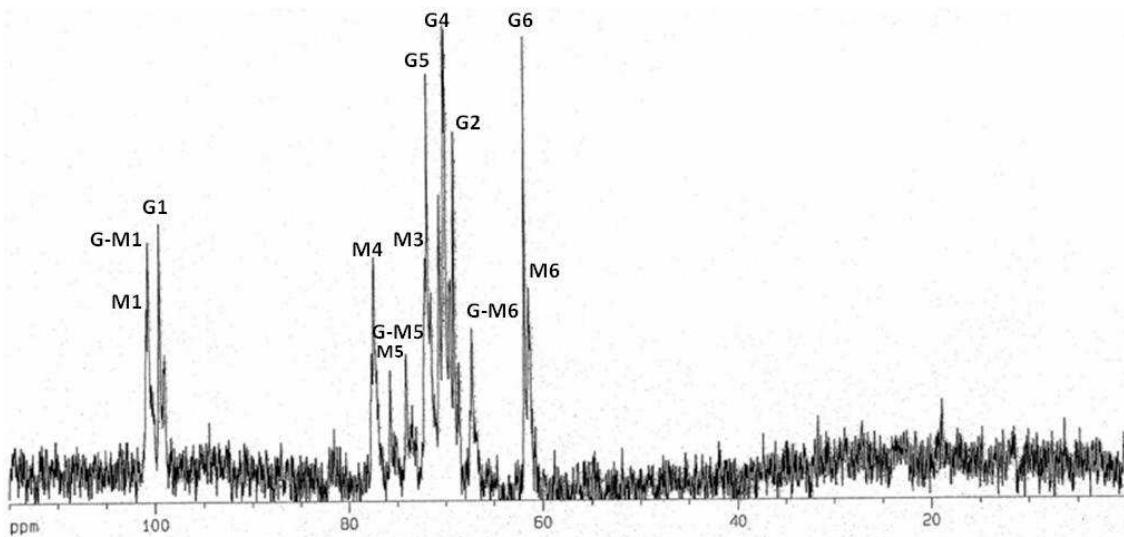


Figura 2.6 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O .

Tabela 2.5 – Deslocamentos químicos (em ppm) dos picos no espectro RMN ^{13}C -BB da galactomanana de sementes de *A. pavonina*.

Tipo de unidade	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Galactopiranosil	99,48	68,55	70,10	69,96	71,42	61,80
β -D-Manopiranosil, não ramificado em HO-6	100,78	70,59	71,83	77,36	75,67	61,36
β -D-Manopiranosil, ramificado em HO-6	100,62	70,59	71,83	77,36	74,05	67,22

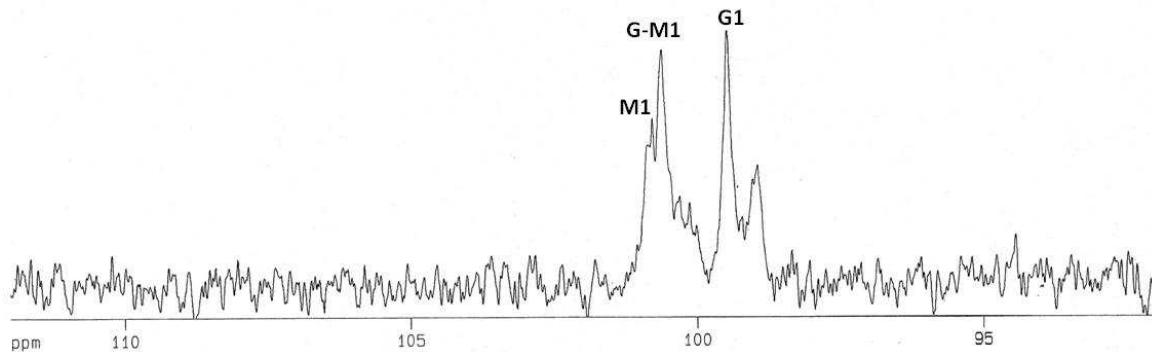


Figura 2.7 – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O , mostrando o desdobramento da região anomérica do carbono 1 de resíduos de D-manose e D-galactose.

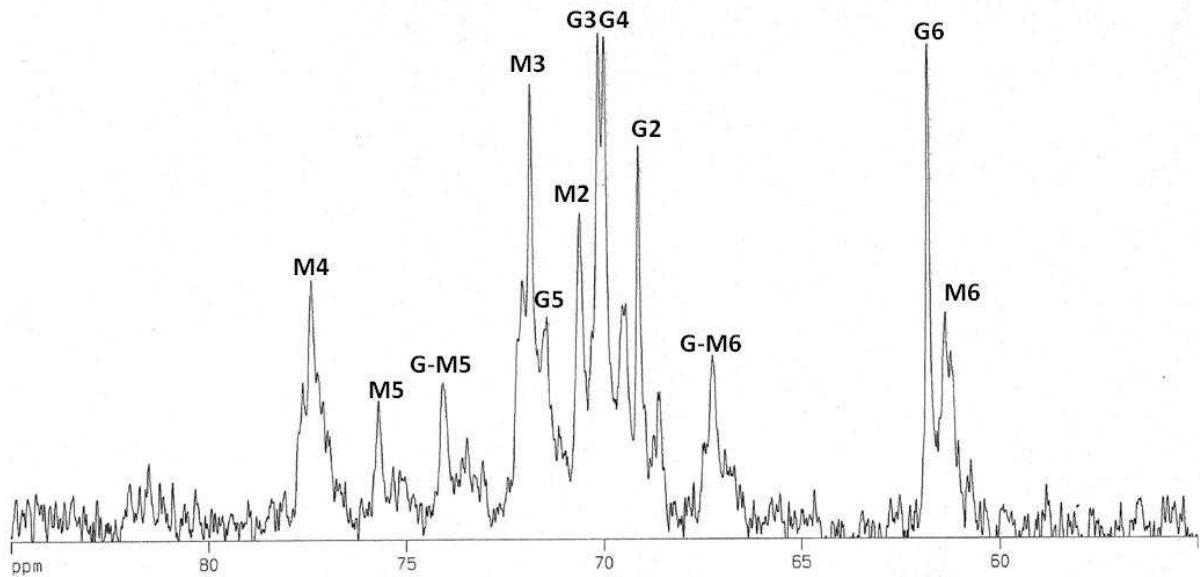


Figura 2.8 – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O , mostrando o desdobramento da região dos carbonos 2, 3, 4, 5 e 6 dos resíduos de D-manose e D-galactose.

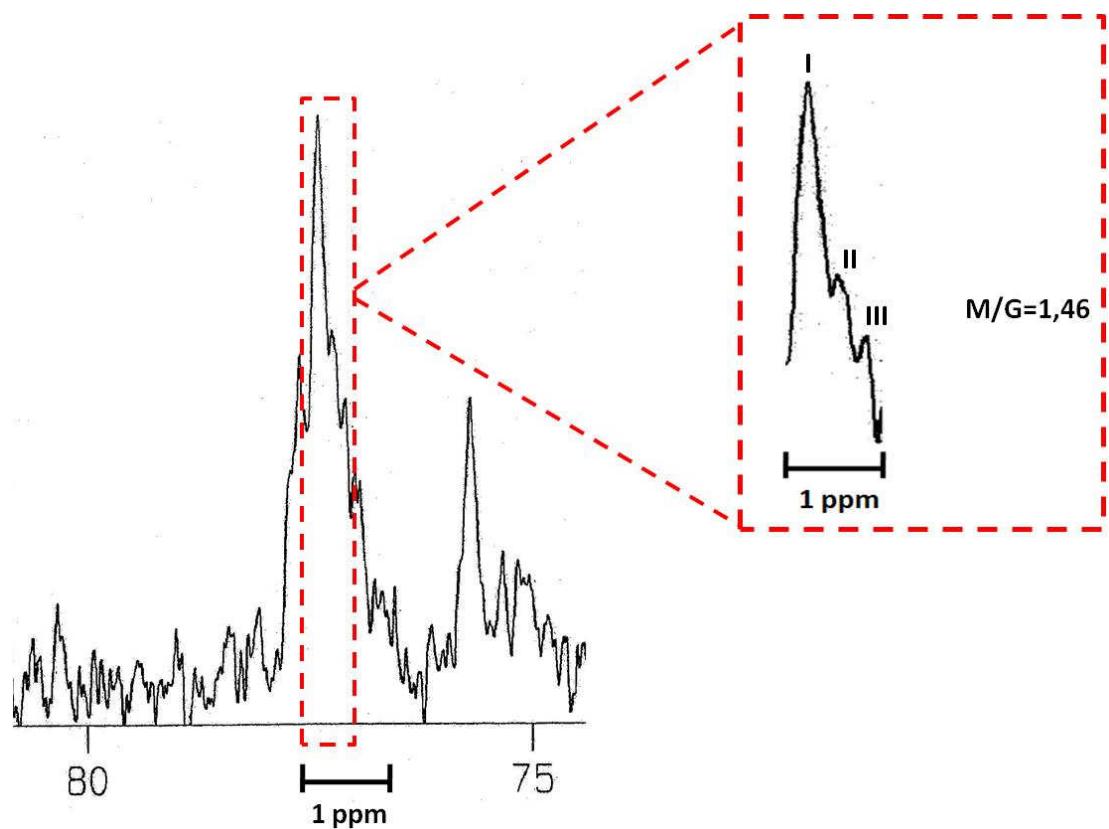


Figura 2.9 – Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -BB mostrando a região do carbono 4 do resíduo de D-manose (M4) da galactomanana de *A. pavonina* (L.).

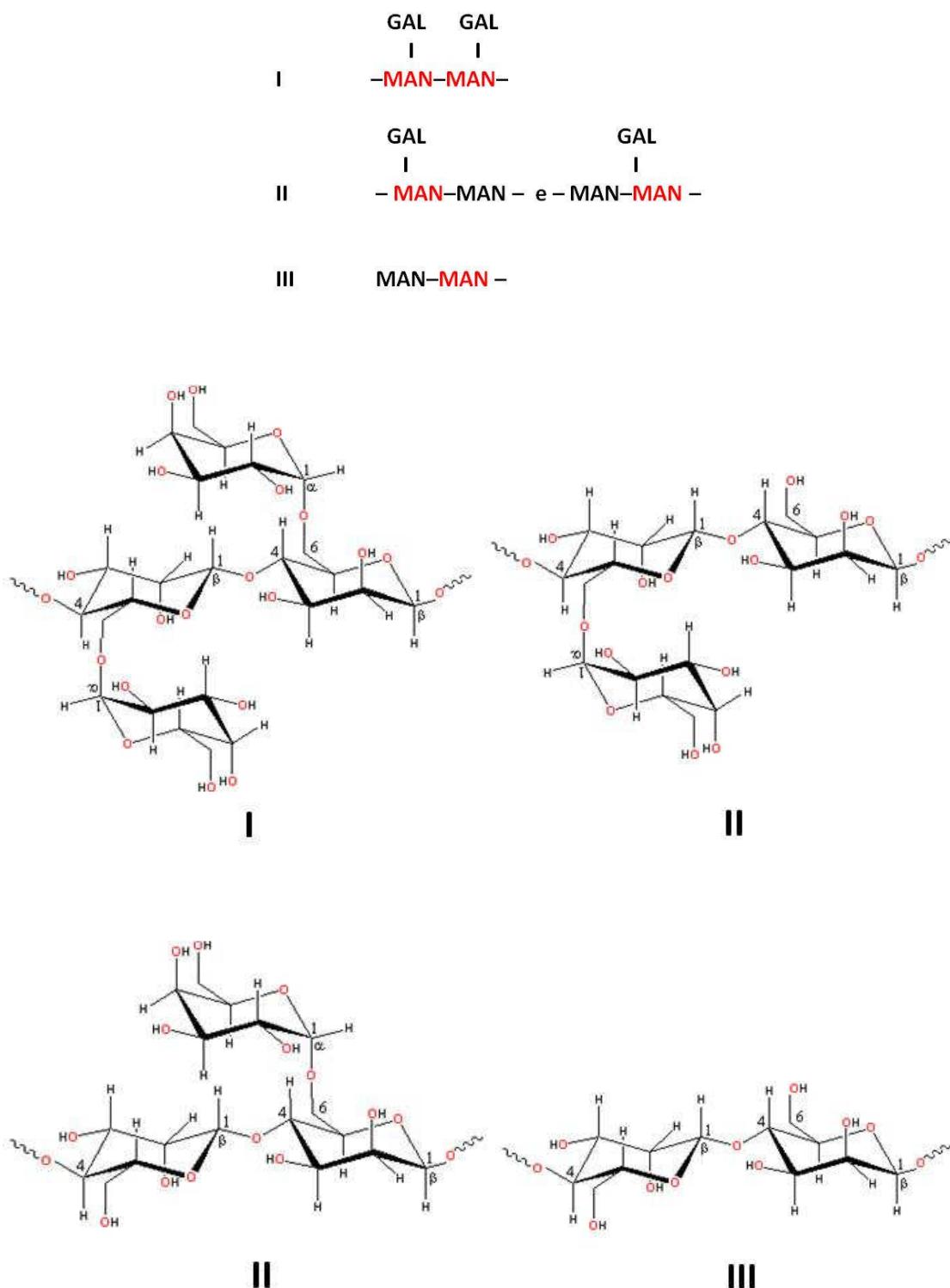


Figura 2.10 – Estruturas possíveis para os padrões de substituição no resíduo de D-manoose da galactomanana de *A. pavonina* (L.).

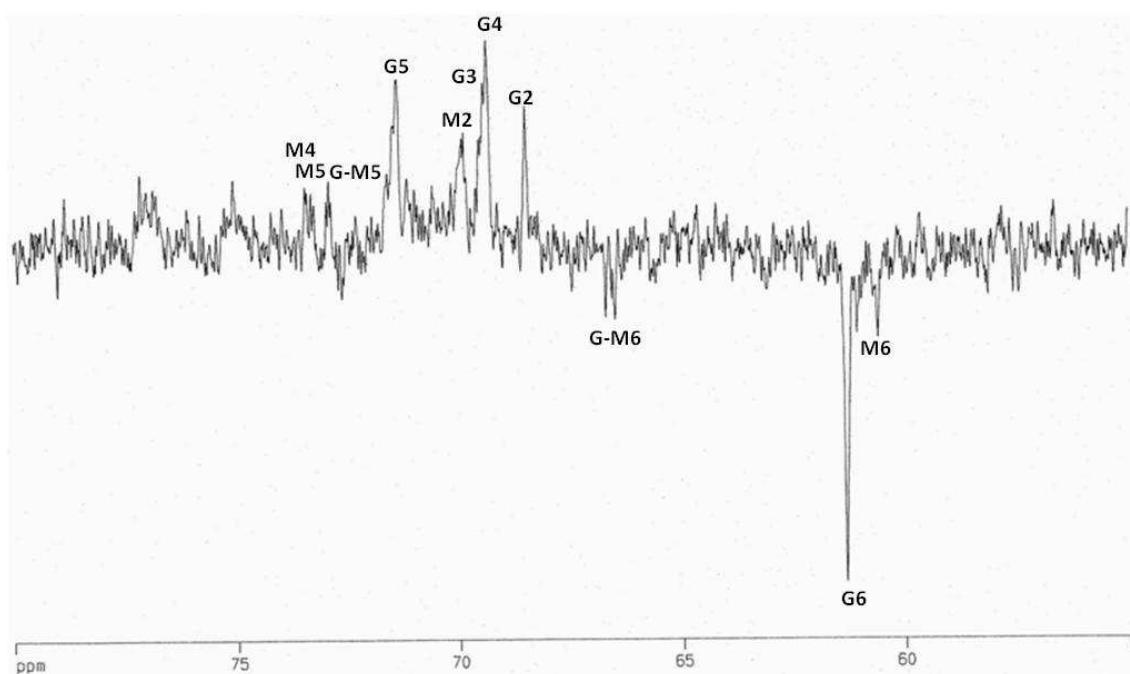


Figura 2.11 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (135°) da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O .

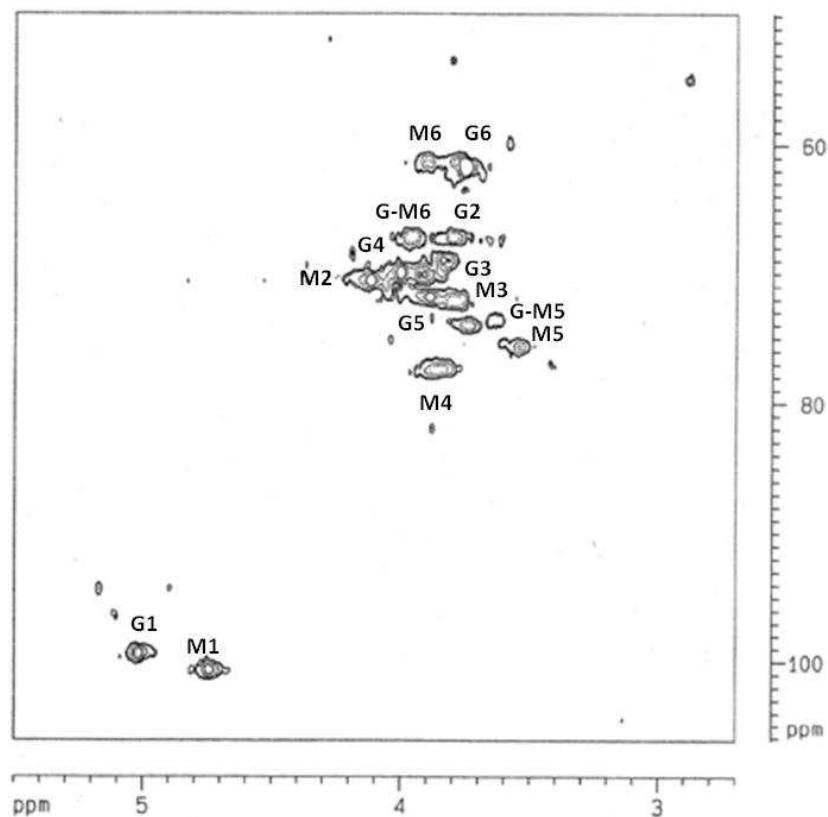


Figura 2.12 – Diagrama de contorno HSQC da solução (20 mg.mL^{-1}) de galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.) em D_2O .

Tabela 2.6 – Correlação entre os deslocamentos químicos obtidos do diagrama de contorno HSQC (RMN ^1H X RMN ^{13}C -BB, ppm) para a galactomanana de *A. pavonina*.

Tipo de unidade	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
α -D-Galactopiranosil	5,02/99,52	3,80/67,14	3,92/69,90	4,00/69,92	3,89/71,80	3,76/61,60
β -D-Manopiranosil, não substituída em HO-6	4,74/100,83	4,12/70,53	3,79/72,03	3,86/77,57	3,54/75,62	3,90/61,23
β -D-Manopiranosil, substituída em HO-6	4,74/100,83	4,12/70,53	3,79/72,03	3,86/77,57	3,64/73,58	3,96/67,14

2.4.6. Espectro de absorção na região do IR

A análise dos dados de IR é mostrada na figura 13. O espectro de IR da goma de *A. pavonina* mostra uma banda de absorção em 3298 cm^{-1} indicando a vibração de grupos hidroxila. Outra banda detectada foi em 2921 cm^{-1} indicando o estiramento do grupo $-\text{CH}_2$. De acordo com um estudo de Shobha *et al.* (2005) sobre a goma guar, a região compreendida entre 3000 e 2800 cm^{-1} representa o modo de estiramento de grupos $-\text{C-H}$. A região em aproximadamente 3300 cm^{-1} representa a vibração de grupos $-\text{OH}$ de polissacarídeos e também água envolvida na formação de pontes de hidrogênio.

As outras principais características foram observadas na região espectral compreendida entre 1600 e 800 cm^{-1} . Nesta região, outras bandas comuns para polissacarídeos (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000), tais como os valores em 1631 , 1377 , 1016 , 870 e 810 cm^{-1} foram detectadas. Esta região exibe modos de estiramento altamente acoplados C-C-O , C-O-C e C-OH do esqueleto do polímero. Viera (2003) trabalhando com galactomananas de *Dimorphandra gardneriana* detectou bandas de absorção em 810 e 870 cm^{-1} , características de deformação de ligação equatorial de mano-oligossacarídeo e de resíduo D-manopiranosil. Figueiró *et al.* (2004), num trabalho com filmes de galactomanana de *A. pavonina* detectaram duas bandas de absorção em 812 e 871 cm^{-1} sugerindo a presença de unidades de D-galactopiranose em ligação α e unidades D-manopiranose em ligação β , respectivamente.

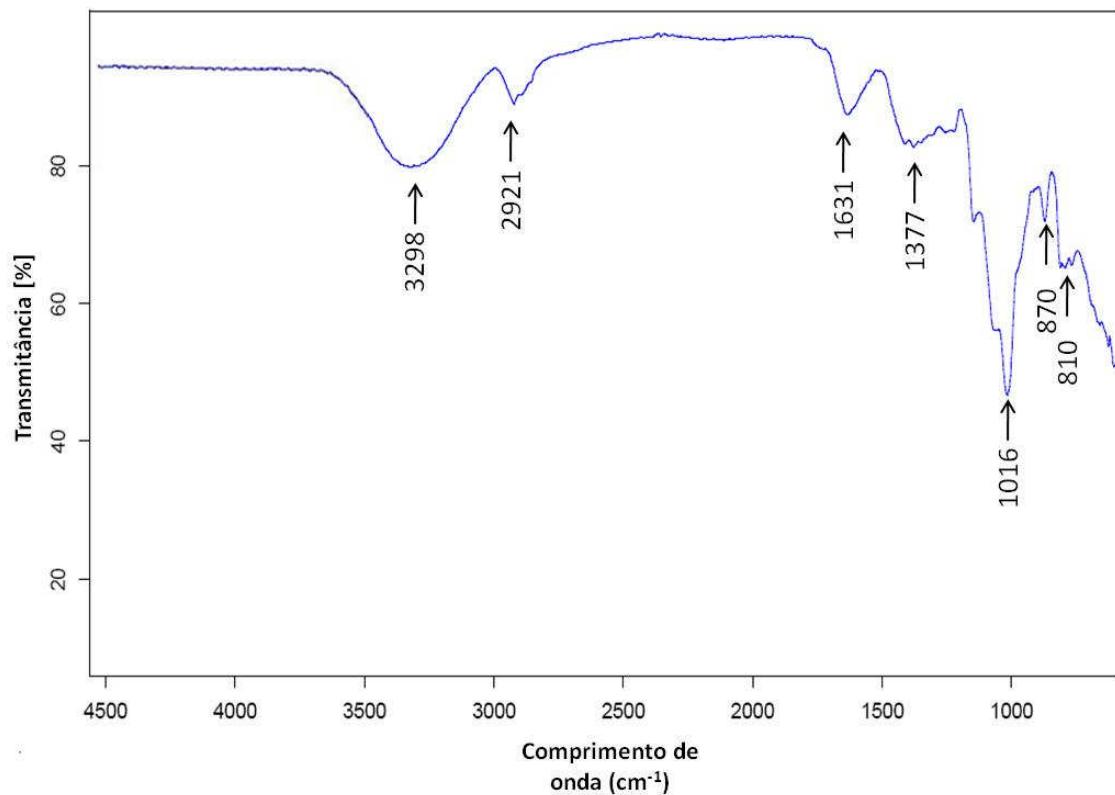


Figura 2.13 – Espectro de absorção na região IV da galactomanana de *Adenanthera pavonina* (L.).

2.5. Conclusões

Galactomananas de alto grau pureza podem ser facilmente obtidas do endosperma de sementes de *Adenanthera pavonina* através de um processo de extração com água quente. Este procedimento permitiu um rendimento de 13%. A estrutura fina dessa goma endospérmica foi estudada através de técnicas de RMN. A razão M/G ($=1,46$) foi determinada e o valor obtido foi similar aquele reportado na literatura. O estudo de RMN sugere que o polissacarídeo possui uma estrutura que esta de acordo com outras estruturas de galactomananas descritas. Os resultados de IR corroboram os dados de RMN obtidos nesse trabalho. Finalmente, os resultados mostraram que essa galactomanana extraída e purificada exibe características que podem ser exploradas em escala comercial e numa série de aplicações da indústria de alimentos.

2.6. Referências

ABEYGUNAWARDANA, C.; BUSH, C. A. Complete structure of the polysaccharide from *Streptococcus sanguis* J22. **Biochemistry**, 29, 2234-248, 1990.

ANDRADE, C.T.; AZERO, E.G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M.P. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinea pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological Macromolecules** n. 26, pp.181-185, 1999.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing** n.21, pp.551-556, 2000.

CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *in press*, 2009.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; LIMA, A. M. P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; COIMBRA, M. A.; GONÇALVES, M. P.; VICENTE, A. A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers** 75, 408–414, 2009.

CHAUBEY, M.; V. P. KAPOOR. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. **Carbohydrate Research**, 332, 439–444, 2001.

CUNHA, P. L. R.; CASTRO, R. R.; ROCHA, F. A. C.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Low viscosity hydrogel of guar gum: preparation and physicochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules** n.37, pp.99-104, 2005.

CUNHA, P. L. R.; VIEIRA, I. G.; ARRIAGA, A. M. C.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra*

gardneriana Tul. Seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, 23, 880-885, 2009.

DAAS, P. J. H.; SCHOLS, H. A.; JONGH, H. H. J. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. **Carbohydrate Research**, 329, 609–619, 2000.

DAKIA, P. A.; BLECKER, C.; ROBERT, C.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. **Food Hydrocolloids**, 22, 807–818, 2008.

DEA, I. C. M.; CLARK, A. H.; MCCLEARY, B. V. Effect of galactose substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, 147, 275, 1986.

DEA, I.C.M.; MORRISON, A. In: R.S. Tipson, & D Horton (Eds.). **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, vol. 31 (pp.241), New York: Academic Press, 1975.

DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. Seed gums. Chapter 11, p. 321 – 344. In: De Baets, S.; Vandamme, E. J.; Steinbüchel, A. **Biopolymers: Polysaccharides II, Polysaccharides from Eukariotes**. vol. 6, Wiley-VCH, 2002.

DUBOIS, M; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, **Analytical Chemistry** 28, pp. 350–356, 1956.

EGOROV, A.V.; MESTECHKINA, N.M.; SHCHERBUKHIN. Determination of the primary and fine structures of a galactomannan from seed of *Gleditsia triacanthos f. inermis* L. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 39, n.4, 398-402, 2003.

EGOROV, A.V.; MESTECHKINA, N.M.; SHCHERBUKHIN. Composition and structure of Galactomannan from seed of *Gleditsia ferox* Desf. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 40, n.3, 314-318, 2004.

FIGUEIRÓ, S. D.; GOES, JÚLIO C.; MOREIRA, R. A.; SOMBRA, A. S. B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. **Carbohydrate Polymers**, 56, 313–320, 2004.

FRANCO, T. T.; RODRIGUES, N. R.; SERRA, G. E.; PANEGASSI, V. R.; BUCKERIDGE, M. S. Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and formation of aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 680, 255-261, 1996.

GRASDALEN, H. ; PAINTER, T. NMR studies of the composition and sequence in legume-seed galactomannans. **Carbohydrate Research**, 81, 59-66, 1980.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

IKUTA, K.; SHIBATA, N.; KANEHIKO, H.; KOBAYASHI, H.; SUZUKI, S.; OKAWA, Y. NMR assignment of the galactomannan of *Candida lypolitica*. **FEBS Letters**, 414, 338-342, 1997.

ISHURD, O.; KERMAGI, A.; ZGHEEL, F.; FLEFLA, M.; ELMABRUK, M.; YALIN, W.; KENNEDY, J. F.; YUANJIANG, P. Structural aspects of soluble-water galactomannans isolated from seeds of *Retama raeta*. **Carbohydrate Polymers**, 58, 41-44, 2004.

JOSHI, H.; KAPOOR, V. P. *Cassia grandis* Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, 338, 1907-1912, 2003.

KAČURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNER, N. & EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, 43, 195-203, 2000.

KRÖGER, G.; BUSCH-STOCKFISCH, M.; WILHELM, F. The thermal stability of guar gums in dependance of granule size. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, 196, 6, 540-546, 1993.

MCCLENDON, J. H.; NOLAN, W. G.; WENZLER, H. F. The role of the endosperm in the germination of legumes: galactomannan, nitrogen, and phosphorus changes in the germination of guar (*Cyamopsis tetragonolobus*, Leguminosae). **American Journal of Botany**, 63, 790-797, 1976.

MIKKONEN, K. S.; RITA, H.; HELÉN, H.; TALJA, R.A.; HYVONEN, L.; TENKANEN, M. Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. **Biomacromolecules**, 8, 3198-3205, 2007.

NAKAMURA, S.; KATO, A.; KOBAYASHI, K. Enhanced of antioxidative effect of ovalbumin due to covalent bonding polysaccharides. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 40, 2033, 1992a.

NAKAMURA, S.; KATO, A.; KOBAYASHI, K. Bifunctional lysozyme-galactomananan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 40, 735, 1992b.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; MAZEAU, K. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. **Carbohydrate Polymers**, 37, 25–39, 1998a.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpiniaceae. **Phytochemistry**, 49, 3, 737-743, 1998b.

RAKHMANBERDYEVA, R. K.; SHASHKOV, A. S. Structure of galactomannans from *Gleditsia delavayi* and *G. aquatica* by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. **Chemistry of Natural Compounds**, 41, 1, 14-16, 2005.

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; ONO, H.; TSUSHIDA, T. Two-dimensional NMR spectroscopy studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): galactomannan without chemical fragmentation. **Carbohydrate Polymers**, 45, 69-77, 2001.

REID, J. S. G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenun-graecum* L. (Leguminosae). **Planta**, 100, 131-142, 1971.

SHOBHA, M. S.; VISHU KUMAR, A. B.; THARANTHAN, R. N.; KOKA, R.; GAONKAR, A. K. Modifications of guar galactomannan with tha aid of *Aspergillus niger* pectinase. **Carbohydrate Polymers**, 62, 267-273, 2005.

SITTIKIJYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behavior of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrates Polymers** n. 59, pp.339-350, 2005.

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

STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their applications**. Marcel Dekker, Inc. 1st edition, New York, USA, 1995.

TAVARES, R. O. **Galactomanana de A. pavonina L. Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. Universidade Federal do Ceará – Brasil, M.Sc. Dissertação , 1998.

UNRAU, A. M.; CHOY, Y. M. Structure of a galactomannan from seed of *Crotalaria mucronata*. **Journal Canadian of Chemistry**, 48, 1123-1128, 1970.

UNRAU, A. M.; CHOY, Y. M. Simple, unambiguous syntheses of 2,3,6- and 2,4,6-tri-*O*-methyl-d-mannose. **Carbohydrate Research**, 17, 2, 439-443, 1971.

VENDRUSCOLO, C.W. **Goma Xantana e Galactomanana (*M. scabrella*): Desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina.** Universidade do Vale do Itajaí. M.Sc. Dissertação, 2005.

VIEIRA, I. G. P. **Estudo químico de *Dimorphandra gardneriana* (Leguminosae) e preparação de complexos de flavonóides com fosfolipídeos.** Fortaleza, Tese (doutorado) em Química Orgânica - Universidade Federal do Ceará, 2003.

VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALÃO, M. I.; BRITO, E. S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, 101, 70–73, 2007.

ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; SIERAKOWSKI, M. R.; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F. A. Linear (15)-L-arabinofuranan from seeds of guapuruvu (*Schizolobium paraybum*). **Carbohydrate Research**, 233, 265-269, 1992.

Capítulo 3

Caracterização físico-química de filmes bioativos produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina.

Sumário	Página
Resumo	103
Abstract	104
3.1. Introdução	105
3.1.1. Reologia: galactomananas e misturas destas com outros polímeros	106
3.1.2. Atividade de água em alimentos	119
3.1.3. Calorimetria	132
3.2. Hipótese e objetivos	133
3.3. Materiais e métodos	134
3.3.1. Reagentes	134
3.3.2. Material vegetal e extração de galactomananas	134
3.3.3. Preparo das dispersões para estudos reológicos	134
3.3.4. Comportamento reológico	135
3.3.5. Preparo de filmes comestíveis	136
3.3.6. Teste gravimétrico em placas de ágar	137
3.3.7. Atividade de água	137
3.3.8. Análise térmica	138
3.4. Resultados e discussão	140
3.4.1. Comportamento reológico	140
3.4.2. Análise gravimétrica	167
3.4.3. Atividade de água	169
3.4.4. Análise térmica	211
3.5. Conclusões	215
3.6. Referências	216

Resumo

No presente capítulo, técnicas de reologia, medida de a_w e DSC foram empregadas para caracterizar a galactomanana de *A.pavonina*, dispersões de amido de milho gelatinizado e filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanan-amido e galactomanana-amido-nisina. O comportamento reológico da goma exibiu perfil similar aqueles reportados na literatura para galactomananas. Os ensaios oscilatórios detectaram diferenças significativas entre as distintas blendas avaliadas. A medida da a_w e a construção de isotermas de sorção permitiram caracterizar filmes comestíveis produzidos a partir de blendas de polissacarídeos e do complexo galactomanana-amido-nisina. Diferenças significativas foram detectadas nesses filmes e permitiram relacionar o comportamento da água ao arranjo estrutural dos diferentes filmes comestíveis produzidos. A umidade foi observada como dependente de importantes parâmetros avaliados nos filmes, tais como a temperatura e o conteúdo de glicerol. O fenômeno da histerese foi evidenciado para os filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido. O modelo de sorção descrito pela equação G.A.B. é sugerido como o que melhor representa os dados obtidos nas condições experimentais testadas aqui. As curvas de estabilidade térmica obtidas por DSC para a galactomanana e para os filmes comestíveis produzidos com galactomanana-amido e galactomanana-amido-nisina permitiram associar esses dados aos obtidos pelas medidas de a_w , corroborando, no caso do filme contendo nisina, que o antimicrobiano colabora com uma maior hidratação do filme comestível.

Palavras-chave: galactomananas, reologia, atividade de água, DSC

Abstract

In this chapter, rheological, water activity measurement and DSC techniques were employed to characterize *A. pavonina* gum, corn starch dispersion gelatinized and edible films made of complex galactomannan-starch and galactomannan-starch-nisin. The rheological behavior of the gum exhibited a similar pattern reported before for gums in the literature. Frequency assays detected significant differences among the blends produced. The a_w measurement and sorption isotherms plots helped to characterized edible films made of polysaccharide blends and the complex galactomannan-starch-nisin. Significant differences were detected among the evaluated films and these differences could relate the water behavior to structural arrangements from the distinct films. The sorption was observed as dependent of the important parameters analyzed in the films, such as temperature and glycerol content. Hysteresis phenomenon was observed on the edible films made of galactomannan-stach. The G.A.B. equation is suggested to represent the experimental data. Thermal curves of the galactomannan and of the edible films made of galactomannan-starch and galactomannan-starch-nisin permitted relate these data to a_w measurement, corroborating the influence of the nisin on increasing the water content in edible film.

Keywords: galactomannans, rheology, water activity, DSC

3.1. Introdução

Atualmente a demanda por alimentos seguros, práticos e acessíveis ao consumidor impulsiona as pesquisas sobre métodos de preservação e/ou aumento do tempo de prateleira daqueles. Hoje a área de alimentos também busca focar pesquisas em métodos de preservação e diariamente são publicados trabalhos relacionados a essa temática.

Mudanças de natureza química e bioquímica estão associadas à deterioração de alimentos. Dessa forma, entender como esses processos ocorrem, como podemos evitá-los ou até mesmo diminuir sua intensidade é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas embalagens ou de técnicas para a modificação da atmosfera que circunda o alimento. Outro aspecto relevante a ser considerado consiste na aplicação dessa tecnologia para melhorar os alimentos.

Aspectos físicos, químicos e estruturais permitem compreender melhor as diversas interações que ocorrem entre os diferentes materiais utilizados no preparo de alimentos. Vale salientar que o aumento do tempo de preservação está intimamente relacionado ao conhecimento dessas múltiplas interações.

3.1.1. Reologia: galactomananas e misturas destas com outros polímeros

A Reologia é utilizada no estudo dos alimentos para definir a consistência de diferentes produtos. Reologicamente, a consistência é definida em termos de duas componentes, a viscosidade e a elasticidade. Na prática, a Reologia dedica-se às medidas de viscosidade, caracterização do comportamento de fluxo e determinação da estrutura do material (BYLUND, 2003).

Uma das maneiras de classificar os materiais reologicamente é através dos termos viscoso, elástico ou viscoelástico. Gases e líquidos são normalmente descritos como fluidos viscosos. Um fluido ideal é incapaz de armazenar qualquer energia de deformação. Assim, ele é deformado de forma irreversível quando submetido a um esforço. Ele flui e a energia de deformação é dissipada como calor, o que resulta num aumento de temperatura. Os sólidos, contrariamente, são descritos como materiais elásticos. Um material sólido ideal armazena toda a energia de deformação imposta e se recuperará consequentemente através da interrupção do esforço. Numerosos materiais são viscosos bem como exibem propriedades elásticas, ou seja, eles armazenam alguma energia de deformação em sua estrutura enquanto parte dessa energia é perdida pelo fluxo. Esses materiais são denominados de viscoelásticos e muitos alimentos se enquadram nesse grupo (FENNEMA, 2001).

O conhecimento dos parâmetros reológicos de um material é fundamental na escolha do equipamento de medição, no controle de qualidade e no desenvolvimento de novos produtos (DOYLE *et al.* 2006; LUCYSZYN *et al.* 2006). No mercado existem muitos equipamentos disponíveis, contudo, apenas alguns reômetros cilíndricos e rotacionais com geometrias bem definidas podem determinar a taxa de deformação do material medido (STEFFE, 1992). Nos reômetros rotacionais, a velocidade não varia em função do tempo no cisalhamento e as tensões geradas pelo escoamento podem atuar tanto na direção paralela (tensão de cisalhamento) como na direção perpendicular (tensão normal) à cisalha. Assim os dados obtidos em estado estacionário são úteis para elaborar curvas de escoamento e modelos de escoamento. Permitem também avaliar a influência de fatores tais como temperatura, concentração, presença e tamanho de

partículas em suspensão sobre as propriedades reológicas (BARONI *et al.* 1999; SATO; CUNHA, 2007).

O comportamento viscoelástico dos fluidos também pode ser determinado por meio de um teste dinâmico (espectro mecânico) onde as amostras são submetidas a um movimento oscilatório. Tipicamente uma deformação sinuosa é aplicada à amostra causando algum nível de estresse que é transmitido por todo o material. Nos materiais viscosos muito desse estresse é dissipado em perdas friccionais e em materiais altamente elásticos é mais transmitido.

Uma solução diluída, uma solução concentrada e um gel apresentam distintos comportamentos quando submetidos a um ensaio de espectro mecânico. Na solução diluída (Figura 3.1), G'' é maior que G' através de todo o intervalo de freqüência. Numa solução concentrada (Figura 3.2), o ponto de cruzamento entre os módulos G' e G'' localizado no meio do intervalo de freqüência mostra uma tendência para comportamento tipo sólido nas altas freqüências. A freqüência do ponto de cruzamento é um critério bem útil para avaliar um determinado material. Por outro lado, nos géis (Figura 3.3), G' é significativamente maior que G'' por todo o intervalo de freqüência. Vale salientar que nas soluções diluídas e nas concentradas os módulos são fortemente dependentes da freqüência enquanto que nos géis seus valores são praticamente constantes (STEFFE, 1992; PAI; KHAN, 2002).

A tangente do ângulo de fase, $\tan(\delta)$, é uma função bem utilizada para descrever o comportamento viscoelástico (STEFFE, 1992). Trata-se de um parâmetro que está diretamente relacionado à razão entre a perda de energia por ciclo e energia armazenada por ciclo (G''/G'). De acordo com Steffe (1992), em soluções diluídas, o valor da $\tan(\delta)$ é bem elevado, em soluções de polímeros amorfos varia de 0,2 a 0,3 e nos géis é muito baixa (próxima de 0,01), (Figura 4).

Técnicas reológicas despontam como ferramentas muito úteis na caracterização de alimentos, pois determinadas mudanças estruturais estão relacionadas ao processamento de alimentos (RINAUDO, 2001; FERITAS *et al.* 2004). Por exemplo, a goma de guar e seus derivados são extensivamente utilizados em muitas aplicações na indústria alimentícia. Em muitas dessas aplicações, a despolimerização dessa galactomanana é requerida para alcançar as propriedades reológicas e microestruturais

de produtos específicos. Métodos químicos, térmicos, mecânicos e enzimáticos (TAYAL; SAAD, 2000; MAHAMMAD *et al.*, 2006; MAHAMMAD *et al.*, 2007) são empregados para promover a despolimerização.

Monteiro *et al.* (2005) estudaram blendas de galactomanana de *locust bean* com proteínas do soro de leite (*whey protein*). Os resultados obtidos mostraram que diferenças de massa molecular do polissacarídeo influenciam a microestrutura do gel.

Lubbers *et al.* (2004) estudaram o comportamento reológico de iogurte desnatado ao longo de 7, 14 e 28 dias armazenados a 10 °C. Mudanças nos parâmetros reológicos associadas ao tempo de armazenamento do iogurte influenciaram a liberação do *flavour* e aumento da viscosidade aparente. Além disso, a composição do iogurte com flavorizante (e contendo proteínas, polissacarídeos, etc) pareceu ter grande impacto na liberação dos componentes relacionados ao aroma.

A maioria dos estudos reológicos com amido é feitos em temperaturas abaixo de 95 °C e o intervalo das taxas de deformação, nesses casos, é irrelevante (LAGARRIGUE; ALVAREZ, 2001; FUNAMI *et al.* 2005). A caracterização de amido gelatinizado por meio de um reômetro é difícil de ser feita por causa de dois fatores: a sedimentação e a evaporação da água da amostra. Esses problemas podem ser resolvidos por meio do aumento da temperatura gradativamente e do uso de óleo de silicone para evitar a evaporação. Taxas de deformação baixas, ou seja, situadas dentro do intervalo linear de deformação, quase não modificam a estrutura do amido gelatinizado. De fato, em aplicações industriais práticas, altas taxas de deformação são submetidas nessas dispersões, muito embora os testes dinâmicos como o ensaio oscilatório forneçam importante conhecimento sobre a formação da estrutura, é difícil assegurar que esta abordagem leva em consideração o rompimento da estrutura devido à alta deformação aplicada (LAGARRIGUE; ALVAREZ, 2001).

Um problema freqüente em blendas de polímeros, sejam estes de baixa ou alta massa molecular, é a separação de fase. Ela dificulta a detecção das propriedades viscoelásticas associadas ao material, sobretudo nas regiões de baixa freqüência (AJJI; CHOPLIN, 1991). Por outro lado, os sistemas de misturas de polissacarídeos são interessantes, pois são usados num rango bem amplo de aplicações por causa da sua habilidade de interagir de modo sinérgico e render materiais com propriedades

controladas (PAI *et al.* 2002). Particularmente, blendas de galactomananas, tais como as gomas de guar e de *locust bean* ou em combinação com xantana, são utilizadas num leque de aplicações que incluem coberturas ou ingredientes de alimentos em certos produtos como molhos, sobremesas geladas ou congeladas e produtos de confeitoria. Nesses casos, a goma de *locust bean* induz gelificação sinérgica em misturas com xantana uma vez que o guar produz somente sinergismo pelo aumento da viscosidade. Tais diferenças químicas podem ser atribuídas à variação na estrutura química das gomas de guar e de *locust bean*.

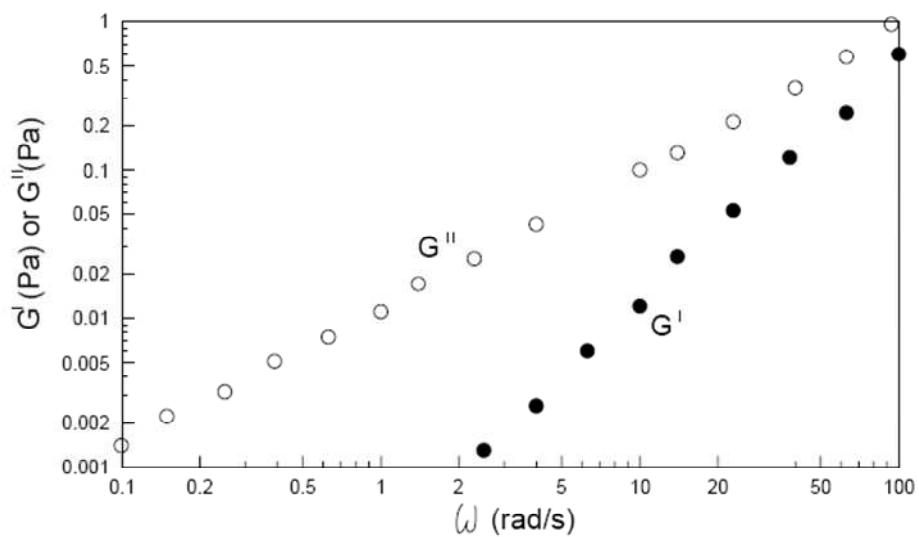


Figura 3.1 – Espectro mecânico de uma solução diluída de dextransa 5% (Fonte: STEFFE, 1992).

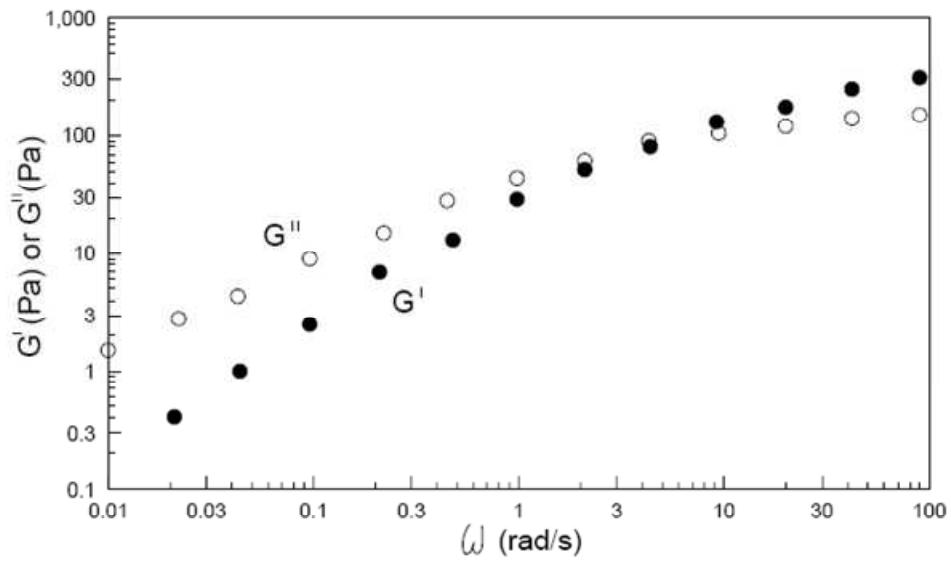


Figura 3.2 – Espectro mecânico de uma solução concentrada de λ -carragenana 5% (Fonte: STEFFE, 1992).

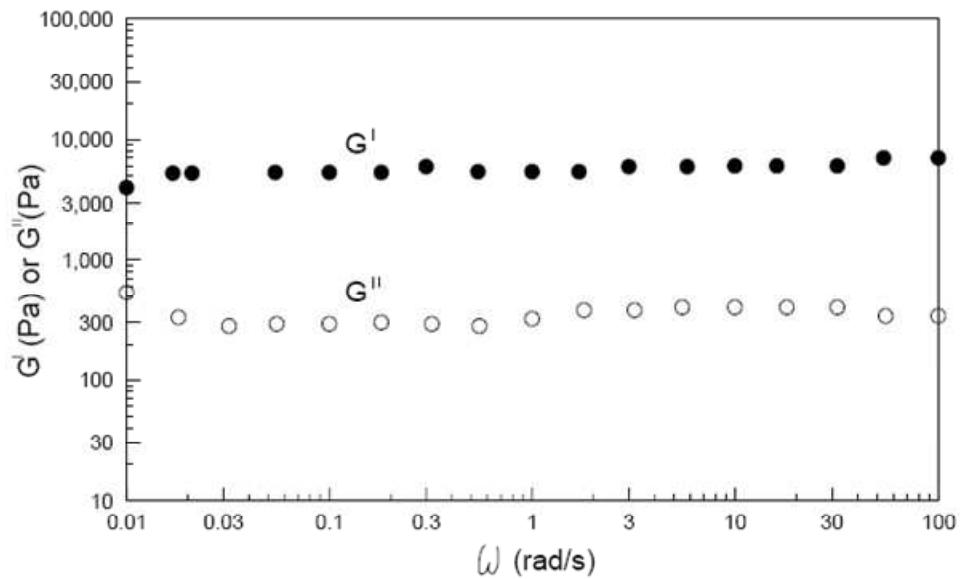


Figura 3.3 – Espectro mecânico de um gel feito de ágar 1% (Fonte: STEFFE, 1992).

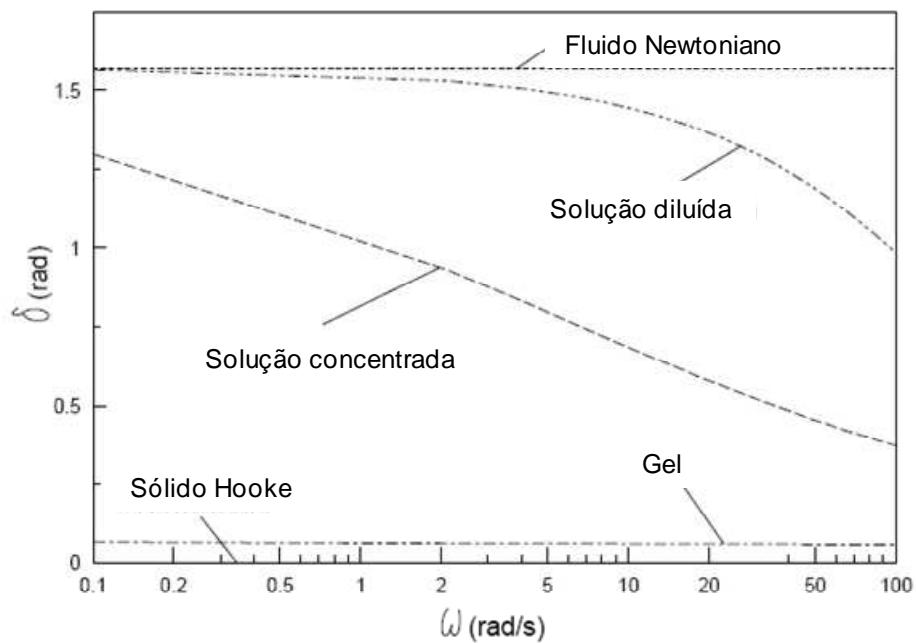


Figura 3.4 – Variação do ângulo de fase (δ) em função da freqüência (ω) para materiais típicos (Fonte: STEFFE, 1992).

3.1.2. Atividade de água em alimentos

O conceito de atividade de água (a_w) originalmente foi introduzido para estudar os níveis de água eram críticos para promover o crescimento microbiano. Em alimentos ou outros produtos naturais, esse conceito está mais intimamente relacionado às propriedades microbianas, químicas e físicas que ao conteúdo de umidade total (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007). Mudanças específicas na cor, aroma, *flavour*, textura, estabilidade e aceitação de produtos alimentícios *in natura* ou processados são associadas a um intervalo relativamente estreito de a_w . Ao lado da temperatura, a atividade de água é considerada como um dos parâmetros mais importantes associados ao processamento e preservação de alimentos (CASTILLO *et al.* 2003; LABUZA *et al.*, 2004; BELLAGHA *et al.* 2005).

A compreensão e o controle da a_w contribuem para condições seguras de armazenamento de alimentos e formam as bases da preparação moderna de alimentos, especialmente aqueles de teor de umidade intermediária. Na literatura existem diversos trabalhos que determinaram os níveis mínimos de a_w para o crescimento de patógenos baterianos, leveduras, mofos e a produção de toxinas microbianas (PRIOR *et al.*, 1987; ROSSO; ROBINSON, 2001; SINIGAGLIA *et al.*, 2002).

A atividade de água em um alimento descreve um *status* de energia da água naquele alimento e daí sua disponibilidade para atuar como solvente e participar de reações químicas e bioquímicas (LABUZA, 1980). A atividade de água influencia o escurecimento não enzimático, oxidação lipídica, degradação de vitaminas e outras reações degradativas (LABUZA, 1971), (Figura 3.5).

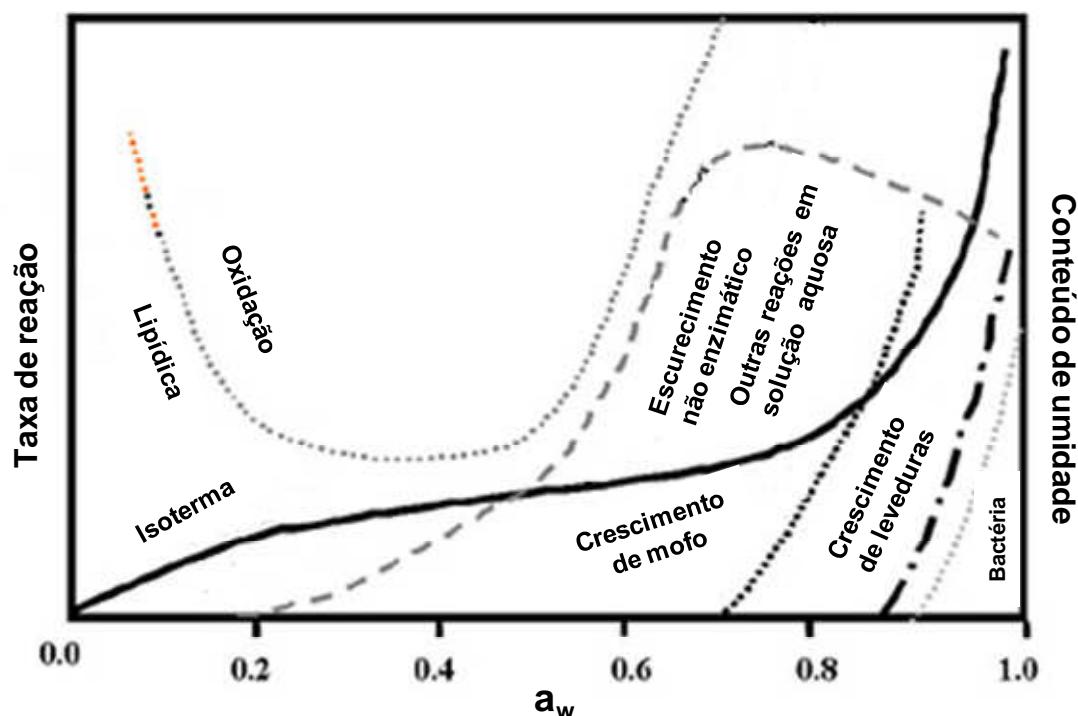


Figura 3.5 – Mapa de estabilidade química e bioquímica em função da atividade de água (Adaptada de BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

Dada a importância do relacionamento entre o conteúdo de umidade e a_w em um alimento, o comportamento de sorção de um produto alimentício é descrito graficamente por meio da representação do ganho de umidade em função do valor de pressão parcial de vapor de água (a_w) ao qual o material é submetido. Esta relação é chamada de isoterma de sorção e pode ser visualizada na Figura 3.5.

Uma isoterma de sorção de um alimento é obtida do equilíbrio de um determinado conteúdo de umidade em diversos níveis de a_w a temperatura constante. A isoterma de sorção pode ser obtida de duas formas: (a) ou através de uma amostra que foi seca (adsorção), hidratada (desorção) ou nativa que é colocada em uma câmara de umidade controlada a temperatura constante e a massa é medida até o equilíbrio ou (b) grupos de amostras com conteúdos de umidades variadas são estabelecidas pela adição ou remoção de umidade, então, a a_w e o conteúdo de umidade são medidos.

As isotermas de sorção da maioria dos alimentos são de formato não linear, e geralmente sigmoidal, mas podem diferir com base na composição química ou o estado físico-químico dos constituintes do alimento. Na Figura 3.6 são mostrados os tipos de isotermas mais comumente observados em alimentos. A isoterma tipo I (Figura 3.6 A) é típica de materiais que retém água em baixas atividades de água. Este tipo de ingrediente absorve água através de quimiosorção em sítios específicos o que resulta num calor de sorção elevado (Q_s). A isoterma tipo II (Figura 3.6 B) tem forma sigmoidal em consequência do efeito aditivo da lei de Raoult, efeito de capilaridade e interação da água em superfície. Sistemas alimentícios compostos principalmente de componentes cristalinos tais como açucares e sais são representados pela isoterma tipo III (Figura 3.6 C). O ganho de água para açúcar cristalino puro, por exemplo, é pequeno quando a a_w está acima de 0,80 (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.* 2007).

É imprescindível ter um conhecimento acerca de isotermas de sorção para estabelecer conteúdos críticos de umidade em materiais biológicos bem como prever potenciais mudanças na estabilidade de alimentos. Para prever o comportamento de sorção, modelos matemáticos com dois ou mais parâmetros tem sido utilizados e mais de 270 equações tem sido propostas para ajustar os dados experimentais de isotermas de sorção aos materiais biológicos.

Sudhamani *et al.* (2005) determinaram as isotermas de sorção de blendas do polissacarídeo microbiano de *Pseudomonas caryophilli* e PVA. Buonocore *et al.* (2003) modelaram o comportamento de sorção de coberturas comestíveis feitas de caseína. Nesses e em muitos outros trabalhos a modelagem matemática é uma abordagem freqüente para que o comportamento de sorção de um material seja descrito quantitativamente pelos parâmetros de uma equação (AZANHA; FARIA, 2005).

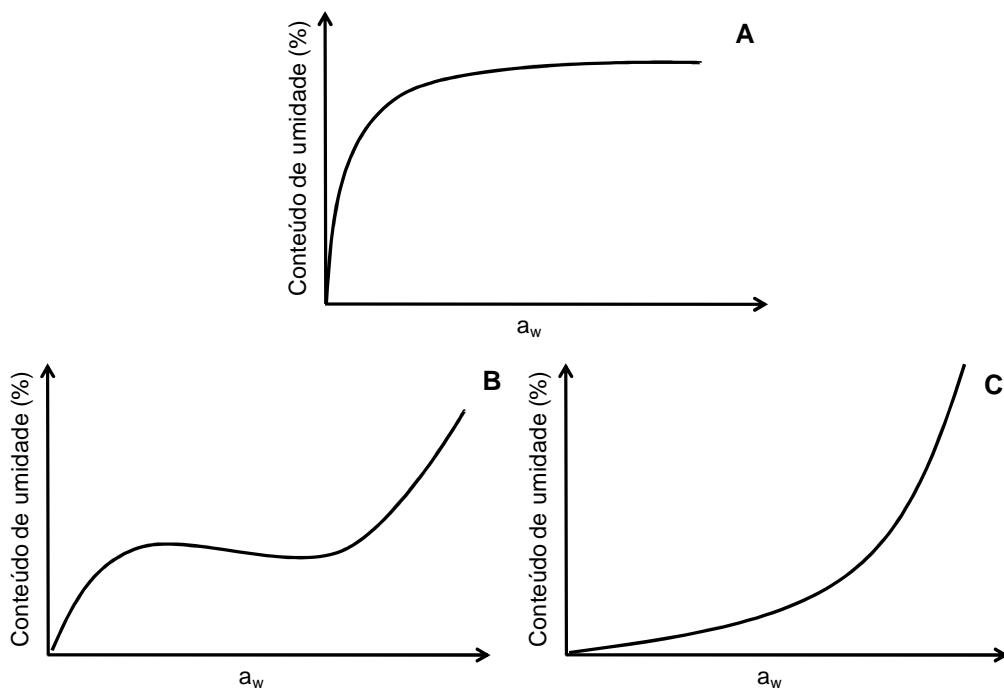


Figura 3.6 – Tipos de isotermas de adsorção. Em (A) isoterma tipo I, em (B) isoterma tipo II e em (C) isoterma tipo III. (Adaptada de BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

A isoterma Langmuir foi desenvolvida por Irving Langmuir em 1916 para descrever a dependência da cobertura de superfície de um gás adsorvente sobre a pressão do gás acima da superfície e a temperatura constante. É um dos mais simples modelos cinéticos, ainda fornecendo úteis *insights* na dependência de pressão da extensão da superfície de adsorção para materiais biológicos. O modelo fornece previsões muito boas dentro de um intervalo de 0 a 0,3 dependendo do número de suposições (BELL; LABUZA, 2000). O modelo também assume que a adsorção é limitada a cobertura da monocamada enquanto todos os sítios da superfície são equivalentes os quais podem acomodar a maioria dos átomos adsorvidos. Também, a habilidade de uma molécula adsorver moléculas de água num dado sítio é admitida independente da ocupação dos sítios vizinhos. Em teoria, se um gás está em contato com um sólido, o equilíbrio se estabelecerá entre as moléculas na fase gasosa e as correspondentes espécies adsorvidas (átomos ou moléculas) ligadas à superfície do sólido. O processo de adsorção entre as moléculas de vapor na fase gasosa imagina-se que existem alguns bolsos de água causados pela condensação em capilares de diâmetro muito pequeno. A isoterma Langmuir ignora isto, o que pode levar ao erro (BELL; LABUZA, 2000).

A equação de Langmuir pode ser derivada termodinamicamente ou baseada na cinética de adsorção. Para ambos os casos, a fração de sítios ocupados na superfície é representada pela equação:

$$(1) \quad 1 + K.a_w = C.K.a_w$$

Onde a_w é a atividade de água e K e C são constantes.

Um dos modelos mais populares para ajustar dados experimentais de isotermas de sorção é dado pela equação proposta por Brunauer-Emmet-Teller (modelo B.E.T.). Sua equação é dada pela fórmula:

$$(2) \quad a_w/(1 - a_w).m = 1/(m_0.C) + (C - 1/m_0.C)a_w$$

Onde a_w é atividade de água, m é ganho de água ou conteúdo de umidade, m_0 é o conteúdo da monocamada e C a constante associada ao calor de adsorção da primeira camada.

O valor da monocamada pode ser determinado através da equação:

$$(3) \quad m_0 = \frac{1}{I + S}$$

Onde I corresponde ao coeficiente linear (intercepto) e S o coeficiente angular quando $a_w / [(1 - a_w)m]$.

A principal característica da isoterma B.E.T. é o conceito de monocamada (Figura 3.7) e que o processo de sorção é regulado por dois mecanismos. Um deles envolve a cinética de Langmuir no qual as moléculas do gás são diretamente absorvidas em locais selecionados na superfície sólida até que a última camada seja coberta por uma fina camada de gás e o outro mecanismo é a condensação em camadas subsequentes enquanto todos os sítios da superfície são admitidos como tendo a mesma energia sem nenhuma interação cruzada na superfície. Esse modelo não prediz a adsorção na região de capilaridade (Figura 3.7).

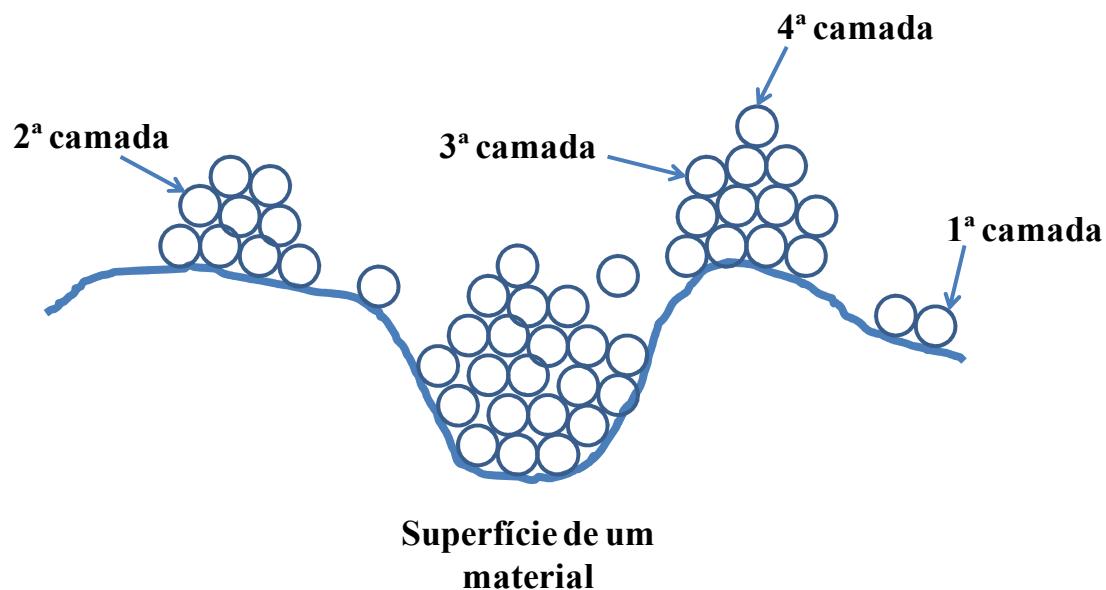


Figura 3.7 – Modelo proposto para caracterizar a dinâmica da água na superfície da monocamada dos materiais (Adaptada de BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

O modelo B.E.T. falha quando níveis superiores de a_w são considerados. Isso leva ao desenvolvimento do modelo proposto por Guggenheim, Anderson e de Boer (modelo G.A.B.). Essa equação da isoterma possui três parâmetros e é amplamente usada para descrever o comportamento de sorção em alimentos. É dada pela fórmula:

$$(4) m = m_0 \cdot K \cdot C \cdot a_w / [(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)]$$

Onde C é a constante de Guggenheim e K o fator de correção.

O modelo G.A.B. foi desenvolvido por Guggenheim, Anderson e de Boer como uma versão melhorada do modelo B.E.T. para adsorção multicamada. Com um número razoável de parâmetros, a equação G.A.B. representa adequadamente os dados experimentais no intervalo de 0 a 0,95 para a maioria dos alimentos de interesse prático. A equação GAB tem sido amplamente recomendada pelo *European Project Group COST 90 on Physical Properties of Food*.

Ambos os modelos B.E.T. e G.A.B. são baseados nos mesmos princípios da monocamada, entretanto o modelo G.A.B. introduz um grau de liberdade adicional em outras palavras, uma constante adicional, que confere ao modelo uma maior versatilidade. O modelo G.A.B. é basicamente similar a equação B.E.T. no qual reconhece a adsorção física em multicamadas sem qualquer interação lateral (Timmermann *et al.* 2001).

As maiores vantagens do modelo G.A.B. são: um *background* teórico viável, pois descreve o comportamento de sorção para a maioria dos alimentos num intervalo de 0 a 0,95 de aw, possui uma formula matemática com apenas três parâmetros o que a torna mais prática para cálculos (Timmermann *et al.* 2001), além disso, seus parâmetros têm significado físico que em termos de processos de sorção é capaz de descrever alguns efeitos da temperatura sobre as isotermas através de equações do tipo Arrhenius (BERTUZZI *et al.* 2007a).

Na literatura, inúmeros trabalhos foram reportados apresentando o modelo G.A.B. como aquele que melhor ajustou os dados experimentais. Azanha; Faria, (2005) estudaram cereais de flocos de milho (*cornflakes*) para prever sua estabilidade. O modelo G.A.B. foi o de melhor ajuste. Phan *et al.* (2005) estudaram filmes comestíveis feitos com diferentes tipos de amido e ágar. O modelo G.A.B. foi utilizado para

descrever o comportamento de sorção desses filmes. Counpland *et al.* (2000) determinaram isotermas de adsorção de filmes comestíveis de proteína do soro de leite (*whey protein*) contendo diferentes concentrações de glicerol. O modelo G.A.B. foi o de melhor ajuste e o conteúdo de umidade variou linearmente com a quantidade de glicerol presente nos fimes.

Embora os modelos B.E.T. e G.A.B. e o conceito da monocamada no qual eles são baseados eles são aparentemente úteis para explicar vários mecanismos de estabilidade, esses modelos nem sempre são compatíveis com outros aspectos do fenômeno de sorção de umidade o qual suporta o uso de equações empíricas para modelar a sorção de umidade (LAGOUDAKI; DEMERTZIS, 1993).

O modelo proposto por Freundlich é importante para explicar o comportamento de sorção de superfícies heterogêneas tais como aqueles da maioria dos alimentos (SMITH *et al.* 1981; DEMERTZIS; KONTOMINAS, 1988). Ele tem sido aplicado com sucesso a vários alimentos e é expresso pela equação:

$$(5) m = K \cdot a_w^{1/n}$$

Onde K e n são constantes relacionadas à eficiência de sorção do adsorvente. K é conhecida como a capacidade de sorção do material. O *plot* de log m em função de log a_w permite o cálculo das constantes K e n. A capacidade de sorção pode ser encarada como uma constante análoga a constante m_0 da equação B.E.T.

Halsey desenvolveu uma expressão para condensar as multicamadas numa distância relativamente grande da superfície (HALSEY, 1948). Essa expressão é dada por:

$$(6) \ln m = [\ln A - \ln (-\ln a_w)]/B$$

Onde A e B são constantes que podem ser calculadas através do *plot* de $\ln m$ em função de $\ln (-\ln a_w)$.

Essa equação desenvolvida por Halsey tem um fundamento crítico da teoria proposta pelo modelo B.E.T. Halsey estabeleceu que a magnitude do parâmetro B caracteriza o tipo de interação entre o vapor e o sólido. Se B é grande, a atração do sólido pelo vapor é muito específica e não se estende além da superfície. Quando B é

pequeno as forças que são mais típicas são as de van der Waals e não atuam a grandes distâncias. Esta equação, como provado por Halsey, apresenta um bom ajuste para dados de adsorção que são representados pelas isotermas dos tipos I, II e III (Figura 3.6). Por exemplo, num trabalho realizado por Lemus *et al.* (2008) para as isotermas de adsorção da alga marinha *Gracilaria* sp o modelo Halsey foi o que melhor representou o comportamento de sorção.

Um dos modelos mais amplamente utilizados que relaciona a atividade de água e a água adsorvida é o da equação de Henderson (1952). Esta equação empírica é dada pela fórmula:

$$(7) \ln m = \{\ln[-\ln(1 - a_w)] - \ln A\}/B$$

Onde A e B são constantes que podem ser calculadas através do *plot* de $\ln m$ em função de $\ln[-\ln(1 - a_w)]$. Herderson reconheceu que a teoria da adsorção de Gibbs a qual é utilizada na derivação desta equação, não foi completamente substanciada pelos experimentos de sorção com amido. Ele também percebeu que não havia relação entre a magnitude das constantes de sua equação e as propriedades do material analisado.

Baseada diretamente na premissa de que a mudança na energia livre para a sorção é relacionada ao conteúdo de umidade, Chung e Pfost (1967) apresentaram um modelo expresso por:

$$(8) m = [\ln A - \ln(-\ln a_w)]/B$$

Onde A e B são constantes que podem ser calculadas pelo *plot* de m em função de $\ln(-\ln a_w)$. As constantes A e B da equação de Chung e Pfost são dependentes da temperatura e do tipo de adsorvente. Boki e Ohno (1991) propuseram que a magnitude das constantes nas equações de Henderson e Chung-Pfost estão relacionadas à estabilidade da estrutura microporosa do amido durante o ganho de umidade.

O efeito da temperatura sobre isotermas de sorção é de grande importância dado que os alimentos são expostos a variações amplas de temperatura durante o processamento e o armazenamento e q a_w muda com a temperatura (SANDOVAL *et al.* 2002). Para uma isoterma de sorção de um alimento qualquer, a temperatura deve ser mantida constante porque a temperatura afeta a mobilidade das moléculas de água e o equilíbrio dinâmico entre as fases de vapor e adsorvente. Entretanto, isotermas de

sorção de umidade são esboçadas com uma temperatura específica e constante. Em geral, o efeito da temperatura sobre o aumento da a_w num conteúdo de umidade constante é maior nas atividades de água baixas ou intermediárias (BELL; LABUZA, 2000). A atividade de água aumenta quando a temperatura aumenta para um conteúdo de umidade constante. Nos alimentos que apresentam um comportamento de sorção descrito por isotermas do tipo II, por exemplo, por causa da natureza de ligação da água, numa a_w constante, esses materiais retêm menos água em altas temperaturas que em baixas temperaturas (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

De um modo geral, a temperatura permite o cálculo da entalpia de sorção (Q_s) pode ser calculada pela equação de Chirife *et al.*(1986):

$$(9) Q_s = R \cdot T \cdot \ln C$$

Onde R é a constante universal dos gases (kcal/K.mol). Essa equação relaciona à constante C (do calor de sorção) e a temperatura absoluta (T).

Quando se trabalha com sistemas alimentícios complexos consistindo sistemas multidomínio de ingredientes, o efeito da composição desempenha um dos mais importantes papéis afetando o comportamento de sorção (CHENG *et al.* 2008). Por exemplo, os grupos – OH do glicerol também contribuem para adsorver umidade, mas as interações hidrofóbicas entre moléculas individuais bloqueiam aqueles grupos e a porção do glicerol tem muito menos massa que a cadeia do ácido graxo. Cho e Rhee (2002) estudaram características de sorção e propriedades mecânicas de filmes comestíveis de proteína de soja. Efeito dos plastificantes glicerol e sorbitol foram avaliados. Filmes com mais plastificante absorveram mais umidade. A umidade retida por ação do plastificante interferiu nas propriedades mecânicas resultando em filmes mais elongação e menor força tênsil.

Nos carboidratos, tais como amido ou as gomas poliméricas, existem mais pontes de hidrogênio quando os comparamos com as proteínas. Entretanto, o uso de plastificante não é tarefa fácil devido às ligações em sua estrutura interna. Com o amido bruto, são necessárias altas temperatura e umidade para gelatinizar e abrir a estrutura para a adsorção (BERTUZZI *et al.*, 2007). Somente a adsorção de superfície é observada em polímeros como a celulose (CHENG *et al.*, 2008), a qual possui estrutura

de natureza cristalina uma vez que as gomas possuem mais pontes de hidrogênio e mais cadeias abertas o que resulta em uma maior capacidade de retenção de água.

3.1.3. Calorimetria

Na pesquisa científica de alimentos, a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), ao lado de outras técnicas termo-analíticas, permite estudar a dinâmica da água. Mudanças na distribuição da água podem ser relacionadas à textura de um alimento (DEAN, 1995; VITURAWONG *et al.* 2008; ZHOU *et al.* 2008).

O resultado de um experimento de DSC é uma curva de fluxo de calor em função da temperatura ou em função do tempo. Nessas curvas, duas convenções são utilizadas, reações exotérmicas na amostra são mostradas como picos negativos ou positivos. Esta curva pode ser utilizada para calcular entalpias de transição. Isto é feita pela integração de um pico que corresponde a uma dada transição. A entalpia de transição pode ser expressa pela equação:

$$(10) \Delta H = K \cdot A$$

Onde ΔH é entalpia de transição, K é a constante calorimétrica e A é área embaixo da curva. A constante calorimétrica varia de um instrumento para outro.

Na literatura existem muitos trabalhos que exploram as técnicas calorimétricas para estudar alimentos/ingredientes de alimentos tais como: o fenômeno da gelatinização do amido (AHMED *et al.* 2008), mudanças nas propriedades do polvilho azedo (GOMES *et al.* 2005), agregação térmica de metilcelulose com diferentes massas moleculares (FUNAMI *et al.* 2007), misturas miscíveis/imiscíveis de carboidratos através da temperatura de transição vítreo (ICOZ; KOKINI, 2007), separação de fase de misturas de glucomanananas, galactomananas e gelatina (ROGERS *et al.* 2006; HARRINGTON; MORRIS, 2009), ponto do estado de transição sol-gel em κ -carragenana (NUÑEZ-SANTIAGO; TECANTE, 2007), amostras de amido de trigo processado e não processado em função da quantidade de água (RODER *et al.* 2009).

3.2. Hipótese e objetivos

3.2.1. Hipótese: filmes produzidos a partir da blenda galactomanana de *Adenanthera pavonina* e amido de milho gelatinizado apresentam sinergismo de propriedades quando esses polímeros são utilizados?

3.2.2. Objetivo geral

Caracterizar por meio de reologia, atividade de água e DSC a galactomanana de *A. pavonina*, amido de milho gelatinizado e filmes comestíveis produzidos a partir das blendas com ambos os polímeros e contendo o antimicrobiano nisina.

3.2.3. Objetivos específicos:

- Caracterizar distintas soluções da galactomanana de *A. pavonina* , dispersões de amido gelatinizado e blendas galactomanana-amido por meio de reologia;
- Estudar o efeito do glicerol nas propriedades reológicas dessas blendas;
- Caracterizar o comportamento da atividade de água (a_w) em filmes comestíveis produzidos a partir da galactomanana de *A. pavonina*, dispersões de amido gelatinizado e blendas galactomanana-amido;
- Estudar o efeito da temperatura, do glicerol e da presença de nisina nos distintos filmes comestíveis produzidos por meio de medidas da a_w ;
- Determinar termogramas por meio de DSC da goma de *A. pavonina* e de filmes comestíveis produzidos a partir de blendas galactomanana-amido e galactomanana-amido-nisina.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Reagentes

Glicerol, ácido cítrico, citrato de sódio, e etanol PA foram adquiridos junto à empresa Panreac, Barcelona, Espanha. Amido de milho rico em amilose (*high amilose corn starch*) foi comprado junto à empresa Sigma Corporation nos EUA.

Nisin (nisin NP, bath 148/149) foi preparada em estoques de 1 mg.mL⁻¹ em água ultra pura (grau Milliq; pH=2,0; ajustado com HCl), filtrados (0,2 µm) e armazenada a -20 °C.

Agar bacteriológico foi comprado junto à empresa Liofilchem s.r.l., Itália.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3.2. Material vegetal e extração de galactomananas

Sementes de *Adenanthera pavonina* foram coletadas no campo experimental do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, durante os meses de julho a setembro de 2006. Galactomananas do endosperma de sementes quiescentes foram isoladas através dos métodos 1 e 2 descritos anteriormente no capítulo 2 desta Tese.

3.3.3. Preparo das dispersões para estudos reológicos

Para determinar o comportamento reológico da galactomanana isolada de *A. pavonina* através de ensaio do espectro mecânico, soluções do polissacarídeo extraído

pelo Método 1 foram preparadas em água destilada e em distintas concentrações (0,3, 0,6, 0,8, 1,0 e 1,4%).

A fim de avaliar o efeito das condições de secado sobre a galactomanana, o Método 2 de extração foi realizado e ao final do protocolo, a secagem das amostras foi realizada de duas maneiras, com acetona e por liofilização. Dispersões de galactomananas (1%) foram preparadas em água destilada com amostras obtidas pelos dois métodos de secado e sem adicionar o agente plastificante.

Amido de milho foi gelatinizado de acordo com o protocolo de Bertuzzi *et al.* (2007a e b). Glicerol (30%, 30 g/100 g de polissacarídeos) foi utilizado como plastificante naquela dispersão e outra foi preparada sem glicerol. Para estudo reológico das propriedades da blenda galactomanana-amido, dispersões de ambos os polissacarídeos foram preparadas e misturadas na proporção de 7,0-3,0 (7 partes de dispersão de galactomanana e 3 partes de dispersão de amido). Essa combinação foi escolhida de acordo com o resultado do experimento gravimétrico de filmes descrito adiante. Essa blenda foi preparada com glicerol (30%) e também sem o agente plastificante.

3.3.4. Comportamento reológico

Dispersões de polissacarídeos e de blendas de polissacarídeos foram analisadas quanto ao comportamento reológico. As medidas reológicas foram conduzidas em um reômetro HAAKE Rheostress 600 (Newark, Alemanha) equipado com geometria cone-placa e as temperaturas constantes de 20 e 25 °C. O rotor utilizado foi um C35/2° Ti. Todas as curvas reológicas foram obtidas após tempo de estabilização de cinco minutos.

O estudo da interação do glicerol com os polímeros foi avaliado nas distintas dispersões. Para tanto, essas foram preparadas com o plastificante (30%) e sem ele. As medidas de curvas de escoamento e de ensaio oscilatório foram realizadas em intervalos de freqüência de 0,05 a 0,5 s⁻¹ e 0,01 a 0,1 s⁻¹, com deformações de 1 e 2 %, respectivamente. O comportamento reológico foi relacionado à lei de potência (modelo de Ostwald-de-Waele, STEFFE (1992)) de acordo com a equação:

$$(11) \tau = -\kappa D^n$$

onde τ é o esforço (Pa), κ é o índice de consistência (Pa.sⁿ), D é a deformação (s⁻¹) e n é o índice de fluxo. Para líquidos não-Newtonianos, a viscosidade aparente é altamente dependente da deformação no qual o esforço é medido (STEFFE, 1992). Dessa forma, a viscosidade aparente (η_{ap}) pode ser calculada pelo modelo da lei de potência:

$$(12) \eta_{ap} = \kappa D^{n-1}$$

3.3.5. Preparo de filmes comestíveis

As dispersões formadoras de filmes consistiram de galactomanana (1%), amido de milho (5%) e mistura das dispersões dos polímeros preparadas em proporções definidas de acordo com uma matriz experimental (Quadro 1). Glicerol (30%) foi utilizado como plastificante. Essas dispersões (3 mL) foram colocadas em placas de Petri plásticas de três cm de diâmetro e deixadas secar em estufa a 35 °C com circulação de ar por 24 horas. Esses filmes foram avaliados por meio do teste gravimétrico descrito no item seguinte (Item 3.3.6).

Para determinação da atividade de água, filmes comestíveis foram produzidos utilizando quantidades pré-estabelecidas de dispersões dos polímeros também de acordo com a matriz experimental de fatorial 2 (Quadro 1). A concentração de plastificante (glicerol) foi fixada em 30% para todas as combinações dessa matriz. Para o centro da matriz foi estabelecida a combinação 7,0-3,0 de acordo com o resultado do experimento gravimétrico.

Filmes contendo o antimicrobiano nisina também foram avaliados quanto à atividade de água. As dispersões formadoras desses filmes foram preparadas com tampão citrato (50 mM, pH 5,0) substituindo água destilada como solvente da galactomanana. Esse tampão foi selecionado com base no resultado do bioensaio utilizando nisina contra distintos microorganismos patogênicos descrito adiante no Capítulo 4 desta Tese. Três mililitros desse preparado foram colocados em placas de Petri plásticas (3 cm de diâmetro) e deixadas secar em estufa a 35 °C com circulação de ar (por aproximadamente 24 horas).

3.3.6. Teste gravimétrico em placas de ágar

Placas de Petri com ágar microbiológico (0,6%) foram preparadas e o gel foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Somente os filmes produzidos nas proporções definidas de acordo com a matriz experimental foram avaliados através deste teste. Três filmes de cada tratamento foram colocados por placa e a resistência desses filmes foi mensurada ao longo de 0, 24 e 48 horas através da remoção dos filmes das placas, quando possível, seguida de pesagem desses filmes.

3.3.7. Atividade de água (a_w)

Para realizar as medidas de atividade de água, amostras em triplicata de polissacarídeo e dos filmes produzidos de acordo com as proporções estabelecidas por uma matriz experimental foram secas em dessecador até peso constante. Um equipamento de medida de atividade de água, LabMaster – aw (Novasina, Suíça) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram acondicionadas em um recipiente metálico e este recipiente foi colocado dentro de um bote de cristal. Ambos recipientes foram fornecidos com o equipamento. O conjunto foi pesado antes do início do experimento em uma balança digital Sartorius, modelo 2462 ($\pm 0,0001$ g). Em seguida, as amostras foram expostas a atmosfera de vapor de água criada dentro da câmara de medição do aparelho a partir de soluções salinas saturadas fornecidas com o equipamento. Toda a obtenção dos dados foi realizada a temperatura constante de 25 °C, exceto quando foi estudado o efeito da temperatura (medidas realizadas a 15°C, 25 °C e 35 °C). Decorrido o tempo de equilíbrio das amostras com a atmosfera da câmara, o ganho de umidade foi determinado pela pesagem das amostras. Para estudo do efeito do glicerol nos filmes da blenda 7,0-3,0, medidas de atividade de água de filmes produzidos com distintas concentrações do plastificante (20, 30 e 40%, g.100 g⁻¹ de polímero) foram realizadas.

Os dados de sorção foram ajustados a oito modelos matemáticos: B.E.T. (BRUNAUER *et al.*, 1938), G.A.B. (BIZOT, 1984), Langmuir (LANGMUIR, 1916),

Chung-Pfost (CHUNG; PFOST, 1967), Freundlich (FREUNDLICH, 1926), Halsey (HALSEY, 1948), Henderson (HENDERSON, 1952) e Smith (SMITH, 1947).

3.3.8. Análise térmica

A estabilidade térmica das amostras de polissacarídeo isolado de sementes de *A. pavonina* e dos filmes comestíveis produzidos (preparados com tampão fosfato e também contendo nisina) foi estudada por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), utilizando um analisador térmico Shimadzu DSC-50. As amostras (5 mg) foram acondicionadas e precisamente pesadas em células de alumínio, com programa de aquecimento de 22 °C a 110 °C, numa taxa de 1,7 °C.min⁻¹, para amostras de polissacarídeo, e de 20 a 320 °C, em igual taxa, para amostras de filmes, sob uma atmosfera inerte de argônio.

Quadro 3.1 – Matriz experimental desenhada para preparo das blendas de galactomanana-amido. O volume final para todos os tratamentos é igual a 10 mL.

Tratamentos	Valores codificados		Volume de GLM (em mL)	Volume de amido (em mL)
	GLM	Amido		
9,0-0,9	1,000	-1,000	9,0	0,9
8,7-1,3	-1,267	0,000	8,7	1,3
8,0-2,0	-1,000	-1,000	8,0	2,0
7,0-3,0	0,000	0,000	7,0	3,0
6,7-3,3	1,000	1,000	6,7	3,3
6,6-3,4	1,267	0,000	6,6	3,4
4,4-5,6	-1,000	1,000	4,4	5,6

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Comportamento reológico

O comportamento reológico de soluções aquosas de galactomanana isolada de sementes de *Adenanthera pavonina* foi avaliado. A concentração das soluções variou de 0,3% a 1,4 %. Na Figura 3.8 é mostrado o espectro mecânico das soluções de galactomananas em distintas concentrações com os módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da freqüência. Um comportamento pseudoplástico é claramente observado na concentração de 1,4%. Esta pseudoplasticidade diminui e se aproxima de um comportamento Newtoniano nas mais baixas concentrações (0,3 e 0,6%). Particularmente na solução 0,3%, um comportamento Newtoniano foi bem marcado. É evidente a transição de comportamento das soluções (variando de solução diluída até solução concentrada) observando-se o aumento nos valores dos módulos G' e G'' .

Na Tabela 3.1 são mostrados os parâmetros reológicos para o espectro mecânico das soluções de galactomanana de *A. pavonina* em distintas concentrações. Pode-se observar um bom ajuste para as concentrações de 0,6 a 1,4% de acordo com os valores dos coeficientes de determinação obtidos ($R^2 > 0,90$). Nessas concentrações (0,6 a 1,4%) fica clara a transição de comportamento, observada na Figura 3.8, quando são considerados apenas os valores dos módulos na Tabela 3.1. Por outro lado, com a diminuição dos valores da tangente de δ (Figura 3.9A) e com o ponto de cruzamento entre os módulos G' e G'' observado na concentração de 1,4% (mostrado na Figura 3.9 B) é possível constatar que essa solução comporta-se realmente como uma solução concentrada.

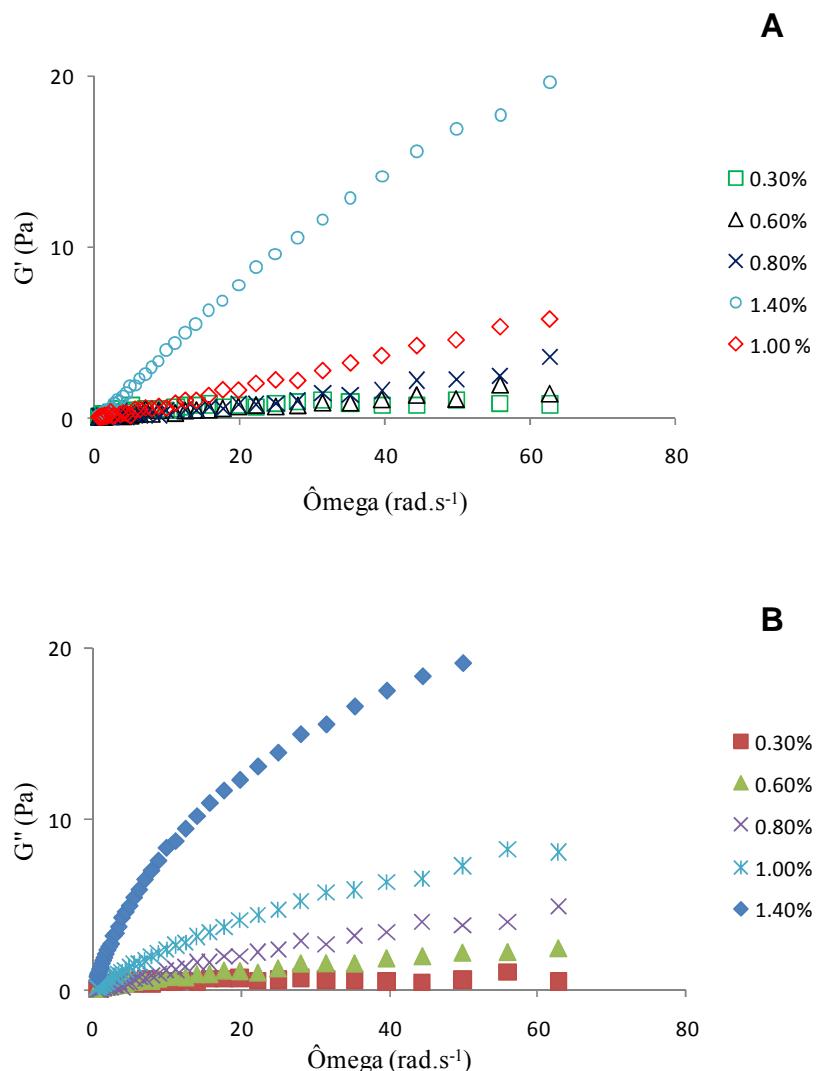


Figura 3.8 – Módulos de armazenamento (G' , em A) e de dissipação de energia (G'' , em B) em função da freqüência para soluções de galactomanana de *Adenanthera pavonina* em distintas concentrações.

Tabela 3.1 – Efeito da concentração de galactomanana de *A. pavonina* sobre as propriedades do espectro mecânico medido a 25 °C.*

Concentração (%)	G'/ω (Pa.s) ^a	$R^2(G')$	G''/ω (Pa.s) ^a	$R^2(G'')$	δ ^b	y ^c
0,3	$0,5309 \pm 0,0405$	0,8149	$0,3633 \pm 0,0332$	0,7550	$53,564 \pm 0,8936$	$-0,1020 \pm 0,0162$
0,6	$0,0255 \pm 0,0012$	0,9162	$0,7044 \pm 0,0152$	0,9822	$70,789 \pm 1,2362$	$-0,0460 \pm 0,0176$
0,8	$0,0472 \pm 0,0016$	0,9557	$0,9011 \pm 0,0202$	0,9807	$86,747 \pm 1,3464$	$-0,0706 \pm 0,0156$
1,0	$0,0946 \pm 0,0012$	0,9939	$0,8408 \pm 0,0111$	0,9933	$86,967 \pm 0,7494$	$-0,0906 \pm 0,0087$
1,4	$0,2494 \pm 0,0040$	0,9921	$0,7183 \pm 0,0140$	0,9854	$82,606 \pm 0,3896$	$-0,1216 \pm 0,0047$

*Os dados experimentais foram ajustados a lei de potência, exceto G' para as amostras 0,3, 0,6 e 1,0% que foram ajustadas linearmente.

^a Os valores dos expoentes dos módulos G' e G'' são expressos como média \pm erro padrão.

^b Os valores dos coeficientes de δ são expressos como média \pm erro padrão.

^c Os valores do expoente de δ (y) são expressos como média \pm erro padrão.

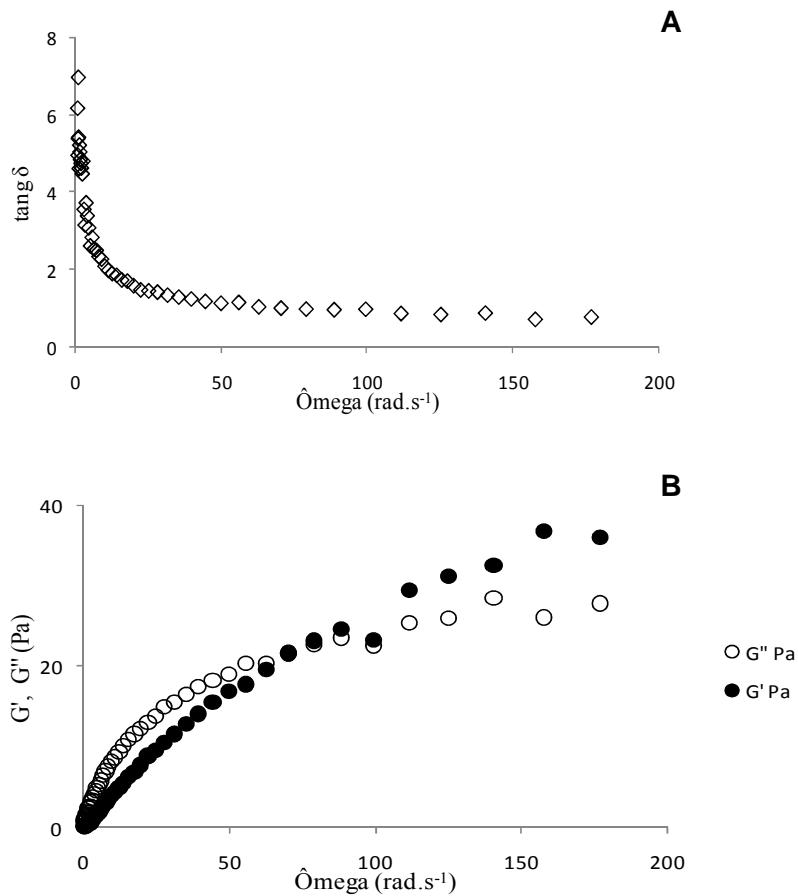


Figura 3.9 – Perda de tangente de δ (em A) e sobreposição dos módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') de energia, (em B), ambos em função da freqüência para solução de galactomanana de *Adenanthera pavonina* 1,4% (m/v).

Para a galactomanana aqui estudada, foi observado que aquela se comporta como um típico biopolímero macromolecular entrecruzado em solução, com o módulo elástico G' dominando o módulo viscoso G'' nas altas freqüências. O ponto de cruzamento dos módulos foi observado nas freqüências intermediárias e nas baixas freqüências ou em longos intervalos de relaxamento o módulo viscoso predomina. Nas baixas concentrações, a solução de galactomanana apresenta o módulo viscoso G'' maior que o módulo elástico G' por todo o intervalo de freqüência testado. Os módulos são altamente dependentes da freqüência e nenhum ponto de cruzamento entre eles foi observado, sugerindo que nessas concentrações a galactomanana comporta-se meramente como uma solução de polímero diluído.

Tais comportamentos reológicos evidenciados provavelmente devem estar relacionados à massa molecular, ao grau de ramificação e a distribuição dos resíduos de galactose na cadeia principal da goma endospérmica, daí requerendo altas concentrações para alcançar um grau significativo de interação/sobreposição entre as macromoléculas. Isto é consistente com o fato de que a massa molecular, o grau de ramificação e a distribuição das unidades de galactose afetam o raio hidrodinâmico nas moléculas das galactomananas o que poderia causar essas mudanças na viscosidade (PAI; KHAN, 2002).

Cabe aqui destacar que essa amostra de galactomanana estudada foi extraída pelo Método 1 descrito anteriormente no Capítulo 2 desta Tese. Esse polímero foi liofilizado ao final do protocolo de extração e provavelmente esse método de secagem da amostra faz com que as propriedades reológicas avaliadas neste ensaio sejam distintas daquelas que serão determinadas nos ensaios posteriores discutidos ao longo deste capítulo, uma vez que a goma utilizada nesses ensaios foi extraída pelo Método 2 e sua secagem se deu através de desidratação com acetona. Para comprovar esse fato, foi realizado um experimento de comparação entre amostras obtidas pelo Método 2, mas que foram submetidas a distintos procedimentos finais de secagem.

Na Figura 3.10 são mostrados os espectros mecânicos da galactomanana extraída pelo Método 2, diferindo apenas no procedimento final de secagem. A concentração de goma utilizada nos ensaios foi de 1% e é notória a diferença entre os espectros quando se observa a localização do ponto de cruzamento entre os módulos G' e G'' . No

espectro da amostra seca com acetona (Figura 3.10A) o ponto de cruzamento foi localizado precisamente em $6,28 \text{ rad.s}^{-1}$ (1,0 Hz) de freqüência. Essa amostra muito provavelmente está mais compactada em sua estrutura o que deve ter sido resultado da remoção completa da água pelo solvente orgânico utilizado (acetona). Contrariamente, a amostra liofilizada apresentou seu ponto de cruzamento em $8,11 \text{ rad.s}^{-1}$ (1,29 Hz), sugerindo que tal amostra possua um grau menor de compactação e as cadeias do polímero estejam mais frouxamente distribuídas o que resulta em acentuado decréscimo de viscosidade e menos rigidez.

A Figura 3.11 mostra as curvas de escoamento obtidas para dispersões de amido de milho gelatinizado. Seu comportamento reológico pode ser adequadamente descrito pelo modelo de Ostwald-de-Waele (Tabela 3.2). Todas as amostras apresentaram comportamento pseudoplástico ou *shear-thinning* ($n < 1$) conforme foi anteriormente relatado na literatura sobre dispersões de amido gelatinizado (NURUL *et al.* 1999; LAGARRIGUE; ALVAREZ, 2001; BERTUZZI *et al.* 2007).

Como pode ser visualizada na Figura 3.11, a suspensão de amido gelatinizado comporta-se como um fluido não Newtoniano. Para a dispersão preparada sem glicerol (Figuras 3.11 A e 3.11 B), o escoamento ascendente (Figura 3.11 A) é debilmente pseudoplástico e nenhuma tixotropia foi evidenciada, pois os valores da aceleração ($\dot{\gamma}$) não são distinguíveis (Tabela 3.2). O escoamento descendente (Figura 3.11 B) é um pouco mais pseudoplástico que o escoamento ascendente, porque o índice de comportamento (n) diminui (de 0,8110 para 0,7590) e o índice de consistência (κ) aumenta cerca de 1,3 vezes, talvez devido à fragmentação parcial do biopolímero (predominantemente amilose) durante o escoamento ascendente.

No caso da dispersão contendo glicerol (Figura 3.11 C e 3.11 D), o escoamento ascendente é menos pseudoplástico que o inicial (mais Newtoniano) embora da diminuição da aceleração $\dot{\gamma}$ (0,8110 para 0,8050), pode-se sugerir que o polialcool (glicerina) permitiria a formação de uma rede de pontes de hidrogênio o que reduziria o ritmo com que varia a velocidade de deformação. Vale ressaltar que muito provavelmente essa rede de pontes de hidrogênio estabelecida entre polissacarídeo-água-polialcool poderia reduzir o número de interações cruzadas (*entanglements*) entre as moléculas de amilose o que justificaria um menor coeficiente de consistência κ e κ' .

Ambas as amostras, com e sem glicerol, não exibiram (ou foi muito pequeno para ser detectado) o *loop* típico de histerese em sistemas de suspensões de macromoléculas. Assim a área das curvas não pode ser utilizada para avaliação das amostras. Isto representa um comportamento totalmente distinto para o que foi recentemente relatado na literatura sobre misturas de amido e galactomananas, pois Achayuthakan e Suphantharika (2008), trabalhando com misturas de amido de milho *waxy* e galactomanana de guar e esse mesmo amido com goma xantana em baixa concentração (0,35%), detectaram tais *loops* de histerese.

Dois resultados interessantes foram verificados no estudo de Achayuthakan e Suphantharika (2008). O primeiro deles mostrou que a mistura de amido e goma guar exibiu histerese de maneira similar a observada na dispersão de amido sozinho, quando submetida a altas taxas de deformação ($D > 50 \text{ s}^{-1}$). O segundo mostrou que a tixotropia parece ser menos pronunciada na presença da goma xantana o que foi evidenciado pela área do *loop* entre os escoamentos ascendentes e descendentes. Com uma concentração de 0,35%, da goma xantana, a área do loop tixotrópico diminuiu marcadamente quando comparado a dispersão de amido sozinho e quase desapareceu completamente em 0,7% de xantana. Quando uma suspensão uniforme é submetida a um aumento no efeito da deformação, uma resistência à deformação pode ser evidenciada no primeiro estágio (escoamento ascendente).

As viscosidades aparentes das distintas dispersões de amido de milho gelatinizado são mostradas nas Figuras 3.12 A, 3.12 B, 3.12 C e 3.12 D. Quando baixos valores de cisalhamento são aplicados, o tempo necessário para o relaxamento da estrutura e sua reorganização são maiores que as taxas de mudança de cisalhamento. Como essa taxa aumenta, os grânulos hidratados de amido se desfazem, o arranjo molecular se desintegra e a molécula adota uma conformação estendida. A estrutura interna sofre um rearranjo que pode suportar aquele esforço diminuindo sua viscosidade aparente. Isso é característico de comportamento pseudoplástico.

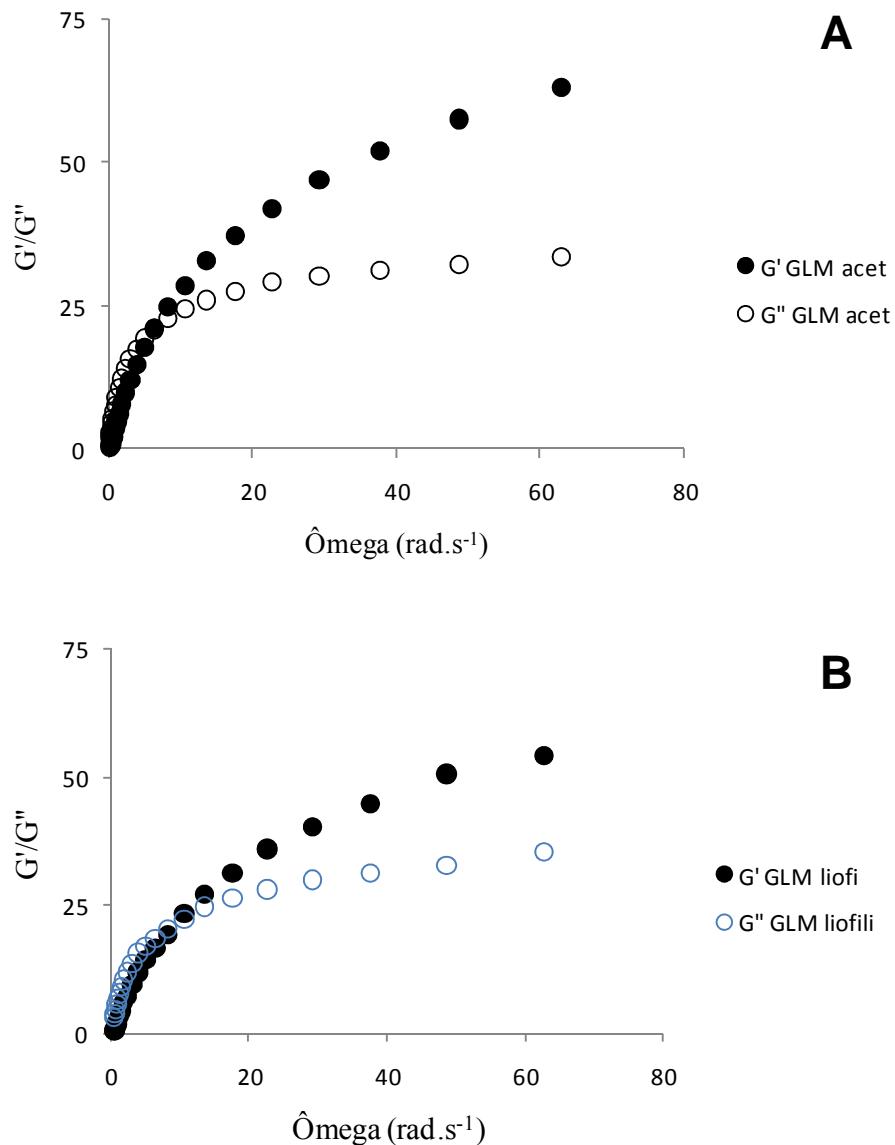


Figura 3.10 – Sobreposição dos módulos de armazenamento (G') e dissipação de energia (G'') em função da freqüência para solução de galactomanana de *Adenanthera pavonina* 1,0% (m/v). A galactomanana foi obtida pelo Método 2 de extração descrito no Capítulo 2, diferindo apenas no procedimento final de secagem.

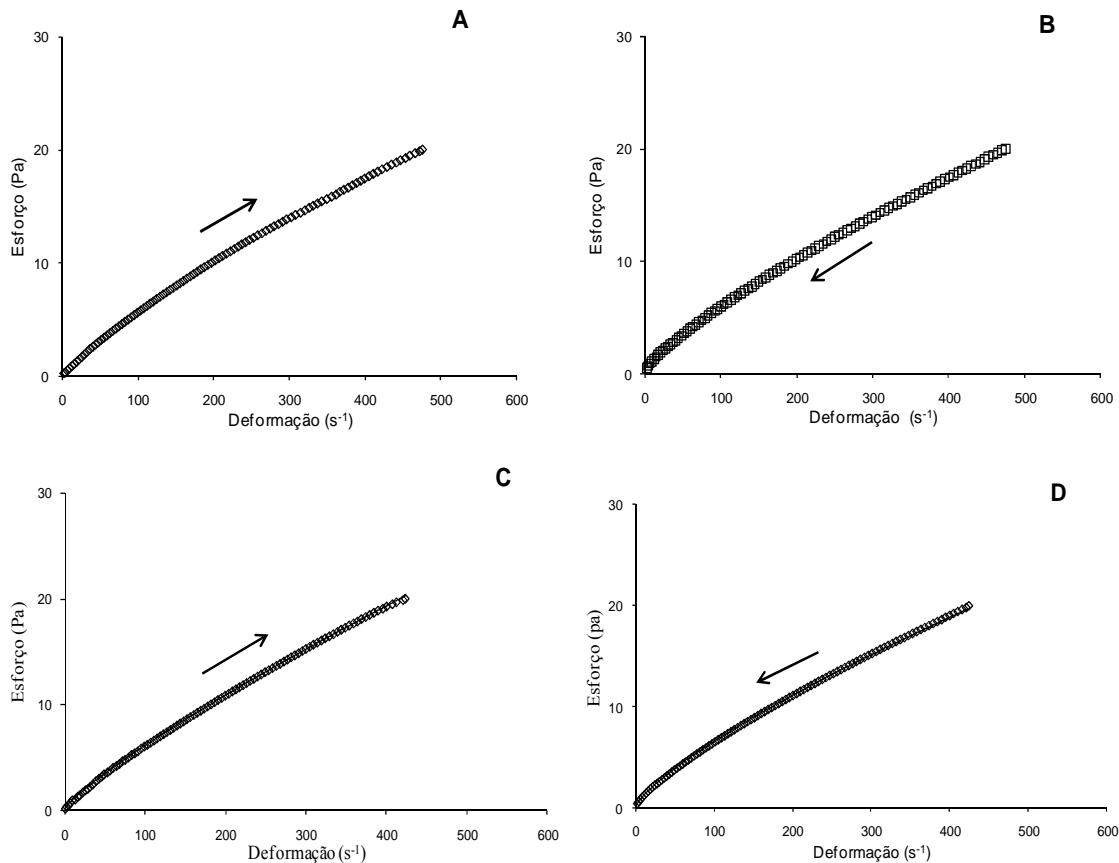


Figura 3.11 – Curvas de escoamento de dispersões de amido de milho (5%) gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). Em A e C temos o escoamento ascendente e em B e D temos o escoamento descendente.

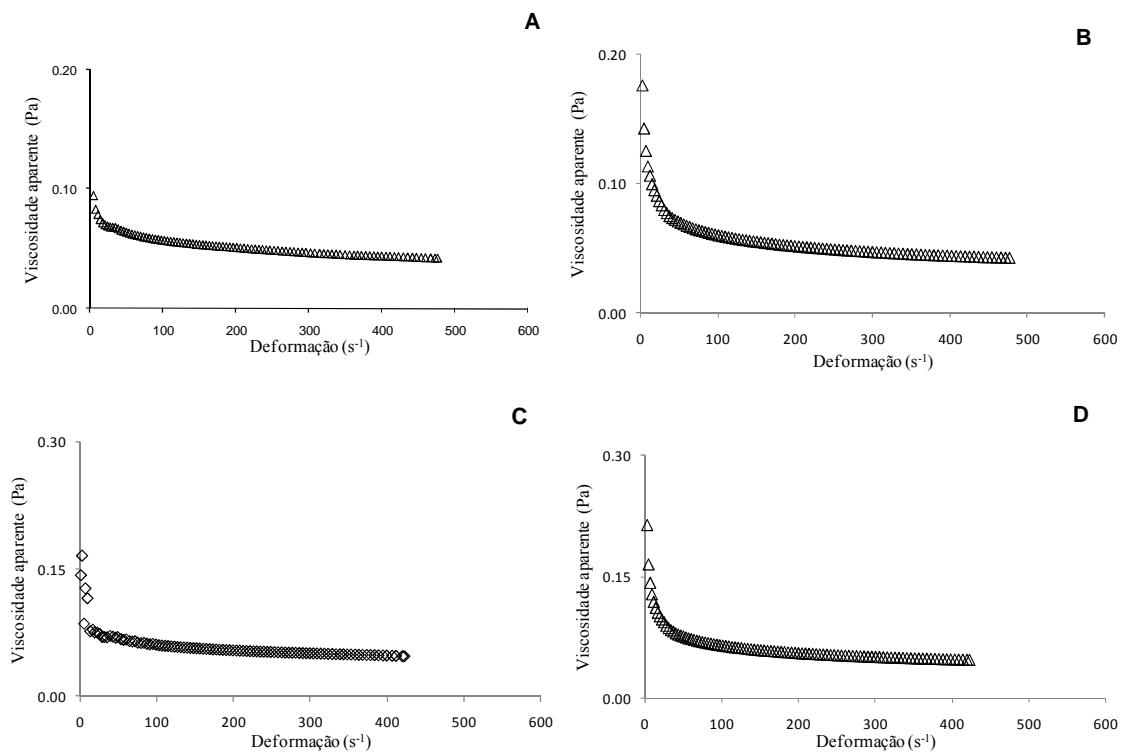


Figura 3.12 – Viscosidade aparente em função da taxa de deformação de dispersões de amido (5%) gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). Em A e C temos o escoamento ascendente e em B e D temos o escoamento descendente.

Tabela 3.2 – Efeito do glicerol sobre as propriedades da curva de escoamento a 20 °C da suspensão de amido de milho gelatinizado.*

Tratamentos	Índice de consistência κ (Pa.s ⁿ)	κ' (Pa.s ⁿ⁻¹)	Índice de comportamento n	$n-1$	$\ddot{\gamma}$ (s ⁻²)
<i>Sem glicerol</i>					
Ascendente	0,1360 ± 0,0020	0,1840 ± 0,0050	0,8110 ± 0,0050	-0,2460 ± 0,0130	0,8050 ± 0,0070
Descendente	0,1819 ± 0,0008	0,1935 ± 0,0001	0,7590 ± 0,0020	-0,2500 ± 0,0020	0,8110 ± 0,0070
<i>Com glicerol</i>					
Ascendente	0,1291 ± 0,0007	0,1445 ± 0,0016	0,8360 ± 0,0030	-0,1850 ± 0,0050	0,7110 ± 0,0050
Descendente	0,1973 ± 0,0008	0,2140 ± 0,0010	0,7600 ± 0,0020	-0,2540 ± 0,0030	0,7210 ± 0,0060

*Os valores dados correspondem à média ± desvio padrão para experimentos em triplicata.

Blendas de galactomanana-amido de milho gelatinizado foram caracterizadas reologicamente. As curvas de escoamento podem ser vistas na Figura 3.13. Os parâmetros reológicos das curvas de escoamento das blendas são mostrados na Tabela 3.3.

A blenda sem glicerol (Figuras 3.13 A e 3.13 B) apresenta um caráter pseudoplástico mais notório na curva de escoamento ascendente. Os valores dos parâmetros são mais elevados na curva ascendente que na descendente. Por exemplo, é notório que o índice de consistência κ (Tabela 3.3) é maior no escoamento ascendente quando comparado com aquele do escoamento descendente. Tal fato observado deveria ser fruto de que a galactomanana de *A pavonina* adicionada à dispersão de amido provavelmente incrementaria a densidade de grupos hidroxila disponíveis para estabelecer interações com as cadeias de amilose (através do aumento de κ e da diminuição de n). Contudo, tal interação entre os polímeros não tem um caráter estável, pois a razão M/G calculada (1,46) através de espectroscopia de RMN sugere que os resíduos de galactose dispostos em ramificação 1→6 impedem uma maior interação entre as cadeias principais dos biopolímeros.

A blenda com glicerol (Figuras 3.13 C e 3.13 D) possui um comportamento debilmente pseudoplástico. A estrutura que é criada na mistura por meio das pontes de hidrogênio diminui notadamente a área de contato de superfície entre as cadeias de galactomanana e amido pela interferência do agente plastificante. Conforme visualizado na Tabela 3.3, essa perturbação do sistema pode ser mais bem evidenciada pela diminuição de κ e o forte aumento de n que aproxima essa blenda de um fluido Newtoniano. Tal perda de consistência resultante do aumento da densidade de grupos disponíveis para estabelecer pontes de hidrogênio pode ser traduzida como um forte aumento da aceleração de 0,11 para $0,85\text{ s}^{-2}$. A rigidez inicialmente observada na blenda sem glicerol diminuiu nesse sistema contendo o plastificante e houve um aumento de flexibilidade. Assim, verifica-se que a velocidade em que ocorrem as mudanças e os reordenamentos moleculares nos constituintes da blenda é muito maior.

As curvas de viscosidade aparente (Figuras 3.14 A, 3.14 B, 3.14 C e 3.14 D) exibem de uma maneira mais clara tais comportamentos reológicos observados nas

curvas de escoamento. A diminuição da viscosidade deve ser fruto de que o glicerol perturba uma maior interação entre os polímeros.

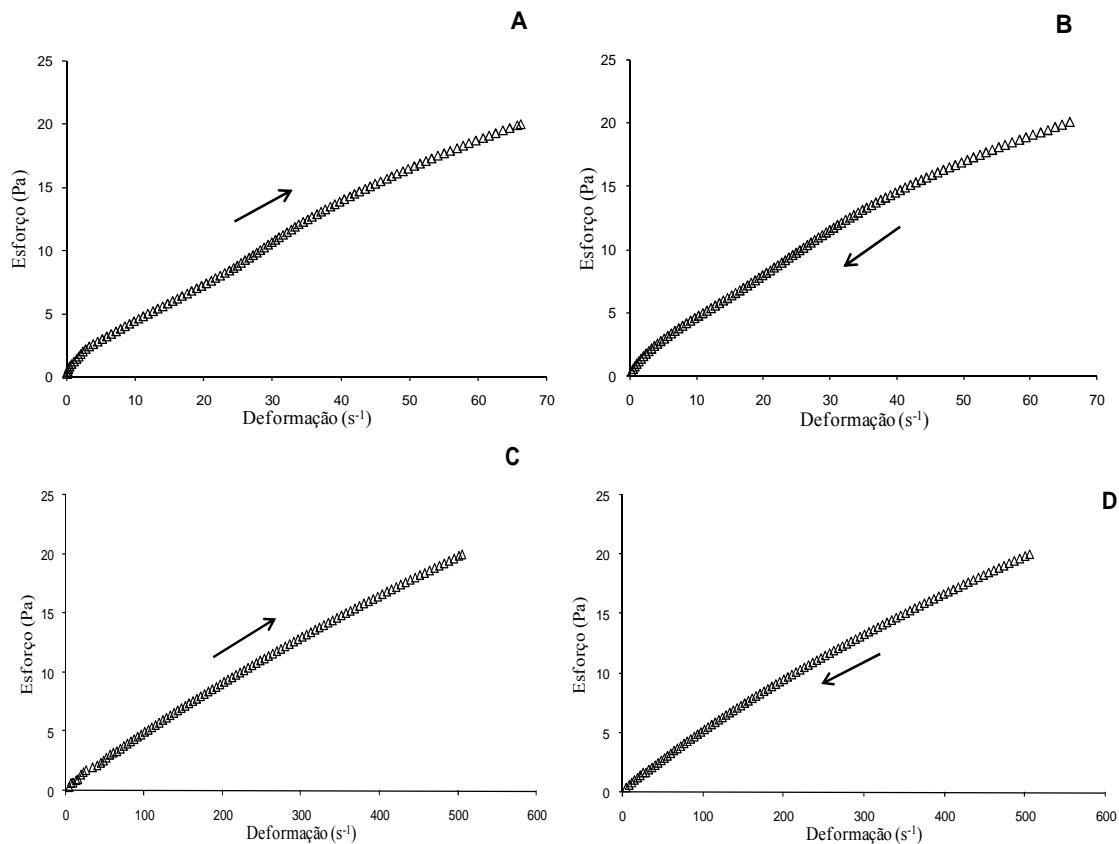


Figura 3.13 – Curvas de escoamento de blendas de galactomanana-amido gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). Em A e C temos o escoamento ascendente e em B e D temos o escoamento descendente.

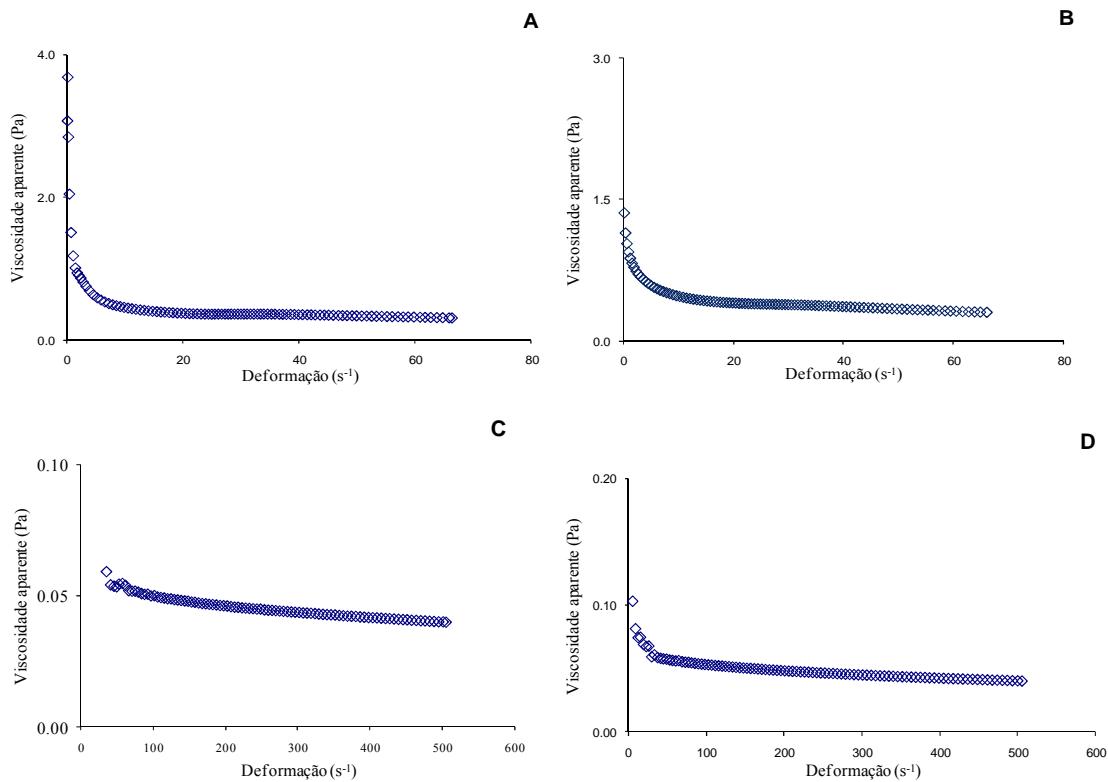


Figura 3.14 – Viscosidade aparente em função da deformação de blendas de galactomanana-amido gelatinizado sem glicerol (A e B) e contendo o agente plastificante (C e D). Em A e C temos o escoamento ascendente e em B e D temos o escoamento descendente.

Tabela 3.3 – Efeito do glicerol sobre as propriedades da curva de escoamento medida a 20 °C de suspensões da blenda galactomanana-amido.*

Tratamentos	Índice de consistência κ (Pa.s ⁿ)	κ' (Pa.s ⁿ⁻¹)	Índice de comportamento n	$n-1$	$\ddot{\gamma}$ (s ⁻²)
<i>Sem glicerol</i>					
Ascendente	1,1540 ± 0,0130	1,1700 ± 0,0130	0,6560 ± 0,0080	-0,3440 ± 0,0080	0,1100 ± 0,0010
Descendente	0,8570 ± 0,0040	0,8990 ± 0,0040	0,7560 ± 0,0030	-0,2530 ± 0,0030	0,1060 ± 0,0010
<i>Com glicerol</i>					
Ascendente	0,1035 ± 0,0009	0,0906 ± 0,0003	0,8450 ± 0,0040	-0,1290 ± 0,0020	0,8490 ± 0,0050
Descendente	0,1094 ± 0,0060	0,1121 ± 0,0006	0,8400 ± 0,0020	-0,1630 ± 0,0030	0,8380 ± 0,0070

*Os valores dados correspondem à média ± desvio padrão para medidas em triplicata.

Os espectros mecânicos das dispersões de amido de milho gelatinizado sem e contendo glicerol são mostrados nas Figuras 3.15 e 3.16. Por meio deste ensaio foi avaliado se alguma interação poderia ser estabelecida entre os polímeros utilizados. A concentração de galactomanana foi estabelecida em 1% e a concentração de amido gelatinizado de 5% em soluções utilizadas para o preparo da blenda. Contudo, a concentração final dos polímeros na blenda em virtude da mistura de partes de soluções/dispersões foi estimada em 1,5% de amido e aproximadamente 0,5% de galactomanana (ou seja, blenda 7-3). Dessa maneira, a concentração de polissacarídeo total foi de 2%. Tal fato poderia implicar na produção de uma blenda com propriedades de solução concentrada.

Na dispersão sem glicerol (mostrada na Figura 3.15), os valores obtidos dos módulos G' e G'' indicam que a dispersão apresenta comportamento de solução de polímero diluído. Um fato importante observado foi que o valor da inclinação G''/ω da viscosidade dinâmica (μ) coincide com o valor da viscosidade aparente (η) obtido pela curva de escoamento na deformação $D > 150 \text{ s}^{-1}$ (Tabela 3.4).

Por outro lado, na dispersão de amido com glicerol (Figura 3.16) o aumento do número de pontes de hidrogênio pode ser traduzido na diminuição do expoente de relaxamento $|\eta|$ e um significativo aumento da resistência viscosa (o dobro, de 0,04 para 0,08 Pa.s) e elástica (quase 10 vezes mais que a dispersão sem glicerol). Este resultado é um indicativo da diminuição da aceleração na dispersão de amido com glicerol (Tabela 4).

Na blenda galactomanana-amido (Figura 3.17), o papel desempenhado pelo glicerol é contrário ao do amido porque ao se interpor entre as cadeias de ambos os polissacarídeos reduz a densidade dos contatos polímero-polímero e o índice $|\eta|$ aumenta ao mesmo tempo em que a viscosidade dinâmica diminui porque o sistema contendo glicerol é mais fluido (se origina de uma dissolução com menor resistência ao escoamento, Tabela 3.4). O espectro da blenda sem glicerol não é mostrado, pois os pontos medidos para os módulos G' e G'' apresentaram elevado erro experimental.

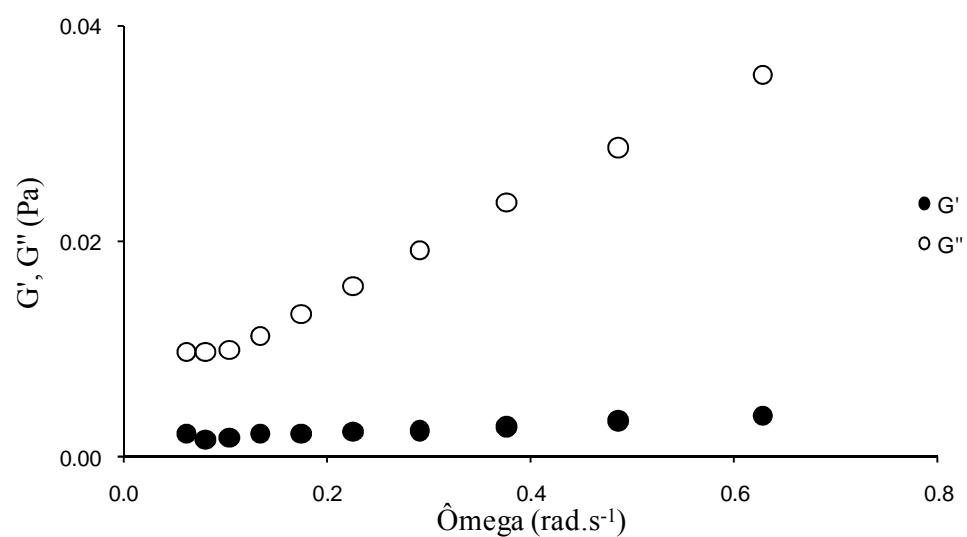


Figura 3.15 – Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado sem glicerol (30%).

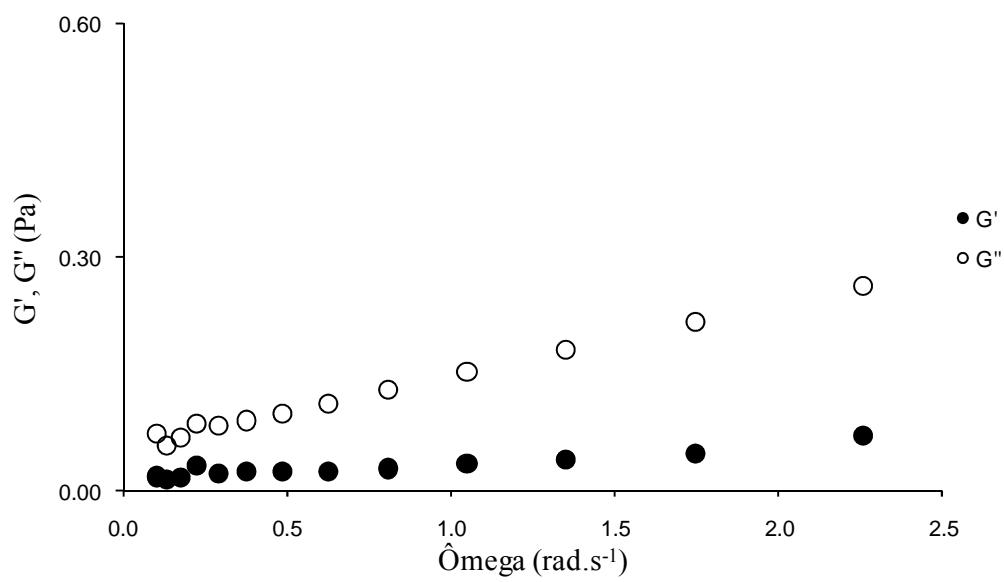


Figura 3.16 – Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado com glicerol (A) e (B).

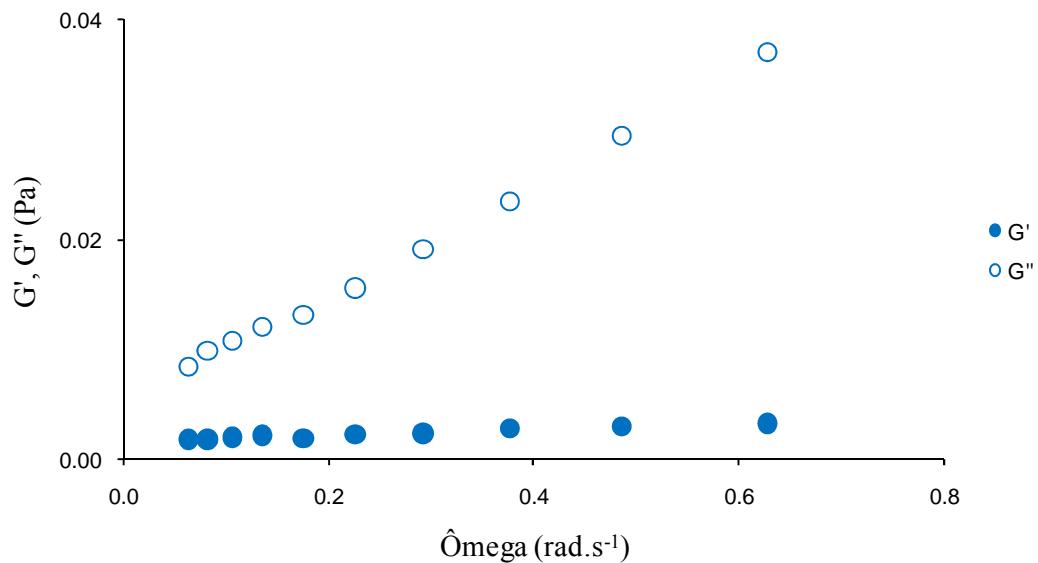


Figura 3.17 – Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da freqüência de blenda de galactomanana-amido gelatinizado com glicerol (A) e (B).

As curvas de viscosidade dinâmica e a os valores da tangente de δ para as dispersões de amido de milho gelatinizado são mostradas nas Figuras 3.18 e 3.19. Como evidenciado pela perda do valor da tan (δ) na Figura 3.18 B e 3.19 B, as dispersões apresentam pequeno comportamento pseudoplástico, mas notadamente podem ser interpretadas como soluções diluídas.

Os gráficos da viscosidade dinâmica e da perda de tangente de blendas de galactomanana-amido são mostrados nas Figuras 3.20 e 3.21. O comportamento evidenciado no estudo das blendas é característico de soluções contendo polímeros amorfos e soluções diluídas, porque os valores para tan (δ) são maiores que 0,2. Esse intervalo numérico é indicativo dos comportamentos anteriormente sugeridos para essas blendas. Ademais essas misturas não formam complexos estáveis o que é evidenciado pela variação dos valores detectados para a relação G''/G' .

O Método 2 de extração contribui para a obtenção de um material de baixa qualidade, sobretudo para medidas reológicas. Triturar o endosperma permite co-extração de material insolúvel, por exemplo, a celulose de parede celular. Isso foi comprovado quando do preparo da solução de galactomanana obtida pelo Método 2. Um precipitado visível se formava e somente através de centrifugação esse material era eliminado. Submetendo a solução do polissacarídeo sem tratamento por centrifugação aos ensaios reológicos, observava-se que as medidas apresentavam elevado erro experimental e nenhuma reproduzibilidade. Os valores da tan (δ) e da viscosidade dinâmica evidenciam que o material analisado possui ampla variação de comportamento, indo de solução diluída até polímero amorfo e em alguns pontos comportando-se como polímero cristalino quebradiço tan (δ) < 0,01.

O ensaio oscilatório é um método dinâmico comumente utilizado para estudar o comportamento viscoelástico em alimentos. Os resultados são muito sensíveis a composição química e a estrutura física do material testado e por essa razão é um método bastante útil numa gama de aplicações, incluindo análise da força de gel (KHOURYIEH *et al.* 2006; VITURAWONG *et al.* 2008), monitoramento da gelatinização de amido (KHONDKAR *et al.* 2007), estudo do fenômeno da transição vítreo, interação de gomas com proteínas (SOZER, 2009), estudo da textura de produtos

alimentícios e ainda correlação entre propriedades reológicas e percepção sensorial (CHUN; YOO, 2006).

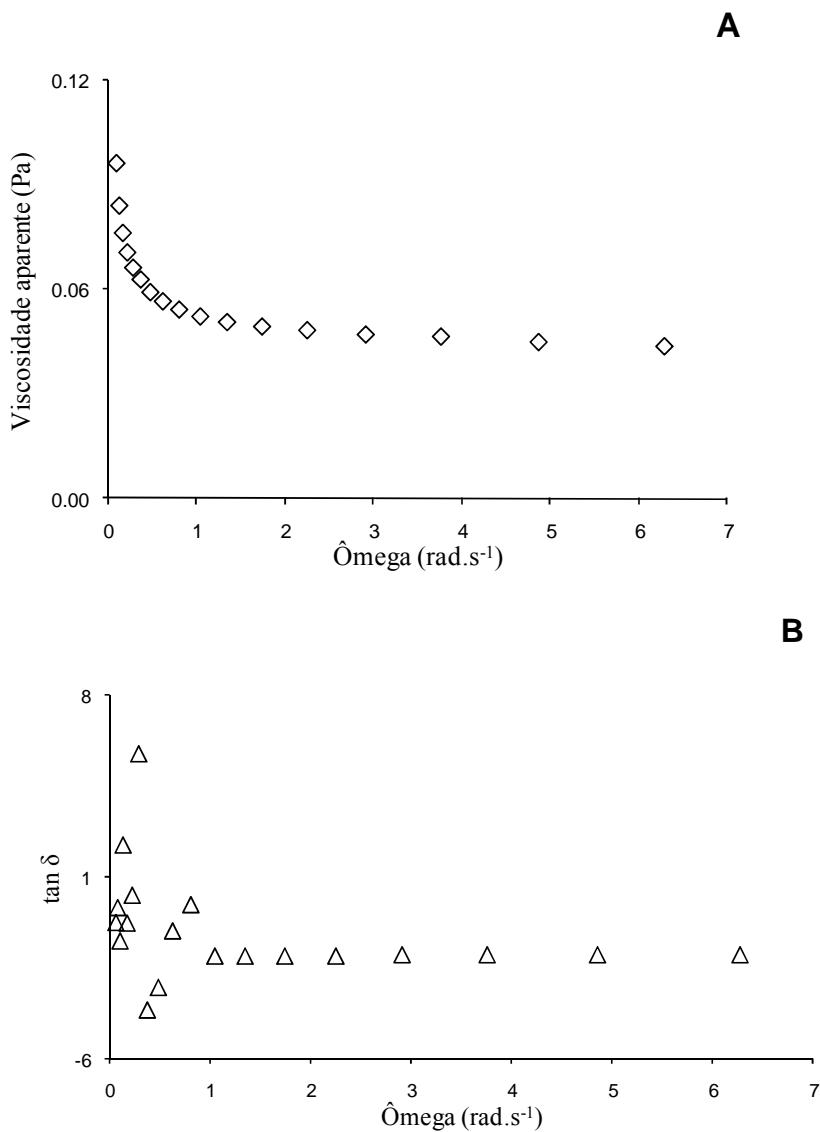


Figura 3.18 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado sem glicerol.

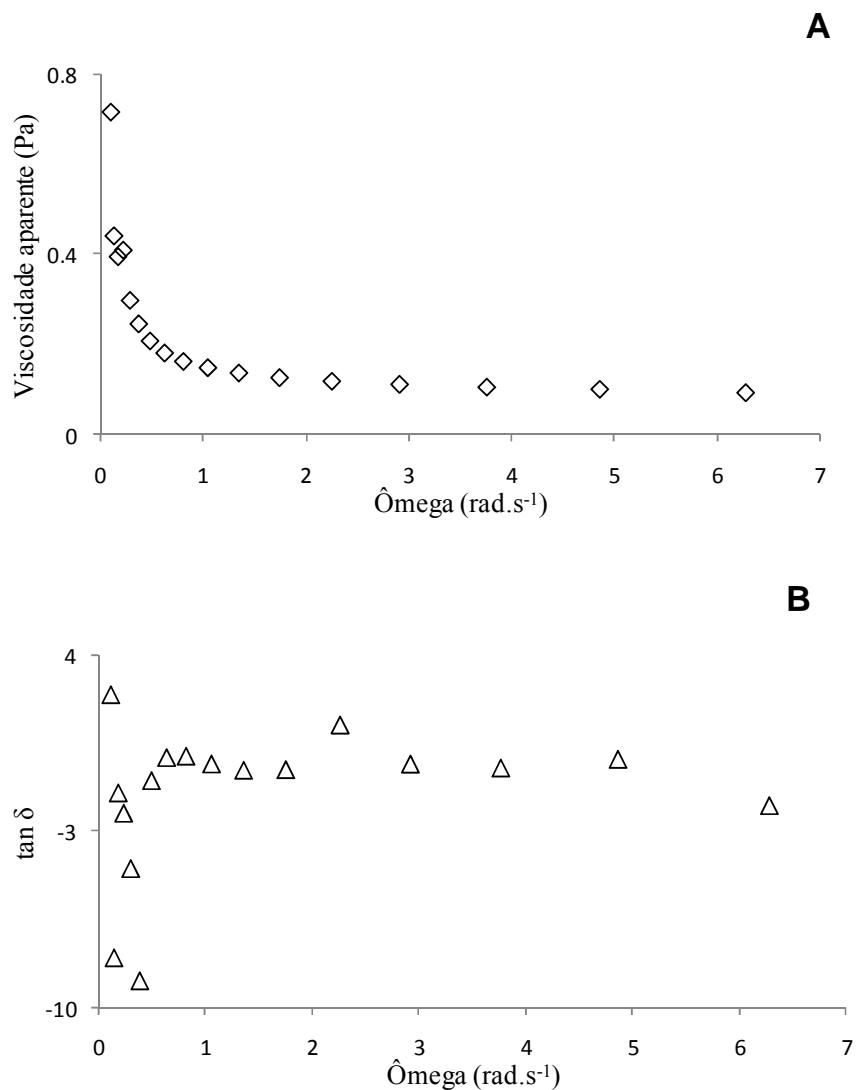


Figura 3.19 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de dispersão de amido de milho (5%) gelatinizado com glicerol.

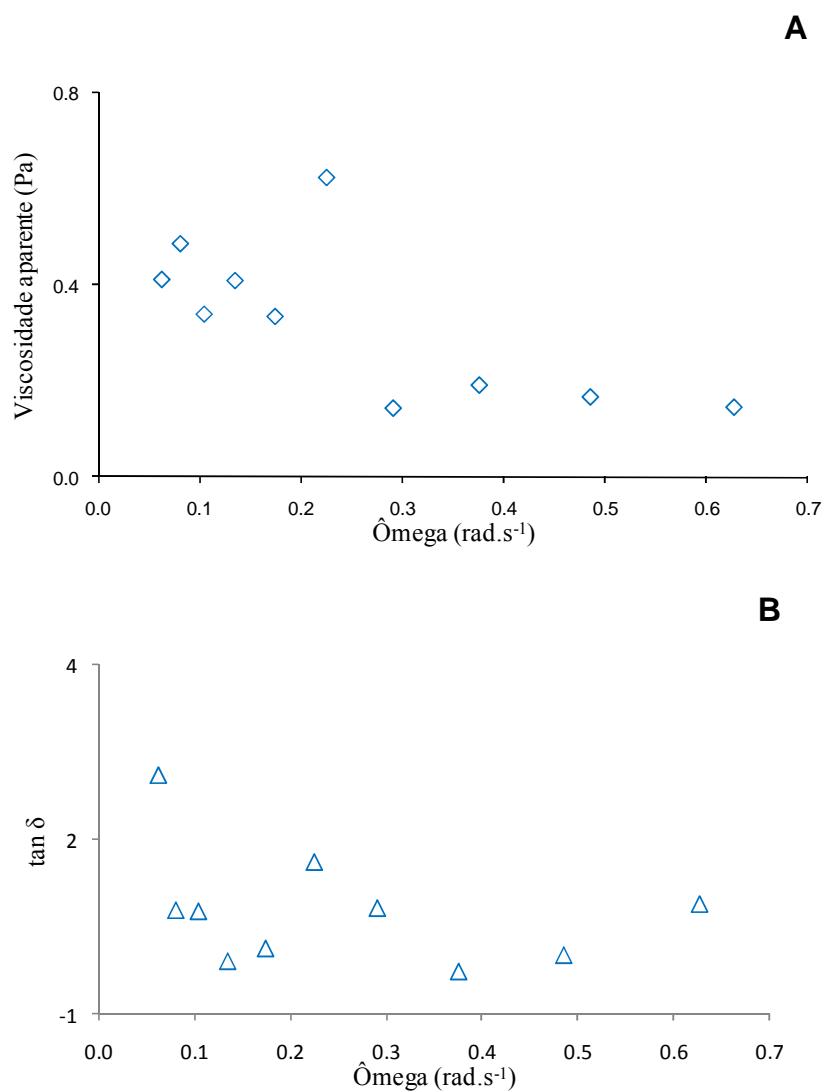


Figura 3.20 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de blenda de galactomanana-amido gelatinizado sem glicerol.

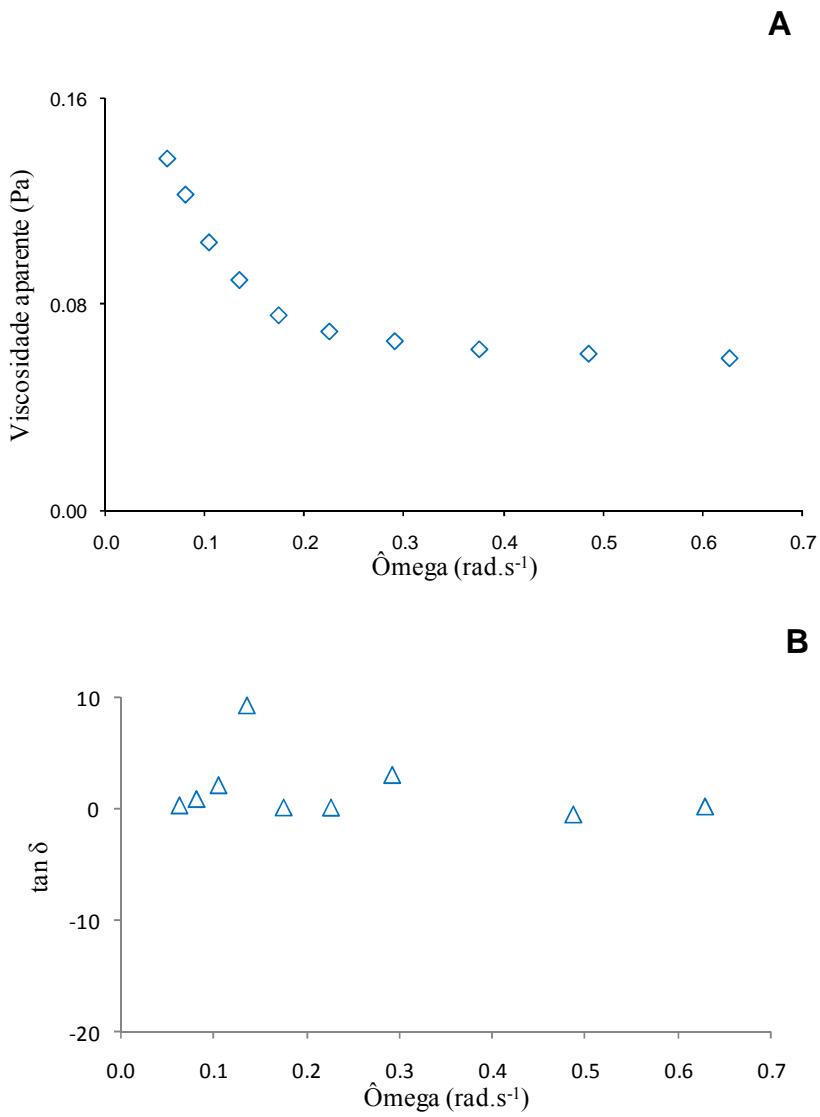


Figura 3.21 – Viscosidade dinâmica (A) e perda da tangente de δ (B) em função da freqüência de blenda de galactomanana-amido gelatinizado com glicerol.

Tabela 3.4 – Efeito do glicerol sobre as propriedades do espectro mecânico medido a 20 °C de suspensões de amido de milho gelatinizado e da blenda galactomanana-amido.[§]

Tratamento	G''/ω (Pa.s) ^a	G'/ω (Pa.s) ^a	η ^b	μ*/ω ^c	x	y
<i>Amido</i>						
Sem glicerol	0,0436 ± 0,0003	0,0035 ± 0,0003	0,9500 ± 0,0220	0,0558ω ^{-0,1721}	0,0558 ± 0,0004	-0,1720 ± 0,0120
Com glicerol	0,0870 ± 0,0009	0,02110 ± 0,0021	0,8790 ± 0,0190	0,1770ω ^{-0,4540}	0,1770 ± 0,0030	-0,4540 ± 0,0310
<i>Blenda</i>						
Sem glicerol	0,0740 ± 0,0020	n.d.	0,8700 ± 0,0300	0,1466ω ^{-0,4106}	0,1466 ± 0,0043	-0,4106 ± 0,046
Com glicerol	0,0501 ± 0,0002	0,00267 ± 0,0002	0,9510 ± 0,0230	0,0614ω ^{-0,1850}	0,0614 ± 0,0009	-0,1850 ± 0,0230

[§]Os dados experimentais foram ajustados por regressão linear e pela lei de potência (modelo de Ostwald-de-Waele).

^a Os valores dos ajustes de G''/ ω e G'/ ω são expressos como média ± erro padrão.

^b Os valores do expoente de relaxamento |η| são expressos como média ± desvio padrão x 1,96.

^c O valor da viscosidade complexa (μ*/ω) é dado por: μ* = x ω^{-y} de acordo com a lei de potência.

n.d. não determinado.

3.4.2. Análise gravimétrica

O resultado obtido no teste gravimétrico para filmes comestíveis, que foram produzidos a partir da blenda galactomanana-amido de acordo com a matriz experimental, é mostrado na Tabela 3.5. Vale destacar que foi evidenciada uma diferença na massa inicial dos filmes que foi aproximadamente proporcional a quantidade de galactomanana adicionada. Filmes com mais galactomanana eram mais leves em relação aos filmes contendo mais amido.

Apenas as amostras dos filmes 9,1-0,9, 8,0-2,0 e 7,0-3,0 resistiram ao longo de 24 horas em contato com ágar das placas de Petri. Os demais filmes produzidos se desfizeram em contato com o gel. É interessante observar que a massa de filmes aumentou de forma quase proporcional a quantidade de galactomanana presente nos filmes. Para o filme 9,1-0,9, por exemplo, o aumento de massa detectado foi de aproximadamente 7,14 vezes, enquanto que para o filme 8,0-2,0 esse aumento foi de 1,51 vezes. Por outro lado, com o filme 7,0-3,0 o aumento detectado foi cerca de 2 vezes a massa inicial. Decorridas 48 horas de exposição dos filmes ao ágar, apenas o filme produzido a partir da blenda 7,0-3,0 resistiu e seu aumento de massa foi de 5,70 vezes em relação à massa inicial (Tabela 3.5).

Esse teste permitiu realizar uma caracterização inicial da dinâmica da água nos filmes produzidos com a mistura galactomanana-amido. Bertuzzi *et al.* (2007a) realizaram um pré-tratamento alcalino com a dispersão de amido. Isso fez com que os filmes produzidos com esse amido apresentassem menor solubilidade em água à temperatura de 30 °C. Um platô em relação à diminuição de solubilidade dos filmes foi verificado em função do tempo de duração desse tratamento alcalino. Assim a solubilidade dos filmes de amido é dependente do tempo de pré-tratamento com solução de NaOH antes da gelatinização.

Pode-se sugerir então que a galactomanana adicionada em diferentes quantidades a dispersão de amido alterou de maneira quase proporcional a solubilidade dos filmes produzidos. Dessa maneira, o aumento de massa dos filmes ao longo de 48 horas de exposição ao ágar mostrou que a galactomanana contribuiu para hidratar esses filmes em até 5 vezes quando comparada a massa inicial.

Tabela 3.5 – Teste gravimétrico de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido. As quantidades foram definidas de acordo com uma matriz experimental de fatorial 2.*

Tratamento	Tempo (h)		
	0	24	48
9,1-0,9	0,1140 ± 0,011	0,8141 ± 0,012	n.d.
8,7-1,3	0,3104 ± 0,005	n.d.	n.d.
8,0-2,0	0,2880 ± 0,002	0,4369 ± 0,003	n.d.
7,0-3,0	0,1980 ± 0,030	0,3987 ± 0,019	1,1304 ± 0,005
6,7-3,3	0,3252 ± 0,009	n.d.	n.d.
6,6-3,4	0,3012 ± 0,003	n.d.	n.d.
4,4-5,6	0,5697 ± 0,020	n.d.	n.d.

*Os valores das massas são expressos como médias ± erro-padrão.

n.d. → não determinado.

3.4.3. Atividade de água

A Figura 3.22 mostra o resultado de um experimento piloto para determinar as condições de secagem das amostras para determinação da atividade de água. Isotermas de adsorção medidas a 25 °C foram construídas e cada ponto experimental representa o valor médio de três determinações. Foram testados dois métodos: (1) secagem em estufa a 100 °C até peso constante ou no máximo por duas horas e (2) secagem em dessecador.

Com base nos resultados preliminares do teste gravimétrico para filmes comestíveis feitos com blendas de galactomanana-amido, amostras de filmes da blenda 7,0-3,0 foram escolhidas para os experimentos iniciais de medida da atividade de água. Para que as medidas de a_w fossem realizadas com reprodutibilidade, o estabelecimento de um método de secagem foi de grande importância. O método ideal não deve alterar drasticamente a estrutura do material analisado. Assim, de acordo com perfil das isotermas obtidas, os dois métodos de secagem apresentam nítida diferença.

A secagem através do uso de estufa até peso constante constituiu uma rápida alternativa, mas modificou visivelmente as amostras de filmes. Os filmes apresentaram escurecimento superficial e significativo ganho de água nos valores de umidade mais altos da curva de adsorção (0,75 a 0,97). Através da secagem com uso do dessecador, o filme obtido manteve suas características visuais e a isoterma de adsorção das amostras exibiu boa reprodutibilidade. Por outro lado, o tempo necessário para desidratar as amostras completamente foi demaisiado (em média de 15 a 20 dias). De fato, o filme 7,0-3,0 foi escolhido com dupla finalidade: (a) para padronizar o método de secagem para medições de a_w e (b) iniciar a caracterização dos filmes obtidos das misturas de galactomanana e amido. Desse modo, a despeito do longo tempo necessário, o método de secagem com uso do dessecador foi escolhido para secar amostras usadas nas posteriores medições de a_w .

A Tabela 3.6 mostra os parâmetros das equações B.E.T., G.A.B. e Langmuir calculados para filmes comestíveis produzidos a partir de galactomanana de *A. pavonina* e glicerol como plastificante (30%). Os três modelos matemáticos foram ajustados adequadamente ($R^2 > 0,90$) e sendo que os modelos G.A.B. e Langmuir apresentaram os valores mais altos de R^2 ($R^2 = 0,999$).

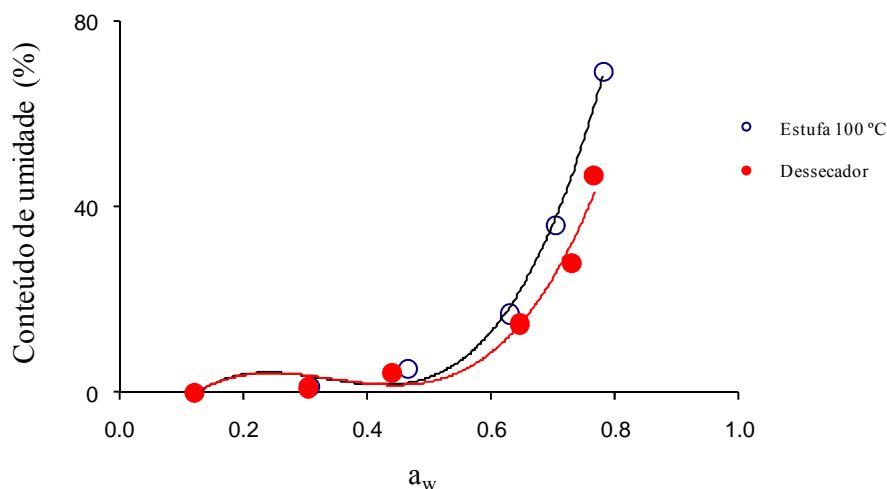


Figura 3.22 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) de filmes comestíveis feitos a partir da blenda galactomanana-amido (7,0-3,0) secas por dois métodos de secagem. A diferença entre as isotermas quando comparadas é marcante no limite superior de a_w .

Tabela 3.6 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis de galactomanana de *A. pavonina*. *

Constantes	Modelos		
	B.E.T.	G.A.B.	Langmuir
K	$4,7930 \pm 0,0574$	$0,2082 \pm 0,0113$	$19,1322 \pm 2,4201$
C	$0,2951 \pm 0,0014$	$2,0432 \pm 0,0887$	$0,0579 \pm 0,1432$
Xm	–	$2,2345 \pm 0,1099$	–
Intervalo de a_w	0,11 – 0,53	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97
R^2	0,996	0,999	0,999

*Os valores são expressos como média ± erro-padrão para amostras em triplicata.

A Figura 3.23 mostra o *plot* da equação B.E.T. para amostras de filmes de galactomanana. Os valores do coeficiente angular e do linear foram determinados e correspondem a 2,6819 e 0,7071, respectivamente. O conteúdo da monocamada foi calculado a partir desses dados e seu valor é 0,2951g/ 100 g de sólidos secos.

Embora os dados experimentais tenham sido bem ajustados ao modelo B.E.T. ($R^2 = 0,996$), o intervalo de a_w considerado não suficientemente amplo ($0,11 < a_w < 0,53$). O modelo de Langmuir também apresentou elevado coeficiente de correlação ($R^2 = 0,999$), contudo, o valor do erro estimado para esse modelo é maior que o erro para os outros dois modelos mostrados na Tabela 3.6. Dessa maneira, o modelo G.A.B., que leva em consideração todo o intervalo de a_w experimental e seu coeficiente de correlação é de um valor bem elevado, é sugerido como o que melhor representa os dados obtidos para os filmes comestíveis feitos a partir de galactomanana de *A. pavonina*. A isoterma de adsorção descrita pelo modelo matemático G.A.B. é mostrada na Figura 3.24.

Na Tabela 3.7 são mostrados os valores dos parâmetros bem como dos valores dos coeficientes de correlação para os demais modelos matemáticos (Halsey, Smith, Chung-Pfost, Henderson e Freundlich). Os valores de R^2 variaram de 0,970 a 0,999 e o intervalo experimental de a_w para todos os modelos foi o mesmo ($0,11 < a_w < 0,97$). Depois do modelo G.A.B., o outro modelo que melhor representaria o comportamento de sorção da isoterma dos filmes comestíveis feitos de galactomanana é sugerido é o modelo Henderson. O erro estimado para as constantes nesse modelo é muito pequeno ($\pm 0,0000$ e $\pm 4,12 \times 10^{-9}$) e isso o torna bem interessante sob o ponto de vista de que também pode representar o comportamento de sorção para filmes de galactomanana adequadamente.

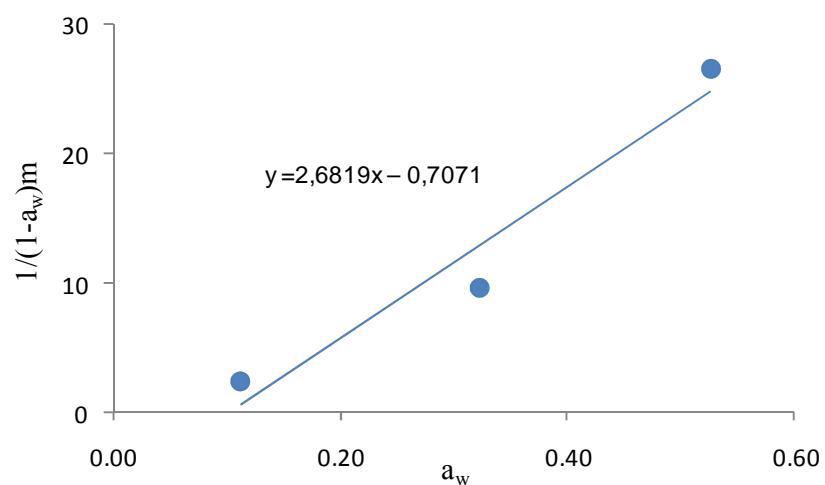


Figura 3.23 – Plot da isoterma B.E.T. para filmes comestíveis produzidos a partir da galactomanana de *A. pavonina*.

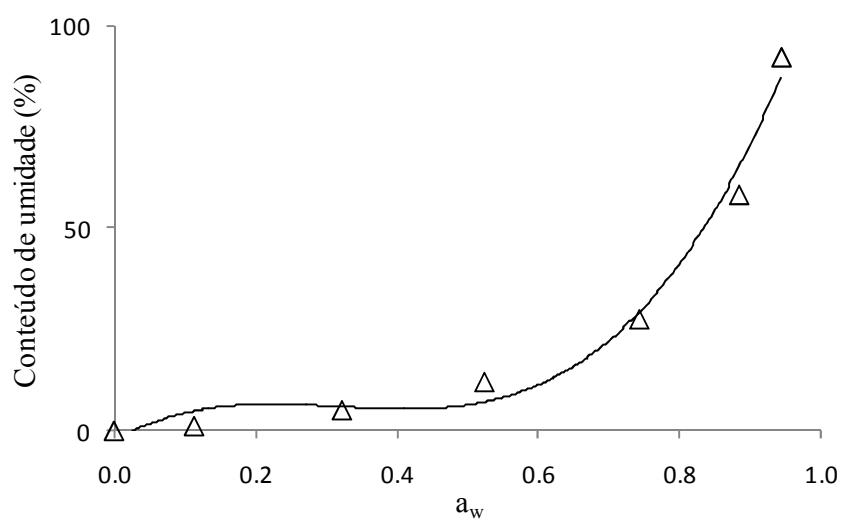


Figura 3.24 – Isoterma de adsorção (a 25 °C) de filme comestível de galactomanana de *Adenanthera pavonina*. Na figura são mostrados os dados experimentais e a curva predita pela equação G.A.B.

Tabela 3.7 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis feitos de galactomanana de *A. pavonina*.*

Constantes	Modelos				
	Halsey	Smith	Chung-Pfost	Henderson	Freundlich
K	$-0,1603 \pm 0,0242$	$6607,89 \pm 3,2099$	$-3,7022 \pm 0,0830$	$0,0898 \pm 0,000$	$0,9794 \pm 0,0355$
C	$2,1020 \pm 0,3462$	$-956,58 \pm 1,2213$	$-3,5602 \pm 0,0722$	$0,3497 \pm 0,000$	$1,0144 \pm 0,0565$
Intervalo de a_w	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97
R^2	0,970	0,999	0,986	0,999	0,999

*Os valores são expressos como média \pm erro-padrão para amostras em triplicata.

Na Tabela 3.8 são mostrados os valores dos parâmetros estimados para os modelos B.E.T., G.A.B. e Langmuir de filmes comestíveis produzidos com amido de milho gelatinizado e glicerol (30%) como plastificante. Os valores de R^2 ajustados foram de 0,993 (B.E.T.), 0,926 (G.A.B.) e 0,999 (Langmuir).

Na Figura 3.25 é mostrado o plot do modelo B.E.T. Os valores dos coeficientes angular (5,4213) e linear (0,8851) foram determinados. O conteúdo da monocamada também foi calculado e seu valor também é de 0,1586 g/ 100 g de sólidos secos.

Contrariamente ao que foi observado no ajuste dos filmes de galactomanana, o modelo sugerido para representar o comportamento de sorção com os filmes feitos de amido é o proposto por Langmuir. Seu R^2 ajustado foi o mais alto ($R^2 = 0,999$), além disso, o erro calculado foi pequeno para as constantes ($\pm 0,0361$ e $\pm 0,8403$). Na Figura 3.26 é mostrada a isoterma predita pelo modelo de Langmuir para os dados experimentais.

Os demais modelos matemáticos (Tabela 3.9) apresentaram valores de R^2 variando de 0,927 a 0,950 com erro estimado para as constantes K e C variando de 0,0412 (Henderson) a 14,91 (Smith) e de 0,0467 (Henderson) a 5,67 (Smith), respectivamente.

Tabela 3.8 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis feitos de amido de milho gelatinizado.*

Constantes	Modelos		
	B.E.T.	G.A.B.	Langmuir
K	$36,9342 \pm 3,8329$	$0,0699 \pm 0,0535$	$24,2707 \pm 0,8403$
C	$0,1239 \pm 0,0982$	$2,4411 \pm 0,2637$	$0,0427 \pm 0,0361$
Xm	–	$4,3394 \pm 0,4797$	–
Intervalo de a_w	0,11 – 0,53	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97
R^2	0,993	0,926	0,999

*Os valores são expressos como média ± erro-padrão para amostras em triplicata.

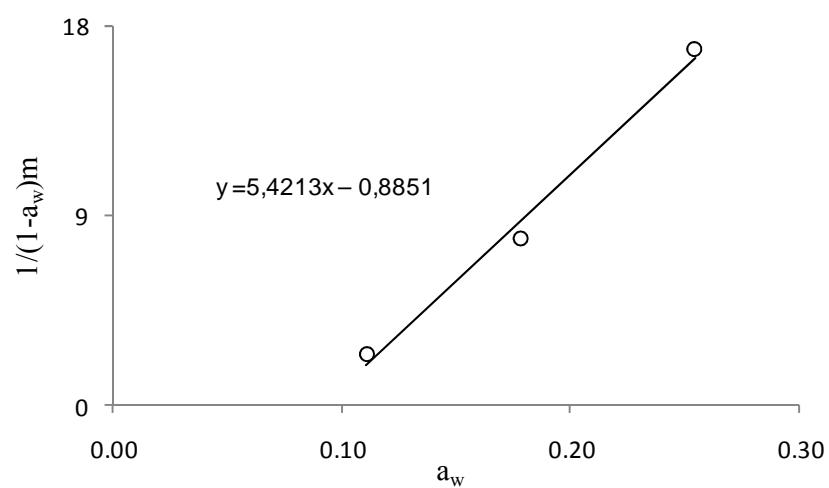


Figura 3.25 – Plot da isoterma B.E.T. para filmes comestíveis produzidos a partir de amido de milho gelatinizado.

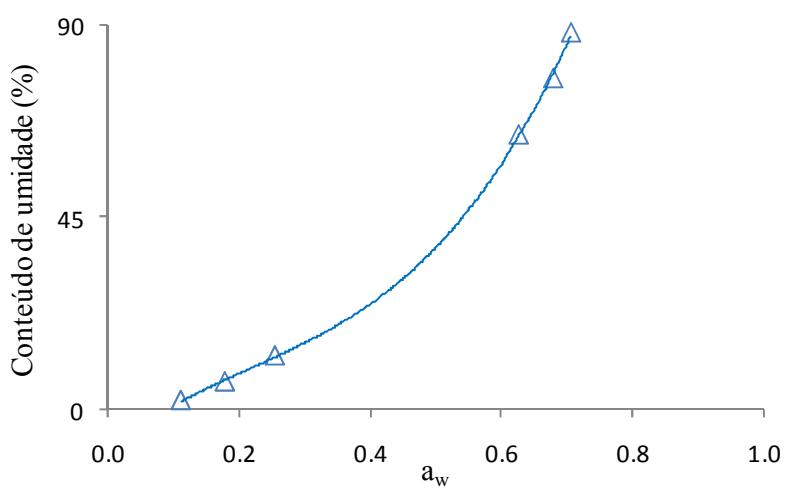


Figura 3.26 – Isoterma de adsorção (a 25 °C) de filme comestível de amido de milho gelatinizado. Na figura são mostrados os dados experimentais e a curva predita pela equação de Langmuir.

Tabela 3.9 – Análise de dados experimentais de sorção para filmes comestíveis feitos de amido de milho gelatinizado.*

Constantes	Modelos				
	Halsey	Smith	Chung-Pfost	Henderson	Freundlich
K	$-0,3177 \pm 0,1407$	$5311,30 \pm 14,91$	$-4,2321 \pm 0,6776$	$0,2463 \pm 0,0412$	$0,7709 \pm 0,1624$
C	$1,9162 \pm 0,2988$	$-768,89 \pm 5,67$	$-2,6317 \pm 0,4574$	$0,2127 \pm 0,0467$	$0,7802 \pm 0,1853$
Intervalo de a_w	$0,11 - 0,97$	$0,11 - 0,97$	$0,11 - 0,97$	$0,11 - 0,97$	$0,11 - 0,97$
R^2	0,947	0,927	0,950	0,927	0,943

*Os valores são expressos como média \pm erro-padrão para amostras em triplicata.

O comportamento da a_w dos distintos filmes comestíveis produzidos a partir de variadas quantidades dos polissacarídeos foi avaliado. Os diferentes filmes foram produzidos de acordo com quantidades determinadas por uma matriz experimental com fatorial 2 e isotermas de adsorção foram construídas para esses filmes (Figura 3.27). Cada um dos distintos filmes apresentou isotermas de adsorção com curvas diferenciadas. Na Figura 3.27 pode-se observar que o conteúdo de umidade aumenta de forma diretamente proporcional a quantidade de galactomanana presente.

Análise de regressão múltipla foi utilizada para desenvolver as equações relacionando os valores experimentais da umidade ($H\%$) e da atividade de água (a_w) às quantidades (em mL) dos polímeros utilizados na produção dos filmes comestíveis (Tabela 3.10). Os valores do coeficiente de correlação variaram de 0,731 a 0,966. Em todas as equações pode-se verificar que ambos os parâmetros analisados ($H\%$ e a_w) dependem da quantidade de cada polímero usado bem como da interação entre essas quantidades. Pode-se concluir que a quantidade dos polissacarídeos possui grande influência sobre os parâmetros testados.

Para os valores de umidade (Figura 3.28), observa-se que estes aumentam quando se diminui a quantidade de amido no preparo dos filmes comestíveis ou quando se aumenta a quantidade de galactomanana. O inverso é observado quando aumentamos a quantidade de amido, ou seja, os valores da umidade diminuem de forma significativa. A umidade, dessa forma, parece ser um parâmetro dependente da quantidade de galactomanana, embora o amido possua alguma contribuição.

Quando consideramos os valores de a_w (Figuras 3.29 e 3.30), essa tendência de comportamento também é evidenciada, pois esses valores aumentam quando se diminui a quantidade de amido, ou quando aumentamos a quantidade de galactomanana. É interessante observar que o comportamento de atividade de água estimado pela regressão múltipla confirma a tendência das curvas de isotermas de adsorção mostradas na Figura 3.27. Dessa maneira, foi verificado estatisticamente que nos altos valores de atividade de água (0,75 e 0,90) existem diferenças entre os distintos filmes comestíveis. Conclui-se, portanto, que essa tendência, facilmente detectada pela isoterma de adsorção, pode ser utilizada como ferramenta para caracterizar os distintos filmes

comestíveis produzidos pela mistura de galactomanana e amido através dos parâmetros avaliados ($H\%$ e a_w).

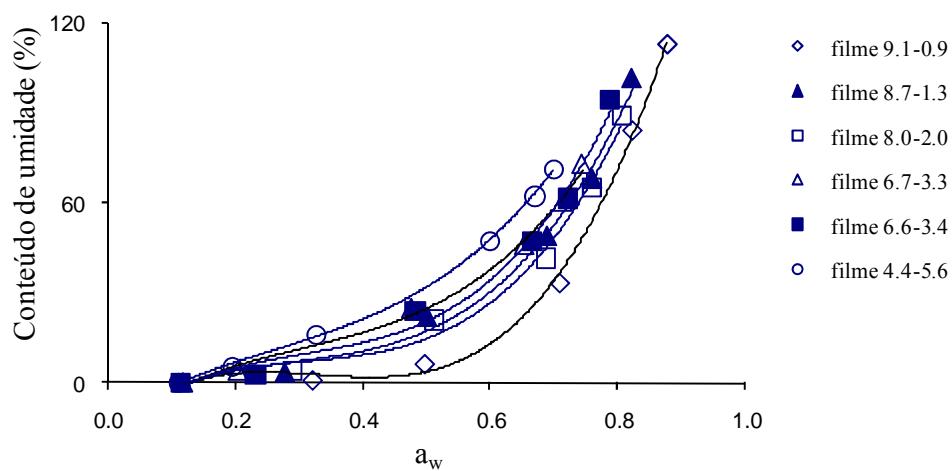


Figura 3.27 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido. Os filmes foram produzidos com quantidades definidas de acordo com uma matriz experimental.

Tabela 3.10 – Equações da umidade (H%) e da a_w relacionadas às quantidades de amido e de galactomanana (GLMAp) adicionada aos filmes comestíveis estudados.

Parâmetro	a_w	Equação	R^2
Umidade (H%) da amostra	0,11	$H\%_{0,11} = 86G + 86A + 5495GA + 2757G^2 + 2738A^2$	0,731
Valor experimental de a_w	0,75	$a_w(0,75) = 8G + 8A + 525GA + 260G^2 + 266A^2$	0,966
Valor experimental de a_w	0,90	$a_w(0,90) = 13G + 13A + 791GA + 394G^2 + 397A^2$	0,919

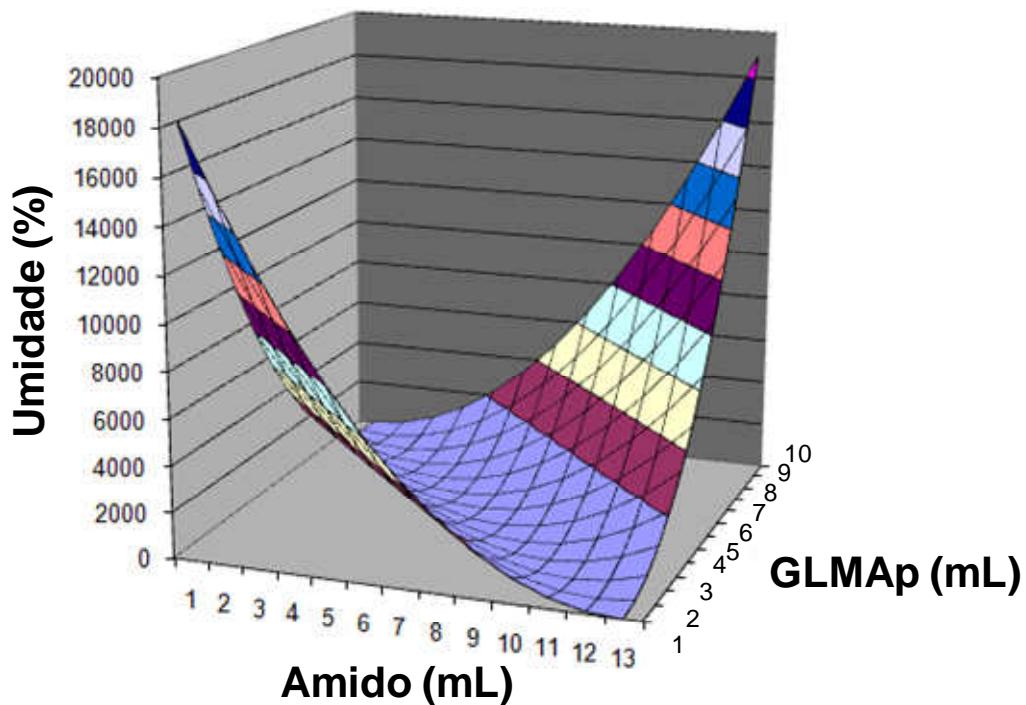


Figura 3.28 – Evolução da umidade (%) estimada na a_w de 0,11 em relação às quantidades de dispersão de amido (mL) e de solução de galactomanana de *A. pavonina* (mL) adicionadas aos filmes comestíveis.

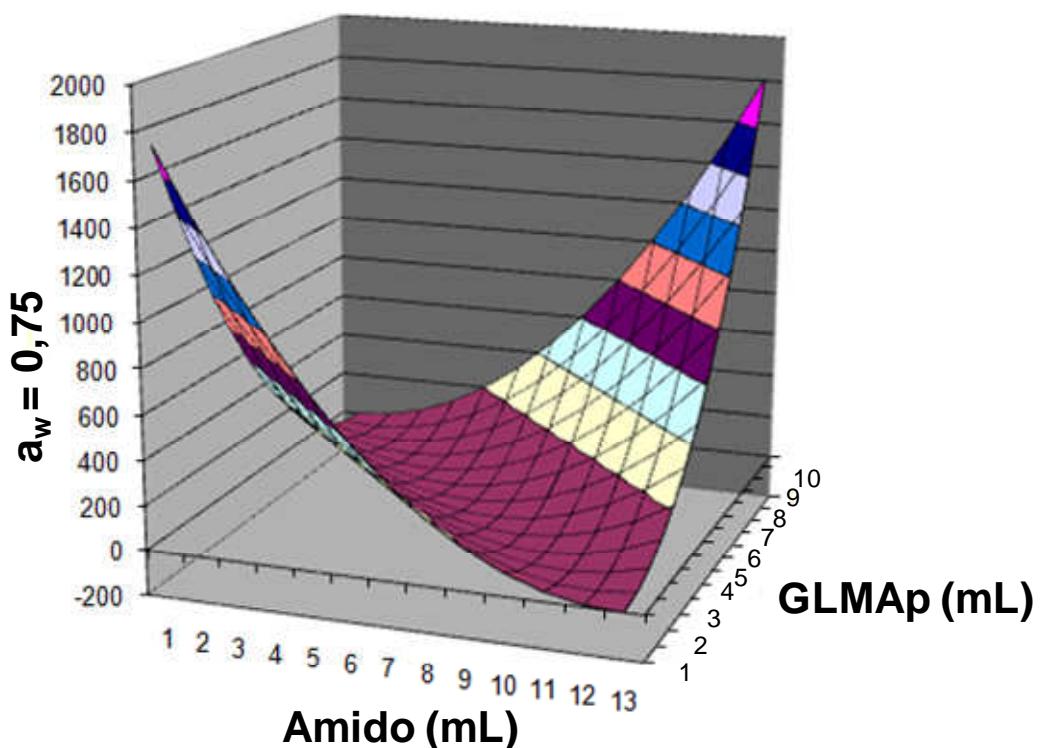


Figura 3.29 – Evolução dos valores experimentais da $a_w=0,75$ em relação às quantidades de dispersão de amido (mL) e de solução de galactomanana de *A. pavonina* (mL) adicionadas em filmes comestíveis.

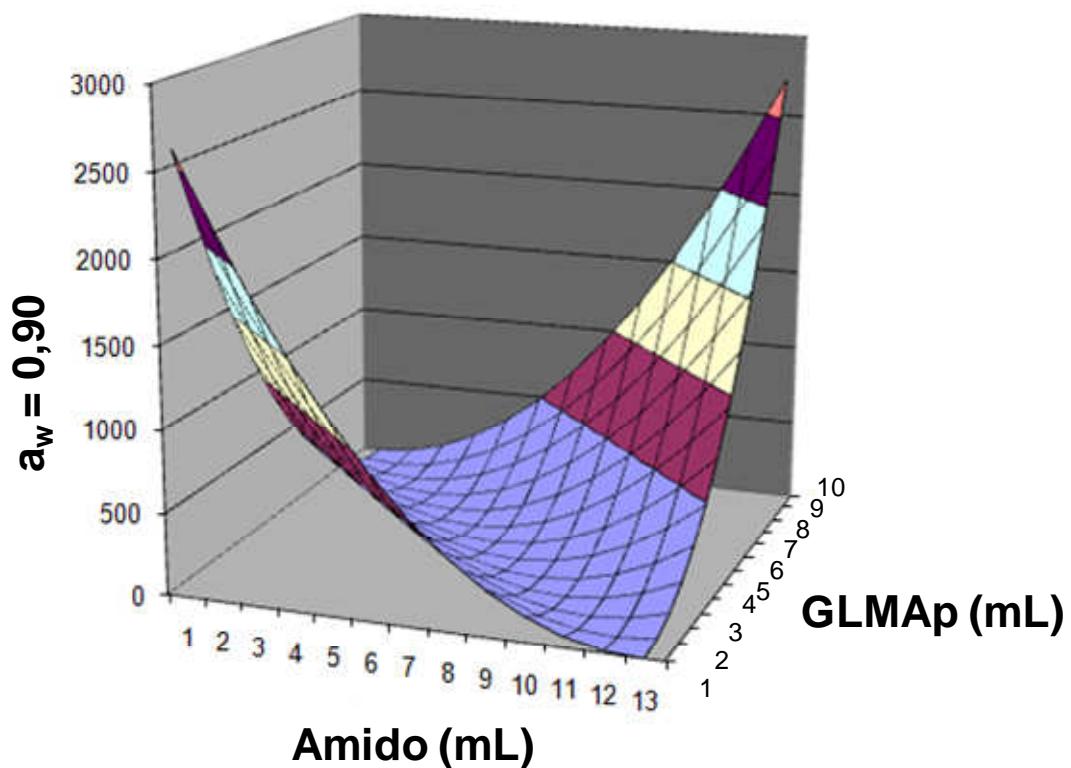


Figura 3.30 – Evolução dos valores experimentais da $a_w=0,90$ em relação às quantidades de dispersão de amido (mL) e de solução de galactomanana de *A. pavonina* (mL) adicionadas em filmes comestíveis.

O efeito da temperatura sobre a capacidade de retenção de umidade de filmes produzidos com a blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 foi estudado. A Figura 3.31 mostra as isotermas de adsorção obtidas para amostras desses filmes em distintas temperaturas.

É marcante a baixa retenção de umidade nos filmes submetidos à temperatura de 15 °C quando comparada as temperaturas de 25 °C e 35 °C. Essa diferença no conteúdo de umidade chega a aproximadamente 3 vezes o valor obtido na mais alta temperatura experimental (35 °C). Por outro lado, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores do conteúdo de umidade entre os as temperaturas de 25 °C e 35 °C.

Em relação aos valores experimentais de a_w também é possível observar que para a isoterma determinada a 15 °C a diferença foi na ordem de 1,25 vezes (Figura 3.31). Novamente não foram detectadas diferenças significativas entre os valores experimentais de a_w para as isotermas obtidas a 25 °C e 35 °C.

Na Tabela 3.11 são mostrados os parâmetros ajustados das isotermas de adsorção obtidas em distintas temperaturas aos modelos B.E.T., G.A.B. e Langmuir. Todos os modelos foram ajustados adequadamente ($R^2 > 0,90$) sendo o intervalo do coeficiente de correlação indo desde 0,958 até 0,999 (ambos obtidos com o modelo B.E.T.). Embora a equação B.E.T. tenha apresentado o maior valor de R^2 , seu intervalo de a_w considerado ($0,11 < a_w < 0,53$) é pequeno o que não permite representar todo o intervalo experimental de estudo. O modelo de Langmuir também apresentou adequados valores de R^2 (0,982, 0,990 e 0,997), no entanto, igualmente apresentou os maiores valores de erro associados as constantes ajustadas (Tabela 3.11).

O valor médio de umidade associado à monocamada foi determinado a partir da equação B.E.T. Os valores para os filmes comestíveis avaliados nas distintas temperaturas foram 0,0096 (15 °C), 0,2939 (25 °C) e 0,2749 (35 °C) g/ 100 g de sólidos secos.

A entalpia de sorção (Q_s) foi determinada pela equação apresentada por Chirife *et al.* (1986). Os valores da entalpia de sorção para os filmes comestíveis avaliados nas distintas temperaturas foram -0,9083 (15 °C), 0,8473 (25 °C) e 1,0226 (35 °C) kcal/mol. Observa-se que seus valores aumentam à medida que se aumenta a temperatura. Seu

valor médio obtido foi $0,3205 \pm 0,0326$ kcal/mol para o intervalo de temperatura estudado.

Pode-se concluir que o comportamento da atividade de água mostrado pelas isotermas de adsorção das amostras de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 apresentou diferenças nos parâmetros estudados na temperatura de 15 °C quando comparada as demais temperaturas.

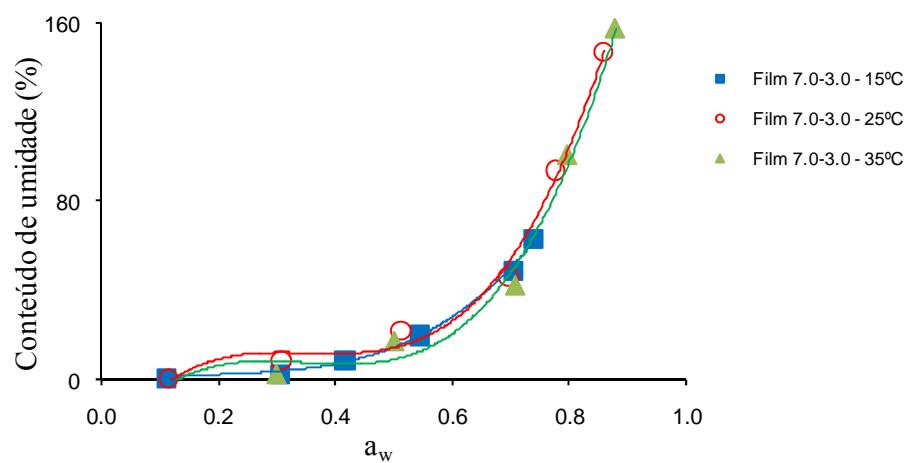


Figura 3.31 – Isotermas de adsorção de filmes comestíveis baseados na blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 medidas em temperaturas distintas.

Tabela 3.11 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para medida da atividade de água em filmes produzidos a partir da blenda galactomanana-amido (7,0-3,0) em distintas temperaturas (15 °C, 25 °C e 35 °C).

Temperatura (°C)	Modelos							
	B.E.T.*			G.A.B.			Langmuir	
	C	Xm	K	Xm	C	K	C	
15	8,948 ± 0,959	0,215 ± 0,104	0,086 ± 0,059	2,804 ± 0,292	3,251 ± 0,288	0,238 ± 0,330	4,118 ± 1,172	
25	4,185 ± 0,668	0,294 ± 0,074	0,104 ± 0,020	3,864 ± 0,180	3,230 ± 0,192	0,148 ± 0,286	11,391 ± 3,458	
35	5,629 ± 0,836	0,274 ± 0,045	0,105 ± 0,055	3,072 ± 0,614	3,058 ± 0,557	0,133 ± 0,299	10,090 ± 2,431	
R^2 **	0,958 (15)			0,991 (15)			0,989 (15)	
	0,999 (25)			0,992 (25)			0,990 (25)	
	0,993 (35)			0,997 (35)			0,997 (35)	

*Neste modelo, o intervalo de atividade de água considerado foi $0,11 < a_w < 0,53$.

**Os valores entre parêntesis correspondem às diferentes temperaturas de medição.

A Figura 3.32 mostra isotermas de adsorção dos filmes comestíveis produzidos com a blenda 7,0-3,0 e contendo distintas concentrações de glicerol. A concentração do plastificante variou de 10 a 40 %. O perfil das isotermas mostrou-se dependente da concentração de glicerol, pois o conteúdo de umidade e os valores medidos de a_w apresentaram diferenças.

Com os valores 10 e 20 % é possível observar que possuem aproximadamente o mesmo perfil em suas isotermas o que é indicativo de a umidade retida nos filmes desses tratamentos está relacionada, provavelmente, à contribuição do agente plastificante. Um padrão similar também é verificado nos filmes dos tratamentos 30 e 40%, porque suas isotermas comportam-se de forma semelhante.

Na Tabela 3.12 são mostrados os valores estimados para as constantes dos modelos B.E.T., G.A.B. e Langmuir dos filmes comestíveis produzidos. Os dados foram ajustados adequadamente a todos os modelos ($R^2 > 0,90$) e o modelo sugerido que melhor representa os dados experimentais para os distintos tratamentos é o proposto pela equação G.A.B. (seu coeficiente de correlação variou de 0,978 a 0,996).

A tendência de comportamento das isotermas de adsorção para os filmes com as diferentes concentrações de glicerol mostrada na Figura 3.32 é corroborada pelo ajuste da Tabela 12. Os valores das constantes exibiram semelhanças quando comparados entre si.

Bertuzzi *et al.* (2007a) trabalhando com filmes de amido de milho gelatinizado e com distintas concentrações de glicerol(0, 10, 20, 40 e 60 %) ajustaram os dados experimentais ao modelo G.A.B.. Os parâmetros ajustados variaram de forma proporcional ao conteúdo de glicerol.

O caráter hidrofílico do plastificante provavelmente cria modificações estruturais na rede das cadeias de amido (amilose e amilopectina). Essa mudança estrutural resulta em um ganho de água diferenciado em função do percentual de glicerol. Dessa forma, os níveis do plastificante testados nas condições experimentais aqui descritas alteram de forma significativa a hidratação dos filmes comestíveis produzidos com a blenda galactomanana-amido.

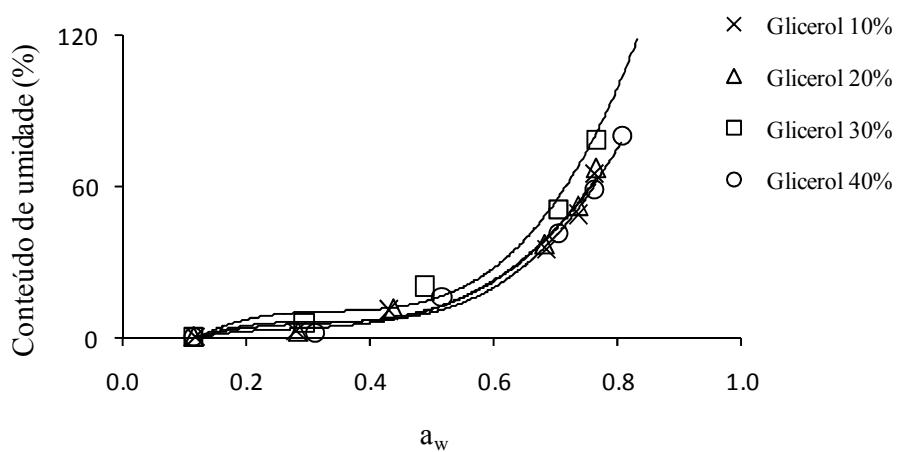


Figura 3.32 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) de filmes comestíveis obtidos a partir da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 preparados com distintas concentrações de glicerol.

Tabela 3.12 – Ajustes de filmes comestíveis obtidos a partir da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 com distintas concentrações de glicerol.

Concentração de glicerol (%)	Modelos						
	B.E.T.*			G.A.B.		Langmuir	
	C	Xm	K	Xm	C	K	C
10	8,468 ± 1,959	0,233 ± 0,220	0,097 ± 0,075	2,772 ± 0,634	3,398 ± 0,717	0,182 ± 0,378	7,085 ± 1,895
20	7,689 ± 1,744	0,237 ± 0,222	0,097 ± 0,109	2,844 ± 0,927	3,568 ± 1,021	0,198 ± 0,413	9,796 ± 3,142
30	4,185 ± 0,668	0,294 ± 0,074	0,104 ± 0,020	3,864 ± 0,180	3,230 ± 0,192	0,148 ± 0,286	11,391 ± 3,458
40	4,771 ± 0,507	0,289 ± 0,022	0,103 ± 0,032	2,754 ± 0,093	3,332 ± 0,093	0,354 ± 0,092	3,192 ± 0,228
R ² **	0,981 (10)		0,978 (10)		0,979 (10)		
	0,991 (20)		0,983 (20)		0,984 (20)		
	0,999 (30)		0,996 (30)		0,990 (30)		
	0,998 (40)		0,989 (40)		0,994 (40)		

*Neste modelo, o intervalo de atividade de água considerado foi $0,11 < a_w < 0,53$.

**Os valores entre parêntesis correspondem às diferentes concentrações de glicerol.

O fenômeno da histerese foi estudado nos filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0. Na Figura 3.33 são mostradas as isotermas de adsorção e desorção de amostras desses filmes. A histerese foi observada pelo padrão das isotermas obtidas. O ganho de água dos filmes obedece a um comportamento diferenciado quando comparado a perda de água. Termodinamicamente isso é explicado pelo fato de que a maneira como a água se associa a superfície do material é dada pela distribuição dessa água livre nas camadas de hidratação desse material. Isso faz com que não exista uma sobreposição das isotermas.

Na Tabela 3.13 os dados experimentais de adsorção e desorção foram ajustados aos modelos B.E.T., G.A.B. e Langmuir. A adsorção apresentou os melhores coeficientes de correlação (0,990 a 0,994) enquanto que a desorção valores de R^2 menores (0,841 a 0,966). Embora nos testes anteriormente descritos o modelo de Langmuir tenha exibido ajustes pouco significativos em virtude do erro experimental elevado quando comparado aos outros modelos, aqui esse modelo foi o que apresentou os valores de coeficientes de R^2 para ambas as isotermas (0,991 para adsorção e 0,966 para desorção).

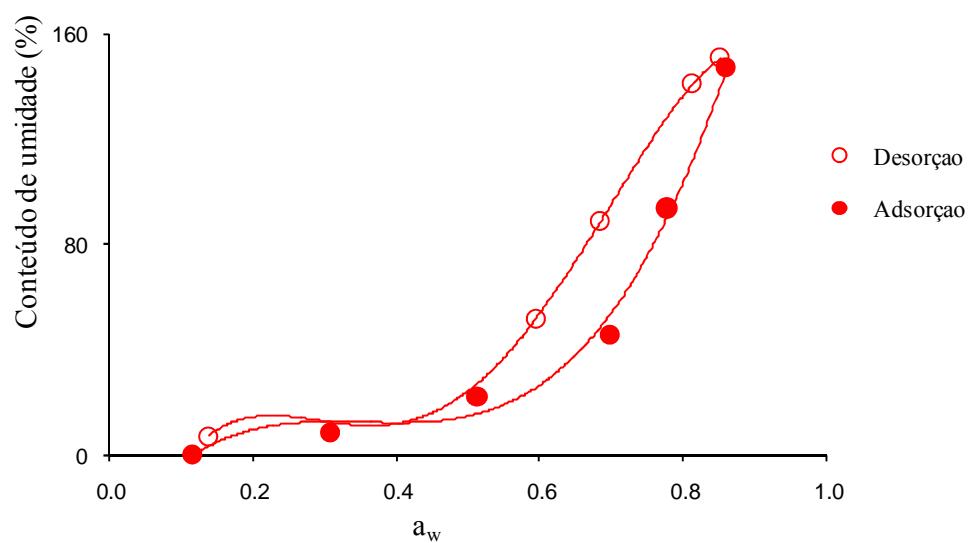


Figura 3.33 – Isotermas de adsorção/desorção (a 25 °C) do filme comestível feito a partir da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0. O fenômeno da histerese é evidenciado.

Tabela 3.13 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para curvas de adsorção/desorção de filmes da blenda galactomanana-amido (7,0-3,0).

Curva de sorção	Modelos						
	B.E.T.*			G.A.B.		Langmuir	
	C	Xm	K	Xm	C	K	C
Adsorção	$5,343 \pm 1,383$	$0,272 \pm 0,186$	$0,102 \pm 0,060$	$2,876 \pm 0,170$	$3,222 \pm 0,203$	$0,180 \pm 0,148$	$5,645 \pm 0,662$
Desorção	$3,895 \pm 1,000$	$0,355 \pm 0,196$	$0,239 \pm 0,073$	$1,645 \pm 0,527$	$2,954 \pm 0,947$	$1,348 \pm 0,784$	$1,701 \pm 0,683$
R^2 **	0,994 (A)			0,990 (A)		0,991 (A)	
	0,841 (D)			0,891 (D)		0,966 (D)	

* Neste modelo, o intervalo de atividade de água considerado foi $0,11 < a_w < 0,53$.

**As letras entre parêntesis representam: A – adsorção e D – desorção.

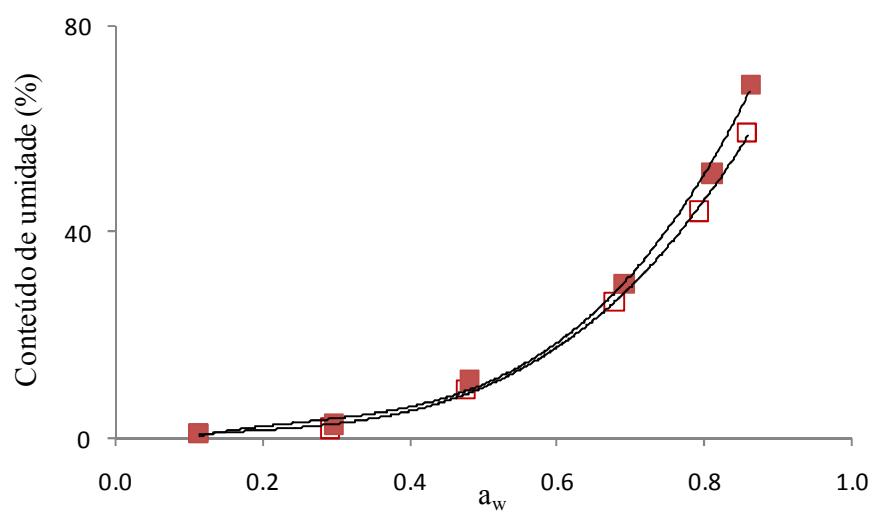
A Figura 3.34 mostra o padrão das isotermas de adsorção de filmes comestíveis preparados a partir de tampão citrato e contendo o tampão e o antimicrobiano nisina. As diferenças observadas foram evidenciadas nos altos valores de a_w (0,75, 0,90 e 0,97). A presença do antimicrobiano permitiu um maior grau de hidratação do filme comestível em virtude dos valores de umidade determinados.

A molécula de nisina é um peptídeo antibacteriano de 13 a 34 resíduos de aminoácidos modificados pós-traducionalmente a resíduos de idro e que apresenta ligações cruzadas tioéter. Dado seu pequeno tamanho e massa molecular, esse peptídeo pode facilmente intercalar-se entre as cadeias dos polissacarídeos utilizados para produzir os filmes comestíveis. Quando da hidratação desses filmes, a nisina pode provavelmente contribuir retendo água o que justificaria os valores diferenciados de conteúdo de umidade e de a_w determinados.

Nas Tabelas 3.14 e 3.15 são mostrados os ajustes dos dados experimentais para as isotermas de adsorção dos filmes produzidos sem a nisina e contendo o antimicrobiano. Os valores dos coeficientes de correlação variaram de 0,998 (modelo B.E.T.) a 0,999 (modelos G.A.B. e Langmuir) para ambos os grupos de dados (filmes sem nenhuma nisina e contendo 0,25 mg/mL).

O conteúdo da umidade associada à monocamada para a superfície dos dois tipos de filmes foi calculado. Para os filmes que não possuíam qualquer nisina em sua preparação apresentaram valor de 0,0155 g/100 g de sólidos secos e para os filmes contendo nisina seu valor foi de 0,0160 g/100 g de sólidos secos.

Na Figura 3.35 são mostrados os plots da isoterma B.E.T. para os filmes comestíveis preparados sem nisina (Figura 3.35 A) e contendo nisina (Figura 3.35 B). Os valores dos coeficientes angulares calculados para ambos os plots foram 64,0074 e 62,4493, respectivamente. Esses valores refletem um padrão semelhante para as isotermas no intervalo de a_w ajustado ao modelo aqui descrito uma vez que as retas obtidas a partir dos dados experimentais mostram aproximadamente uma mesma inclinação.



Figuras 3.34 – Isotermas de adsorção (a 25 °C) dos filmes comestíveis baseados nos complexos galactomanana-amido 7,0-3,0 (símbolos abertos) e galactomanana-amido-nisina 7,0-3,0 (símbolos cheios). A solução de galactomanana em ambos os sistemas foi preparada com tampão citrato 50 mM, pH = 5,0.

Tabela 3.14 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para curvas de adsorção de filmes da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0. A solução de galactomanana foi preparada com tampão citrato 50 mM, pH = 5,0.

Constantes	Modelos		
	B.E.T.*	G.A.B.	Langmuir
K	$5,4135 \pm 0,4510$	$0,0984 \pm 0,0612$	$16,8976 \pm 2,6110$
C	$0,2626 \pm 0,0617$	$2,7638 \pm 0,4964$	$0,0609 \pm 0,1440$
Xm	–	$3,4652 \pm 0,6426$	–
Intervalo de a_w	0,11 – 0,53	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97
R^2	0,998	0,999	0,999

*Neste modelo, o intervalo de atividade de água considerado foi $0,11 < a_w < 0,53$.

Tabela 3.15 – Valores das constantes (K, Xm e C) e do coeficiente de ajuste (R^2) para curvas de adsorção de filmes da blenda galactomanana-amido-nisina 7,0-3,0. A solução de galactomanana foi preparada com tampão citrato 50 mM, pH = 5,0.

Constantes	Modelos		
	B.E.T.*	G.A.B.	Langmuir
K	$5,3991 \pm 0,4859$	$0,1005 \pm 0,0396$	$15,2832 \pm 1,9699$
C	$0,2654 \pm 0,0586$	$2,7866 \pm 0,3952$	$0,0649 \pm 0,1278$
Xm	–	$3,3995 \pm 0,4777$	–
Intervalo de a_w	0,11 – 0,53	0,11 – 0,97	0,11 – 0,97
R^2	0,998	0,999	0,999

*Neste modelo, o intervalo de atividade de água considerado foi $0,11 < a_w < 0,53$.

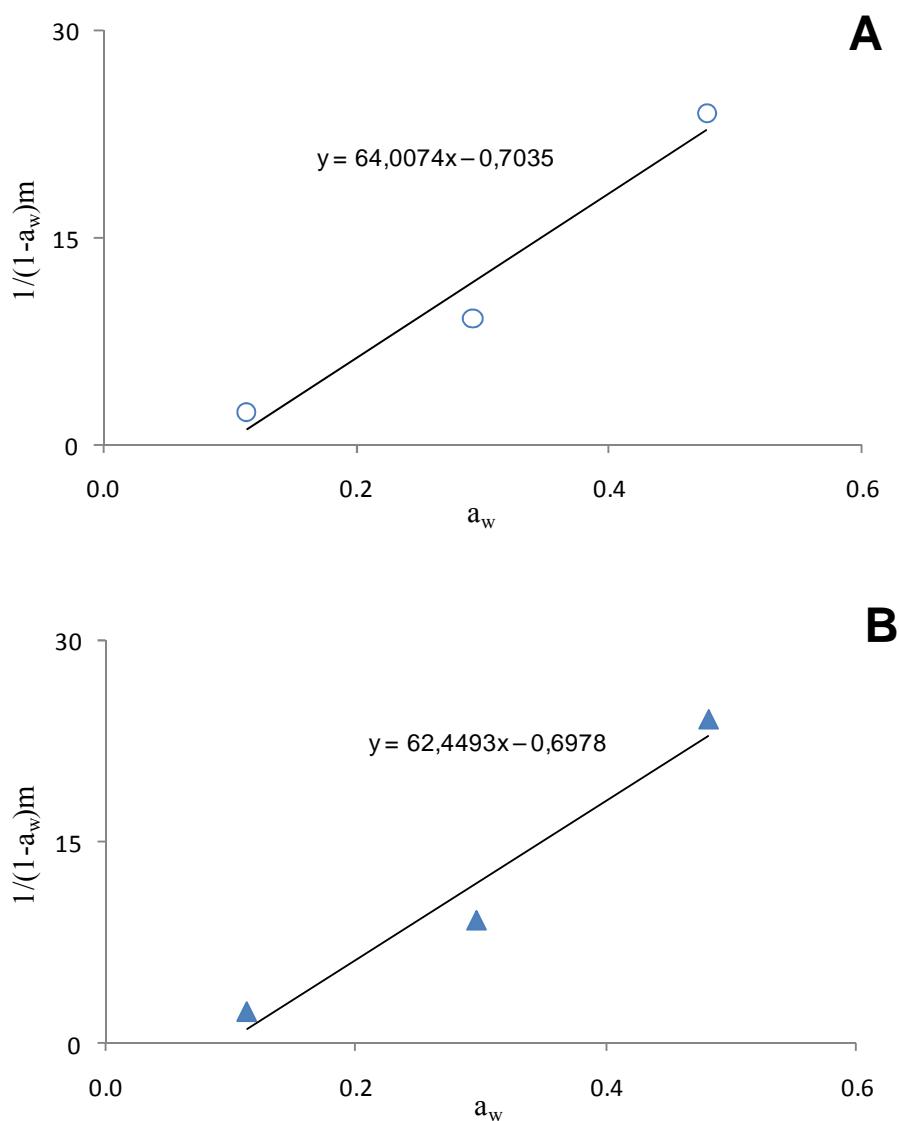


Figura 3.35 – Plots das isotermas B.E.T. para filmes comestíveis baseados nos complexos galactomanana-amido 7,0-3,0 (A) e galactomanana-amido-nisina 7,0-3,0 (B). A solução de galactomanana em ambos os sistemas foi preparada com tampão citrato 50 mM, pH = 5,0.

3.4.4. Análise térmica

Análise térmica através de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada para amostras de galactomanana de *A. pavonina*, filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido em tampão citrato pH = 5,0, 50 mM sem o antimicrobiano e contendo a nisina (0,25 mg/mL).

Na Figura 3.36 é mostrada a curva de estabilidade térmica por DSC para amostras do polissacarídeo de *Adenanthera pavonina*. Apenas uma transição térmica foi detectada, uma endotérmica a 57,2 °C. Essa transição provavelmente está associada à perda de água da estrutura do material.

A curva de estabilidade térmica de filmes comestíveis feitos com blenda galactomanana-amido (7,0-3,0) em tampão citrato apresenta três transições térmicas (Figura 3.37). As transições detectadas foram todas de natureza endotérmica aos 72, 211 e 296 °C. Esse fato é consistente com uma separação de fase entre os materiais utilizados no preparo desse filme.

Na Figura 3.38 é mostrado o termograma por DSC para filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido-nisina preparada a partir de tampão citrato. Nessa curva de estabilidade foram detectadas três transições térmicas, todas endotérmicas, aos 91,3, 247 e 287 °C. A presença do antimicrobiano deslocou os valores das transições. Quando esses valores são comparados com aqueles obtidos para o filme sem o antimicrobiano, as diferenças observadas correspondem a 19,3, 36 e – 9 °C. Esses resultados indicam que houve interação da nisina com os polímeros da blenda, pois uma maior quantidade de água estrutural do filme foi perdida. Essa maior quantidade de água provavelmente está associada a presença nisina no filme o que foi corroborado pelo comportamento da isoterma de adsorção dos filmes contendo nisina (Figura 3.34).

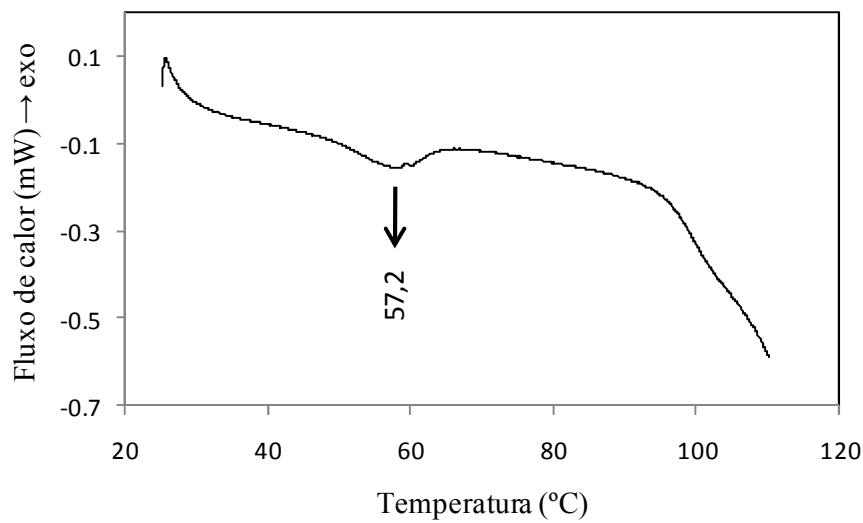


Figura 3.36 – Termograma por DSC da galactomanana de *Adenanthera pavonina*.

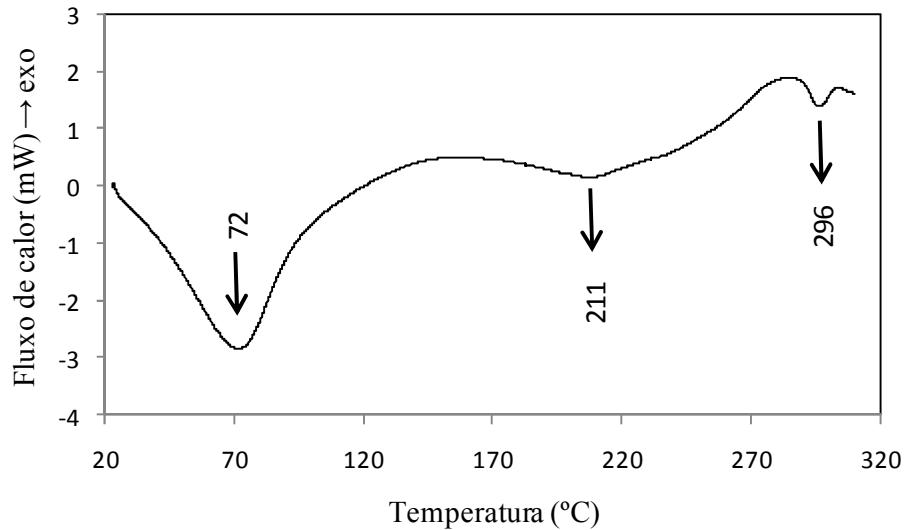


Figura 3.37 – Termograma por DSC do filme comestível feito a partir da blenda galactomanana-amido de milho. A solução de galactomanana foi preparada com tampão citrato 50 mM, pH = 5,0.

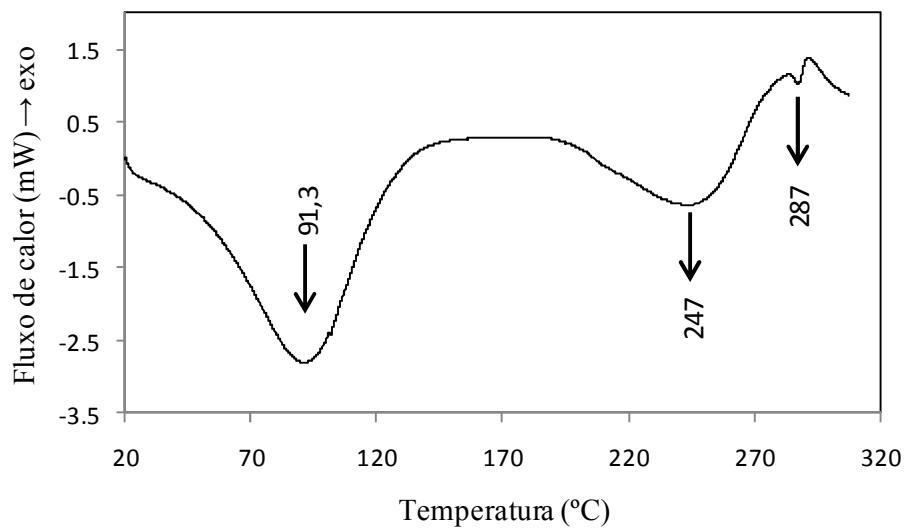


Figura 3.38 – Termograma por DSC do filme feito a partir da blenda galactomanana-amido de milho contendo o antimicrobiano nisina ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$). A solução de galactomanana foi preparada com tampão citrato 50 mM, pH = 5,0.

3.5. Conclusões

A galactomanana de *A.pavonina* apresentou comportamento reológico típico de gomas de sementes uma vez que soluções aquosas do polissacarídeo exibiram perfis similares aqueles reportados na literatura para galactomananas. Por outro lado, o esforço aplicado nos testes de curvas de escoamento da dispersão de amido de milho gelatinizado e das misturas de galactomanana-amido não permitiu caracterizar adequadamente esses sistemas de polímeros em solução. Os ensaios oscilatórios, por sua vez, foram mais sensíveis para detectar as diferenças entre os distintos sistemas avaliados permitindo sua caracterização de maneira mais adequada.

A medida da a_w e a construção de isotermas de sorção consistiram em numa abordagem interessante para caracterizar filmes comestíveis produzidos a partir dos sistemas de blendas de polissacarídeos e do complexo galactomanana-amido-nisina. Diferenças significativas foram detectadas nesses filmes e permitiram relacionar o comportamento da água ao arranjo estrutural dos diferentes filmes comestíveis produzidos. A umidade foi observada como dependente de importantes parâmetros avaliados nos filmes, tais como a temperatura e o conteúdo de glicerol. O fenômeno da histerese foi evidenciado para os filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido. Finalmente, o modelo matemático de sorção descrito pela equação G.A.B. é sugerido como aquele que melhor representa os dados obtidos nas condições experimentais testadas aqui.

Finalmente, as curvas de estabilidade térmica obtidas por Calorimetria Exploratória Diferencial para a galactomanana e os filmes comestíveis, produzidos sem o antimicrobiano e contendo a nisina, permitiram associar os dados de DSC aos obtidos pelas medias de a_w , corroborando, no caso do filme contendo nisina, que o antimicrobiano colabora com uma maior hidratação do filme comestível.

3.6. Referências

- Ahmed, J; Ramaswamy, H. S.; Ayad, A.; Alli, I. (2008). Thermal and dynamic rheology of insoluble starch from basmati rice. *Food Hydrocolloids*, 22, 278–287.
- Achayuthakan, P.; Suphantharika, M. (2008). Pasting and rheological properties of waxy corn starch as affected by guar gum and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 71, 9–17.
- Ajji, A.; Choplin, L. (1991). Rheology and Dynamics near Phase separation in a polymer blend: model and scaling analysis. *Macromolecules*, 24, 5221-5223.
- Bertuzzi, M. A.; Armada, M.; Gottifredi, J. C. (2007a). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*, 82, 17-25.
- Bertuzzi, M. A.; Castro Vidaurre, E. F.; Armada, M.; Gottifred, J. C. (2007b). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engeneering* 80, 972-978.
- Bizot, H. (1984). Using the G.A.B. model to construct sorption isotherms. In R. Jowitt, F. Escher, B. Hallstrom, H. F. T. Meffert, W.E.L. Speiss, & G. Vos. *Physical properties of foods*. London: Applied Science Publishers.
- Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multi molecular layers. *Journal American Chemistry Society*, 60, 309.
- Bylund, G. (2003). Rheology, Chapter 3, p. 37-44. In: *Dairy Processing Handbook*, International Dairy Books, 2nd Edition, ISBN-10: 9163134276, pp. 450.
- Baroni, A. F.; Freitas, I. C.; Cunha, R. L.; Hubinger, M. D.; Menegalli, F. C. (1999). Caracterização reológica de queijo cremoso tradicional e com teor reduzido de

gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2, (1,2), 21-29.

Barbosa-Cánovas, G. V.; Jr, A. J. F.; Schimidt, S. J.; Labuza, T. P. (2007). *Water activity in Foods: Fundamentals and applications*. IFT Press and Blackwell Publishing.

Boki, K.; Ohno, S. (1991). Equilibrium isotherm to represent moisture sorption on starch. *Journal of Food Science*, 56, 4, 1106-1110.

Castillo, M. D.; Martínez, E. J.; Gonzalez, H. H. L.; Pacin, A. M.; Resnik, S. L. (2003). Study of mathematical models applied to sorption isotherms of Argentinean black bean varieties. *Journal of Food Engineering*, 60, 343–348.

Chun, S. Y.; Yoo, B. (2006). Steady and dynamic shear rheological properties of sweet potato flour dispersions. *European Food Research Technology*, 223, 313-319.

Chirife, J.; Suaréz, C.; Iglesias, H. (1986). Technical note: The calculation of the heat of water sorption in foods on the basis of BET theory. *Journal of Food Technology*, 21, 1, 103-107.

Chung, D.; Pfost, H. (1967). Adsorption and desorption of water vapor by cereal grains and their products. Part 1: Heat and free energy changes of adsorption and desorption. *Transactions of ASAE*, 10, 3, 549.

Coupland, J. N.; Shaw, N. B.; Monahan, F. J.; O'Riordan, E. D.; O'Sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43, 25-30.

Chung, D. S.; Pfost, H. B. (1967). Adsorption and desorption of water vapor by cereal grains and their products. Part II: Development of the general isotherm equation. *Transactions of the American Society for Agriculture Engineers*, 10, 4, 552-555.

Cheng L. H.; Karim, A. A.; Seow, C. C. (2008). Characterisation of composite films made of konjac glucomannan (KGM) carboxymethyl cellulose (CMC) and lipid. *Food Chemistry*, 107, 1, 411-418.

Cho, S. Y.; Rhee, C. (2002). Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their Relation to Mechanical Properties. *LWT*, 35, 151-157.

Dean, J. A. (1995). *The Analytical Chemistry Handbook*. New York, McGraw-Hill, Inc. ISBN-13: 978-0070161979, pp.1168.

Doyle, J. P.; Giannouli, P.; Martin, E. J.; Brooks, M.; Morris, E. R. (2006). Effect of sugars, galactose content and chainlength on freeze-thaw gelation of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 64, 391–401.

Demertzis, P. G.; Kontominas, M. G. (1988). Study of water sorption of egg powders by inverse gas chromatography. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 186, 213-217.

Fennema, O. R. (2001). *Química de los alimentos*. 2^a Edición, Zaragoza, España. ISBN-13: 978-8420009148, pp. 1280.

Freitas, J. C. O.; Queiroz, A. J. M.; Figueiredo, R. M. F.; Rodrigues, A. E. (2004). Combinações de mel e acerola em pó: avaliação reológica. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 6,1, 87-95.

Funami, T.; Kataoka, Y.; Hiroe, M.; Asai, I.; Takahashi, R.; Nishinari, K. (2007). Thermal aggregation of methylcellulose with different molecular weights. *Food Hydrocolloids*, 21, 46–58.

Funami, T.; Kataoka, Y.; Omoto, T.; Goto, Y.; Asai, I.; Nishinari, K. (2005). Effects of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 19, 1–13.

- Freundlich, H. (1926). *Colloid and capillary chemistry*. Methuen, London.
- Gomes, A. M. M.; Silva, C. E. M.; Ricardo, N. M. P. S. (2005). Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). *Carbohydrate Polymers*, 60, 1–6.
- Halsey, G. (1948). Physical adsorption on non-uniform surfaces. *Journal of Chemical Physics*, 16, 931–937.
- Henderson, S. M. (1952). A basic concept of equilibrium moisture. *Agriculture Engineering*, 2, 29–32.
- Harrington, J. C.; Morris, E. R. (2009). An unusual manifestation of phase separation in mixtures of disordered gelatin with konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, 23, 460–467.
- Halsey, G. D. (1948). Physical adsorption on non-uniform surfaces. *Journal of Chemistry and Physics*, 16, 931.
- Henderson, S. (1952). A basic concept of equilibrium moisture. *Agriculture Engineering*, 33, 29.
- Icoz, D. Z.; Kokini, J. L. (2007). Probing the boundaries of miscibility in model carbohydrates consisting of chemically derivatized dextrans using DSC and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 68, 68–76.
- Khouryieh, H.A.; Herald, T.J.; Aramouni, F.; Alavi, S. (2006). Influence of mixing temperature on xanthan conformation and interaction of xanthan–guar gum in dilute aqueous solutions. *Food Research International*, 39, 964–973.
- Khondkar, D.; Tester, R. F.; Hudson, N.; Karkalas, J.; Morrow, J. (2007). Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinised waxy maize starch with pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 21, 1296–1301.

- Lucyszyn, N.; Quoirin, M.; Koehler, H. S.; Reicher, F.; Sierakowski, M. R. (2006). Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 107, 358–364.
- Lubbers, S.; Decourcelle, N.; Vallet, N.; Guichard, E. (2004). Flavor Release and Rheology Behavior of Strawberry Fatfree Stirred Yogurt during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3077-3082.
- Lagarrigue, S.; Alvarez, G. (2001). The rheology of starch dispersions at high temperatures and high shear rates. *Journal of Food Engineering*, 50, 189-202.
- Labuza, T.; Roe, K.; Payne, C.; Panda, F.; Labuza, T. J.; Labuza, P. S.; Krusch, L. (2004). Storage stability of dry food systems: influence of state changes during drying and storage. *Drying 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium*, A, pp. 48-68.
- Labuza, T.P. (1980). The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology*, 34 (4), 36-41.59.
- Labuza, T. P. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 2, 355-405.
- Lagarrigue, S.; Alvarez, G. (2001). The rheology of starch dispersions at high temperatures and high shear rates: a review. *Journal of Food Engineering*, 50, 189-202.
- Lagoudaki, M.; Demertzis, P. G. (1993). Equilibrium moisture characteristics of foods – hysteresis effects and isotherm models. *Lebensmittel-Technologie*, 26, 71-77.
- Lemus, R. A.; Perez,M.; Andre, A.; Roco, T.; Tello, C. M.; Vega, A. (2008). Kinetic study of dehydration and desorption isotherms of red alga *Gracilaria*. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1592-1599.

Mahammad, S.; Prud'homme, R. K.; Roberts, G. W.; Khan, S. A. (2006). Kinetics of Enzymatic Depolymerization of Guar Galactomannan. *Biomacromolecules*, 7, 2583-2590.

Mahammad, S.; Comfort, D. A.; Kelly, R. M.; Khan, S. A. (2007). Rheological Properties of Guar Galactomannan Solutions during Hydrolysis with Galactomannanase and β -Galactosidase Enzyme Mixtures. *Biomacromolecules*, 8, 949-956.

Monteiro, S. R.; Tavares, C.; Evtuguin, D. V.; Moreno, N.; Lopes da Silva, J. A. (2005). Influence of Galactomannans with Different Molecular Weights on the Gelation of Whey Proteins at Neutral pH. *Biomacromolecules*, 6, 3291-3299.

Nuñez-Santiago, M. C.; Tecante, A. (2007). Rheological and calorimetric study of the sol-gel transition of k-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 69, 763-773.

Nurul, I.; Azzerri, B. M. N.; Manan, D. M. A. (1999). Rheological behavior of sago (*Metroxylon sagu*) starch paste. *Food Chemistry*, 64, 501-505.

Pai, V. B.; Khan, S. A. (2002). Gelation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. *Carbohydrate Polymers*, 49, 207-216.

Pai, V.; Srinivasarao, M.; Khan, S. A. (2002). Evolution of Microstructure and Rheology in Mixed Polysaccharide Systems. *Macromolecules*, 35, 1699-1707.

Phan, T. D.; Debeaufort, F.; Luu, D.; Voilley, A. (2005). Functional Properties of Edible Agar-Based and Starch-Based Films for Food Quality Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 973-981.

Prior, B. A.; Kenyon, C. P.; Van Der Veen, M.; Mildenhall, J. P. (1987). Water relationships in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, 62, 119-128.

- Rinaudo, M. (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, 15, 433-440.
- Rogers, M. A.; Roos, Y. H.; Goff, H.D. (2006). Structural heterogeneity and its effect on the glass transition in sucrose solutions containing protein and polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, 20, 774–779.
- Roder, N.; Gerard, C.; Verel, A.; Bogracheva, T. Y.; Hedley, C. L.; Ellis, P. R.; Butterworth, P. J. (2009). Factors affecting the action of α-amylase on wheat starch: Effects of water availability. An enzymic and structural study. *Food Chemistry* 113, 471–478.
- Rosso, L.; Robinson, T. P. (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 265-273.
- Sato, A. C. K.; Cunha, R. L. (2007). Influência da temperatura no comportamento reológico da polpa de jabuticaba. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 24, 4, 879-884.
- Sinigaglia, I.; Corbo, M. R.; Altieri, C.; Massa, S. (2002). Response surface model for effects temperature, water activity and pH on germination of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Safety*, 22, 121-134.
- Sudhamani, S. R.; Raj, A. E.; Raj, B.; Prasad, M. S. (2005). Moisture Sorption Characteristics of Microbially Produced Polysaccharide and Polyvinyl Alcohol Blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 13, 3, 253-260.
- Sandoval, A. J.; Barreiro, J. A.; Tovar, X.; Angueira, M. (2002). Sorption characteristics of fermented cocoa powder (*Theobroma cacao*). *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia*, 25, 1, 1-7.
- Sozer, N. (2009). Rheological properties of rice pasta dough supplemented with proteins and gums. *Food Hydrocolloids*, 23, 849–855.

- Smith, D. S.; Mannheim, C. H.; Gilbert, S.G. (1981). Water sorption isotherms of sucrose and glucose by inverse gas chromatography. *Journal of Food Science*, 46, 1051-1053.
- Smith, S. (1947). The sorption of water vapor by high polymers. *Journal of American Chemical Society*, 69, 646.
- Steffe, J. F. (1992). *Rheological methods in food process engineering*. Michigan: Freeman Press, pp.17-27.
- Tayal, A.; Khan, S. A. (2000). Degradation of a Water-Soluble Polymer: Molecular Weight Changes and Chain Scission Characteristics. *Macromolecules*, 33 (26), 9488-9493.
- Timmermann, E. O.; Chirife, J.; Iglesias, H. A. (2001). Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? *Journal of Food Engineering*, 48, 19-31.
- Viturawong, Y.; Achayuthakan, P.; Suphantharika, M. (2008). Gelatinization and rheological properties of rice starch/xanthan mixtures: Effects of molecular weight of xanthan and different salts. *Food Chemistry*, 111, 106–114.
- Zhou, Y.; Wang, D.; Zhang, L.; Du, X.; Zhou, X. (2008). Effect of polysaccharides on gelatinization and retrogradation of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 22, 505–512.

Capítulo 4

Bioensaios de filmes produzidos a partir de blenda galactomanana-amido-nisinina contra microorganismos modelos.

Sumário	Página
Resumo	226
Abstract	227
4.1. Introdução	228
4.1.1. Filmes comestíveis bioativos	229
4.1.2. Bioensaios	233
4.2. Hipótese e objetivos	236
4.3. Materiais e métodos	237
4.3.1. Reagentes	237
4.3.2. Preparo das soluções de antimicrobianos e formadoras de filmes bioativos	237
4.3.3. Preparo dos meios de cultura e condições de crescimento das células dos microorganismos	238
4.3.4. Teste do halo de inibição de microorganismos	238
4.3.5. Bioensaios dos filmes comestíveis contra <i>Lysteria monocitogenes</i>	239
4.3.6. Análise estatística	239
4.4. Resultados e discussão	240
4.4.1. Teste do halo de inibição	240
4.4.2. Bioensaios	243
4.5. Conclusões	249
4.6. Referências	250

Resumo

Neste capítulo foi avaliada a ação antimicrobiana de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina. Foram empregados o teste do halo de inibição em placas de ágar e o bioensaio. A ação da nisina analisada através do teste do halo de inibição mostrou que o antimicrobiano foi efetivo contra microorganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* e *Lysteria monocitogenes*). A presença de nisina nos filmes comestíveis testados no bioensaio reduziu significativamente o crescimento de *L. monocitogenes* de maneira dose dependente e em função do tempo ($p < 0,05$). O teste do halo de inibição e o bioensaio permitiram caracterizar os filmes comestíveis através do uso de técnicas satisfatórias. Além disso, pode-se afirmar que o antimicrobiano atuou como barreira efetiva contra a proliferação do patógeno de alimentos *L. monocitogenes* nas condições experimentais testadas.

Palavras-chave: galactomananas, amido de milho, nisina, *Lysteria monocitogenes*

Abstract

In this chapter, the antimicrobial action of edible films made of galactomannan-starch-nisin blend was evaluated. Two strategies were employed: inhibition based on diffusion in agar and bioassay. The nisin action analyzed through the agar diffusion showed that the antimicrobial was effective against Gram positive microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Lysteria monocitogenes*). On the bioassay, the presence of nisin in edible films reduced *L. monocitogenes* growth. Statistical differences ($p < 0,05$) were found among the treatments and the effect was doses-dependent. The inhibition detected on agar diffusion and the bioassay permitted characterize the edible films using satisfactory techniques. In fact, the nisin added to edible films acted as an efficient barrier against the pathogen growth.

Keywords: galactomannans, corn starch, nisin, *Lysteria monocitogenes*

4.1. Introdução

A qualidade dos alimentos depende de mudanças físicas, químicas e biológicas que ocorrem naturalmente. Dentre as abordagens utilizadas para minimizar esses efeitos, o uso de embalagens ativas tem grande impacto (AYDINLI; TUTAS, 2000). Entretanto, o excessivo emprego de materiais plásticos não biodegradáveis para confeccionar embalagens dos produtos disponibilizados nos modernos supermercados cria problemas associados ao desperdício e danos ao meio ambiente.

Recentemente, o desenvolvimento de filmes comestíveis tem contribuído para aumentar o tempo de preservação de produtos alimentícios. Essa tecnologia de novos materiais permite que sejam incorporados aditivos ou preservativos que são funcionais de várias formas (BILIADERIS *et al.* 1999; BARRETO *et al.* 2003). A demanda por alimentos que apresentam suas propriedades naturais preservadas instiga a pesquisa e o desenvolvimento de bio-preservativos que possam ser adicionados aos alimentos e consumidos sem qualquer risco aos consumidores.

A necessidade por materiais para confecção de embalagens ecologicamente sustentáveis aumentou de forma impressionante. A disponibilidade desses biomateriais, especialmente por biopolímeros para produção de filmes e coberturas comestíveis é intensivamente estudada (ANN BALL, 1997; ARVANITOYANNIS; BILIADERIS, 1999; ALBERT; MITTAL, 2002). Polímeros naturais típicos utilizados na produção de filmes comestíveis são proteínas e polissacarídeos (ARVANITOYANNIS *et al.* 1997; ARVANITOYANNIS *et al.* 1998a; ARVANITOYANNIS *et al.* 1998b; KAYA; KAYA, 2000; BATISTA *et al.* 2005). A principal vantagem do uso de polímeros naturais é que eles em geral são biodegradáveis e também são fontes renováveis, o que poderia reduzir os danos ambientais. Contudo, as embalagens sintéticas não serão completamente substituídas pelos biomateriais, porque aquelas apresentam as melhores propriedades mecânicas.

A função de uma embalagem de alimentos é preservar o produto ao longo do transporte desde a colheita ao mercado e o consumidor. Para cumprir essa finalidade uma embalagem deve proteger seu conteúdo do efeito ambiental exterior. Os produtos

alimentícios podem ser danificados por ação dos efeitos da água, gases, luz, odor ou proliferação de microorganismos a menos que uma embalagem apropriada seja utilizada (AYRANCI; TUNC, 2003).

Os filmes comestíveis podem ser usados como agentes transportadores de antimicrobianos ou substâncias funcionais tais como aditivos, componentes do aroma ou corantes (SECOUARD *et al.* 2007; OMS-OLIU *et al.* 2008). Filmes comestíveis com substâncias antimicrobianas encapsuladas podem retardar o crescimento de microorganismos sobre a superfície do alimento.

4.1.1. Filmes comestíveis bioativos

Um filme comestível pode ser definido como uma fina camada de material que é aplicada sobre ou dentro de um alimento, pode ser consumida e atua como barreira contra transmissão de gases, vapores, solutos e ainda fornece proteção mecânica (THUMULA, 2006; TALJA, 2007; CASARIEGO *et al.* 2008).

A aplicação de filmes comestíveis é uma estratégia que permite aumentar o tempo de prateleira de alimentos através da redução de seus processos metabólicos (BRIGATO-FONTES, 2005). Com o advento de novos materiais para uso como filmes ou coberturas comestíveis e a demanda do consumidor por produtos mais frescos, pesquisas sobre atmosfera modificada pelos biofilmes vem se popularizando (GROSS; KALRA, 2002; CERQUEIRA *et al.* 2007; CERQUEIRA *et al.* 2009).

A tecnologia de embalagens ativas (Figura 4.1) é um conceito relativamente novo criado para relacionar a interação do alimento com o material da embalagem, enquanto sustenta o microambiente em seu interior (FLORES *et al.* 2007a). O objetivo é estender o tempo de prateleira de um produto alimentício, preservando suas propriedades nutricionais e qualidades sensoriais, bem como mantendo sua segurança microbiológica (DURANGO *et al.* 2006).

Sem dúvida que a principal causa da deterioração de alimentos é o crescimento microbiano sobre a superfície do produto (HAMMOND, 2001). A aplicação de agentes antimicrobianos numa embalagem pode criar um ambiente em seu interior que pode reduzir ou prevenir o crescimento microbiano sobre a superfície do produto (Figura 4.1), desse modo, levando a extensão do tempo de prateleira ou melhorando a segurança alimentar (AVHENAINEN, 2003).

Muitos fatores devem ser considerados no desenvolvimento de um sistema de embalagem contendo antimicrobiano tais como natureza do agente antimicrobiano, métodos de incorporação, permeabilidade e evaporação (QUINTAVALLA; VINCINI, 2002). Fatores extras incluem atividade específica, resistência do microorganismo, liberação controlada, mecanismo de liberação, natureza química do alimento e do antimicrobiano, condições de distribuição e de armazenamento, condições do processo

de elaboração do filme, propriedades mecânicas e físicas dos materiais utilizados no preparo dos filmes, características organolépticas, toxicidade do antimicrobiano e as normas vigentes de saúde pública (AVHENAINEN, 2003; THUMULA, 2006).

Um agente antimicrobiano possui atividade inibitória específica contra um microorganismo. Entretanto, a seleção desse agente depende de sua atividade contra o microorganismo alvo. Devido as características próprias do alimento, pH, atividade de água, composição e temperatura de armazenamento, o crescimento de microorganismos que podem estragar produtos alimentícios é previsível. O agente antimicrobiano deve ser selecionado pela atividade de inibição do agente contra o microorganismo nas condições ambientais da embalagem que envolve o alimento (KRISTO *et al.* 2008).

O desenvolvimento do sistema de embalagem ativa requer tecnologia de liberação e a cinética de crescimento do patógeno. Quando a taxa de migração do agente antimicrobiano é mais rápida que a taxa de crescimento do microorganismo alvo, o agente antimicrobiano se esgotará antes que se complete o período esperado de armazenamento e a embalagem perderá a atividade antimicrobiana, porque o alimento possui um volume maior quando comparado ao volume ocupado pela embalagem e a quantidade de agente antimicrobiano incorporado (OUATTARA *et al.* 2000; FLORES *et al.* 2007b). Como estratégia de sobrevivência, o microorganismo iniciará seu crescimento após o esgotamento do agente antimicrobiano. Por outro lado, quando a taxa de liberação é extremamente lenta para controlar a proliferação do patógeno, o microorganismo poderá crescer antes de o agente antimicrobiano ser liberado e atingir uma concentração efetiva.

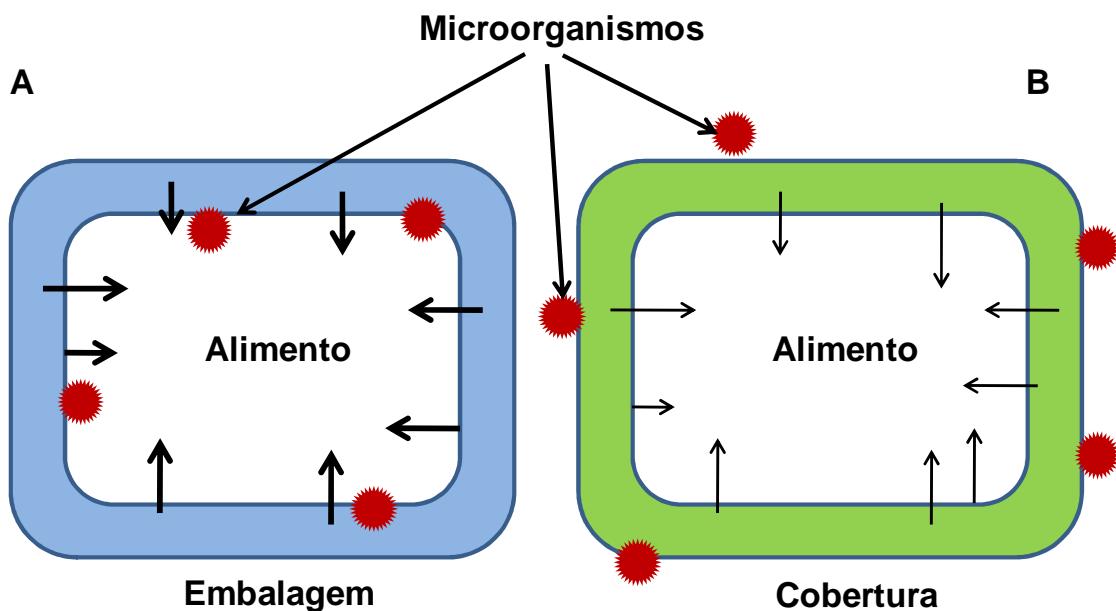


Figura 4.1 – Embalagem bioativa (A) contendo antimicrobiano incorporado e sistema de cobertura comestível (B) (Adaptada de HAN, 2003).

4.1.2. Bioensaios

O ensaio de difusão em ágar é provavelmente o método mais comumente empregado para detecção de atividade de bacteriocinas. Neste método um microorganismo sensível é inoculado no ágar ou plaqueado na superfície e a bacteriocina é colocada em poços perfurados no ágar (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004). Como podem ser visualizados na Figura 4.2, os resultados positivos do ensaio de difusão são detectados pela presença de zonas claras ao redor dos poços após incubação por 24 horas.

Métodos de determinação de atividade de bacteriocinas baseados em meio líquido têm sido propostos (CABO *et al.* 1999). Dessa maneira, a cepa indicadora também pode ser cultivada com a bacteriocina (ou com o filme bioativo contendo bacteriocina) em meio líquido. Métodos espectrofotométricos podem ser empregados e o resultado é medido através da leitura da absorbância ou ainda esse resultado pode ser expresso pela contagem de unidades formadoras de colônias após a incubação (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004). Contudo, essa metodologia também não reflete uma situação prática para os alimentos que são sólidos ou semi-sólidos. Um filme contendo bacteriocina, vantajosamente, poderia moldar-se a superfície desse tipo de alimento.

Técnicas de difusão de bacteriocinas em ágar para detecção de zonas de inibição do crescimento possuem como principal vantagem a simplicidade do protocolo, pois seu princípio é similar ao de um antibiograma típico. Além disso, os custos associados à implantação da técnica e seu uso rotineiro são baixos quando comparados a outros métodos. Como desvantagens existem os problemas associados à difusão da bacteriocina em ágar (HIRSCH, 1950) e o uso de um critério de quantificação que na maioria das vezes é apenas semi-quantitativo e condicionado a interpretações subjetivas.

Como soluções para esses problemas do ensaio baseado em ágar, temos: melhoria da difusão através da adição de detergentes tais como o Tween ao meio de cultura (WOLF; GIBBONS, 1996) ou por meio da armazenagem das placas a 4 °C por um período variável de tempo antes da incubação do microorganismo sensível. Wolf e Gibbons (1996) provaram que a redução da proporção de ágar do nível convencional de

1,5 % para 0,75% poderia aumentar a sensibilidade em 21 %. Para minimizar o erro da quantificação das zonas de inibição, o uso de tratamento de imagem por meio de programa de computador permite padronizar essa medição.

Quando se trabalha com filmes comestíveis contendo bacteriocinas, diferentes estratégias de inoculação do microorganismo podem ser empregadas a fim de avaliar a difusão do antimicrobiano do filme para o meio. Recentemente, a difusão da nisina em géis de agarose foi estudada e o comportamento foi modelado de acordo com a segunda Lei de Fick (SEBTI *et al.* 2004).

A inibição do crescimento pela liberação de bacteriocinas de filmes bioativos é avaliada pela contagem de UFCs após incubação. O inóculo pode ser plaqueado diretamente sobre o ágar e o filme é então colocado sobre o ágar (SEBTI; COMA, 2002; KRISTO *et al.* 2008), o inóculo pode ser plaqueado sobre o filme comestível ou ainda o inóculo pode ser filtrado e retido em membranas e os filmes podem ser dispostos sobre essas membranas. Essa última foi a estratégia empregada neste capítulo¹ para avaliar a ação da nisina liberada dos filmes bioativos.

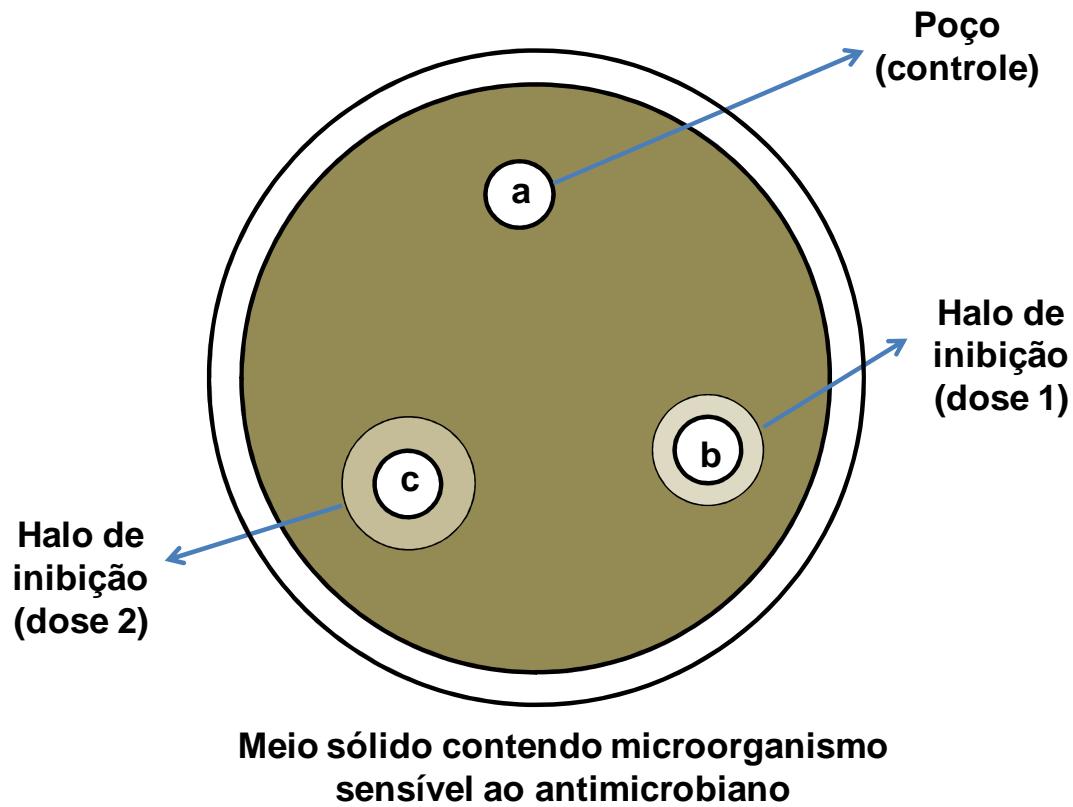


Figura 4.2 – Representação do teste do halo de inibição em placa de Petri para estudo da ação de bacteriocinas. Em a temos o poço controle, em b temos a dose 1 que é maior que a dose 2 (em c). O halo formado é proporcional a concentração da dose.

4.2. Hipótese e objetivos

4.2.1. Hipótese: filmes comestíveis produzidos com a blenda galactomanana-amidonisia apresentam efeito antimicrobiano contra a bactéria patogênica de alimentos *Lysteria monocitogenes*?

4.2.2. Objetivo geral

Producir filmes comestíveis bioativos a partir da blenda galactomanana-amidonisia e realizar bioensaios contra *L. monocitogenes*.

4.2.3. Objetivos específicos:

- Definir a(s) concentração(ões) de nisina a ser(em) utilizada(s) nos filmes comestíveis;
- Realizar o teste do halo de inibição em placas;
- Produzir filmes comestíveis a partir da blenda galactomanana-amido contendo nisina;
- Realizar bioensaios dos filmes comestíveis contra *L. monocitogenes*.

4.3. Materiais e métodos

4.3.1. Reagentes

Glicerol, ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio monobásico e fosfato ácido de sódio foram adquiridos junto à empresa Panreac, Barcelona, Espanha. Amido de milho rico em amilose (*high amylose corn starch*) foi comprado junto à empresa Sigma Corporation nos E.U.A.

Nisin (nisin NP, bath 148/149) e NisaplinTM foram preparados em estoques de 1 mg.mL⁻¹ em água ultra pura (grau Milliq; pH=2,0; ajustado com HCl), filtrados (0,2 µm) e estocados a -20 °C.

Meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) e ágar bacteriológico foram comprados junto à empresa Liofilchem s.r.l., Itália.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.3.2. Preparo das soluções de antimicrobianos e formadoras de filmes bioativos

Nisin nas concentrações de 0,08, 0,25 e 0,5 mg.mL⁻¹ foi preparada em distintos diluentes (H₂O pH = 2,0; tampão citrato 50mM, pH = 5,0, ajustado com HCl e tampão fosfato, 50 mM, pH = 7,0). NisaplinTM (preparado em H₂O pH = 2,0) foi utilizado como controle positivo e na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. Água ultrapura (grau Milli-Q, pH = 2,0) foi utilizada como controle negativo.

As misturas formadoras de filmes foram preparadas para os experimentos do bioensaio contra microrganismos de acordo com o protocolo descrito no capítulo 3 desta Tese. Água destilada usada para dissolver as galactomananas foi substituída por tampão. Quando da realização dos bioensaios, os filmes comestíveis contendo tampão citrato e o antimicrobiano nisin nas concentrações de 0,1 e 0,25 mg.mL⁻¹ foram utilizados em virtude do resultado do teste do halo de inibição.

4.3.3. Preparo dos meios de cultura e condições de crescimento das células dos microorganismos

Para o teste do halo de inibição, culturas estoques (todas em glicerol, 1:1, v/v, armazenadas -20 °C) de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* foram crescidas em meio líquido TSY enquanto *Lysteria monocitogenes* em meio BHI. As culturas foram mantidas sob agitação contínua (200 rpm) e temperatura controlada (37 °C) por 12 – 14 horas. Decorrido o tempo de incubação, 3–4 mL da cultura foram transferidos para Erlenmeyer's contendo 150–200 mL de meio novo e estéril. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições citadas acima até alcançar a densidade de células desejada (OD = 1,0).

Para o bioensaio, células de *L. monocitogenes* (estoques em glicerol, 1:1, v/v, armazenadas -20 °C) cresceram em meio líquido BHI sob agitação contínua (200 rpm) e temperatura controlada (37 °C) por cerca de 14 horas. Transcorrido o tempo de incubação, 10–12 mL da cultura foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 500–600 mL de meio novo e estéril e a nova cultura foi mantida sob as mesmas condições citadas acima até alcançar a densidade de células desejada.

4.3.4. Teste do halo de inibição de microorganismos

Decorrido o tempo de incubação das culturas em meio líquido, 10 a 25 mL dessas culturas foram transferidos para os meios TSA e BHA antes de solidificarem, respectivamente, a fim de incorporar os microrganismos aos meios. O meio (20 mL) foi distribuído em placas de Petri descartáveis. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C até o crescimento das células (24 horas).

Em atmosfera estéril (sobre um bico chama), seis poços de 0,5 cm de diâmetro foram perfurados no ágar das placas de modo equidistante a fim de abrigar distintos tratamentos para se determinar a concentração do antimicrobiano a ser incorporada aos filmes bem como comparar com os devidos controles negativo (água ultra pura, pH=2,0 ajustada com HCl e tampões 50mM citrato pH=5,0 e fosfato pH=7,0) e positivo

(nisaplinTM 1 mg.mL⁻¹). As placas foram mantidas a 4 °C por duas horas a fim de assegurar a difusão do antimicrobiano e posteriormente foram transferidas para e mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas. A inibição do crescimento foi mensurada por meio da medida precisa do halo formado ao redor do poço (em cm), considerando o diâmetro do poço.

4.3.5. Bioensaios dos filmes comestíveis contra *Lysteria monocitogenes*

Dez mililitros de cultura de *L. monocitogenes* foram filtrados através de membranas de nitrato de celulose com diâmetro de 47 mm e poro de 0,2 µm (Sartorius AG 37070 Goetting, Alemanha) para reter as células. Essas membranas foram colocadas em placas de Petri e divididas em grupos de tratamentos. Os tratamentos consistiram de: membranas sem filmes, filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0, filmes preparados com tampão citrato (50mM, pH 5,0) e filmes contendo nisina em distintas concentrações (0,1 e 0,25 mg/mL). Os filmes foram colocados em contato com essas membranas e os tratamentos foram mantidos a 25 °C durante 0, 24 e 48 horas. Decorrido o tempo de exposição aos filmes, as membranas foram removidas e acondicionadas em bolsas de estomaquer contendo 10 mL de solução salina 0,8 % estéril. Essas bolsas foram esmagadas por 1 minuto para remover as células que permaneceram nas membranas decorrido o tempo de exposição aos filmes. Cem microlitros dessa solução salina serviram de inóculo para placas com meio de cultura BHA. O efeito da nisina foi quantificado através da inibição do número de unidades formadoras de colônias (ufc) do microrganismo modelo ao longo do tempo.

4.3.6. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) foi empregada para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. Anova e o teste de comparação de médias foram empregados (Teste de Tukey, p < 0,05) utilizando o pacote estatístico Sigma StatTM.

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. Teste do halo de inibição de microorganismos

O teste do halo de inibição foi empregado visando dois objetivos. O primeiro foi estabelecer a concentração de trabalho com o antimicrobiano (nisina) para produzir filmes comestíveis bioativos. O segundo objetivo foi realizar um comparativo com distintos tampões para avaliar a efetividade e especificidade do lote de nisina empregado nos testes.

Na Tabela 4.1 são mostrados os valores medidos para o halo de inibição formado ao redor dos poços em placas de ágar contendo microorganismos. Foi possível observar que a nisina testada em todas as concentrações e com distintos solventes foi efetiva especificamente contra os microorganismos Gram-positivos (*L. monocitogenes* e *Staphylococcus aureus*), inibindo a formação de colônias ao redor dos poços. Para *L. monocitogenes* o efeito observado foi de forma dose dependente (Tabela 1). A ação do antimicrobiano puro evidentemente foi melhor que aquela do preparado comercial utilizado como controle positivo (nisaplinTM).

Artefatos foram observados nesse experimento com a presença de halos para o tratamento da água ultrapura apenas (visualizados em *Lysteria* e *Salmonella*). A água utilizada para diluir a nisina era de elevada concentração de H₃O⁺ (pH = 2,0) o que poderia explicar essa mortalidade das células. Contudo, isso não interferiu de maneira significativa nos resultados com outros tratamentos, pois a presença de halos não foi verificada para os tampões. Ademais, os tamanhos dos halos medidos para *Lysteria* e *Staphylococcus* foram similares entre todos os tratamentos o que é indicativo da ação da nisina apenas sem sofrer intensificação de efeito pela água de baixo pH.

A mais baixa dose do antimicrobiano (0,08 mg/mL) sem qualquer solvente não foi efetiva contra células de *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, nas maiores doses (0,25 e 0,50 mg/mL), a nisina testada foi efetiva contra *S. aureus* de forma praticamente idêntica ao controle positivo.

Foi relatado na literatura que as bacteriocinas inibem o crescimento de um grande número de microorganismos Gram-positivos e neste grupo inclui-se *L. monocitogenes*, um importante patógeno de alimentos (DEEGAN *et al.* 2006). A nisinina, por exemplo, é utilizada predominantemente em comida enlatada e laticínios, além disso, é especialmente efetiva quando utilizada na produção de queijo processado e requeijão onde os protege contra microorganismos produtores de esporos resistentes ao calor tais como aqueles que pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*.

Com as células Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella*) o antimicrobiano não apresentou qualquer efeito. A exceção foram os halos medidos para os tratamentos da nisinina em água com células de *Salmonella* que provavelmente consistiram de artefatos. A inibição provavelmente pode ser atribuída a ação da água ultrapura de baixo pH e não da bacteriocina.

O teste do halo de inibição é também uma das técnicas mais amplamente utilizadas para determinação de bacteriocinas. O princípio desse teste é semelhante aquele do antibiograma uma vez que zonas de inibição de crescimento em placas são o indicativo da ação da bacteriocina. Duas das principais razões para sua popularidade são, sem dúvida, o baixo custo aliado à simplicidade da técnica.

Alguns inconvenientes do método estão associados à difusão das bacteriocinas em ágar. Para resolver esse problema, alguns detergentes tais como Tween são freqüentemente adicionados ao meio de cultura. Outra alternativa para melhorar a difusão é armazenar as placas a 4 °C por um variável período de tempo antes da incubação dos microorganismos sensíveis (CABO *et al.* 1999).

Os efeitos do pH sobre a solubilidade, estabilidade e atividade biológica das bacteriocinas são peculiares a molécula em questão. No caso da nisinina, sua inativação é verificada em pH alcalino o que provoca reações intramoleculares envolvendo grupos hidroxil (ROSE *et al.* 2003). Contudo, os valores de pH críticos são incertos. Hurst (1981) sustenta que a inativação ocorre em pH = 7,0, enquanto que Liu e Hansen (1990) verificaram que os valores estão situados acima de 8,0. Além disso, a solubilidade da nisinina em água (um fator que provavelmente afeta seu modo de ação) diminui exponencialmente de 57 para 1,5 g/L com um aumento do pH de 2,0 para 6,0 (LIU; HANSEN; 1990).

Tabela 4.1 – Diâmetro da zona de inibição de crescimento (em cm) determinado no bioensaio com diferentes microorganismos em distintas condições de preparo do antimicrobiano nisina.

Tratamentos	Microorganismos modelos															
	<i>Lysteria</i>				<i>Staphylococcus</i>				<i>E.coli</i>				<i>Salmonella</i>			
Nisina (mg/mL)	(-)	0,5	0,25	0,08	(-)	0,5	0,25	0,08	(-)	0,5	0,25	0,08	(-)	0,5	0,25	0,08
H ₂ O	0,6	1,2	1,0	0,6	-	0,8	0,8	-	-	-	-	-	-	0,8	0,8	0,6
Fosfato	-	1,1	1,0	0,9	-	0,8	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	1,2	1,0	0,8	-	0,8	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nisaplin™ (1 mg/mL)	0,6				0,8				-				-			

4.4.2. Bioensaio dos filmes produzidos contra *Lysteria monocitogenes*

Os resultados do bioensaio contra o microorganismo *Lysteria monocitogenes* são mostrados nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5. As propriedades antimicrobianas dos filmes comestíveis foram analisadas pela observação da inibição de crescimento bacteriano na interface filme/superfície após o tempo de incubação. Os resultados desse experimento mostraram que o filme da blenda galactomanana-amido 7,0-3,0 (controle) não apresentou qualquer efeito inibitório de crescimento sobre a interface filme/filtro (Figuras 4.3 e 4.4, tempos 0, 24 e 48 horas). A diminuição do logaritmo do número de colônias mostrou-se de forma linear em função do tempo ($R^2 = 0,950$), entretanto, não mostrou ser significativa quando comparada, de maneira geral, aos demais tratamentos controles (filtros e filmes com tampão citrato). Isso mostra que nem a galactomanana muito menos o amido gelatinizado possuem qualquer propriedade bactericida ou bacteriostática sobre *L. monocitogenes*.

Os filtros de acetato de celulose não constituem um meio adequado para propiciar o desenvolvimento dos microorganismos o que foi obviamente comprovado pelo número de colônias contadas ao longo do tempo (Figuras 4.3 e 4.4). O logaritmo desse número decresceu de 2,30 para 1,26 depois de 24 horas e de 1,26 para 0,74 decorridas 48 horas. Essa diminuição foi significativa, decorridas 24 horas, e pode ser ajustada igualmente como de forma linear quando o logaritmo do número de ufcs dos filtros de acetato é comparado aos dos filmes controles e demais tratamentos. O ajuste linear desses dados apresentou um adequado valor de coeficiente de correlação ($R^2 = 0,963$). As poucas células que resistiram fizeram uso de suas próprias reservas metabólicas e muito provavelmente de resquícios de meio de cultura retidos nos filtros.

O logaritmo do número de ufcs dos filmes comestíveis contendo citrato e nenhuma nisina também diminuiu em função do tempo e de forma linear ($R^2 = 0,998$, Figuras 4.3 e 4.4). A diminuição observada foi aproximadamente 1,5 vezes, decorridas 24 horas (de 2,31 para 1,53), e 3,6 vezes ao longo de 48 horas (de 2,31 para 0,65). Igualmente ao ocorrido com os tratamentos dos filmes controle e dos filtros, a diminuição do log ufc dos filmes contendo tampão citrato observada variou em função do tempo de exposição, mas isso não reflete qualquer propriedade antimicrobiana desses tratamentos.

Por outro lado, os filmes contendo nisina em ambas as concentrações testadas (0,1 e 0,25 mg/mL) diminuíram significativamente a densidade de células na interface filme/superfície ($p < 0,05$). O número de ufc's contadas para esses tratamentos mostrou clara inibição decorridas 24 e 48 horas (Figuras 4.3 e 4.4).

Comparando os filmes contendo tampão citrato e nisina 0,1 mg/mL em relação aos filmes controles depois de 24 horas de exposição (Figura 4.3), foi observado que a diferença no log ufc entre esses tratamentos foi 2,1 vezes (1,91 no controle e 0,92 no filme bioativo, Figura 4.3). Passadas 48 horas essa diferença foi da ordem de 5 vezes (1,01 no controle e 0,18 no filme). Para a concentração de 0,25 mg/mL (Figura 4.5) essa diferença foi marcante ao final de 48 horas com diminuição observada de 33 vezes quando comparados filmes controle e contendo nisina (log ufc igual a 1,01 no controle e 0,03 no filme, Figura 4.4). Vale salientar que o efeito bactericida da nisina foi linear e dose dependente o que pode ser evidenciado pelo número de ufc's ao longo de 24 e 48 quando comparamos os tratamentos das doses 0,1 e 0,25 mg/mL ($R^2 = 0,970$ e $0,997$, respectivamente). Esse efeito é mais bem visualizado decorrido 48 horas de tempo de exposição, pois o número de colônias contadas para o tratamento 0,25 mg/mL é significativamente menor que o número contado para o tratamento 0,1 mg/mL.

A incorporação de aditivos aos filmes comestíveis não é estratégia recente. Antioxidantes, antimicrobianos, corantes, flavorizantes, etc contribuem para modificar e melhorar filmes e coberturas comestíveis, consequentemente, mantendo a qualidade dos alimentos. Inúmeros são os exemplos dessas aplicações na literatura (OUATTARA *et al.*, 2000; LI *et al.* 2006; SANJURJO *et al.* 2006; FLORES *et al.*, 2007a). Sanjurjo *et al.* (2006) estudaram o efeito da nisina adicionada a filmes comestíveis feitos de amido de tapioca contendo glicerol como agente plastificante. O antimicrobiano foi efetivo contra *Lysteria innocua* sendo liberado de forma gradativa. O pH dos sistemas foi ajustado a 4,0 com solução de ácido cítrico (50 %, p/p).

Li *et al.* (2006) avaliaram o efeito do filme produzido com o complexo glucomanana-quitosana-nisina. A incorporação do antimicrobiano diminuiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocitogenes* e *Bacillus cereus*, no entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos do filme de glucomanana contendo nisina, do filme de quitosana ou do filme produzido com a blenda nisina-

quitosana-glucomanana. A nisina incorporada não somente melhorou a atividade antimicrobiana, mas também as propriedades físicas dos filmes glucomanana-quitosana.

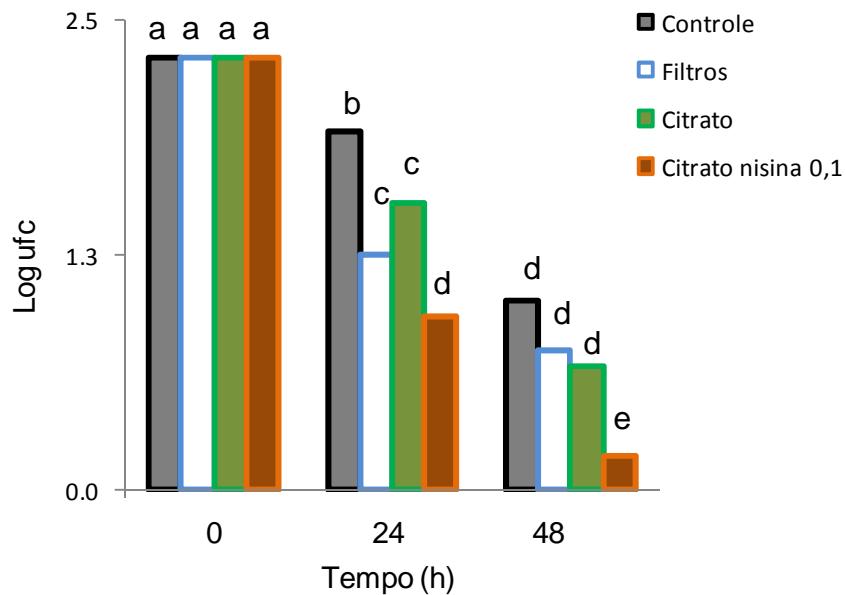


Figura 4.3 – Bioensaio de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina contra *Lysteria monocitogenes*. A concentração de nisina utilizada foi de 0,1 mg/mL. Os tratamentos do grupo de barras com a mesma letra indicam que não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$, Teste de Tukey).

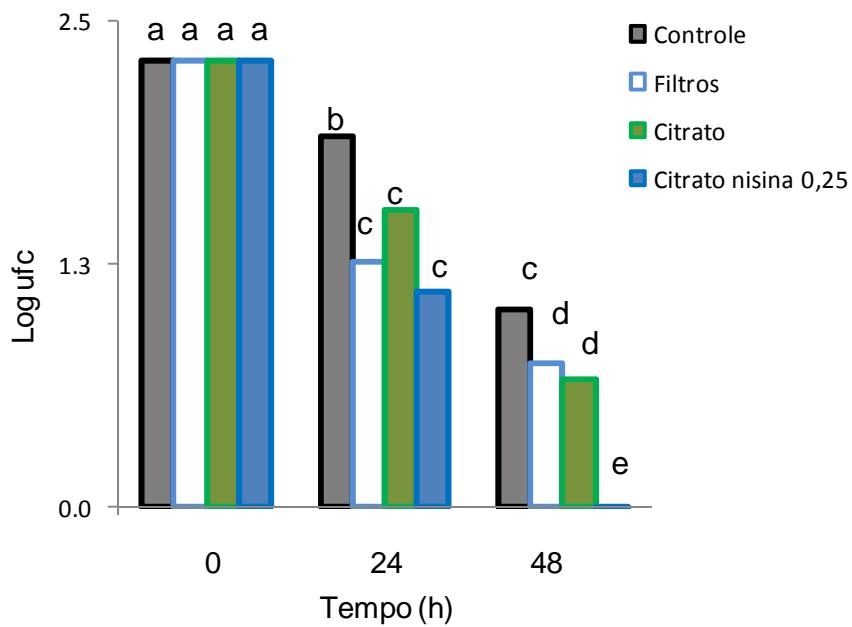


Figura 4.4 – Bioensaio de filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina contra *Lysteria monocitogenes*. A concentração de nisina utilizada foi de 0,25 mg/mL. Os tratamentos do grupo de barras com a mesma letra indicam que não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$, Teste de Tukey).

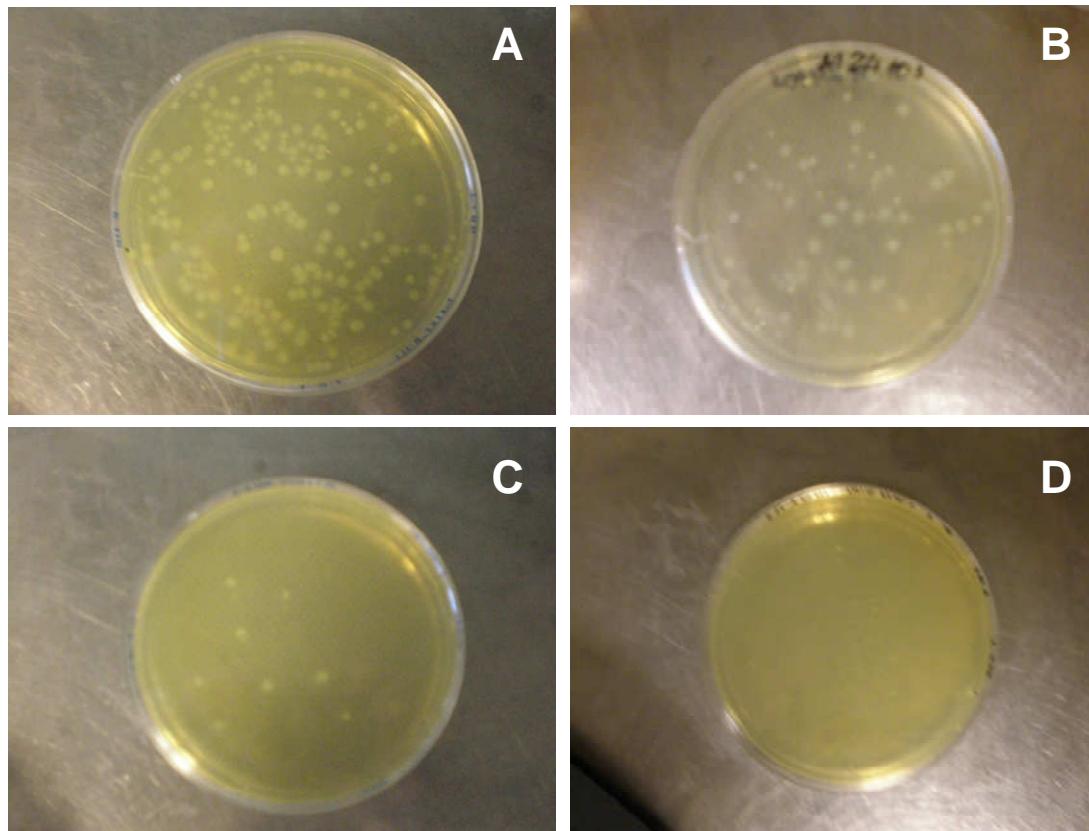


Figura 4.5 – Número de unidades formadoras de colônias visualizadas em placas de bioensaio dos filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina contra *Lysteria monocitogenes*. Em A é mostrada a placa do filme controle no tempo inicial (T0), em B a placa do filme contendo tampão citrato decorridas 24 horas de exposição (T24), em C a placa do filme contendo nisina 0,25 mg/mL (em tampão citrato) após 24 horas de exposição (TN24) e em D a placa do filme contendo nisina (em tampão citrato) na mesma concentração decorridas 48 horas (TN48).

4.5. Conclusões

A presença de nisina nos filmes comestíveis produzidos com a blenda galactomanana-amido e glicerol reduziu o crescimento de *L. monocitogenes*, diminuindo o número de unidades formadoras de colônias e atuando como barreira a contaminação para as condições experimentais testadas aqui.

O estudo da ação da nisina através do teste do halo de inibição e do bioensaio permitiu caracterizar os filmes comestíveis através do uso de técnicas satisfatórias. Finalmente, mais estudos devem ser conduzidos a fim de determinar se mudanças adicionais na composição ou na estrutura dos filmes (por exemplo, adição de óleo vegetal ou mistura de galactomanana ao amido antes da etapa de gelatinização) poderiam modificar a atividade antimicrobiana devido à inativação da nisina ou alterando sua liberação.

4.6. Referências

- Aydinli, M.; Tutas, M. (2000). Water Sorption and Water Vapour Permeability Properties of Polysaccharide (Locust Bean Gum) Based Edible Films. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 33, 63-67.
- Ann Ball, J. (1997). *Evaluation of Two Lipid-Based Edible Coatings For Their Ability to Preserve Post Harvest Quality of Green Bell Peppers*. Thesis, Virginia State University.
- Arvanitoyannis, I.; Biliaderis, C. G. (1999). Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate Polymers*, 38, 47–58.
- Albert, S.; Mittal, G. S. (2002). Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product. *Food Research International*, 35, 445–458.
- Arvanitoyannis, I.; Psomiadou, E.; Nakayama, A.; Aibab, S.; Yamamoto, N. (1997). Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Food Chemistry*, 60, 4, 593-604.
- Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A.; Aiba, S. (1998a). Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, 37, 371–382.
- Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A.; Aiba, S. (1998b). Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate Polymers*, 36, 105-119.

- Ayrancı, E.; Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423–431.
- Ahvenainen, R. (2003). *Novel food packaging techniques*. CRC Press, 1st Edition, England.
- Biliaderis, C. G.; Lazaridou, A.; Arvanitoyannis, I. (1999) Glass transition and physical properties of polyol-plasticised pullulan–starch blends at low moisture. *Carbohydrate Polymers*, 40, 29–47.
- Barreto, P.L.M.; Pires, A.T.N.; Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*, 79, 147–152.
- Batista, J. A.; Tanada-Palmu, P. S.; Grossó, C. R. F. (2005). Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 25, 4, 781-788.
- Brigato-Fontes, L. C. (2005). *Uso de solução conservadora e de películas comestíveis em maçãs da cultivar Royal gala minimamente processadas: efeito na fisiologia e na conservação*. Dissertação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- Cabo, M. L.; Murado, M. A.; González, M. P.; Pastoriza, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 907-914.
- Casariego, A.; Souza, B. W. S; Vicente, A. A.; Teixeira, J. A.; Cruz, L.; Diaz, R. (2008). Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocolloids*, 22, 1452–1459.

Cerqueira, M. A.; Lima, A. M.; Teixeira, J. A.; Vicente, A. A.; Moreira, R. A. (2007). Novel Functional Polysaccharides as Edible Coatings for Cheese. CIGR 2007, Section VI International Symposium on Food and Agricultural Products: Processing and Innovations, Naples, Italy.

Cerqueira, M. A.; Lima, A. M.; Souza, B. W. S.; Teixeira, J. A.; Moreira, R. A.; Vicente, A. A. (2009). Functional Polysaccharides as Edible Coatings for Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4, 1456-1462.

Deegan, L. H.; Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.

Durango, A.M.; Soares, N.F.F.; Andrade, N.J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17, 336–341.

Flores, S.; Fama, L.; Rojas, A.M.; Goyanes, S.; Gerschenson, L. (2007a). Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40, 257–265.

Flores, S.; Conte, A.; Campos, C.; Gerschenson, L.; Del Nobile, M. (2007b). Mass transport properties of tapioca-based active edible films. *Journal of Food Engineering*, 81, 580–586.

Gross, R. A.; Kalra, B. (2002). Biodegradable Polymers for the Environment. *Science*, 297, 803-807.

Hammond, M. D. (2001). *The use of chitosan to preserve and extend atlantic salmon quality*. Thesis, University of Massachusetts.

Han, J. H. (2003). Antimicrobial Food packaging. Chapter 4. In: Ahvenainen, R. (2003). *Novel food packaging techniques*. CRC Press, 1st Edition, England.

Hurst, A. (1981). Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27, 85-123.

Hirsch, A. (1950). The assay of the antibiotic nisin. *Journal of General Microbiology*, 4, 70-86.

Kaya, S.; Kaya, A. (2000). Microwave drying effects on properties of whey protein isolate edible films. *Journal of Food Engineering*, 43, 91-96.

Kristo, E.; Koutsoumanis, K. P.; Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373–386.

Liu, W.; Hansen, N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2551-2558.

Li, B.; Kennedy, J. F.; Peng, J. L.; Yie, X.; Xie, B.J. (2006). Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers*, 65, 4, 488-494.

Oms-Oliu, G.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 1, 87-94.

Ouattara, B.; Simard, R. E.; Piette, G.; Bégin, A.; Holley, R. A. (2000). Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, 65, 768-773.

Ouwehand; A. C.; Vesterlund, S. *Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria*. Chapter 11.(2004). In: Salminen, S.; von Wright, A.; Ouwehand, A. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc, USA.

Quintavalla, S.; Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373–380.

Rose, N. L.; Sporns, P.; Dodd, H. M.; Gasson, M. J.; Mellon, F. A.; McMullen, L. M. (2003). Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyline in the addition of glutathione to nisin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3174-3178.

Sanjurjo, K.; Flores, S.; Gerschenson, L.; Jagus, R. (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39, 749-754.

Secouard, S.; Grisel, M.; Malhiac, C. (2007). Flavour release study as a way to explain xanthan–galactomannan interactions. *Food Hydrocolloids*, 21, 1237–1244.

Sebti, I.; Blanc, D.; Carnet-Ripoche, A.; Saurel, R.; Coma, V. (2004). Experimental study and modeling of nisin diffusion in agarose gels. *Journal of Food Engineering*, 63, 185–190.

Sebti, I.; Coma, V. (2002). Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydrate Polymers*, 49, 139-142.

Talja, R. A. (2007). *Preparation and characterization of potato starch films plasticized with polyols*. Dissertation, University of Helsinki, Finland.

Thumula, P. (2006). *Studies on storage behaviour of tomatoes coated with chitosan-lyzozym films*. Thesis, McGill University, Quebec, Canadá.

Wolf, C. E.; Gibbons, W. R. (1996). Improved method for the determination of nisin. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 453-457.

Capítulo 5

Síntese geral acerca deste trabalho de Tese.

Sumário	Página
5.1. Síntese geral acerca deste trabalho de Tese	258
5.2. Referências	264

5.1. Síntese geral acerca do trabalho

Neste trabalho de Tese, filmes comestíveis foram produzidos a partir de blendas de galactomanana, amido de milho gelatinizado e nisina. Esses materiais foram caracterizados através de RMN, espectroscopia de IR, reologia, medida de atividade de água (a_w), DSC e análises microbiológicas.

No primeiro capítulo uma revisão de literatura sobre os materiais utilizados para produzir os filmes comestíveis foi apresentada. Além disso, igualmente foi apresentada revisão sobre as técnicas trabalhadas ao longo dos demais capítulos. A escolha e a elaboração dos materiais empregados para formar filmes comestíveis dependem de muitos parâmetros. Alguns destes são os custos, a disponibilidade das matérias-primas, as propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), as propriedades ópticas (cor e opacidade), a espessura, a permeabilidade ao vapor d'água e gases como o CO₂ e O₂, a solubilidade em água e as propriedades sensoriais (GENNADIOS, 2002; NUSSINOVITCH, 2003; STEPHEN, PHILLIPS ; WILLIAMS, 2006). Estas propriedades possuem dependência em relação à natureza do biopolímero (sua conformação, massa molecular, distribuição das cargas, polaridade, etc).

Vale destacar que as condições de produção dos filmes (pH, a concentração do polímero, tratamento térmico da solução, tipo e teor de aditivos, tais como plastificantes e antimicrobianos), bem como as condições ambientais (temperatura e umidade relativa), que são importantes devido à natureza higroscópica dos biopolímeros e dos aditivos utilizados, também influenciam as propriedades citadas acima (GENNADIOS, 2002; AHVENAINEN, 2003; NUSSINOVITCH, 2003).

As galactomananas consistem, em geral, de cadeias lineares de D-manoose unidas em ligação β -(1-4), com substituições de resíduos de D-galactose unidas por ligações glicosídicas α -(1-6) às unidades de D-manoose na cadeia linear (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). As propriedades físico-químicas e conformação de galactomananas são estreitamente relacionadas com a relação M/G e a distribuição de galactose ao longo da principal cadeia. A solubilidade em água é afetada pelo grau de substituição de galactose na principal cadeia (VANDAMME, DE BAETS; STEINBÜCHEL, 2002). Por exemplo, a galactomanana da goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) apresenta razão

M/G de 3,5 e baixa solubilidade em temperatura ambiente, quando comparado com a goma Guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.), cuja relação M/G é de, aproximadamente, de 1,8 (VANDAMME, DE BAETS ; STEINBÜCHEL, 2002).

No capítulo 2, galactomananas de alto grau pureza foram facilmente obtidas do endosperma de sementes de *Adenanthera pavonina* através de um processo de extração com água quente. Este procedimento permitiu um rendimento de 13%. A estrutura fina dessa goma endospérmica foi estudada através de técnicas de RMN. Sua razão M/G (=1,46) foi determinada e o valor obtido foi similar aquele reportado na literatura para galactomananas (ANDRADE *et al.*, 1999; EGOROV *et al.*, 2003; EGOROV *et al.*, 2004; AZERO; ANDRADE, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.* 2009a). O estudo de RMN sugere que o polissacarídeo possui uma estrutura que esta de acordo com outras estruturas de galactomananas descritas. Os resultados de IR corroboram os dados de RMN obtidos nesse trabalho. Finalmente, os resultados mostraram que essa galactomanana extraída e purificada exibe características que podem ser exploradas em escala comercial e numa série de aplicações da indústria de alimentos.

A galactomanana de *A.pavonina* apresentou comportamento reológico típico de gomas de sementes uma vez que soluções aquosas do polissacarídeo exibiram perfis similares aqueles reportados na literatura para galactomananas. Para a galactomanana aqui estudada, foi observado que aquela se comporta como um típico biopolímero macromolecular entrecruzado em solução. Foi observado que o módulo elástico G' dominou o módulo viscoso G'' nas altas freqüências. Um ponto de cruzamento dos módulos foi observado nas freqüências intermediárias e nas baixas freqüências ou em longos intervalos de relaxamento o módulo viscoso predominou. Em baixas concentrações, a solução de galactomanana apresentou o módulo viscoso G'' maior que o módulo elástico G' por todo o intervalo de freqüência testado. Como esses módulos são altamente dependentes da freqüência e nenhum ponto de cruzamento entre eles foi observado, é sugerido que nessas concentrações (0,3 a 0,8) a galactomanana comporta-se meramente como uma solução de polímero diluído.

Tais comportamentos reológicos observados provavelmente devem estar relacionados à massa molecular, ao grau de ramificação e a distribuição dos resíduos de

galactose na cadeia principal da goma endospérmica, daí requerendo altas concentrações para alcançar um grau significativo de interação/sobreposição entre as macromoléculas. Isto é consistente com o fato de esses fatores afetam o raio hidrodinâmico nas moléculas das galactomananas o que poderia causar essas mudanças na viscosidade (PAI; KHAN, 2002).

Por outro lado, o esforço aplicado nos testes de curvas de escoamento da dispersão de amido de milho gelatinizado e das misturas de galactomanana-amido não permitiu caracterizar adequadamente esses sistemas de polímeros em solução. Ambas as amostras, com e sem glicerol, não exibiram (ou foi muito pequeno para ser detectado) o *loop* típico de histerese em sistemas de suspensões de macromoléculas. Assim a área das curvas não pode ser utilizada para avaliação das amostras. Isto representa um comportamento totalmente distinto para o que foi recentemente relatado na literatura sobre misturas de amido e galactomananas, pois Achayuthakan e Suphantharika (2008), trabalhando com misturas de amido de milho *waxy* e galactomanana de guar e esse mesmo amido com goma xantana em baixa concentração (0,35%), detectaram tais *loops* de histerese.

Os ensaios oscilatórios, por sua vez, foram mais sensíveis para detectar as diferenças entre os distintos sistemas avaliados permitindo sua caracterização de maneira mais adequada. Na dispersão sem glicerol, os valores obtidos dos módulos G' e G'' indicam que a dispersão apresenta comportamento de solução de polímero diluído. Um fato importante observado foi que o valor da inclinação G''/ω da viscosidade dinâmica (μ) coincide com o valor da viscosidade aparente (η) obtido pela curva de escoamento na deformação $D > 150 \text{ s}^{-1}$. Por outro lado, na dispersão de amido com glicerol o aumento do número de pontes de hidrogênio pode ser traduzido na diminuição do expoente de relaxamento $|\eta|$ e um significativo aumento da resistência viscosa (o dobro, de 0,04 para 0,08 Pa.s) e elástica (quase 10 vezes mais que a dispersão sem glicerol). Este resultado é um indicativo da diminuição da aceleração na dispersão de amido com glicerol.

Na blenda galactomanana-amido, o papel desempenhado pelo glicerol é contrário ao do amido porque ao se interpor entre as cadeias de ambos os polissacarídeos reduz a densidade dos contatos polímero-polímero e o índice $|\eta|$

aumenta ao mesmo tempo em que a viscosidade dinâmica diminui porque o sistema contendo glicerol é mais fluido (se origina de uma dissolução com menor resistência ao escoamento). O espectro da blenda sem glicerol não foi mostrado, pois os pontos medidos para os módulos G' e G'' apresentaram elevado erro experimental.

A medida da a_w e a construção de isotermas de sorção consistiram em numa abordagem interessante para caracterizar filmes comestíveis produzidos a partir dos sistemas de blendas de polissacarídeos e do complexo galactomanana-amido-nisina. Diferenças significativas foram detectadas nesses filmes e permitiram relacionar o comportamento da água ao arranjo estrutural dos diferentes filmes comestíveis produzidos. A umidade foi observada como dependente de importantes parâmetros avaliados nos filmes, tais como a temperatura e o conteúdo de glicerol. O fenômeno da histerese foi evidenciado para os filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido. Finalmente, o modelo matemático de sorção descrito pela equação G.A.B. é sugerido como aquele que melhor representa os dados obtidos nas condições experimentais testadas aqui.

Propriedades físicas dos filmes de galactomanana de *A. pavonina* foram determinadas tais como opacidade, medida do ângulo de contato, permeabilidade ao vapor de água, ao CO₂ e ao O₂, força tênsil e elongação (CERQUEIRA *et al.* 2009b; CERQUEIRA *et al.* 2009, *no prelo*). Os filmes comestíveis de galactomanana foram produzidos com a finalidade de recobrir queijos e foi observado que a presença do recobrimento reduziu o crescimento extensivo de fungos quando comparado ao queijo não recoberto (CERQUEIRA *et al.* 2009b).

As curvas de estabilidade térmica obtidas por DSCl para a galactomanana e os filmes comestíveis, produzidos sem o antimicrobiano e contendo a nisina, permitiram associar os dados de DSC aos obtidos pelas medias de a_w , corroborando, no caso do filme contendo nisina, que o antimicrobiano, de fato, colabora com uma maior hidratação do filme comestível.

No capítulo 4, a presença de nisina nos filmes comestíveis produzidos com a blenda galactomanana-amido e glicerol reduziu o crescimento de *L. monocitogenes*,

diminuindo o número de unidades formadoras de colônias e atuando como barreira a contaminação para as condições experimentais testadas aqui.

O estudo da ação da nisina através do teste do halo de inibição e do bioensaio permitiu caracterizar os filmes comestíveis através do uso de técnicas satisfatórias. Finalmente, mais estudos devem ser conduzidos a fim de determinar se mudanças adicionais na composição ou na estrutura dos filmes (por exemplo, adição de óleo vegetal ou mistura de galactomanana ao amido antes da etapa de gelatinização) poderiam modificar a atividade antimicrobiana devido à inativação da nisina ou alterando sua liberação.

No Quadro 5.1 são apresentados os resultados gerais obtidos para as características estudadas dos filmes comestíveis bioativos.

Quadro 5.1 – Resumo geral dos resultados obtidos nesta Tese para as matérias-primas e os filmes comestíveis produzidos a partir da blenda galactomanana-amido-nisina.

Características	Resultados obtidos
<i>Extração do polissacarídeo (%)</i>	
Rendimento Extração (Método 1)	13
<i>RMN da Galactomanana (ppm)</i>	
Razão M/G	1,46
<i>IR da galactomanana (em cm⁻¹)</i>	
Bandas detectadas	3298, 2921, 1631, 1377, 1016 e 870
<i>Reologia</i>	
Comportamento da galactomanana, do amido e das blendas galactomanana-amido	Pseudoplástico
<i>Isotermas de sorção (filmes comestíveis da blenda galactomanana-amido)</i>	
Modelo matemático sugerido para intervalo $0,11 < a_w < 0,97$.	G.A.B.
Histerese	Detectada
Parâmetros que influenciam a umidade	Temperatura e conteúdo de glicerol
<i>Bandas detectadas por DSC (endotérmicas, °C)</i>	
Galactomanana	57,2
Filme galactomanana-amido	72, 211 e 296
Filme galactomanana-amido-nisina	91,3; 247 e 287
<i>Testes microbiológicos (log UFC)</i>	
Filme galactomanana-amido-nisina (0,1 mg/mL)	
T0/T24/T48	2,31/0,92/0,18
Filme galactomanana-amido-nisina (0,25 mg/mL)	
T0/T24/T48	2,31/1,11/0,03

5.2. Referências

ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M. Pasting and rheological properties of waxy corn starch as affected by guar gum and xanthan gum. **Carbohydrate Polymers**, 71, pp. 9–17, 2008.

ANDRADE, C. T.; AZERO, E. G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinea pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological Macromolecules** n. 26, pp.181-185, 1999.

AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing** 21, pp. 551-556, 2002.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, 38 (1/2), pp. 141–156, 2000.

CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Suitability of Novel Galactomannans as Edible Coatings for Tropical fruits. **Journal of Food Engineering**, 57, 4, pp. 1456-1462, *in press*, 2009.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; LIMA, A. M. P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; COIMBRA, M. A.; GONÇALVES, M. P.; VICENTE, A. A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers** 75, pp. 408–414, 2009a.

CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Functional Polysaccharides as Edible Coatings for Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 4, pp. 1456 – 1462, 2009b.

EGOROV, A. V.; MESTECHKINA, N. M. ; SHCHERBUKHIN, V. D. (2003) Determination of the Primary and Fine Structures of a Galactomannan from the Seed of *Gleditsia triacanthos* f. *inermis* L. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 4, pp. 398–402, 2003.

EGOROV, A. V.; MESTECHKINA, N. M. ; SHCHERBUKHIN, V. D. (2004) Composition and Structure of Galactomannan from the Seed of *Gleditsia ferox* Desf. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 40, 3, pp. 314–318, 2004.

GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**. CRC Press LLC, 1st edition, p.650, 2002.

NUSSINOVITCH, A. **Water-soluble polymer applications in foods**. Blackwell Publishing, 1st edition, p.240, 2003.

PAI, V. B.; KHAN, S. A. Gelation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. **Carbohydrate Polymers**, 49, pp. 207-216, 2002.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications**. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York, p.644, U.S.A., 2006.

VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes**, vol. 6, Wiley-VCH; 1st edition, p. 644, 2002.

VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALAO, M. I.; BRITO, E.S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry** 101, pp.70–73, 2007.

Anexos

Lista de publicações produzidas desta Tese:

Capítulo de livro:

I – Carlos E. A. Soares; Maria L. Rúa; N. Perez Guerra; R. A. Moreira; L. M. Pastrana Castro. (2009). Charcaterization of corn-strach galctomannans films by adsorption isotherms. In: A Europe-Latin America post-graduate research network in the valorization of Natural Resources. (2009). J. A. Teixeira (Editor). VALNATURA Project, 2005/08. ISBN: 978-972-97810-5-6.

Artigos em periódicos internacionais:

I – Carlos E. A. Soares, W. P. Félix, F. Noélia P. Mendes, R. A. Moreira, S. G. Yeates, Í. G. P. Vieira and N. M. P. S. Ricardo. (2009). Isolation and characterization of galactomannans from *Adenanthera pavonina* L. seeds: a non-traditional source. *Food Chemistry* (submitted).

II – Carlos E. A. Soares, M. L. Rúa, F. Noélia P. Mendes, R. A. Moreira, S. G. Yeates, Í. G. P. Vieira, N. M. P. S. Ricardo, C. A. R. Tovar and L. M. Pastrana Castro. (2009). Edible films made of nisin-galactomannan-corn starch blend: sorption isotherms, rheological behavior and antimicrobial effect. *Journal of Food Science*. (submitted)

III – Carlos E. A. Soares, Joana Teresa R. Martins, José António A. Soares Vicente, José António Teixeira, M. L. Rúa, F. Noélia P. Mendes, R. A. Moreira, S. G. Yeates, Í. G. P. Vieira, N. M. P. S. Ricardo, L. M. Pastrana Castro and C. A. R. Tovar. (2009). Rheological behaviour and structural study from *Adenanthera pavonina* galactomannan: comparison among distinct drying methods. *Carbohydrate Polymers* (submitted)

Resumos em congressos internacionais

I – Soares, C.E.A.; Pastrana Castro, L.M.; Rúa, M.L.; Monteiro Moreira, A. C. O.; Moreira, R.A. (2009). Corn Starch-Galactomannan-Nisin Based Edible Films Antimicrobial Properties. 34th FEBS Congress, July 4 – 9, Prague, Czech-Republic, (accepted).

II – Soares, C.E.A.; L.M.; Rúa, M.L.; Perez Guerra, N.; Moreira, R.A.; Pastrana Castro. (2008). Adsorption isotherms of Galactomannan films. Book of Abstracts of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Resumos em congressos nacionais

I – Soares, C.E.A.; Pastrana Castro, L.M.; Rúa, M.L.; Moreira, R.A. (2009). Edible films based on complex Corn Starch-Galactomannan-Nisin on a bioassay against *Lysteria monocitogenes*. (2009). XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, 16 – 19 maio, Águas de Lindóia – SP, Brasil.

II – Soares, C.E.A.; Felix, W. P.; Pastrana Castro, L.M.; Rúa, M.L.; Moreira, R.A. (2009). Effects of the glycerol concentration and temperature on adsorption isotherms of edible films based on complex corn starch-galactomannan. (2008). IX Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Universidade de Fortaleza, Fortaleza – CE, Brasil.

III – Soares, C.E.A.; Pastrana Castro, L.M.; Rúa, M.L.; Moreira, R.A. (2009). Uso de filmes e coberturas comestíveis para aumento do tempo de preservação de frutos tropicais. (2008). BIOLATINA 2008, 28 – 30 de setembro, São Paulo – SP, Brasil.