

# Agradecimento

Quase a terminar este desafio gigante, esta é a altura certa para enaltecer e agradecer a todos aqueles que me fizeram acreditar e me incentivaram a seguir em frente dando-me alento e criando condições para tal. Sem a vossa força, não teria chegado até aqui com toda a certeza.

Ao Doutor Filipe Antunes, na qualidade de meu orientador, pela confiança depositada, pelo apoio, acolhimento, ajuda e disponibilidade demonstrados ao longo deste projeto mas acima de tudo por me ter dado força e coragem para lutar pelos meus objetivos.

Ao Doutor Luís Alves, meu co-orientador, por me ter dado a oportunidade de aprender com ele de forma tão descomplicada, pela sua disponibilidade, constante boa disposição e sentido de humor tão apurado.

À Mestre Elodie Melro, também na qualidade de minha co-orientadora que tão bem me orientou e inspirou. A sua disponibilidade, altruísmo, capacidade de partilha e encorajamento marcaram-me de uma forma tão profunda que vai muito além destas palavras.

A todos os elementos do grupo Colling, que sempre me brindaram com uma tremenda simpatia em todos os momentos que partilhámos. Foi uma honra poder fazer parte deste núcleo.

Agradeço ainda à Doutora Ermelinda Eusébio (departamento de Química da Universidade de Coimbra) pela disponibilização do equipamento de FTIR usado no estudo de diferentes amostras de produtos cárneos fatiados e de alginatos.

De igual modo, agradeço à Doutora Gabriela Silva (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) por todas as facilidades concedidas na realização dos estudos microbiológicos.

Ao Doutor José António Ribeiro (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) agradeço a disponibilização do equipamento para realização de DLS e potencial zeta.

Ao Doutor Pedro Silva (Departamento de Física da Universidade de Coimbra) agradeço pela ajuda na visualização através de microscopia eletrónica das amostras de produtos cárneos fatiados.

À Empresa Primor Charcutaria-Prima S.A., na pessoa da Doutora Fátima Carvalho, diretora de I&D agradeço por toda a colaboração prestada no decorrer do projeto.

Um agradecimento muito especial ao Pedro, meu companheiro de toda uma vida. Todo o incentivo e capacidade que tens de me levar a desafiar os meus limites serviram, entre outras coisas, para chegar até aqui. O finalizar desta etapa tem muito de ti.

Aos meus pais, Joaquim e Maria de Lurdes que são dois dos meus pilares e um exemplo de vida, agradeço o apoio incondicional e constante no decorrer desta etapa e por estarem sempre presentes nos meus dias apesar da distância física que nos separa.

*"O eterno mistério do mundo é a possibilidade de o compreendermos.*

*O facto de que ele seja compreensível é um milagre."*

*(Albert Einstein)*

# Índice

Abreviações .....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1. Introdução .....	1
1.1 Os produtos cárneos na alimentação global.....	1
1.2 Fiambre e outros produtos cárneos fatiados .....	2
1.3 Filmes e revestimentos edíveis, uma perspectiva histórica .....	3
1.4 Utilização de filmes e revestimentos edíveis para aplicações alimentares.....	4
1.5 Biopolímeros com potencial para desenvolvimento de revestimentos edíveis.....	7
1.5.1 Polímeros, conceito e classificação .....	7
1.5.2 Biopolímeros .....	8
1.5.3 Polímeros em solução .....	9
1.6 Biopolímeros em estudo .....	11
1.6.1 Quitosano.....	11
1.6.2 Alginato .....	14
1.6.3 Gelatina .....	17
1.7 Microbiologia e conservação na indústria cárnica .....	21
1.7.1 Efeitos da contaminação microbológica em produtos cárneos .....	21
1.7.2 Os microrganismos na contaminação dos alimentos.....	21
1.7.3 Principais grupos de microrganismos relevantes no contexto alimentar.....	23
1.7.4 Controle e destruição microbiana; uso de conservantes .....	25
2. Resultados e Discussão.....	27
2.1 Caracterização dos produtos cárneos fatiados .....	27
2.2 Caracterização de biopolímeros a utilizar na formulação de revestimentos edíveis .....	34

2.2.1	Caraterização do Alginato .....	34
2.2.2	Quitosano .....	45
2.2.3	Gelatina .....	55
2.3	Estudos de ação antimicrobiana.....	57
3.	Conclusões .....	67
4.	Experimental.....	71
4.1	Material.....	71
4.1.1	Polímeros .....	71
4.1.2	Solventes .....	71
4.1.3	Conservantes .....	71
4.1.4	Microbiologia .....	72
4.1.5	Produtos cárneos fatiados .....	72
4.2	Métodos .....	73
4.2.1	Caraterização dos produtos cárneos.....	73
4.2.2	Caraterização de materiais para revestimentos edíveis .....	77
4.2.3	Estudos microbiológicos.....	79
4.3	Técnicas de Caraterização .....	81
4.3.1	Reologia.....	81
4.3.2	Medição do tamanho de partícula por DLS.....	84
4.3.3	Potencial Zeta .....	85
4.3.4	Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR) .....	87
4.3.5	Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) .....	89
4.3.6	Análise de textura .....	89
	Bibliografia .....	93

# Abreviações

AA - Ácido acético

AL - Ácido láctico

AS - Ácido sórbico

ATR - *Attenuated Total Reflectance* (Refletância total atenuada)

c\* - Concentração de entrelaçamento ou concentração crítica

CAE - *Cocoyl arginine ethylester* (Éster etílico de cocoil arginina)

DLS - *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de Luz Dinâmico)

FDA - *Food and Drug Administration*

FTIR - *Fourier Transform Infrared spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier)

G - glucurônico

GRAS - *Generally Recognized as Safe* (Geralmente Reconhecido como Seguro)

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

M - manurônico

MHA - *Mueller-Hinton agar* (Meio de cultura de agár Mueller-Hinton)

Mw - *Molecular weight* (massa molecular)

n - Grau de polimerização

nm - nanómetro

QH - Quitosano de alto peso molecular

QM - Quitosano de peso molecular médio

SE - *Secondary electrons* (detetor de elétrons secundários)

SEM - *Scanning Electron Microscopy* (Microscopia Eletrônica de Varrimento)



# Resumo

Os produtos cárneos constituem uma excelente fonte de proteínas na alimentação e são transversalmente consumidos em todo o mundo. Porém, estes produtos são particularmente suscetíveis à deterioração química e microbiológica, o que, para além das avultadas perdas económicas e depreciação competitiva do respetivo setor de produção, transformação ou venda, representa também um risco consideravelmente elevado para a saúde pública. Desta forma, a fim de preservar o equilíbrio ambiental e socioeconómico, afigura-se como necessidade premente o desenvolvimento de formulações que permitam conservar os produtos cárneos, com especial ênfase nos fatiados, de forma segura e sem a necessidade da atmosfera protetora. Nesse âmbito, os revestimentos edíveis assumem uma relevância crescente, uma vez que dão resposta a vários desafios relacionados com o armazenamento e conservação dos produtos alimentares e surgem como uma alternativa sustentável na minimização dos efeitos prejudiciais que advêm do processamento dos alimentos.

O objetivo deste trabalho é então a caracterização de biopolímeros e outras substâncias ativas adequadas à formulação de revestimentos edíveis para aplicação sobre os produtos cárneos fatiados.

O presente estudo está assente em três eixos fundamentais que passam pela caracterização química e estrutural de substratos amostra de produtos cárneos fatiados; caracterização de biopolímeros e outros aditivos a aplicar em formulações de revestimentos edíveis e estudos de capacidade antimicrobiana dos materiais anteriormente caracterizados bem como de conservantes em uso na indústria cárnica.

Nesse enfoque, a caracterização química e estrutural dos produtos cárneos onde o revestimento será aplicado assume uma importância vital uma vez que a distribuição dos constituintes no produto cárneo e a sua influência na morfologia bem como a influência na adesão do revestimento, se afiguram como fatores chave que não são facilmente esclarecidos apenas com os testes de controlo de qualidade realizados a nível industrial. Para tal foram utilizadas técnicas analíticas suplementares como microscopia eletrónica de varrimento (SEM), espectroscopia de infravermelho com refletância total atenuada (FTIR-ATR) e análise da textura (texturómetro).

A seleção e caracterização de biopolímeros solúveis em meio aquoso que constituirão a base dos revestimentos edíveis a aplicar nos produtos cárneos foram realizadas a nível reológico, dispersão de luz para determinação do tamanho de partícula em solução e potencial zeta (quando aplicável). A análise reológica das soluções poliméricas foi feita através da determinação da viscosidade em função da tensão de cisalhamento e permitiu constatar um aumento da viscosidade com o aumento da concentração de polímero. Por sua vez, o DLS, permitiu comprovar a existência de agregados de partículas em solução.

A fim de assegurar o cumprimento dos requisitos de qualidade necessários e definidos para os produtos cárneos fatiados, foram também realizados testes de capacidade microbiológica que envolveram não

só os biopolímeros caracterizados mas também diversos conservantes alimentares. De um modo geral estes testes permitiram salientar a boa capacidade antimicrobiana do quitosano e de alguns conservantes, como o ácido acético ou o ácido sórbico. A utilização de um tensoativo à base de aminoácidos (CAE) em baixas concentrações demonstrou também vantagens no sentido em que reforça a capacidade antimicrobiana das formulações.



# Abstract

Meat products are excellent sources of proteins in Human diet and are transversely consumed all around the world. However, these products are particularly susceptible to chemical and microbiological spoilage which, in addition to the hefty economic losses and competitive depreciation in the respective production sector, processing and sale, also represents a significantly high risk to public health. Thus, in order to preserve the environmental and socioeconomic balance, it appears as an imperative need in the development of formulations which allow preserving meat products, with special emphasis on the sliced ones, in a safe manner and without the use of protective atmosphere. In this context, the edible coatings are becoming increasingly important since they respond to various challenges related to the storage and preservation of food products, and emerge as a sustainable alternative in minimizing the harmful effects that come from food processing.

Then, the main goal in this work is the characterization of biopolymers and other active substances suitable for the formulation of edible coatings and application on sliced meat products.

This study is based on three fundamental axes passing by the chemical and structural characterization of the sample substrates (sliced meat products); characterization of biopolymers and other additives to apply in edible coatings formulations and antimicrobial capacity studies of materials previously characterized as well as preservatives suitable to be used in the meat industry.

In this approach, chemical and structural characterization of meat products where the coating will be applied is of vital importance since the distribution of the constituents in the meat product and its influence on the morphology, as well as the influence on coating adhesion seem as key factors not easily clarified only by the quality control tests performed at an industrial level.

For such, additional analytical techniques were used, like Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) with Attenuated Total Reflectance (ATR) and texture analysis (texturometer).

The selection and characterization of soluble biopolymer in an aqueous medium constituting the basis of edible coatings to be applied in meat products was performed at a rheological level, determination of particle size in solution and zeta potential measurements. The rheological analysis of the polymer solutions was performed by determination of viscosity versus shear stress which permitted us to note an increase in viscosity with the increment of polymer concentration. In its turn, Dynamic Light Scattering (DLS) allowed to prove the existence of polymer aggregates in solution.

In order to ensure compliance with the necessary quality requirements set for the sliced meat products, antimicrobial capacity tests were also conducted involving not only the featured biopolymers but also several food preservatives. Generally these tests allowed to highlight the good antimicrobial properties of chitosan and some preservatives such as acetic or sorbic acid. The use of a surfactant based on amino acid

(CAE) at low concentrations also showed advantages enhancing the antimicrobial properties of the formulations.

# Capítulo 1

## 1. Introdução

### 1.1 Os produtos cárneos na alimentação global

Transversalmente consumidos em todo o mundo, os produtos cárneos constituem uma excelente fonte de proteínas na alimentação humana. Porém, estes produtos são particularmente suscetíveis a degradação química e microbiológica, o que desencadeia, para além de avultadas perdas económicas e depreciação competitiva do respetivo setor, representa também um risco bastante elevado para a saúde pública. A Organização Mundial de Saúde alerta para o facto de que as diarreias provocadas pelo consumo de alimentos contaminados e de água imprópria para consumo são atualmente as principais causas de doença e morte nos países em desenvolvimento, matando cerca de 1,8 milhões de pessoas todos os anos, principalmente crianças. A mesma entidade revela que 10.3% dos casos totais de intoxicação alimentar resultam diretamente da ingestão de produtos cárneos, estimando que as doenças de origem alimentar são 300 a 350 vezes mais frequentes do que indicam os casos declarados, afetando anualmente uma em cada três pessoas a nível mundial[1]. Por outro lado, segundo o Centro de Controlo de Doenças, todos os anos são reportados 48 milhões de novos casos patológicos relacionados com a ingestão de alimentos, representando uma despesa pública de 77,7 biliões de dólares apenas nos Estados Unidos[2].

Nesse contexto, qualquer produto cárneo é suscetível de uma rápida deterioração físico-química, sendo acelerada quanto maior for a sua área de exposição ao ambiente. Assim, os produtos cárneos fatiados, sendo exemplo os produtos de charcutaria fresca, constituem um exemplo extremamente significativo. Estes alimentos são tipicamente acondicionados em embalagens descartáveis, sendo que nos produtos de charcutaria em fatias e fios a elevada área superficial exposta ao ambiente aumenta o risco de contaminação microbiana e de degradação oxidativa. Todas as fases de transformação, corte e transporte, bem como o reduzido tempo de prateleira, característico destes alimentos, colocam em sério risco a integridade do produto, que, ao chegar ao consumidor final e, aquando da abertura da embalagem, se encontra de novo sob elevadíssimo risco de contaminação, dado que a destinada proteção do produto, a atmosfera protetora constituída maioritariamente por azoto e dióxido de carbono, desaparece nesse momento. Para além disto, a forma atual de conservação destes produtos por introdução de atmosfera protetora na embalagem, cuja

vedação depende da aplicação de camadas de plástico específicas, apresenta limitações de eficácia protetora devido à possibilidade de ocorrência de fugas nesses filmes barreira, levando assim, a oxidação dos produtos e consequente contaminação. Desta forma, na medida em que a saúde pública e a correta gestão de resíduos plásticos e alimentares são fundamentais para o equilíbrio ambiental e socioeconómico, afigura-se como necessidade premente o desenvolvimento de formulações que permitam conservar produtos cárneos de forma segura e sem a necessidade da atmosfera protetora, com especial ênfase em artigos de charcutaria fatiados, durante o mesmo tempo que, em condições de atmosfera protetora, seria possível proteger o produto.

## **1.2 Fiambre e outros produtos cárneos fatiados**

Segundo a norma portuguesa NP 4393 (2001) entende-se por fiambre o produto à base de carne, preparado exclusivamente a partir da carne de porco, salmourada, prensada ou não em moldes e posteriormente submetida a tratamento térmico. A classificação do fiambre depende das peças de carne utilizadas e dos ingredientes facultativos que lhe são adicionados e pode ser: fiambre da perna superior, fiambre da perna extra, fiambre da perna, fiambre da pá e fiambre corrente. Consideram-se como ingredientes essenciais a carne de porco, água potável e gelo e sal refinado (NP 4393, 2001). De acordo com a mesma norma, dependendo do tipo de fiambre os ingredientes facultativos podem ser: açúcares, aditivos, geleias de cobertura, aromas, proteínas cárneas e não cárneas. A percentagem mínima de proteína para fiambre da perna e da pá é de 14% e para o fiambre corrente é de 12%. Deve apresentar ao corte uma superfície levemente húmida, de cor rosada mais ou menos intensa, de textura compacta com cheiro e sabor característicos. Comercialmente pode apresentar-se sob a forma de bloco com diversas configurações ou sob a forma de fatias. Nos fiambres da pá, perna, perna superior e perna extra a estrutura muscular deve ser macroscopicamente identificável (NP 4393, 2001).

De acordo com as fichas técnicas fornecidas pela empresa Primor Charcutaria-Prima S.A. referentes aos produtos cárneos fatiados em estudo no projeto, o fiambre de perna extra é um produto preparado a partir de carne de suíno, à qual foram adicionados aditivos sendo prensado em moldes e posteriormente submetido a tratamento térmico; o bacon sem couro é descrito como um produto composto à base de carne entremeada de suíno que sofreu um tratamento por salmoura e fumagem. Por sua vez, o peito de peru é descrito como um produto de salsicharia composto por carne de peru que sofreu um tratamento por salmoura e um tratamento térmico.

### 1.3 Filmes e revestimentos edíveis, uma perspetiva histórica

Não é possível definir revestimento funcional sem inicialmente explorar o conceito de “revestimento”. É do senso comum a noção de que praticamente tudo o que nos rodeia está protegido por um revestimento. De facto, o Homem, desde cedo, sentiu a necessidade de criar um material, normalmente um líquido, aplicável em superfícies, e que após secagem se apresenta como um filme ou película. Os revestimentos funcionais emergem do conceito de proteção para além deste conceito clássico, ou seja, são revestimentos que têm a capacidade de responder a um determinado estímulo, dependendo da função para que foram desenvolvidos[3].

Desde tempos imemoriais, a capacidade de conservação dos alimentos tem constituído um fator de importância fundamental na sobrevivência do Homem, com consequências diretas no desenvolvimento das suas aptidões individuais e coletivas, sendo indissociável da evolução sociológica, económica e cultural das sociedades ao longo do tempo. Reciprocamente, os métodos de conservação dos alimentos têm acompanhado o conhecimento científico que tem revelado, com crescente detalhe, os principais fatores e mecanismos de degradação dos produtos alimentares e contribuído, de forma determinante, para a elaboração de estratégias de prevenção, de controlo e de combate à degradação alimentar, envolvendo várias áreas interdisciplinares em constante desenvolvimento. Estas estratégias, inicialmente baseadas no empirismo, permitiram contrariar os efeitos de fatores ambientais como a temperatura, a luz ou a humidade, através de métodos relativamente rudimentares de eficácia limitada.

O primeiro filme comestível, designado por "Yuba"(Figura 1.1) foi desenvolvido no Japão a partir de leite de soja durante o século XV, e era usado para fins de conservação de alimentos[3].



**Figura 1.1.** Ilustração do processo de produção do “Yuba” consistindo na recolha da casca do leite de soja quente [3]

No século XVI em Inglaterra, após o corte, as carnes eram injetadas com banha de porco para reduzir a perda de humidade e, assim, o encolhimento num processo designado por *larding*[4]. Desta forma a conservação da carne era assegurada por um período mais alongado.

Desde então, uma série de formulações de revestimentos lipídicos têm sido usadas para melhorar a qualidade de carnes e produtos derivados. Em 1958, Letney e a sua equipa propuseram um revestimento da carne com a gordura derretida e deixando-a solidificar para formar uma película a fim de prolongar o tempo de armazenamento de produtos cárneos durante o armazenamento refrigerado e manter o seu aspeto rosado (na indústria é utilizado o termo "*bloom*" para designar a conversão da coloração roxa para vermelha na presença de oxigénio)[5]. Entretanto, outros materiais começaram também a ser usados em revestimentos para carne congelada tais como a cera de carnaúba, cera de abelha, candelila a fim de aumentar o tempo de prateleira destes produtos[3].

A introdução de tecnologias emergentes da Revolução Industrial, nomeadamente as referentes à refrigeração dos alimentos, veio conferir uma capacidade acrescida na conservação de alimentos cuja importância perdura de forma incontestável. Atualmente, um elevado número de biomateriais à base de polissacarídeos e proteínas são utilizados como revestimentos em produtos alimentares e a procura de novas formulações com propriedades otimizadas continua a ser uma importante área de investigação científica[6].

## **1.4 Utilização de filmes e revestimentos edíveis para aplicações alimentares**

As designações de revestimento e filme edíveis são frequentemente usadas na área alimentar de forma indistinta. Contudo, é importante clarificar o conceito por detrás destas duas designações. Um filme consiste numa estrutura membrana muito fina que, após formação, é aplicada na superfície, enquanto que nos revestimento o filme é formado diretamente na superfície a revestir [7].

O uso de revestimentos/filmes edíveis baseados em polímeros naturais e em aditivos reconhecidos como seguros tem aumentado na indústria alimentar podendo ser produzidos com recurso a uma grande variedade de produtos, tais como polissacarídeos, proteínas, lípidos, resinas, com a adição de plastificantes e surfactantes[8]. A sua funcionalidade e comportamento dependem principalmente das suas propriedades mecânicas e de transporte, que por sua vez dependem da composição do filme, do seu processo de formação e do método de aplicação no produto[7].

De facto, os revestimentos edíveis estão a ganhar cada vez mais importância, uma vez que dão resposta a vários desafios relacionados com o armazenamento e marketing dos produtos alimentares e surgem como uma alternativa sustentável na minimização dos efeitos prejudiciais impostos pelo processamento dos alimentos[8].

A escolha entre filme (membrana fina independente do produto) e revestimento (camada formada sobre o próprio produto, passando a constituir um novo sistema integral) depende das características do alimento, dos objetivos pretendidos e do método de aplicação. Tipicamente, a espessura dos filmes e

revestimentos edíveis é inferior a 0,3 mm, pelo que apesar de serem elementos comestíveis, o seu valor nutricional global é reduzido. Nesta perspetiva, podem ser classificados como aditivos, embora a regulamentação europeia vigente seja ainda omissa. Tratando-se de componentes comestíveis, também podem ser considerados ingredientes[7].

Os principais componentes dos alimentos (proteínas, polissacarídeos, lípidos) utilizados no quotidiano podem ser usados na preparação de filmes e revestimentos edíveis. De um modo geral, as proteínas fornecem estabilidade mecânica, os polissacarídeos atuam como barreira gasosa e os lípidos reduzem a perda de água. Embora estes materiais possam ser utilizados individualmente, normalmente são usados em combinações mais ou menos complexas, sendo necessário assegurar um conjunto de condições essenciais como a ausência de substâncias tóxicas, características organoléticas adequadas, estabilidade (físico-química, biológica, mecânica), baixo custo de materiais e tecnologias de processamento e aplicação[2].

As proteínas habitualmente utilizadas na preparação de filmes e revestimentos edíveis são de origem animal (ex. caseína, gelatina, albumina) ou de origem vegetal (ex. extraídas de milho, soja, trigo, sementes de algodão, amendoim, arroz). Estes filmes/revestimentos geralmente aderem bem a superfícies hidrofílicas e formam barreira ao oxigénio e dióxido de carbono, mas não evitam a transferência de água. De modo a aumentar a flexibilidade das redes de proteínas que formam estas estruturas, é habitual adicionar plastificantes (glicerol, polietilenoglicol). Estes filmes/revestimentos podem aumentar a sua resistência à difusão de água através da adição de substâncias hidrofóbicas como ácido oleico ou cera de abelha, afetando as suas propriedades relativamente à cristalinidade, hidrofobicidade, carga superficial, entre outras. Na sua aplicação em produtos cárneos, um dos inconvenientes relaciona-se com a sua suscetibilidade de degradação em resultado da presença de enzimas proteolíticas[9].

Efetivamente, dependendo da sua constituição, os filmes e revestimentos edíveis podem ser utilizados para retardar a desidratação de alimentos (carnes, frutos, vegetais) frescos e congelados ou, ao invés, para diminuir a sua absorção de água, mantendo a textura de, por exemplo, alimentos em pó ou estaladiços. Também podem ser usados no controlo das trocas gasosas, particularmente de oxigénio, permitindo reduzir as reações de oxidação dos alimentos. No caso dos gases orgânicos voláteis que conferem aroma aos alimentos, a sua preservação também pode ser beneficiada. No sentido inverso, podem prevenir a absorção de aromas indesejáveis ou de solventes prejudiciais (por exemplo, evitando a absorção excessiva de óleo em batatas durante a fritura). Outras aplicações interessantes relacionam-se com a prevenção das transferências de massa entre componentes diferentes, ou com a introdução de elementos com função de filtro de radiação visível ou UV. Por outro lado, os filmes e revestimentos edíveis podem ter também propriedades antimicrobianas, em função da sua composição ou da inclusão de agentes adequados, eventualmente encapsulados[8].

Ao selecionar uma composição de revestimento adequado para um determinado tipo de produto alimentar, há uma série de critérios que devem ser considerados. Assim, a eficácia dos revestimentos edíveis

para conservação de alimentos depende, numa primeira fase, do controlo da capacidade molhante do revestimento de modo a garantir uma superfície uniformemente revestida. Outros fatores que afetam a eficácia do revestimento são as propriedades mecânicas e de transporte, cor e solubilidade. Estes parâmetros também devem ser considerados pois permitem: diminuir a permeabilidade ao oxigénio, uma vez que uma menor concentração de oxigénio prolonga o tempo de prateleira dos alimentos; prolongar a fase *lag* (decorrente da adaptação microbiana ao meio) e o tempo de formação durante a fase de crescimento dos microrganismos indesejáveis, leveduras e bolores, que é alcançado mantendo os valores de permeabilidade ao dióxido de carbono elevados; melhorar a resistência mecânica dos revestimentos/filmes, com o objetivo de preservar a sua integridade e diminuir a incidência de luz (a luz promove a oxidação de gorduras) ou seja, promover elevados valores de opacidade[8]. Todo o potencial apresentado pelos revestimentos e filmes edíveis é essencialmente baseado numa combinação sinérgica de propriedades tais como: barreira ao vapor de água, oxigénio, dióxido de carbono e manutenção das propriedades organoléticas o que, por sua vez, permite que este tipo de aplicações aumente e melhore o tempo de prateleira de alimentos. Tais propriedades dependem frequentemente do polímero usado na matriz, dos constituintes adicionados, das condições de armazenamento, do tipo de aplicação, etc. Assim, os filmes e revestimentos edíveis com propriedades mecânicas satisfatórias e boa aparência são potenciais alternativas aos revestimentos sintéticos usados. Estas propriedades são muitas vezes relacionadas com as propriedades térmicas dos biopolímeros, como é caso da temperatura de transição vítrea, que é um dos parâmetros mais importantes na determinação das propriedades mecânicas de materiais no estado amorfo ou cristalino. A solubilidade dos filmes fornece informações sobre a sua integridade em sistemas aquosos e constitui uma medida da sua resistência à água. Tratando-se de um polímero hidrolizável, poderá também fornecer uma indicação sobre a biodegradabilidade do filme caso o polímero se[8].

A seleção dos agentes ativos a serem incorporados deve ser limitada a compostos comestíveis uma vez que estes têm de ser consumidos com os revestimentos edíveis. Adicionalmente, há que ter em conta o impacto da adição de alguns compostos na funcionalidade do filme/revestimento porque existe a possibilidade de alterarem as suas propriedades funcionais básicas, em particular as suas propriedades de barreira a gases e vapor de água ou de transporte de solutos. A influência de um ingrediente na funcionalidade do filme/revestimento depende da sua concentração, estabilidade, estrutura química, grau de dispersão no revestimento e da interação com o polímero[8].

Os filmes e revestimentos edíveis podem ser usados para preservar os alimentos, como suporte de ingredientes bioativos e como material de embalagens. A sua eficiência e funcionalidade dependem dos materiais usados na sua produção. Nessa perspetiva, os polissacarídeos juntamente com as proteínas parecem ser dos materiais mais promissores para serem usados na produção de filmes e revestimentos edíveis devendo esta ser compatível com os atuais processos de produção dos filmes sintéticos e com os processos de revestimento dos alimentos, sem investimento significativo. Deste modo, estes sistemas apresentam-se como



bastante promissores para a melhoria da qualidade dos alimentos, tempo de prateleira, segurança e funcionalidade[8].

## **1.5 Biopolímeros com potencial para desenvolvimento de revestimentos edíveis**

### **1.5.1 Polímeros, conceito e classificação**

De acordo com a União Internacional da Química Pura Aplicada (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a definição de polímero consiste "numa molécula de elevada massa molecular relativa cuja estrutura resulta, na prática ou teoricamente, da repetição de unidades moleculares de baixa massa molecular relativa"[10]. Estas unidades de repetição são designadas por monómeros. Consoante os polímeros são constituídos por monómeros de uma única composição molecular, ou de diferentes composições, as respetivas macromoléculas são designadas por homopolímeros e copolímeros, respetivamente[11].

A classificação dos polímeros pode ser feita segundo vários critérios, por exemplo, de acordo com a sua origem (natural ou sintética), composição química (poliésteres, poliamidas, etc.), estrutura (linear, ramificada ou reticulada), reações de síntese (adição, condensação, etc.) e propriedades físicas (comportamento térmico, cristalinidade, etc.). Deve atender-se, no entanto, que esta sistematização é puramente conceptual, existindo na realidade uma interdependência entre composição, estrutura e propriedades dos materiais[12].

Relativamente à estrutura, os polímeros podem ser lineares, ramificados, reticulados ou assumirem a forma de uma rede tridimensional[13]. Os polímeros lineares são aqueles nos quais as unidades repetitivas estão concatenadas constituindo cadeias lineares. Nos polímeros ramificados, as unidades monoméricas estão unidas de modo a formar ramificações, ou seja, as cadeias laterais crescem fora da própria molécula, sendo que estas ramificações podem variar em número e em tamanho e alteram dramaticamente a mobilidade relativa das cadeias poliméricas e sua capacidade de formar estruturas organizadas e estruturas cristalinas no estado sólido[14].

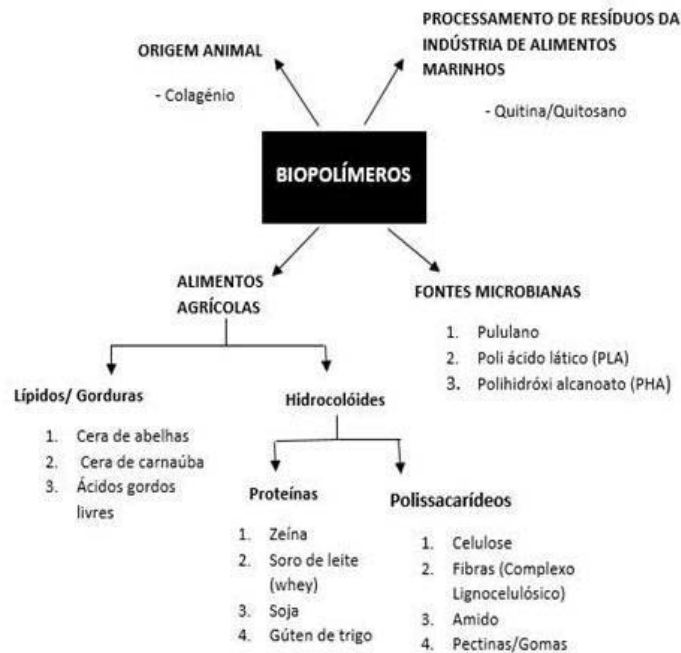
As propriedades dos polímeros são largamente influenciadas pela sua estrutura, dependente por sua vez da composição química básica, morfologia e modo de processamento. A nível estrutural, o tamanho da cadeia polimérica pode ser definido tanto pela massa como pelo seu grau de polimerização ( $n$ ) referente ao número de unidades monoméricas contidas na cadeia[13]. A massa molecular de cada unidade monomérica do polímero multiplicada pelo número de monómeros define a massa molecular do polímero. Este parâmetro influencia várias das suas propriedades, em particular, a temperatura de amolecimento, a força elástica, a força

do impacto e a resistência ao calor. Assim, polímeros de alto peso molecular são mais duros e mais resistentes ao calor, ao passo que os polímeros de baixo peso molecular são moles[15]. Quando em solução, polímeros com elevada massa molecular conferem viscosidades superiores.

No que concerne à carga superficial, os polímeros podem ser classificados em catiónicos, se apresentarem carga global positiva; aniônicos, se apresentarem carga global negativa e não iônicos, se a carga global for neutra[15].

## **1.5.2 Biopolímeros**

Existe uma grande variedade de polímeros de ocorrência natural utilizados em inúmeras aplicações com particular destaque na área alimentar (Figura 1.2). Estes biopolímeros têm origem em fontes muito diversas como é o caso do quitosano obtido por processamento de resíduos alimentares marinhos, ou o colagénio (percursor da gelatina) que tem origem animal, entre outros[16].



**Figura 1.2.** Biopolímeros de ocorrência natural utilizados em formulações de revestimentos edíveis[7]

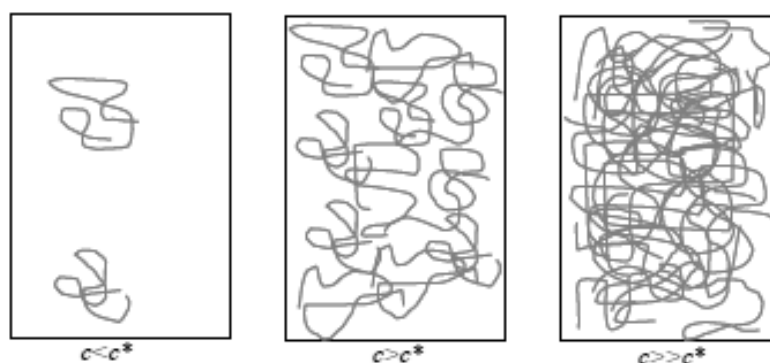
A utilização de biopolímeros abre portas ao desenvolvimento de novos materiais amigos do ambiente que se assumem como biodegradáveis e sustentáveis. Atualmente há uma tendência crescente na utilização de materiais de embalagem biodegradáveis em substituição dos materiais convencionais não degradáveis reduzindo o impacto ambiental resultante da acumulação de resíduos. Assim, os polímeros sintéticos convencionais como polietileno ou polipropileno estão gradualmente a ser substituídos por polímeros de origem natural e sustentáveis. Para além disso, a utilização de biopolímeros como matriz polimérica de filmes e revestimentos edíveis em frutas, carne e outros produtos alimentares é responsável por uma melhoria assinalável das suas propriedades[17].

### 1.5.3 Polímeros em solução

O comportamento das moléculas poliméricas em solução depende de vários fatores, entre os quais a concentração do polímero,  $c$ . O intervalo de concentração do polímero pode ser dividido em três regimes, representados na Figura 1.3, o diluído, o semidiluído e o concentrado[18]. No regime diluído as moléculas estão separadas umas das outras e, sem qualquer contacto entre elas, movem-se independentemente umas das outras[19]. Ao aumentar a concentração da solução, diminui a distância média entre as cadeias poliméricas que começam assim a entrelaçar-se, ou seja, começam a tocar umas nas outras, atingindo-se um novo regime,

o regime semidiluído. Neste regime ocorre uma sobreposição das moléculas, ou seja, as macromoléculas sobrepõem-se umas às outras, e quando isto acontece diz-se que a solução atingiu a concentração de entrelaçamento ou concentração crítica,  $c^*$ [20]. A concentração de entrelaçamento caracteriza a situação onde há um contacto contínuo entre as moléculas do polímero na solução. É a concentração na qual as moléculas começam a interpenetrar umas nas outras, ou seja, a distância entre os centros de massa das cadeias é da ordem dos raios das macromoléculas.

Assim, quanto maior for o tamanho da cadeia polimérica, ou seja, quanto maior for a massa molecular, menor é a concentração de entrelaçamento para um dado polímero. Quando se atinge a concentração crítica, ocorre a formação de uma rede polimérica transitória que pode ser detetada pelo aumento drástico da viscosidade da solução polimérica[21]. A viscosidade da solução depende do tamanho do polímero. No regime semidiluído existe a possibilidade de formação de um gel se ocorrer uma forte interação física ou química entre as moléculas. E quando o incremento da concentração do polímero na solução for muito elevado é atingido um outro regime, o regime concentrado. Neste regime as cadeias poliméricas estão altamente emaranhas, pelo que os segmentos das cadeias dos polímeros não têm espaço suficiente para se movimentarem [19, 22].



**Figura 1.3.** Regimes de concentração: solução diluída ( $c < c^*$ ), semidiluída ( $c > c^*$ ) e concentrada ( $c \gg c^*$ )[19]

A solubilização de polímeros depende muito da sua massa molecular, sendo que quanto maior for a molécula, mais intensas serão as forças que mantêm as cadeias unidas e maior será a energia necessária para promover a sua separação por ação do solvente. A dissolução de um polímero em concentrações elevadas conduz frequentemente à obtenção de uma solução muito viscosa devido à interação das cadeias poliméricas a um nível tridimensional no seio do solvente. Estes sistemas viscosos interligados são designados de géis. Um gel pode ser definido como um sistema solvente-polímero que possui uma rede tridimensional mesmo a baixas concentrações de polímero. A formação do gel pode ocorrer quer pelo inchamento do polímero quer por redução da sua solubilidade. Este sistema será um gel, independentemente da rede ser formada através de ligações físicas ou químicas[22].

## 1.6 Biopolímeros em estudo

A estratégia sugerida para o desenvolvimento técnico proposto consiste fundamentalmente na aplicação de revestimentos edíveis em solução sobre os diversos produtos cárneos em estudo usando para tal biopolímeros aprovados para consumo alimentar, sendo exemplo os polissacarídeos, como o alginato e o quitosano e as proteínas como a gelatina, com a possível combinação sinérgica com outras substâncias comestíveis de reconhecido potencial no prolongamento do tempo de conservação de produtos cárneos, sendo exemplos os ácidos orgânicos, óleos essenciais ou bacteriocinas. Esses revestimentos aplicados na proteção dos próprios alimentos deverão conferir propriedades antioxidantes e antimicrobianas aos produtos embalados sob atmosfera normal.

Os critérios usados na seleção dos biopolímeros com potencial interesse na aplicação em revestimentos edíveis para produtos cárneos assentam, em traços gerais, em algumas características basilares destes compostos que devem então, ser edíveis e solúveis em água, devem apresentar afinidade com os produtos cárneos, ter massa molecular adequada e não promover alterações nas propriedades organolépticas dos produtos em que serão aplicados.

### 1.6.1 Quitosano

O quitosano apresenta grande potencial na indústria alimentar como conservante devido à sua elevada atividade antimicrobiana contra vários microrganismos, atoxicidade bem como propriedades físicas e químicas notavelmente versáteis, garantindo assim a qualidade de uma vasta gama de produtos alimentares onde é aplicado. Atualmente, cada vez mais atenção tem sido dada à investigação e desenvolvimento de filmes e revestimentos com propriedades antimicrobianas a fim de melhorar a segurança alimentar e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos[23].

Sob o ponto de vista químico, o quitosano é um polissacarídeo catiónico linear de origem natural, composto por unidades de glucosamina unidas a unidades de acetilglucosamina por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  [24]. A Figura 1.4 ilustra a estrutura química geral do quitosano.

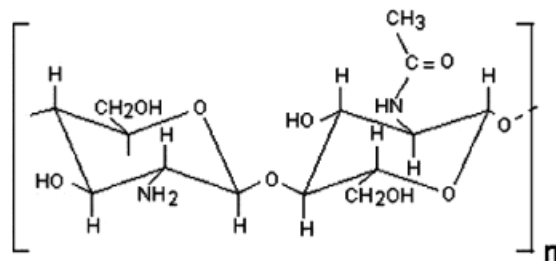


Figura 1.4. Estrutura geral do quitosano [25]

Embora a sua estrutura se encontre raramente na natureza, industrialmente o quitosano é obtido por um processo de desacetilação alcalina da quitina que é determinado pela proporção de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina[26]. Embora pouco solúvel em água, exceto o quitosano quimicamente modificado, quando em contacto com soluções aquosas de ácidos orgânicos, como por exemplo, ácido acético, fórmico e cítrico, apresenta solubilidade devido à ocorrência de protonação dos grupos amino [27]. Estes grupos, que apresentam um pKa entre 6,2 e 7,0, podem ser protonados usando ácidos com pKa inferior a 6,2 tornando o quitosano solúvel[28]. Deste modo verifica-se uma forte dependência do comportamento físico-químico do quitosano com o pH da solução, devido em particular à presença de cargas apenas a pH baixo com o consequente aumento de solubilidade em água.

A quitina, sua precursora formada por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações do tipo β(1→4), é o segundo polímero mais abundante na natureza, sendo apenas superado pela celulose. Ambos os polímeros possuem estruturas moleculares similares, distinguindo-se apenas no grupo substituinte do carbono 2 do anel da glucopirranose, em que na quitina é um grupo acetamida (Figura 1.5) e na celulose é um grupo hidroxilo (Figura 1.6.)

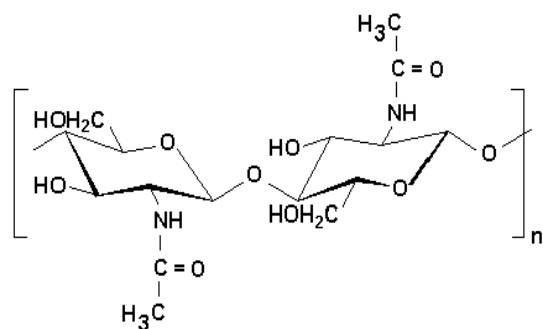
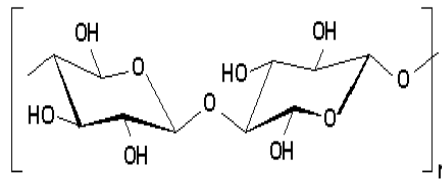


Figura 1.5. Estrutura geral da quitina [25]



**Figura 1.6.** Estrutura geral da celulose[25]

A quitina é sintetizada por um elevado número de organismos, encontrando-se preferencialmente nos artrópodes, mais especificamente crustáceos (camarão, lagosta, caranguejo e *krill*), insetos, parede celular de fungos e leveduras, assim como em células de plantas de baixo porte[29-31].

Apesar de ser um polissacarídeo de grande potencialidade, a quitina tem ainda escassa aplicabilidade, devido sobretudo à sua baixa solubilidade e tratamento complicado (a sua estrutura cristalina causa dificuldades nas modificações químicas, especialmente da forma  $\alpha$ -quitina), que resultam das fortes ligações de hidrogénio entre as cadeias poliméricas[32]. Com vista a ultrapassar esta restrição, a quitina é submetida a um processo, designado por desacetilação, onde lhe são retirados os grupos acetamida. A conversão de quitina em quitosano pode ser realizada por desacetilação alcalina homogénea, heterogénea ou por meios enzimáticos[24, 31]. O quitosano obtido a partir de condições heterogéneas não é solúvel em água o que, por oposição, é conseguido em condições homogéneas de desacetilação da quitina[24].

O crescente interesse demonstrado pelo principal produto da quitina, o quitosano, fez-se sentir, principalmente durante as últimas décadas. Entre os fatores motivadores deste interesse estão, a sua grande abundância potenciando um recurso economicamente atrativo, e a apresentação de características de elevado interesse para áreas específicas[33].

No estado sólido, o quitosano apresenta-se como um polímero semi-cristalino. Os parâmetros mais utilizados na sua caracterização são a solubilidade, o grau de desacetilação, a distribuição dos grupos acetamida, a massa molecular e o comprimento das cadeias [30]. Trata-se do único polímero catiónico obtido de fontes naturais, com capacidade de ser empregue como solução, gel, filme ou fibra [30]. Associado a estas características podem enumerar-se múltiplas propriedades, tais como: capacidade de formação de estruturas porosas; função de barreira; adesão e migração celulares; atividade antimicrobiana especialmente contra agentes patogénicos; bioatividade; hidrofilicidade; biodegradabilidade; ausência de toxicidade; compatibilidade biológica (não-antigénico); propriedades de adsorção/complexação e anticancerígenas[34]. A sua solubilidade, biodegradabilidade, reatividade e adsorção de diversos substratos dependem da quantidade de grupos amino protonados na cadeia polimérica, e por conseguinte, da proporção de unidades de D - glucosamina acetilada e não - acetilada[35]. A atividade antimicrobiana do quitosano é uma das suas propriedades mais importantes e, sendo referida por vários autores, já foi demonstrada contra uma variada gama de fungos, leveduras e bactérias em produtos alimentares[36].

Porém, é de salientar que esta propriedade se exprime maioritariamente quando o quitosano se encontra em solução, numa gama de pH inferior a 6 e depende fundamentalmente de três aspetos: características da molécula (massa molecular e grau de desacetilação); existência de outros componentes no sistema (tipo e concentração de ácidos, presença de iões, proteínas, lípidos, etc.) e condições ambientais de preparação da solução, membrana ou gel (temperatura, humidade relativa, etc.). Nesse enfoque, o quitosano tem sido amplamente utilizado em filmes antimicrobianos para revestimento protetor comestível, aplicado, quer por imersão ou pulverização, em produtos alimentares. A otimização das propriedades biocidas de filmes e revestimentos biocompósitos à base de quitosano e o seu papel de biocatalisador na melhoria da qualidade e prolongamento do tempo de prateleira dos alimentos têm sido alvo de diversos estudos sendo que o mecanismo proposto e melhor aceite pela comunidade científica preconiza que a carga positiva das moléculas do quitosano interage com a carga negativa da membrana das bactérias, provocando a fuga de constituintes intracelulares e proteicos, levando à destruição e morte celulares[37]. Contudo, esta propriedade fica diminuída quando o quitosano se encontra na forma de filme insolúvel[38]. Um outro mecanismo também proposto é o da interação entre os produtos hidrolisados difundidos e o ADN microbiano, o que leva a inibição do ARN mensageiro e consequentemente da síntese de proteínas, metais quelantes e nutrientes essenciais ao funcionamento da bactéria [39].

## 1.6.2 Alginato

O alginato é um polissacarídeo encontrado tanto na matriz intercelular de algas castanhas como em algumas espécies de bactérias. A sua caracterização remonta ao final do século XIX e atualmente é obtido de algas castanhas (Figura 1.7) recolhidas em regiões costeiras podendo constituir até 40% da massa seca destas algas[40].



**Figura 1.7.** Macroalga castanha da classe *Phaeophyceae* [41]



Devido às suas propriedades únicas para espessar e gelificar soluções e atuar como suporte de imobilização, o alginato tornou-se um produto de grande importância comercial. A indústria alimentar utiliza a maior parte do alginato produzido atualmente. Entre as suas aplicações mais comuns estão a produção de gelados, produtos lácteos e misturas para bolos[40]. O alginato encontra aplicações também na indústria de bebidas, onde é utilizado para melhorar as características sensoriais destes produtos. Em cervejas estabiliza a espuma e na elaboração de sumos pode ser utilizado para manter os constituintes da mistura em suspensão. Algumas aplicações promissoras do alginato incluem a sua utilização em filmes bioativos para cobertura de alimentos e na elaboração de alimentos reestruturados onde pode ser utilizado em polpas de frutas, de vegetais e em carnes. A adição de alginato em massas proporciona uma clara melhoria das propriedades de pasta, modifica as características reológicas e a textura do material, retarda a degradação e aumenta a capacidade de hidratação do amido. Na indústria têxtil a utilização do alginato melhora o desempenho das tintas utilizadas nos processos de impressão favorecendo a aderência e a deposição destes materiais sobre os tecidos. Na indústria do papel, a adição de alginato permite que as propriedades para impressão destes materiais também melhorem. O alginato é, também, utilizado em aplicações na área farmacológica, com vários produtos farmacêuticos imobilizados neste suporte polimérico. É conhecida também a sua utilização como excipiente de libertação de medicamentos, curativos inteligentes, em formulações para prevenção de refluxo gástrico, bem como materiais de impressão dentária. Atualmente, tem vindo a ser utilizado em aplicações inovadoras na área médica e farmacêutica. Em função das suas características é utilizado como espessante, estabilizante de emulsões e de espumas, agente de encapsulação, agente de gelificação, agente de formação de filmes/revestimentos e de fibras sintéticas, entre outras possibilidades[40].

Apesar de o alginato utilizado atualmente ser extraído de algas, a sua produção por micro-organismos é conhecida desde há muito e poderá proporcionar uma boa alternativa e, num futuro próximo, uma exploração controlada das fontes naturais deste recurso. Outra vantagem adicional reside no facto da produção de alginato por microrganismos poder ser realizada sob condições controladas, usando substratos de qualidade constante e permitindo assim a obtenção de materiais específicos com características uniformes[40].

A descoberta do alginato bacteriano foi feita em 1964, aquando do seu isolamento a partir de uma cepa mucóide de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes portadores de fibrose cística submetidos a tratamento com antibióticos. Posteriormente, foram identificadas bactérias do género *Azotobacter* e *Pseudomonas* como produtoras deste biopolímero. A descrição da produção por *Azotobacter* foi realizada em 1966. No início dos anos 80 foram identificados microrganismos do género *Pseudomonas* que não apresentaram patogenicidade e possuíam a capacidade de sintetizar alginato. Os microrganismos reportados foram *P. florencens*, *P. mendocina* e *P. putida*[40]. A produção de alginato por microrganismos está associada ao desenvolvimento de uma característica mucóide fenotípica e formadora de extensas colónias denominadas biofilmes. O alginato bacteriano pode substituir o material extraído de algas nas suas aplicações tradicionais e

a sua utilização na área médica e farmacêutica tem vindo a ser alvo de extensa investigação, devido à possibilidade de produzir materiais de elevada pureza e também materiais que apresentam estruturas poliméricas específicas[40].

Em termos moleculares, o alginato é um copolímero linear composto de resíduos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) e de ácido  $\alpha$ -L-glucurónico (G) unidos por ligações glicosídicas do tipo [1-4], como se pode observar na Figura 1.8.

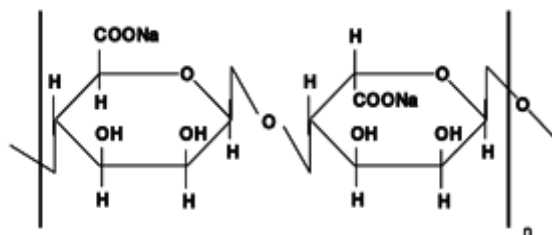


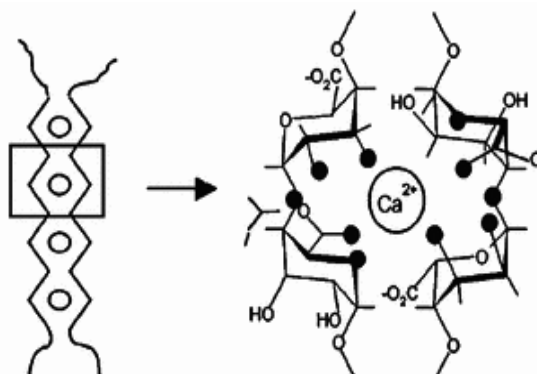
Figura 1.8. Estrutura geral do alginato de sódio[42]

O alginato varia extensamente em termos da sua proporção entre os resíduos manurónicos (M) e glucurónicos (G), bem como em sua estrutura sequencial e grau de polimerização. Desta forma, o material pode apresentar sequências alternadas de resíduos MG e blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G[26, 42].

Em solução, o alginato apresenta uma superfície que está organizada numa dupla camada elétrica, região interna ou camada de Stern onde se encontram os iões fortemente ligados à superfície e uma região externa ou camada difusa em que se encontram iões ligados à superfície por interações mais fracas. A camada difusa apresenta uma fronteira em que os iões e as nanopartículas formam uma entidade estável que se designa como plano deslizante e o potencial desta fronteira denomina-se potencial zeta. Ou seja, os agregados poliméricos de alginato a pH acima do pKa do ácido manurónico (3,38) e glucurónico (3,65) apresentam carga negativa [43]. Um aumento de pH desencadeado pela adição de uma base forte como por exemplo NaOH, conduz a uma maior presença de iões  $\text{Na}^+$  na camada difusa aumentando a densidade de carga nessa região[44]. É de esperar que à medida que se diminui o pH com a protonação dos grupos carboxílicos terminais das cadeias de alginato ocorra uma diminuição do valor absoluto da carga superficial[26].

Uma das propriedades mais importantes do alginato é a sua capacidade de reagir com catiões divalentes, especialmente iões cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis cujas características dependem da proporção M/G e do número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. O uso do alginato na formulação de filmes e revestimentos edíveis deve-se às suas propriedades coloidais, que incluem a estabilização de emulsões, produção de gel e formação de filmes. Os géis podem ser formados na presença de catiões divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  e a presença de sequências de resíduos glucurónicos é necessária

para que apresentem esta capacidade[26, 45]. A interação entre os íons divalentes e os blocos glucurónicos forma a estrutura denominada "modelo caixa de ovos" ilustrada na Figura 1.9.



**Figura 1.9.** Modelo de *egg-box* em gel de alginato de cálcio e interação entre os íons cálcio e os átomos de oxigênio (círculos negros) de monómeros de ácido glucurônico [45]

As características estruturais do material afetam significativamente o seu comportamento reológico. Assim, as propriedades reológicas do biopolímero estão associadas ao grau de polimerização, às complexas interações entre íons e os resíduos glucurónicos e manurónicos. A força do gel formado irá depender do número e da extensão dos blocos de resíduos glucurónicos ao longo da cadeia polimérica e da concentração de íons presentes[40].

### 1.6.3 Gelatina

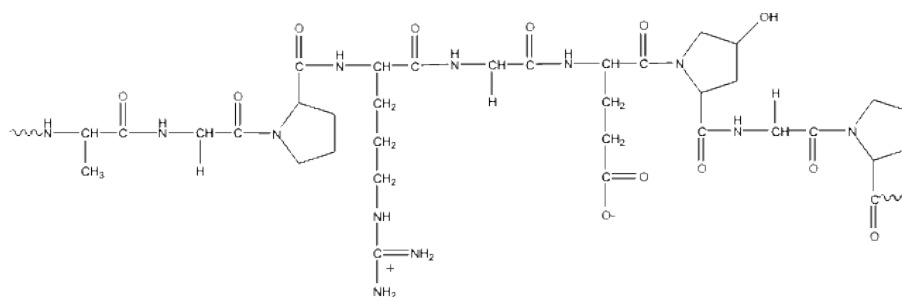
Desde há muito que a gelatina se encontra integrada na alimentação humana. Numerosos documentos comprovam a sua utilização em muitos banquetes no antigo Egito, onde diversas iguarias eram servidas usando gelatina como base, sendo os mais conhecidos, as trutas e as frutas em geleias.

Em 1682, o francês Denis Papin (1647-1714) descreveu pela primeira vez um processo de cozimento que permitia a obtenção de uma massa gelatinosa, a partir de ossos de certos animais[46]. A utilização regular da palavra gelatina só ocorreu em torno do ano de 1700 e deriva do latim *gelatus*, que significa firme, rígido, gelado. Em 1754, foi registada pela primeira vez, na Inglaterra, uma patente relativa ao fabrico de gelatina. O reconhecimento que se outorga hoje à gelatina como alimento de alto valor nutritivo data das guerras napoleónicas, época durante a qual o produto foi largamente utilizado para garantir às tropas francesas o aporte proteico necessário durante o bloqueio continental. Em 1850, Poetevine e Gaudin recomendaram o uso da gelatina como aglutinante dos sais de prata na emergente indústria fotográfica. Vinte anos mais tarde, C. Volt demonstrou que a gelatina era constituída por componentes proteicos[47].

A indústria da gelatina apresenta um desenvolvimento tecnológico constante constituindo atualmente um setor de altíssimo nível tecnológico onde são aplicados os mais rigorosos sistemas de controlo de

qualidade. Assim, apesar da sua venerável antiguidade, a gelatina é um produto moderno e atual, que é utilizado amplamente na indústria alimentar, bem como noutros setores industriais[46].

A gelatina é uma proteína de origem animal, obtida por desnaturação térmica do colagénio que é o principal constituinte de peles de animais, ossos, tendões e tecido conjuntivo. Apresenta uma estrutura em tripla hélice estabilizada principalmente pela formação de ligações de hidrogénio entre cadeias devido à interação entre os grupos carbonilo e amino de cadeias adjacentes. Após o processo de desnaturação, a tripla hélice é quebrada e as cadeias polipeptídicas adotam uma configuração aleatória. Então, essas cadeias podem interagir para formar uma tripla hélice de colagénio parcialmente hidrolisado designado de gelatina estrutural[48] estando a sua estrutura representada na Figura 1.10.



**Figura 1.10** Estrutura molecular da gelatina [46]

Tal como o colagénio, a gelatina é composta por 18 aminoácidos diferentes que estão unidos por ligações peptídicas na formação da molécula, cujo peso molecular médio varia geralmente entre 20.000 a 250.000 g/mol, dependendo do grau de hidrólise do colagénio. Tem como característica peculiar o alto conteúdo de glicina, hidroxiprolina e prolina e deficiência em aminoácidos sulfurados. A Tabela 1.1 apresenta o conteúdo de aminoácidos na gelatina.

**Tabela 1.1.** Conteúdo de aminoácidos na gelatina[47]

<b>Aminoácidos (g) por 100g de gelatina pura</b>	
Alanina	11,3
Arginina	9,0
Ácido aminosuccínico	6,7
Ácido glutâmico	11,6
Glicina	27,2
Histidina	0,7
Prolina	15,2
Hidroxiprolina	13,3
Hidroxilisina	0,8
Isoleucina	1,6
Leucina	3,5
Lisina	4,4
Metionina	0,6
Fenilalanina	2,5
Serina	3,7
Treonina	2,4
Tirosina	0,2
Valina	2,8

O processo de fabrico da gelatina envolve algumas etapas básicas que passam pelo tratamento do tecido colagénico; extração; purificação; concentração; esterilização; arrefecimento e secagem. Alguns dos aminoácidos na estrutura peptídica do colagénio contêm grupos funcionais que são hidrolisados sob condições ácidas ou básicas, levando a mudanças no balanço dos grupos carregados das moléculas de gelatina[47].

O comportamento físico e químico da gelatina é determinado, por um lado, pela sequência de aminoácidos das moléculas e pela estrutura espacial resultante e, por outro, pelas condições do ambiente, como pH, força iónica e reações com outras moléculas. Assim, muitos desafios colocados atualmente podem ser solucionados com o uso da gelatina, tais como formação de géis termorreversíveis e elásticos; ajuste da propriedade de fluidez de emulsões; prevenção de coalescência e separação de fases em diferentes sistemas de emulsão em que estão dispersos óleos e glóbulos de gorduras; prevenção da separação de fases em emulsões congeladas ou esterilizadas; prevenção da recristalização; formação de filmes e revestimentos edíveis; manutenção da ventilação em emulsões e cremes; prevenção da ocorrência de sinérese; fornecimento de consistência e textura em produtos de baixo teor calórico; melhoria da aglutinação de gorduras em emulsões de carne e de massas; aumento da absorção de água em emulsões de carne; melhoria das propriedades de batimento e de fusão em gelados; e agente aglutinante de pós, comprimidos e pastilhas. Com base nestas propriedades, a gelatina desempenha funções de: texturização, formação de gel, ligação com a água e como agente de efeitos de superfície, emulsionante e formadora de espumas[49].

Uma das principais características da gelatina é a sua natureza hidrofílica. Apesar de ser relativamente insolúvel em água fria, a gelatina hidrata-se prontamente em água quente. Quando adicionada à água fria, os

grânulos de gelatina intumescem, absorvendo múltiplas vezes seu peso em água. Em determinadas concentrações, o aumento a temperatura acima de 30°C a 35°C, conduz à dissolução das partículas de gelatina intumescidas, formando uma solução que gelifica quando arrefecida. Ao arrefecer a solução até ao ponto de solidificação, a estrutura gelatinosa forma-se novamente. Esse processo de conversão é reversível e pode ser repetido muitas vezes, o que confere à gelatina um poder gelificante nas suas aplicações. O seu grau de solubilidade depende de fatores, tais como temperatura, concentração e tamanho das partículas. Apesar da gelatina não ser solúvel em álcool e nem na maioria dos solventes orgânicos, a sua solubilidade pode ser modificada pela utilização de certos agentes, como sais de metais e aldeídos [49].

Por se tratar de um polímero, a natureza macromolecular da gelatina leva ao aumento da viscosidade em soluções que, para muitas temperaturas e concentrações, apresentam propriedades reológicas de natureza newtoniana. As características de viscosidade apresentadas por uma determinada gelatina dependem, sobretudo, da distribuição do peso molecular das moléculas da gelatina. Mudanças na fórmula molecular e na distribuição da carga resultam em alterações na viscosidade em diferentes valores de pH sendo que esta propriedade assume um papel significativo em certos sistemas alimentares e afeta também as propriedades do gel, incluindo o ponto de fusão e de solidificação. Gelatinas com alta viscosidade resultam em géis com maior ponto de fusão e solidificação do que gelatinas com menor viscosidade. Em geral, as gelatinas alcalinas (tipo B) apresentam maior viscosidade do que as do tipo A obtidas por tratamento ácido[47, 49].

Tal como outras proteínas, a gelatina apresenta características anfotéricas, tendo tanto grupos de aminoácidos ácidos (carboxilo) quanto básicos (amina, guanidina). Para um determinado valor de pH, a gelatina possui um número igual de cargas positivas e negativas na sua molécula. Em soluções isentas de sais, o pH para o qual não existe nenhuma carga na molécula, é chamado de ponto iso-iônico. Em soluções gelatinosas que contêm sais ou outros eletrólitos, o valor de pH para o qual a carga na molécula é zero e não ocorre nenhum movimento por ação de um campo elétrico, é designado de ponto isoeletrico. Em soluções desionizadas, o ponto iso-iônico e isoeletrico são virtualmente iguais.

As gelatinas são classificadas consoante o ponto isoeletrico que apresentam. Assim, a gelatina do tipo A apresenta o ponto isoeletrico no intervalo de pH de 7,0 a 9,0, enquanto a gelatina do tipo B tem o seu ponto isoeletrico no intervalo de pH de 4,8 a 5,2. O ponto isoeletrico controla a densidade da carga e a carga na molécula da gelatina como uma função do pH do sistema no qual a gelatina está a ser utilizada. A carga da gelatina, bem como a sua intensidade irão determinar se a gelatina ficará compatível com as outras substâncias presentes na formulação[50].

A combinação de polissacarídeos de carga negativa, como a goma xantana, o carragenano e ou os alginatos, com a gelatina poderá, se as condições para tal forem favoráveis, ocasionar reações laterais, resultando na remoção de uma parte da gelatina do sistema e numa conseqüente perda de funcionalidade. Isto mostra claramente como o critério mais importante para a escolha do tipo certo de gelatina é o valor de pH do produto, uma vez que este determina a carga da molécula de gelatina. Se além da gelatina também forem

usados outros hidrocolóides, é necessário assegurar que estes tenham uma carga semelhante, caso contrário, poderão desencadear-se reações indesejadas, como turvação e precipitação[50].

O uso da gelatina em produtos cárneos e enchidos apresenta vantagens na otimização das propriedades organoléticas com notáveis melhorias na cor, sabor e aroma destes alimentos. Desta forma, a gelatina assume um papel de destaque sendo uma alternativa viável para a produção de revestimentos edíveis a aplicar em produtos cárneos[50].

## 1.7 Microbiologia e conservação na indústria cárnica

### 1.7.1 Efeitos da contaminação microbiológica em produtos cárneos

A microbiota láctica é a causadora da maioria dos casos de alteração dos produtos cárneos cozidos como o fiambre e bacon. O seu desenvolvimento pode originar: diminuição do valor de pH, acompanhada de uma diminuição da capacidade de retenção de água no produto produzindo-se sinérese com formação de um exsudado mais ou menos leitoso (Figura 1.11A); formação de dióxido de carbono que se manifesta no produto cárnico através do inchaço da embalagem (Figura 1.11B); produção de ácidos que se evidencia pela acidez organolética, aromas e sabores desagradáveis; formação de peróxido de hidrogénio que origina descolorações ou colorações verde-acastanhado ou produção de dextrano, responsável pelo surgimento de limosidade superficial no produto[51].



**Figura 1.11.** Algumas consequências do desenvolvimento da microbiota láctica em fiambre embalado. **A** - Produção de sinérese - exsudado; **B** - Embalagem opada devido à produção de dióxido de carbono.

### 1.7.2 Os microrganismos na contaminação dos alimentos

A designação de microrganismo ou, utilizando um termo mais comum, micróbio, é aplicável a todos os seres vivos cuja visualização não é possível a olho nú, tornando-se assim necessária a utilização do

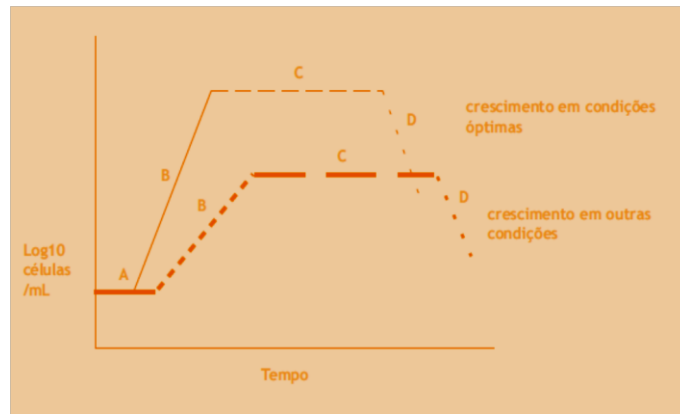
microscópio que permite observar objetos cujo tamanho é da ordem do micrómetro. Os microrganismos são fundamentais na obtenção de alguns produtos alimentares, mas são também os principais responsáveis pela deterioração de grande parte dos alimentos e culturas. Além disso, têm um papel muito importante no envenenamento de origem alimentar sendo as bactérias, sem dúvida, os principais agentes[52].

São diversos os fatores que contribuem para a presença destes microrganismos nos alimentos, sendo que a presença endógena e as contaminações cruzadas são frequentemente apontados como as principais “fontes” de microrganismos para os alimentos. O seu crescimento nos alimentos é potenciado por diversos fatores e, se nem todos têm a mesma importância relativamente ao seu efeito no crescimento microbiano, todos eles devem ser tidos em conta quando se trata de prevenir a ocorrência de toxinfecções de origem alimentar[52].

Se à contaminação se juntarem os nutrientes (existentes em todos os alimentos), tempo e temperaturas de armazenagem inadequadas, existem todas as condições para que os microrganismos possam crescer e permanecer nos alimentos causando, com a sua ingestão ou com a ingestão das suas toxinas, os sintomas característicos dos diversos tipos de toxinfecção de origem alimentar. Estes microrganismos são também os principais responsáveis pela deterioração de alimentos e produtos alimentares. Quantas vezes não vamos dar com um pedaço de carne, ou sobras de uma refeição estragada mesmo quando guardada no frigorífico? A que se deve tal alteração? Que fatores contribuem para que tal possa acontecer? Para responder a estas questões convém conhecer um pouco sobre o crescimento microbiano e sobre os fatores que podem influenciar esse crescimento.

Quando se fala em crescimento microbiano, subentende-se que se trata do aumento do número de células. Esse crescimento em muitos casos ocorre por divisão binária compreendida em quatro fases distintas: fase de latência ou de adaptação, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte [53]. A velocidade de crescimento será maior quando todas as condições estão otimizadas e, qualquer alteração dessas condições ótimas afeta a taxa temporal de crescimento microbiano (Figura 1.12). Uma maior velocidade de crescimento num determinado alimento significa maior gasto de nutrientes, o que por sua vez implica maiores alterações. Torna-se assim evidente que, de uma forma geral, a deterioração alimentar está em parte relacionada com o crescimento microbiano e com os seus efeitos sobre os alimentos. No entanto, os microrganismos não se limitam a utilizar (consumir) os nutrientes presentes nos produtos alimentares. Aí, eles vão produzir e modificar os compostos presentes, originando alterações que dão indicação de deterioração. O surgimento de mucosidade, aromas e sabores anormais, são algumas das consequências do crescimento microbiano nos alimentos. Os microrganismos responsáveis por estas alterações são globalmente designados microrganismos de alteração ou de deterioração[52].





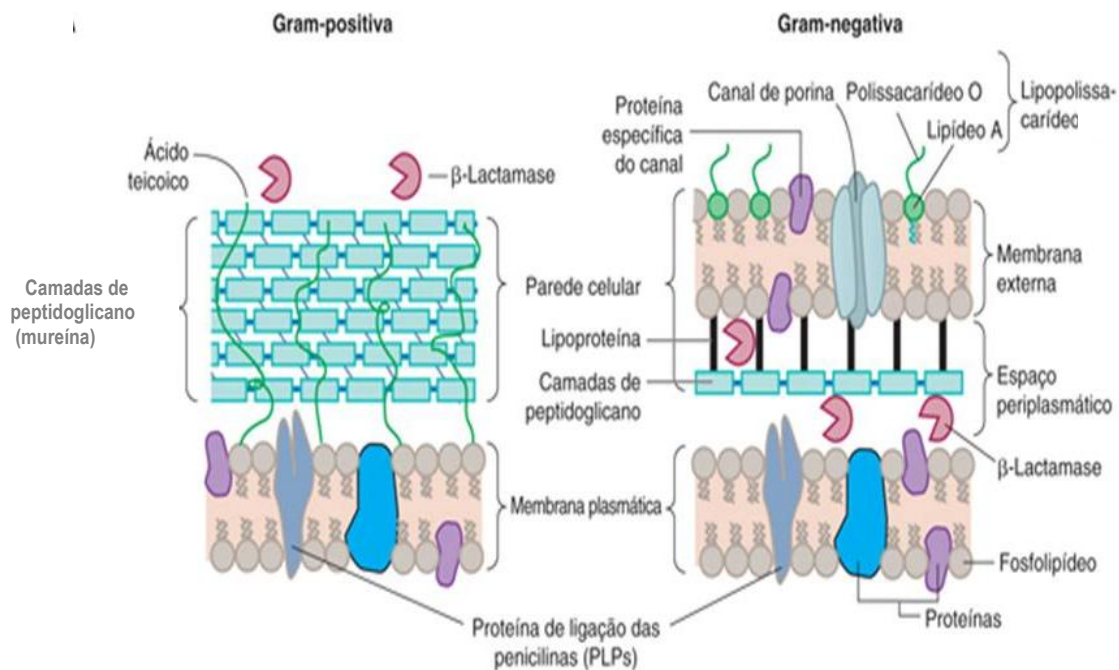
**Figura 1.12.** Fases de crescimento microbiano em meio líquido. A - Fase de adaptação, B- Fase exponencial; C-Fase estacionária; D - Fase de morte [54]

### 1.7.3 Principais grupos de microrganismos relevantes no contexto alimentar

Os principais grupos de microrganismos, em especial aqueles que têm maior importância no que diz respeito à Higiene e Segurança Alimentar distinguem-se em bactérias, bolores e leveduras.

Entre eles, as bactérias formam o grupo mais importante, quer pela diversidade, quer pela maior frequência das suas ações. Em condições favoráveis, são capazes de se multiplicar rapidamente à custa dos nutrientes dos alimentos, alterando-os ou simplesmente aí permanecendo e, por vezes, causando toxinfecções. São organismos unicelulares, que podem apresentar várias formas: esférica (cocos); cilíndrica (bacilos) e espiralada (espirilos)[55].

As bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas. Apesar desta classificação ter por base uma técnica de coloração, cuja aplicação cora de violeta as bactérias Gram-positivas, e de rosa as Gram-negativas, a diferença na capacidade de reter a coloração violeta depende da composição da parede celular bacteriana. Assim, a parede celular das bactérias Gram-positivas possui apenas uma camada de peptidoglicano bastante espessa enquanto a das bactérias Gram-negativas para além da camada de peptidoglicano bem mais fina, tem também uma camada externa de membrana lipoproteica com polissacarídeos (Figura 1.13.)



**Figura 1.13.** Comparação das estruturas e das composições das paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [56]

Nos estudos microbiológicos desenvolvidos no âmbito deste projeto destinados a testar a capacidade antimicrobiana das diversas formulações de revestimentos edíveis em análise, foram utilizadas duas estirpes bacterianas distintas e muito relevantes no que toca a infeções e intoxicações de origem alimentar: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*[57].

A *Escherichia coli* é um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de uma variedade de animais. São bactérias Gram-negativas, não esporuladas, capazes de fermentar glicose produzindo ácido e gás. A presença de coliformes é indicadora, que para além de refletir as condições higiénico-sanitárias durante a produção e/ou armazenamento, levantam a suspeita da existência de patógenos provenientes da mesma fonte de contaminação[58].

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica (cocos) que aparece aos pares no exame microscópico, em cadeias curtas ou em cachos similares aos da uva ou em grupos. É uma Gram positiva, sem mobilidade, sendo que algumas cepas produzem uma toxina proteica altamente termo-estável patogénica em humanos. A toxina é produto da multiplicação da bactéria nos alimentos sujeitos a temperaturas inadequadas. Muitas das 32 espécies e subespécies do género *Staphylococcus* são potencialmente encontradas em alimentos devido a contaminação humana, animal e ambiental[59].

## 1.7.4 Controle e destruição microbiana; uso de conservantes

O controle e destruição microbiana na indústria alimentar pode ser feito por métodos diretos, como por exemplo tratamentos térmicos (pasteurização, esterilização, limpeza e desinfecção, uso de ultrassons ou altas pressões entre outros), ou por métodos indiretos que vão desde a fermentação, a desidratação, fumagem, uso de conservantes ou de atmosferas modificadas[54].

Em particular, os conservantes são substâncias químicas sintéticas ou naturais que inibem o crescimento e a atividade de microrganismos (específicos ou genéricos). A sua eficácia depende do tipo de microrganismo e da sua concentração no alimento. As substâncias com ação conservante podem ter origem no crescimento de microrganismos no produto, como por exemplo o ácido lático que surge em produtos cárneos curados; podem ser adicionados de forma intencional, sendo nesse caso designados de conservantes químicos e classificados de acordo com o seu campo de ação em antimicrobianos, antioxidantes e inibidores enzimáticos sendo a sua utilização regulamentada e limitada por legislação. Existem ainda outras substâncias com ação conservante e que são usadas na indústria de produtos cárneos como por exemplo: especiarias (canela, cominho negro, cardamomo, entre outros), condimentos (alho, cacau, limão, café, etc), fumo de lenha e antibióticos (nisina, natamicina, etc). O mecanismo de ação dos conservantes nos microrganismos pode ser efetuado a nível do DNA, da síntese proteica, da atividade enzimática, na membrana celular, na parede celular ou interferir no mecanismo de transporte de nutrientes. Assim, a ação antimicrobiana dos conservantes pode envolver a acidificação do meio externo; acidificação do citoplasma; ação sobre os lípidos e proteínas das membranas; sequestro de metais ou ação sobre o metabolismo microbiano. A utilização combinada de conservantes é também uma estratégia usual destinada a ampliar o espectro de ação antimicrobiana, conseguir efeitos sinérgicos e reduzir a concentração individual de conservantes nos produtos alimentares. É também comum usar os conservantes associados a métodos físicos de conservação como os tratamentos térmicos, a irradiação, refrigeração, uso de altas pressões entre outros[54].

Os surfactantes à base de arginina assumem-se na atualidade como uma classe importante de compostos ativos com atividade antimicrobiana face a um largo espectro de bactérias, apresentando uma boa biodegradabilidade e baixa toxicidade[60]. Estas características bem como o uso de matérias-primas naturais como a arginina e ácidos gordos na sua síntese fazem deles candidatos interessantes como conservantes e antisépticos em formulações alimentares, farmacêuticas e cosméticas. Um exemplo de um surfactante à base de aminoácidos é o Mirenat®-N (Lauryl arginine ethylester). Trata-se de um composto antimicrobiano derivado de ácido láurico, L-arginina e etanol, todas substâncias naturais. As suas características mais notáveis passam por uma eficácia antimicrobiana de largo espectro, elevado coeficiente de partição, atividade num largo intervalo de pH (3 a 7) e segurança. O Mirenat®-N é hidrolisado no corpo humano e reconhecido como GRAS (generally recognized as safe) pela FDA (Food and Drug Administration). O CAE (Cocoyl arginine ethylester), também incluído na categoria dos tensoativos à base de aminoácidos, irá ser testado no decorrer

deste projeto na formulação de revestimentos edíveis dadas as semelhanças estruturais ao Mirenat® e propriedades reconhecidas como conservante.

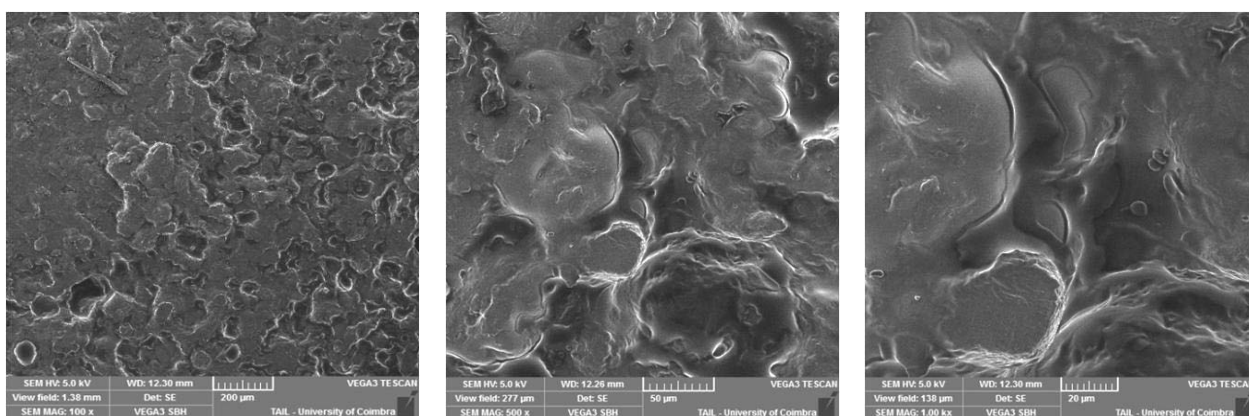
O mecanismo de atuação destes biocidas catiónicos assenta na sua elevada afinidade (*binding*) para com a membrana citoplasmática. Após interação, a cauda hidrofóbica do tensioativo penetra no interior da membrana, também hidrofóbica, levando a uma progressiva perda do material citoplasmático perturbando a morfologia da membrana bem como as funções da mesma (respiração, transporte de solutos e biossíntese) conduzindo assim à morte celular[61].

## Capítulo 2

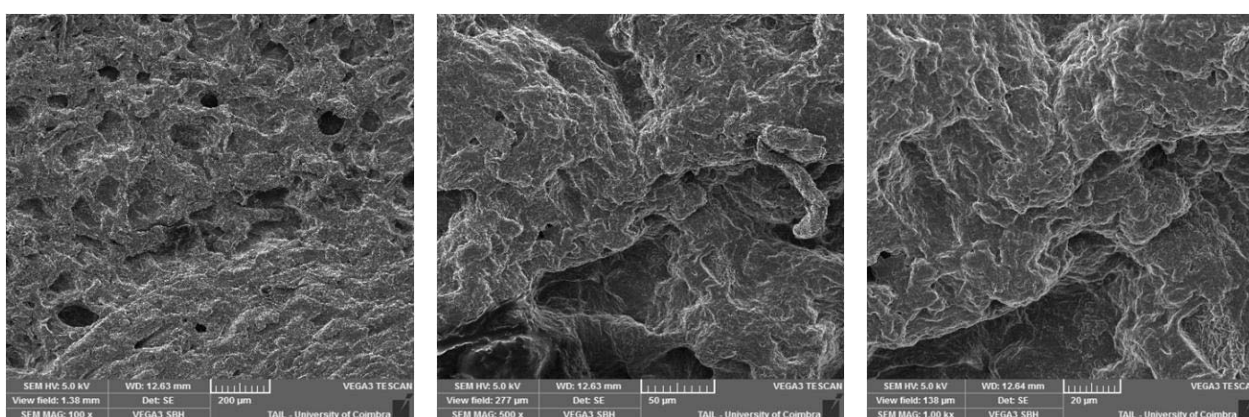
### 2. Resultados e Discussão

#### 2.1 Caracterização dos produtos cárneos fatiados

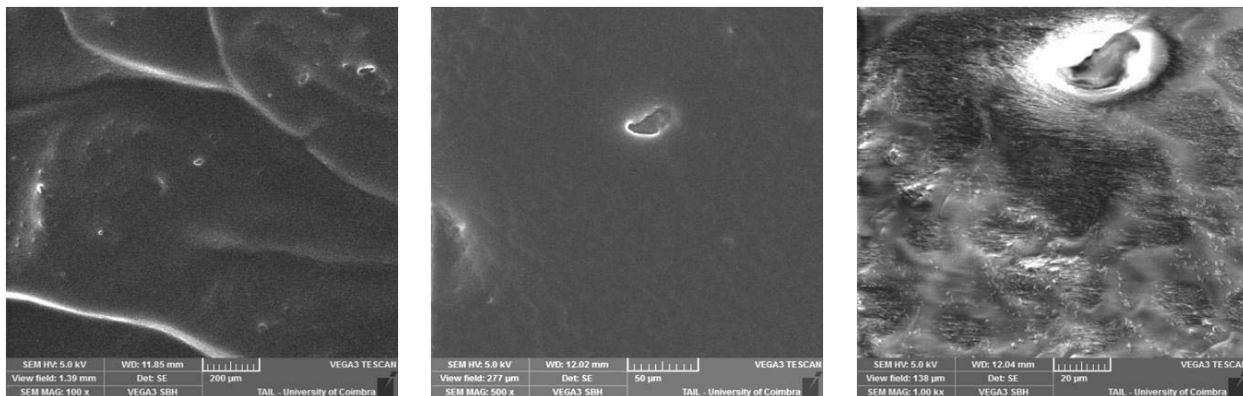
A fim de proceder a uma caracterização mais completa dos produtos cárneos, inicialmente foi utilizada a técnica de SEM em modo convencional de modo a permitir uma análise microestrutural mais fina. As imagens de SEM dos produtos em análise são apresentadas da Figura 2.1 à Figura 2.4.



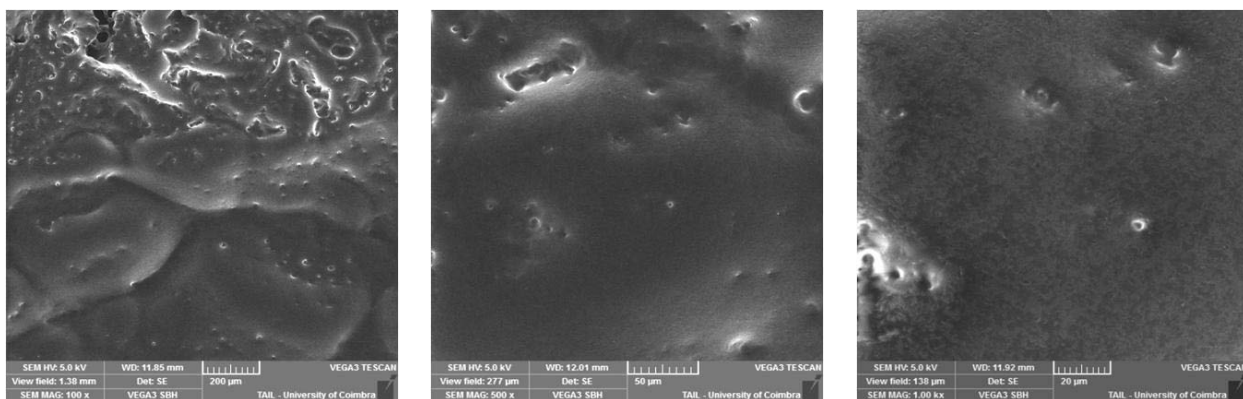
**Figura 2.1** Imagens do peito de peru desidratado nas ampliações de 100, 500 e 1000x. As amostras foram conservadas na zona de refrigeração do frigorífico à temperatura média de 4°C dentro da embalagem fechada até ao momento de realização do teste.



**Figura 2.2** Imagens do fiambre da perna extra desidratado nas ampliações de 100, 500 e 1000x. As amostras foram conservadas na zona de refrigeração do frigorífico à temperatura média de 4°C dentro da embalagem fechada até ao momento de realização do teste.



**Figura 2.3** Imagens do bacon desidratado (zona magra) nas ampliações de 100, 500 e 1000x. As amostras foram conservadas na zona de refrigeração do frigorífico à temperatura média de 4°C dentro da embalagem fechada até ao momento de realização do teste.



**Figura 2.4** Imagens do bacon desidratado (zona gorda) nas ampliações de 100, 500 e 1000x. As amostras foram conservadas na zona de refrigeração do frigorífico à temperatura média de 4°C dentro da embalagem fechada até ao momento de realização do teste.

A morfologia das amostras observada no SEM aponta para a existências de grandes diferenças a nível da sua microestrutura. O peito de peru apresenta-se com uma morfologia mais compacta, enquanto o fiambre de porco se apresenta com um aspeto mais “moído”, dando ideia de maior processamento da carne durante a preparação do fiambre. A zona gorda do bacon apresenta-se sem grandes irregularidades na morfologia devido à pouca firmeza da gordura.

A textura do produto é também um fator de extrema importância já que influencia a perceção do consumidor sobre a sua qualidade. A caracterização texturométrica das amostras de produtos cárneos (Figura 2.5 a **Figura 2.7**) no seu estado original foi feita com o propósito de a podermos comparar numa fase posterior com a caracterização texturométrica dos produtos cárneos tratados com o revestimento edível cuja aplicação se pretende que seja o mais inócua possível no que concerne à preservação das propriedades organoléticas destes produtos.

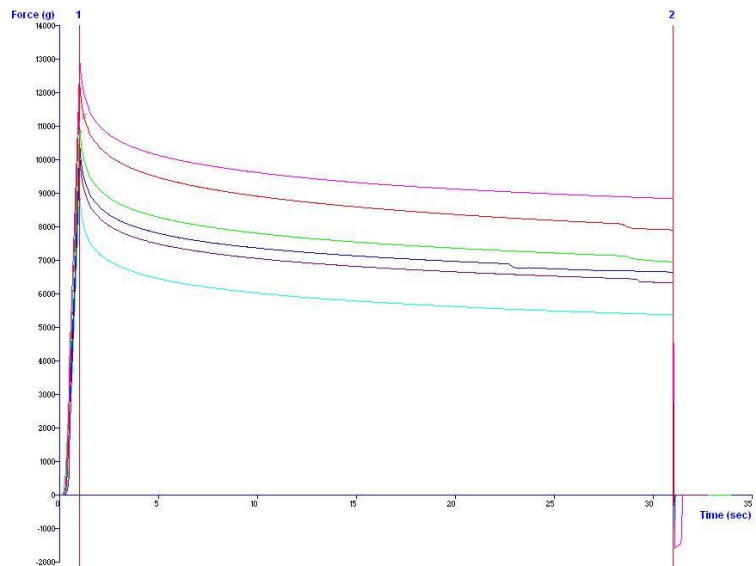


Figura 2.5 Firmeza do peito de peru avaliada em função do tempo

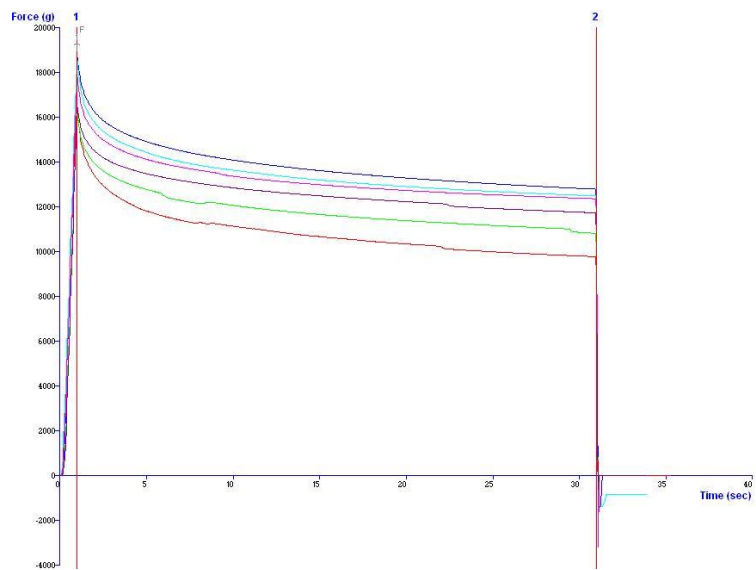
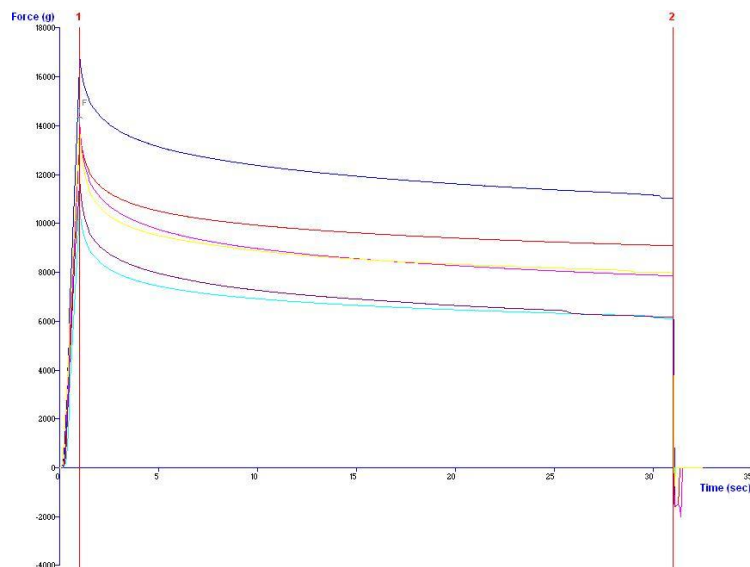


Figura 2.6 Firmeza do fiambre de perna extra avaliada em função do tempo



**Figura 2.7** Firmeza do bacon avaliada em função do tempo

A partir dos dados experimentais obtidos no decorrer da análise texturométrica foi determinada a firmeza e a elasticidade média para cada amostra em análise.

A firmeza é definida como a força (em gramas-força, quilogramas-força ou newtons) ou de modo simplificado em gramas ou quilogramas, necessários para comprimir o produto a uma altura pré-definida, por exemplo 25% da altura inicial da amostra. O tratamento estatístico dos dados obtidos permite determinar a firmeza para cada amostra em estudo, sendo esta representada pela média aritmética dos valores obtidos para cada um dos seis ensaios realizada acompanhada do respectivo desvio padrão conforme está patente na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** Valores de firmeza para os produtos cárneos em análise

<b>Amostra</b>	<b>Firmeza /g</b>
<b>Peito de peru</b>	11078 ± 1466 (n=6)
<b>Fiambre de perna extra</b>	17552 ± 1146 (n=6)
<b>Bacon</b>	13640 ± 2125 (n=6)

Os resultados obtidos revelam que o fiambre da perna extra apresenta maior valor de firmeza sendo que os outros dois produtos em estudo apresentam valores semelhantes e mais baixos para este parâmetro. A natureza e morfologia das matérias-primas utilizadas bem como o grau de processamento destes produtos poderão estar na base destes resultados. O fiambre de perna extra apresenta uma percentagem de carne de 74% e um teor de humidade de 21%, por sua vez o peito de peru apresenta uma percentagem de carne de 60% e um teor de humidade de 30,5%. O bacon apresenta uma percentagem de carne de 87% e um teor de



humidade de 5,6%. Partindo destes dados constantes na ficha técnica dos produtos, salienta-se que apesar do bacon apresentar maior percentagem de carne da sua composição, a heterogeneidade deste produto é determinante nos valores mais baixos de firmeza registados entre as três amostras em estudo. Comparando com o peito de peru, a maior firmeza registada para a amostra de fiambre da perna extra é explicada pela maior percentagem de carne aliada a um teor de humidade mais baixo na sua composição.

A elasticidade de cada uma das amostras foi outro dos parâmetros calculados, sendo a sua determinação feita através da seguinte relação:

$$\text{Taxa de recuperação} = \frac{F_{30}}{F_{\text{max}}} \times 100$$

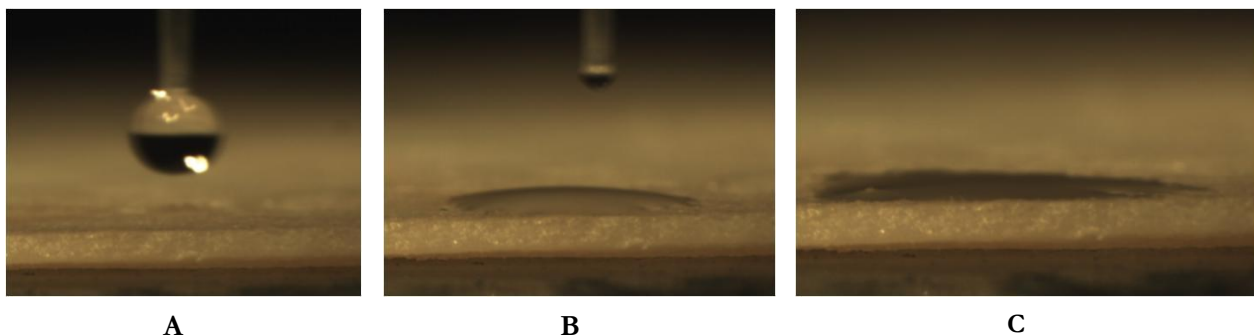
em que a taxa de recuperação é uma medida da elasticidade do produto,  $F_{30}$  designa a força medida após 30s de teste e  $F_{\text{max}}$  designa a força máxima. Os resultados obtidos para este parâmetro estão apresentados na Tabela 2.2 salientando que quanto mais próximo de 100% estiver o resultado, mais elástico o produto é considerado.

**Tabela 2.2** Valores da elasticidade para os produtos cárneos em análise

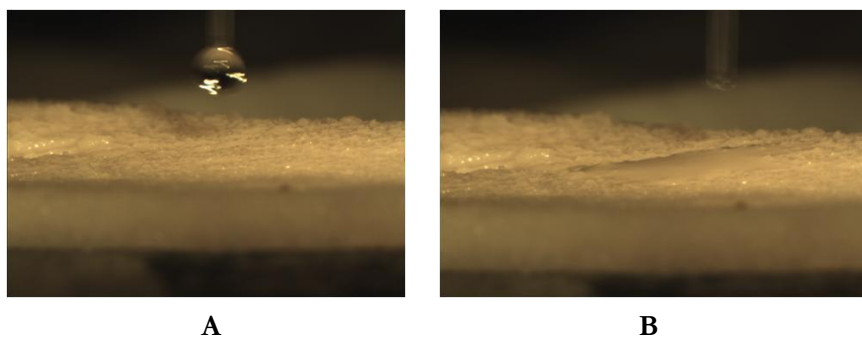
<b>Amostra</b>	<b>Elasticidade (%)</b>
<b>Peito de peru</b>	55,6 ± 3,6 (n=6)
<b>Fiambre de perna extra</b>	61,8 ± 3,9 (n=6)
<b>Bacon</b>	51,1 ± 6,8 (n=6)

Os resultados medidos para este parâmetro acompanham de forma tendencial os valores medidos para a firmeza destes produtos como de resto seria expectável. Assim, o fiambre de perna extra apresenta uma firmeza e elasticidade em média superior ao bacon e ao peito de peru. Salienta-se que este produto apresenta cumulativamente maior homogeneidade morfológica quando comparada com a do bacon e a sua composição química aponta para a uma % de carne superior e um teor de humidade inferior ao peito de peru.

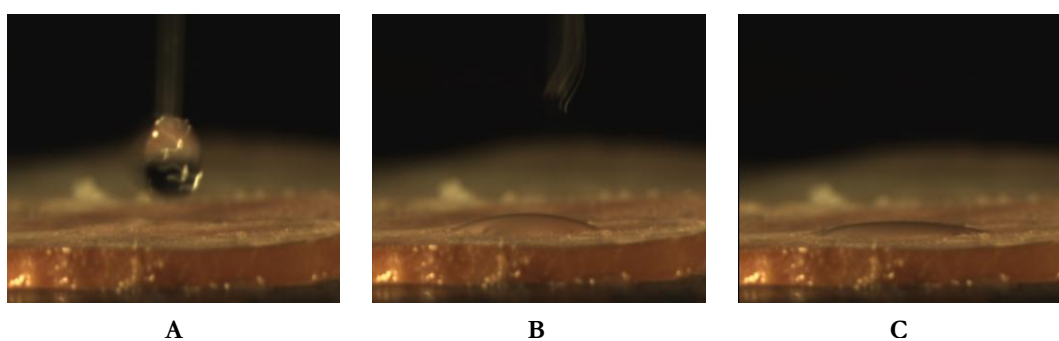
Sendo a água o solvente de eleição a usar nas formulações de revestimentos edíveis, a análise da afinidade da superfície dos produtos cárneos com este líquido assume grande importância. Pretende-se que o revestimento de base aquosa adira à superfície do produto de forma homogénea de modo a assegurar uma proteção antimicrobiana e antioxidante o mais eficaz possível, prolongando o tempo de prateleira do produto com dispensa do uso de atmosfera protetora na embalagem. Apresentam-se de seguida (Figura 2.8 à Figura 2.11) as imagens relativas aos testes de hidrofobicidade efetuados em diferentes instantes para cada um dos produtos em análise. Um maior achatamento da gota poucos instantes após ter entrado em contacto com a superfície sugere maior afinidade da superfície da amostra em estudo com a água, o que permite classificar a superfície em hidrofílica.



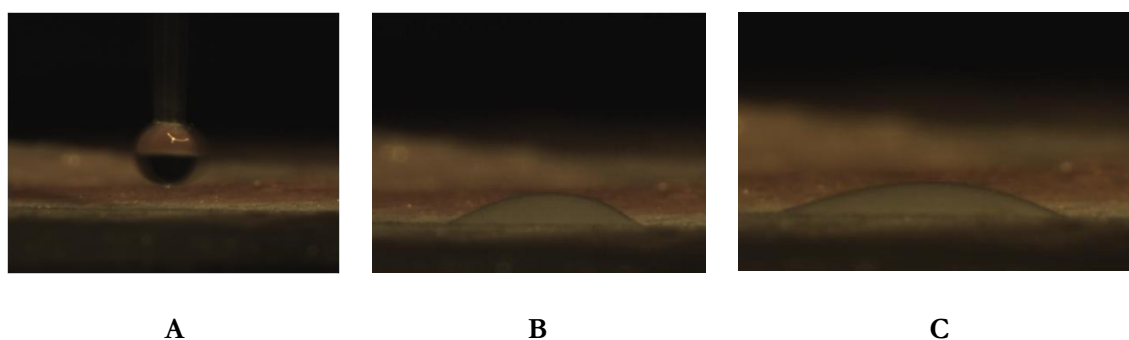
**Figura 2.8** Estudo de hidrofobicidade em fiambre da perna extra; A- adição da gota de água; B - instante inicial após contacto entre a gota de água e a superfície; C- morfologia da superfície de contacto entre a gota de água e a amostra 3 segundos após a adição.



**Figura 2.9** Estudo de hidrofobicidade no peito de peru A- adição da gota de água; B - morfologia da superfície de contacto entre a gota de água e a amostra imediatamente após a adição.



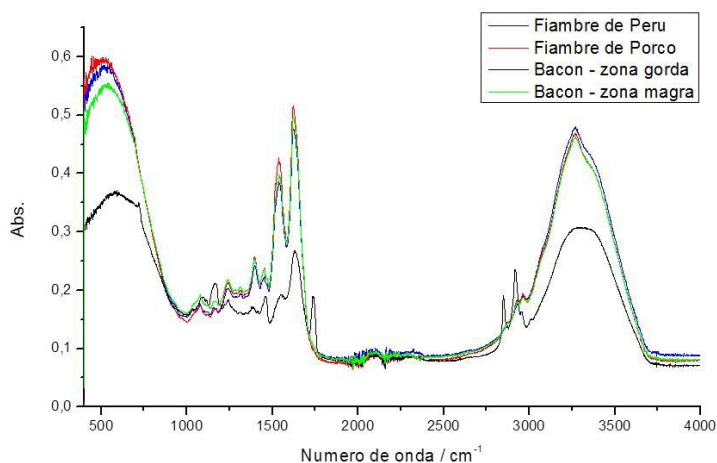
**Figura 2.10** Estudo de hidrofobicidade no bacon (zona magra) A- adição da gota de água; B - instante inicial após contacto entre a gota de água e a superfície; C- morfologia da superfície de contacto entre a gota de água e a amostra 3 segundos após a adição.



**Figura 2.11** Estudo de hidrofobicidade em bacon (zona gorda) A- adição da gota de água; B - instante inicial após contacto entre a gota de água e a superfície; C- morfologia da superfície de contacto entre a gota de água e a amostra 3 segundos após a adição.

Estes resultados permitem concluir que o peito de peru e o fiambre da perna extra apresentam baixa hidrofobicidade compatível com baixo teor de gordura. Relativamente ao bacon, a zona “gorda” apresenta maior hidrofobicidade devido à presença de ácidos gordos de cadeia carbonada longa que, dado o seu carácter maioritariamente apolar, repelem as moléculas de água. Por sua vez, a zona "magra" deste produto apresenta hidrofobicidade mais ligeira o que se pode concluir pelo maior achatamento da gota (Figura 2.10).

De seguida, com o intuito de obter informações moleculares e estruturais mais detalhadas e vitais na compreensão das interações químicas entre o revestimento e os produtos cárneos fatiados, foi usada a espectroscopia FTIR-ATR em amostras de peito de peru, fiambre de porco e bacon. Neste último, dada a sua heterogeneidade marcante, foi feita a análise em duas zonas distintas - zona "gorda " e zona "magra". A figura seguinte (Figura 2.12) apresenta o espectro obtido para as amostras em análise.



**Figura 2.12** Espectro de FTIR-ATR da superfície do Fiambre de Peru, Fiambre de Porco e Bacon (zona gorda e magra).

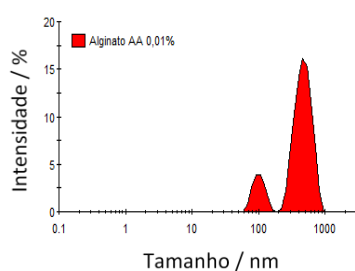
Da análise do FTIR não se verificam diferenças significativas entre o fiambre de porco, o de peru e a parte magra do bacon. Apenas a zona gorda do bacon apresenta bandas diferentes das observadas para os outros produtos, possivelmente devido à elevada concentração de ácidos gordos, sendo de salientar a banda situada a cerca de  $1700\text{ cm}^{-1}$  proveniente da vibração C=O do grupo carboxilo dos ácidos gordos, bem como a vibração C-H presente a aproximadamente  $3000\text{ cm}^{-1}$ , característica de cadeias carbonadas.

## 2.2 Caraterização de biopolímeros a utilizar na formulação de revestimentos edíveis

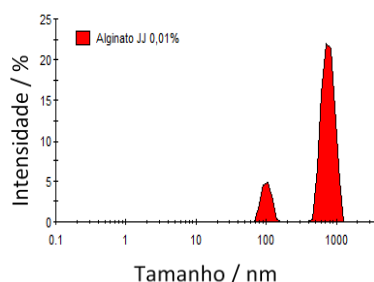
### 2.2.1 Caraterização do Alginato

Com o intuito de proceder à caraterização de matérias primas após seleção de materiais poliméricos potencialmente adequados à formulação de revestimentos edíveis, foram preparadas soluções aquosas diluídas de alginato a concentrações de 0,05% ; 0,1%; 0,5%; 1% e 2%(m/m). O estudo incidiu em três referências diferentes de alginato: alginato da Alfa Aesar (AA) com pH 5,0 -7,5 e viscosidade 40-90 MPa.s (1% em solução aquosa); alginato da VWR Chemicals (VWR) com pH de 5,5-7,5 (1% em solução aquosa) e alginato da Shandong Jiejing Group Corporation (JJ) com viscosidade 636 mPa.s (1% em solução aquosa).

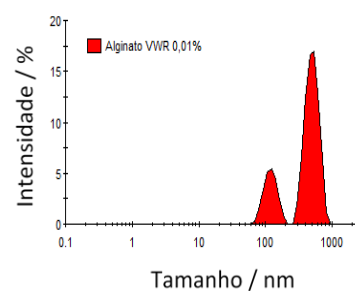
A determinação do tamanho de partícula das três soluções de alginato foi feita recorrendo à técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS) utilizando para tal soluções a 0,01%(m/m) a pH neutro. As medições foram efetuadas à temperatura ambiente estando a distribuição de tamanhos representada da Figura 2.13 à Figura 2.15.



**Figura 2.13.** Distribuição do tamanho das partículas da solução de alginato AA.



**Figura 2.14.** Distribuição do tamanho das partículas da solução de alginato JJ.



**Figura 2.15.** Distribuição do tamanho das partículas da solução de alginato VWR.

A análise dos gráficos anteriores permite concluir que todas as soluções em análise apresentam duas populações de partículas. Das três referências de alginato em estudo, o alginato JJ é o que possui partículas de

maiores dimensões, com a maior população encontrada a apresentar um tamanho médio de partícula a 770,0 nm descendo para 504,8 nm no caso do alginato VWR e para 480,9 nm no alginato AA. Estes valores de tamanho de partícula elevados remetem-nos para o facto das partículas se encontrarem aglomeradas em solução. A existência de agregados de maiores dimensões remete para maior massa molecular do polímero. Perante a indisponibilidade de dados nas fichas técnicas destes polímeros, através da realização de estudos reológicos espera-se obter um suporte científico complementar e mais robusto para esta ideia.

De seguida foi feito um estudo do efeito da concentração polimérica no pH da solução, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.3. Pode constatar-se que existem ligeiras diferenças de pH em função da concentração e consoante o fabricante, no entanto estas diferenças não são significativas.

**Tabela 2.3** Valores de pH das soluções de alginato com diferentes concentrações.

Concentração de polímero/ % (m/m)	pH		
	Alginato AA	Alginato JJ	Alginato VWR
0,05	6,99	7,43	6,98
0,1	7,45	7,44	7,60
0,5	7,48	7,47	6,39
1	7,47	7,27	7,10
2	7,49	7,61	6,77

Atendendo à definição aproximada de pH como o logaritmo negativo da concentração de  $H^+$ , ou seja  $pH \approx -\log [H^+]$ , uma solução é ácida se  $[H^+] > [OH^-]$  e básica se  $[H^+] < [OH^-]$ , o que corresponde a um valor de pH abaixo e acima de 7, respetivamente, a uma temperatura de 25°C. Ora, atendendo à constituição monomérica do alginato; que é feita a partir de dois ácidos fracos: ácido manurónico ( $pK_a=3,38$ ) e ácido glucurónico ( $pK_a=3,65$ ) [43], para um dado valor de temperatura, o valor de  $pK_a$  dos grupos ionizáveis do alginato permanece constante pelo que a extensão da sua ionização em solução aquosa não sofre variação significativa com a concentração inicial da solução. Logo, ao ser atingido o equilíbrio em solução a concentração de  $H^+$  permanece inalterada pelo que o pH não sofre variação significativa.

Foi também feita uma análise reológica destas soluções, através da determinação da viscosidade em função da tensão de cisalhamento, a 5 e 20 °C, estando os resultados apresentados da Figura 2.16 à Figura 2.21. Em todos os casos é possível observar que existe um aumento da viscosidade com o aumento da concentração de polímero, visto que o aumento da concentração de polímero promove o entrelaçamento das cadeias, tornando a solução mais viscosa. O alginato AA apresenta um comportamento newtoniano até uma concentração de 1% (m/m), visto que o aumento da tensão de cisalhamento não influencia a viscosidade da solução. Acima desta concentração, elevadas tensões de cisalhamento provocam uma diminuição da viscosidade, sendo este fenómeno característico de fluidos pseudoplásticos. No alginato JJ e VWR este comportamento já é notório a partir de 0,5 % (m/m) de concentração.

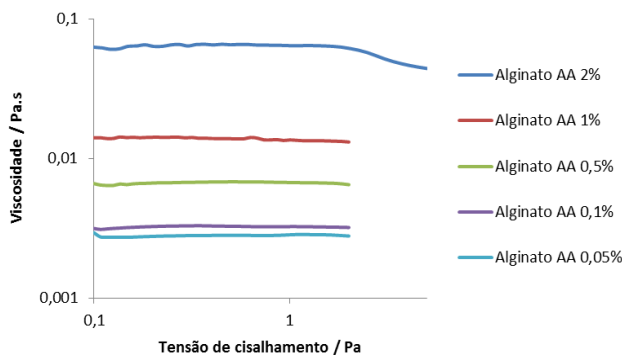


Figura 2.16 Curvas de fluxo do alginato AA a 5 °C.

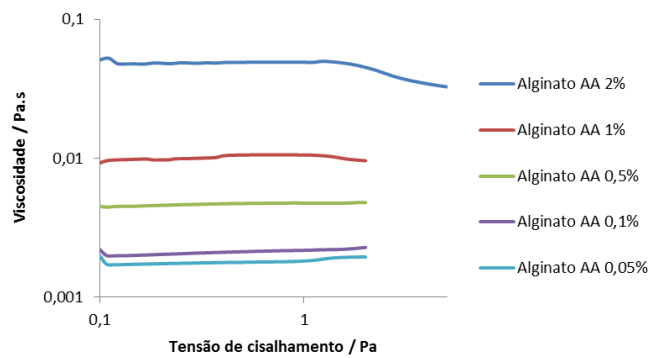


Figura 2.17 Curvas de fluxo do alginato AA a 20 °C.

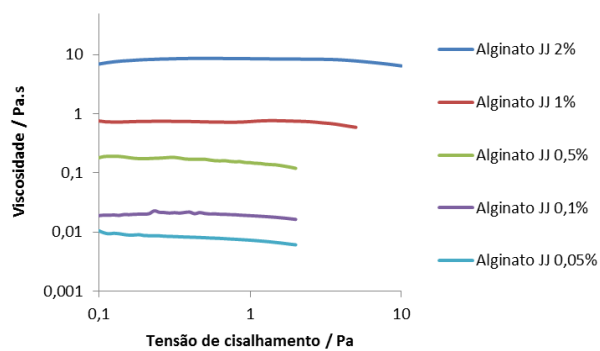


Figura 2.18. Curvas de fluxo do alginato JJ a 5 °C.

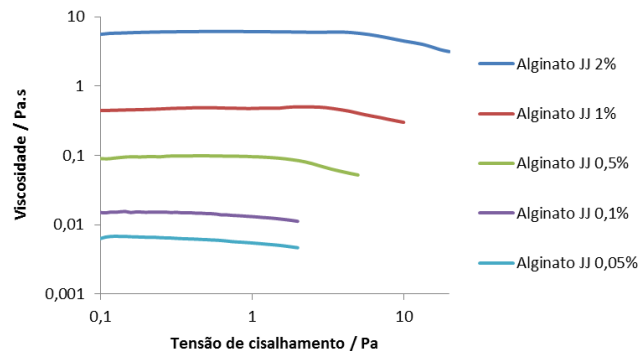


Figura 2.19. Curvas de fluxo do alginato JJ a 20 °C.

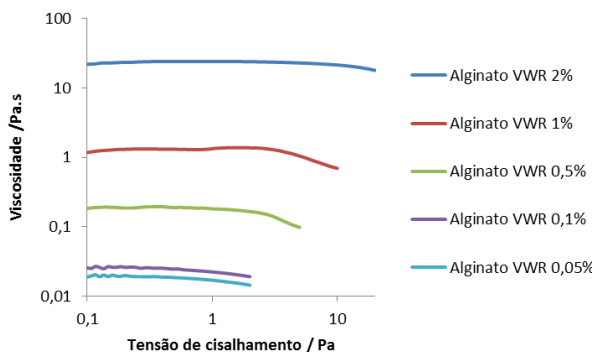


Figura 2.20 Curvas de fluxo do alginato VWR a 5 °C.

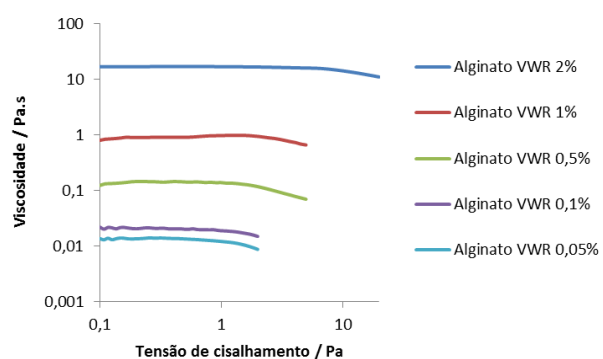
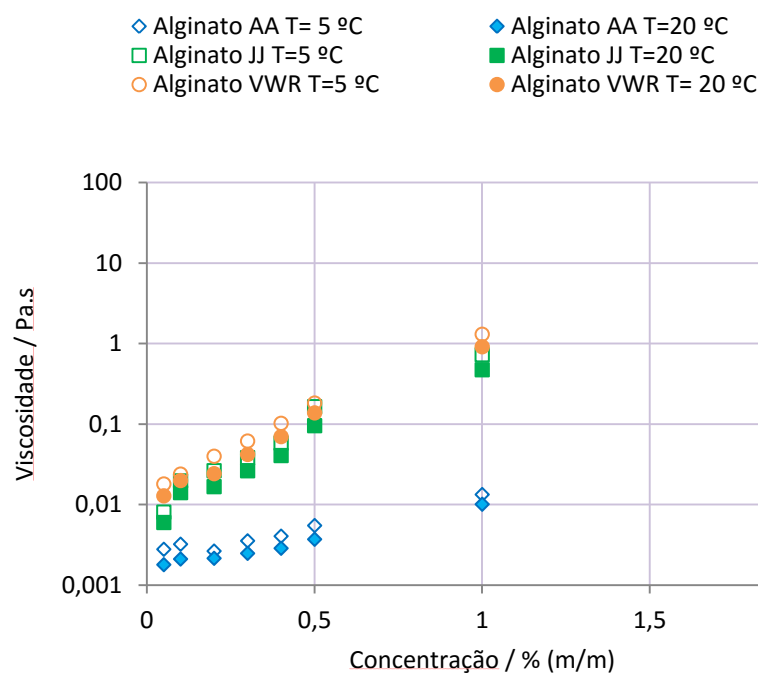


Figura 2.21 Curvas de fluxo do alginato VWR a 20 °C.

A partir das curvas de fluxo acima apresentadas foram determinados os valores da viscosidade newtoniana e de seguida foi feita a análise da variação da mesma com a concentração de polímero em solução (Figura 2.22). Como se pode observar no gráfico, o alginato AA apresenta viscosidades muito inferiores aos restantes alginatos (JJ e VWR).



**Figura 2.22** Viscosidade newtoniana das soluções de alginato AA, alginato JJ e alginato VWR a 5°C e 20 °C

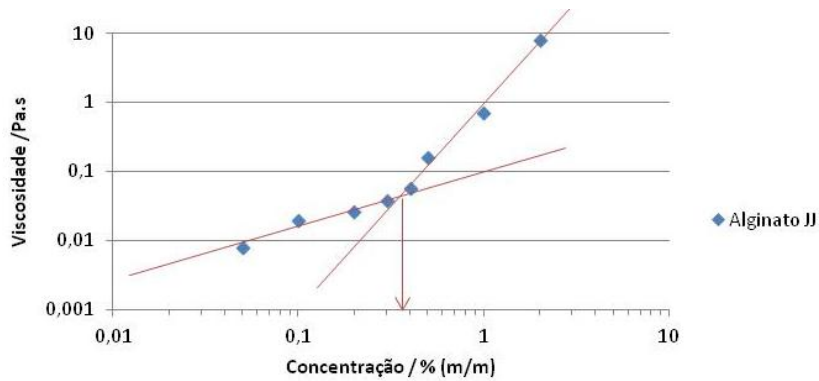
Analisando os valores de viscosidade em função da concentração de polímero, a 5 e 20°C, salienta-se que a viscosidade aumenta com a concentração de polímero em solução. Também é possível observar que existe uma tendência para a viscosidade a 5°C ser superior à viscosidade a 20°C. De notar também que as diferenças de viscosidade a diferentes valores de temperatura são mais acentuadas em soluções de concentração polimérica mais elevada.

Sendo a temperatura um parâmetro relacionado com a energia interna de um sistema, reporta-se que a sua variação produz efeitos na viscosidade de sistemas poliméricos. A temperaturas mais elevadas aumentam os movimentos intermoleculares e o volume livre entre as cadeias; este aumento de volume livre diminui o atrito entre elas bem como a intensidade das forças atrativas e, conseqüentemente, diminui a viscosidade[26].

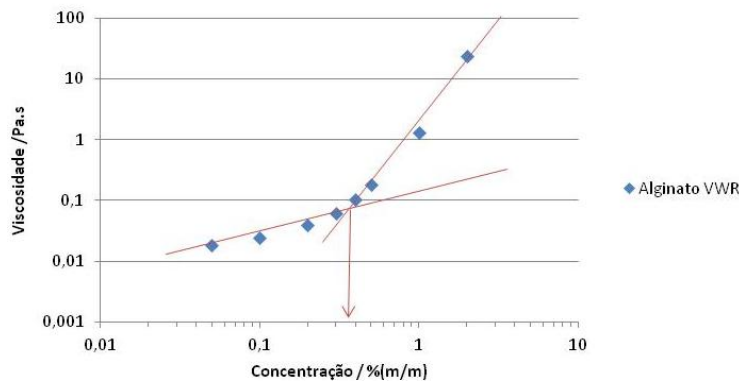
É de salientar também que a baixa viscosidade do alginato AA relativamente às outras duas referências em análise deste biopolímero remete para a existência de uma massa molar média mais baixa, o que suporta os resultados obtidos por dispersão de luz dinâmica segundo os quais este polímero apresenta agregados de menores dimensões.

Dada a importância do estudo da viscosidade das soluções, a que acresce o facto da mesma ser fortemente condicionada pelo entrelaçamento entre as cadeias poliméricas, torna-se importante fazer a determinação do valor da concentração de entrelaçamento para cada uma das soluções poliméricas. Para tal, foi efetuado um ajuste na zona da curva onde a viscosidade se mantém constante com o aumento da taxa de

corde, zona newtoniana. Assim, foram retirados os valores de viscosidade newtoniana a fim de construir um gráfico deste parâmetro em função da concentração da solução. A partir deste gráfico é possível fazer o cálculo da concentração de entrelaçamento como se ilustra de seguida (Figura 2.23 até à Figura 2.28) onde estão representadas as determinações da  $c^*$  para o alginato nas três referências em análise.



**Figura 2.23** Viscosidade newtoniana em função da concentração do alginato JJ, medida a 5°C e pH7. As coordenadas do ponto de interseção das duas retas traçadas permitem ler uma  $c^* \approx 0,37\%$  (m/m) .



**Figura 2.24** Viscosidade newtoniana em função da concentração do alginato VWR, medida a 5°C e pH7. As coordenadas do ponto de interseção das duas retas traçadas permitem ler uma  $c^* \approx 0,38\%$  (m/m)



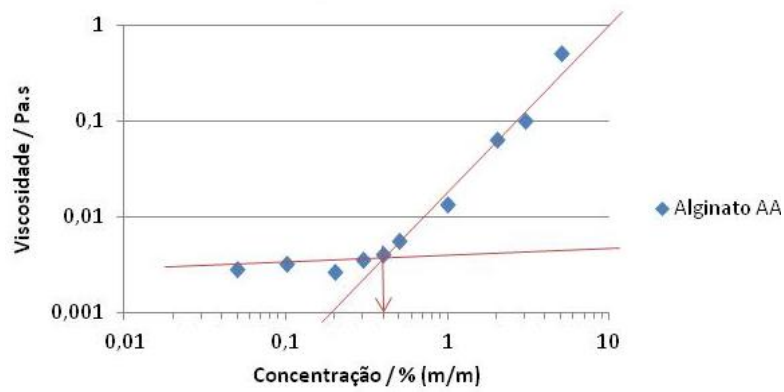


Figura 2.25 Viscosidade newtoniana em função da concentração do alginato AA, medida a 5°C e pH7. As coordenadas do ponto de interseção das duas retas traçadas permitem ler uma  $c^* \approx 0,40\%$  (m/m)

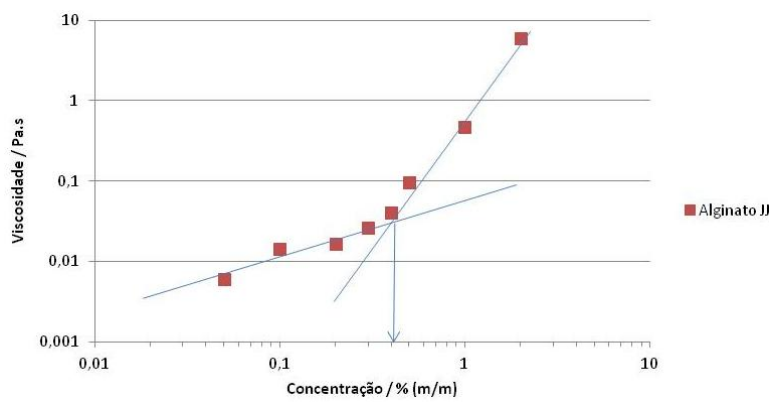


Figura 2.26 Viscosidade newtoniana em função da concentração do alginato JJ, medida a 20°C e pH7. As coordenadas do ponto de interseção das duas retas traçadas permitem ler uma  $c^* \approx 0,42\%$  (m/m)

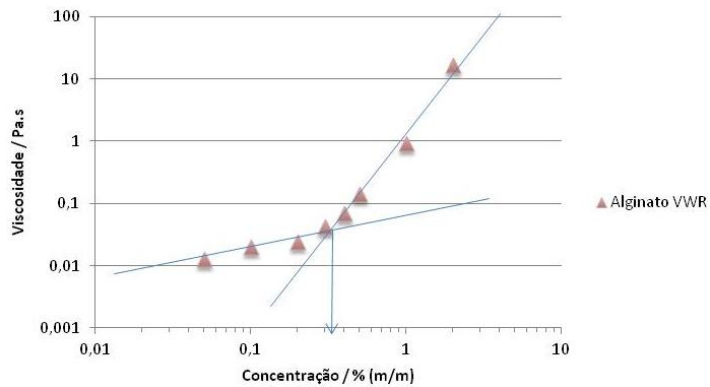
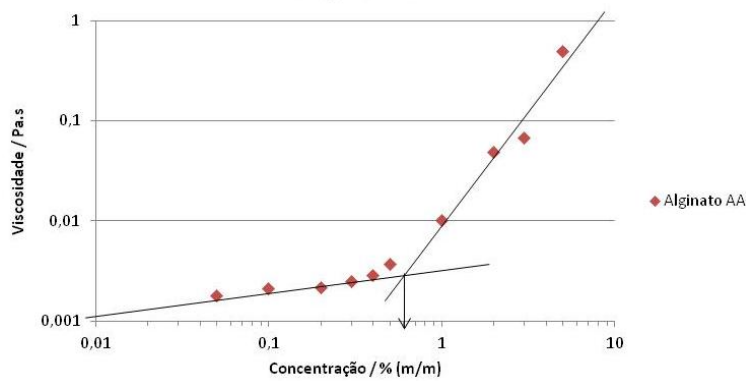


Figura 2.27 Viscosidade newtoniana em função da concentração do alginato VWR, medida a 20°C e pH7. As coordenadas do ponto de interseção das duas retas traçadas permitem ler uma  $c^* \approx 0,36\%$  (m/m)



**Figura 2.28** Viscosidade newtoniana em função da concentração do alginato AA, medida a 20°C e pH7. As coordenadas do ponto de interseção das duas retas traçadas permitem ler uma  $c^* \approx 0,60\%$  (m/m)

Os valores da concentração de entrelaçamento,  $c^*$ , para os polímeros em estudo são apresentados na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4** Concentrações de entrelaçamento,  $c^*$ , do alginato estimadas a 5°C e 20°C

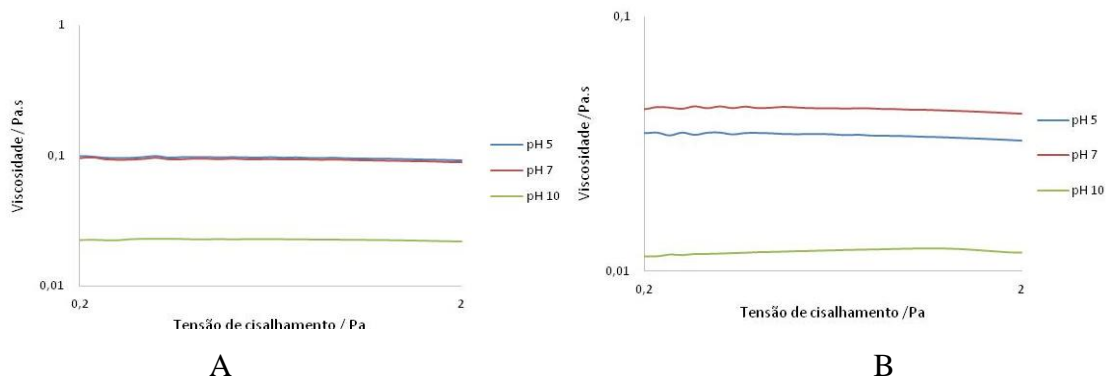
Alginato	$c^*$ (% m/m)	
	5°C	20°C
JJ	0,37	0,42
VWR	0,38	0,36
AA	0,40	0,60

A análise destes resultados permite apurar que para uma dada temperatura, não existem diferenças acentuadas na concentração de entrelaçamento das três referências de alginato em estudo com exceção do alginato AA que apresenta um valor de  $c^*$  superior quando comparado com as outras duas referências. É de recordar que o alginato AA apresenta viscosidades newtonianas inferiores às outras referências em estudo para este biopolímero como está patente no gráfico da Figura 2.22 sendo por isso expectável que a sua concentração crítica seja superior. Presume-se que tal se deve ao facto de este alginato apresentar cadeias poliméricas de menor tamanho, o que leva a que a concentração de polímero necessária para que seja atingido o regime semidiluído seja maior quando comparada com os restantes.

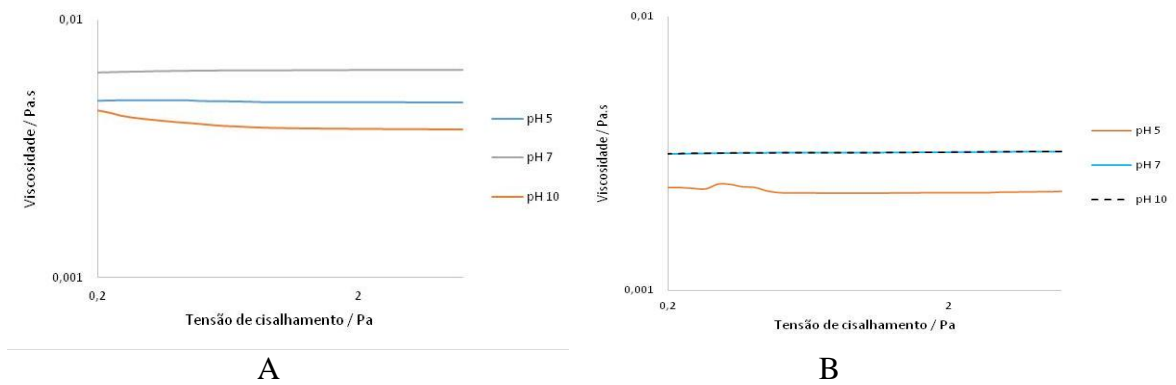
Por sua vez, é de salientar a tendência para um aumento da concentração de entrelaçamento com a temperatura para cada um dos alginatos em estudo. De facto, a temperaturas mais elevadas aumentam os movimentos intermoleculares e o volume livre entre as cadeias leva a uma diminuição da viscosidade pelo que é necessária uma maior concentração de polímero para atingir o limiar em que ocorre um contacto contínuo entre as macromoléculas na solução com formação de uma rede polimérica transitória.

De seguida, com o intuito de investigar o efeito do pH na viscosidade do alginato em solução, foi preparada uma solução deste polímero a 0,5 % (m/m) e foram feitos ajustes de pH para valores de 2, 5, 7 e

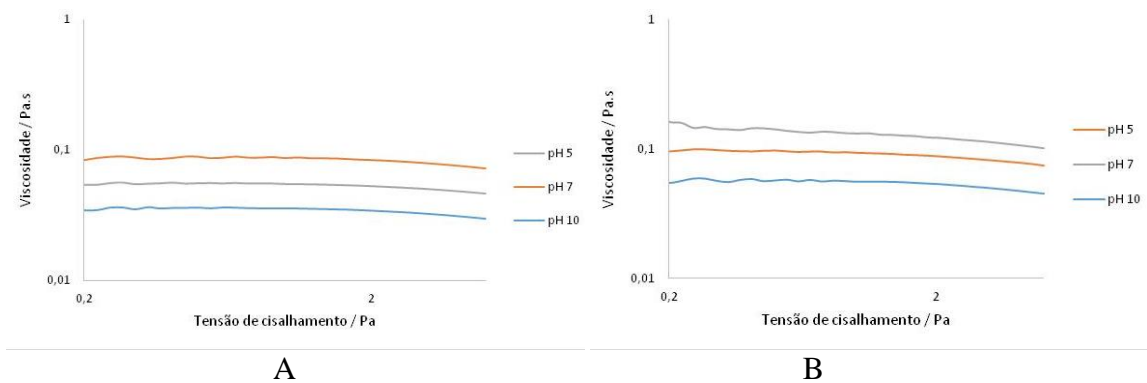
10, com adições de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Foi feito o estudo reológico das soluções preparadas a partir do qual se traçaram as respectivas curvas de fluxo (Figura 2.29 a Figura 2.31).



**Figura 2.29** Estudo da viscosidade do Alginato JJ em função do pH à temperatura de 5°C(A) e 20°C (B)



**Figura 2.30** Estudo da viscosidade do Alginato AA em função do pH a valores de temperatura de 5°C (A) e 20°C(B)



**Figura 2.31** Estudo da viscosidade do Alginato VWR em função do pH à temperatura de 5°C (A) e 20°C(B)

Os resultados obtidos permitem concluir que o alginato é solúvel no intervalo de pH de 5 a 10 enquanto a pH2 apresenta precipitação devido à formação de ácido algínico cujo pKa a 25°C pode variar de 1,5 a 3,5 [62]( Figura 2.32).



**Figura 2.32** Solução de alginato AA a pH2, sendo visível a formação de um precipitado.

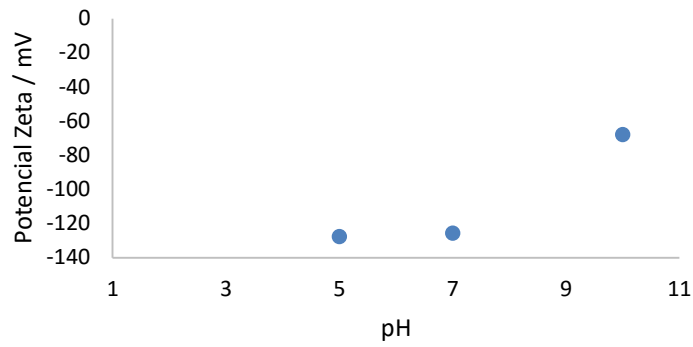
O facto de ocorrer precipitação na solução de pH2, explica-se atendendo aos valores de pKa do ácido manurónico (3,38) e glucurónico (3,65) que são superiores ao pH da solução [43]. Sendo o alginato uma macromolécula que possui grupos ionizáveis ao longo da cadeia, é expectável que esses grupos respondam de forma brusca a alterações de pH perto do pKa correspondente. Quando os grupos se apresentam carregados geram-se repulsões eletrostáticas, e especialmente aumenta a entropia dos contraíões, o que aumenta a solubilidade do polímero. Na sua forma não ionizável, conseguida pela adição de ácido clorídrico através da protonação dos grupos carboxilo, as cadeias tendem a colapsar e a precipitar.

Por sua vez, o aumento de viscosidade das soluções quando o pH passa de 5 para 7(a 20°C) pode ser explicado pela expansão do polímero devido ao efeito das repulsões eletrostáticas provocado pelas cargas que adquiriu durante a desprotonação dos grupos carboxilo ao adicionar hidróxido de sódio à solução. Esta expansão favorece uma maior proximidade entre as cadeias sendo possível a interação entre elas a um nível tridimensional resultando num incremento da viscosidade.

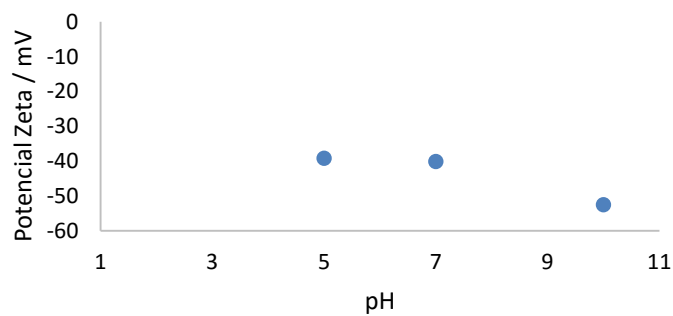
A diminuição de viscosidade registada a pH10 nos dois regimes de temperatura em estudo remete-nos para o efeito de sal proveniente do hidróxido de sódio usado no acerto do pH. A presença de concentrações suficientemente elevadas deste sal promove o *screening* eletrostático entre cargas do polímero e consequente compactação polimérica.

Verifica-se também que, para um dado valor de pH, a viscosidade diminui com a temperatura.

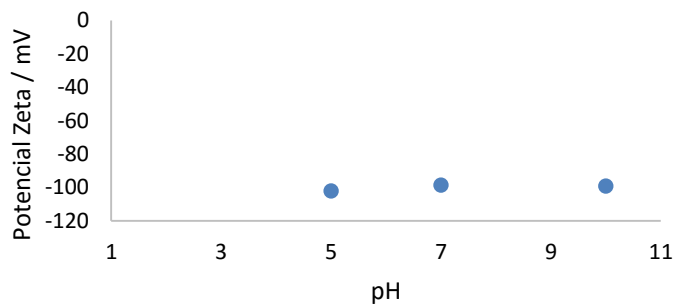
A medição do potencial zeta para estas soluções foi outra das análises realizadas para o alginato com o propósito de investigar a influência do pH na variação de carga do polímero (Figura 2.33 a Figura 2.35).



**Figura 2.33** Variação do Potencial zeta com o pH em soluções de alginato JJ medida a 20°C.



**Figura 2.34** Variação do Potencial zeta com o pH em soluções de alginato AA medida a 20°C.



**Figura 2.35** Variação do Potencial zeta com o pH em soluções de alginato VWR medida a 20°C.

Os resultados obtidos mostram que de pH=5 a pH=7 ocorre uma ligeira variação de densidade de carga com o aumento de pH mas ao aumentar o pH para 10 a variação da densidade de carga é bastante acentuada para o alginato JJ.

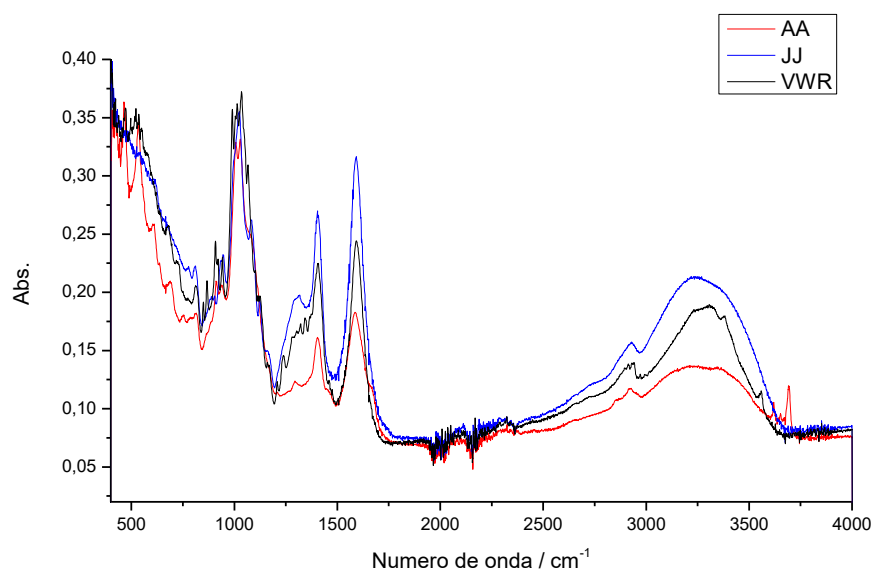
Salienta-se que os biopolímeros em solução apresentam uma superfície que está organizada numa dupla camada elétrica, região interna ou camada de Stern onde se encontram os iões fortemente ligados à superfície e uma região externa ou camada difusa em que se encontram iões ligados à superfície por interações mais fracas. A camada difusa apresenta uma fronteira em que os iões e as nanopartículas formam

uma entidade estável que se designa como plano deslizante e o potencial desta fronteira denomina-se potencial zeta.

Ou seja, as nanopartículas (agregados poliméricos), no caso do alginato a pH acima do pKa apresentam carga negativa. A adição de hidróxido de sódio, feita com o intuito de modificar o pH da solução, conduz a um aumento da concentração de iões sódio,  $\text{Na}^+$ , em solução, o que vai levar a uma maior presença destes iões na camada difusa, logo o potencial desta camada (potencial zeta) vai ficar menos negativo[44] quando comparado com pHs mais baixos (pH 5 e pH 7)

Teoricamente será de esperar que à medida que se diminui o pH com a protonação dos grupos carboxílicos terminais das cadeias de alginato ocorra uma diminuição do valor absoluto da carga superficial[26].

Os diferentes resultados apresentados quer nos estudos reológicos quer na medição do potencial zeta nas três referências de alginato em estudo apontam, à partida, para diferenças estruturais na cadeia polimérica. A fim clarificar este aspeto, foi efetuada uma análise FTIR-ATR estando o resultado patente no gráfico da Figura 2.36.



**Figura 2.36** Espectros de FTIR-ATR realizado ao alginato nas três referências em estudo

Numa análise geral, os três espectros apresentam em comum as bandas características correspondentes a vibrações de distensão do grupo  $-\text{OH}$  ( $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ ) e deformação axial dos grupos  $-\text{OH}$  existentes na cadeia; salienta-se também a banda a  $2930\text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração de distensão do  $-\text{CH}$ , bem como a banda a  $1595\text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração de distensão do grupo  $-\text{COO}$ [63].

A nível estrutural, o alginato varia extensamente em termos da sua proporção entre os resíduos manurónicos (M) e glucurónicos (G), bem como na sua estrutura sequencial e grau de polimerização. Desta

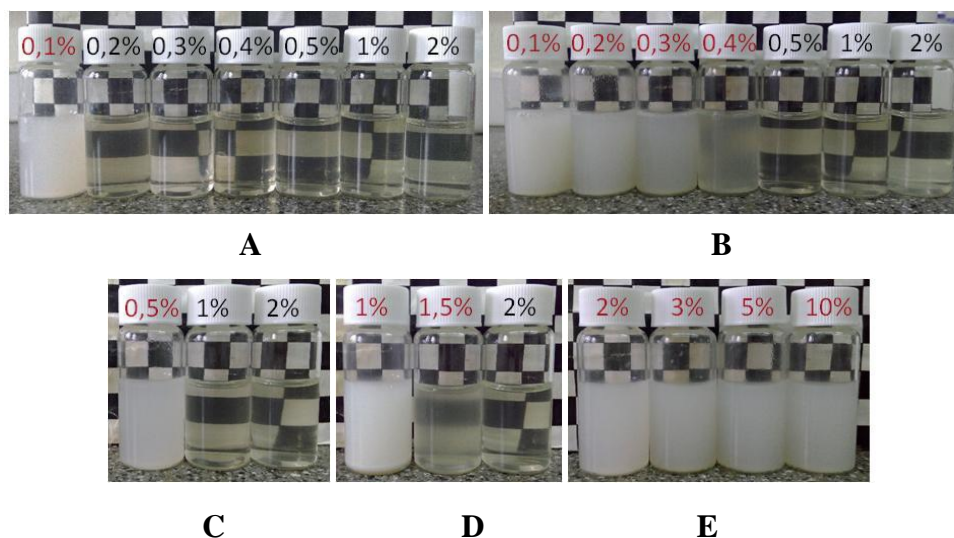
forma, o alginato pode apresentar sequências alternadas de resíduos MG e blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G. Apesar do ácido manurônico e glucurônico serem isômeros, a sua combinação na cadeia polimérica é revelada no espectro FTIR na região de *fingerprint* (impressão digital), que se situa entre 900 e 1300  $\text{cm}^{-1}$  onde ocorrem absorções do tipo deformação angular. Por sua vez, na região de 500 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  são visíveis também diferenças a nível das deformações angulares que ocorrem fora do plano.

Assim, a análise comparativa dos espectros das três referências de alginato permite de facto evidenciar diferenças a nível estrutural nas cadeias poliméricas quer a nível da combinação monomérica quer a nível da isomeria estrutural de posição existente entre os dois monómeros constituintes. Tais diferenças devem ser tidas em consideração na variação da densidade de carga do polímero em solução em função do pH. Por sua vez as diferenças na massa molecular terão maior impacto no condicionamento do comportamento reológico das amostras em solução

## 2.2.2 Quitosano

Sendo o quitosano um biopolímero insolúvel em água mas solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos fracos, iniciou-se o estudo de caracterização deste biopolímero tentando encontrar outras alternativas à utilização usual do ácido acético para dissolução.

Foram então preparadas soluções de quitosano a 1%(m/m) de massa molecular (Mw) alta com diferentes percentagens em massa de ácidos em solução com o objetivo de determinar a menor percentagem de ácido necessária à dissolução do quitosano. A Figura 2.37 apresenta imagens das soluções preparadas com diferentes concentrações de ácidos selecionados.



**Figura 2.37** Estudo de dissolução de quitosano a 1%(m/m) em solução aquosa de - ácido acético(A), ácido láctico(B), ácido málico(C), ácido cítrico(D), ácido fosfórico(E). Na parte superior dos frascos estão indicadas as percentagens em massa de ácido usadas na preparação das soluções poliméricas

Os ensaios anteriores mostram que é possível dissolver quitosano para uma concentração mínima de ácido acético de 0,2% (m/m) apresentando a solução um valor de pH de 4,96. Por sua vez, a dissolução de quitosano em ácido láctico é possível para uma concentração mínima de 0,5% (m/m) de ácido levando a um valor de pH de 5,04. A dissolução de quitosano com ácido málico e cítrico requer maiores concentrações, respetivamente 1%(m/m) de ácido málico, 2%(m/m) de ácido cítrico. Verificou-se também que quanto maior a percentagem de ácido necessária à dissolução, menor é o valor do pH da solução final sendo de 4,96 com o uso de ácido málico e 2,74 com o uso de ácido cítrico. A diferença na eficiência na dissolução do quitosano por parte dos ácidos orgânicos fracos aqui testados pode estar relacionada com a sua massa molar. Uma vez que os estudos comparam a mesma concentração mássica dos ácidos, haverá maior quantidade química dos ácidos com menor massa molecular. Assim, o ácido acético que apresenta menor massa molar é mais eficaz na dissolução de quitosano.

Quanto à dissolução de quitosano com ácido fosfórico, suspendeu-se o incremento da concentração ao verificar que até 10%(m/m) de ácido na mistura, o quitosano não dissolveu.

Noutra perspetiva complementar, tendo presente que a solubilidade do quitosano ocorre devido à protonação dos grupos amino, estes grupos, que apresentam um pKa entre 6,2 e 7,0, estão completamente protonados em ácidos com pKa inferior a 6,2 tornando o quitosano solúvel [27, 28]. Atendendo à Tabela 2.5, onde figuram os valores de pKa dos ácidos utilizados neste estudo é de salientar que a protonação dos grupos amino do biopolímero surge dificultada quando, por exemplo, o ácido é poliprótico, como o ácido fosfórico, e apresenta um dos valores de pKa superior ao intervalo de pKa do biopolímero. No entanto, esta observação carece de estudos complementares.

**Tabela 2.5** Valores de pKa dos ácidos usados no estudo de dissolução do quitosano [64]

Ácido	pKa (25°C)
Ácido acético	4,8
Ácido láctico	3,07
Ácido málico	pKa <sub>1</sub> = 3,4; pKa <sub>2</sub> =5,13
Ácido cítrico	pKa <sub>1</sub> =3,15; pKa <sub>2</sub> =4,77; pKa <sub>3</sub> =6,40
Ácido fosfórico	pKa <sub>1</sub> =2,15; pKa <sub>2</sub> =4,77; pKa <sub>3</sub> =12,4

De seguida pretendeu-se averiguar acerca do impacto da utilização de diferentes ácidos orgânicos fracos na viscosidade do polímero em solução. Assim, foram preparadas soluções de quitosano de 0,05 a 1 ou 2% (m/m) utilizando 2% (m/m) de ácido acético, ácido málico, ácido láctico e ácido cítrico tendo sido efetuado um estudo reológico das mesmas a 5°C e 20°C As curvas de fluxo referentes ao estudo efetuado apresentam-se de seguida da Figura 2.38 à Figura 2.41.



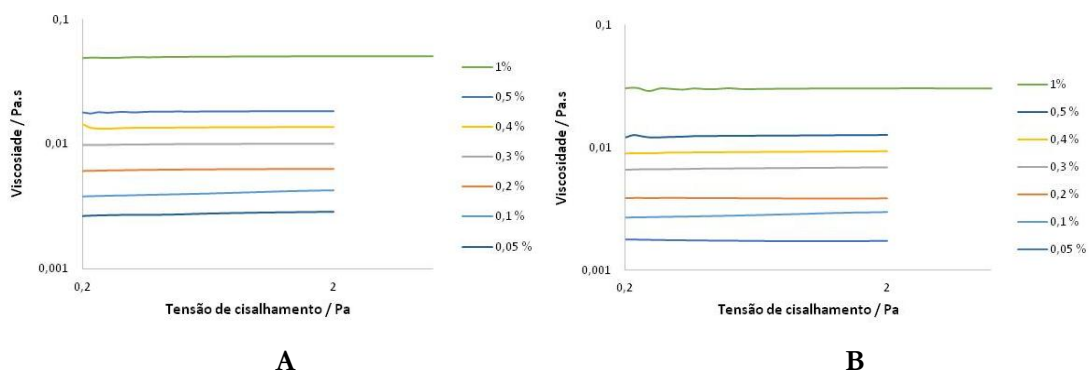


Figura 2.38 Curva de fluxo do quitosano Mw alta dissolvido em ácido cítrico 2%, a 5°C (A) e 20°C(B)

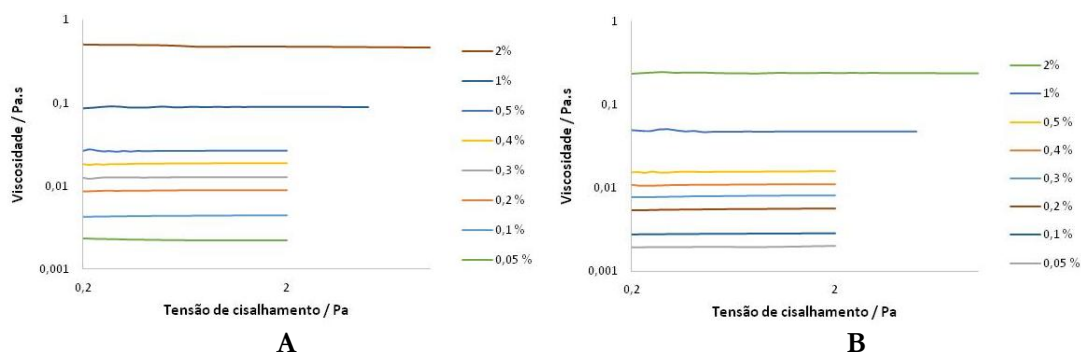


Figura 2.39 Curva de fluxo do quitosano Mw alta dissolvido em ácido láctico 2% a 5°C (A) e 20°C(B)

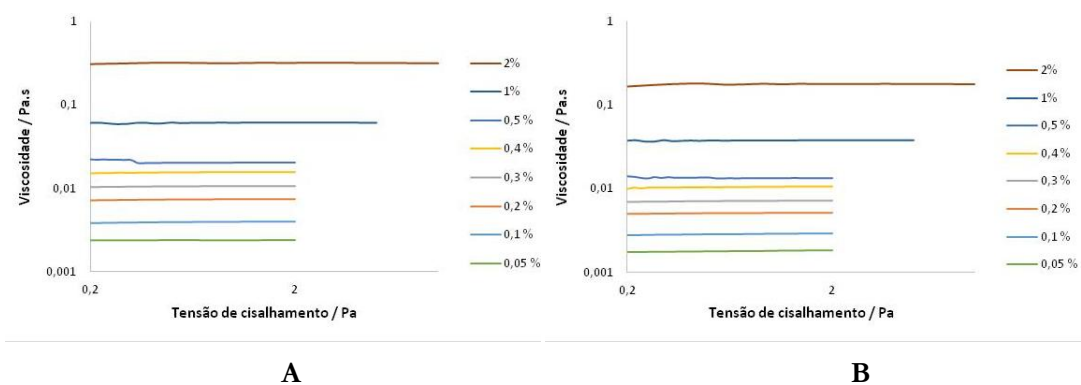


Figura 2.40 Curva de fluxo do quitosano Mw alta dissolvido em ácido málico 2% a 5°C (A) e 20°C(B)

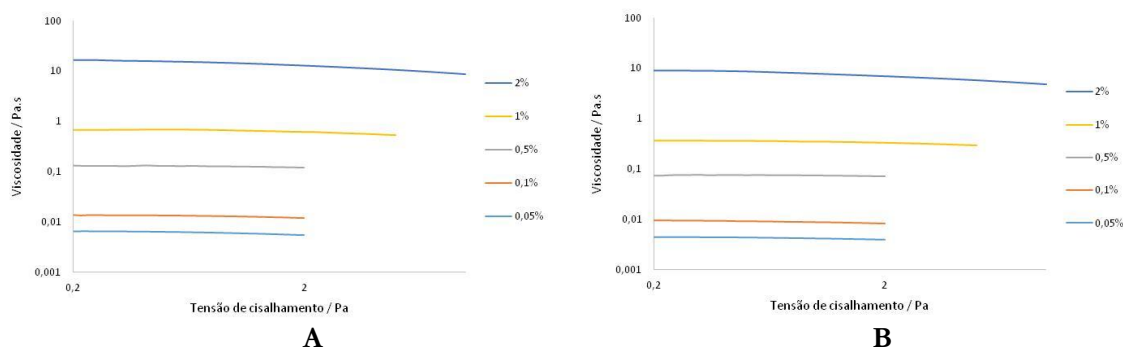
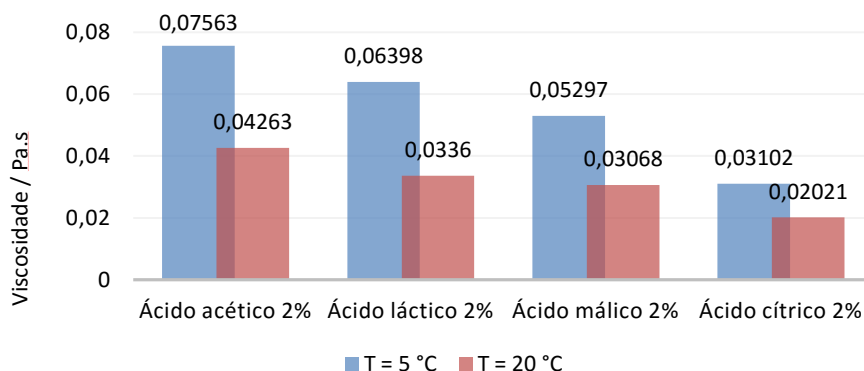


Figura 2.41 Curva de fluxo do quitosano Mw alta dissolvido em ácido acético 2%, a 5°C (A) e 20°C (B)

Verifica-se que todas as soluções analisadas apresentam comportamento newtoniano, com a viscosidade independente da tensão de cisalhamento, no intervalo de tensões estudadas, e que o mesmo não é afetado pelo ácido usado na dissolução do polímero.

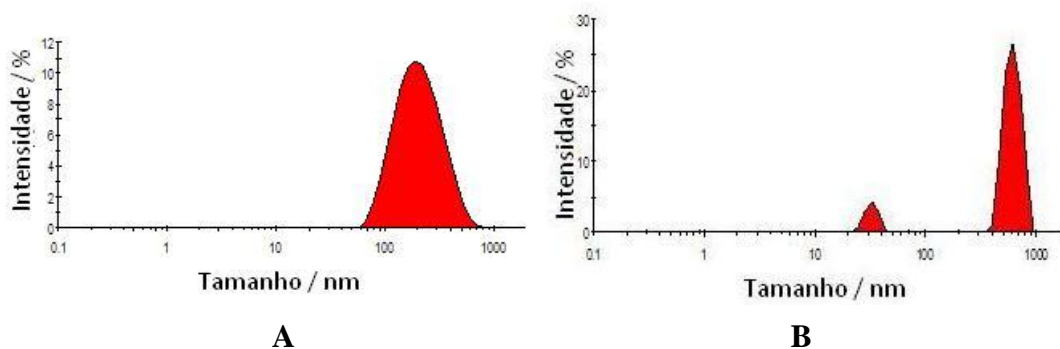
Foram retirados os valores de viscosidade newtoniana e foi construído um gráfico deste parâmetro em função do ácido usado na dissolução do quitosano (Figura 2.42).

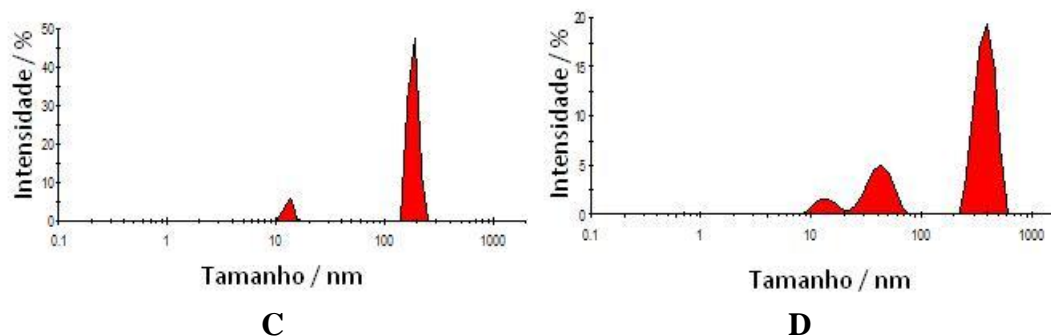


**Figura 2.42** Viscosidade das soluções de quitosano a 1%(m/m) preparadas com diferentes ácidos orgânicos fracos medida a 5 e 20°C

A análise do gráfico anterior permite salientar que a utilização de ácido cítrico na preparação das soluções, conduz a uma menor variação de viscosidade dentro das temperaturas de ensaio, sendo essas viscosidades, de um modo geral, mais baixas que as obtidas com a aplicação de outros ácidos. A utilização do mesmo ácido permite obter viscosidades mais baixas a temperatura mais elevada o que era expectável tendo em conta a influência da temperatura na viscosidade de soluções poliméricas. A viscosidade mais elevada reflete a ionização das cadeias poliméricas, que passam a estar estendidas devido às repulsões eletrostáticas. Desta forma, os ácidos mais eficientes na dissolução do quitosano conduzem a maiores viscosidades.

A fim de averiguar acerca do impacto da utilização de diferentes ácidos orgânicos fracos no tamanho de partícula em solução, foram preparadas soluções de quitosano a 0,01% (m/m) utilizando soluções aquosas a 2% (m/m) de ácido acético, ácido láctico, ácido málico e ácido cítrico tendo sido realizadas análises por DLS à temperatura ambiente cujos gráficos se encontram na Figura 2.43.

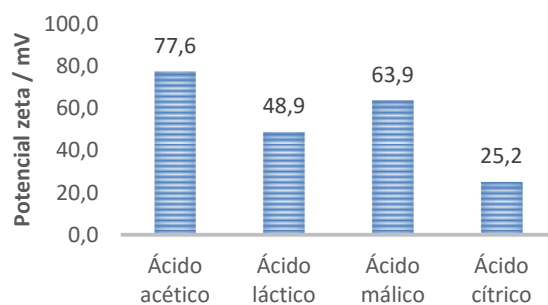




**Figura 2.43** Distribuição (intensidade) do tamanho das partículas da solução de quitosano a pH2, com: ácido acético(A); ácido láctico(B); ácido málico(C) e ácido cítrico(D)

Os resultados obtidos por DLS permitem aferir a influência do ácido utilizado na dissolução do quitosano no tamanho médio de partícula em solução. A utilização de ácido acético leva à formação de agregados poliméricos com tamanho médio de aproximadamente 222,7 nm; por sua vez o uso de ácido láctico leva ao aparecimento de duas populações de partículas sendo a de maior intensidade a 614,9 nm; com o ácido málico aparecem também duas populações de partículas sendo de 184,6 nm o tamanho da população que apresenta maior intensidade enquanto o uso de ácido cítrico faz surgir três populações de partículas com a de maior intensidade a 387,1 nm de tamanho. Esta assimetria quanto ao tamanho médio dos agregados poliméricos está relacionada com o efeito do ácido e poderá estar relacionada com a perturbação da estrutura química das cadeias de quitosano nomeadamente ao nível da capacidade de protonação dos resíduos aminados presentes na glucosamina e acetilglucosamina que difere em intensidade consoante a capacidade de protonação dos diferentes ácidos usados no estudo. No entanto, um esclarecimento mais completo nesse domínio deverá ser obtido através de um estudo mais aprofundado a realizar futuramente.

São amplamente conhecidas as propriedades antimicrobianas do quitosano. De modo a analisar se o ácido usado na dissolução tem algum efeito na capacidade antimicrobiana do polímero, foram efetuadas determinações de potencial zeta (Figura 2.44). Para tal foram preparadas soluções aquosas de quitosano a 0,5%(m/m) usando diferentes ácidos orgânicos a 2%(m/m) tendo o pH de todas as soluções preparadas sido acertado para 2 com o mesmo ácido utilizado na dissolução.



**Figura 2.44** Medição do potencial zeta a 20°C em soluções aquosas de quitosano em diferentes ácidos orgânicos a pH2

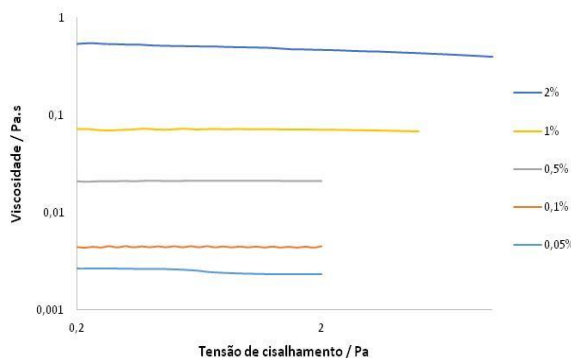
A análise do gráfico anterior permite mostrar que o potencial zeta da solução de quitosano em que foi usado ácido acético para dissolução é superior quando comparado com o valor obtido com outros ácidos.

Esta evidência sugere que a capacidade antimicrobiana do quitosano sai potenciada na presença deste ácido revelando assim a sua eficácia acrescida na capacidade de protonação dos resíduos aminados presentes na glucosamina e acetilglucosamina da cadeia polimérica, o que resulta num aumento efetivo da densidade de carga.

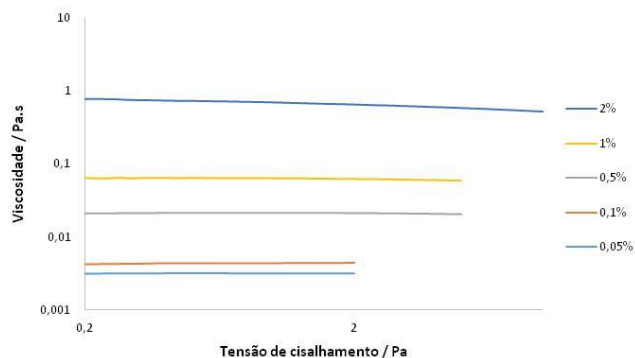
Apesar das soluções de quitosano apresentarem uma viscosidade um pouco superior quando se usa ácido acético, o facto de termos uma dissolução mais eficaz e uma carga superior, torna este solvente a melhor escolha, e por isso mesmo os testes posteriores são todos efetuados usando ácido acético na preparação das soluções.

A caracterização deste biomaterial atendendo também à sua massa molecular assume particular importância atendendo à previsível utilização do quitosano como matriz polimérica do revestimento edível.

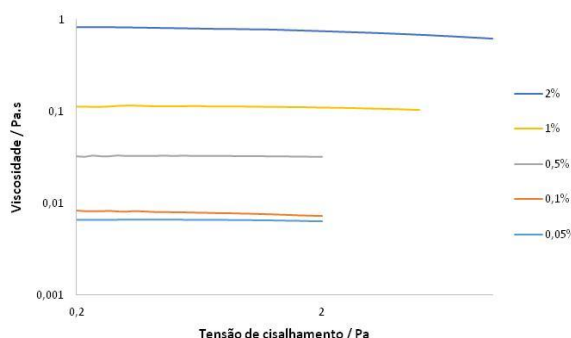
Nesse enfoque, foram usados três quitosanos, o de massa molecular baixa (50-190 kDa), o de massa molecular média (190-310 kDa) e o de massa molecular elevada (310-375 kDa). Em ambos os casos foram preparadas soluções com concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 2% (m/m), usando 2% (m/m) de ácido acético para facilitar a sua dissolução. Foi feito o estudo reológico das soluções de quitosano, sendo as curvas de fluxo apresentadas da Figura 2.45 à Figura 2.50.



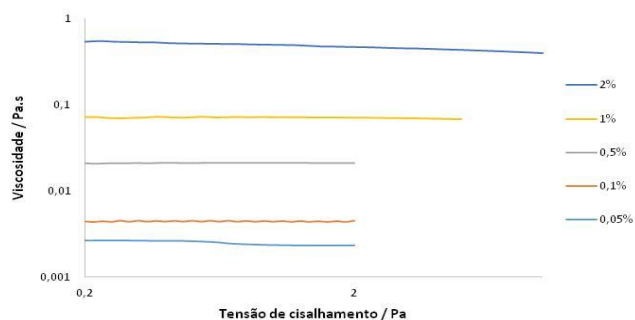
**Figura 2.45** Curvas de fluxo do quitosano Mw baixo a 5 °C.



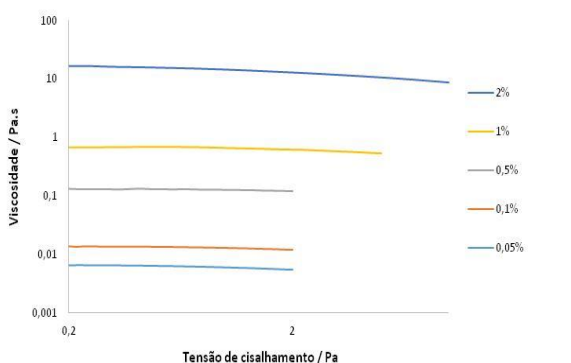
**Figura 2.46** Curvas de fluxo do quitosano Mw baixo a 20 °C.



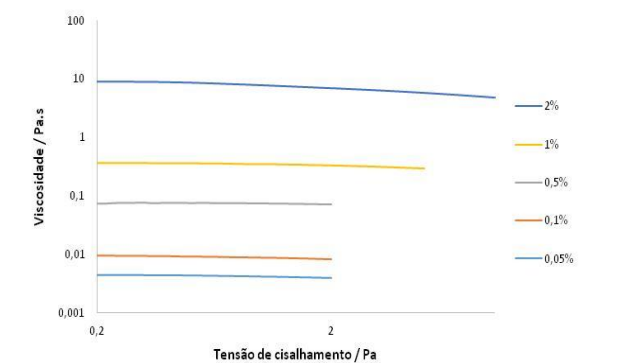
**Figura 2.47** Curvas de fluxo do quitosano Mw média a 5 °C.



**Figura 2.48** Curvas de fluxo do quitosano Mw média a 20 °C.



**Figura 2.49** Curvas de fluxo do quitosano Mw alta a 5 °C.



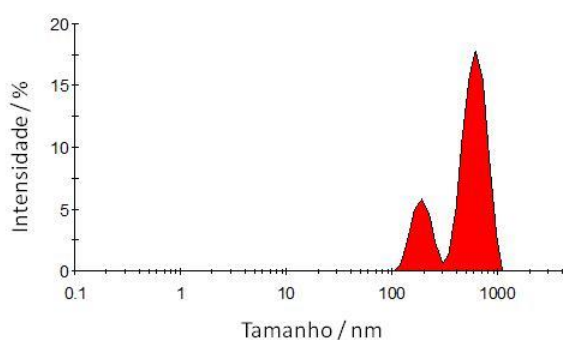
**Figura 2.50** Curvas de fluxo do quitosano Mw alta a 20 °C.

Em todos os casos é possível concluir que o aumento da concentração de polímero aumenta a viscosidade das soluções, visto que a adição de polímero promove a formação de uma rede tridimensional, sendo esta reforçada ao adicionar mais polímero, o que resulta num aumento efetivo da viscosidade.

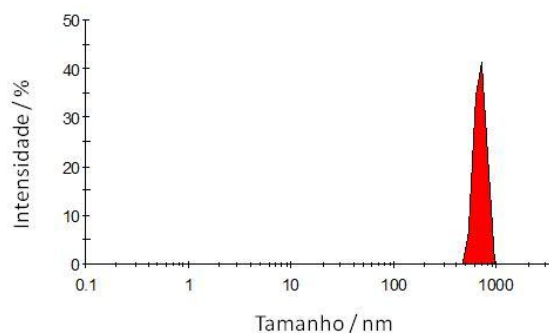
Os estudos realizados mostram ainda que a um dado valor de temperatura e para a mesma concentração de polímero, o quitosano Mw alta apresenta valores de viscosidade muito mais elevados quando comparada com as viscosidades do quitosano Mw média e Mw baixa. Estes resultados são de facto expectáveis atendendo a que a massa molecular do polímero influencia a sua viscosidade em solução. De facto, quanto maior a massa molecular do polímero, maior é o tamanho da cadeia polimérica o que aumenta o

número de pontos de interação entre cadeias bem como a intensidade das forças atrativas o que resulta num reforço da rede tridimensional com o conseqüente aumento de viscosidade.

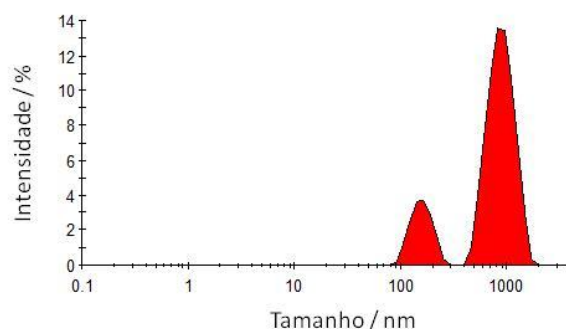
Com o intuito de averiguar o tamanho de partícula em solução do quitosano nos três regimes de massa molecular, recorreu-se à técnica de DLS utilizando para tal soluções de quitosano a 0,01% (m/m) e pH de aproximadamente 2. A distribuição de tamanhos está representada da Figura 2.51 à Figura 2.53, sendo que no caso do quitosano de Mw baixa e alta é possível observar duas populações de partículas enquanto no quitosano de Mw média apenas se observa uma população.



**Figura 2.51.** Distribuição do tamanho das partículas da solução de quitosano Mw baixa.



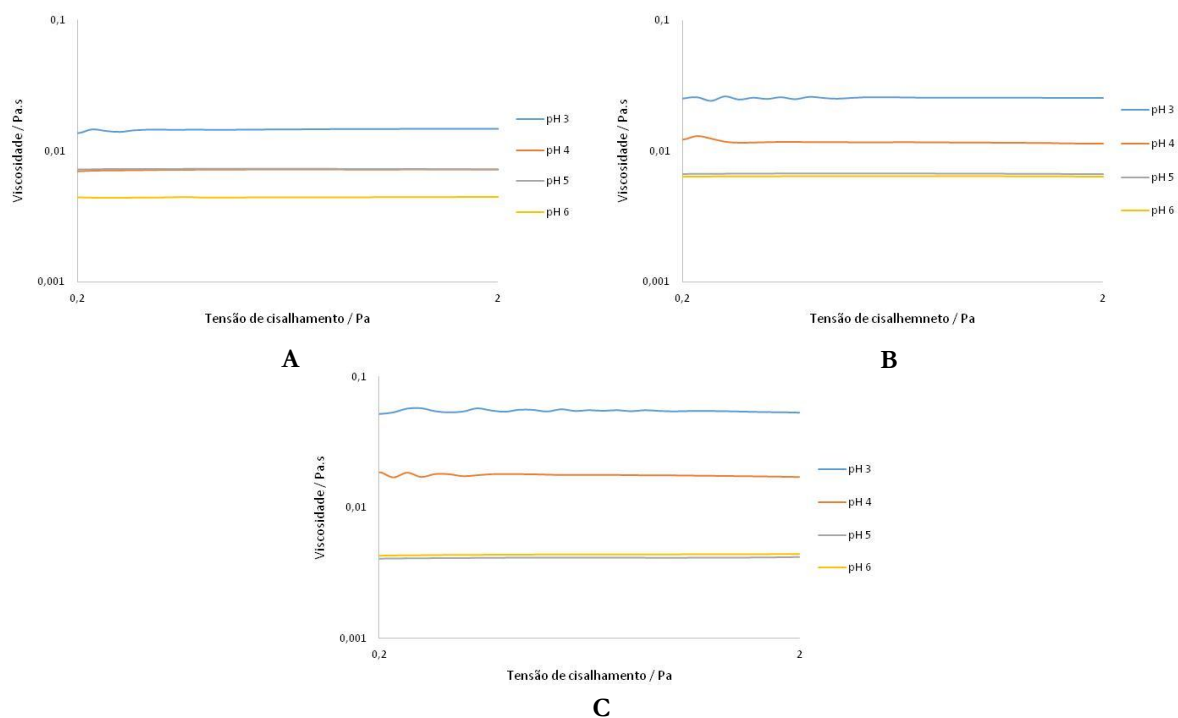
**Figura 2.52.** Distribuição do tamanho das partículas da solução de quitosano Mw média.



**Figura 2.53** Distribuição do tamanho das partículas da solução de quitosano Mw alta

No caso do quitosano de Mw baixa o pico de maior intensidade surge a 613,3 nm e o de menor intensidade a 192,3 nm; por sua vez o quitosano de Mw média apresenta um pico a 687,5 nm enquanto que o quitosano de Mw alta apresenta um pico mais intenso a 904,4 nm e outro menos intenso a 159,6 nm. Estes valores de tamanho de partícula elevados apontam para o facto de as moléculas se encontrarem aglomeradas em solução e não dispersas a nível molecular

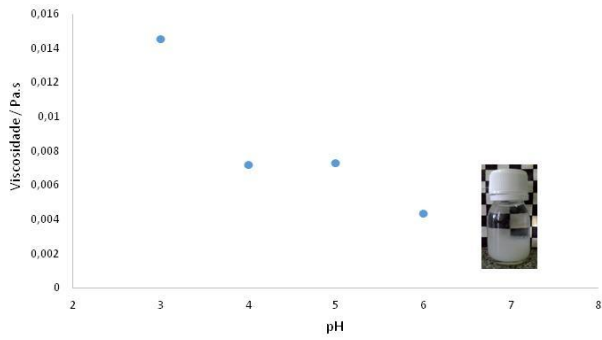
Sendo o quitosano um polímero catiónico e a sua densidade de carga influenciada pelo pH da solução, foi analisado o efeito do pH na viscosidade e densidade de carga do quitosano. Foram preparadas soluções a 0,5 % (m/m) em polímero e ajustado o pH para 3, 4, 5 e 6 com ácido acético e hidróxido de sódio. e foi medida a viscosidade das soluções a 20°C em função da tensão de cisalhamento (Figura 2.54).



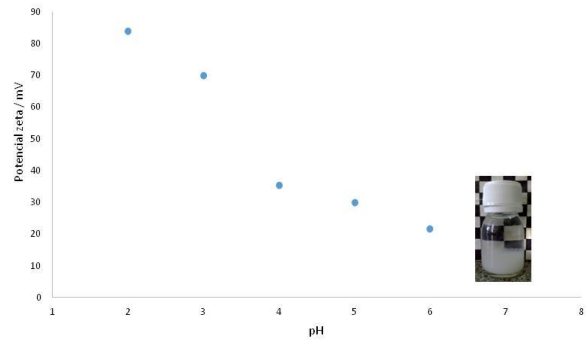
**Figura 2.54** Curvas de fluxo do quitosano Mw baixa (A); Mw média (B) e M walta (C) a 20°C

A análise das curvas de fluxo mostra que o comportamento newtoniano do polímero não é afetado pelo pH da solução.

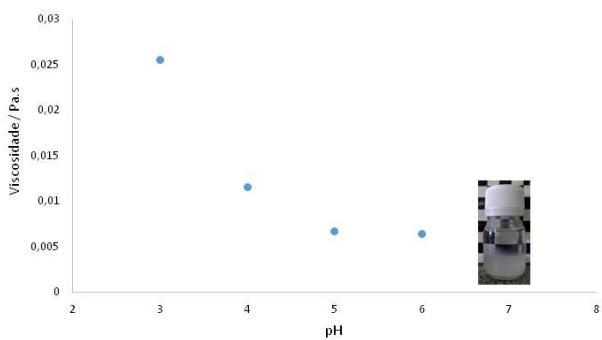
Foram retirados os valores de viscosidade newtoniana a fim de construir um gráfico deste parâmetro em função do pH para os três quitosanos (Figura 2.55; Figura 2.57 e Figura 2.59). Os resultados da medição do potencial zeta a 20°C para as soluções em estudo estão apresentados a par com o gráfico da viscosidade em função do pH (Figura 2.56; Figura 2.58 e Figura 2.60) para cada um dos quitosanos analisados para uma análise comparativa facilitada.



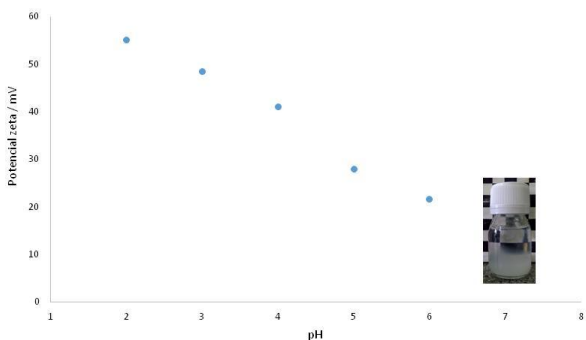
**Figura 2.55** Viscosidade newtoniana em função do pH de soluções de quitosano Mw baixa medida a 20°C.



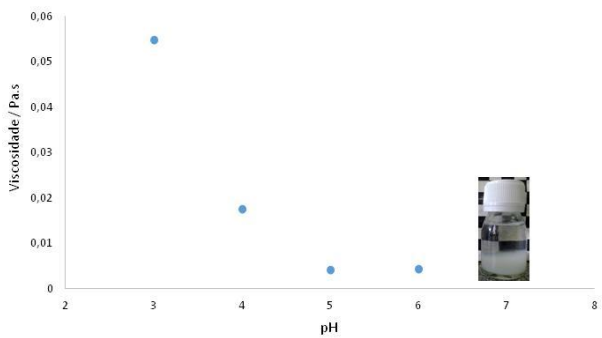
**Figura 2.56** Variação do potencial zeta com o pH de soluções de quitosano Mw baixa medida a 20°C.



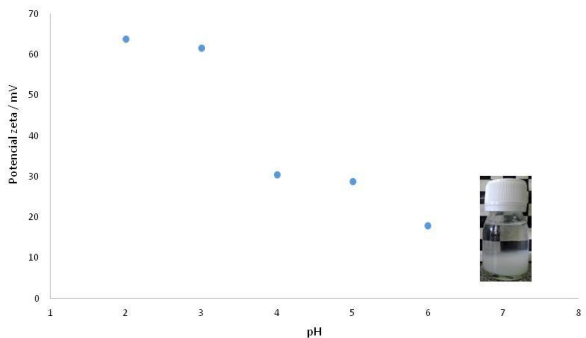
**Figura 2.57** Viscosidade newtoniana em função do pH de soluções de quitosano Mw média medida a 20°C.



**Figura 2.58** Variação do potencial zeta com o pH de soluções de quitosano Mw média medida a 20°C.



**Figura 2.59** Viscosidade newtoniana em função do pH de soluções de quitosano Mw alta medida a 20°C.



**Figura 2.60** Variação do potencial zeta com o pH de soluções de quitosano Mw alta medida a 20°C.

Pode concluir-se que o aumento do pH promove uma diminuição da viscosidade do quitosano, consequência da diminuição da densidade de carga do polímero. Também é possível observar que o quitosano apresenta estabilidade quando o pH se encontra entre 3 e 6, no entanto, quando o pH da solução sobe para 7, existe formação de um precipitado devido à perda de carga do polímero que provoca o colapso das cadeias poliméricas.



### 2.2.3 Gelatina

A gelatina, outro dos biopolímeros de interesse, foi também alvo de estudos de caracterização realizados em condições idênticas às anteriormente descritas. Assim foram preparadas soluções de gelatina, usando água destilada como solvente, a concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 2 % (m/m). As soluções foram mantidas em agitação à temperatura de 70°C durante uma hora a fim de promover a desnaturação das cadeias poliméricas e dessa forma facilitar o processo de dissolução.

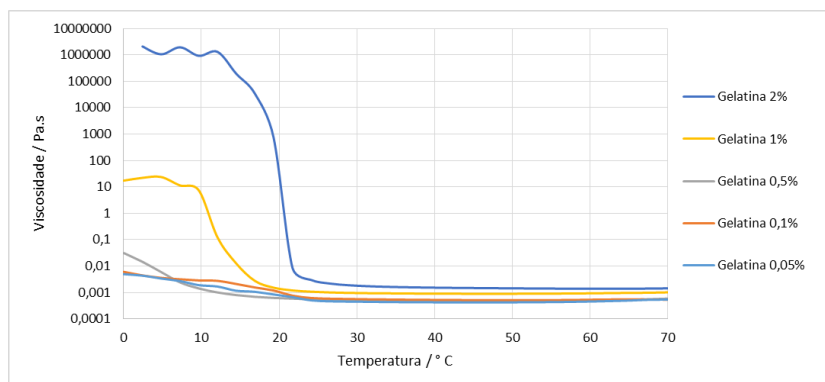
Como primeira análise foi feito um estudo do efeito da concentração no pH da solução polimérica, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.6.

**Tabela 2.6** Valores de pH das soluções de quitosano com diferentes concentrações.

Concentração de polímero/% (m/m)	pH
0,05	5,92
0,1	5,84
0,5	4,87
1	4,87
2	4,86

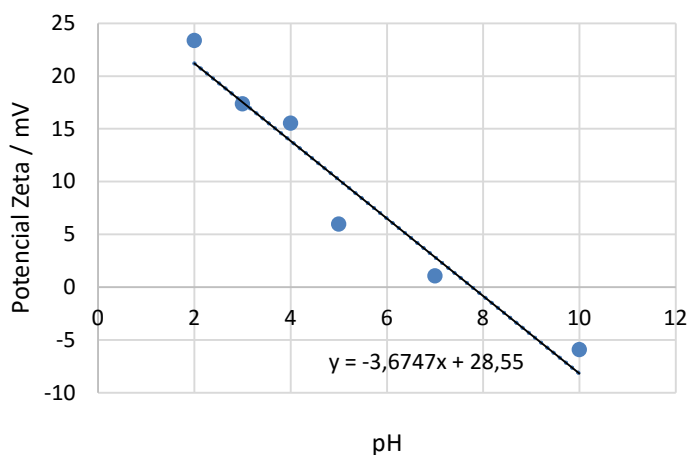
Os valores de pH registados apontam para uma diminuição do pH com a concentração da solução. Atendendo à definição operacional de pH, sabemos que este parâmetro depende da concentração de iões hidrogénio, H<sup>+</sup>, no instante em que o equilíbrio de ionização é atingido. Assim, apesar do valor de pKa dos resíduos aminoácidos ácidos permanecer constante para um dado valor de temperatura, para concentrações mais elevadas, a concentração de H<sup>+</sup> em equilíbrio é ligeiramente superior conduzindo a um valor mais baixo de pH.

Posteriormente foi determinada a viscosidade destas soluções em função da temperatura, sendo os resultados apresentados na Figura 2.61, salientando que o ensaio reológico teve início a 70°C, é possível observar que até 25°C todas as soluções apresentam um comportamento bastante fluído devido à desnaturação do colagénio o que origina uma mistura de cadeias polipeptídicas enroladas de forma aleatória, sendo que a partir de 10°C as soluções com 1 e 2%(m/m) de concentração apresentam viscosidades muito elevadas, devido à ocorrência do fenómeno de gelificação que consiste na recuperação da estrutura helicoidal. Assim a gelificação da gelatina permite um retorno da estrutura do colagénio por parte das moléculas desorganizadas da gelatina[65]. Abaixo destas concentrações existe um ligeiro aumento da viscosidade com a diminuição da temperatura, no entanto, mesmo a 0 °C as soluções não apresentam viscosidades muito elevadas.



**Figura 2.61** Curvas de viscosidade da gelatina em função da temperatura à razão de descida de  $T=0,77^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e tensão 1Pa (nas concentrações em massa de 0,05 a 0,5%) e 5 Pa (nas concentrações em massa de 1 e 2%)

A gelatina é uma proteína, tendo na sua composição aminoácidos, e como tal as suas características são extremamente influenciadas pelo pH. Por este motivo foram preparadas soluções de gelatina a 0,5 % (m/m) e ajustado o pH numa faixa de 2 a 10, foi medido o potencial zeta das soluções com os diferentes valores de pH e feito um ajuste linear, como se pode observar na Figura 2.62.



**Figura 2.62** Potencial zeta em função do pH das soluções de gelatina a 0,5 % (m/m).

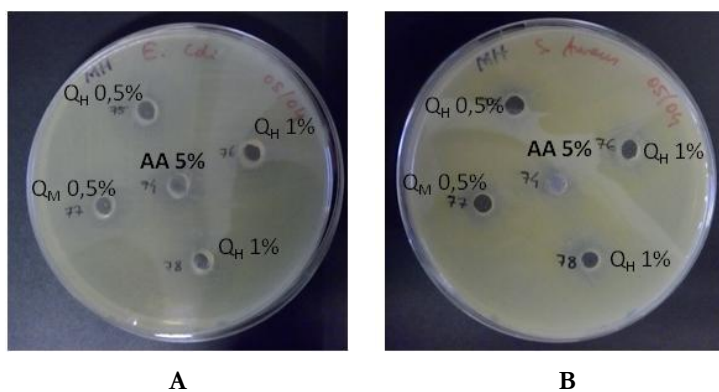
A partir do ajuste linear aos pontos obtidos, foi possível obter a equação da reta,  $y = -3,6747x + 28,55$  e, substituindo o valor de y por 0, foi obtido um valor de  $x = 7,77$  que corresponde ao ponto isoelétrico desta gelatina que é assim classificada como gelatina do tipo A[50]. Um ponto isoelétrico de 7,77 significa que a um pH de 7,77 a gelatina tem uma carga efetiva nula o que significa que se encontra eletricamente neutra, sendo que apresenta carga global positiva para valores de pH abaixo do ponto isoelétrico, em que a gelatina pode ser considerada um biopolímero catiónico (devido à presença dos grupos amina protonados  $-\text{NH}_3^+$ ). De forma semelhante, para valores de pH acima do ponto isoelétrico, a gelatina apresenta uma carga global negativa e nessas condições pode ser considerada um biopolímero aniónico (devido à presença dos grupos  $-\text{COO}^-$ ). Com efeito, a presença de grupos de aminoácidos ácidos (ácido carboxílico) e básicos (amina) confere à gelatina um carácter *zwitteriónico* sendo o pH da solução a determinar a carga efetiva da gelatina.

## 2.3 Estudos de ação antimicrobiana

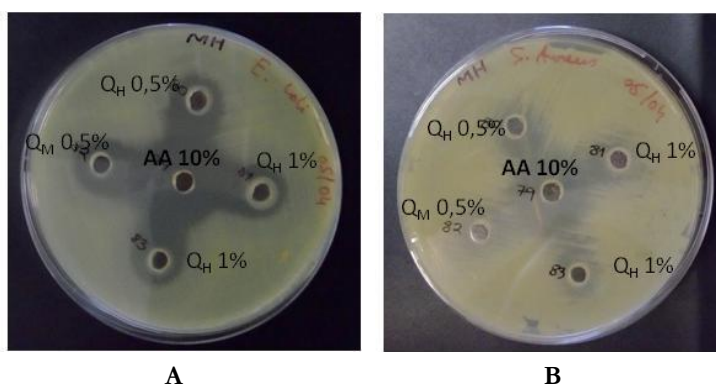
Com o intuito de analisar a capacidade antimicrobiana dos materiais anteriormente caracterizados bem como de outros elementos de interesse marcante na formulação de revestimentos edíveis, foram realizados estudos de ação microbiana destes agentes utilizando para tal duas estirpes bacterianas relevantes na segurança alimentar por causarem degradação microbiológica e toxinfecções, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A técnica primária que serviu de base a este estudo foi o método de difusão em ágá tendo sido aplicada a múltiplas combinações em solução.

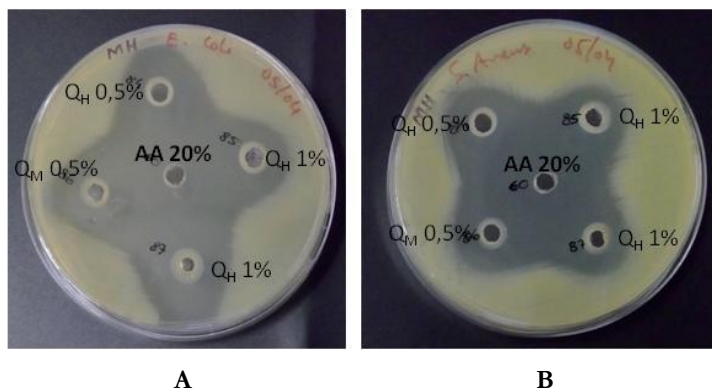
Foi testada a capacidade antimicrobiana do quitosano dissolvido em ácido acético sendo que para tal foram preparadas soluções de polímero de Mw média e Mw alta a 0,5% e 1% (m/m) usando ácido acético a 5, 10, e 20% (m/m). Os resultados destes testes estão patentes da Figura 2.63 à Figura 2.65.



**Figura 2.63** Método de difusão em ágá aplicado a quitosano dissolvido em ácido acético a 5% face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.



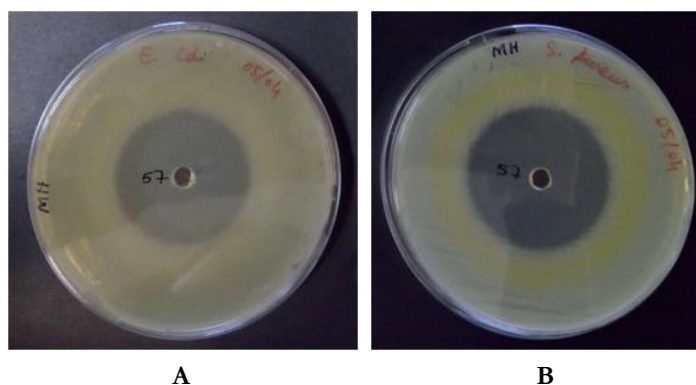
**Figura 2.64** Método de difusão em ágá aplicado a quitosano dissolvido em ácido acético a 10% face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.



**Figura 2.65** Método de difusão em ágar aplicado a quitosano dissolvido em ácido acético a 20% face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.

A utilização de ácido acético a 10%(m/m) revela uma capacidade antimicrobiana acentuada principalmente para a bactéria *E.coli* em todos os regimes de concentração de quitosano utilizados, ao contrário do que é revelado no teste similar em que foi utilizado ácido acético a 5%(m/m). Ao aumentarmos a concentração de ácido acético para 20%(m/m) o efeito antimicrobiano sai potenciado nas duas estirpes em estudo como pode observar-se pela amplitude do halo de inibição criado em torno de cada um dos poços.

A utilização de ácido acético como referência foi efetuado para todos os ensaios (poço do meio). Foi também estudado o uso de ácido acético glacial nas duas estirpes bacterianas (Figura 2.66) O uso do ácido concentrado revela um halo de inibição de larga amplitude como seria expectável dado que este ácido por si só é um dos conservantes atualmente em uso na indústria alimentar dos produtos cárnicos condicionando não só os microrganismos que conseguem sobreviver no período de armazenamento como também a sua capacidade de alterar o alimento. A sua ação antimicrobiana pode passar pela acidificação do meio externo, acidificação do citoplasma, ação sobre lípidos e proteínas das membranas, quelação de metais ou ação sobre o metabolismo[55].

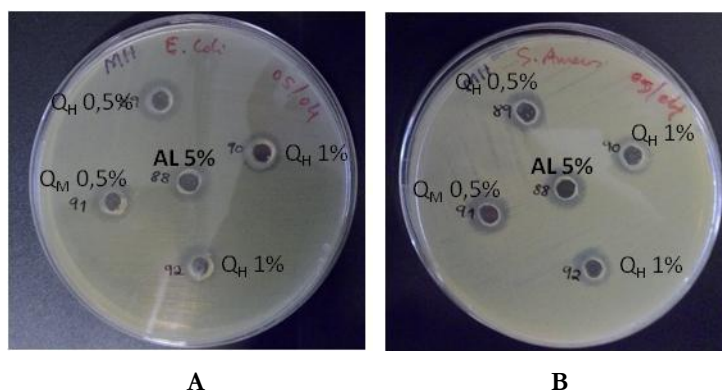


**Figura 2.66** Método de difusão em ágar aplicado a ácido acético concentrado face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.

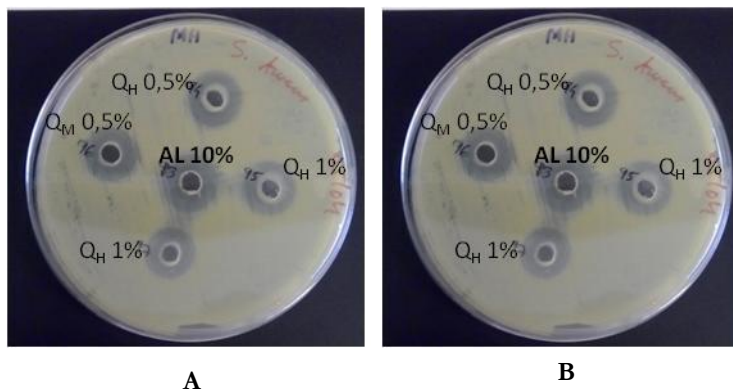
Num estudo conduzido de forma idêntica ao anterior em que apenas se substituiu o ácido acético por ácido láctico (Figura 2.67 à Figura 2.70), os resultados revelam que mesmo a concentrações mais baixas de ácido o efeito antimicrobiano contra as duas estirpes já se faz sentir (Figura 2.67) sendo ainda mais eficaz que o ácido acético na mesma concentração.

Ao aumentar a concentração de ácido na solução a capacidade antimicrobiana sai reforçada embora não de forma tão acentuada como com o ácido acético. A utilização de ácido láctico concentrado, feita como controlo destes testes, revela a sua capacidade antimicrobiana contra as estirpes em estudo embora menos intensa que o do ácido acético, o que é visível pela comparação do tamanho do halo de inibição criado (Figura 2.70 e Figura 2.66). Salienta-se aqui que a utilização deste ácido como conservante na indústria alimentar dos produtos cárnicos é também bastante usual.

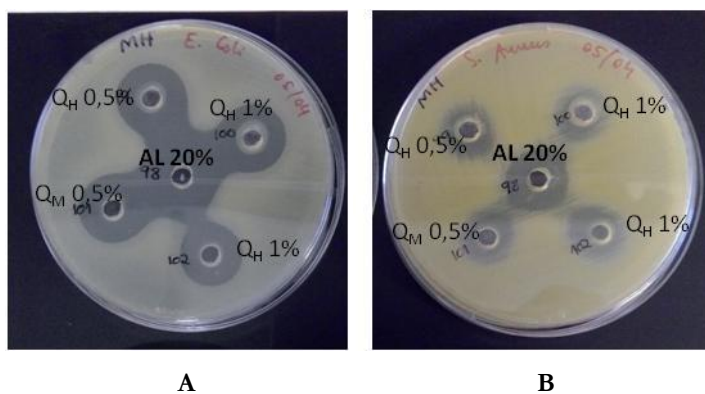
A análise dos resultados obtidos não permite clarificar a capacidade antimicrobiana do quitosano podendo mesmo sugerir pela comparação do diâmetro dos halos de inibição que a mesma se deve à presença dos ácidos. Por outro lado, levanta-se aqui a hipótese de este método não ser o mais indicado para avaliar a eficácia antimicrobiana do quitosano devido a dificuldades na difusão de soluções viscosas pelo meio de ágar, algo que só ficará confirmado com a realização de testes complementares.



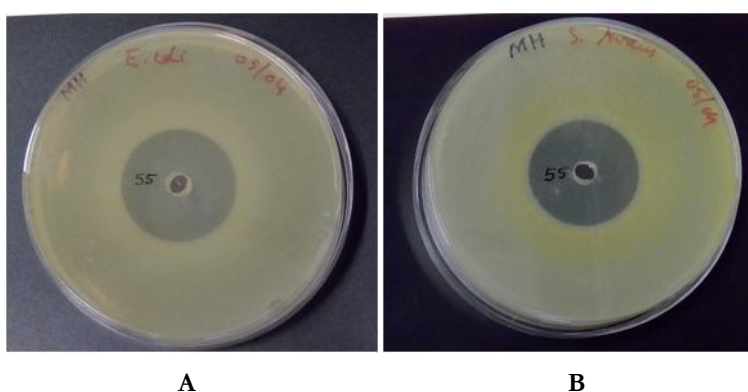
**Figura 2.67** Método de difusão em ágar aplicado a quitosano dissolvido em ácido láctico a 5% face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.



**Figura 2.68** Método de difusão em ágar aplicado a quitosano dissolvido em ácido láctico a 10% face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.

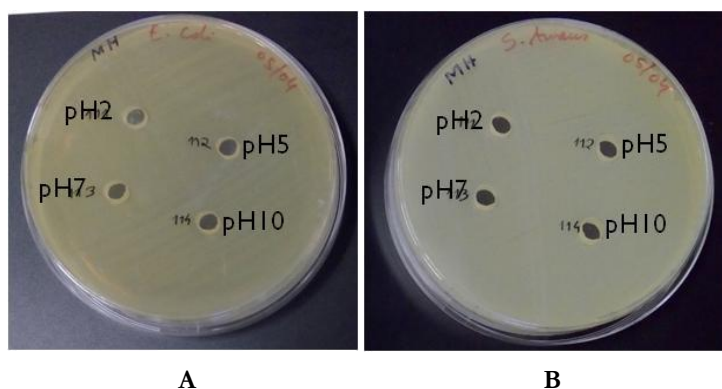


**Figura 2.69** Método de difusão em ágar aplicado a quitosano dissolvido em ácido láctico a 20% face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.



**Figura 2.70** Método de difusão em ágar aplicado a ácido láctico concentrado face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.

A gelatina foi também testada a nível da sua ação antimicrobiana contra as duas estirpes bacterianas disponíveis pelo que em soluções de gelatina a 1% foi feito o acerto de pH para valores de 2,5,7 e 10. Os resultados dos testes efetuados estão apresentados na Figura 2.71.



**Figura 2.71** Método de difusão em ágar aplicado a gelatina a 1% com diferentes valores de pH face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.

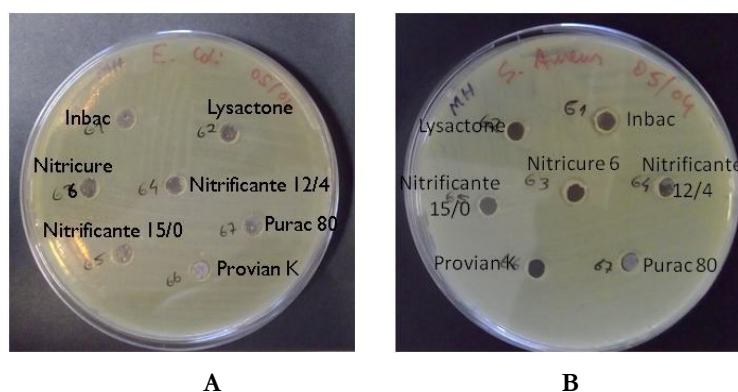
Os resultados deste teste indiciam que a gelatina em solução aquosa não apresenta atividade antimicrobiana independentemente do pH contudo combinada com conservantes adequados pode tornar-se uma alternativa muito interessante na formulação de revestimentos edíveis.

A capacidade antibacteriana de diversos conservantes atualmente em uso na indústria de produtos cárnicos foi também testada face às estirpes bacterianas disponíveis. A Figura 2.72 e a Figura 2.73 mostram o resultado dos testes efetuados. Sabe-se à partida que alguns destes conservantes apresentam uma composição química que não é exclusivamente direcionada para a ação antimicrobiana pelo que são aplicados aos produtos cárnicos como conservantes mas com outras funções como é o exemplo do Nitrificante 12/4® ou do Nitrificante 15/0® que são compostos de sais nitrificantes (nitrito de sódio e nitrato de potássio) adicionados às carnes com a função de melhorar a cor e o sabor, mantêm também uma ação inibitória do crescimento de *Clostridium botulinum*.

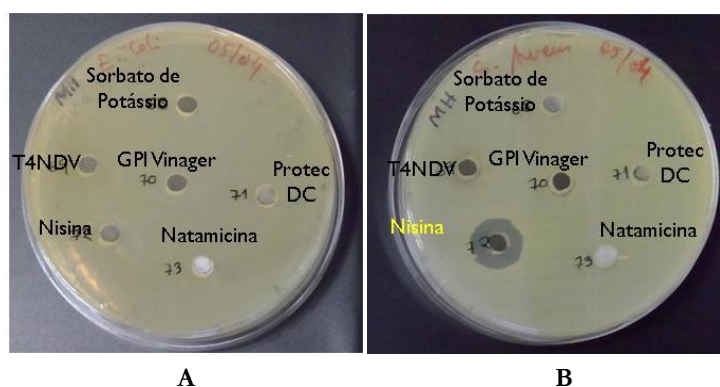
Outros conservantes testados têm na sua composição ácido acético ou ácido láctico (GPI vinager®, Purac 80® ou T4NDV®) que apresentam propriedades antimicrobianas como atrás comprovado pelo que seria de esperar que apresentassem alguma capacidade antimicrobiana. Tal não se verificou muito provavelmente devido ao facto de terem sido destes conservantes terem sido concebidos apenas para atuar noutras estirpes bacterianas, como *Listeria spp*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium Botulinum* e *Salmonella*, que não foram aqui testadas, tendo por isso um espetro de atuação mais limitado. Por outro lado também se pode levantar a hipótese de a concentração de conservantes usada nestes testes ser inferior à requerida para atuar sobre estas estirpes bacterianas.

Foi também testada a natamicina, antibiótico ativo para fungos e leveduras mas não sobre bactérias e vírus tendo os resultados do teste confirmado o expectável.

Por sua vez, o Inbac® que é apresentado como um produto de ação bacteriostática de uso universal que apresenta entre outros componentes o diacetato de sódio e o ácido málico não apresentou qualquer atividade antimicrobiana neste estudo mesmo sendo usado a 1% (m/m), uma concentração superior à dose recomendada que é no limite 0,4%. A Nisina que é uma bacteriocina apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* mas é preciso salientar que o limite máximo de concentração permitida por lei na indústria alimentar é de 0,00125 %, muito inferior ao usado nas condições testadas (1% m/m). Sais ou misturas de sais, como o sorbato de potássio ou o Provian K® (acetato de potássio e diacetato de potássio) também não apresentaram capacidade antimicrobiana quando testados a 1% (m/m) contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



**Figura 2.72** Método de difusão em ágar aplicado a diversos conservantes em uso na indústria dos produtos cárneos fatiados face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.



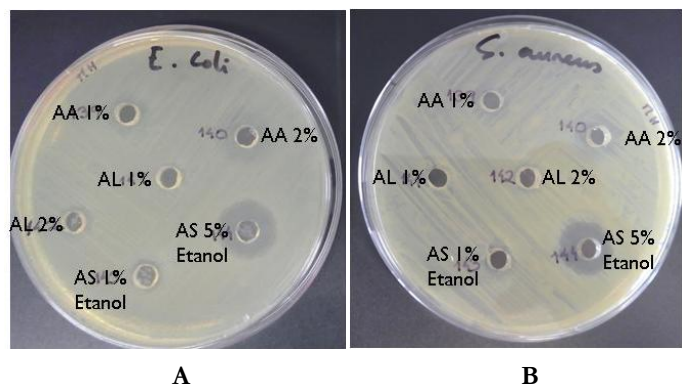
**Figura 2.73** Método de difusão em ágar aplicado a conservantes de uso recorrente na indústria dos produtos cárneos fatiados face a (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*.

Visto que o ácido acético e láctico apresentaram elevado poder antimicrobiano a altas concentrações, foram testadas concentrações mais baixas destes ácidos a 1, 2 e 5% (m/m) de ácido acético (AA), ácido láctico (AL) e também ácido sórbico (AS) tendo estas últimas soluções sido preparadas com etanol e as restantes com

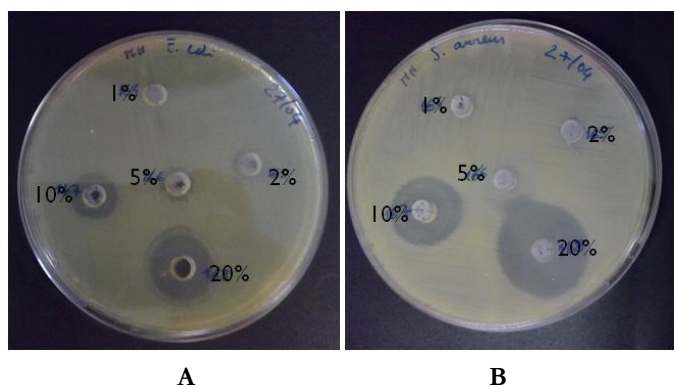


água desionizada. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2.74 sendo apenas de salientar a capacidade antimicrobiana do ácido sórbico a 5% contra *Staphylococcus aureus*.

O ácido cítrico de concentração 1, 2, 5, 10 e 20%(m/m) foi também testado (Figura 2.75) tendo os resultados obtidos revelado a sua capacidade antimicrobiana apenas a concentrações mais elevadas para as duas estirpes e de forma mais eficaz para *Staphylococcus aureus*.

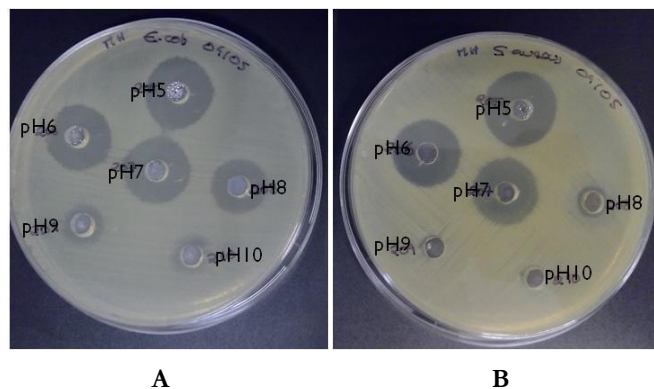


**Figura 2.74** Método de difusão em ágar aplicado a ácidos orgânicos fracos de concentração 1,2 e 5% face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*



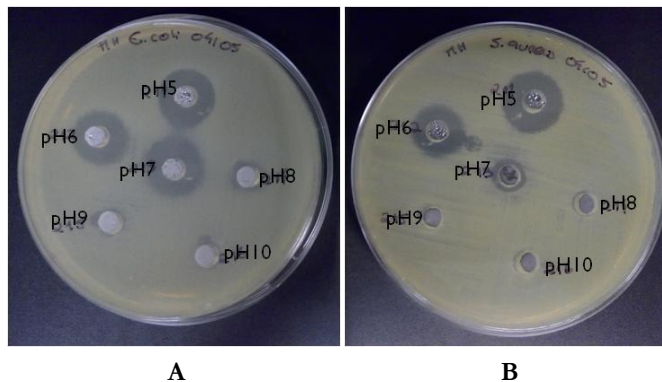
**Figura 2.75** Método de difusão em ágar aplicado a ácido cítrico de concentração 1,2 ,5, 10 e 20% face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*

Por sua vez, soluções de ácido sórbico a 10% com ajuste de pH de 5 a 10 com hidróxido de potássio (Figura 2.76) revelaram acentuada capacidade antimicrobiana até pH8 contra as duas estirpes bacterianas atuando sobre a membrana plasmática, com desorganização da sua estrutura e alteração da sua funcionalidade o que conduz à morte celular[55].



**Figura 2.76** Método de difusão em ágar aplicado a ácido sórbico 10% face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*. O pH das soluções foi acertado para 5,6,7,8,9 e 10 usando hidróxido de potássio.

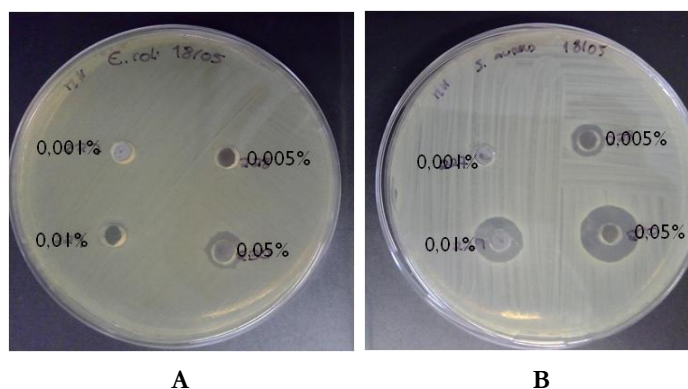
Soluções de ácido sórbico a 10% com o pH de 5 a 10 desta vez pelo uso de hidróxido de sódio (Figura 2.77) apresentam uma ação antimicrobiana nas condições testadas menos intensa que nas condições anteriores o que comprova que o sorbato de potássio que se forma na neutralização é de facto um bactericida mais eficaz que o sorbato de sódio. Contudo a pH7 o sorbato de sódio e sorbato de potássio apresentam boa capacidade antimicrobiana desde que se encontrem conjugados com os respetivos ácidos e a valores de pH específicos.



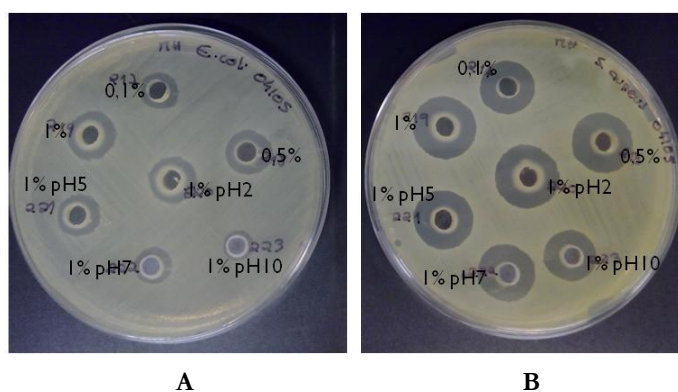
**Figura 2.77** Método de difusão em ágar aplicado a ácido sórbico 10% face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*. O pH das soluções foi acertado para 5,6,7,8,9 e 10 usando hidróxido de sódio.

Foi ainda testado o potencial inibitório de um tensoativo à base de aminoácidos, o CAE - Cocoyl arginine ethylester (Figura 2.78 e Figura 2.79). Os resultados revelaram boa inibição microbiana mesmo a baixas concentrações num largo espetro de pH, principalmente contra *Staphylococcus aureus* revelando assim a sua ação biocida suportada pela elevada afinidade deste tensoativo catiónico com a membrana plasmática

onde, após interação, a cauda hidrofóbica penetra no interior da membrana, conduzindo a uma perda de material citoplásmico que perturba não só a morfologia como também as funções da mesma[61].

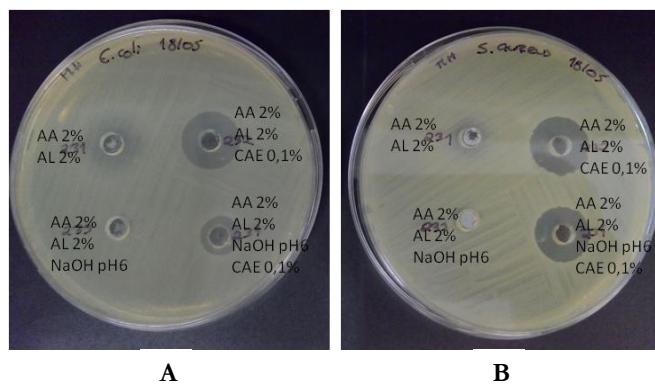


**Figura 2.78** Método de difusão em ágar aplicado a CAE em concentrações 0,001, 0,005, 0,01 e 0,05% face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*.

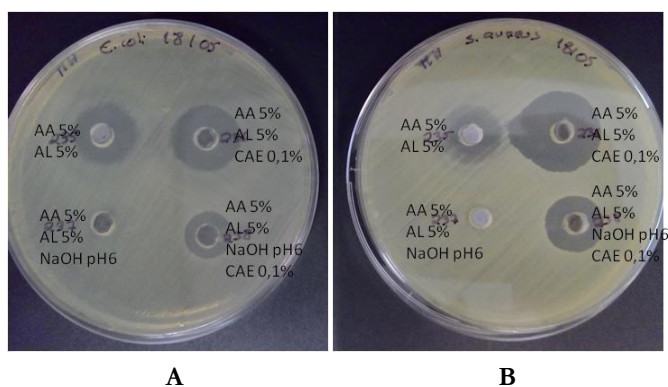


**Figura 2.79** Método de difusão em ágar aplicado a CAE em concentrações de 0,1% e a 1% (a pH 2,5,7 e 10) face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*.

A mistura de ácido acético e ácido láctico a 2 e 5% (m/m) foi testada com e sem a presença de CAE estando o resultado dos testes efetuados representado na Figura 2.80 e Figura 2.81.



**Figura 2.80** Método de difusão em ágar aplicado a soluções aquosas de ácido acético 2% com ácido láctico 2% face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*. A mistura destes dois ácidos foi também sujeita a uma modificação para pH6, foi adicionado CAE a 0,1% na solução original e na solução de pH alterado.



**Figura 2.81** Método de difusão em ágar aplicado a soluções aquosas de ácido acético 5% com ácido láctico 5% face a (A)*Escherichia coli* e (B)*Staphylococcus aureus*. A mistura destes dois ácidos foi também sujeita a uma modificação para pH6, foi adicionado CAE a 0,1% na solução original e na solução de pH alterado.

Os resultados obtidos revelam uma atividade antimicrobiana da mistura de ácidos melhorada na presença de CAE o que reitera uma vez mais a eficácia deste composto aqui a atuar em sinergia com os ácidos para uma inibição microbiana melhorada

# Capítulo 3

## 3. Conclusões

A realização deste estudo a nível da caracterização química e estrutural de substratos-amostra de produtos cárneos fatiados para aplicação de revestimentos edíveis; a nível da caracterização de biopolímeros e outros aditivos e a nível de estudos de capacidade antimicrobiana dos materiais caracterizados e de conservantes usados na indústria cárnica permitiu estabelecer alguns pilares importantes no prosseguimento dos trabalhos de investigação para o desenvolvimento de novos revestimentos edíveis a aplicar em produtos cárneos fatiados.

O fiambre da perna extra apresentou uma estrutura mais homogénea devido ao seu processamento, elevada firmeza e elasticidade e baixa hidrofobicidade compatível com baixo teor de gordura em contraste com o peito de peru que apresentou uma morfologia mais compacta, valores de firmeza e elasticidade mais baixos embora também tenha apresentado baixa hidrofobicidade. A zona gorda do bacon apresentou-se sem grandes irregularidades na morfologia devido à pouca firmeza da gordura e maior hidrofobicidade devido à presença de ácidos gordos de cadeia carbonada longa em contraste com a zona magra deste produto que apresentou uma hidrofobicidade baixa. A análise de FTIR feita a estes produtos permitiu destacar a zona gorda do bacon que apresentou bandas diferentes das observadas para os outros fiambres, possivelmente devido à elevada concentração de ácidos gordos.

No âmbito da caracterização de biopolímeros, a análise reológica permitiu concluir que existe um aumento da viscosidade com o aumento da concentração de polímero motivado pela promoção do entrelaçamento das cadeias. Também foi possível concluir que existe uma tendência para a viscosidade a 5°C ser superior à viscosidade a 20°C. A análise de DLS revelou valores de tamanho de partícula elevados remetendo para o facto das cadeias poliméricas se encontrarem agregadas em solução.

Os estudos de viscosidade em função do pH permitiram concluir que o alginato é estável em solução no intervalo de pH de 5 a 10 enquanto para valores de pH2 apresenta precipitação devido a baixa densidade de carga e à formação de ácido algínico.

Os ensaios de dissolução do quitosano em diferentes ácidos comprovaram que a utilização de ácido acético é a mais eficaz das opções testadas uma vez que apresenta uma concentração mássica mínima de dissolução inferior à do ácido láctico, cítrico, málico ou fosfórico. Por sua vez, o valor mais elevado de potencial zeta da solução de quitosano em que foi usado ácido acético para dissolução veio comprovar que este ácido é mais eficaz a protonar os grupos aminados do quitosano. Os ensaios reológicos mostraram ainda que a um dado valor de temperatura e para a mesma concentração de polímero, o quitosano Mw alta apresenta valores de viscosidade mais elevados quando comparada com as viscosidades do quitosano Mw

média e Mw baixa atestando assim a influência da massa molecular na viscosidade da solução polimérica. Por sua vez, a análise das curvas de fluxo em função do pH mostrou que o comportamento newtoniano das soluções de quitosano não é afetado pelo pH da solução, o que permite comprovar a estabilidade do polímero no intervalo de pH estudado. Pode também concluir-se que o aumento do pH promove uma diminuição da viscosidade do quitosano, consequência da diminuição da densidade de carga do polímero. Também é possível observar que o quitosano apresenta estabilidade quando o pH se encontra entre 3 e 6, no entanto, quando o pH da solução é corrigido para 7, existe formação de um precipitado devido à perda de carga do polímero que provoca o colapso das cadeias poliméricas.

Os ensaios reológicos da gelatina permitiram concluir que todas as soluções apresentam um comportamento bastante fluído dos 70 aos 25°C, sendo que a partir de 10 °C as soluções com 1 e 2% de concentração mostraram viscosidades muito elevadas, devido ao fenómeno de gelificação. Abaixo destas concentrações foi registado um ligeiro aumento da viscosidade com a diminuição da temperatura, no entanto, mesmo a 0°C as soluções não apresentaram viscosidades muito elevadas. Os ensaios de potencial zeta permitiram determinar o ponto isoelétrico da gelatina, pI de 7,77 o que permite classificá-la como gelatina do tipo A.

Nos estudos de capacidade antibacteriana concluiu-se que o ácido acético e o ácido láctico apresentam elevado poder antimicrobiano principalmente a partir da 10%(m/m) e na estirpe *Staphylococcus aureus*. A gelatina em solução aquosa e com o pH alterado não apresentou atividade antimicrobiana face às estirpes bacterianas em estudo mesmo a pH bastante baixo. A utilização de ácido láctico concentrado revelou a sua capacidade antimicrobiana contra as estirpes em estudo embora menos intensa que o ácido acético. Por sua vez, o Inbac® que é apresentado como um produto de ação bacteriostática de uso universal que apresenta entre outros componentes o diacetato de sódio e o ácido málico não apresentou qualquer atividade antimicrobiana nas condições usadas neste estudo mesmo usado a uma concentração superior à dose recomendada que é no limite 0,4%(m/m). A Nisina que é uma bacteriocina apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* mas é preciso salientar que o limite máximo de concentração permitida por lei na indústria alimentar é de 0,00125%(m/m), muito inferior ao usado nas condições testadas. Soluções de ácido sórbico a 10%(m/m) com o pH modificado com hidróxido de sódio apresentam uma ação antimicrobiana menos intensa que a manifestada com a utilização de hidróxido de potássio o que comprova que a presença de sorbato de potássio, formado na neutralização, confere uma ação bactericida mais eficaz que o sorbato de sódio. Os testes antibacterianos realizados usando CAE revelaram boas performances inibitórias quer a baixas concentrações quer usando uma concentração de 0,1 e 1%(m/m) e num largo espetro de pH, principalmente contra *Staphylococcus aureus* revelando assim a sua ação biocida suportada pela elevada afinidade deste tensioativo catiónico para com a membrana plasmática. A mistura de ácido acético e ácido láctico a 2 e 5% revelou uma atividade antimicrobiana melhorada na presença de CAE o que reitera uma

vez mais a eficácia deste composto aqui a atuar em sinergia com os ácidos para uma maior inibição microbiana.

Pretende-se que este estudo lance as bases para a concretização do grande objetivo do projeto onde se encontra inserido permitindo a criação de novas formulações de revestimentos edíveis a usar em produtos cárneos fatiados com o intuito de dispensar o embalamento em atmosfera protetora num período de tempo nunca inferior a 35 dias preservando todas as propriedades organolépticas e nutricionais do produto.





# Capítulo 4

## 4. Experimental

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Polímeros

Alginato de Sódio: Shandong Jiejng Group Corporation (lote 141 L2006)

Alginato de Sódio: Alfa Aesar (lote S13A058)

Alginato de Sódio: VWR CHEMICALS (lote 15E080009)

Quitosano de baixo peso molecular (50-190 kDa): Sigma Aldrich (lote STBF 82129 V)

Quitosano de peso molecular médio (190-310 kDa): Sigma Aldrich (lote: STBF 3507 V)

Quitosano de alto peso molecular (310-375 kDa): Sigma Aldrich (lote: AXBP 1333V)

Gelatina em pó neutra, grau comercial: Royal; Mondeléz International

#### 4.1.2 Solventes

Água desionizada

Ácido acético 99-100% p.a.: Chem Lab NV (lote: 20.1140811.100)

Ácido clorídrico S.G. ≈37%: Fisher Chemical (lote: 1352676)

Ácido cítrico p.a.: Merck (lote 8506439)

Ácido láctico 87,5% : M&B Laboratory Chemicals (lote L46/18/66)

Ácido málico: General purpose reagent L-malic acid 98,5% (lote 9007210C)

Ácido orto-fosfórico 85%: Panreac (lote 58702UFN)

Ácido sórbico a 99%: Riedel-de Haen lote 22410

Etanol a 96%: Fábrica de álcool - Manuel Vieira e C<sup>a</sup> (irmãos), sucrs

#### 4.1.3 Conservantes

CAE (Cocoyl arginine ethylester ): ajinomoto (lote 211174)

Lysactone®: Fuso Chemical Co., Ltd.  
Inbac®: CHEMITAL; Técnicas alimentárias  
Natamicina: Formulab (lote 102150801)  
Nisina niseen-S: Siveele (lote SLY101140704)  
Nitricure® : CHEMITAL; Técnicas alimentárias  
Nitrificante 15/0® : PCA; Produção e Consultadoria Alimentar  
Nitrificante 12/4®: PCA; Produção e Consultadoria Alimentar  
Purac 80® : Brenntag, Portugal lda  
Provian K®: Brandsweet food-tech S.A  
Protec DC®: ACTIVA FOOD-TECH S.A.  
T4NDV® : ProSur Get it Natural  
GPI Vinager®: ACTIVA FOOD-TECH S.A.

#### 4.1.4 Sais

Hidróxido de sódio em pérolas: José Manuel Gomes dos Santos (lote 31614)  
Hidróxido de potássio 85% da Panreac (lote 0000245361)

#### 4.1.4 Microbiologia

Estirpes de bactérias: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.  
Meio de cultura: agár Mueller Hinton

#### 4.1.5 Produtos cárneos fatiados

Os produtos cárneos fatiados foram fornecidos pela empresa Primor Charcutaria-Prima S.A. em embalagens de película plástica termosoldada a vácuo. tendo sido conservados na zona de refrigeração do frigorífico a uma temperatura de 4°C até à data de realização dos diferentes testes.

Fiambre da Perna Extra (% de carne de suíno (perna de porco)74%, humidade 21%, teor de proteína 16%)

Peito de Peru (% de carne de aves (peito de peru) 60%, humidade 30,5%, teor de proteína 15%)

Bacon (% carne de suíno (entremeada de porco) 87%, humidade de 5,6%, teor de proteína 18%)

## 4.2 Métodos

Nesta secção serão abordados os métodos de preparação de soluções e amostras em cada estudo, bem como uma breve descrição das técnicas usadas.

Com o foco no principal objetivo do projeto que é o desenvolvimento de revestimentos edíveis para produtos cárneos fatiados, procedeu-se a um estudo de caracterização exaustiva dos mesmos através de técnicas analíticas complementares às efetuadas em testes de controlo de qualidade pela empresa *Primor S.A.*

Em simultâneo, foi feita a seleção de biopolímeros com potencial para servir de base à matriz do revestimento edível, seguida da caracterização exaustiva destes materiais bem como de eventuais aditivos cuja ação se pode revelar vantajosa no cumprimento dos propósitos do projeto. As técnicas aplicadas vão deste a reometria para perceber o comportamento reológico dos biopolímeros em estudo, em particular a viscosidade dos sistemas para diferentes valores de temperatura e pH; o DLS para aferir o tamanho de partícula em solução; o potencial zeta que permite a análise da variação de carga superficial da partícula em função do pH e estudos microbiológicos, que incluem a técnica de difusão em agár, a fim de analisar a capacidade antimicrobiana das formulações em estudo contra algumas estirpes de bactérias patogénicas contaminantes dos produtos cárneos fatiados com particular destaque para a *E. Coli* e *Staphylococcus aureus*.

### 4.2.1 Caracterização dos produtos cárneos

Neste domínio pretende-se efetuar uma caracterização ampla dos produtos onde irão ser aplicados os revestimentos. Apesar de existirem já alguns testes, principalmente no âmbito do controlo de qualidade efetuados por parte da empresa *Primor S.A.*, que dão algumas indicações acerca da composição dos produtos cárneos, como informações do histórico de análises microbiológicas, nutricionais e físico-químicas tais como teores de proteína, percentagem de humidade e ainda os testes de validação do produto e estudos de vida útil, o modo como todos os constituintes estão distribuídos no produto cárneo, a sua influência na morfologia do produto e o modo como influenciarão a adesão do nosso revestimento, afiguram-se como fatores-chave que não são facilmente esclarecidos apenas com os testes de controlo de qualidade rotineiros.

Assim, recorrendo a técnicas analíticas complementares, procedeu-se a uma caracterização detalhada não só dos constituintes dos produtos cárneos, bem como a sua distribuição no produto e as características mais importantes que em muito influenciam a aplicação dos revestimentos e os resultados conseguidos com a aplicação dos mesmos.

#### 4.2.1.1 Análise morfológica e de microestrutura com recurso a SEM

A análise morfológica e de microestrutura mais detalhada nos produtos cárneos fatiados, foi feita com recurso a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) no equipamento ilustrado na Figura 4.1. Como

condições operacionais deste equipamento refere-se a utilização de um filamento de tungstênio como fonte de elétrons; uso de uma voltagem de 5KV, ampliação e campo de visão variáveis e ajustados à análise em questão. Foi utilizado um detetor de elétrons secundários (SE) do tipo Everhart-Thornley equipado com um cristal de cintilação -YAG (yttrium aluminium garnet).

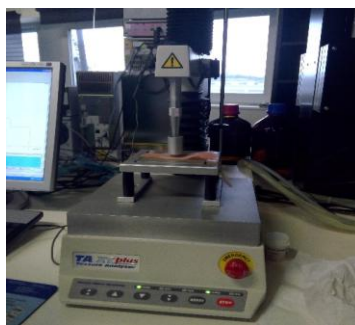


**Figura 4.1** Microscópio de varrimento eletrônico TESCAN Vega3 SBH SEM . Cortesia de TAIL-UC Trace Analysis and Imaging Laboratory

O equipamento funciona apenas no modo de alto vácuo com uma pressão operacional inferior a  $9 \times 10^{-3}$  Pa. As amostras em análise foram previamente desidratadas no liofilizador e, uma vez que são não condutoras, revestidas com uma fina camada ouro-paládio a fim de evitar a acumulação de carga.

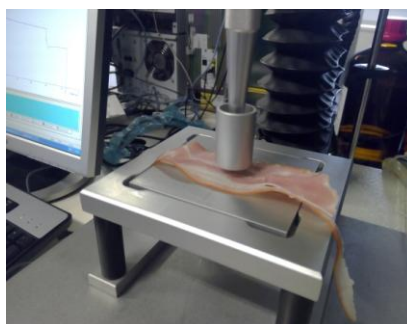
#### **4.2.1.2 Análise texturométrica**

A textura do produto é também um fator de extrema importância já que influencia a percepção do consumidor sobre a qualidade do produto. Foi efetuada uma caracterização texturométrica das nossas amostras de produtos cárneos no seu estado original a fim de podermos comparar numa fase posterior com a caracterização texturométrica dos produtos cárneos tratados com o revestimento edível. A análise da textura dos produtos cárneos foi realizada no equipamento TA.XTPlus (Figura 4.2), um analisador de textura versátil, que satisfaz todos os requisitos para a obtenção de informação textural exata e quantificável dos produtos cárneos em estudo.



**Figura 4.2** Analisador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems)

O perfil de textura foi obtido por teste de dupla compressão dos produtos cárneos fatiados conforme ilustrado na Figura 4.3.



**Figura 4.3** Análise do perfil de textura em produtos cárneos fatiados

Os testes foram efetuados com uma com uma sonda cilíndrica de 36 mm com raio P/36R e uma célula de carga de 5Kg, a uma velocidade de teste de 1,0 mm/s, com uma distância de compressão de 10 mm equivalente a 50% de compressão e uma força de contacto de 5,0g.

#### **4.2.1.3 Afinidade da superfície dos produtos cárneos com a água**

A afinidade da superfície dos produtos cárneos em estudo com a água foi avaliada através da realização de testes de hidrofobicidade com recurso ao equipamento ótico ilustrado na Figura 4.4.



**Figura 4.4** Câmara Moticam 2300 da Motic utilizada nos testes de hidrofobicidade

Foram testadas amostras dos produtos cárneos em estudo e efetuados os registos fotográficos correspondentes ao momento em que uma gota de água atinge a superfície da amostra (instante inicial) e após 3 segundos. A análise do perfil da gota em contato com a superfície do produto cárneo permite aferir a maior ou menor hidrofobicidade da sua superfície.

#### **4.2.1.4 Análise química e estrutural dos produtos cárneos**

A fim de obter informações moleculares e estruturais mais detalhadas e vitais na compreensão das interações químicas entre o revestimento e os produtos cárneos fatiados foi feita a análise usando a técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) em modo ATR.

Os espectros FTIR foram obtidos num equipamento Thermo Nicolet 380 (Figura 4.5), em modo ATR (Attenuated Total Reflection), no intervalo 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , usando 64 scans por espectro e uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 4.5** Equipamento Thermo Nicolet 380

## 4.2.2 Caracterização de materiais para revestimentos edíveis

A caracterização dos biopolímeros candidatos à aplicação sobre os produtos cárneos foi feita com recurso a diferentes técnicas analíticas, usando soluções poliméricas a diferentes concentrações e em diferentes condições de temperatura e de pH.

### 4.2.2.1 Caráter químico das soluções poliméricas

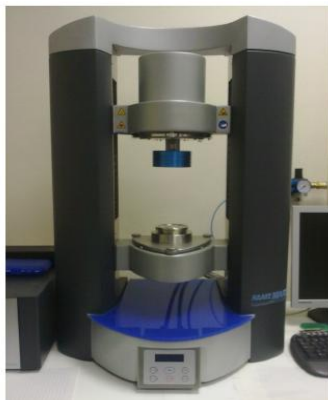
Sendo o pH um dos fatores que é importante controlar durante todo o processo de formulação do revestimento edível, foi feita a medição do pH das soluções poliméricas preparadas e analisada a sua variação com a concentração de polímero na solução. O equipamento usado nas determinações de pH foi um medidor de pH InoLab da WTW, Figura 4.6.



Figura 4.6 Medidor de pH InoLab da WTW

### 4.2.2.2 Estudo reológico

Foi realizado o estudo reológico de todas as soluções poliméricas preparadas. Após a preparação das soluções com diferentes percentagens em massa de polímero, estas foram colocadas no reómetro e, após definir um intervalo de força a ser aplicado (tensão de cisalhamento) foi medida a viscosidade e taxa de corte em função deste parâmetro. Os estudos reológicos foram realizados num reómetro Haake Mars III da Thermo Scientific, apresentado na Figura 4.7, utilizando a geometria cone e prato, C35/1 (cone de 35 mm de diâmetro com 1° de inclinação) sendo a temperatura estabilizada através de um sistema de *peltier* com circulador de água.



**Figura 4.7** Reômetro Haake Mars III da Thermo Scientific utilizado nos estudos reológicos.

#### **4.2.2.3 Medição do tamanho das partículas em dispersão por DLS**

Sendo a pulverização o método de aplicação selecionado para aplicação do revestimento edível torna-se importante analisar o tamanho de partícula nas soluções poliméricas em estudo. Este parâmetro bem como o índice de polidispersividade (PDI) nas soluções poliméricas foi medido por DLS (*Dynamic Light Scattering*). O DLS foi realizado à temperatura ambiente em soluções aquosas a 0,01% (m/m) dos biopolímeros em estudo. Foi utilizado um equipamento da marca Malvern, o Zetasizer Nano ZS, ilustrado na Figura 4.8, com ângulo de detecção de 173°, laser de He-Ne 4 mW executado a um comprimento de onda de 633 nm e equipados com um detetor de foto díodo de avalanche.



**Figura 4.8** Zetasizer Nano ZS da Malvern



#### 4.2.2.4 Medição da carga superficial dos biopolímeros através do potencial zeta

A carga superficial do biopolímero constitui uma medida de estabilidade de sistemas coloidais e é um parâmetro importante na medida em que permite prever e controlar as interações com outros constituintes do revestimento a fim de desenhar com maior precisão as suas propriedades em função das características pretendidas no novo material. Assim, os biopolímeros em estudo também foram caracterizadas em termos de carga superficial, através da medição do potencial zeta a 20°C em suspensões poliméricas a 0,5% (m/m) de cada um dos biopolímeros em estudo. A análise foi efetuada com recurso ao equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern utilizando um laser de He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) de 4 MW, com um ângulo fixo de deteção de 173° utilizando uma célula de poliestireno com elétrodos metálicos revestidos a ouro (Figura 4.9).



**Figura 4.9** Células de medição de potencial zeta usadas no Zetasizer Nano ZS da Malvern

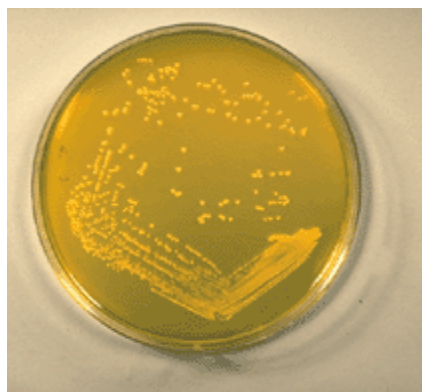
A amostra foi introduzida na célula lentamente com a ajuda de uma micropipeta de modo a garantir a ausência de bolhas de ar no interior da célula e a total imersão dos elétrodos. Fechou-se cada extremidade da célula e colocou-se no compartimento do aparelho de forma a realizar a medição. Para cada amostra foram efetuadas 3 medições sendo que cada uma delas é o resultado de uma série de leituras consecutivas no limite de 100 dependendo da variabilidade dos resultados, a uma temperatura de 20°C com um intervalo de equilíbrio térmico de 120s.

#### 4.2.3 Estudos microbiológicos

Os estudos microbiológicos foram efetuados através da realização de testes de capacidade antimicrobiana dos biopolímeros caracterizados e também de diversos componentes com potencial interesse na formulação do revestimento edível dos produtos cárneos face a duas estirpes de bactérias patogénicas bastante relevantes no que toca à segurança alimentar - *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Para tal foram previamente preparadas soluções aquosas de concentrações variáveis de biopolímeros (alginato, quitosano e gelatina), ácidos orgânicos, conservantes comerciais em uso corrente na indústria dos produtos cárneos fatiados e ainda um tensoativo catiónico, CAE, com potencial para utilização como

conservante alimentar. Procedeu-se à cultura das duas estirpes bacterianas em meio sólido, Agár Mueller-Hinton (MHA), por se tratar de um meio com uma composição adequada a um crescimento robusto destas duas estirpes. Assim, em condições de assepsia, foi feita a repicagem de colónias bem isoladas a partir do stock refrigerado para placas de meio de crescimento, seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. O aspeto das colónias isoladas encontra-se ilustrado nas figuras seguintes (Figura 4.10. e Figura 4.11).



**Figura 4.10** *Staphylococcus aureus* após repicagem e cultura



**Figura 4.11** *Escherichia coli* após repicagem e cultura

Após este período, tendo verificando que as estirpes bacterianas estavam bem isoladas, em condições de assepsia, foi preparado o inóculo de cada uma delas em tubo de ensaio diluindo as bactérias em água destilada até atingir a turvação de 0,5 na escala de MacFarland como ilustrado na Figura 4.12.



**Figura 4.12** Inóculo bacteriano com turvação de 0,5 na escala de MacFarland

De seguida, com recurso ao método difusão em agár (técnica do poço) foi feita a sementeira das colónias (Figura 4.13) em placas de MHA sólido.



**Figura 4.13** Preparação das placas de cultura com o inóculo bacteriano

Em cada placa semeada foram feitos poços no meio de cultura e em cada poço foi depositada uma amostra de 50 $\mu$ L de cada uma das soluções a testar (Figura 4.14). De seguida as placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas.



**Figura 4.14** Aspeto da placa de difusão com os poços e aplicação das amostras a difundir pelo meio de cultura

Após este período foi feita a observação macroscópica do halo de inibição criado em torno de cada poço. Esta observação incidiu nos parâmetros presença/ausência de halo de inibição e amplitude do mesmo e permitiu avaliar a capacidade antimicrobiana das formulações testadas contra estas duas estirpes bacterianas.

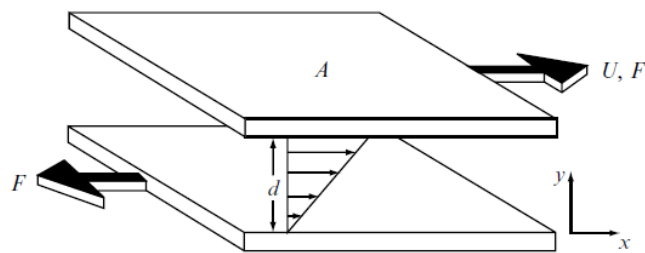
## 4.3 Técnicas de Caraterização

### 4.3.1 Reologia

A reologia é uma técnica que permite explicar como é que os materiais respondem a um determinado tipo de deformação. Com o intuito de otimizar as propriedades das suspensões e de prever o seu comportamento, é necessário entender o mecanismo pelo qual as suspensões resistem à sedimentação sob a ação de tensões gravitacionais. Neste campo, a reologia é uma ferramenta útil para estudar as interações que regem este tipo de comportamentos. No entanto, para efetuar as medições com o intuito de obter

informações sobre a estrutura existente nas suspensões é necessário realizar vários tipos de testes reológicos como por exemplo, oscilatórios, rotacionais ou de deformação[66].

Perante um determinado tipo de deformação, a resposta de corpos sólidos, líquidos e de gases pode variar consideravelmente, podendo essa deformação ser elástica, fluída ou fraturante. As medidas de viscosidade permitem determinar a resposta de um fluido simples perante o cisalhamento. Neste estudo, apenas consideramos um tipo simples de deformação, o cisalhamento, representado na Figura 4.15. Sob condições designadas por “antiderrapantes”, a camada de líquido mais próxima da parede encontra-se em fase estacionária relativamente à outra camada. Nos testes rotacionais podemos considerar um fluido entre duas placas planas e paralelas, de área  $A$ , separadas por uma altura  $d$ . Quando a força  $F$  é aplicada, paralela ao prato superior (prato móvel) a porção de fluido em contacto com esse prato vai adquirir uma velocidade  $U$ , enquanto a porção de fluido em contacto com o prato inferior (prato fixo) não se move, existindo, portanto, um gradiente de velocidades na amostra como representado na Figura 4.15. Se o espaçamento entre os dois pratos for muito pequeno, o perfil de velocidades é linear e, deste modo, concluímos que o gradiente é constante[67].



**Figura 4.15** Representação da velocidade de corte um fluido simples sujeito a cisalhamento em pratos paralelos [68]

Esta força  $F$  origina uma força com a mesma intensidade, contudo de sentido oposto, designada por tensão de corte ( $\tau$ ), que existe devido às forças de coesão do fluido estabelecidas com as paredes da placa e entre as camadas de um fluido, para o caso dos regimes laminares. Trata-se de uma força definida como sendo a força necessária para manter o prato superior em movimento à velocidade  $U$  dividida pela área do prato,  $A$ . A tensão de corte dá origem a um gradiente de velocidade entre as duas placas que se designa de velocidade de corte ( $\gamma$ ).

A Lei de Newton referente à viscosidade atesta uma relação de linearidade entre a tensão de corte ( $\tau$ ) e o gradiente local de velocidade ( $\mathcal{V}$ ), sendo a viscosidade do fluido ( $\eta$ ) a constante de proporcionalidade.

$$\tau_{xy} = \eta \mathcal{V} \quad \text{Equação 4.1}$$

Assim, todos os fluidos que seguem este comportamento são designados fluidos newtonianos. Verificamos então que se a viscosidade se mantiver constante com o aumento da velocidade de corte estamos na presença de um fluido newtoniano. Esta classe abrange todos os gases, líquidos e soluções homogêneas,

como por exemplo: água, leite, soluções de sacarose, óleos vegetais, entre outros. Fluidos em que a relação entre a taxa de deformação e a tensão de corte não é constante, são designados de fluidos não newtonianos. Nestes verifica-se que a viscosidade diminui ou aumenta, consoante o aumento da velocidade de corte. Frequentemente, é observada uma diminuição da viscosidade com a velocidade de corte, resultante de uma quebra na estrutura[68].

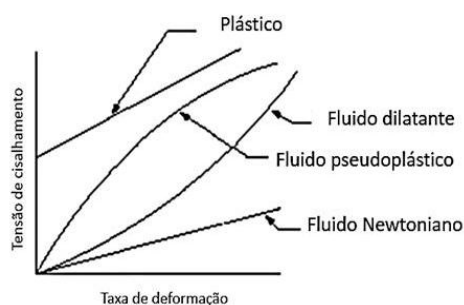
Do ponto de vista molecular, o estudo reológico das soluções poliméricas permite retirar informações importantes sobre o polímero como, por exemplo, a sua massa molar média, as dimensões da cadeia polimérica em solução e o grau de solvatação do polímero[69].

Uma característica das soluções poliméricas diluídas reside no facto da sua viscosidade ser consideravelmente superior relativamente à do solvente puro, ou de soluções diluídas de pequenas moléculas. Isto deve-se à grande diferença de tamanho existente entre as moléculas de polímero e as de solvente, sendo que a viscosidade aumenta com o aumento das dimensões das macromoléculas em solução.

As curvas de tensão de corte em função da taxa de deformação são usadas para caracterizar o comportamento viscoso dos fluidos. Quando a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação até atingir um valor praticamente constante, o fluido é designado de pseudoplástico. Por sua vez os líquidos que apresentam um comportamento oposto a este são designados de dilatantes sendo que estes se tornam rígidos à medida que a taxa de deformação aumenta. Os fluidos que se comportam como corpos rígidos até que um valor mínimo de tensão de corte seja atingido, exibem um comportamento inicialmente rígido e em seguida mostram uma taxa de deformação constante, são designados de plásticos[70]

Em suma, de acordo com o tipo de escoamento, os sistemas podem ser classificados em reofluidificantes (também designados de pseudoplásticos), reofluidificantes com valor de cedência (ou plásticos) e reoesspessantes (ou dilatantes)[71].

As curvas de escoamento que traduzem os diferentes tipos de comportamento reológico exibem as relações da viscosidade em função da tensão de corte ou em função da velocidade de corte, como representado na Figura 4.16.



**Figura 4.16** Comportamento de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos. Diagrama representativo variação da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação[68]

### 4.3.2 Medição do tamanho de partícula por DLS

A técnica de DLS, também denominada espectroscopia de correlação fotónica ou dispersão de luz quasi-elástica, é usada de forma eficaz na estimativa do tamanho médio de partícula de 2 nm a 2  $\mu$ m em suspensões coloidais[72, 73]. O DLS mede o movimento Browniano das partículas coloidais em suspensão (movimento aleatório) e relaciona-o com o tamanho das mesmas. Atendendo a que partículas de maiores dimensões exibem movimentos Brownianos menos acentuados e vice-versa. A velocidade do movimento browniano é definida através de uma propriedade designada por coeficiente de difusão translacional (D), que se relaciona com o diâmetro hidrodinâmico pela equação de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{RT}{NA} \frac{1}{6\pi \eta \alpha} \quad \text{Equação 4.2}$$

em que D é o coeficiente de difusão, R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta,  $N_A$  é a constante de Avogadro,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $\alpha$  é o raio hidrodinâmico da partícula. O raio hidrodinâmico assim calculado é normalmente superior ao raio das partículas obtido por outras técnicas (tais como microscopia eletrónica de transmissão, microscopia eletrónica de varrimento e difração de raios X) devendo-se isto à esfera de solvatação que se encontra na superfície das partículas. Esta esfera de solvatação forma-se devido à presença de iões em solução que interagem electrostaticamente com a partícula, formando uma camada em volta da partícula que aumenta efetivamente o seu raio[72]. Apesar desta limitação, a técnica permite determinar o tamanho das partículas em suspensão de uma forma rápida e fiável em amostras com baixa dispersão de tamanhos. Para amostras polidispersas, a medição não é tão fiável e normalmente ocorre um desvio dos resultados para maiores diâmetros. A medida do diâmetro obtida por luz difundida é um método que recorre à aproximação de Rayleigh, segundo o qual  $I \propto d^6$  e  $I \propto 1/\lambda^4$ , onde I é a intensidade da radiação, d é o diâmetro da partícula e  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação. Isto traduz-se em diferentes gráficos de resultados consoante o objeto de análise (número de partículas com um certo diâmetro, volume de partículas com um certo diâmetro ou intensidade de partículas com um certo diâmetro). Assim, a contribuição das partículas maiores para a intensidade de luz medida é muito superior, podendo mascarar as flutuações de intensidade de luz devido à presença de partículas mais pequenas. Como tal, esta técnica é consideravelmente sensível à formação de agregados assim como de nanopartículas de maiores tamanhos na distribuição de raio hidrodinâmico determinado. Por esta razão a medição fiável de diâmetros através desta técnica depende consideravelmente da estabilidade das soluções coloidais[72, 74].

Existem vários parâmetros que afetam a medida do tamanho hidrodinâmico, em particular a temperatura, a força iónica do meio suspensor e as características superficiais da partícula. A temperatura é um

parâmetro de grande relevância pois os gradientes de temperatura perturbam a estabilidade cinética do sistema (a uma certa temperatura são criadas correntes de convecção no sistema que podem conduzir a uma medida errada) para além de afetarem a viscosidade do meio. O tipo de iões presentes e a sua concentração (no meio suspensor) afetam a velocidade de difusão dos colóides, determinando a espessura da dupla camada elétrica (conhecida por tamanho de Debye,  $K^{-1}$ ). Por exemplo, para o mesmo colóide, um meio de baixa condutividade (baixa força iónica) produz uma dupla camada maior, o que reduz a velocidade de difusão, resultando num diâmetro hidrodinâmico aparentemente maior. Qualquer alteração na superfície da partícula coloidal vai também afetar a velocidade de difusão e conseqüentemente, o tamanho aparente do colóide. Por exemplo, um polímero adsorvido à superfície das partículas afeta mais o raio hidrodinâmico se estiver projetado para o meio de suspensão do que se estiver orientado com a superfície[72].

A limitação do DLS no que concerne à geometria das partículas, faz com que as esferas sejam única forma geométrica que é corretamente medida. O diâmetro hidrodinâmico medido para partículas não esféricas é o correspondente ao de uma partícula esférica com o mesmo coeficiente de difusão translacional. O laser ilumina a célula de medida, que contém a amostra, com radiação a um comprimento de onda fixo. Para soluções diluídas, a maior parte do feixe de luz atravessa a amostra, e apenas uma fração deste é desviado do trajeto (dispersando-se em diversos ângulos) ao deparar-se com uma ou mais partículas. Por sua vez, o detetor capta a luz dispersa num determinado ângulo. Um processador digital (denominado correlador), recebe os sinais de luz captados pelo detetor e compara-os em sucessivos intervalos de tempo, de forma a derivar a taxa na qual estes variam. A informação obtida pelo correlador é transferida para um computador equipado com um software que analisa os dados efetuando a comparação em sucessivos intervalos de tempo, de forma a derivar a taxa na qual estes variam em relação ao respetivo tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão e critérios de qualidade[72, 74].

Durante este trabalho utilizou-se esta técnica para determinar o diâmetro hidrodinâmico dos biopolímeros em solução aquosa.

Os testes de DLS foram efetuados a todas as formulações produzidas, diluídas com água destilada, em triplicado e à temperatura de 20°C. Foi utilizado um equipamento da marca Malvern, modelo Zetasizer Nano S, com ângulo de deteção de 173°, laser de He-Ne 4 mW executado a um comprimento de onda de 633nm e um detetor de foto díodo de avalanche.

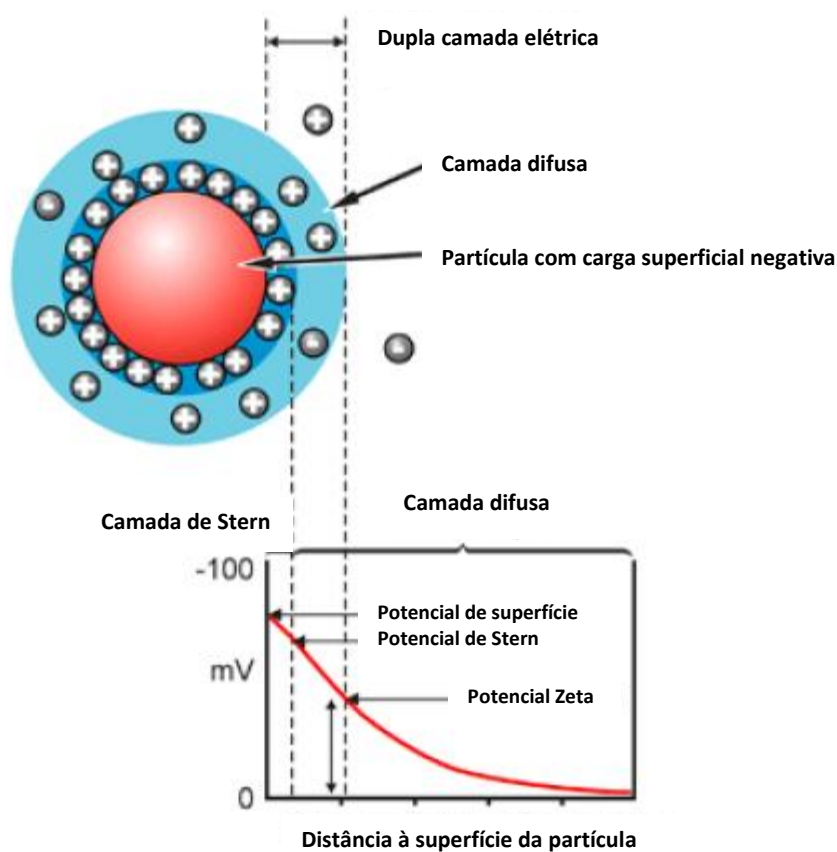
### **4.3.3 Potencial Zeta**

O potencial zeta é uma medida da magnitude da carga eletrostática ou de repulsão/atração entre as partículas e é um dos parâmetros fundamentais que se sabe afetarem a sua estabilidade. A determinação do potencial zeta consiste, essencialmente, na medição da carga eletrostática na superfície da nanopartícula

através de um laser que atravessa a célula de amostra sendo a dispersão detetada segundo um ângulo de 90°. Esta medição pode dar informações relacionadas com a dispersão, a agregação ou floculação de dispersões, emulsões e suspensões[75].

Tratando-se do potencial eletrostático originado pela adsorção do solvente e outros iões à superfície das partículas, o potencial zeta ( $\zeta$ ) é frequentemente considerado uma medida de estabilidade de sistemas coloidais, dado que em muitos casos esta depende em grande parte das repulsões eletrostáticas existentes entre as partículas[75].

Os biopolímeros em solução apresentam uma superfície que está organizada numa dupla camada elétrica, região interna ou camada de Stern onde se encontram os iões fortemente ligados à superfície e uma região externa ou camada difusa em que se encontram iões ligados à superfície por interações mais fracas conforme ilustrado na Figura 4.17.



**Figura 4.17** Descrição da Camada de Stern e relação com os diferentes potenciais em torno de uma partícula de carga negativa[76]

A camada difusa apresenta uma fronteira em que os iões e as nanopartículas formam uma entidade estável que se designa como plano deslizante e o potencial desta fronteira denomina-se potencial zeta.



A técnica utilizada para a medição de potencial zeta neste trabalho, designada de microeletroforese Doppler a laser, baseia-se na aplicação de um campo elétrico à amostra de modo induzir movimentação das nanopartículas carregadas em direção aos elétrodos com carga oposta. A velocidade do movimento da partícula no campo elétrico é medida por uma técnica interferométrica a laser patenteada, chamada M3 PALS (espalhamento de luz com análise de fases) e corresponde à mobilidade eletroforética que se pode relacionar com o potencial  $\zeta$  através da equação de Henry .

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} KR \quad \text{Equação 4.3}$$

em que  $U_E$  representa a mobilidade eletroforética,  $\varepsilon$  a constante dielétrica do meio,  $\eta$  a viscosidade do meio,  $\zeta$  o potencial zeta e  $f(kR)$  é a função de Henry. A partir dessa medição é possível fazer o cálculo da mobilidade eletroforética e, a partir desta, o potencial zeta e a distribuição do potencial zeta para a amostra em análise.

Esta técnica apresenta algumas limitações devido às aproximações efetuadas para a função de Henry em que se utilizam aproximações Smoluchowski ( $f(kR)=1,5$ ) para sistemas aquosos e para sistemas não aquosos recorre-se à aproximação de Huckel ( $f(kR)=1$ ), ocorrendo situações em que estas aproximações não são aplicáveis[75].

O conhecimento do potencial zeta das partículas numa formulação pode ser usado para fazer escolhas lógicas sobre a química da formulação possibilitando assim a seleção de materiais mais adequados para melhorar a estabilidade e aumentar o tempo de prateleira dos produtos. Pode também ser usado para estudar o efeito dos componentes da formulação noutras propriedades, tais como a viscosidade com o objetivo de alcançar uma viscosidade mais baixa a concentrações mais elevadas, por exemplo[77].

A medição do potencial zeta em soluções aquosas dos biopolímeros em estudo assume elevada importância no decorrer deste trabalho dado que permite monitorizar a ação antimicrobiana de alguns biopolímeros, como por exemplo o quitosano, em função do pH do sistema.

#### **4.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR)**

A espectroscopia de infravermelho é uma das técnicas mais versáteis usadas em química e certamente um dos mais importantes métodos analíticos disponíveis. Com o acoplamento do ATR torna-se uma técnica experimental versátil sendo relativamente fácil obter espectros fidedignos a partir de amostras virtualmente em qualquer estado. A análise de líquidos, soluções, pastas, pós, filmes, fibras, gases e superfícies diversas pode ser realizada mediante uma seleção criteriosa da técnica de amostragem. Devido a uma notável melhoria na

instrumentação, foram desenvolvidas uma variedade de novas técnicas com um grau de sensibilidade de tal modo apurado que tornou possível a análise de amostras até então intratáveis[78]. A técnica de FTIR é baseada na vibração dos átomos dentro da molécula. Geralmente, o espectro de infravermelho é obtido através da incidência de radiação infravermelha (com intervalo de número de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) através da amostra e determinando a fração de radiação incidente que é absorvida a uma determinada energia[79].

A energia correspondente a cada pico de absorção detetado corresponde à frequência de vibração de parte da molécula. A fim de produzir um sinal de absorção mensurável em espectroscopia de infravermelho, o modo vibracional deve causar uma mudança no momento dipolar da molécula. Quanto maior for essa mudança, mais intensa será a banda de absorção[78].

Historicamente, os instrumentos dispersivos, disponíveis desde os anos 40, eram usados para obter espectros de infravermelho. Nas décadas mais recentes, esses métodos foram substituídos por um método bem diferente. Presentemente, os espectrómetros de infravermelho com transformadas de Fourier, com os diferentes componentes ilustrados na Figura 4.18, são os mais usados e melhoraram de forma acentuada a aquisição de espectros de infravermelho[78].



**Figura 4.18** Componentes básicos de um espectrómetro FTIR (adaptado de[78])

Os métodos tradicionais de transmitância podem tornar-se limitados em termos da análise de algumas amostras peculiares. Tais limitações podem ser ultrapassadas pela utilização das técnicas de refletância. A espectroscopia de refletância total atenuada (ATR) utiliza o fenômeno da reflexão total interna, segundo o qual um feixe de radiação ao penetrar num cristal irá sofrer reflexão total interna, quando o ângulo de incidência na interface entre a amostra e o cristal for maior que o ângulo crítico, sendo este função dos índices de refração das duas superfícies. O feixe penetra com uma fração de comprimento de onda abaixo da superfície refletora quando um material que absorve radiação de modo seletivo, entra em contacto com essa superfície. Esta técnica apresenta várias vantagens quando comparada com os métodos de transmitância, sendo de referir a redução do tempo de preparação da amostra e a capacidade de análise de praticamente todos os tipos de amostra[80]

A espectroscopia FTIR-ATR foi usada no presente trabalho como técnica suplementar de caracterização dos produtos cárneos permitindo obter informações moleculares e estruturais mais detalhadas e vitais quer na compreensão das interações químicas entre o revestimento e os produtos fatiados quer na elucidação da estrutura molecular dos biopolímeros em estudo, em particular do alginato.

### **4.3.5 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)**

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM) é uma técnica analítica de rotina usada para obter imagens de alta resolução. A utilização desta técnica permite obter informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos numa amostra sólida. Assim, através do SEM é possível a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos, devido à sua alta resolução. A utilização de equipamentos comerciais permite efetuar observações até uma gama de 2 a 5 nm enquanto a utilização de equipamentos de pesquisa avançada apresenta uma resolução inferior a 1 nm. Além disso, com esta técnica é possível obter imagens das amostras analisadas com uma aparência tridimensional devido à grande profundidade de campo[81].

O princípio de funcionamento do SEM consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, geralmente usando como fonte um filamento de tungstênio aquecido, para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detetor a uma tela catódica cujo varrimento está sincronizado com o do feixe incidente. Através de um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra. O sinal da imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra sendo captado pelo detetor e usado na modulação do brilho do monitor permitindo assim a observação. O feixe de elétrons é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo, e posteriormente é focado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas. Ao interagir com a amostra, o feixe produz elétrons e fótons que posteriormente são convertidos em sinal de vídeo[81].

A utilização desta técnica no presente estudo destinou-se a efetuar uma análise microestrutural mais detalhada dos produtos cárneos fatiados.

### **4.3.6 Análise de textura**

No sector alimentar, a análise sensorial tem uma grande importância para avaliar a aceitabilidade, comercialização e qualidade do produto, fazendo parte do plano de controlo de qualidade na indústria. Neste contexto, a textura do produto é um fator de extrema importância já que influencia a percepção do consumidor sobre a qualidade do produto. A textura é constituída pelo conjunto de todas as propriedades reológicas e estruturais (geométricas e de superfície) de um alimento, perceptíveis pelos recetores mecânicos, táteis e eventualmente pelos recetores visuais e auditivos. Manifesta-se quando o alimento sofre uma deformação (quando é mordido, prensado, cortado, etc), e é através dessa interferência na integridade do alimento que se pode ter noção da resistência, coesividade, fibrosidade, granulabilidade, aspereza, crocância, entre outras. As propriedades da textura podem ser classificadas em três categorias: mecânica, geométrica e de composição, que por sua vez podem ser subdivididas em primárias e secundárias[82]. Para alimentos líquidos,

tal deformação é designada de fluidez; para alimentos semi-sólidos ao invés de textura, denomina-se consistência[83].

A medição da firmeza e elasticidade dos produtos cárneos em estudo foi feita no equipamento TA.XTPlus. Para tal procedeu-se ao ajuste das configurações do aparelho e utilizou-se um acessório adequado que consiste numa sonda cilíndrica de 36 mm de raio (P/36R). As amostras a analisar foram retiradas do frigorífico imediatamente antes da realização dos testes a fim de preservarem a humidade e frescura. Antes de dar início aos testes de textura propriamente ditos foi feita a calibração da sonda a fim de obter o valor de tensão a 100%. O teste foi então iniciado colocando a amostra numa posição central debaixo da sonda cilíndrica com o cuidado de evitar quaisquer zonas irregulares ou não representativas (Figura 4.19).



**Figura 4.19** Teste de firmeza realizado em fiambre da perna extra à temperatura ambiente

Este teste assume que a superfície da amostra é mais larga que o diâmetro da sonda usada. A sonda comprime a amostra até atingir 25% da altura do produto, mantém essa posição por 30 segundos e, em seguida, retira-se a amostra que retorna à sua posição inicial.

A firmeza é definida como a força (em gramas-força, quilogramas-força ou newtons) ou de modo simplificado em gramas ou quilogramas, necessária para comprimir o produto a uma altura pré-definida, por exemplo 25% da altura inicial da amostra. Uma forma simples de calcular a elasticidade consiste em medir a força após 30 segundos e dividir este valor pela força máxima e de seguida multiplicar 100 permitindo assim calcular a taxa de recuperação. Quanto mais próximo de 100% estiver o resultado, mais elástico o produto é considerado.

Antes de se iniciar cada ensaio, é indispensável assegurar que as amostras em estudo são homogéneas na sua espessura caso contrário, quando o analisador de textura comprime por 25% da altura da amostra, a distância percorrida pela sonda irá variar. Uma superfície plana também é importante para que o teste seja iniciado em boas condições.

Uma vez realizados os testes, os valores de particular interesse para análise amostral podem ser obtidos automaticamente pelo *software* do equipamento. Os resultados obtidos nos testes a partir das amostras analisadas de produtos cárneos fornecem a média da força de compressão para uma compressão na amostra a 25% da sua altura inicial.



# Bibliografia

1. Rougemont, A.J., *Alimentos seguros—necessidade ou barreira comercial?* Perspectivas online, 2014. **1**(2): p. 62-70.
2. Sanchez-Ortega, I., et al., *Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation*. TheScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 1-18.
3. Embuscado, M.E. and K.C. Huber, *Edible films and coatings for food applications*. 2009: Springer.
4. Kester, J. and O. Fennema, *Edible films and coatings: a review*. Food technology, 1986. **40**(12): p. 47-59.
5. Le, R.L., *Method of coating freshly cut surfaces of meat*. U.S. Patent No 2,819,975. 1958.
6. Pinheiro, A., et al., *Diffusion of bioactive peptides from chitosan-based edible films-effects of temperature and peptides molecular weight*. Special Publication - Royal Society of Chemistry, 2010. **323**(1): p. 233-237.
7. Tharanathan, R., *Biodegradable films and composite coatings: past, present and future*. Trends in Food Science & Technology, 2003. **14**(3): p. 71-78.
8. Pinheiro, A., et al., *Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares*. Boletim de Biotecnologia, 2010. **85**: p. 18-28.
9. Fernández-Pan, I., X. Carrión-Granda, and J.I. Maté, *Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets*. Food Control, 2014. **36**(1): p. 69-75.
10. Bower, D.I., *An introduction to polymer physics*. 2002: Cambridge University Press.
11. von Schmeling, H. H. K. B., *Eighty years of macromolecular science: from birth to nano-, bio-and self-assembling polymers—with slight emphasis on European contributions*. Colloid and Polymer Science, 2011. **289**(13): p. 1407-1427.
12. De Paoli, M.A., *Degradação e estabilização de polímeros*. 2009: Artliber São Paulo.
13. Nicholson, J.W., *The chemistry of polymers*. 2012: Royal Society of Chemistry.
14. Causin, V., *Polymers on the Crime Scene: Forensic Analysis of Polymeric Trace Evidence*. 2015: Springer.
15. Pahari, A. and B. Chauhan, *Engineering chemistry*. 2006: Laxmi Publications.
16. Kaplan, D.L., *Introduction to biopolymers from renewable resources*. 1998: Springer.
17. Hosseini, S.F., et al., *Bio-based composite edible films containing Origanum vulgare L. essential oil*. Industrial Crops and Products, 2015. **67**: p. 403-413.
18. Smidsrød, O., S. Moe, and S.T. Moe, *Biopolymer chemistry*. 2008: Tapir Academic Press.
19. Karlson, L., *Hydrophobically Modified Polymers. Rheology and Molecular Associations*. 2002: Lund University.
20. Mark, J.E., *Physical properties of polymers handbook*. 1996: Springer.
21. Antoniou, E., *Structure-property relationships in associating polymer solutions*. 2008: ProQuest.
22. Attwood, D. and A.T. Florence, *Physicochemical principles of pharmacy*. 1998: Macmillan.
23. Dutta, S. *Global Information Technology Report 2008-2009*. 2009: World Economic Forum.

24. Peniche, C., et al., *Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation*. Macromolecular Bioscience, 2003. **3**(10): p. 511-520.
25. Kumar, M.N.R., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and functional polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.
26. Sousa, H.C.d., M.E. Braga, and A. Sosnik, *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados*. 2015: Imprensa da Universidade de Coimbra.
27. Garcia, R.B., et al., *Evaluation of gels obtained from acetylation of chitosan in heterogeneous medium*. Química Nova, 2008. **31**(3): p. 486-492.
28. Borgognoni, C.F., B. Polakiewicz, and R.N.d.M. Pitombo, *Stability of d-limonene emulsions in modified chitosan*. Food Science and Technology (Campinas), 2006. **26**(3): p. 502-508.
29. Yuan, Y., et al., *The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release*. Carbohydrate Polymers, 2007. **68**(3): p. 561-567.
30. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: properties and applications*. Progress in polymer science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
31. Kittur, F., et al., *Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry*. Carbohydrate polymers, 2002. **49**(2): p. 185-193.
32. Campana-Filho, S.P., et al., *Extração, estruturas e propriedades de alfa-e beta-quitina*. Química Nova, 2007. **30**(3): p. 644-650.
33. Azevedo, V., et al., *Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais*. Revista eletrônica de Materiais e processos, 2007. **2**(3): p. 27-34.
34. Borgognoni, C.F., B. Polakiewicz, and R. Pitombo, *Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006. **26**(3): p. 502-508.
35. Hintze, K.J., et al., *Nutraceutical Properties of Milk Fat Globular Membrane*. Biotechnology of Biopolymers, 2011.
36. Kong, M., et al., *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review*. International journal of food microbiology, 2010. **144**(1): p. 51-63.
37. Dutta, P., et al., *Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications*. Food chemistry, 2009. **114**(4): p. 1173-1182.
38. Zivanovic, S., S. Chi, and A.F. Draughon, *Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils*. Journal of food science, 2005. **70**(1): p. 45-51.
39. Prashanth, K.H. and R. Tharanathan, *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview*. Trends in food science & technology, 2007. **18**(3): p. 117-131.
40. Brasil, F.I., *Os alginatos e suas múltiplas aplicações*. Revista Fib, 2013. **26**: p. 34-38.
41. Pereira, L., *Guia ilustrado das macroalgas*. 2009: Imprensa da Universidade de Coimbra.



42. Souza, K.d., P. Zamora, and S.F. Zawadzki, *Imobilização de ferro (II) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processos fenton*. Química Nova, 2008. **31**(5): p. 1145-1149.
43. Garcia-Cruz, C.H., U. Foggetti, and A.N.d. Silva, *Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção*. Química Nova, 2008. **31**(7): p. 1800-1806.
44. Carneiro-da-Cunha, M.G., et al., *Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production*. Carbohydrate polymers, 2011. **85**(3): p. 522-528.
45. Barrera, A., et al., *Effect of pectins on the gelling properties of surimi from silver carp*. Food Hydrocolloids, 2002. **16**(5): p. 441-447.
46. D'Avila, V.D.L., *Biofilmes à base de gelatina, aplicados na conservação de frutos de mirtilo (Vaccinium ashei Reade)*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.
47. Silva-Weiss, A., et al., *Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods*. Food Engineering Reviews, 2013. **5**(4): p. 200-216.
48. Dai, C.A., Y.F. Chen, and M.W. Liu, *Thermal properties measurements of renatured gelatin using conventional and temperature modulated differential scanning calorimetry*. Journal of applied polymer science, 2006. **99**(4): p. 1795-1801.
49. *A gelatina e seus benefícios para a saúde humana*, Food Ingredients Brasil. 2011. **18**: p. 56-65.
50. Dick, E., *Gelatine a look at functionality*. International Food Ingredients.1998. **2**: p. 42-46.
51. Júnior, O.R., et al., *Estudo da microbiota envolvida na deterioração blown pack de cortes cárneos embalados a vácuo*. Ars Veterinaria. **27**(2): p. 094-101.
52. Adam, M. and R. Moss, *Food Microbiology the Royal Society of Chemistry Thomas Garden House Science Park*. Cambridge CB, 1995. **40**: p. 156-218.
53. Forsythe, S.J., *Microbiologia da segurança dos alimentos*. 2013: ArtMed Editora.
54. Jay, J.M., *Modern food microbiology*. 2012: Springer Science & Business Media.
55. Murray, P., K.S. Rosenthal, and M.A. Pfaller, *Microbiologia médica*. 2015: Elsevier Brasil.
56. Brunton, L.L., B. Chabner, and B.C. Knollmann, *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Vol. 12. 2011: McGraw-Hill Medical New York.
57. Portocarrero, S., M. Newman, and B. Mikel, *Reduction of Listeria monocytogenes, Salmonella spp., and Escherichia coli O157: H7 During Processing of Country-cured Hams*. Journal of food science, 2002. **67**(5): p. 1892-1898.
58. Jay, J.M., M.J. Loessner, and D.A. Golden, *Modern food microbiology*. 2008: Springer Science & Business Media.
59. Cutter, C., et al., *Major microbiological hazards associated with packaged fresh and processed meat and poultry*. Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging. 2012: Woodhead Publishing.

60. Vives, M., M. Infante, and M. Vinardell, *Comparative study of the resistance of different erythrocytes to haemolysis by the surfactant lysine laurate*. Pharmacy and Pharmacology Communications, 1997. **3**(12): p. 601-604.
61. Denyer, S.P., *Mechanisms of action of antibacterial biocides*. International biodeterioration & biodegradation, 1995. **36**(3): p. 227-245.
62. Tagliari, M.P., et al., *Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato*. Quim. Nova, 2012. **35**(6): p. 1228-1232.
63. Vidart, J.M.M., et al., *Avaliação da eficiência de incorporação de diclofenaco de sódio em partículas de sericina e alginato*. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2015. **2**(1): p. 1928-1935.
64. Morrison, R.T. and R.N. Boyd, *Química orgânica*. 1998: Pearson Educación.
65. Prestes, R.C., *Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos*. Journal of Health Sciences, 2015. **15**(1): p. 65-74.
66. Faers, M.A. and G.R. Kneebone, *Application of rheological measurements for probing the sedimentation of suspension concentrate formulations*. Pesticide science, 1999. **55**(3): p. 312-325.
67. Antunes, F., *Mixed solutions of polymers and surfactants*. 2006, PhD Thesis, Universidade de Coimbra.
68. Ying, Q. and B. Chu, *Overlap concentration of macromolecules in solution*. Macromolecules, 1987. **20**(2): p. 362-366.
69. Johnson, K.M., et al., *Hydrophobically modified acrylamide-based polybetaines. II. Interaction with surfactants in aqueous solution*. Journal of applied polymer science, 2004. **92**(1): p. 658-671.
70. Anusavice, K.J., *Phillips Materiais Dentários*. 2013: Elsevier Health Sciences Brazil.
71. Kronberg, B., K. Holmberg, and B. Lindman, *Surface chemistry of surfactants and polymers*. 2014: John Wiley & Sons.
72. Berne, B.J. and R. Pecora, *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. 2000: Courier Corporation.
73. Tscharnuter, W., *Photon correlation spectroscopy in particle sizing*. Encyclopedia of analytical chemistry, 2000.
74. Burchard, W., *Static and dynamic light scattering from branched polymers and biopolymers*. 1983: Springer.
75. Hunter, R.J., *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. Vol. 2. 2013: Academic press.
76. Disponível em [http://www.alfatest.it/public/images/zeta\\_potential\\_schematic.png](http://www.alfatest.it/public/images/zeta_potential_schematic.png), última consulta: 15 de maio de 2016.
77. Rosa, N.A.B., *Development of nanoparticles loaded with bioactive compounds for application as nutraceuticals*. 2011, Oporto University.
78. Stuart, B., *Infrared spectroscopy*. 2005: Wiley Online Library.

79. Adapa, P., et al., *Quantitative analysis of lignocellulosic components of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw using Fourier transform infrared spectroscopy*. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011: p. 177-188.
80. Painter, P., et al., *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 1985: Academic press.
81. Dedavid, B.A., C.I. Gomes, and G. Machado, *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. 2007: EdIPUCRS.
82. Anzaldúa-Morales, A., *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. 1994: Acribia.
83. Anzaldúa-Morales, A., *Importancia de la evaluación sensorial en la industria alimentaria*. Curso impartido a profesores del Departamento de Graduados, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional de México, 1984.