



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**VALORIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ: ELABORAÇÃO DE FILMES
BIODEGRADÁVEIS E COBERTURAS COMESTÍVEIS**

Cristiano Gautério Schmidt

Prof^a. Dr^a. Eliana Badiale Furlong
ORIENTADORA

Rio Grande, RS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ATA DO EXAME DE TESE

Às 8h30min do dia 19 de fevereiro de 2013, reuniu-se no Miniauditório do IFRS – Campus Cidade desta Universidade, a Comissão Examinadora de tese de doutorado constituída para o exame da tese "VALORIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ: ELABORAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS E COBERTURAS COMESTÍVEIS", do Eng. de Alimentos Cristiano Gautério Schmidt, matrícula número 95617, tendo como orientadora a Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong. As argumentações apresentadas demonstram que o aluno tem domínio do conhecimento utilizado na sua tese. Portanto, a Comissão o considera APROVADO e APTO para receber o Título de DOUTOR EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS e recomenda que esta Ata acompanhe os documentos necessários para a emissão do referido título.

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG

Prof. Dr. Carlos Raimundo F. Grosso – UNICAMP

Profa. Dra. Vilásia G. Martins – FURG

Profa. Dra. Melissa dos S. Oliveira – IF Farroupilha

Profa. Dra. Myriam de las M. Salas Mellado – FURG

Profa. Dra. Leonor A. de S. Soares - FURG

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**VALORIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ: ELABORAÇÃO DE FILMES
BIODEGRÁDAVEIS E COBERTURAS COMESTÍVEIS**

CRISTIANO GAUTÉRIO SCHMIDT
Engenheiro de Alimentos

Tese apresentada como um dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

Prof^a. Dr^a. ELIANA BADIALE FURLONG
ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2013

“A benção do Senhor é que enriquece; e não acrescenta dores”.

(Provérbios 10:22)

DEDICO

À Deus

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Senhor meu Deus, que tornou isto possível na minha vida, sustentando-me em seus braços nos momentos difíceis desta jornada.

A minha mãe, Rosana Gautério, que nunca mediu esforços para fazer o melhor por mim.

A minha esposa, Jose Schmidt, por todo amor, incentivo, carinho, paciência, compreensão e companheirismo.

A todos os meus familiares, especialmente minha irmã Renata, meu padraсто Luciano, minha avó Dueli e meu pai José Luís, por todo apoio concedido.

Aos meus pastores e irmãos do Ministério Espaço Cristão, por todo amor.

Aos meus amigos André, Anderson, Alex, Márcio, Leonardo, Neusa, Eliana e Weridiana, pela eterna amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Ciência de Alimentos da FURG, em especial ao Júlio, Renata, Michele, Helen, Gabriela, Priscila e Luciana, pela amizade.

Aos meus estagiários Andrio, Letícia, Charles, Ester e Claudia, pelo auxílio no desenvolvimento experimental deste trabalho e pela amizade.

Aos meus colegas do curso de pós-graduação Adriano, Catarina, Francisco, Felipe, Wiliam, Sandriane, Roberta, Ana Priscila, Inajara, Meritane, pelo companheirismo.

As funcionárias técnicas Maria de Jesus e Sabrine, pela disponibilidade, suporte técnico e amizade.

A secretária da pós-graduação Islanda, pelo suporte no requerimento de documentos, sempre atenciosa e prestativa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos Carlos, Luis Antônio, Myriam, Vilásia, Jaqueline e Leonor, pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores da Universidade do Minho José Teixeira e Antonio Vicente e ao pós-doutor Miguel Cerqueira, por toda orientação e suporte durante o estágio em Portugal.

A minha orientadora professora Eliana Furlong, por toda ajuda profissional e pessoal, por se importar, por querer sempre melhorar, enfim por acreditar.

A Capes pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estágio no exterior.

A Universidade Federal do Rio Grande pela infraestrutura e ensino de qualidade.

A todas as pessoas que de alguma forma tornaram isso possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo geral	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 FARELO DE ARROZ	6
2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	7
2.3 <i>RHIZOPUS</i>	8
2.4 PELÍCULAS COMESTÍVEIS	9
2.5 BLENDAIS	12
2.6 PROTEÍNAS	14
2.7 GALACTOMANANAS	15
2.8 INCORPORAÇÃO DE ADITIVOS	17
2.9 EXTRATOS FENÓLICOS	20
2.10 ARGILA MONTMORILONITA (MMT)	21
2.11 PLASTIFICANTES	23
2.12 SURFACTANTES	24
2.13 CARACTERIZAÇÃO DAS PELÍCULAS	24
2.13.1 Propriedades de barreiras	25
2.13.2 Propriedades mecânicas	27
2.13.3 Cor e opacidade	29
2.13.4 Propriedades molhantes (Molhabilidade)	29
2.13.5 Microscopia e espectroscopia	33
2.14 ALIMENTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS	33
2.15 BATATA	34
CAPÍTULO 3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE ARROZ COM O FUNGO <i>Rhizopus oryzae</i>	37
3.1 INTRODUÇÃO	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.1 Preparo do inóculo	39
3.2.2 Classificação e caracterização do substrato	39
3.2.3 Processo fermentativo	40
3.2.4 Delineamento experimental	41
3.2.5 Produção de biomassa	41
3.2.6 Ganho de proteína	42
3.2.7 Determinação de compostos fenólicos	42
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.3.1 Estudo preliminar	43
3.3.2 Caracterização do substrato	45
3.3.3 Delineamento experimental	48
3.3.4 Produção de biomassa	50
3.3.5 Enriquecimento proteico	52

3.3.6 Conteúdo fenólico	53
3.4. CONCLUSÃO	55

CAPÍTULO 4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS FENÓLICOS DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO COM *Rhizopus oryzae* ...

4.1 INTRODUÇÃO	57
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.2.1 Fermentação do farelo de arroz	58
4.2.1.1 Preparo do Inoculo	58
4.2.1.2 Processo Fermentativo	58
4.2.2 Determinação da biomassa	59
4.2.3 Extração dos compostos fenólicos	59
4.2.4 Separação e identificação dos ácidos fenólicos	60
4.2.5 Atividade antioxidante do extrato fenólico	60
4.2.6 Inibição enzimática dos extratos fenólicos	61
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.3.1 Biomassa e conteúdo fenólico	62
4.3.2 Ácidos fenólicos do farelo de arroz fermentado	63
4.3.3 Atividade antioxidante	67
4.3.4 Inibição enzimática	70
4.4 CONCLUSÃO	75

CAPÍTULO 5. ELABORAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS A PARTIR DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE FARELO DE ARROZ (CPFA) E DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO (CPFF)

5.1 INTRODUÇÃO	77
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	78
5.2.1 Processo fermentativo	78
5.2.2 Concentrados proteicos	78
5.2.3 Elaboração dos filmes	79
5.2.4 Caracterização dos filmes	79
5.2.5 Propriedades ópticas	79
5.2.6 Propriedades mecânicas	80
5.2.7 Análise de aminoácidos	80
5.2.8 Perfil eletroforético das proteínas	81
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.4 CONCLUSÃO	87

CAPÍTULO 6. FILMES PROTEICOS DE FARELO DE ARROZ ADICIONADOS DE EXTRATO FENÓLICO DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO E ARGILA MONTMORILONITA

6.1 INTRODUÇÃO	89
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	90
6.2.1 Concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA)	90
6.2.2 Extrato fenólico	91
6.2.3 Planejamento experimental e análise de efeitos	91
6.2.4 Elaboração dos filmes	92
6.2.5 Caracterização dos filmes	92
6.2.5.1 Espessura	92
6.2.5.2 Solubilidade	93
6.2.5.3 Propriedades Ópticas	93
6.2.5.4 Propriedades Mecânicas	93
6.2.5.5 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	94
6.2.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	94

6.2.5.7 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	94
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
6.3.1 Caracterização da matéria-prima	95
6.3.2 Planejamento experimental	96
6.3.3 Efeito da concentração de proteína	98
6.3.4 Efeito da concentração de glicerol	101
6.3.5 Efeito da adição de extrato fenólico	103
6.3.6 Efeito da adição de MMT	105
6.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	106
6.3.8 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	108
6.4 CONCLUSÃO	110
CAPÍTULO 7. FILMES E COBERTURAS COMESTÍVEIS OBTIDAS A PARTIR DE BLENDS DE PROTEÍNAS DE FARELO DE ARROZ E GALACTOMANAS DE <i>Caesalpinia pulcherima</i> ADICIONADOS DE EXTRATO FENÓLICO DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO	111
7.1 INTRODUÇÃO	112
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	113
7.2.1 Obtenção do concentrado proteico de farelo de arroz	113
7.2.2 Obtenção das galactomananas de sementes de <i>Caesalpinia pulcherima</i>	114
7.2.3 Elaboração e caracterização das soluções de revestimento na superfície de batatas	114
7.2.4 Propriedades molhantes	115
7.2.5 Elaboração dos filmes	115
7.2.6 Obtenção do extrato fenólico de farelo de arroz fermentado	116
7.2.7 Propriedades dos filmes	116
7.2.7.1 Espessura	116
7.2.7.2 Solubilidade	116
7.2.7.3 Propriedades Ópticas	116
7.2.7.4 Propriedades Mecânicas	117
7.2.7.5 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	117
7.2.7.6 Permeabilidade ao Oxigênio e ao Dióxido de Carbono	118
7.2.7.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	118
7.2.8 Aplicação dos revestimentos em batatas minimamente processadas	119
7.2.8.1 Análises Físicas e Físico-químicas	119
7.2.8.2 Análises Microbiológicas	120
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
7.3.1 Propriedades molhantes	120
7.3.2 Propriedades dos filmes	126
7.3.3 Avaliação dos revestimentos em batatas minimamente processadas	131
7.4 CONCLUSÃO	140
CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES GERAIS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
8.1 CONCLUSÕES GERAIS	142
8.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	143
8.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
APÊNDICES	165

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Comportamento de misturas de proteína-polissacarídeo.	13
Figura 2.2 - Estrutura geral das galacomanas.	16
Figura 2.3 - Estruturas polímero-argila.	22
Figura 2.4 - Esquema representativo das tensões interfaciais em um sistema trifásico.....	31
Figura 2.5 - Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.).	35
Figura 3.1 - Microscopia das partículas de farelo de arroz.	47
Figura 3.2 - Gráfico de Pareto mostrando o efeito do tamanho da partícula e da concentração de sulfato de amônio na biomassa fúngica (a), no ganho de proteínas (b) e no conteúdo de compostos fenólicos (c).	49
Figura 3.3 - Teores de glicosamina, proteínas (a) e compostos fenólicos (b) nos diferentes ensaios de farelo de arroz fermentado e não fermentado.	51
Figura 4.1- Biomassa e conteúdo de compostos fenólicos ao longo da fermentação do farelo de arroz.....	62
Figura 4.2 - Cromatograma de uma mistura de ácidos fenólicos.	64
Figura 4.3 - Comportamento cinético das soluções antioxidantes (a) ácido ascórbico, (b) ácido felúrico, (c) farelo de arroz e (d) farelo de arroz fermentado.	68
Figura 4.4 - Inibição enzimática de soluções antioxidantes de farelo de arroz (FA), farelo de arroz fermentado (FF), ácido ferúlico (AF) em diferentes concentrações de EC ₅₀	71
Figura 4.5 - Influência da adição das soluções de ácido ferúlico (A), extrato fenólico de farelo de arroz (B) e extrato fenólico de farelo de arroz fermentado (C) na velocidade de reação da enzima peroxidase.	74
Figura 5.1 - Filmes de concentrado proteico de farelo de arroz (A) e de concentrado proteico de farelo fermentado (B).....	84
Figura 5.2 - Análise de eletroforese das proteínas do concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) e do concentrado proteico de farelo de arroz fermentado.	86
Figura 6.1 - Filmes proteicos de farelo de arroz com formulação correspondente aos ensaios 1 (a), 2 (b), 5 (c) e 9 (d).	100
Figura 6.2 - Superfície de resposta relacionando a permeabilidade ao vapor de água com as concentrações de glicerol e de proteína. ..	102
Figura 6.3 - Superfície de resposta relacionando a opacidade dos filmes com as concentrações de proteína e extrato fenólico.	103
Figura 6.4 - Superfície de resposta relacionando o módulo de Young com as concentrações de glicerol e de extrato fenólico.	104
Figura 6.5 - Superfície de resposta relacionando a tensão de ruptura com as concentrações de argila montmorilonita e glicerol.	106

Figura 6.6 - Microscopia eletrônica de varredura das superfícies (a,c,e,g) e da seção transversal (b,d,f,h) de filmes proteicos de farelo de arroz elaboradas a partir das formulações referentes aos ensaios 1, 5, 9 e 17.	107
Figura 6.7 - FTIR de filmes proteicos de farelo de arroz elaboradas a partir das formulações referentes aos ensaios 1, 5, 9 e 17.	109
Figura 7.1 - Módulo de permeação gasosa.	118
Figura 7.2 - Imersão das batatas nas soluções filmogênicas.	119
Figura 7.3 - Ajuste dos dados experimentais a um modelo linear.	122
Figura 7.4 - Gráfico de Zisman da regressão linear da tensão superficial.	122
Figura 7.5 - Gráfico de Pareto mostrando o efeito da proporção proteína:galactomanana (P:G), das concentrações de glicerol ([G]) e Twin [S] nos coeficientes de espalhamento (a), adesão (b) e coesão (c).	125
Figura 7.6 - Microscopia eletrônica de varredura das superfícies de filmes proteicos de farelo de arroz elaboradas a partir das formulações referentes aos tratamentos TT1, TT2, TT3 e TT4.	128
Figura 7.7 - FTIR dos filmes elaboradas a partir das formulações referentes aos tratamentos TT1 (a), TT2 (b), TT3 (c) e TT4 (d).	130
Figura 7.8 - Ressecamento em batata minimamente processada.	135
Figura 7.9 - Amostras de batatas minimamente processadas no dia do processamento (dia 0) e no oitavo dia de armazenamento.	136
Figura 7.10 - Perda de massa das amostras de batatas minimamente processadas tratadas com diferentes coberturas e armazenadas a 4 ± 1 °C.	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Aplicação de revestimentos comestíveis contendo aditivos funcionais para melhorar a qualidade e estender a vida útil de frutas minimamente processadas.	18
Tabela 3.1 - Níveis e valores das variáveis independentes de tamanho médio das partículas e da concentração de sulfato de amônio utilizados no planejamento.....	41
Tabela 3.2 - Conteúdo de proteína, lipídios, fibras, cinzas, carboidratos e biomassa no farelo de arroz fermentado.	43
Tabela 3.3 - Composição proximal das diferentes frações do farelo de arroz integral em base seca.	45
Tabela 3.4 - Características físicas de diferentes frações de farelo de arroz.	46
Tabela 3.5 - Produção de biomassa, ganho de proteína e conteúdo fenólico.	48
Tabela 4.1 - Parâmetros de calibração dos ácidos fenólicos.	64
Tabela 4.2 - Conteúdo de ácidos fenólicos ao longo da fermentação (mg/g _{fs}).	65
Tabela 4.3 - Comportamento cinético das soluções antioxidantes.	67
Tabela 4.4 - Valores de EC ₅₀ e de eficiência anti-radical e suas respectivas classificações para as soluções antioxidantes.	69
Tabela 4.5 - Valores de Km e V _{máx} para enzima peroxidase em presença de extratos fenólicos de farelo de arroz fermentado e não fermentado.	73
Tabela 5.1 - Composição proximal e rendimentos dos concentrados proteico de farelo de arroz (CPFA) e de farelo de arroz fermentado (CPFF).	82
Tabela 5.2 - Filmes de concentrados proteicos de farelo de arroz (CPFA) e de farelo de arroz fermentado (CPFF).	83
Tabela 5.3 - Perfil de aminoácidos nos concentrados proteicos de farelo de arroz (CPFA) e de farelo fermentado (CPFF) e na biomassa fúngica seca	85
Tabela 6.1 - Valores reais e codificados dos fatores estudados.	92
Tabela 6.2 - Composição do farelo de arroz e do concentrado proteico	95
Tabela 6.3 - Valores de espessura, solubilidade, luminosidade, opacidade, tensão de ruptura, alongação, elasticidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes.....	97
Tabela 6.4 - das concentrações de proteína, glicerol, fenóis e argila montmorilonita nas propriedades dos filmes.	99
Tabela 7.1 - Valores reais e codificados dos fatores estudados	115
Tabela 7.2 - Tensão superficial dos líquidos testados e suas componentes e valor do ângulo de contato desses líquidos na superfície de batata (T = 20 °C).	121
Tabela 7.3 - Valores de tensão superficial (γ_L), ângulo de contato (θ), coeficientes de espalhamento (W_s), adesão (W_a) e coesão (W_c) das soluções de revestimento.....	123
Tabela 7.4 - Valores de espessura, solubilidade, luminosidade, opacidade, tensão de ruptura e alongação.	127

Tabela 7.5 - Valores de permeabilidades ao vapor de água, oxigênio e dióxido de carbono.	127
Tabela 7.6 - Sólidos solúveis totais, pH e acidez de batatas minimamente processadas revestidas com diferentes coberturas e armazenadas a 4 ± 1 °C.	132
Tabela 7.7 - Valores de L^* , a^* , b^* e índice de escurecimento das amostras de batatas minimamente processadas utilizando diferentes coberturas e armazenadas a 4 ± 1 °C.....	134
Tabela 7.8 - Firmeza (N) das amostras de batatas minimamente processadas tratadas com coberturas e armazenadas durante 8 dias a 4 °C.	138
Tabela 7.9 - Contagem de micro-organismos psicotróficos das amostras de batatas minimamente processadas utilizando diferentes coberturas ao longo de 9 dias de armazenamento a 4 °C.	139

RESUMO

O uso de filmes e coberturas comestíveis a partir de diferentes fontes tem chamado a atenção, pois possibilita a valorização de coprodutos agroindustriais de onde podem ser recuperados compostos para este fim. Dentre estes coprodutos, o farelo de arroz se destaca pela grande quantidade produzida. Neste trabalho foi usado o farelo de arroz como fonte proteica e de compostos fenólicos para elaboração de filmes biodegradáveis e coberturas comestíveis. O farelo de arroz foi utilizado como substrato no processo de fermentação em estado sólido com o fungo *Rizhopus oryzae* visando um aumento no seu conteúdo de proteínas e de compostos fenólicos. O extrato fenólico obtido a partir da fermentação foi caracterizado quanto ao seu perfil de ácidos fenólicos e avaliado quanto a sua capacidade antioxidante e de inibição das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Foram obtidos filmes a partir de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) e concentrado proteico de farelo de arroz fermentado (CPFF) e caracterizados quanto à espessura, solubilidade, propriedades ópticas (luminosidade e opacidade) e propriedades mecânicas (tensão de ruptura, porcentagem de alongação e módulo de Young). Um planejamento experimental fatorial 2^4 foi usado para avaliar o efeito das concentrações de proteína e glicerol e a adição de extrato fenólico de farelo fermentado e argila montmorilonita nas propriedades mecânicas e físico-químicas de filmes proteicos de farelo de arroz. Misturas de proteínas extraídas de farelo de arroz e galactomananas extraídas de semente de *Caesalpinia pulcherrima* foram usadas para preparar soluções filmogênicas que foram avaliadas quanto as suas propriedades molhantes em superfície de batatas minimamente processadas e aplicadas como coberturas sobre as mesmas. A fermentação do farelo de arroz resultou em um aumento de 53% no conteúdo proteico, e de compostos fenólicos em mais de 100%, sendo o ácido ferúlico o composto fenólico mais abundante com valor de 765 mg/g de farelo fermentado. O extrato fenólico obtido do farelo de arroz fermentado apresentou potencial de inibição para o radical DPPH e para enzima peroxidase. Após a elaboração dos filmes, melhores propriedades ópticas e mecânicas foram verificadas com CPFA em relação aos filmes de CPFF. A concentração de proteína afetou ($p<0,05$) a espessura, luminosidade, opacidade e solubilidade dos filmes de CPFA, enquanto um aumento na concentração de glicerol afetou ($p<0,05$) principalmente as propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor de água. A adição de extrato fenólico aos filmes afetou ($p<0,05$) a opacidade, a tensão de ruptura, o módulo de Young e a permeabilidade ao vapor de água. A adição de montmorilonita produziu um efeito ($p<0,05$) negativo nas propriedades mecânicas dos filmes, sendo obtidos filmes com solubilidade menor que 25%, luminosidade acima de 80 (L^*), opacidade ao redor de 14%, tensão de ruptura de 8,6 MPa, alongação de 70%, elasticidade acima de 600 MPa e permeabilidade ao vapor de água abaixo de 7,5 g.mm/d.m².KPa. A mistura de proteína e galactomana (3:1) apresentou maiores valores de coeficientes de espalhamento e adesão e menor coesão para a superfície de batatas minimamente processadas. Filmes contendo 25% de galactomananas apresentaram maior resistência à tração e menores valores de permeabilidade ao vapor de água e oxigênio. As soluções filmogênicas utilizadas como coberturas em batatas minimamente processadas armazenadas a $4\pm1^\circ\text{C}$ tiveram como efeito mais marcante a redução no conteúdo de microrganismos psicotrópicos das amostras tratadas com coberturas proteicas.

Palavras-chave: farelo de arroz, fermentação, compostos fenólicos, filmes, coberturas.

ABSTRACT

Edible films and coatings utilization from various sources has attracted attention because it enables the utilization of agro-industrial byproducts, recovering an otherwise valueless compound for this purpose. Among these byproducts is rice bran. Rice bran stands out from other sources for its large production. In this study rice bran was utilized as a source of protein and phenolic compounds for preparation of biodegradable films and edible coatings. Rice bran was used as a substrate in a solid state fermentation with the fungus *Rizhopus oryzae*, aiming an increase in the bran's proteins and phenolic compounds contents. The phenolic extract obtained from the fermentation process was characterized for its phenolic acids profile and evaluated for its antioxidant capacity as well as its peroxidase and polyphenoloxidase inhibition capacities. The films were obtained from rice bran protein concentrate (RBPC) and fermented rice bran protein concentrate (FRBPC). The films were characterized by their thickness, solubility, optical properties (luminosity and opacity) and mechanical properties (tensile strength, elongation and Young's modulus). A 2⁴ factorial experimental design was used to evaluate the effect of protein and glycerol concentrations as well as the addition of phenolic extract from fermented rice bran and montmorillonite clay in the mechanical and physico-chemical properties of rice bran protein-based films. Mixtures of proteins extracted from rice bran and galactomannans extracted from *Caesalpinia pulcherrima* seeds were used to prepare solutions that were evaluated for wetting properties in the surface of minimally processed potatoes and applied as coatings in the same kind of potatoes. Rice bran fermentation resulted in an increase of 53% in the protein content and more than 100% increase of phenolic compounds, where the ferulic acid was the phenolic compound with biggest concentration, 765 mg/g of fermented rice bran. Phenolic extract obtained from fermented rice bran showed a potential for DPPH and peroxidase enzyme inhibitions. After the films preparation, better optical and mechanical properties were verified with RBPC rather than with FRBPC films. The protein concentration affected ($p<0.05$) the thickness, luminosity, opacity, and solubility of RBPC films. Meanwhile an increase in glycerol concentration affected ($p<0.05$) especially the mechanical properties as well as the water vapor permeability. The phenolic extract addition in the films affected ($p<0.05$) opacity, tensile strength, Young's modulus and the water vapor permeability. The montmorillonite addition produced a negative effect ($p<0.05$) in mechanical properties of the films. When using the clay, it was obtained films with solubility smaller than 25%, luminosity above 80 (L*), opacity around 14%, tensile strength of 8.6 MPa, elongation of 70%, elasticity above 600 MPa and water vapor permeability below 7.5 g.mm/d.m².KPa. A mixture of protein and galactomannan (3:1) showed higher coefficients values of spreading and adhesion and lower cohesion on the minimally processed potatoes surface. The films containing 25% of galactomannan showed higher tensile strength and lower values of water vapor permeability and oxygen permeability. The film-forming solutions used as coating in minimally processed potatoes stored at 4±1°C had the most distinguished effect in the reduction of psychotropic microorganisms content at samples treated with protein coatings.

Keywords: rice bran, fermentation, phenolic compounds, films, coatings.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Neste capítulo estão apresentados a motivação, as justificativas e os objetivos do trabalho.

1.1 INTRODUÇÃO

Para minimizar as perdas pós-colheita, uma das técnicas que vem sendo utilizada é a aplicação de películas comestíveis como revestimento de frutas e hortaliças frescas ou minimamente processadas. São finas camadas de material aplicadas e formadas diretamente na superfície do produto, sendo usadas para substituir o revestimento de cera de proteção natural e para reduzir a perda de água de frutas e hortaliças *in natura* ou minimamente processadas. Este procedimento visa manter a umidade e ao mesmo tempo reduzir as taxas de respiração, retardar a degradação de ácidos orgânicos, além de conferir aparência brilhante e atraente ao produto (PIRAN et al., 2008; AZEREDO et al., 2003). O uso de películas com esse propósito representa também uma vantagem econômica, pois pode, dependendo do tecido, evitar a necessidade de armazenamento em atmosfera controlada, a qual implica em elevados custos operacionais e de equipamento (JACOMETTI et al., 2003; CHITARRA, 1998).

De acordo com a literatura científica existe um grande interesse no desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade de fácil preparo, preocupações ambientais com o descarte de materiais não renováveis (utilizados como embalagem para alimentos) e oportunidades para criar novos mercados de matérias-primas formadoras de filme (FONTES et. al, 2008; FAKHOURI et. al, 2007; RIGO, 2006).

As películas podem ser obtidas a partir de diferentes materiais, tais como: polissacarídeos, proteínas e lipídios, sendo as propriedades mecânicas dos filmes à base de proteínas geralmente superiores às obtidas com os demais polímeros. O grau de hidrofiliabilidade dos resíduos de aminoácidos da proteína controla a influência da umidade na propriedade de transporte de massa do filme, tornando os filmes derivados de proteínas excelentes barreiras para substâncias não polares, tais como o oxigênio (LIMA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2007a). Os polissacarídeos apresentam boas propriedades de formação de filmes e barreira aos gases, porém, pela hidrofiliabilidade, não proporcionam boa barreira à umidade. Os lipídios oferecem excelente barreira à umidade, mas apresentam problemas relativos à estabilidade oxidativa (OSÉS et al. 2009; GOUNGA et al. 2007; AZEREDO et al., 2003).

As proteínas de origem vegetal são mais utilizadas que as proteínas de origem animal, devido à produção elevada e ao baixo custo das mesmas (ROJAS-GRAU et

al., 2009; ADEBIYI et al., 2008; RIGO, 2006). A utilização de filmes proteicos oferece potencial para o emprego de coprodutos e resíduos gerados durante o beneficiamento de cereais, no caso da região sul do Rio Grande do Sul se destaca o arroz. Este vem sendo foco de políticas recentes de incentivo a novas tecnologias para valoração de seus coprodutos, em vista de sua abundância (aproximadamente 600.000 toneladas/ano de farelo), cuja riqueza de nutrientes, caráter sensorial desfavorável e dificuldade de descarte constituem um problema (CONAB, 2013; SOUZA, 2007).

Do beneficiamento do arroz, obtém-se o farelo de arroz um coproduto que possui diversos constituintes de interesse, nutrientes e minerais. Durante a fermentação deste coproduto com o microrganismo *Rhizopus oryzae*, há um acréscimo do conteúdo proteico e liberação de compostos fenólicos com atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2010; SILVEIRA E FURLONG, 2007) que podem vir a ser utilizados na elaboração de películas protetoras. Dentro deste contexto, o uso de coprodutos agroindustriais como matéria-prima para a extração de compostos de interesse, que possam ser aplicados na elaboração de películas protetoras, torna-se interessante devido à possibilidade do melhor aproveitamento do potencial dos mesmos, formulação de produtos alimentícios e/ou mecanismos que contribuam para o melhor aproveitamento do produto, tais como as películas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Obter filmes biodegradáveis e coberturas comestíveis a partir de diferentes formulações à base de proteínas de farelo de arroz.

1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da fermentação em estado sólido com o fungo *Rhizopus oryzae* sobre o farelo de arroz, avaliando a composição proximal e as propriedades das proteínas na biomassa.
- Avaliar o efeito do tamanho de partícula do farelo de arroz e da concentração de sulfato de amônio no conteúdo proteico e fenólico do farelo de arroz fermentado com o fungo *Rhizopus oryzae*.
- Identificar e avaliar a atividade antioxidante e a inibição enzimática dos compostos fenólicos antes e após a fermentação e identificá-los.

- Caracterizar e avaliar as propriedades de filmes proteicos obtidos a partir de farelo de arroz e farelo de arroz fermentado.
- Caracterizar e avaliar as propriedades de filmes proteicos de farelo de arroz adicionados de argila montmorilonita e extrato fenólico de farelo de arroz fermentado.
- Elaborar e caracterizar filmes e coberturas obtidos com proteína de farelo, galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima* e compostos fenólicos.
- Aplicar e avaliar a utilização de coberturas em batatas minimamente processadas.

O desenvolvimento e a caracterização dos filmes e coberturas foram realizados no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LCA) da FURG, contando com o apoio dos laboratórios de Tecnologia de Alimentos (LTA) e Engenharia Bioquímica (LEB). Análises de microscopia e isothermas de adsorção de nitrogênio das partículas de farelo de arroz foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) e no Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A análise de aminoácidos do farelo de arroz e farelo fermentado foram realizadas no Centro de Química de Proteínas da Universidade Estadual de São Paulo (USP). A avaliação das propriedades molhantes e a caracterização dos filmes proteicos com galactomananas foram realizadas no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho de Portugal.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo esta apresentada uma revisão bibliográfica sobre o farelo de arroz, processos fermentativos, elaboração e propriedades de filmes e coberturas comestíveis, alimentos minimamente processados e batata (*Solanum tuberosum* L.).

2.1 FARELO DE ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial (ZHANG et al., 2010; MIRA et al., 2008). As diferentes etapas do beneficiamento do grão para comercialização resultam nas frações derivadas: casca 24%, farelo 8% a 10% e arroz polido 68%.

Um dos principais subprodutos do beneficiamento do arroz é o farelo integral, resultante da remoção do endosperma amiláceo. Este possui os mais elevados teores de proteína (13 a 15%) em relação ao arroz polido (5 a 8%) e a casca (3 a 3,5%). O mesmo ocorre para o conteúdo lipídico que perfaz no farelo entre 15 e 17%, 0,3 a 0,6% no arroz polido e 0,8% na casca, e seus maiores constituintes são os ácidos oleico e linoleico, e ésteres do ácido palmítico. As fibras também são abundantes nesta fração entre 8,5 e 10% (AVILA et al., 2008; FEDDERN et al., 2007; AMATO e ELIAS, 2005). Trata-se, portanto de uma excelente fonte de vitaminas, minerais, proteínas e óleo.

Segundo a CONAB (Conselho Nacional de Abastecimento), o Brasil colheu cerca de 11,6 milhões de toneladas de arroz em 2012. Somente no estado do Rio Grande do Sul, foram produzidas mais de 7 milhões de toneladas de arroz, das quais 8% foram farelos, que após a extração do óleo, foram comercializados a baixo custo para ração animal ou mesmo descartados, apesar do seu elevado conteúdo em proteínas, fibras e compostos bioativos. Dentre os últimos, está uma elevada quantidade de fitonutrientes, incluindo compostos fenólicos, tais como ácido ferúlico, cumárico e diferulatos, que possuem demonstrada atividade antioxidante (CONAB, 2013; BUTSAT e SIRIAMORN PUN, 2010; MUNTANA e PRASONG 2010; POULARI et al., 2010).

A composição e abundância do farelo de arroz, o torna um substrato interessante para processos fermentativos que visam à produção de insumos para a indústria alimentícia e farmacêutica. Tradicionalmente, a maior parte da produção do farelo de arroz é destinada para a produção de fertilizantes, alimentação de animais e para a indústria cosmética, porém várias pesquisas têm sido conduzidas para melhor avaliação de seu potencial para a alimentação humana (FURLONG et al., 2007; SILVEIRA e FURLONG, 2007; SOTOKUBA, 2001).

2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os processos fermentativos têm sido estudados há muitas décadas. A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como o processo que se refere à cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegura o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não excede a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001). Ou seja, o termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semissólida, ou fermentação em meio semissólido se aplica ao processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre, que nestes sistemas se encontra ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Nesse tipo de processo o micro-organismo é inoculado, sob a forma de suspensão de esporos, na massa sólida do substrato que pode ser de subprodutos agroindustriais com teor de umidade e pH compatíveis com a espécie microbiana usada. Na sua execução mais simples, a massa do substrato é distribuída em bandejas em uma camada fina, introduzidas em câmaras herméticas, nas quais circula ar filtrado e umedecido (REGULY, 2000). O uso de processos fermentativos que empregam micro-organismos para obter transformações resultantes da sua atividade metabólica é uma das formas de aumentar a disponibilidade de nutrientes nas matérias-primas. Os fungos estão entre os micro-organismos mais utilizados para a fermentação sólida, uma vez que podem produzir uma variedade de produtos bioquímicos, necessários à sua multiplicação e metabolismo. Estes também podem produzir metabólitos secundários devido à sua capacidade de se reproduzir em ambientes de baixa atividade de água, sendo alguns bastante interessantes como insumos industriais (OLIVEIRA et al., 2010).

A fermentação em estado sólido apresenta as seguintes vantagens: grande taxa de reação devido ao contato direto entre o substrato e o micro-organismo; menor quantidade de água empregada utilizando um reator de volume menor reduz os custos de operação; aeração, natural ou forçada, são facilmente acessível aos micro-organismos devido aos intra espaços existentes entre as partículas do substrato; produto final encontra-se mais concentrado, podendo ser utilizado diretamente, e também menor uso de solvente para a sua extração; há produção de menores resíduos líquidos a serem tratados ou dispostos; redução dos problemas de

contaminação; ausência de espuma (BORZANI *et al.*, 2001). A fermentação em estado sólido foi adotada há alguns anos pela indústria biotecnológica, devido à sua potencial aplicação na produção de metabólitos secundários ativos de interesse para a indústria de alimentos, combustível, produtos químicos e farmacêuticos, o que também confere valor agregado aos resíduos e subprodutos (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SINGHANIA *et al.*, 2009).

A escolha de cada meio depende do produto final que se deseja obter, pode-se exemplificar: celulose, hemicelulose e lignina oriundas da biomassa vegetal; farelo e palha de trigo; farelo de arroz entre outras (TRABULSI *et al.*, 2000). A atividade de água, composição química e as características físicas dos farelos de cereais e seus coprodutos os tornam adequados para o emprego em processos de fermentação sólida destinados à produção industrial de enzimas e outras biomoléculas de interesse comercial (FURLONG *et al.*, 2007).

O uso de resíduos no processo é importante do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto que causa sobre a natureza, valoriza os resíduos agrícolas e agroindustriais. Fato que tem motivado estudos de condições que aumentem a produtividade dos metabólitos de interesse associando a seleção de micro-organismos mais competitivos e adaptados a processos fermentativos com o tipo de material disponível (PHILIPPOUSSIS *et al.*, 2011; SILVA, 2002).

2.3 RHIZOPUS

Os micro-organismos pertencentes a este gênero são classificados como zigomicetos, da ordem *Mucorales* sendo considerados dentro do reino fungi os mais primitivos. São bolores que formam micélio cenocítico e apresentam rizoides para fixação ao substrato, que podem se reproduzir de forma sexuada e assexuada. Na reprodução assexuada ocorre formação de esporângios, estruturas constituintes dos esporos. Uma desintegração dos esporângios ocorre, quando estão maduros, liberando os esporos que germinam e formam novas hifas. Na reprodução sexuada ocorre à aproximação de duas hifas de indivíduos diferentes, as extremidades das mesmas se fundem originando um zigoto de parede espessa e resistente, denominado zigospóro. Este, passado o período de dormência, sofre meiose e germina originando um novo micélio (PITT e HOCKING, 1997; RAVEN *et al.*, 1996).

O grande interesse nos fungos deste gênero decorre de que este não possui espécies toxigênicas, fato que pode justificar a grande facilidade de contaminação de materiais onde estes se desenvolvem por outras espécies fúngicas, sendo

reconhecidos como seguro para aplicação em alimentos (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*). São agentes deteriorantes comuns em alimentos de origem vegetal, com produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas. Esta espécie caracteriza-se por produzir grande quantidade de ácido fumárico a partir de açúcares fermentáveis (OLIVEIRA et al., 2010; PITT e HOCKING, 1997).

Da mesma forma que outras espécies fúngicas, estes tem um papel importante no progresso da biotecnologia, por produzirem muitos metabólitos primários e secundários, em particular, os ácidos orgânicos, antibióticos e enzimas (Jin et al., 2005). Algumas espécies, tais como a *R. oryzae*, *R. oligosporus*, e *R. stolonifer*, podem produzir enzimas como lipases e fitases, glucoamilases e outros, usando principalmente resíduos agroindustriais como meio sólido para o seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2010). *Rhizopus oryzae* é um fungo filamentoso capaz de assimilar manose, glicose, xilose e galactose. Embora esta espécie tenha sido principalmente de interesse em relação com a produção de ácido láctico, ela também pode produzir uma grande variedade de outras substâncias valiosas, como ácido gálico, enzimas celulolíticas, lipases, proteases e outras proteínas com alta digestibilidade (TAHERZADEH et al., 2003; ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). A fermentação do farelo de arroz pelo fungo *Rhizopus oryzae* promove uma ativação de fitases endógenas que resulta na diminuição do teor de fitatos, além do aumento no teor proteico do farelo de arroz e no seu conteúdo de fosfolipídios (OLIVEIRA et al., 2010; SILVEIRA e BADIALE-FURLONG, 2007).

2.4 PELÍCULAS COMESTÍVEIS

Os filmes e coberturas comestíveis vêm recebendo mais atenção nos últimos anos por causa de suas vantagens em relação a filmes sintéticos, pois podem ser consumidos com os produtos embalados e contribuir para a redução da poluição do ambiente, uma vez que são biodegradáveis (SOUZA et al., 2010a).

As películas comestíveis podem ser classificadas em filmes e coberturas. Embora os termos sejam muitas vezes utilizados indiscriminadamente, a diferença básica é que os filmes são pré-formados, separadamente, do produto. As coberturas são formadas sobre a própria superfície do alimento, o que pode ser efetuado, por exemplo, por imersão ou aspersão (FALGUERA et al., 2011; KESTER e FENNEMA, 1986). Filmes e revestimentos comestíveis têm sido especialmente considerados na

conservação de alimentos, devido à sua capacidade em melhorar sua qualidade global (CHILLO et al., 2008).

Segundo Pavlath e Orts (2009) qualquer tipo de material utilizado para revestir vários tipos de alimentos visando prolongar a vida útil do produto, que podem ser consumidos juntamente com os alimentos, com ou sem remoção adicional é considerada uma película ou revestimento comestível. Eles podem proporcionar a substituição e/ou reforço de camadas naturais para evitar perdas de umidade ou promover a troca seletiva e controlada de gases, tais como oxigênio, dióxido de carbono e etileno, que estão envolvidos nos processos de respiração. Os filmes ou coberturas podem também proporcionar certa esterilidade à superfície e evitar a perda de outros componentes importantes. Geralmente, a sua espessura é inferior a 0,3 mm.

As películas podem ser obtidas a partir de diferentes tipos de materiais, sendo que as biomoléculas mais utilizados são os polissacarídeos, as proteínas e os lipídios (CHEN, 1995). As gomas e pectinas, celulose, quitosana e alginato têm sido os polissacarídeos preferenciais para a formulação de películas (PILON, 2007). Os lipídeos empregados são cera de abelha, óleo mineral, surfactantes, monoglicerídeo acetilado, cera de carnaúba e cera de parafina (KESTER e FENNEMA, 1986). Quanto às proteínas, as mais utilizadas em películas são as proteínas de soja, proteína de soro de leite, caseína, gelatina, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares (PIRES et al., 2013; PILON, 2007).

Os filmes elaborados a partir de polissacarídeos ou proteínas possuem excelentes propriedades mecânicas, ópticas e sensoriais, porém são sensíveis à umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água. Ao contrário, as coberturas compostas de lipídeos apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor d'água, mas são opacas e pouco flexíveis, além de apresentarem sabor residual, o que pode influenciar as características sensoriais do alimento (FAKHOURI et al., 2007; GALLO et al., 2000).

De acordo com a legislação Europeia e a FDA (*Food and Drug Administration*), filmes e revestimentos comestíveis podem ser classificados como produtos alimentícios, ingredientes, aditivos alimentares, substâncias em contacto com alimentos ou materiais de embalagem de alimentos. No entanto, como eles são uma parte integrante da porção comestível de produtos alimentares, deve-se observar todas as normas exigidas para ingredientes alimentícios. Para a segurança alimentar, todos os componentes incluídos na formulação de películas, bem como quaisquer aditivos funcionais adicionados aos materiais de formação das películas, devem ser de

grau alimentício de materiais não tóxicos (GRAS), e todo o processo deve atender os padrões de higiene estabelecidos (ROJAS-GRAU et al., 2009).

A obtenção de filmes comestíveis se fundamenta na dispersão ou solubilização de biopolímeros em um solvente (água, etanol ou ácidos orgânicos) com a posterior adição de aditivos (plastificantes, agentes de ligação, entre outros), obtendo-se assim uma solução filmogênica, que poderá ser utilizada diretamente no caso de películas. Ou passará por uma operação de secagem, para a obtenção de filmes. Nesta etapa, ocorre o aumento da concentração do biopolímero na solução, devido à evaporação do solvente, e consequentemente a agregação das moléculas, levando à formação de uma rede tridimensional. Portanto, as características finais destes filmes comestíveis estão intimamente ligadas às propriedades dos biopolímeros utilizados como base (PIRAN et al., 2008; MONTERREY e SOBRAL, 1999). De acordo com a literatura (DEBEAUFORT et al., 1998; KESTER e FENNEMA, 1986), filmes e coberturas comestíveis podem ser formadas pelos seguintes mecanismos:

- Fusão e solidificação, que são mais utilizadas para gorduras sólidas e ceras.
- Coacervação simples – consiste na precipitação de um hidrocolóide disperso em solução aquosa. Esta precipitação pode ser obtida pela evaporação de um solvente (durante a secagem), pela adição de um soluto não eletrólito (no qual o hidrocolóide não é solúvel. Ex: etanol), pela adição de um eletrólito que induz a precipitação ou cruzamento dos componentes, ou pela modificação do pH da solução.
- Coacervação complexa – consiste em se obter a precipitação pela mistura de duas soluções de hidrocolóides com cargas elétricas opostas que interagem, formando o polímero complexo.
- Gelificação ou coagulação térmica – consiste no aquecimento das macromoléculas, o qual leva a desnaturação seguida pela geleificação ou precipitação. Isso pode ocorrer, por exemplo, quando a ovoalbumina é aquecida. Outro modo de obter-se a gelificação é pelo resfriamento rápido de uma solução hidrocolóide que se encontra aquecida. Por exemplo, o ágar a 95 °C está líquido, e quando resfriado abaixo de 45 °C forma um gel e se solidifica.

Esses revestimentos podem ser aplicados aos alimentos por diferentes métodos, como a pulverização, imersão ou aplicação com pincéis, seguindo de uma etapa de secagem para revestimentos hidrocolóidais ou esfriamento para revestimentos lipídicos (DEBEAUFORT et al., 1998).

2.5 BLENIDAS

Através da combinação de vários tipos de materiais é possível obter propriedades diferenciadas para os revestimentos. Para isto, dois ou mais polímeros formadores de filmes de diferentes categorias são misturados na preparação de filmes ou coberturas. O método de misturas é um dos mais efetivos para melhorar as propriedades de filmes e coberturas (JIA et al., 2009; WANG et al., 2007). A combinação dos biopolímeros tem como vantagem agregar os pontos positivos de cada um dos constituintes utilizados (FAKHOURI et al., 2007; GALLO et al., 2000).

Devido às vantagens e limitações de cada categoria de componentes dos filmes e coberturas, muitos trabalhos têm envolvido o uso de combinações desses materiais para melhorar as propriedades das coberturas. Principalmente, polissacarídeos e proteínas fornecem suporte estrutural, ao passo que os lipídios são usados para criar uma barreira eficaz à água (DEBEAUFORT e VOILLEY, 2009). Películas compostas de polissacarídeos e lipídios, por exemplo, combinam as propriedades mecânicas e barreira aos gases conferidas pelos polissacarídeos com barreira à umidade proporcionada pelos lipídios (JIA et al. 2009; OSÉS et al. 2009; GOUNGA et al. 2007; CHEN e NUSSINOVITCH, 2001; KESTER e FENNEMA, 1986).

As proteínas e os polissacarídeos são polímeros naturais, que são utilizados como ingredientes funcionais. As misturas destes são frequentemente utilizadas em muitas aplicações tecnológicas nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, dentre outras, sob a forma de dispersões na maioria dos casos. Na mistura entre uma solução de polissacarídeo e proteína, pode-se observar qualquer uma das possibilidades representadas na Figura 2.1. As interações de atração entre as proteínas e os polissacarídeos podem levar à formação de complexos solúveis e/ou insolúveis (Figura 2.1a e 2.1b). A formação de complexos insolúveis conduz a um fenômeno de separação de fases ou coacervação (Figura 2.1c). Outro fenômeno que pode ocorrer é a separação espontânea em duas fases (Figura 2.1d), uma enriquecida em proteínas e a outra enriquecida em polissacarídeo (PATINO e PILOSOF, 2011).

Denavi et al. (2009) estudaram a relação estrutura-função de filmes compósitos obtidos a partir de proteína isolada de soja e gelatina de bacalhau. Todos os filmes apresentavam aparência translúcida, sendo que foi observado um aumento na cor amarelada com o aumento na proporção de proteínas de soja.

Jia et al. (2009) avaliaram os efeitos da composição dos polímeros, da concentração de glicerol e do pH da solução na permeabilidade ao vapor de água, tensão de ruptura e porcentagem de alongação dos filmes à base de glucomanano,

quitosana e proteína de soja. A incorporação de proteína de soja na matriz polimérica diminuiu a permeabilidade ao vapor de água e também tornou menos eficientes as propriedades mecânicas dos filmes.

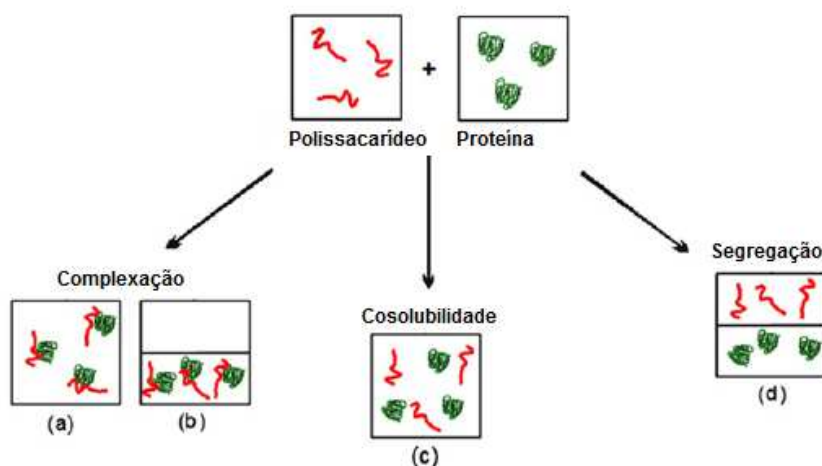


Figura 2.1 – Comportamento de misturas de proteína-polissacarídeo (PATINO e PILOSOF, 2011).

Ferreira et al. (2009) estudaram a capacidade de produzir filmes de quitosana misturada com proteínas de soro de leite. Os filmes mistos, especialmente aqueles com quantidades intermediárias de proteína mostraram propriedades interessantes para aplicação em sistemas alimentares, onde os filmes comestíveis devem quebrar-se durante o processo de cozimento ou durante a mastigação.

Muñoz et al. (2012) estudaram as propriedades microestruturais, físicas e funcionais de filmes elaborados a partir de misturas de mucilagem de *Salvia hispanica* e concentrado proteico de soro de leite. Os filmes apresentaram boas propriedades mecânicas e baixa permeabilidade ao vapor de água, apesar da formação de agregados polissacarídeo/proteína na microestrutura dos filmes.

Piazza et al. (2009) avaliaram a utilização de soluções de proteína de soja e pectina na produção de filmes biodegradáveis destinados a aplicações de embalagem de alimentos. Constataram que as propriedades estruturais da matriz filmogênica influenciaram na permeabilidade e na resistência mecânica dos filmes.

Yoo e Krochta (2011) avaliaram cinco tipos diferentes de polissacarídeos (metilcelulose, hidroximetilcelulose, alginato de sódio, amido com 25% de amilose e amido com 99% de amilopectina) para produzir blendas com isolado proteico de soja. As blendas elaboradas com materiais mais polares como alginato e os amidos

apresentaram menores valores de permeabilidade ao oxigênio. Enquanto que blendas feitas com metilcelulose ou hidroximetilcelulose apresentavam maior resistência mecânica e alongação, devido a uma cadeia polimérica mais organizada.

Tanada-Palmu et al. (2002) testaram misturas de glúten de trigo, gelatina e celulose em goiabas frescas e verificaram que as coberturas de gelatina e da mistura de glúten e celulose foram as mais eficientes na manutenção da qualidade das goiabas.

2.6 PROTEÍNAS

As películas comestíveis podem ser preparadas a partir de proteínas, polissacarídeos, lipídios, ou da combinação destes componentes. Dentre estes, películas à base de proteínas geralmente são mais atraentes. Em primeiro lugar, elas fornecem valor nutricional ao produto. Em segundo lugar, películas à base de proteínas possuem excelentes propriedades de barreira aos gases e boas propriedades mecânicas em comparação com aquelas a partir de lipídios e polissacarídeos (CAO et al., 2007).

As proteínas que vêm sendo estudadas como possíveis agentes de formação de filme incluem colágeno, gelatina, zeína de milho, caseína, proteína de soro de leite, glúten de trigo, proteína isolada de soja, proteínas de farelo de arroz, de amendoim, albumina, de semente de algodão e proteína do ovo. Sendo que a proteína de soja é uma das proteínas mais utilizadas, devido à abundância de sua produção (KYU e BAE, 2006; SOBRAL, 2000). O farelo de arroz, um coproduto do processamento de arroz, rico em proteína, apresenta um grande potencial de aplicação por ser de baixo custo (GNANASAMBANDAM et al., 1997). As proteínas de origem vegetal são mais utilizadas para a elaboração de biofilmes do que as proteínas de origem animal, devido à produção elevada e ao baixo custo dessas proteínas nos países desenvolvidos (SOBRAL, 2000).

As propriedades inerentes das proteínas as tornam excelentes materiais para elaboração de filmes e coberturas. A distribuição das cargas, polares e não polares de aminoácidos ao longo da cadeia proteica cria um potencial químico. As forças interativas resultantes produzem uma matriz coesa. Os filmes formados são estabilizados através das interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, ligação covalente e pontes dissulfeto (DANGARAN et al., 2009).

As propriedades finais das películas são afetadas pelas propriedades intrínsecas dos componentes do filme/cobertura, além dos fatores extrínsecos de

processamento. Propriedades intrínsecas das proteínas incluem composição de aminoácidos, cristalinidade (proteína e/ou plastificante), hidrofobicidade/hidrofiliidade, carga superficial, ponto isoelétrico, tamanho molecular e forma tridimensional. Os fatores extrínsecos incluem temperatura de processamento, condições de secagem, pH, força iônica, umidade relativa durante o processamento e armazenamento, corte e pressão (DANGARAN et al., 2009).

De acordo com Gnanasambandam et al. (1997), filmes e coberturas comestíveis à base de proteínas têm várias vantagens na indústria de processamento de alimentos. Películas proteicas comestíveis podem ser usadas como veículos de antioxidantes, agentes antimicrobianos ou aromatizantes, para materiais de revestimento para nozes, feijão, ovos sem casca, frutas e hortaliças. Visando também evitar a migração de umidade em alimentos multicomponentes como pizzas, sanduíches, empanados e doces, e como envoltório para alimentos semiperecíveis.

Os filmes à base de proteínas apresentam efetiva barreira a gases (CO_2 e O_2), porém alta permeabilidade ao vapor de água em função do seu caráter hidrofílico. De acordo com o uso pretendido dos filmes biopoliméricos, várias modificações das propriedades de barreira ou melhoramento da resistência física podem ser possíveis. Uma forma de modificar as propriedades dos filmes é introduzir associações intermoleculares física, química ou enzimaticamente. Outra possível abordagem para melhorar as propriedades físicas dos filmes biopoliméricos tem sido a de preparar filmes compostos através do uso combinado de polissacarídeos, proteínas e lipídeos. (TANADA-PALMU et al., 2002).

2.7 GALACTOMANANAS

As galactomananas estão contidas em sementes de plantas e são utilizadas como fonte de reserva para o vegetal. A maioria das galactomananas extraídas de plantas superiores tem origem na família *Leguminosae* ou *Fabaceae*. A estrutura básica das galactomananas está representada na Figura 2.2. As unidades de D-manose se repetem ao longo da cadeia principal, enquanto as de D-galactose ocorrem na cadeia como substituintes no carbono 6 da D-manose em ligação $\alpha(1\rightarrow6)$ (SALVALAGGIO, 2010).

Os parâmetros mais importantes que definem a natureza de uma goma são a relação manose/galactose (M/G), a massa molecular, a estrutura e a viscosidade. A relação M/G difere de acordo com a espécie. As três galactomananas de maior importância comercial nas indústrias são a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobo*,

relação M/G de 2:1), goma tara (*Caesalpinia spinosa*, relação M/G de 3:1) e goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*, relação M/G de 3,5:1) no entanto, as tendências industriais exigem a introdução de fontes alternativas de gomas de sementes e é, portanto, importante pesquisar fontes alternativas renováveis (CERQUEIRA et al., 2011a; CERQUEIRA, 2010).

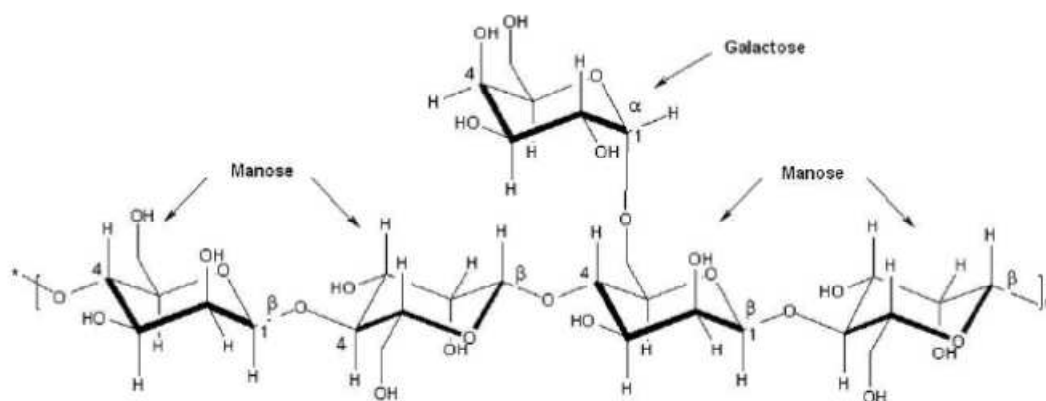


Figura 2.2 – Estrutura geral das galactomananas.

As galactomananas podem ser utilizadas de diversas formas para consumo humano. Com diferentes propriedades físico-químicas, as galactomananas são um material versátil usado para muitas aplicações: são excelentes reforçadoras e estabilizadoras de emulsões, também podem ser aplicadas na indústria têxtil, farmacêutica, biomédica, de cosméticos e alimentos. As principais aplicações das galactomananas na indústria de alimentos são em produtos lácteos, produtos em pó, panificação, produtos dietéticos, branqueadores de café, formulações de leite para bebês, temperos, molhos e sopas, carnes enlatadas e alimentos congelados de carnes. Esta ampla gama de aplicações reflete em um número de diferentes características funcionais, incluindo elevada viscosidade da solução (guar), a estabilização de sistemas de congelados (goma guar e alfarroba) e capacidade de formação de gel misturada com outros polissacarídeos e proteínas (goma de alfarroba) (CERQUEIRA, 2010).

Alguns trabalhos vêm demonstrando a possibilidade de utilizar galactomananas na formação de películas. A literatura sobre a caracterização e aplicação de galactomananas como películas e/ou coberturas é muito limitada quando comparada com a disponível para outros polissacarídeos. No entanto, trabalhos recentes trouxeram novas perspectivas sobre as propriedades e a utilização de

filmes/coberturas comestíveis de galactomananas pelas suas propriedades formadoras de soluções viscosas mesmo em baixas concentrações, precisando somente de água na preparação (CERQUEIRA et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2010; LIMA et al., 2010; MIKKONEN et al., 2007).

Em geral, as galactomananas com maiores valores relativos de galactose são mais solúveis em H₂O, mas têm menor capacidade para formar gel, enquanto que galactomananas com maior teor de manose possuem tendência a interagir com polissacarídeos gelificantes (CERQUEIRA et al., 2007).

A *Caesalpinia pulcherrima* é uma planta ornamental encontrada por toda a Índia, mas pode ser encontrada em outros países, especialmente no Brasil. Esta também pertence à família *Leguminosae*. Sendo que alguns dos componentes extraídos da *C. pulcherrima* possuem propriedades antitumorais e antimicrobianas (CERQUEIRA et al., 2009). As galactomananas das sementes desta planta possuem uma relação M/G de 3:1 (CERQUEIRA et al., 2011b).

2.8 INCORPORAÇÃO DE ADITIVOS

Uma das principais vantagens do uso de filmes comestíveis e revestimentos é que vários ingredientes ativos podem ser incorporados na matriz polimérica, e consumidos com o alimento, aumentando assim a segurança ou até mesmo os atributos nutricionais e sensoriais. Estes revestimentos comestíveis apresentam um elevado potencial para transportar ingredientes ativos, tais como agentes antiescurecimento, corantes, sabores, nutrientes, especiarias e compostos antimicrobianos, que podem estender a vida útil do produto e reduzir o risco de crescimento de patógenos nas superfícies dos alimentos (ROJAS-GRAU et al., 2009).

No entanto, é conveniente lembrar que estes aditivos podem alterar adversamente a resistência ao vapor, gás ou transporte de soluto dos filmes. A influência de um aditivo nas propriedades dos filmes dependerá de sua concentração, estrutura química, grau de dispersão e da extensão desta interação com o polímero (RIGO, 2006; KESTER e FENNEMA, 1986).

Com relação aos agentes antimicrobianos, existem várias categorias destes, que podem ser incluídos em filmes e revestimentos comestíveis, incluindo ácidos orgânicos (acético, benzóico, láctico, propiônico, sórbico), ésteres de ácidos graxos (monolaurato de glicerol), polipeptídeos (lisozima, nisina), óleos essenciais de plantas (canela, orégano, erva-cidreira), nitritos e sulfitos, entre outros (ROJAS-GRAU et al., 2009). A Tabela 2.1 apresenta alguns exemplos de ingredientes aplicados a filmes e

películas comestíveis visando melhorar a qualidade e prolongar a vida útil de frutas minimamente processadas.

Tabela 2.1 - Aplicação de revestimentos comestíveis contendo aditivos funcionais para melhorar a qualidade e estender a vida útil de frutas minimamente processadas.

Aditivo	Quantidade (%)	Material de revestimento	Fruta	Efeito
<i>Antimicrobiano</i>				
Sorbato de potássio	0,2 (m/v)	Amido	Morangos	Inibiu o crescimento de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras.
Ácido cítrico	não rep.			
Ácido málico	2,5 (m/v)	Alginato	Melões	Inibiu o crescimento microbiano e reduziu para 3,1 log CFU/g depois de 30 dias de estocagem.
Canela	0,7 (v/v)			
Palmarosa	0,7 (v/v)			
Nardo	0,7 (v/v)			
Canela	0,7 (v/v)			
Cravo	0,7 (v/v)	Alginato	Maças	Inibiu a microbiota nativa durante 30 dias e reduziu para 4 log CFU/g de <i>E. coli</i> na primeira semana de estocagem.
Nardo	0,7 (v/v)			
Cinamaldeído	0,5 (v/v)			
Eugenol	0,5 (v/v)			
Citral	0,5 (v/v)			
<i>Antioxidantes</i>				
Ácido ascórbico	1,0 (m/v)	Carragena e concentrado protéico de soro de leite	Maças	Manteve a cor original durante a estocagem sem alterações nas propriedades sensoriais.
Ácido cítrico	1,0 (m/v)			
Ácido oxálico	0,05 (m/v)			
Ácido ascórbico	0,5 (m/v)	Carboximetilcelulose e proteína de soja	Maças	Evitou o escurecimento mais efetivamente do que quando aplicado em soluções aquosas.
n-Acetaldeído	0,75 (m/v)	Alginato e gelatina	Pera	Preveniu o escurecimento por 2 semanas.
Glutadiona	0,75 (m/v)			
<i>Realçadores de Textura</i>				
Cloreto de cálcio	2,0 (m/v)	Concentrado protéico de soro de leite	Maças	Inibiu a perda de firmeza.
Cloreto de cálcio	2,0 (m/v)	Alginato	Abacaxi	Ajudou a reter o líquido interno.
Lactato de cálcio	2,0 (m/v)	Alginato	Melões	Manteve a firmeza das amostras.
Gluconato de cálcio	5,0 (m/v)	Quitosana	Framboesas	Ajudou a manter a qualidade textural.

Fonte: Rojas-Grau *et al.*, 2009.

Filmes e revestimentos comestíveis incorporados com agentes antimicrobianos são de especial interesse para fabricantes e cientistas de alimentos, especialmente quando são originados de fontes naturais. Sorbato de potássio e ácido sórbico vêm sendo utilizados há anos como substâncias antimicrobianas para preservar alimentos e retardar o crescimento de bolores, leveduras e bactérias durante o transporte, armazenagem e manuseio (OZDEMIR e FLOROS, 2008). Ozdemir (1999) constatou que filmes elaborados com proteína de soro contendo sorbato de potássio

apresentaram inibição do crescimento de bolores e leveduras, aumentando assim a vida útil de alimentos contendo estes revestimentos.

Segundo Lee et al. (2003), filmes comestíveis são úteis como veículo de agentes de antiescurecimento. A cor em produtos claros com risco de escurecimento enzimático, tais como fatias de maçã, é um importante critério de qualidade, pois fatias escuras de maçã não são esteticamente atraentes. Estes autores salientaram que na época eram poucas pesquisas sobre o efeito da combinação entre os revestimentos comestíveis e agentes antiescurecimento para produtos minimamente processados.

O ácido ascórbico é amplamente utilizado para evitar o escurecimento enzimático de frutas, devido à redução das orto-quinonas, geradas pela ação das enzimas polifenoloxidas. Contudo, após um determinado tempo, o ácido ascórbico é oxidado a ácido dehidroascórbico, permitindo assim a acumulação de orto-quinonas. Como uma alternativa ao ácido ascórbico, vários tióis contendo compostos como cisteína, acetilcisteína e glutatona reduzida foram investigados como inibidores do escurecimento enzimático. Estes compostos reagem com as quinonas formadas durante a fase inicial das reações enzimáticas de escurecimento, para produzir produtos de adição incolores ou reduzir as orto-quinonas para orto-difenóis. Além disso, ácidos carboxílicos (ácido cítrico e oxálico) também têm sido sugeridos como agentes antioxidantes eficazes em frutas frescas (ROJAS-GRAU et al., 2009).

Lee et al. (2003) relataram que revestimentos comestíveis utilizando combinações de agentes anti-escurecimento estenderam efetivamente, por duas semanas, o período de vida útil de fatias de maçã minimamente processadas, armazenadas a 3 °C. Revestimentos à base de carragena (0,5 g/100 mL) ou concentrado proteico de soro de leite (5 g/100 mL) com adição de agentes antiescurecimento mantiveram a cor clara de fatias de maçã durante o armazenamento. Efeito sinérgico de ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido oxálico e cloreto de cálcio foi verificado para manter a cor das fatias de maçã. A adição de CaCl_2 (1 g/100mL) inibiu a perda de firmeza, enquanto que a adição de ácido cítrico (0,5 g/100mL) induziu um amolecimento severo da textura. A utilização destes revestimentos apresentaram bons resultados de análises sensoriais e redução de ambos os micro-organismos, mesófilos e psicrotróficos, após 2 semanas de armazenamento.

2.9 EXTRATOS FENÓLICOS

Os antioxidantes aumentam a estabilidade dos componentes dos alimentos, mantendo o valor nutricional e a cor, impedindo a rancidez oxidativa, a degradação e a descoloração. Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, que podem ser incorporados em películas comestíveis, sendo assim retido sobre a superfície de alimentos, onde estes são mais eficazes, uma vez que a oxidação é um fenômeno de superfície-ar. As películas comestíveis também podem reduzir os processos enzimáticos, tais como a oxidação enzimática (QUEZEDA-GALLO et al., 2009; RIBEIRO, 2005).

Compostos fenólicos, tais como os flavonóides, ácidos fenólicos e taninos são considerados os principais responsáveis pela capacidade antioxidante de plantas e também por funções fisiológicas, incluindo antioxidantes, atividades antimutagênica e antitumorais (SOUZA et al., 2011). Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com a sua estrutura, ácidos derivados do hidroxibenzóico, como os ácidos gálico, protocatecóico e sirínico, e derivados do hidroxicinâmico, tais como, os ácidos caféico, ferúlico, cumárico e clorogênico (MARTINS et al., 2011).

A massa molecular e estrutura dos compostos fenólicos apresentam uma grande variação, podendo conter diferentes números de grupos hidroxil, capazes de formar ligações-H com grupos carbonila de peptídeos de proteínas (ARCAN e YEMENICIOĞLU, 2011).

O ácido ferúlico é um ácido fenólico de baixa toxicidade, tem funções como antioxidante, antimicrobiana, anticâncer e reduz o colesterol. Quando o ácido ferúlico é oxidado, ele pode reagir com alguns aminoácidos das proteínas, tais como tirosina, cisteína, lisina e moléculas de reticulação de proteínas. Assim, ele também pode ser usado como um agente de reticulação para melhorar as propriedades de películas comestíveis à base de proteínas (CAO et al., 2007).

Extratos de plantas vêm sendo alvo de atenção para serem usados como agentes alternativos aos sintéticos, pois contêm geralmente concentrações elevadas de compostos fenólicos com atividade antioxidante (MAYACHIEW e DEVAHASTIN, 2010). A utilização de compostos fenólicos naturais em embalagens de alimentos é particularmente encorajada uma vez que reduzem a oxidação e a atividade microbiana em alimentos, além de possuírem muitos benefícios sobre a saúde (MARTINS et al., 2011).

2.10 ARGILA MONTMORILONITA (MMT)

A primeira alternativa para controlar as propriedades mecânicas e de barreira de filmes proteicos é modificar a rede de polímero por meio da formação de ligações cruzadas covalentes intramoleculares e intermoleculares, por exemplo, através da aplicação de tratamentos térmicos ou por adição de agentes químicos. Outra abordagem consiste em misturar a proteína com polímeros hidrofóbicos tais como policaprolactona ou poliésteres, ou lipídios. Uma terceira estratégia é a incorporação de agentes de enchimento (TEIXEIRA, 2011; TUNÇ e DUMAN, 2010; BAE et al., 2009).

Os estudos têm sido dedicados a sistemas híbridos orgânico-inorgânicos, em particular, aqueles em que os silicatos são dispersos em camadas a uma escala nanométrica em uma matriz polimérica. As camadas de silicatos exibem uma estrutura cristalina perfeita, consistindo em camadas bidimensionais onde uma folha central octaédrica de alumina ou magnésia é ligada a dois grupos de sílica tetraedros externos (TUNC et al., 2007).

Uma área de pesquisa emergente que tem despertado interesse é a de nanocompositos poliméricos, devido à capacidade dos materiais nanométricos melhorarem significativamente as propriedades de determinados polímeros, quando comparado com o polímero isolado ou em compósitos de microescala. As principais melhorias são na resistência mecânica, além do aumento da resistência ao calor e melhores propriedades de barreira (BAE et al., 2009).

Os nanocompósitos poliméricos podem ser fabricados tanto com resinas virgens como com recicladas. Os mais estudados são os de material híbrido composto por matrizes de polímeros orgânicos recheados de argilas organofílicas, principalmente as de camadas de silicatos. A estrutura cristalina desta família de argilas organofílicas consiste em duas camadas de silicatos formando um esqueleto tetraédrico, unidos por uma camada intermediária compartilhada de estrutura octaédrica composta por aluminatos ou hidróxidos de magnésio, como a argila montmorilonita (MMT) (DIÉGUEZ, 2010).

A MMT é o tipo mais utilizado de silicato de argila em nanocompósitos poliméricos. É um material de reforço, naturalmente abundante, não tóxico, não dispendioso, estável química e termicamente, o que a torna conveniente para aplicação como componente para a embalagem de alimentos e nas áreas da medicina e cosmética (TUNÇ e DUMAN, 2010).

As partículas de argila podem interagir com polímeros de diferentes maneiras. Os polímeros iônicos são adsorvidos na superfície das partículas de argila por interações eletrostáticas, enquanto os não iônicos adsorvem aos polímeros por interações estéricas. A concentração, massa molecular e grupos funcionais dos polímeros, além do tamanho, a forma e a carga da superfície das partículas de argila, a concentração de argila em suspensão, o pH e temperatura da suspensão, são fatores que podem afetar as interações entre as argilas e os polímeros. A dispersão de argila dentro do polímero tem uma influência significativa sobre as propriedades do material. A MMT pode formar suspensões estáveis em água devido ao seu caráter hidrofílico. Esta propriedade da MMT facilita a sua dispersão em polímeros solúveis em água (TUNÇ e DUMAN, 2010).

Os três principais tipos de estruturas, que estão apresentadas na Figura 2.3, podem ser obtidas quando uma argila é dispersa em uma matriz polimérica: (i) estrutura de fase separada, onde as cadeias poliméricas não intercalam as camadas de argila, resultando em uma estrutura com propriedades similares às de um compósito convencional; (ii) estrutura intercalada, onde as cadeias poliméricas são intercaladas entre as camadas de argila, formando uma estrutura multicamada bem ordenada, que apresenta propriedades superiores às de um compósito convencional; e (iii) estrutura esfoliada, onde a argila é completa e uniformemente dispersa em uma matriz polimérica, maximizando as interações polímero-argila e levando a significativas melhorias nas propriedades físicas e mecânicas (TEIXEIRA, 2011; ZHU e WOOL, 2006, RAY e BOUSMINA, 2005).

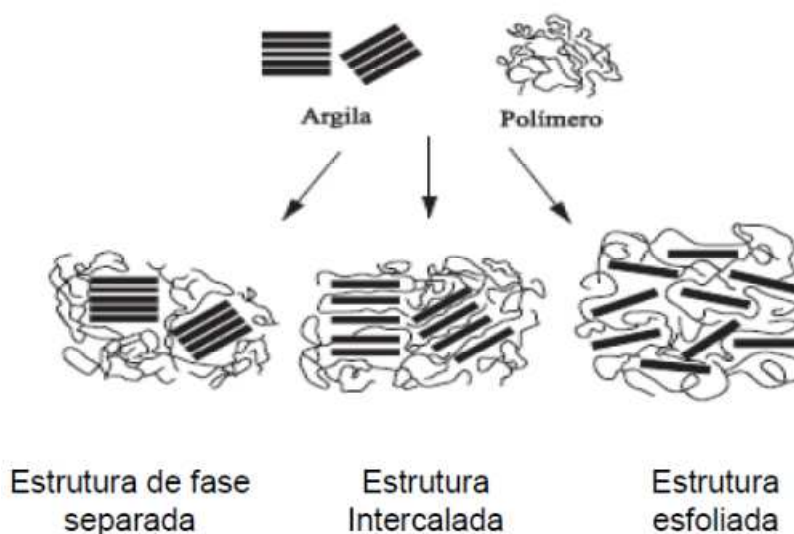


Figura 2.3 – Estruturas polímero-argila (TEIXEIRA, 2011).

Diversos autores vêm aplicando MMT na elaboração de filmes visando à melhora nas propriedades. Por exemplo: Bae et al. (2009) adicionaram MMT em filmes à base de gelatina de peixe, e obtiveram filmes com espessuras uniforme, relativamente transparentes e com melhor resistência a tração; Tunç e Duman (2010) prepararam filmes nanocompósitos de glúten/montmorilonita pelo método de *casting*. Estes destacaram que a presença de MMT induziu a redução da sensibilidade à água dos filmes; Lee e KIM (2009) desenvolveram filmes compostos de proteína isolada de soja e MMT, e obtiveram melhores propriedades mecânicas e de permeabilidade (H₂O e O₂).

2.11 PLASTIFICANTES

A adição de um plastificante é necessária para melhorar as propriedades dos filmes e coberturas. Um plastificante é uma pequena molécula de baixa volatilidade, que se soma aos materiais poliméricos, modificando a organização tridimensional, diminuindo as forças intermoleculares atrativas, e aumentando o volume livre e mobilidade da cadeia polimérica. Como resultado dessas mudanças na organização molecular, o plastificante altera as propriedades funcionais dos filmes, promovendo uma maior extensibilidade, dispensabilidade e flexibilidade, diminuindo a coesão, a elasticidade, as propriedades mecânicas e a rigidez (KOKOSZKA et al., 2010a).

Diversos tipos de plastificantes vêm sendo utilizados, tais como: mono, di e oligossacarídeos (geralmente xaropes de glicose ou glicose-frutose, mel), polióis (glicerol e derivados, polietilenoglicol, sorbitol), lipídeos e derivados (ácidos graxos, monoglicerídeos e seus ésteres, fosfolipídeos e outros emulsionantes) (GOUNGA et al., 2007; RIGO, 2006). Os plastificantes de grau alimentício mais usados são o glicerol e o sorbitol (KOKOSZKA et al., 2010a).

A elaboração de filmes à base de proteínas geralmente necessita da incorporação de um conteúdo mínimo de plastificante para reduzir sua fragilidade. Os plastificantes atuam enfraquecendo as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes da matriz proteica, resultando em um aumento da extensibilidade e flexibilidade com redução da elasticidade, aumento da resistência mecânica e de suas propriedades de barreira (GOUNGA et al., 2007). Osés et al. (2009) constataram a necessidade de se adicionar plastificantes, a fim de melhorar as propriedades mecânicas de filmes obtidos a partir de isolados proteicos de soro de leite. Seus resultados mostraram que a incorporação de um plastificante aos filmes resultou em melhoria das propriedades mecânicas.

2.12 SURFACTANTES

Surfactantes ou tensoativos são compostos orgânicos, constituídos por moléculas anfifílicas representando a parte polar que tem afinidade pela água e apolares que tem afinidade pelo óleo, com propriedade de atividade superficial, resultado da adsorção destes compostos na superfície de líquidos ou na interface entre dois líquidos imiscíveis. Em meio aquoso, acima de uma determinada concentração própria para cada tipo de surfactante, eles formam micelas e outros agregados, nos quais a porção lipofílica das moléculas ou íons fica orientada para o interior da micela enquanto apenas os grupos polares ficam na parte externa da micela em contato com a água. Forças eletrostáticas concentram compostos hidrofílicos junto à superfície de micelas enquanto compostos lipofílicos podem ser solubilizados em seu interior (FERREIRA, 2006).

Os agentes tensoativos podem ser incorporados nas formulações de filmes para reduzir a tensão superficial da solução, melhorando a molhabilidade e adesão do filme. Além disso, com a adição de surfactante na formulação do filme, espera-se um decréscimo dos valores da permeabilidade do vapor de água, devido à incorporação de componentes com alguma característica hidrofóbica (ZIANI et al., 2008).

Os filmes compósitos são filmes heterogêneos de partículas hidrofóbicas dentro de uma matriz hidrofílica. Neste caso, os agentes tensoativos podem ser usados para estabilizar a fase dispersa antes da secagem da película ou antes da sua aplicação às superfícies dos alimentos (QUEZADA-GALLO, 2009).

Os surfactantes são substâncias utilizadas para melhorar a estabilidade de emulsões, devido às suas propriedades de hidrofiliidade e de hidrofobicidade simultâneas (CEQUEIRA, 2010; RIBEIRO et al, 2007). Choi et al. (2002) relataram que a adição de 1% de Tween 80 a uma solução de 1,5% de quitosana aumentou a compatibilidade entre o revestimento e a superfície de maçãs, reduzindo a tensão superficial do líquido e assim aumentando o coeficiente de espalhamento. Ribeiro et al. (2007) também verificaram o efeito da diminuição da tensão superficial de soluções de amido, carragena e quitosana nas superfícies de morangos.

2.13 CARACTERIZAÇÃO DAS PELÍCULAS

As propriedades requeridas para películas comestíveis dependem, principalmente, das características do alimento sobre o qual serão aplicadas. O uso desses materiais em embalagens para alimentos vai depender, além de parâmetros como custo e disponibilidade, de suas propriedades funcionais: propriedades

mecânicas (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas (cor e opacidade), propriedades de barreira (permeabilidades ao vapor de água, ao O₂ e ao CO₂), solubilidade em água e propriedades sensoriais. Essas propriedades dependem do biopolímero usado (conformação, peso molecular, distribuição de cargas, polaridade), das condições de fabricação (pH, concentração de proteínas na solução filmogênica, tratamento térmico da solução, tipo e teor de aditivos, como os plastificantes) e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa), importantes por causa da natureza higroscópica dos biopolímeros e do plastificante usados (GARCÍA et al. 2009; MAHMOUD e SAVELLO, 1992).

2.13.1 Propriedades de barreiras

Diversos alimentos necessitam de condições atmosféricas específicas para poder manter sua qualidade durante a estocagem. Para manter constante a composição de gases dentro da embalagem é necessário que o material apresente uma barreira aos gases e ao vapor de água (FONSECA, 2009). Os revestimentos fornecem uma barreira semipermeável contra oxigênio, dióxido de carbono, umidade e movimento de solutos, reduzindo assim a respiração, a perda de água e reações de oxidação (LEE et al., 2003).

Para muitas aplicações em alimentos, a característica funcional mais importante do filme ou revestimento comestível é a resistência à umidade. A perda de água de produtos armazenados não só resulta em perda de peso, mas também em perda de qualidade, principalmente pelas alterações na textura. Uma pequena perda de água pode ser tolerada, mas àquelas responsáveis pelo murchamento ou enrugamento devem ser evitadas (OLIVEIRA et al., 2007a).

A permeabilidade ao vapor de água é um fenômeno que implica em solubilidade em água e difusão das moléculas de água através da matriz do filme. (OSÉS et al., 2009). Longares et al. (2005), não encontraram diferenças na permeabilidade ao vapor de água entre os filmes elaborados com isolado proteico de soro de leite e filmes feitos com misturas deste isolado e caseinato de sódio, devido à natureza hidrofílica de ambas as proteínas. Por outro lado, Ryu et al. (2002), elaboraram filmes compostos de zeína de milho com diferentes quantidades de amido com elevado teor de amilose. Um aumento da quantidade de zeína em relação ao amido diminuiu a permeabilidade dos filmes resultantes, decorrente da alta hidrofobicidade da zeína

De acordo com Bourtoom (2008), o método de elaboração das películas afeta as propriedades de barreira desses filmes. Outros fatores, tais como a conformação das proteínas, sequências de aminoácidos, distribuição dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, grau de desnaturação proteica, polaridade, força iônica e condições ambientais, afetam a capacidade de retenção de água das proteínas alimentares (BANERJEE e CHEN, 1995).

Segundo Kokoszka et al. (2010a), que estudaram a permeação do vapor de água em filmes de isolado proteico de soja, os valores de permeabilidade encontrados na literatura para estes filmes dependem do pH, da composição do isolado (frações proteicas e de conteúdo) e das condições de secagem. Estes autores concluíram em seu estudo que a variação da proporção de isolado proteico de soja e glicerol em filmes comestíveis teve um efeito sobre a permeabilidade ao vapor de água, sendo que um efeito sinérgico do teor de glicerol e proteína foi observado na permeabilidade ao vapor de água.

Um aumento na concentração de plastificante, normalmente causa um aumento na permeabilidade de filmes higroscópicos ou hidrofílicos, devido a uma reorganização da rede de proteína e um consequente aumento do volume livre. (KOKOSZKA et al., 2010b). Kamper e Fennema (1985) produziram filmes de emulsão de ácidos graxos e metil celulose para melhorar a barreira de vapor de água desses revestimentos.

A permeabilidade ao vapor de água de filmes e películas geralmente é determinada por gravimetria segundo padrões estabelecidos pela ASTM (*American Society for Testing and Materials*). O método está baseado na variação de massa das células de permeação ao longo do tempo.

O transporte de gases como o oxigênio e o dióxido de carbono, tal como a transmissão de umidade, pode influenciar a estabilidade do armazenamento de alimentos, uma vez que o oxigênio é meio de sua deterioração pela oxidação de lipídios, vitaminas, pigmentos e componentes de *flavor*. Desta forma, o emprego de filmes comestíveis com propriedades de barreira ao oxigênio em alimentos, visa estender a vida útil e reduzir o custo da embalagem. A reação acontece como resultado de injúrias mecânicas pós-colheita e da desintegração durante o processamento, que permitem o acesso do oxigênio aos tecidos e o contato da enzima com o substrato. A principal consequência é a formação de melaninas, pigmentos escuros que prejudicam a aceitação de muitas frutas. Visto que o oxigênio é requerido

para iniciar a reação, a utilização de filmes comestíveis pode ser útil para reduzir as taxas de escurecimento (OLIVEIRA et al., 2007b).

A permeabilidade ao oxigênio é uma das propriedades de transporte mais estudadas em filmes poliméricos comestíveis. Gounga et al. (2007) relataram que a baixa permeabilidade ao O_2 em elevadas concentrações de isolado proteico de soro de leite foi provavelmente devido ao aumento na densidade da solução filmogênica que resultou em uma maior espessura do filme, que reduziu o espaçamento intersticial entre as moléculas dos filmes poliméricos. Como consequência, a permeabilidade ao O_2 é reduzida devido à obstrução de moléculas de oxigênio através da rede proteica mais empacotada. Olivas e Barbosa-Cánovas (2009) confirmaram que uma menor permeabilidade ao O_2 pode ser conseguida com filmes e revestimentos comestíveis do que quando foram utilizados filmes plásticos convencionais.

Os filmes e revestimentos comestíveis agem como uma barreira semipermeável que pode ser capaz de manter a qualidade dos alimentos. Sendo biodegradáveis, estes oferecem sistemas alternativos de embalagens, ocasionando uma redução nos problemas ambientais. A atmosfera modificada, criada pelo revestimento, gera uma barreira física ao CO_2 no interior das frutas e uma vedação parcial dos poros, reduzindo as trocas gasosas e reduzindo as taxas de transferência deste gás (LIMA et al. 2010).

A permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono também são determinados segundo padrões estabelecidos pela ASTM. Lima et al. (2010) verificaram que as diferenças de permeabilidade ao oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água, de revestimentos elaborados a partir de misturas de galactomananas, colágeno e glicerol, sugerem que estes revestimentos podem reduzir as taxas de transferência de gases nas frutas estudadas (mangas e maçãs), e podem ser uma importante ferramenta para estender a vida útil destes produtos.

2.13.2 Propriedades mecânicas

A maioria dos alimentos sofre estresse durante o armazenamento, o manuseio e a distribuição, por isso, os filmes comestíveis e revestimentos que são destinados a aplicações em alimentos devem possuir boas propriedades mecânicas (BANERJEE e CHEN, 1995).

O teste mais utilizado para medir a força mecânica de filmes é o teste de tração, onde podem ser derivadas propriedades de resistência à tração, alongação, força resultante e módulo de elasticidade. As propriedades mecânicas são medidas

por deformação de uma amostra e monitoração da força até que esta se rompa (RIGO, 2006).

A resistência à tração é medida pela força máxima de tração que o filme pode sustentar. A elongação é geralmente tirada do ponto de quebra e é expressa como a porcentagem de aumento ao comprimento original da amostra. O módulo de elasticidade ou módulo de Young mede também a resistência do filme (ADEBIYI et al., 2008; RIGO, 2006). A resistência à tração e o alongamento geralmente são medidas utilizando um texturômetro, seguindo as diretrizes estabelecidas pela ASTM (LIMA et al., 2010).

As propriedades mecânicas de filmes à base de proteínas fornecem uma indicação da integridade destes filmes sob condições de estresse, que geralmente ocorrem durante o manuseio, processamento e armazenamento de alimentos. Todas as variáveis envolvidas durante a formação de películas, tais como o tipo de proteína e a concentração, tipo e concentração de plastificante, o pH da solução e o tratamento térmico afetam significativamente as propriedades físicas de filmes proteicos (ADEBIYI et al., 2008).

Com relação à composição dos filmes, Banerjee e Chen (1995) verificaram que a adição de lipídios reduziu significativamente a resistência à tração de filmes à base de proteínas do soro de leite, por causa do enfraquecimento e efeitos de lubrificação destes lipídios sobre a matriz destes filmes.

Lima et al. (2010) verificaram que filmes elaborados somente com proteínas de soro de leite apresentavam maior resistência à tração, pois as forças intermoleculares entre as cadeias das proteínas são as responsáveis pela resistência destes filmes. A desnaturação destas proteínas provoca uma interação entre as cadeias proteicas, promovidas pelas pontes de hidrogênio e dissulfeto, resultando em uma matriz rígida de baixa elongação. Osés et al. (2009) relataram que a adição de goma de algaroba a filmes de proteína de soro de leite conferiu uma maior flexibilidade a eles, sugerindo que esta goma participa do enfraquecimento ou na redução do número de pontes de hidrogênio, agindo como um plastificante.

Brindle e Krochta (2008) constataram uma redução na resistência à tração e um aumento na elongação com a elevação da concentração de glicerol e de proteínas. Como o glicerol apresenta três grupos hidroxila e um tamanho adequado, isto pode facilitar a entrada entre polímeros que formam as películas, enfraquecendo as forças intermoleculares, suavizando a rigidez da estrutura. Portanto, sua incorporação à

matriz polimérica pode resultar em uma diminuição na resistência à tração e um aumento na porcentagem de alongamento de ruptura (JIA et al., 2009).

2.13.3 Cor e opacidade

A cor e a opacidade (transparência) estão entre as principais propriedades óticas dos filmes e revestimentos, consistindo em importante parâmetro na caracterização de filmes, pois está associada com a matéria-prima utilizada em sua elaboração. Para uma boa apresentação visual do produto, é desejável que os filmes apresentem elevado brilho e transparência. Por outro lado, muitas vezes impedir incidência de luz se faz necessária, como no acondicionamento de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz (PIRAN et al., 2008; RIGO, 2006).

Filmes à base de proteínas de soro de leite apresentam um potencial para retardar a oxidação lipídica induzida pela luz ultravioleta em alimentos. Resultados obtidos por Gounga et al. (2007) indicaram que filmes de proteínas de soro de leite e pululam foram claros o suficiente para serem selecionados e usados como revestimentos e/ou material de embalagem, evitando alterações na cor e a oxidação lipídica. Em outro caso, Osés et al. (2009) relataram que a opacidade e cor amarelada conferida pela adição de goma de algaroba aos filmes produzidos por estes, seria provavelmente a maior desvantagem do potencial de aplicação destes filmes em alimentos.

A cor e a opacidade de filmes e revestimentos normalmente são determinadas utilizando-se um colorímetro, seguindo o sistema Cielab de coordenadas cromáticas. A opacidade de um material é uma indicação de quanto de luz passa através dele, quanto maior a opacidade, menor será a quantidade de luz que pode passar através do material (LIMA et al. 2010).

2.13.4 Propriedades molhantes (Molhabilidade)

A aderência de um filme a um produto alimentar é um fenômeno físico que pode ser controlada pela molhabilidade, devido às forças interfaciais entre os materiais (onde pelo menos um é líquido), pelas forças eletrostáticas entre os polímeros carregados, ou por ligações químicas quando ocorrem as reações (DEBEAUFORT e VOILLEY, 2009).

A eficiência do revestimento comestível utilizado depende principalmente do controle da molhabilidade das soluções de revestimento, que pode ser obtido através do coeficiente de espalhamento (W_s). As formulações de revestimentos comestíveis

devem molhar e se espalhar uniformemente sobre a superfície do produto, e após secagem, formar uma película com adequada adesão, coesão e durabilidade (RIBEIRO et al., 2007).

A molhabilidade pode ser estudada através da determinação dos valores de coeficiente de espalhamento (W_s), de adesão (W_a) e coesão (W_c). As forças adesivas promovem o espalhamento de líquido numa superfície sólida, enquanto que as forças de coesão promovem a sua contração. O comportamento da molhabilidade das soluções irá depender, sobretudo, do equilíbrio entre estas forças. A tensão superficial das soluções de revestimento é feito pelo método da gota pendente utilizando a aproximação de Laplace-Young (CERQUEIRA, 2010).

O ângulo de contato de uma gota de um líquido em uma superfície sólida é definido pelo equilíbrio mecânico da gota sobre a ação de três tensões interfaciais: sólido-vapor (γ_{SV}), sólido-líquido (γ_{SL}), e líquido-vapor (γ_{LV}). O coeficiente de espalhamento no equilíbrio pode ser então definido, conforme a Equação 2.1, podendo ser negativo ou nulo.

$$W_s = W_a - W_c = \gamma_{SV} - \gamma_{LV} - \gamma_{SL} \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde W_a e W_c são os trabalhos de adesão e coesão, definidos pelas equações 2.2 e 2.3, respectivamente.

$$W_a = \gamma_{LV} + \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad \text{Equação 2.2}$$

$$W_c = 2\gamma_{LV} \quad \text{Equação 2.3}$$

Para determinar estes parâmetros é necessário medir o ângulo de contato da cobertura na superfície (LIMA et al., 2010). Uma das características primárias de um sistema bi ou trifásico, contendo duas fases condensadas, em que pelo menos uma delas é um líquido, é o ângulo de contacto do líquido na outra fase condensada (Θ) (Figura 2.4). O ângulo de contato da gota de líquido na superfície sólida é definido pelo equilíbrio mecânico da gota sob a ação das três tensões interfaciais citadas acima (γ_{SV} , γ_{SL} e γ_{LV}) (RIBEIRO, 2005).

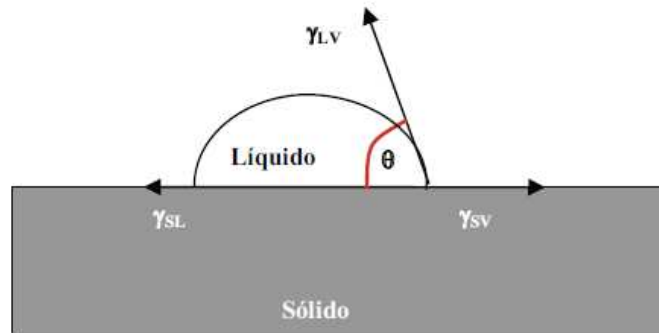


Figura 2.4 – Esquema representativo das tensões interfaciais em um sistema trifásico.

Esta relação de equilíbrio é conhecida como equação de Young (RULON e ROBERT, 1993), a qual fornece uma definição termodinâmica do ângulo de contato.

$$\cos \theta = \frac{(\gamma_{SV} - \gamma_{SL})}{\gamma_{LV}} \quad \text{Equação 2.4}$$

Alguns autores desenvolveram a ideia de que a tensão interfacial líquido-vapor pode ser dividida em duas componentes, uma polar e outra dispersiva (KAELBLE, 1970). As contribuições polar e dispersiva são adicionadas, obtendo-se:

$$\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^p \quad \text{Equação 2.5}$$

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad \text{Equação 2.6}$$

Para um líquido puro, são conhecidas as interações polar (γ_L^p) e dispersiva (γ_L^d), e se o ângulo de contato entre o líquido e o sólido é obtido, a interação pode ser descrita por:

$$W_a = W_a^d + W_a^p \Leftrightarrow W_a = 2 \cdot (\sqrt{\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \cdot \gamma_L^p}) = \gamma_L (1 + \cos \theta) \quad \text{Equação 2.7}$$

$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^d} \cdot \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_S^p} \quad \text{Equação 2.8}$$

A determinação do ângulo de contato de pelo menos três compostos puros em uma superfície permite o cálculo de ambas as variáveis, independente $\left(\sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} \right)$ e dependente $\left(\frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} \right)$, da Equação 1.8 (LIMA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2007).

Zisman (1964) desenvolveu um método prático para caracterizar a capacidade molhante de superfícies sólidas. O sistema baseia-se na observação de que em superfícies sólidas com uma tensão superficial inferior a 100 mN/m (geralmente classificadas como superfícies de baixa energia) o ângulo de contacto formado por uma gota de líquido na superfície sólida seria função aproximadamente linear de γ_{LV} (onde a fase V é ar saturado com o vapor do líquido). Para líquidos não polares esta relação é linear, sendo que para líquidos polares se observa uma ligeira curvatura. Construindo um gráfico $\cos \Theta$ versus γ_{LV} poderá se obter o valor da tensão superficial do líquido para o qual $\cos \Theta = 1$. Este valor denomina-se tensão superficial crítica do processo de umedecimento (γ_c), sendo definido como o valor de γ_{LV} de um líquido abaixo do qual o espalhamento desse líquido em determinada superfície sólida é completo. A determinação da tensão superficial crítica é bastante atraente, pois permite caracterizar a superfície sólida em estudo de uma forma bastante prática. (RIBEIRO, 2005).

Alguns estudos avaliaram a molhabilidade de soluções de revestimento sobre frutas e vegetais. Choi et al. (2002) estudaram a molhabilidade de soluções de revestimento à base de quitosana na superfície de maçãs usando o método da gota pendente. A superfície das maçãs apresentaram uma tensão crítica de 18,7 mN/m. Ribeiro et al. (2007), obtiveram um valor similar para a tensão crítica da superfície de morangos (18,84 mN/m), os quais foram referidos como tendo uma tensão superficial de 28,94 mN/m, com componentes polar e dispersiva de 5,95 e 22,99 mN/m, respectivamente.

Em alguns casos, para melhorar a molhabilidade das soluções de revestimento, tem sido adicionado Tween 80, reduzindo a tensão superficial do líquido e aumentando assim a coeficiente de espalhamento (RIBEIRO et al., 2007). Casariego et al. (2008) determinaram os efeitos das concentrações de plastificantes, de Tween 80 e de quitosana sobre a molhabilidade das soluções de revestimento em tomate e cenoura. As superfícies apresentam tensões superficiais de 28,71 e 26,48 mN/m para

tomate e cenoura, respectivamente. Sendo que, com a adição de Tween foi observado aumento no coeficiente de espalhamento.

Uma boa escolha da formulação de revestimento é essencial para a durabilidade e manutenção do revestimento sobre os produtos alimentares. A determinação da capacidade molhante, com o estudo do W_s , W_a e W_c , bem como o estudo das propriedades da superfície dos produtos, é, portanto, essencial para a correta aplicação de revestimentos comestíveis (CERQUEIRA, 2010).

2.13.5 Microscopia e espectroscopia

A determinação microscópica da estrutura do filme ou revestimento é fundamental para conhecer as interações de diferentes componentes na estrutura final do filme. Compreender as interações entre os componentes ajuda a controlar as propriedades físicas de filmes e revestimentos (OSÉS et al., 2009). A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser utilizada para avaliar a homogeneidade dos filmes, a estrutura da camada, poros e fissuras, lisura da superfície e da espessura (GARCÍA et al. 2009).

Dias et al. (2010) constatou que a microscopia de varredura mostrou a homogeneidade do filme de amido de arroz elaborado. A matriz homogênea deste filme foi um bom indicador de sua integridade estrutural, e conseqüentemente, eram esperadas boas propriedades mecânicas deste filme.

A espectroscopia transformada de Fourier no infravermelho (FTIR) é uma técnica útil para suplementar à caracterização microestrutural de películas compostas, uma vez que pode ser utilizada para avaliar as interações entre os componentes do filme (GARCIA et al. 2009).

A espectroscopia no infravermelho é um método de caracterização físico para análise qualitativa e determinações quantitativas de traços de elementos. Isto é possível porque os átomos que formam as moléculas possuem frequências específicas de vibração, que variam de acordo com a estrutura, composição e o modo de vibração da amostra. Para varrer essa gama de frequência, utiliza-se o infravermelho (CHIA, 1984).

2.14 ALIMENTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS

A utilização de películas comestíveis tem sido bastante explorada para revestimento de frutas e hortaliças frescas, pois além de ser uma alternativa para o aumento da vida útil, devido à redução da perda de umidade e ao controle da

transmissão de gases, é também eficaz no melhoramento da aparência dos produtos aumentando sua aceitabilidade frente ao consumidor (OLIVEIRA et al, 2007a; AZEREDO, 2003; MAIA et al, 2000).

Assim, para produtos suscetíveis à oxidação, as películas devem apresentar baixa permeabilidade de O₂. Frutas e hortaliças frescas requerem películas que permitem transferência moderada de gases para reduzir (mas não inibir) a respiração e evitar processos fermentativos resultantes de anaerobiose. (DEBEAUFORT e VOILLEY, 1994). Por estarem em contato com os alimentos, é desejável que os filmes e coberturas comestíveis apresentem propriedades sensoriais neutras (transparente, inodoro e insípido), de modo a não alterar a qualidade dos alimentos (FAKHOURI et al., 2007).

Essas películas podem ser usadas em frutas e vegetais, inteiros ou minimamente processados e são utilizadas com o objetivo de melhorar ou substituir algumas das características das camadas da epiderme natural (FILHO, 2000). Dentre elas se destacam as seguintes propriedades: redução da perda de água, a difusão de gás, a movimentação de óleos e gorduras e a perda de sabores e aromas; melhora na aparência e nas propriedades estruturais; possibilidade de incorporar pigmentos, aromatizantes e aditivos (SALTVEIT, 1998).

Inicialmente, os produtos minimamente processados foram fornecidos a restaurantes ou a serviços de alimentação, onde as mercadorias são vendidas aos consumidores com validade restrita, portanto, não havendo necessidade de manter a qualidade do alimento por longos períodos. Atualmente, frutas frescas e vegetais têm se expandido para supermercados em resposta à demanda dos consumidores. O uso de filmes/coberturas comestíveis tem sido estudado como uma boa alternativa para a preservação de frutas intactas e vegetais minimamente processados, uma vez que esses filmes podem criar barreiras semipermeáveis para gases e vapor de água, mantendo a qualidade do produto (OLIVAS e BARBOSA-CÁNOVAS, 2009).

2.15 BATATA

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é um tubérculo originário da região andina, no continente sul-americano. Por suas qualidades nutritivas e por se adaptar facilmente a qualquer tipo de solo, em pouco tempo seu consumo tornou-se generalizado em todo o mundo. A batata é o terceiro alimento mais consumido no mundo, após o arroz e o trigo, e compõe a base alimentar de vários países (MORETI, 2007).



Figura 2.5 - Batata (*Solanum tuberosum* L.).

A batata está entre os dez principais produtos agrícolas brasileiros, e é a hortaliça mais importante para a economia nacional, com faturamento superior a um bilhão de reais e com mais de trezentos mil empregos diretos e indiretos gerados. Entre as possibilidades de agregação de valor à batata se destaca o processamento mínimo (PINELLI et al., 2005). Segundo a Associação Brasileira da Batata (ABBA) que realizou uma pesquisa no de 2000, 82% dos entrevistados preferem batatas frescas, que incluem batatas minimamente processadas, a batatas pré-fritas congeladas.

Um dos principais problemas que reduz a vida pós-colheita de batatas minimamente processadas é a suscetibilidade ao escurecimento enzimático ocasionado pelo processo de corte. Esta deterioração tem grande importância no aspecto visual do produto, pois prejudica sua aceitação sensorial e qualidade comercial, reduzindo também o valor nutritivo (VITTI, 2007).

No caso da batata fatiada minimamente processada, o escurecimento enzimático ocorre com intensidade, devido ao aumento da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO). O escurecimento é iniciado pela oxidação de compostos fenólicos pela PPO. O produto inicial da oxidação é a quinona, que rapidamente se condensa, formando pigmentos escuros insolúveis, denominados melaninas, ou reage não enzimaticamente com outros compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas, também formando melanina. A enzima peroxidase (POD) também participa do escurecimento em hortaliças minimamente processadas e está relacionada com processos de cicatrização, como, por exemplo, a lignificação (JUNQUEIRA et al., 2009, PINELLI et al., 2005).

Em tubérculos de batata, açúcares e amido são os componentes primeiramente afetados pelo metabolismo pós-colheita. A degradação do amido ocorre rapidamente com a diminuição da temperatura, enquanto a variação dos açúcares

totais e redutores está diretamente relacionada com o tempo de armazenamento (MORETTI, 2007).

É importante conhecer os efeitos causados pelo processamento mínimo para desenvolvimento de tecnologia que permita aumentar a vida útil desses produtos, mantendo as características nutricionais e sensoriais, mantendo a segurança do alimento (PORTE e MAIA, 2001). Um método que vem ganhando destaque para aumentar a vida pós-colheita de vegetais é o uso de coberturas comestíveis (FONTES et al., 2008).

CAPÍTULO 3

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE ARROZ COM O FUNGO

Rhizopus oryzae

Neste capítulo está descrito o estabelecimento de parâmetros de cultivo do fungo *Rhizopus oryzae* visando à produção de proteína e de compostos fenólicos livres.

3.1 INTRODUÇÃO

Os cultivos microbianos visando à produção de compostos úteis vêm sendo estudados há muitas décadas, sob a denominação geral de fermentação. A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como o processo em que a cultura de micro-organismos ocorre sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das células mas não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001). Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de aumentar o conteúdo proteico e a síntese de metabólitos pelos micro-organismos (MEMBRILLO et al., 2011).

O uso de resíduos agroindustriais como suporte na FES é economicamente importante também do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto que causa sobre a natureza, valoriza os resíduos agrícolas e agroindustriais cujos custos de produção são elevados (SILVA, 2002). O gênero de fungo *Rhizopus* é um dos mais promissores para este processo, pois tem sido demonstrado que além da capacidade de aumentar o teor proteico de matérias-primas de baixo valor nutritivo, as proteínas possuem atividade funcional e atividade catalítica específicas. Em especial, os fungos deste gênero são bastante indicados, pois além de não produzirem substâncias tóxicas, têm elevada produção de proteínas de alta digestibilidade (OLIVEIRA et al. 2010; ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, e um dos principais subprodutos do beneficiamento do arroz é o farelo integral. Trabalhos realizados por Oliveira et al. (2010) e Silveira e Badiale-Furlong (2007) comprovaram que com a fermentação do farelo de arroz pelo fungo *Rhizopus oryzae* havia um aumento no conteúdo proteico. Além disso, com a FES, pode-se disponibilizar um maior conteúdo de compostos fenólicos a partir de resíduos agroindustriais (MARTINS et al., 2011). O arroz é uma fonte rica nestes compostos bioativos, inclui muitos antioxidantes fenólicos que têm o potencial para reduzir o risco de doenças, e encontram aplicação tanto na indústria de alimentos, como no mercado de saúde e cosméticos (BUTSAT e SIRIAMORNPNUN, 2010; POURALI, 2010).

A atuação do micro-organismo sobre o substrato depende das propriedades físicas do material, que incluem a natureza cristalina ou amorfa, área acessível, porosidade e principalmente o tamanho da partícula (MEMBRILLO et al., 2008). O

nitrogênio é um nutriente essencial em meios de cultura microbiológicos e se tem constatado que o farelo de arroz, quando suplementado com soluções minerais e fontes de nitrogênio, individualmente ou em misturas tem aumentado o rendimento proteico da biomassa fermentada (ANUPAMA e RAVINDRA, 2001). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da granulometria do substrato (farelo de arroz) e da concentração de sulfato de amônio da solução nutriente na multiplicação da biomassa, no conteúdo proteico e na produção de compostos fenólicos liberados pela fermentação em estado sólido com o microrganismo *Rhizopus oryzae*, visando à recuperação destes compostos para emprego em formulações alimentícias.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Preparo do inóculo

A cepa do agente fermentador, o fungo *Rhizopus oryzae* (CCT 1217), foi obtida da Fundação André Tosello (FAT), Campinas, Brasil. As culturas foram mantidas a 4°C em tubos inclinados contendo meio ágar dextrose de batata (PDA, Acumedia®), sendo os esporos propagados através da adição de 5 mL de uma emulsão aquosa de Tween 80 (0,2%). Os mesmos foram incubados durante 7 dias a 30°C até nova e completa esporulação do fungo após a adição de 0,2 mL da emulsão de esporos em placas de Petri contendo ágar batata-dextrose. A suspensão de esporos para realização da fermentação foi obtida pela adição de 10 mL de emulsão aquosa de Tween 80 (0,2%), raspando as placas com auxílio de uma alça de Drigalski. A concentração da solução de esporos foi estimada por enumeração em Câmara de Neubauer (L.Opitik, Alemanha).

3.2.2 Classificação e caracterização do substrato

O farelo de arroz integral foi fornecido pela empresa Irgovel de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Foi realizado primeiramente um estudo preliminar para avaliar a composição proximal e o crescimento da biomassa fúngica ao longo de 120 h de fermentação usando o farelo de arroz com partículas menores que 35 mesh. Após isso, o farelo foi submetido a peneiramento utilizando peneiras (Bertel, Brasil) de tamanho-mesh: 35, 42, 65 e 100. Sendo o farelo utilizado nesta etapa classificado em três tamanhos de diâmetro médios: 0,39 mm (-35 e +42); 0,28 mm (-42 e +65); 0,18

mm (-65 e +100). A composição proximal das diferentes frações de farelo de arroz foi determinada conforme metodologia da AOAC (2000) para umidade (n° 934.01), proteínas (n° 955.04C; fator de conversão de 5,7), fibras totais (n° 962.09), lipídeos (n° 920.85) e cinzas (n° 900.02A). Os carboidratos foram estimados por diferença. As características físicas das diferentes frações de farelo de arroz, área superficial, volume de poros e diâmetro médio de poros foram estimados através das isotermas de adsorção-desorção de nitrogênio (Apêndice 1), pelo método de BET (Brunauer-Emmett-Teller) (CARDOSO et al., 2011), utilizando um analisador volumétrico de adsorção (Quantachrome, modelo NovaWin2, EUA). O detalhamento da morfologia das partículas foi obtido por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol, JSM 6060, Japão).

3.2.3 Processo fermentativo

O farelo de arroz integral foi fermentado em estado semissólido, utilizando a metodologia padronizada por Oliveira et al. (2010). As frações contendo farelo de arroz com diferentes granulometrias foram acondicionadas em biorreatores de bandeja, dispostas em camadas de 2 cm, cobertas com gaze e algodão esterilizados para permitir a aeração e evitar a contaminação externa. As bandejas (6cm x 6cm x 5cm) contendo 15 gramas de farelo de arroz (esterilizadas a 121°C por 30 min) foram adicionadas de 6,75 mL de uma solução nutriente (2g/L de KH_2PO_4 , 1g/L de MgSO_4 e 2 - 8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em HCl 0,4N), esterilizada a frio (usando membrana Millipore de 0,45 μm), sendo estudado o efeito da concentração de sulfato de amônio na produção de proteína fúngica.

A solução de esporos do fungo *Rhizopus oryzae* foi adicionada na concentração inicial de 4×10^6 esporos/g de farelo. Água destilada esterilizada foi adicionada ao meio visando o ajuste da umidade para 50%. Os biorreatores foram colocados em câmara de fermentação a 30°C com umidade controlada usando recipientes abertos com água esterilizada no interior da estufa (OLIVEIRA et al., 2010; SUMANTHA et al., 2006). Após 96 h de incubação, a biomassa fermentada foi estocada à -18 °C para posterior caracterização físico-química segundo procedimentos da AOAC (2000), para umidade, lipídeos, proteínas, cinzas e fibras.

3.2.4 Delineamento experimental

Para a avaliação dos efeitos do tamanho médio das partículas de farelo de arroz e da concentração de sulfato de amônio no processo fermentativo, realizou-se um planejamento experimental fatorial 2^2 (PCC), considerando como variáveis dependentes a produção de biomassa, o ganho de proteínas e o ganho de compostos fenólicos. Os níveis estudados para as variáveis independentes (Tabela 3.1) foram baseadas em condições trabalhadas por diferentes pesquisadores (POGAKU et al., 2009; RUDRAVARAM et al., 2006; RAVINDER et al., 2003).

Tabela 3.1 – Níveis e valores das variáveis independentes de tamanho médio das partículas e da concentração de sulfato de amônio utilizados no planejamento.

Fator	Níveis		
	-1	0	1
$\Phi_{\text{médio}}$ (mm)	0,18	0,28	0,39
$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (g/L)	2	5	8

Onde: $\Phi_{\text{médio}}$ = diâmetro médio das partículas.

O efeito do tamanho médio das partículas e da concentração de sulfato de amônio na produção de biomassa, no ganho de proteínas e no ganho de compostos fenólicos foi analisado por gráfico de Pareto.

3.2.5 Produção de biomassa

A produção de biomassa gerada na fermentação foi estimada indiretamente pelo teor de glicosamina produzido (AIDOO et al., 1981). Um grama de amostra foi adicionado de 5 mL de HCl 6N e levado a banho fervente por 2 horas. Após resfriamento a amostra foi filtrada, sendo 1 mL do filtrado transferido para um balão volumétrico de 25 mL juntamente com uma gota de solução alcoólica de fenolftaleína 0,5% (p/v). A neutralização foi realizada com solução NaOH 3N até que a mistura adquirisse coloração rosa. A titulação reversa foi realizada com solução de KHSO_4 1% (p/v) até desaparecimento da cor rosada. O volume do balão foi completado com água destilada.

Foram transferidos 3 mL da solução do balão para tubo de ensaio, seguidos pela adição de 1 mL de uma solução de acetil cetona em Na_2CO_3 0,5 N (1:50) e a mistura foi colocada em banho de água fervente por 20 minutos. Após resfriamento da

amostra, foram adicionados 4 mL de etanol e 1 mL de reagente de Erlich (AIDOO et al., 1981) e incubados a 65°C por 10 minutos. O teor de glicosamina foi estimado espectrofotometricamente (Biospectro, Brasil) a 530 nm, utilizando uma curva padrão de glicosamina (Sigma, USA) em água (1 – 15 mg/mL).

Para converter o teor de glicosamina em biomassa fúngica, foi utilizado um fator de conversão de 0,057 mg de glicosamina/mg de fungo seco, obtido através de uma regressão linear (Apêndice 2) de glicosamina versus massa de fungo seco (obtida em condições de crescimento em estado sólido). Sendo a biomassa fúngica gerada durante a fermentação calculada segundo a Equação 3.1:

$$Biomassa \text{ (mg / g)} = (GF - GF_0) / 0,057 \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde: GF = teor de glicosamina no farelo fermentado; GF₀= teor de glicosamina no farelo não fermentado (tempo zero).

3.2.6 Ganho de proteína

O teor de nitrogênio total nos produtos fermentados foi determinado através do método micro-Kjedhal conforme a AOAC (2000), sendo que o ganho de proteína após a fermentação foi calculado segundo a Equação 3.2, levando em consideração o fator de correção de 5,7 para o cálculo da proteína do farelo de arroz e o fator de 6,25 para o cálculo da biomassa fermentada.

$$GP (\%) = \frac{[(NF - NF_0) \times 6,25]}{(NF_0 \times 5,7)} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde: GP = ganho percentual de proteína em base seca; NF = teor de nitrogênio no farelo fermentado; NF₀= teor de nitrogênio no farelo não fermentado. O teor de nitrogênio da solução de esporos e da solução nutriente foram desprezados no cálculo (menor que 0,1%).

3.2.7 Determinação de compostos fenólicos

Amostras de 5g de farelo de arroz fermentado foram submetidas à agitação durante 2 horas com 40 mL de metanol em mesa agitadora orbital (150 rpm) a temperatura ambiente (SOUZA et al., 2010b). A agitação foi interrompida por 15 minutos e reiniciada, após a adição de 10mL de metanol por mais 1 hora. O extrato foi

filtrado para um funil de separação e lavado três vezes com 10mL de hexano e submetido à clarificação pela adição de 10mL de hidróxido de bário 0,1M e 10mL de sulfato de zinco 5%. Após repouso por 20 minutos, o extrato foi filtrado para um balão volumétrico de 100mL completando o volume com metanol. Alíquotas de 1 mL do extrato fenólico, adicionadas de 4,5 mL de uma solução alcalina (Na_2CO_3 4%, CuSO_4 2% e $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4%; 100:1:1), foram incubadas por 15 minutos a 40°C. Após, foram adicionados 0,5mL de reagente Folin-Ciocalteu (Qell, Brasil, diluído 1:2) e deixado em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente, sendo a leitura da amostra realizada a 750nm. O teor de compostos fenólicos nas amostras foi estimado utilizando ácido ferúlico (Sigma, Japão) como padrão (2 a 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), e o incremento de seu conteúdo com a fermentação calculado de acordo com a Equação 3.3.

$$GF (\%) = \frac{(FF - FF_0)}{FF_0} \times 100 \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde: GF = ganho percentual de compostos fenólicos em base seca; FF = teor de compostos fenólicos no farelo fermentado; FF_0 = teor de compostos fenólicos no farelo não fermentado (tempo zero).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Estudo preliminar

A Tabela 3.2 apresenta a composição proximal do farelo de arroz fermentado e o conteúdo de biomassa fúngica ao longo de 120 h de fermentação.

Tabela 3.2 – Conteúdo de proteína, lipídios, fibras, cinzas, carboidratos e biomassa no farelo de arroz fermentado.

Amostra	Umidade (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lipídios (g/100g)	Fibras (g/100g)	Cinzas (g/100g)	Carboidratos (g/100g)	Biomassa (mg/g)
0 h	48,8 ± 0,5 ^{ab}	13,9 ± 0,5 ^b	16,6 ± 0,8 ^b	6,5 ± 0,4 ^d	11,6 ± 0,3 ^b	51,4 ± 1,8 ^a	0,0
24 h	49,6 ± 0,5 ^a	14,3 ± 1,8 ^b	16,5 ± 0,8 ^b	6,9 ± 0,2 ^d	12,4 ± 0,2 ^b	48,1 ± 1,5 ^{ab}	12,2 ± 1,1 ^e
48 h	48,3 ± 0,5 ^b	18,0 ± 1,6 ^a	18,3 ± 0,4 ^a	9,2 ± 0,2 ^c	17,0 ± 0,4 ^a	37,7 ± 2,8 ^e	61,9 ± 4,3 ^d
72 h	46,2 ± 0,5 ^c	18,1 ± 1,2 ^a	14,2 ± 0,4 ^c	10,4 ± 0,6 ^b	15,9 ± 1,1 ^a	40,8 ± 0,7 ^{de}	123,2 ± 1,0 ^c
96 h	45,4 ± 0,1 ^c	18,4 ± 1,0 ^a	11,1 ± 0,4 ^d	11,1 ± 0,4 ^{ab}	15,2 ± 1,5 ^a	43,9 ± 1,9 ^{cd}	154,9 ± 0,7 ^a
120 h	46,4 ± 0,1 ^c	18,7 ± 0,3 ^a	9,9 ± 0,1 ^d	11,9 ± 0,4 ^a	16,9 ± 0,9 ^a	42,8 ± 0,8 ^d	136,7 ± 1,5 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O elevado conteúdo de umidade apresentado pelo farelo fermentado se deve a adição de água ao meio, como condição pré-estabelecida para o processo fermentativo. A redução no conteúdo de lipídeos e carboidratos no farelo fermentado é decorrente da utilização destes componentes como fonte de carbono para geração de biomassa fúngica, sendo que o fungo consumiu cerca de 40% do conteúdo lipídico até 120 h de fermentação, enquanto o conteúdo de carboidratos consumido foi 27% até 48h, após houve um aumento ($p<0,05$) até 96 h de fermentação. Esse aumento no conteúdo de carboidratos no final da fermentação pode ser atribuído à produção de biomassa fúngica, assim como o aumento no conteúdo proteico, de fibras e cinzas. Esses resultados condizem com outros resultados relatados na literatura (OLIVEIRA et al., 2010; ODUGUWA et al., 2008; FEDDERN et al., 2007).

A bioconversão de materiais agroindustriais é uma potencial aplicação para produção de proteína (OLIVEIRA et al., 2010). Com 48 h de fermentação foi obtido um aumento de 30% no conteúdo proteico, não sendo observado um aumento significativo após este intervalo. O conteúdo de cinzas no farelo fermentado aumentou até 48 h, que conforme Oliveira et al. (2010) este pode em algumas espécies fúngicas variar de 1 a 29%.

Os aumentos nos conteúdos de fibras e de biomassa até 96 h de fermentação estão relacionados com a produção de quitina do *R. oryzae* (OLIVEIRA et al., 2010). Esta se constitui num polímero linear insolúvel, formado por ligações α -1,4 de acetilglicosamina, sendo o constituinte majoritário da parede celular dos fungos. A determinação do conteúdo de glicosamina se baseia na despolimerização da molécula de quitina, seguida por determinação espectrofotométrica do teor de glicosamina liberada (AIDOO et al., 1981). Cabe salientar, que o conteúdo de glicosamina aumenta em culturas velhas, principalmente por causa do aumento da parede celular (SPARRINGA e OWENS, 1999). Sendo assim, o fator de conversão entre glicosamina e biomassa varia com a idade para muitos fungos. No caso deste estudo, foi empregado um fator de conversão obtido a partir da regressão linear de diferentes concentrações celulares do fungo seco, obtidas em sistema *overculture* (IKASARI e MITCHELL, 2000), em um tempo correspondente ao final da fase exponencial de crescimento do micro-organismo (2 dias). Como foi verificado um aumento na biomassa até 96 h, este foi escolhido para seguir os próximos experimentos.

3.3.2 Caracterização do substrato

As frações de farelo de arroz obtidas pelo peneiramento foram classificadas em diferentes diâmetros médios de partícula, tendo sua composição proximal determinada (Tabela 3.3). Os resultados mostram que apenas o teor proteico não apresentava diferença ($p < 0,05$) entre as diferentes frações granulométricas. A fração contendo partículas menores ($\Phi_{\text{médio}}$ de 0,18 mm) apresentava teores de lipídeos e de fibras menores que as demais frações, ao passo que os teores de cinzas e carboidratos foram maiores. O maior conteúdo de lipídeos encontrado para as frações com partículas de maior diâmetro está associado ao tamanho das partículas de gérmen contidas no farelo que eram visivelmente maiores nestas. O mesmo ocorreu com o conteúdo de fibras, sendo observado um maior conteúdo de cascas nas frações com maior diâmetro.

O teor de cinzas embora tenha apresentado diferença ($p < 0,05$) entre as partículas de menor e maior diâmetro, não variou mais do que 1% nas amostras de farelo. O componente que mais variou nas frações granulométricas de farelo de arroz foram os carboidratos, associados com a diferença encontrada nos teores de fibras e lipídeos, estes estão contidos em maior proporção na fração de menor diâmetro devido ao processo de polimento do grão gerar pequenas partículas oriundas do endosperma amiláceo (UNITED NATIONS PUBLICATION, 1985; AMATO e ELIAS, 2005).

A umidade média de todas as frações foi em torno de 11%. Os valores encontrados estão próximos daqueles relatados pela literatura (OLIVEIRA et al., 2010; POGAKU et al., 2009; FEDDERN et al., 2007; DAL MORO et al., 2004).

Tabela 3.3 - Composição proximal das diferentes frações do farelo de arroz integral em base seca.

Componente (g/100g)	Fração (mm)		
	0,18	0,28	0,39
Proteínas	13,2 ± 0,5 ^a	13,7 ± 1,2 ^a	13,2 ± 0,3 ^a
Lipídeos	18,2 ± 0,7 ^b	19,8 ± 0,5 ^a	21,1 ± 0,4 ^a
Fibras	4,5 ± 0,1 ^b	8,3 ± 0,7 ^a	8,4 ± 0,4 ^a
Cinzas	12,0 ± 0,1 ^a	11,8 ± 0,2 ^a	11,1 ± 0,2 ^b
Carboidratos	52,1 ± 1,1 ^a	46,5 ± 1,8 ^b	46,1 ± 0,7 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A porcentagem de farelo retido em cada malha utilizada na classificação está na Tabela 3.4. As partículas de diâmetro médio de 0,28 mm são as que correspondem à maior fração do farelo de arroz (26,8%), não apresentando diferença ($p < 0,05$) da fração retida na malha de 100 (23,8%). A fração de diâmetro médio de 0,39 mm foi a de menor porcentagem. Estes três frações foram utilizadas separadamente como substrato na fermentação em estado sólido para avaliar o efeito do tamanho da partícula no processo fermentativo.

A fração retida na peneira de malha 35 foi descartada, devido à presença de pedaços de grãos inteiros e casca de arroz. As partículas menores que 0,18 mm não foram utilizadas no processo fermentativo em razão dos níveis estabelecidos no planejamento, além disso, poderiam dificultar o desenvolvimento microbiano pela compactação do meio, o que não impede que possam vir a serem utilizadas como substrato em outros estudos.

Tabela 3.4 – Características físicas de diferentes frações de farelo de arroz.

Granulometria			
malha retida (ty)	abertura livre (mm)	$\Phi_{\text{médio}}$ (mm)	% de farelo*
35	0,425	> 0,42	$18,1 \pm 0,6^b$
42	0,355	0,39	$12,3 \pm 1,7^c$
65	0,212	0,28	$26,8 \pm 1,5^a$
100	0,150	0,18	$23,8 \pm 1,3^a$
Fundo	-	<0,15	$18,6 \pm 2,0^b$
Análise de BET			
$\Phi_{\text{médio}}$ (mm)	área superficial específica (m^2/g)	volume de poros (cm^3/g)	diâmetro dos poros (Å)
0,18	2,0	$2,9 \times 10^{-3}$	58,3
0,28	1,5	$2,6 \times 10^{-3}$	67,5
0,39	4,1	$5,5 \times 10^{-3}$	54,0

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). BET = resultados da análise das isotermas pelo método de Brunauer-Emmett-Teller.

Com relação às características físicas do farelo de arroz, partículas de maior diâmetro apresentaram área superficial cerca de duas vezes maior que as demais frações (Tabela 3.4), o que justificou o maior volume de poros apresentada por estas

partículas ($5,5 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$). Porém, o diâmetro dos poros destas partículas foi menor que o diâmetro de poros das partículas de 0,18 e 0,28 mm. De acordo com a classificação relatada por Teixeira et al. (2001), os poros das partículas de farelo de arroz se encontram na região de mesoporos ($20 \text{ \AA} < \Phi < 500 \text{ \AA}$), com uma tendência a microporos ($\Phi < 20 \text{ \AA}$).

A análise de microscopia (Figura 3.1) mostrou as irregularidades superficiais das partículas. Nas figuras 3.1a e 3.1b, pode ser verificado que as partículas apresentaram um formato quase que planar, com pouca esfericidade. De acordo com a Tabela 3.4, partículas de maior diâmetro médio, apresentaram uma diferença superficial mais acentuada com relação às demais frações, o que pode ser verificado nas Figuras 3.1c e 3.1d, onde se nota que partículas de diâmetro médio de 0,39 mm, apresentaram superfície mais irregular do que partículas de diâmetro médio de 0,28 mm, ocasionando a maior área superficial apresentada por estas partículas, sendo que as partículas e suas características dependem do processo de obtenção do farelo de arroz.

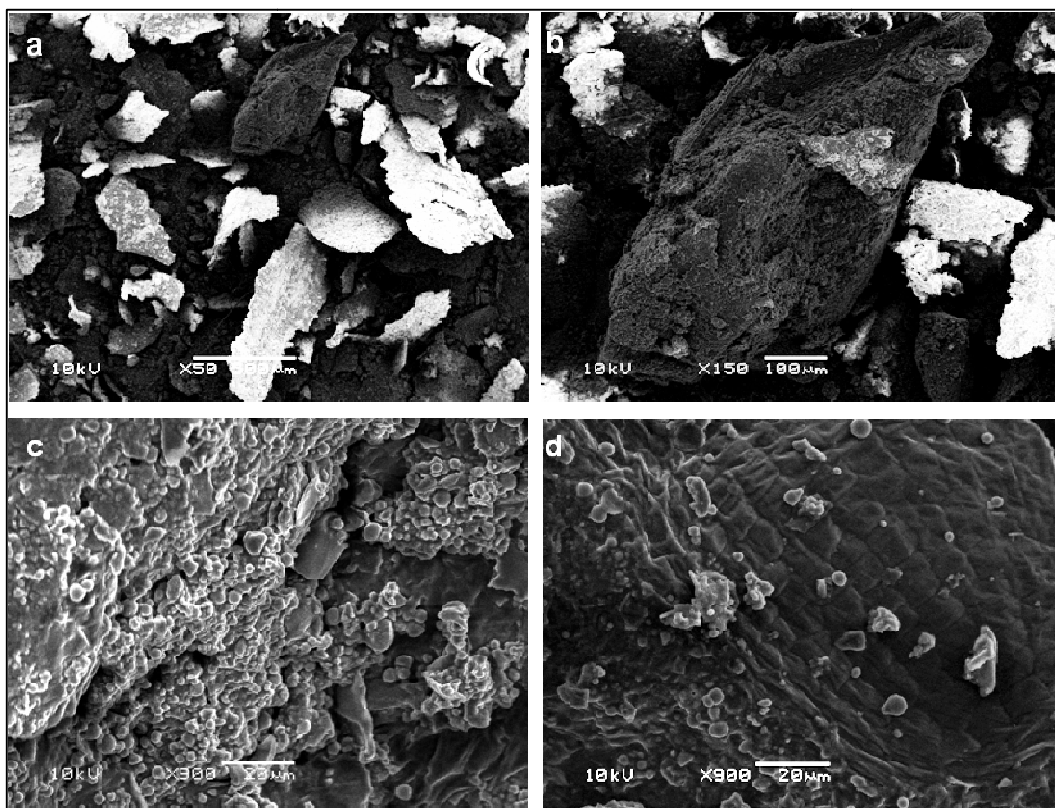


Figura 3.1 - Microscopia das partículas de farelo de arroz. (a) partículas de $\Phi_{\text{médio}}$ de 0,39. (b) partícula inteira de $\Phi_{\text{médio}}$ de 0,39. (c) superfície da partícula de $\Phi_{\text{médio}}$ de 0,39. (d) superfície da partícula de $\Phi_{\text{médio}}$ de 0,28.

3.3.3 Delineamento experimental

A produção de biomassa e o aumento no conteúdo de proteínas e compostos fenólicos após o processo fermentativo, nas diferentes condições estudadas, estão contidos na Tabela 3.5. A maior produção de biomassa foi obtida nos ensaios realizados nos pontos centrais do planejamento (189 mg/g). O maior incremento no conteúdo proteico (53,4%) foi obtido no terceiro ensaio do planejamento, utilizando partículas de menores tamanhos e a mais elevada concentração de sulfato de amônio. Para o maior conteúdo fenólico (65,1%) as condições ideais foram às mesmas obtidas para o maior conteúdo proteico.

Tabela 3.5 – Produção de biomassa, ganho de proteína e conteúdo fenólico.

ensaio	$\Phi_{\text{médio}}$ (mm)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ g/L	Biomassa (mg/g)	GP (%)	GCF (%)
1	0,18 (-1)	2 (-1)	122,2 ± 5,4	46,0 ± 5,4	51,8 ± 0,8
2	0,39 (+1)	2 (-1)	151,1 ± 10,1	34,9 ± 4,8	19,9 ± 1,5
3	0,18 (-1)	8 (-1)	147,2 ± 10,7	53,4 ± 5,8	65,1 ± 4,5
4	0,39 (-1)	8 (-1)	150,8 ± 10,4	35,7 ± 3,2	25,5 ± 2,3
5	0,28 (0)	5 (0)	189,0 ± 9,0	32,9 ± 4,9	25,3 ± 3,6
6	0,28 (0)	5 (0)	188,0 ± 13,6	35,0 ± 4,9	29,0 ± 2,7
7	0,28 (0)	5 (0)	185,4 ± 6,5	35,6 ± 0,9	25,6 ± 2,6

Onde: $\Phi_{\text{médio}}$ = diâmetro médio; GP = ganho de proteínas; GCF = ganho de compostos fenólicos.

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Pode-se constatar que o tamanho da partícula do substrato foi o parâmetro que mais influenciou na fermentação do farelo de arroz com o microrganismo *Rhizopus oryzae* (Figura 3.2). Tanto para a produção de biomassa, quanto para o ganho de proteína e de compostos fenólicos, esta variável apresentou um efeito significativo.

Quanto a concentração de sulfato de amônio, a literatura relata (RUDRAVARAM et al. 2006, WANG et al. 2005, DURU e UMA 2003) que fontes exógenas de nitrogênio aumentam consideravelmente a quantidade de biomassa e proteína. Neste estudo, foi verificado um efeito significativo da concentração de sulfato de amônio sobre a produção de biomassa e ganho de compostos fenólicos, não afetando significativamente a produção de proteína na biomassa fermentada.

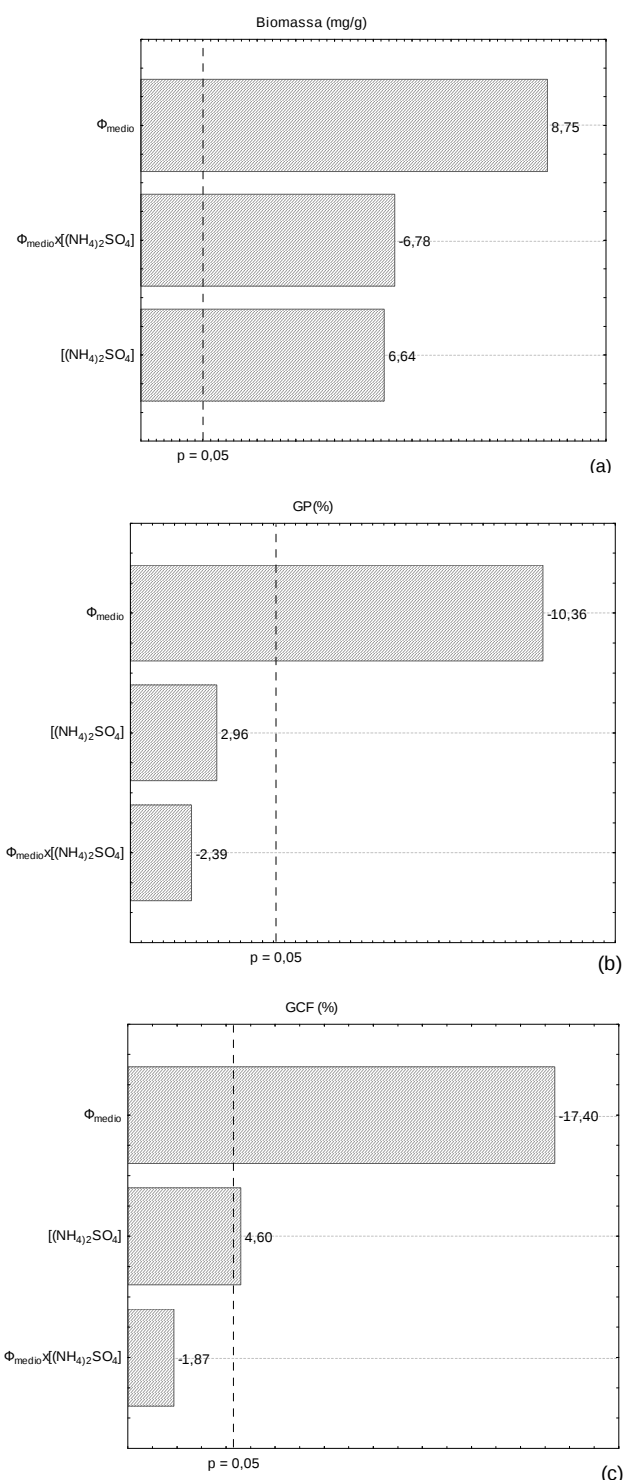


Figura 3.2 - Gráfico de Pareto mostrando o efeito do tamanho da partícula e da concentração de sulfato de amônio na biomassa fúngica (a), no ganho de proteínas (b) e no conteúdo de compostos fenólicos (c).

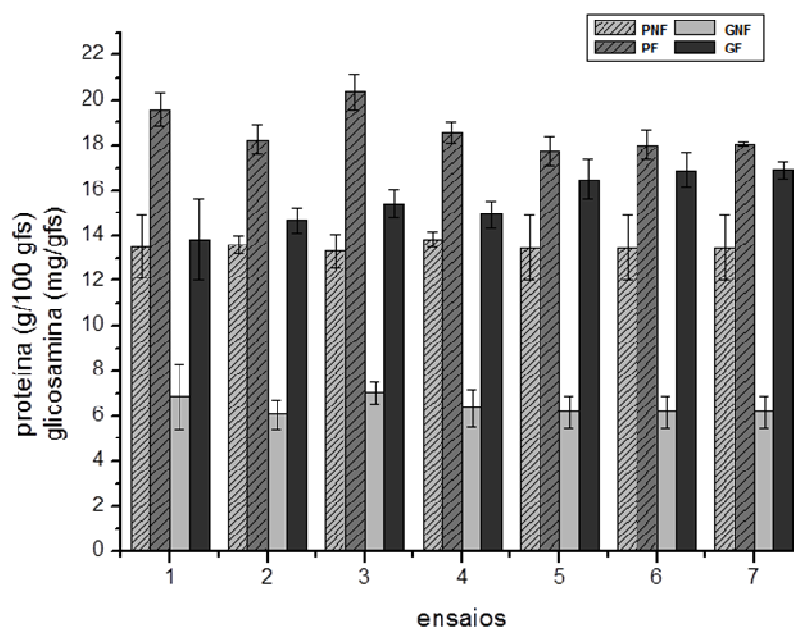
3.3.4 Produção de biomassa

A utilização de partículas maiores na fermentação acarretou em um efeito positivo na produção de biomassa (Figura 3.2a). De acordo com a literatura científica (MEMBRILLO et al., 2011; MEMBRILLO et al., 2008; VARELA et al., 2005) o tamanho das partículas do substrato pode proporcionar dois tipos de efeitos opostos na fermentação em estado sólido. Substratos com menor tamanho de partículas fornecem uma maior área de contato entre o fungo e o substrato, favorecendo seu crescimento. Porém partículas muito pequenas são mais susceptíveis à compactação e formação de aglomerados, acarretando na diminuição da transferência de oxigênio no meio fermentativo, afetando a respiração e o desenvolvimento fúngico. Verificou-se que as partículas maiores apresentavam maior porosidade (Tabela 3.4), no entanto, em contrapartida ao relatado pelos demais pesquisadores, as partículas de maior diâmetro médio apresentaram também maior área superficial. Característica física dessas partículas justificada pelo maior volume de poros de menor diâmetro. Embora as partículas de diâmetro médio de 0,39 mm apresentassem maior área superficial e maior volume de poros, o diâmetro desses poros, não eram superiores a 70 Å (7 nm), enquanto que o diâmetro das hifas de *Rizhopus* geralmente é maior que 10 µm (ALEXOPOULOS et al., 1996). Portanto, a área de contato do fungo com a partícula seria preferencialmente a área externa.

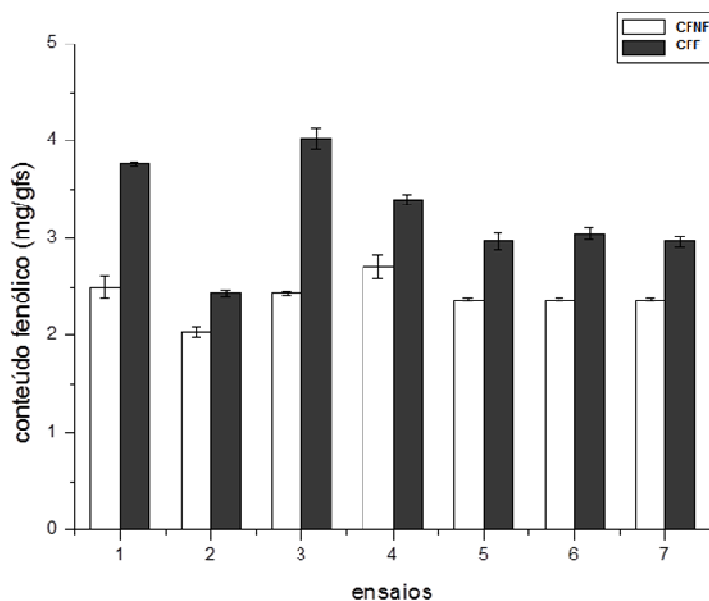
A maior porosidade das partículas acabou beneficiando a aeração no meio fermentativo, uma vez que o substrato necessita de uma granulometria que permita a circulação de ar através do leito fermentativo e a dissipação de gases e calor produzidos durante o crescimento microbiano (VENDRUSCOLO et al., 2009). Durante o crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos, é geralmente aceito que existe uma limitação no fornecimento de oxigênio para as células que estão em íntimo contato com o substrato, que é fundamental para a utilização do mesmo. Por exemplo, no caso do fungo *A. oryzae*, o oxigênio é principalmente (70%) absorvido pela hifa aérea (ASHA-AUGUSTINE et al., 2006). Além disso, ocorre uma falta de fornecimento de oxigênio para as hifas de penetração durante o crescimento do fungo sobre um substrato sólido, o que acaba afetando o conteúdo de biomassa final obtido.

Uma influência significativa na produção de biomassa (Figura 3.2a) foi constatada pelo aumento da concentração de sulfato de amônio que foi adicionada no meio fermentativo, verificada pelo aumento no teor de glicosamina nos produtos fermentados (Figura 3.3a). Anupama e Ravindra (2001) fermentando farelo de arroz desengordurado com *Aspergillus niger*, também verificaram que a adição de uma fonte

suplementar de nitrogênio proporcionava um maior rendimento em biomassa, pois o íon amônio supria o nitrogênio.



(a)



(b)

Figura 3.3 - Teores de glicosamina, proteínas (a) e compostos fenólicos (b) nos diferentes ensaios de farelo de arroz fermentado e não fermentado. Onde: PNF = teor de proteína no farelo não fermentado; PF = teor de proteína no farelo fermentado; GNF = teor de glicosamina no farelo não fermentado; GF = teor de glicosamina no farelo não fermentado; FNF = teor de fenóis no farelo não fermentado; FF = teor de fenóis no farelo não fermentado; gfs = grama de farelo seco.

Através da Figura 3.3a, pode-se observar que o maior teor de glicosamina de 16,9 mg/g_{farelo seco} foi obtido utilizando partículas de diâmetro médio de 0,28 mm e uma concentração de sulfato de amônio na solução nutriente de 5 g/L.

3.3.5 Enriquecimento proteico

Varias espécies fúngicas vêm sendo estudadas visando à produção de proteína unicelular em uma variedade de substratos (ODUGUWA et al, 2008). Um aumento significativo no conteúdo proteico foi verificado quando se utilizou partículas menores de farelo de arroz. Neste caso, o aumento no $\Phi_{\text{médio}}$ das partículas ocasionou um efeito negativo no ganho de proteína (Figura 3.2b). Efeito este contrário a aquele verificado na produção de biomassa. Resultados semelhantes foram relatados por Membrillo et al. (2011), onde constataram que as características físicas das fibras de bagaço de cana de açúcar, utilizada como substrato, influenciavam fortemente na fermentação em estado sólido, verificando que o conteúdo de proteína e biomassa, não era em todos os momentos proporcionalmente relacionados. Varela et al. (2005) investigaram o efeito de diferentes frações de farelo de trigo na fermentação em estado sólido com o fungo *Aspergillus flavipes* para a produção de lovastatina e também verificaram que partículas menores apresentavam melhores resultados. Membrillo et al. (2008) também encontraram um enriquecimento proteico mais acentuado na fermentação de bagaço de cana com *Pleurotus ostreatus* em partículas de menor tamanho.

Pode-se observar um aumento significativo de proteínas em todos os ensaios realizados no experimento (Figura 3.3a), sendo que no ensaio 3 foi o maior (20,4 g/100g). O aumento no teor de proteína do farelo de arroz fermentado foi devido a biomassa celular formada durante a fermentação. Resultados estes superiores aos encontrados por Pogaku et al. (2009), que estudando diferentes cepas fúngicas (*A. oryzae*, *T. viride* e *A. niger*) e utilizando farelo de arroz desengordurado como substrato na fermentação em estado sólido. Eles verificaram após incubação completa dos microrganismos sob diferentes condições de cultivo, um aumento no teor proteína bruta máximo de 13,2%.

Com relação ao efeito da concentração de sulfato de amônio ao meio fermentativo, Rudravaram et al. (2006) verificaram que o sulfato de amônio foi a melhor entre as fontes de nitrogênio inorgânico testadas por eles, visando enriquecimento protéico. Ressaltaram que sais de amônio influenciaram consideravelmente no enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado,

ajudando na conversão de nitrogênio inorgânico em orgânico. No entanto, a variação na concentração de sulfato de amônio, bem como sua interação com o tamanho da partícula, não influenciaram no aumento de proteína neste estudo (Figura 3.2b), indicando que o substrato utilizado supria o nitrogênio necessário para a produção de proteína fúngica.

O comportamento relatado pelos diferentes pesquisadores e o deste experimento indicam que a classificação do substrato, de acordo com o tamanho de partículas, poderia ser utilizado como critério visando o enriquecimento proteico por ação fúngica, sem que se faça necessário o emprego de outras fontes de nitrogênio que além do custo de processo afetariam a recuperação das proteínas.

3.3.6 Conteúdo fenólico

O conteúdo de compostos fenólicos aumentou com a fermentação. Assim como, o conteúdo proteico e a produção de biomassa, o teor de compostos fenólicos também foi fortemente influenciado pelo tamanho das partículas do substrato. A concentração de sulfato de amônio no meio fermentativo, também apresentou uma influência significativa no conteúdo de compostos fenólicos ao final da fermentação (Figura 3.2c).

Grãos de arroz integral são compostos por endosperma amiláceo, gérmen e farelo (incluindo aleurona). O farelo de arroz é uma rica fonte de fibras, vitaminas, minerais e fitoquímicos. Os fitoquímicos existem principalmente como glicosídeos ligados a moléculas de açúcar ou como vários outros complexos ligados a ácidos orgânicos, aminas, lipídios, carboidratos, fenóis e outros. Estes estão comumente presentes na forma ligada e normalmente são os componentes de estruturas complexas, tais como ligninas e taninos hidrolisáveis, e ligadas à parede celular de componentes estruturais, como celulose, lignina e proteínas através de ligações éster (ZHANG et al., 2010).

Os compostos fenólicos do arroz incluem derivados de ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos, principalmente o ácido ferúlico e diferulatos. Os mais solúveis encontram-se compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares, e estão na forma livre ou conjugada, enquanto os fenólicos insolúveis encontram-se ligados a estruturas da parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécticos ou hemicelulósicos (MIRA et al., 2009; MIRA et al., 2008; ADOM e LIU, 2002). Dados para o arroz e seus derivados são limitados, mas sugerem que os fenóis predominantes são os ácidos fenólicos, principalmente ferúlico e os

ácidos p-cumárico. Sendo que as concentrações de ácidos fenólicos aumentam do endosperma para aleurona (ZHOU et al., 2004).

O farelo de arroz não fermentado apresentou em média 2,4 mg ác. felúrico/g. Valores semelhantes foram encontrados por Butsat e Siriamornpun (2010), que obtiveram teores de fenóis totais que variaram de 2,5 – 2,7 mg. A concentração de compostos fenólicos em arroz está fortemente relacionada com a cor do farelo, cultivares de arroz que fornecem farelo vermelho e roxo apresentam concentrações até 20 vezes maiores em comparação com farelo branco ou castanho-claro (GOFFMAN e BERGMAN, 2004).

A FES tem sido utilizada para aumentar o teor de compostos fenólicos em certos produtos alimentares, reforçando assim a sua atividade antioxidante (MARTINS et al. 2011). Nesse sentido, diferentes resíduos agroindustriais vêm sendo utilizados como substratos sólidos na FES para a produção de diferentes compostos fenólicos bioativos. Após a fermentação, o conteúdo de compostos fenólicos chegou a 4 mg/g farelo (Figura 3.3b), um aumento elevado, em torno de 65%. Os compostos fenólicos contidos na parede celular do farelo de arroz estão extensivamente ligados a carboidratos e a lignina. Há duas possibilidades para a formação de compostos fenólicos; a partir da decomposição das ligações entre a lignina, celulose e hemicelulose ou partir do óleo do farelo de arroz (POURALI et al., 2010) que possui compostos antioxidantes, como o oryzanol (BEMVENUTI et al., 2012).

Tanto para os compostos fenólicos como para o ganho de proteína, o aumento no tamanho das partículas apresentou um efeito negativo, enquanto que para a produção de biomassa o efeito foi positivo. Como discutido anteriormente, a produção de biomassa está associada principalmente com as características físicas das partículas, como área superficial e porosidade, enquanto que os ganhos percentuais de proteína e compostos fenólicos estão fortemente associados com disponibilização dos nutrientes das partículas de substrato. Partículas de menor diâmetro apresentavam um menor conteúdo lipídico e maior conteúdo de carboidratos, o que poderia ter favorecido a produção de proteína e a liberação de compostos fenólicos.

Outro aspecto que pode ter influenciado os resultados foi que o tamanho das partículas de diâmetro médio de 0,18 e 0,28 mm apresentou características físicas similares, enquanto que as partículas de maior diâmetro apresentavam características bem distintas das demais partículas (Tabela 3.4). Embora o aumento no tamanho das partículas tenha apresentado um efeito positivo na produção de biomassa, foi com partículas de diâmetro intermediário que se obteve os maiores valores de biomassa

(Tabela 3.5). Indicando que as partículas de menores diâmetros favoreceram a disponibilização dos nutrientes necessários para o processo fermentativo.

Tradicionalmente, a maior parte da produção do farelo de arroz é destinada para a produção de fertilizantes, alimentação de animais e para a indústria cosmética, porém várias pesquisas têm sido conduzidas para melhor avaliação de seu potencial para a alimentação humana (FURLONG et al., 2007; SILVEIRA e FURLONG, 2007; SOTOKUBA, 2001). A classificação do farelo de arroz em diferentes tamanhos de partículas possibilita direcionar distintas frações granulométricas para diversas finalidades, segundo o produto que se deseja obter. Neste estudo as partículas de menor diâmetro possibilitaram maiores teores de proteína e de composto fenólicos após a fermentação, que poderiam vir a ser utilizados diretamente na formulação de produtos alimentícios tais como concentrados ou isolados proteicos (MEMBRILLO et al., 2011; ODUGUWA et al., 2008), ou na elaboração de novos produtos, como filmes e películas comestíveis. Sendo que neste último caso, poderiam vir a ser utilizados tanto a proteína como formadora da matriz do revestimento, e também os compostos fenólicos que possuem capacidade antifúngica e antioxidante (SOUZA et al., 2010b; BUTSAT E SIRIAMORN PUN, 2010) que poderiam vir a retardar reações de escurecimento e prolongar a vida útil de tecidos vegetais minimamente processados.

3.4. CONCLUSÃO

A fermentação em estado sólido com o fungo *Rhizopus oryzae* acarretou em um aumento nos conteúdos de proteína, fibras e cinzas, enquanto que os de lipídeos e carboidratos diminuíram. O tamanho das partículas de farelo de arroz influenciou fortemente o processo fermentativo, sendo que partículas menores favoreceram a produção de proteína e de compostos fenólicos, enquanto partículas de maiores diâmetros favoreceram a produção de biomassa fúngica. A elevação da concentração de sulfato de amônio ao meio fermentativo influenciou principalmente a produção de biomassa. Indicando que o uso de coprodutos agroindustriais como matéria-prima para a produção de compostos torna-se interessante devido à possibilidade do melhor aproveitamento do potencial dos mesmos, formulação de novos produtos alimentícios que contribuam para o melhor aproveitamento da produção agrícola.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS FENÓLICOS DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO COM *Rhizopus oryzae*

Neste capítulo foi estudado o efeito da fermentação em estado sólido com o fungo *Rhizopus oryzae* no conteúdo de ácidos fenólicos da biomassa fermentada, bem como a capacidade antioxidante destes.

4.1 INTRODUÇÃO

Durante a fermentação em meio sólido (FES) o micro-organismo se desenvolve sobre ou dentro das partículas de uma matriz sólida, onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que assegura o seu crescimento e metabolismo (DEL BIANCHI et al., 2001). A FES é uma técnica simples para produção de compostos bioativos, economicamente viável por empregar resíduos agroindustriais e que também propicia a redução do impacto ambiental do descarte destes (SCHMIDT e FURLONG, 2012; OLIVEIRA et al., 2010). A FES também é utilizada como uma forma de disponibilizar um maior conteúdo de compostos fenólicos a partir de resíduos agroindustriais (MARTINS et al., 2011).

O arroz (*Oryza sativa*), um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo (ZHANG et al., 2010; MIRA et al., 2008) é uma fonte rica em compostos bioativos, incluindo muitos antioxidantes fenólicos, que podem reduzir o risco de doenças, aplicáveis na indústria de alimentos, no mercado de saúde e cosméticos (BUTSAT e SIRIAMORN PUN, 2010; POURALI, 2010). Os ácidos fenólicos constituem uma importante classe, que pode ser dividida em dois subgrupos de acordo com a sua estrutura, ácidos derivados do hidroxibenzóico, como os ácidos gálico, protocatecóico e sirínico, e derivados do hidroxicinâmico, tais como os ácidos, caféico, ferúlico, cumárico e clorogênico (MARTINS et al., 2011; ROBBINS 2003). São encontrados em plantas como mecanismos de defesa e outras funções biológicas, incluindo a quelação de metais, sequestro de algumas espécies de oxigênio ativo e atividade antioxidante (NARA et al., 2006).

Um dos principais subprodutos do beneficiamento do arroz é o farelo integral. Este possui 11 a 13% de proteína, aproximadamente 11% de fibras e 20% do seu peso em óleo, contem também compostos funcionais e antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2011; FEDDERN et al., 2007). Tradicionalmente, a maior parte da produção do farelo de arroz era destinada para a produção de fertilizantes, alimentação de animais e para a indústria cosmética, porém várias pesquisas têm sido conduzidas para melhor avaliação de seu potencial para a alimentação humana (FURLONG et al., 2007; SILVEIRA e FURLONG, 2007), incluindo o desenvolvimento de processos de cultivo microbiano para a produção de metabólitos com atividade biológica (MEMBRILLO et al., 2011).

Dentre os principais microrganismos conhecidos pela capacidade de produzir enzimas que degradam a parede celular de plantas, os fungos compreendem o grupo

mais interessante (HEGDE et al., 2006). O gênero *Rhizopus* é um dos mais promissores para este processo, pois ficou demonstrado que além da capacidade de aumentar o teor proteico de matérias-primas de baixo valor nutritivo, as proteínas possuem atividade funcional e atividade catalítica específicas. Além disso, os fungos deste gênero são bastante indicados por não produzirem substâncias tóxicas (OLIVEIRA et al. 2010; ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

Os compostos fenólicos oriundos da fermentação do farelo de arroz com o fungo *Rhizopus oryzae* possuem atividade antioxidante manifestada pela inibição da formação e propagação de radicais livres formados química ou enzimaticamente (SOUZA et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2007). Neste trabalho foi estudado o perfil dos ácidos fenólicos oriundos da fermentação em estado sólido do farelo de arroz com o fungo *Rhizopus oryzae*, bem como avaliada a capacidade antioxidante de extratos contendo esses compostos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Fermentação do farelo de arroz

4.2.1.1 Preparo do Inoculo

A cepa do agente fermentador, o fungo *Rhizopus oryzae* (CCT 1217), foi obtida da Fundação André Tosello (FAT), Campinas, Brasil. As culturas foram mantidas a 4°C em tubos inclinados contendo meio agar dextrose de batata (PDA, Acumedia), sendo os esporos propagados através da adição de 5 mL de uma emulsão aquosa de Tween 80 (0,2%). Os mesmos foram incubados durante 7 dias a 30°C até nova e completa esporulação do fungo pela adição de 0,2 mL da emulsão em placas de Petri contendo ágar batata-dextrose. A suspensão de esporos foi obtida pela adição de 10 mL de emulsão aquosa de Tween 80 (0,2%) em cada placa e raspagem delas com auxílio de uma alça de Drigalski, sendo a concentração da solução de esporos estimada por enumeração em Câmara de Neubauer (L. Opitk, Alemanha).

4.2.1.2 Processo Fermentativo

O farelo de arroz integral utilizado como substrato no processo fermentativo foi obtido das empresas da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, tendo sua granulometria padronizada para partículas menores que 32 mesh. Cada 100 g foram acondicionadas em biorreatores de bandeja (12 x 8 x 4cm), dispostas em camadas de

2 cm, cobertas com gaze e algodão esterilizados para permitir a aeração e evitar a contaminação externa. Aos biorreatores foram adicionados 45 mL de uma solução nutriente (2g/L de KH_2PO_4 , 1g/L de MgSO_4 e 8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em HCl 0,4N) e a solução de esporos do fungo *Rhizopus oryzae* na concentração inicial de 4×10^6 esporos/g de farelo (OLIVEIRA et al. 2010). Água destilada esterilizada foi adicionada ao meio para ajustar a umidade em 50%. Os biorreatores foram colocados em câmara de fermentação a 30°C com umidade controlada. Depois de transcorrido o tempo de incubação (0 - 120 h, com amostragens em cada 24 h), a biomassa fermentada foi acondicionada a -18 °C.

4.2.2 Determinação da biomassa

A biomassa gerada durante o processo fermentativo foi estimada indiretamente pela determinação espectrofotométrica do teor de glicosamina a 530 nm (AIDOO et al., 1981), utilizando uma curva padrão de glicosamina (Sigma, USA) em água (1 – 15 mg/mL). Os níveis iniciais de glicosamina no farelo de arroz foram descontados da biomassa fermentada, sendo os resultados expressos como mg de glicosamina/g de farelo em base seca.

4.2.3 Extração dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos dos farelos de arroz fermentados (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h) foram extraídos com metanol na proporção 1:10 (p/v), segundo método descrito por Souza et al. (2010b). Alíquotas de 5 g foram submetidas à agitação orbital (150 rpm) durante 3 h com metanol e filtrada para obtenção do extrato bruto que foi submetido a uma partição com 10 mL hexano (3 vezes). O solvente extrator foi evaporado em um rota-evaporador a 50 °C sob pressão reduzida e os compostos fenólicos foram ressuspensos com 10 mL de água destilada em banho ultrassônico por 10 min. O extrato resultante foi clarificado com 5 mL de ZnSO_4 0,1M e 5 mL Ba(OH)_2 0,1M, permanecendo em repouso por 20 min. Após centrifugação (3200 g, 10 min, 25 °C) o sobrenadante contendo os compostos fenólicos foi recolhido, liofilizado e quantificado espectrofotometricamente a 750 nm com reagente de Folin-Ciocalteu (Qell, Brasil) utilizando uma curva padrão de ácido felúrico (Sigma, Japão).

4.2.4 Separação e identificação dos ácidos fenólicos

Uma alíquota de 20 µL de amostra dos extratos de farelos de arroz (diluídos em água:metanol, 1:1) foram injetadas em um cromatógrafo (Shimadzu, Tokyo, Japan, CLASS-M10A), em fluxo de 0,7 mL/minutos, a temperatura de 35 °C. A separação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) e um gradiente isocrático de solventes constituído por metanol e água acidificada (ácido acético 1%) na relação 20:80 v/v, durante 25 min, usando detecção a 280 nm até 15 min e 320 nm até 25 min. Os ácidos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção com diversos padrões de ácidos fenólicos presentes em farelo de arroz (cafeíco, clorogênico, cumárico, felúrico, gálico, hidroxibenzóico, protocatecóico, siríngico, e vanilina, obtidos da Sigma-Aldrich USA), conforme descrito na literatura (POULARI et al., 2010; MIRA et al., 2008; ZHOU et al., 2004). O limite de detecção (LOD) foi calculado pela relação sinal ruído do branco (solução contendo os solventes utilizados na extração dos compostos fenólicos) de 3:1. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como sendo três vezes o valor do LOD (RIBANI et al., 2004).

4.2.5 Atividade antioxidante do extrato fenólico

A atividade antioxidante dos extratos fenólicos foi determinada de acordo com os métodos descritos por Rufino et al. (2009), Sanchez-Moreno et al. (1998) e Brand-Williams et al. (1995), medida pela redução de radicais livres 1,1-difenil-2-picrihidrazil (DPPH). O método se baseia na transferência de elétrons de uma substância antioxidante para um radical livre, o DPPH, que ao se reduzir perde a sua coloração púrpura, tornando-se amarelo. Foram testadas diferentes concentrações de soluções de ácido ascórbico (0,01 – 0,1 mg/mL) e ácido ferúlico (0,01 – 1 mg/mL), extratos de farelo de arroz fermentado (96 h) e não fermentado (0,01 – 0,5 mg/mL). Em ambiente escuro, foram adicionados 0,2 mL de amostra em 3,8 mL de DPPH (0,5 mM). O consumo de DPPH foi monitorado em espectrofotômetro a 515 nm até sua estabilização. A concentração de DPPH no meio foi calculada utilizando uma curva de calibração (0 – 0,16 mg/mL), determinada por regressão linear (Equação 4.1).

$$A_{515\text{ nm}} = 6,6953 * [DPPH] \quad (r = 0,999) \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde: [DPPH] = concentração de DPPH expressada em mg/mL.

A partir da equação da curva de calibração, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes para cada tempo e em cada concentração testada, conforme a Equação 4.2:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_t / [\text{DPPH}]_{\text{controle}} * 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

A porcentagem de DPPH_{REM} foi relacionada com o tempo de reação utilizando um modelo exponencial de primeira ordem, através do programa *Microcal Origin 6.0*, para estimar a porcentagem de DPPH_{REM} no estado estacionário para cada uma das concentrações testadas, sendo então a porcentagem de DPPH_{REM} no estado estacionário graficada contra a concentração das soluções para obter a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH (EC_{50}). O tempo necessário para alcançar o EC_{50} ($T_{\text{EC}50}$) foi obtido graficamente conforme proposto por Sanchez-Moreno *et al.* (1998). A eficiência anti-radical (EA) foi calculada de acordo com a equação 4.3.

$$EA = 1 / (EC_{50} * t_{EC50}) \quad \text{Equação 4.3}$$

4.2.6 Inibição enzimática dos extratos fenólicos

O efeito inibidor dos compostos fenólicos gerados pela fermentação foi avaliado sobre as enzimas responsáveis pelo escurecimento em tecidos vegetais, peroxidase e polifenoloxidase. O extrato enzimático foi obtido a partir de 20 g de batata (variedade Monalisa) com 100 mL de solução tampão pH 7 fosfato-citrato 0,1M. Após 2 min de trituração em blender, a mistura foi filtrada (em tecido de algodão) e centrifugada (15 min, 4 °C, 3200 g). O extrato enzimático bruto foi utilizado como fonte enzimática, sendo o teor de proteína solúvel estimado em mg de albumina (LOWRY *et al.*, 1951). A atividade da enzima peroxidase foi determinada utilizando 0,2 mL de extrato enzimático, 1 mL de H_2O_2 (30 mM), 2 mL de uma solução de guaiacol (5 mM), sendo o volume final do tubo completado para 4 mL com tampão pH 7 e a absorbância da reação lida a 470 nm após 10 min de reação a 30 °C. A atividade da enzima polifenoloxidase foi determinada utilizando 1 mL de extrato enzimático, 2 mL de uma solução de catecol (10 mM), 1 mL de tampão pH 7 e a absorbância da reação medida a 425 nm após 10 min de reação a 30 °C. O efeito inibidor dos compostos fenólicos do

farelo de arroz e do farelo de arroz fermentado (96 h) na atividade destas enzimas foi avaliado utilizando diferentes concentrações de inibidor. O pH final da reação foi mantido em 7 pela adição de uma solução de NaOH 0,1M.

O mecanismo de inibição dos compostos fenólicos sobre a enzima peroxidase também foi avaliada pelos parâmetros de K_m e $V_{máx}$. Diferentes concentrações do substrato (guaiacol) foram utilizadas na reação enzimática com a adição das soluções de extratos fenólicos. Os resultados foram analisados segundo o método gráfico de Lineweaver e Burk (1934) e utilizados para identificar o tipo de inibição.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Biomassa e conteúdo fenólico

Após 48 h de fermentação, não foi observado um aumento no conteúdo fenólico, enquanto que a biomassa fúngica aumentou até 96 h (Figura 4.1).

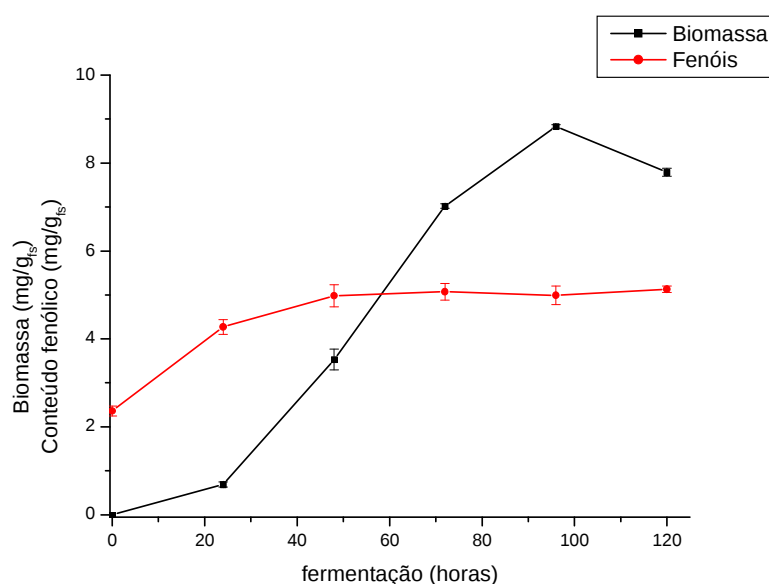


Figura 4.1- Biomassa e conteúdo de compostos fenólicos ao longo da fermentação do farelo de arroz.

A determinação do conteúdo de glicosamina, um constituinte da quitina, um polímero linear insolúvel, constituído por ligações α -1,4 de acetilglicosamina, é uma forma de estimar a multiplicação fúngica em FES (SCHMIDT e FURLONG, 2012;

SPARRINGA e OWENS, 1999). Em 96 h de fermentação foram obtidos 8,8 mg_{glicosamina}/g_{farelo seco}, sendo que o aumento na biomassa ao longo da fermentação comprova que o fungo *Rhizopus oryzae* é capaz de se multiplicar utilizando farelo de arroz como fonte de carbono.

Com relação à liberação de compostos fenólicos durante a FES, ocorreu um aumento acima de 100% no conteúdo de compostos fenólicos (Figura 4.1) comparado ao inicial. Os compostos fenólicos do arroz incluem derivados de ácidos benzóicos e hidroxicinâmicos, principalmente o ácido ferúlico e diferulatos, comumente presentes na forma ligada e compondo estruturas complexas, tais como ligninas e taninos hidrolisáveis, e ligadas à parede celular de componentes estruturais, como celulose, arabinose, galactose, pectina e proteínas através de ligações éster (ZHANG et al., 2010; MIRA et al., 2008). Os fenóis mais solúveis se encontram compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares, e estão na forma livre ou conjugada (MIRA et al., 2009; ADOM e LIU, 2002).

Durante a fermentação do farelo de arroz, o aumento no conteúdo de ácidos fenólicos é causado principalmente pela clivagem de compostos complexados com a lignina (SCHMIDT e FURLONG, 2012). Fungos filamentosos produzem uma gama de enzimas necessárias para quebrar a lignina, sendo que esses microrganismos possuem dois sistemas extracelulares, um que produz carbohidrolisases e outro sistema ligninolítico oxidativo que degrada os anéis fenil, aumentando o conteúdo fenólico livre (MARTINS et al., 2011; SÁNCHEZ, 2009).

4.3.2 Ácidos fenólicos do farelo de arroz fermentado

A Figura 4.2 mostra o cromatograma de separação do grupo de ácidos fenólicos que foram analisados usando um gradiente isocrático de eluição. A Tabela 4.1 apresenta os tempos de retenção para os padrões ácidos fenólicos. Foram obtidos elevados valores de coeficiente de determinação (acima de 0,99) e baixos valores de %RSD (abaixo de 4%) para as equações obtidas na faixa linear de trabalho.

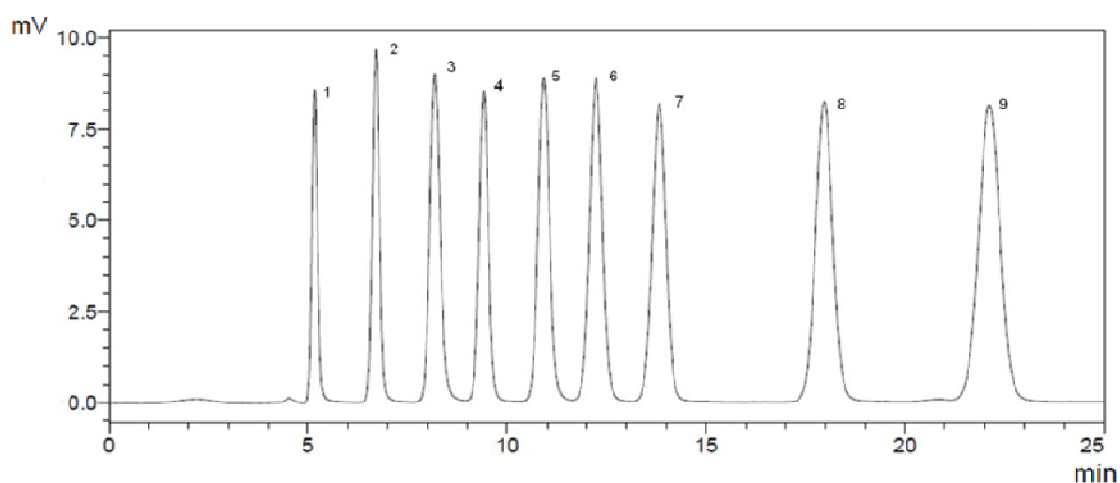


Figura 4.2 – Cromatograma de uma mistura de ácidos fenólicos. Onde: 1 - gálico, 2 - protocatecico, 3 – clorogênico, 4 - hidroxibenzóico, 5 - caféico, 6 - siringico, 7 - vanilina, 8 - cumárico e 9 - ferúlico.

Tabela 4.1 - Parâmetros de calibração dos ácidos fenólicos.

n	ácido fenólico	Tr (min)	Padrão de absorvidade	faixa linear (ug/mL)	%RSD	R ²	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
1	gálico	5,16	$y = (0,741 + 0,754) \times 10^5$	0,36 - 3,6	3,8	0,998	0,12	0,36
2	protocatecico	6,71	$y = (0,475 + 0,867) \times 10^5$	0,81 - 8,1	3,1	0,999	0,27	0,81
3	clorogênico	8,17	$y = (0,455 - 1,798) \times 10^5$	1,23 - 12,3	1,9	0,999	0,41	1,23
4	hidroxibenzóico	9,4	$y = (0,486 + 0,989) \times 10^5$	0,96 - 9,6	1,5	0,999	0,32	0,96
5	caféico	10,9	$y = (0,824 + 0,203) \times 10^5$	0,72 - 7,2	1,7	0,999	0,24	0,72
6	siringico	12,21	$y = (0,903 - 4,186) \times 10^5$	0,75 - 7,5	1,8	0,999	0,25	0,75
7	vanilina	13,8	$y = (1,265 - 2,199) \times 10^5$	0,54 - 5,4	1,7	0,999	0,18	0,54
8	cumárico	17,92	$y = (1,512 - 1,119) \times 10^5$	0,57 - 5,7	2,1	0,999	0,19	0,57
9	ferúlico	22,05	$y = (1,405 + 2,354) \times 10^5$	0,75 - 7,5	2,6	0,999	0,25	0,75

Onde: n = número correspondente ao ácido fenólico; Tr = tempo de retenção; RSD = desvio padrão relativo; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

Pode ser observado que houve uma variação no conteúdo dos ácidos fenólicos do farelo de arroz somente com o tratamento térmico (tempo zero), mas foi com a

fermentação que ocorreu uma grande mudança no conteúdo destes compostos (Tabela 4.2). Em anexo (Apêndice 3) constam os cromatogramas das amostras.

Tabela 4.2 - Conteúdo de ácidos fenólicos ao longo da fermentação (mg/g_{fs}).

n	FA	tempo de fermentação (h)					
		0	24	48	72	96	120
1	2,53 ± 0,77 ^c	n detec.	3,58 ± 0,30 ^c	76,36 ± 5,61 ^b	170,15 ± 24,15 ^a	166,91 ± 6,98 ^a	154,47 ± 6,04 ^a
2	7,74 ± 1,42 ^c	8,71 ± 1,20 ^{bc}	12,45 ± 1,92 ^{ab}	8,43 ± 0,72 ^{bc}	12,17 ± 1,79 ^{ab}	10,21 ± 2,74 ^{abc}	13,61 ± 0,41 ^a
3	20,98 ± 0,72 ^d	14,61 ± 0,49 ^d	4,85 ± 1,17 ^d	126,54 ± 12,55 ^a	137,37 ± 0,77 ^a	100,65 ± 10,37 ^b	76,10 ± 1,71 ^c
4	2,39 ± 0,41 ^c	6,15 ± 1,80 ^c	19,03 ± 1,88 ^b	30,31 ± 2,05 ^a	23,56 ± 0,34 ^b	29,19 ± 3,14 ^a	22,35 ± 2,62 ^b
5	4,80 ± 0,97 ^{bc}	1,63 ± 0,22 ^c	2,40 ± 0,20 ^c	11,16 ± 0,35 ^b	27,66 ± 1,48 ^a	27,00 ± 4,92 ^a	28,73 ± 5,06 ^a
6	2,13 ± 0,32 ^d	2,58 ± 0,58 ^d	7,56 ± 1,57 ^c	9,14 ± 0,02 ^{bc}	6,95 ± 0,03 ^c	10,83 ± 1,92 ^{ab}	12,70 ± 0,46 ^a
7	8,55 ± 0,38 ^d	20,27 ± 1,41 ^a	14,10 ± 0,08 ^b	22,01 ± 0,50 ^a	14,08 ± 0,35 ^b	10,31 ± 1,32 ^{cd}	13,06 ± 1,89 ^{bc}
8	14,88 ± 0,90 ^b	41,25 ± 4,97 ^a	40,46 ± 2,71 ^a	2,47 ± 0,63 ^c	5,49 ± 0,85 ^c	12,68 ± 1,10 ^b	14,05 ± 1,12 ^b
9	33,25 ± 2,32 ^{de}	16,83 ± 3,76 ^e	10,52 ± 2,84 ^e	68,42 ± 6,06 ^d	386,83 ± 2,44 ^c	602,62 ± 16,16 ^b	764,69 ± 32,04 ^a

Onde: n = número correspondente ao ácido fenólico, 1 - gálico, 2 - protocatecico, 3 - clorogênico, 4 - hidroxibenzóico, 5 - caféico, 6 - siríngico, 7 - vanilina, 8 - cumárico e 9 - ferúlico; FA = farelo de arroz. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Valores na mesma linha com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O ácido cumárico foi o único que não apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) em seu conteúdo com a fermentação, pois seus níveis permaneceram praticamente constantes até 24 h e foi sendo reduzido até 72 h, possivelmente devido a processos oxidativos do metabolismo fúngico. Ryan et al. (2011) também observaram uma redução no conteúdo do ácido cumárico após fermentação de farelo de arroz com *S. boulardii*.

Os ácidos clorogênico, hidroxibenzóico e vanilina apresentaram aumento em seu conteúdo ao longo da fermentação. O ácido protocatecico não apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) após 24 h, enquanto gálico e caféico aumentaram até 72h, e os ácidos siríngico e ferúlico aumentaram seu conteúdo até 120 h de fermentação. Os conteúdos dos ácidos gálico e ferúlico aumentaram cerca de 60 e 20 vezes, respectivamente, em relação aos conteúdos do farelo de arroz não fermentado. As alterações produzidas pelo desenvolvimento microbiano no perfil de ácidos fenólicos dependem do tipo de substrato, do fungo utilizado e das condições de processo fermentativo (SCHMIDT e FURLONG, 2012; MARTINS et al., 2011).

Resíduos agroindustriais de cereais e vegetais, como farelo, bagaço, palha, sabugo, entre outros, são materiais lignocelulósicos compostos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. A fração de lignina nestes materiais contém numerosos componentes fenólicos, principalmente ácidos ferúlico, cumárico, siríngico

e hidroxibenzóico, os quais também podem ser recuperados pela FES. Como fungos crescem sobre esses resíduos, estes utilizam os polissacarídeos após degradação da lignina, a fim de crescer e se reproduzir (MARTINS et al., 2011; SÁNCHEZ, 2009).

A ação de enzimas, tais como, amilases, lactases, glicosidases, hidrolases, entre outras, desempenham um papel importante na mobilização de compostos fenólicos durante FES (MARTINS et al., 2011; CHO et al., 2009). A enzima β -glucosidase catalisa a hidrólise de ligações alquil e aril β -D-glicosídicas, bem como glicosídeos contendo apenas resíduos de hidratos de carbono. Esta enzima tem sido descrita como sendo capaz de hidrolisar glicosídeos fenólicos para liberar ácidos fenólicos livres (VATTEM e SHETTY, 2003).

O ácido ferúlico foi o composto fenólico que teve seu conteúdo mais aumentado (acima de 700 mg/g) durante a produção da biomassa fermentada (Tabela 4.2). A liberação de ácido ferúlico de resíduos agrícolas através de métodos enzimáticos tem sido cada vez mais pesquisada, especialmente utilizando fungos como fonte de enzimas (YANG et al., 2009). A celulase tem capacidade de decompor as paredes das células de cereais, libertando o ácido ferúlico livre contido no farelo de arroz, enquanto ácido ferúlico esterase pode clivar as ligações éster, que ocorrem entre os componentes fenólicos e o demais componentes estruturais dos cereais (XIE et al., 2010).

A ácido ferúlico esterase é a enzima chave que hidrolisa ésteres de ácido ferúlico (BENOIT et al., 2006). Outras espécies fúngicas como *Aspergillus sp.*, *Streptomyces tendae* e *Talaromyces stipitatus*, demonstraram que a ácido ferúlico esterase pode hidrolisar ligações entre açúcares e ácido ferúlico presentes em resíduos agroindustriais (XIE et al., 2010; FERREIRA et al., 2007).

O ácido ferúlico é um composto que apresenta potencial de aplicação comercial, tais como, precursor natural de vanilina, antioxidante natural, agente conservador em alimentos, agente anti-inflamatório e fotoprotetor (YANG et al., 2009). A vanilina é um dos agentes flavorizantes mais utilizados em alimentos, perfumes, bebidas e produtos farmacêuticos, sendo que recentemente vem se indicando a bioconversão de ácido ferúlico, a fim de diminuir o custo de produção de vanilina (ZHENG et al., 2007). Nossos resultados sugerem que a utilização do fungo *Rhizopus oryzae* sobre farelo de arroz pode produzir a enzima ácido ferúlico esterase para liberar ácido ferúlico de resíduos e coprodutos agroindustriais.

O farelo fermentado no tempo de 96 h foi escolhido para avaliação atividade antioxidante e de inibição das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, devido ao farelo

fermentado em 120 h apresentar indícios de crescimento de outras espécies fungicas ao final do período de incubação.

4.3.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos foi avaliada pela inibição do radical livre DPPH, expressa em termos da habilidade de reduzir/sequestrar o radical livre. Trata-se de um método largamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante em um intervalo curto de tempo, comparado com outros métodos (RUFINO et al., 2009; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998; BRAND-WILLIAMS et al., 1995). O comportamento cinético de soluções padrões de ácido ascórbico e ácido ferúlico, e dos extratos de farelo de arroz controle (não fermentado) e fermentado, usando diferentes concentrações, seguindo o modelo multiplicativo ($\ln [DPPH_{REM}] = b \ln \text{tempo} + \ln a$) adotado por Sánchez-Moreno et al. (1998), está na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Comportamento cinético das soluções antioxidantes.

Solução Antioxidante	Concentração (mg/mL - mg antioxidante/g DPPH)	Declividade (%DPPH/min)	Coefficiente de Correlação	DPPH remanescente EE (%)
Ácido Ascórbico	0,01 - 26	-0,004	-0,880	85,1
	0,025 - 66	-0,016	-0,767	71,1
	0,06 - 158	-0,078	-0,868	50,1
	0,07 - 184	-0,277	-0,886	14,5
	0,1 - 263	-0,514	-0,975	4,7
Ácido Ferúlico	0,01 - 26	-0,011	-0,824	92,4
	0,05 - 132	-0,062	-0,984	66,2
	0,1 - 263	-0,110	-0,979	46,3
	0,5 - 1316	-0,397	-0,991	10,1
	1 - 2632	-0,477	-0,995	5,3
Extrato Farelo de Arroz	0,01 - 26	-0,016	-0,893	87,9
	0,05 - 132	-0,071	-0,960	61,7
	0,1 - 263	-0,121	-0,898	44,1
	0,25 - 658	-0,229	-0,889	22,2
	0,5 - 1316	-0,319	-0,940	14,3
Extrato Farelo de Arroz Fermentado	0,01 - 26	-0,012	-0,908	90,6
	0,015 - 39	-0,021	-0,984	79,2
	0,1 - 263	-0,129	-0,941	41,5
	0,15 - 395	-0,218	-0,908	19,0
	0,5 - 1316	-0,344	-0,981	13,0

Onde: EE = estado estacionário.

O mesmo comportamento pode ser notado nas curvas de redução de DPPH em relação ao tempo (Figura 4.3), onde o ácido ascórbico atingiu o estado estacionário em menos de 1 min (Figura 4.3a), sendo que a solução padrão de ácido ferúlico atingiu o estado estacionário em menor tempo (Figura 4.3b) que a soluções de extratos de farelo de arroz (Figura 4.3c) e farelo fermentado (Figura 4.3d), indicando que a mistura de compostos fenólicos nestes extratos tornou a inibição mais lenta.

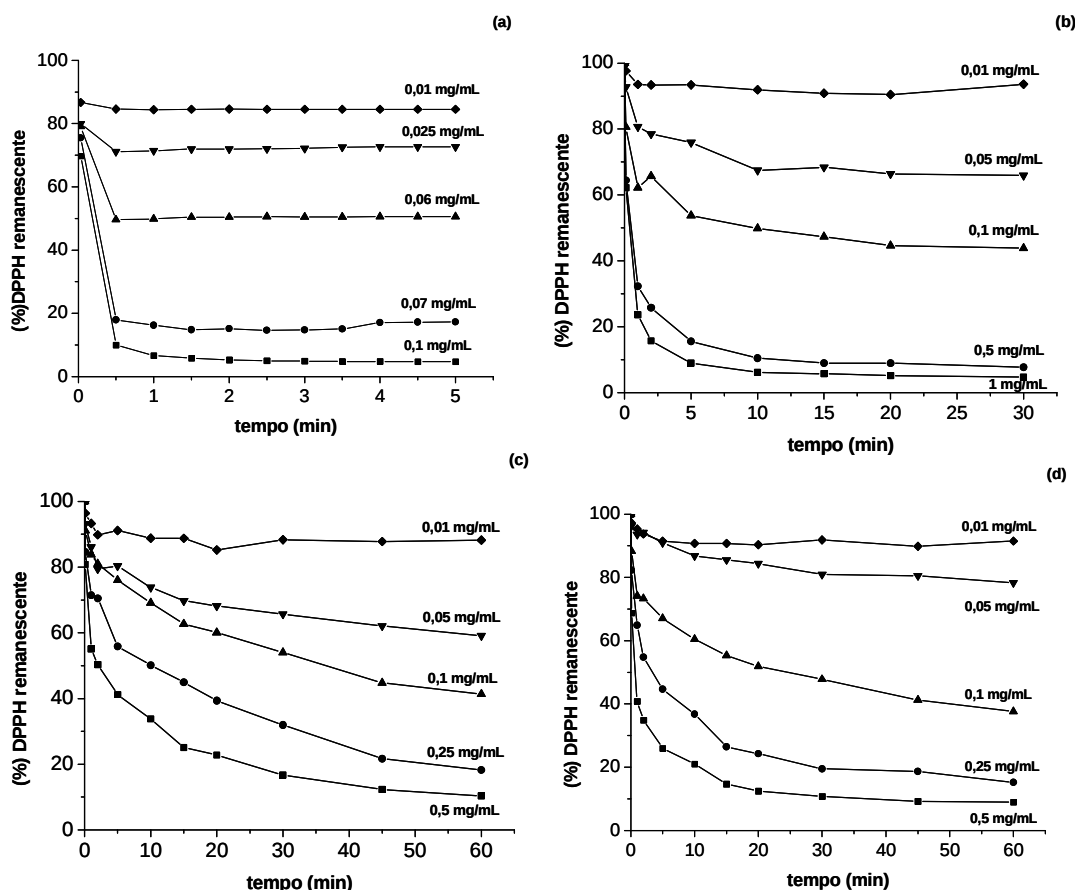


Figura 4.3 - Comportamento cinético das soluções antioxidantes (a) ácido ascórbico, (b) ácido felúrico, (c) farelo de arroz e (d) farelo de arroz fermentado.

A concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (EC_{50}) é o parâmetro mais usado para mensurar o poder antioxidante de uma substância (RUFINO et al., 2009; PÉREZ-JIMÉNES e SAURA-CALIXTO, 2006), sendo que o menor valor de EC_{50} indica um maior poder antioxidante. O extrato fenólico de farelo de arroz fermentado embora tenha apresentado um menor poder antioxidante (Tabela 4.4), apresentou um valor de EC_{50}

próximo aos valores para as soluções de ácido ferúlico e de farelo de arroz não fermentado. Os valores de EC_{50} desses extratos foram menores que os valores encontrados para extratos de cardamomo e cebola (MARIUTTI et al., 2008), koji de feijão preto fermentado por diferentes microrganismos (LEE et al., 2008), farelo de arroz branco obtido de diferentes cultivares (MUNTANA e PRASONG, 2010), *Rubi Fructus* fermentado (JU et al., 2009).

A solução de ácido ascórbico apresentou um valor de EC_{50} cerca de 2,5 vezes menor que as demais soluções antioxidantes. Porém o valor de EC_{50} não leva em consideração o tempo para chegar ao estado estacionário da reação de inibição. De acordo com a classificação cinética baseada no tempo necessário para atingir o valor de EC_{50} (SÁCHEZ-MORENO et al., 1998; BRAD-WILLIAMS et al., 1995), o ácido ascórbico apresentou uma rápida ação antioxidante, enquanto que para as soluções de ácido ferúlico e farelo de arroz (não fermentado e fermentado) apresentaram uma ação intermediária e lenta, respectivamente (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Valores de EC_{50} e de eficiência anti-radical e suas respectivas classificações para as soluções antioxidantes.

Solução Antioxidante	EC_{50} ($mg_{antiox.}/g_{DPPH}$)	Tempo EC_{50} (min)	Classificação	EA ($\times 10^3$)	Classificação
Ácido Ascórbico	98 ± 16	$0,37 \pm 0,03$	rápido	27,3	muito alta
Ácido Felúrico	235 ± 4	$20,74 \pm 0,74$	intermediário	0,21	baixa
Farelo de Arroz	213 ± 10	$40,53 \pm 0,96$	lento	0,12	baixa
Farelo de Arroz Fermentado	250 ± 4	$43,05 \pm 0,49$	lento	0,09	baixa

Onde: EA = eficiência anti-radical. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Outra classificação de soluções antioxidantes baseada na cinética de atuação que leva em consideração a concentração e o tempo de EC_{50} , chamada de eficiência anti-radical (EA), indica que enquanto a solução de ácido ascórbico apresentou uma EA muito rápida, as demais soluções apresentaram uma EA baixa (Tabela 4.4), sendo que as soluções de farelo de arroz fermentado e não fermentado apresentaram uma menor eficiência do que a solução de ácido ferúlico, causada pela presença de outros compostos fenólicos de lenta EA contida nestes extratos. A menor EA do extrato de

farelo fermentado comparada com a do farelo de arroz pode ser compensada pelo aumento do conteúdo fenólico com a fermentação (Figura 4.1).

Os compostos fenólicos se comportam como antioxidantes devido à reatividade do radical fenol (substituinte hidroxil do anel aromático), que pode inativar o radical livre doando um átomo de hidrogênio. Outros mecanismos são via extinção do radical por meio de doação de elétrons e extinção de oxigênio singlete. Os substituintes no anel aromático afetam a estabilização, e por isso afetam a habilidade destes ácidos fenólicos de suprimir o radical livre, decorrente da atividade antioxidante característica de cada ácido fenólico (ROBBINS 2003).

A eficiência das substâncias fenólicas como antioxidante depende, em grande parte, da sua estrutura química, orientação relativa e do número de grupos hidroxilas ligados ao anel aromático. Por exemplo, o ácido gálico cujo efeito indutivo dos três grupos hidroxil determinam o aumento da atividade antioxidante deste. Outro fator que aumenta consideravelmente o poder antioxidante dos monofenóis é a substituição metoxi, tal como ocorre no BHA (butil-hidroxi-anisol). No caso de substituição metoxi de ácidos fenólicos, ela está longe de ser equivalente à adição de um grupo hidroxil, sendo assim, o ácido ferúlico, pode ser menos eficaz do que o ácido caféico (SÁCHEZ-MORENO et al., 1998).

A importância de se avaliar a velocidade de reação inibidora está relacionada com a forma como estes extratos podem ser adicionados como antioxidantes para proteger certos produtos alimentares seja por um longo período de armazenamento, ou durante o processamento, para o qual é necessário estabilidade frente às condições empregadas. Por exemplo, um antioxidante de ação lenta, deve ser adicionado ao produto armazenado congelado e um antioxidante de ação rápida deve ser utilizado em produtos cozidos no forno ou frito (MARIUTTI et al., 2008).

Embora o extrato fenólico de farelo de arroz fermentado tenha apresentado uma pequena perda da atividade antioxidante com relação ao extrato fenólico de farelo de arroz sem fermentar, em termos de EC_{50} e EA, o elevado aumento no conteúdo fenólico com a fermentação acaba compensando a perda.

4.3.4 Inibição enzimática

O escurecimento enzimático é uma reação indesejável que ocorre em frutas e legumes. A reação de escurecimento requer a presença de oxigênio, compostos fenólicos e enzimas oxidativas. Geralmente é iniciada pela oxidação enzimática de monofenóis em difenóis, e de difenóis em quinonas, as quais sofrem posteriormente

uma polimerização não enzimática que leva à formação de pigmentos. Uma variedade de frutas e vegetais, como alface, batata, maçã, pera, banana e pêssego, são suscetíveis ao escurecimento enzimático durante o processamento e armazenamento (EMBUSCADO e HUBER, 2009; HE et al., 2008). Assim, para inibir o escurecimento enzimático são usados compostos antioxidantes, com potencial semelhante ao deste trabalho.

Em vista disto, os extratos fenólicos de farelo de arroz controle e fermentado foram avaliados quanto à capacidade de inibir as enzimas peroxidase e polifenoloxidase. As soluções fenólicas apresentaram uma maior inibição para enzima peroxidase, sendo que as soluções de ácido ferúlico, farelo de arroz não apresentaram uma inibição semelhante, chegando próximo de 60% de inibição quando foi utilizada uma concentração cerca de 3 vezes o valor correspondente ao EC_{50} delas (Figura 4.4). Para enzima polifenoloxidase, as soluções antioxidantes de extratos de farelo de arroz fermentado e não fermentado (controle) não apresentaram inibição em nenhuma das concentrações testadas, enquanto a solução de ácido ferúlico mostrou maior inibição em uma concentração correspondente a 3 vezes o EC_{50} . O fato dos extratos fenólicos não serem eficientes para inibir a enzima polifenoloxidase (PPO), mesmo com elevado conteúdo de ácido ferúlico, mostra que os extratos possuem compostos fenólicos que também podem servir como substrato para esta enzima, como no caso dos ácidos clorogênico, caféico e gálico (QUEIROZ et al., 2011).

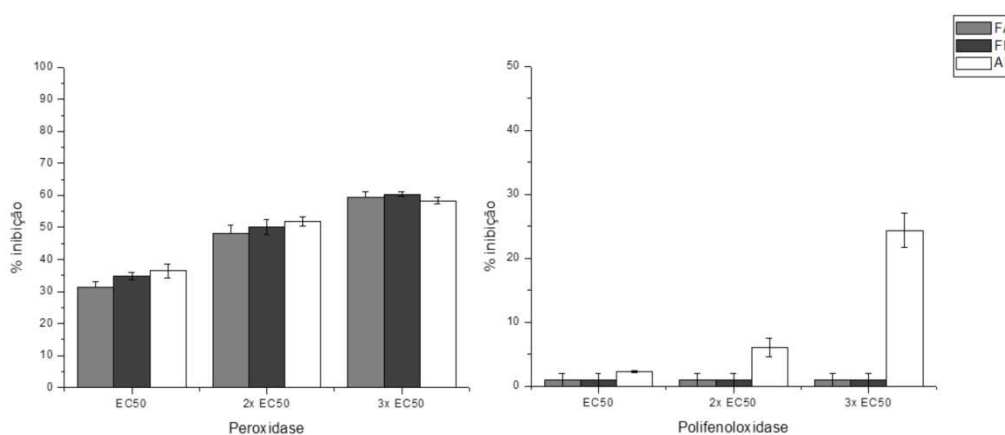


Figura 4.4 - Inibição enzimática de soluções antioxidantes de farelo de arroz (FA), farelo de arroz fermentado (FF), ácido ferúlico (AF) em diferentes concentrações de EC_{50} . Onde: EC_{50} = 0,1mg/mL.

A PPO catalisa a oxidação de polifenóis para quinonas que reagem não enzimaticamente para produzir pigmentos coloridos (QUEIROZ et al., 2011). A peroxidase é capaz de oxidar compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio, que podem ser formados como um produto secundário durante a oxidação catalisada pela PPO (MATUSCHEK e SVANBERG, 2005). O extrato enzimático de batata apresentou maior atividade para enzima peroxidase (0,24 UA/min.mg_{proteína}) do que para enzima polifenoloxidase (0,06 UA/min.mg_{proteína}), comportamento também verificado por outros autores (PINELI et al., 2005; CANTOS et al., 2002), sendo que a enzima polifenoloxidase pode liberar H₂O₂, assim aumentando a atividade da enzima peroxidase (MORETTI, 2007).

Todas as peroxidases possuem um mecanismo de catálise similar, basicamente, a enzima nativa férrica primeiro sofre uma oxidação por uma molécula de peróxido (como H₂O₂) para formar um composto enzimático intermediário, este composto aceita um elétron de um doador de elétrons (como o guaiacol) para formar um segundo composto intermediário. Este segundo composto intermediário, então aceita um segundo elétron equivalente, do mesmo doador ou de outro doador de elétron, para retornar ao estado de enzima nativa. Uma variedade de compostos fenólicos atua como inibidores de peroxidases, uma vez que estes podem doar um elétron para o primeiro composto, mas não para o segundo composto (DURNER e KLESSIG, 1995).

A Tabela 4.5 apresenta os valores dos parâmetros Km e V_{máx} obtidos para enzima peroxidase de extrato de batata na presença de diferentes inibidores. A Figura 4.5 mostra o comportamento enzimático na presença dos extratos adicionados na reação. A solução padrão de ácido ferúlico apresentou uma inibição do tipo não competitiva (Figura 4.5A), onde o valor de Km e de V_{máx} diminuíram com a adição de inibidor, mas a relação Km/V_{máx} pouco foi alterada (Tabela 4.5). Comportamento de inibição diferente do apresentado pelos extratos fenólicos de farelo de arroz e farelo fermentado, que mostraram um comportamento inibidor semelhante (Figura 4.5B e 4.5C), onde os valores de Km diminuíram e os valores de V_{máx} apresentaram pouca alteração com a adição de extrato fenólico (Tabela 4.5). Este comportamento indica que ocorre uma inibição do tipo competitiva (WHITAKER, 1994), portanto os compostos fenólicos são semelhantes ao substrato preferencial da enzima. Mesmo estas soluções apresentando ácido ferúlico em maior quantidade, principalmente a solução de extrato fenólico fermentado, os resultados mostraram que a mistura de ácidos fenólicos influenciou na inibição da enzima peroxidase, reforçando que os

ácidos fenólicos presentes nos extratos competem com as outras moléculas de substrato pelo centro ativo da enzima.

Tabela 4.5 - Valores de K_m e $V_{m\max}$ para enzima peroxidase em presença de extratos fenólicos de farelo de arroz fermentado e não fermentado.

Reação	[Inibidor] mg/mL	K_m (mM) 10^3	$V_{m\max}$ (1/min)	$K_m/V_{m\max}$ (mM/min)	Tipo de inibição
Substrato + SAF	0	1,19	0,167	7,13	não competiiva
	0,05	0,50	0,060	8,33	
	0,15	0,32	0,037	8,65	
Substrato + EFA	0	0,65	0,101	6,44	competitiva
	0,05	0,34	0,087	3,91	
	0,15	0,17	0,092	1,82	
Substrato + EFF	0	0,65	0,078	8,39	competitiva
	0,05	0,26	0,091	2,85	
	0,15	0,06	0,068	0,89	

Onde: SAF = solução padrão de ácido ferúlico. EFA = extrato fenólico de farelo de arroz; EFF = extrato fenólico de farelo de arroz fermentado; K_m = constante de Michaelis-Menten.

A FES tem sido utilizada para aumentar o teor de compostos fenólicos em certos produtos alimentares, reforçando assim a sua atividade antioxidante. Nesse sentido, diferentes resíduos agroindustriais vêm sendo utilizados como substratos sólidos na FES para a produção de diferentes compostos fenólicos bioativos (MARTINS et al. 2011). Os resultados deste trabalho comprovam que com a fermentação houve um acréscimo no conteúdo de compostos fenólicos livres no farelo de arroz (10 vezes), os quais possuem uma potencial atividade antioxidante inibindo radicais livres e a enzima peroxidase. Além disso, estes compostos podem ser utilizados para conversão a outros de interesse, como no caso da conversão do ácido ferúlico em vanilina. Podem também virem a serem aplicados em produtos que visem à inibição da enzima peroxidase, como no caso de produtos a base de batata, ou para elaboração de batatas minimamente processadas.

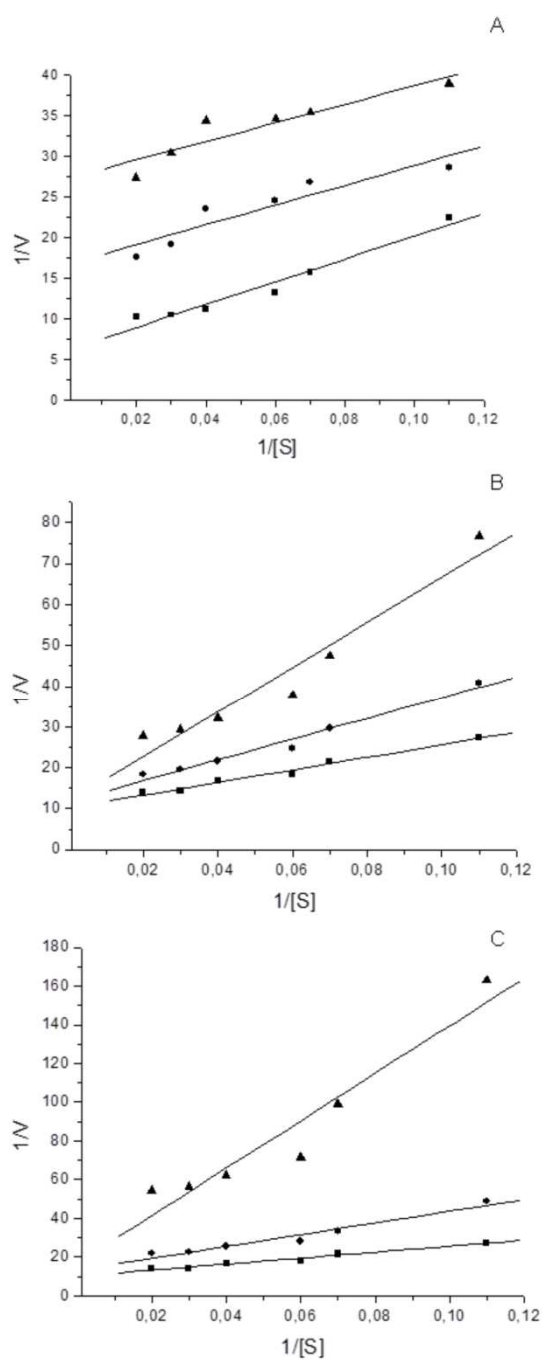


Figura 4.5 – Influência da adição das soluções de ácido ferúlico (A), extrato fenólico de farelo de arroz (B) e extrato fenólico de farelo de arroz fermentado (C) na velocidade de reação da enzima peroxidase. Sendo: ■ sem inibidor; ● 0,05 mg/mL de inibidor; ▲ 0,15 mg/mL de inibidor.

4.4 CONCLUSÃO

A fermentação em estado sólido do farelo de arroz com o fungo *Rhizopus oryzae* aumentou o conteúdo fenólico livre em mais de 100%. Foi observada uma mudança no perfil dos ácidos fenólicos, sendo que o ácido gálico e ferúlico foram os que mais aumentaram, resultando em 170 e 765 mg/g, respectivamente. O extrato fenólico de farelo de arroz fermentado apresentou uma cinética lenta de inibição do radical DPPH, apresentado um valor de EC_{50} de 250 mg/g_{DPPH} e um potencial de inibição para enzima peroxidase do tipo competitiva.

CAPÍTULO 5

ELABORAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS A PARTIR DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE FARELO DE ARROZ (CPFA) E DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO (CPFF)

Neste capítulo estão apresentados os resultados do trabalho de produção e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) e concentrado proteico de farelo de arroz fermentado (CPFF) com o microrganismo *Rhizopus oryzae*. A espessura, solubilidade, propriedades ópticas (luminosidade e opacidade) e propriedades mecânicas (tensão de ruptura, porcentagem de elongação e módulo de Young) foram consideradas para definir a aplicabilidade dos filmes.

5.1 INTRODUÇÃO

O interesse no desenvolvimento de filmes comestíveis ou degradáveis decorre da demanda por alimentos de alta qualidade, preocupações ambientais sobre o descarte de materiais não renováveis e oportunidades para criar novos mercados de matérias-primas formadoras de filme (FAKHOURI et al., 2007). Filmes comestíveis são usados como barreira semipermeável para reduzir a taxa de respiração, retardar a perda de umidade e variação de cor, melhorar a textura e a integridade mecânica, auxiliar na retenção de aromas e inibir o crescimento de micro-organismos. A eficiência funcional das embalagens comestíveis vai depender da natureza de seus componentes, da composição e da estrutura do filme (MORETTI, 2007).

Os filmes comestíveis podem ser obtidos a partir de diferentes materiais, tais como: polissacarídeos, proteínas e os lipídios, sendo as propriedades mecânicas dos filmes à base de proteínas, geralmente, superiores as obtidas com os demais polímeros (AZEREDO, 2003). As proteínas de origem vegetal são mais utilizadas que as proteínas de origem animal, devido a sua produção elevada e o menor custo (ROJAS-GRAU et al., 2009; ADEBIY et al., 2008).

A elaboração de filmes proteicos, tendo como fonte resíduos gerados durante o beneficiamento de cereais, é interessante para o melhor aproveitamento das culturas agrícolas. No caso da região sul do Rio Grande do Sul, destaca-se o arroz (*Oryza sativa*) como a cultura de maior impacto econômico e nutricional pelo seu amplo consumo. Um dos principais coprodutos do beneficiamento do arroz é o farelo integral (ÁVILA et al., 2008; AMATO e ELIAS, 2005).

A fermentação em estado sólido (FES) é a denominação de um cultivo microbiano sobre substratos sólidos sem a presença de água livre (RAIMBAULT, 1998), portanto resíduos agroindustriais podem ser empregados como substrato na FES (TRABULSI et al., 2000). Fato importante do ponto de vista econômico e ambiental, pois além de reduzir o impacto do descarte sobre a natureza valoriza os resíduos agroindustriais (SILVA, 2002). Vem sendo demonstrando que durante a fermentação do farelo de arroz com o micro-organismo *Rhizopus oryzae* (GRAS - *Generally Recognized As Safe*), ocorre um acréscimo do conteúdo proteico (OLIVEIRA et al., 2010; SILVEIRA e FURLONG, 2007), melhorando o potencial destes como fonte proteica para diferentes fins. Neste trabalho, as proteínas obtidas de farelo de arroz natural e fermentado por *Rhizopus oryzae* foram empregadas para elaboração de filmes que tiveram suas propriedades avaliadas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Processo fermentativo

O farelo de arroz integral, previamente esterilizado, foi utilizado como substrato para o cultivo sólido realizado em biorreatores de bandeja (7 cm x 12 cm). Cerca de 50 g de amostra foram colocadas em cada um de forma a resultar em uma camada de 2 cm de espessura e adicionadas de 22,5 mL de uma solução nutriente (2g/L de KH_2PO_4 , 1g/L de MgSO_4 e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). O agente fermentador, o fungo *Rhizopus oryzae* (CCT 1217), foi adicionado na concentração inicial de 4×10^6 esporos/g de farelo. A umidade do meio foi corrigida para 50% pela adição de água destilada. Os reatores foram incubados a 30 °C sob umidade controlada. Após 96 h de incubação, a biomassa fermentada foi acondicionada em recipientes plásticos e estocada a -18 °C (OLIVEIRA et al., 2010).

5.2.2 Concentrados proteicos

Para extração das proteínas do farelo de arroz fermentado e não fermentado foram realizados alguns testes preliminares visando um maior rendimento na extração. Foram avaliados diferentes solventes (solução tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M a pH 10 e solução de NaOH 0,05 M com pH ajustado a 8,5 e 11,5), empregando diferentes métodos de homogeneização (em banho ultrassom e em agitador orbital, com e sem pérolas de vidro), bem como purificação primária através da precipitação proteica (com acetona e com solução de HCl até o ponto isoelétrico). O método de extração alcalina a pH 11,5 com agitação orbital sem perolas de vidro e precipitação das proteínas a pH 4,5 foi escolhido.

Sendo assim, a partir do farelo de arroz e da biomassa fermentada foram obtidos um concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) e um concentrado proteico de farelo de arroz fermentado (CPFF) que foram utilizados na elaboração dos filmes. Cada 10 g de amostras foram adicionadas em Erlenmeyers e o pH do meio foi ajustado para 11,5 com NaOH ou HCl 0,1 M. As amostras foram submetidas à agitação por 30 min em agitador orbital (170 rpm), a temperatura ambiente. Após filtração à vácuo com tecido de nylon e centrifugação (15200 g, 30 min, 4 °C), o sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi novamente submetido ao processo de extração. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com uma solução de HCl 1 M para atingir o pH 4,5. Após repouso (*overnight* a 4 °C), as proteínas foram separadas por centrifugação. A composição centesimal dos concentrados foi

determinada segundo metodologia da AOAC (2000) para umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e fibras. O conteúdo dos carboidratos foi estimado por diferença.

5.2.3 Elaboração dos filmes

Os concentrados proteicos foram ressuspensos em uma solução de NaOH 0,02 M, com o pH ajustado para 11,5. Foi obtida uma solução na concentração de 2% de proteína, sendo o glicerol adicionado à solução de modo a constituir 50% em relação a proteína. A solução (50 mL) foi aquecida por 30 min a 85 °C. Os filmes foram produzidos pela técnica *casting*, em placas de petri de plástico (9 cm de diâmetro) e secagem em estufa com circulação de ar por aproximadamente 24 h a 30 °C. A concentração inicial de sólidos nas placas foi mantida constante (1,5 g). Os filmes foram mantidos em dessecador com sílica por 48 h antes dos testes.

5.2.4 Caracterização dos filmes

Os filmes obtidos foram submetidos a ensaios de umidade e solubilidade. A umidade foi determinada em estufa à vácuo a 70 °C. Para a solubilidade em água dos filmes, amostras circulares dos filmes de 2 cm de diâmetro foram imersas em 50 mL de água destilada e mantidos a temperatura ambiente por 24 h, com agitação esporádica. As amostras foram filtradas em cadinho poroso com lã de vidro e secas até peso constante a 105 °C, sendo determinada a massa de matéria seca que não foi dissolvida em água. As determinações foram realizadas em triplicata.

A espessura dos filmes foi determinada utilizando um micrômetro digital (Insize IP54, Brasil) com sensibilidade de 0,001 mm, sendo tomadas dez medidas para cada filme.

5.2.5 Propriedades ópticas

Os parâmetros de cor croma a (a^*), croma b (b^*), luminosidade (L^*) e a opacidade (Op) foram determinados utilizando um colorímetro Minolta (modelo Chroma Meter CR400, Brasil). Amostras dos filmes foram sobrepostos a um padrão branco para a determinação dos parâmetros de L^* , a^* e b^* . A opacidade foi calculada como sendo a relação entre a opacidade do filme sobreposto a um padrão preto e um padrão branco, de acordo com CARVALHO e GROSSO (2006), segundo a Equação 5.1. Foram realizadas seis determinações para cada filme.

$$Op(\%) = \frac{P_{\text{Preto}}}{P_{\text{Branco}}} \times 100 \quad \text{Equação 5.1}$$

Onde: Op = opacidade; P_{preto} = valor da coordenada Y no padrão preto; P_{branco} = valor da coordenada Y no padrão branco.

5.2.6 Propriedades mecânicas

A tensão de ruptura (TR) e a porcentagem de alongação (E) dos filmes foram obtidas a partir das curvas de força-deformação determinadas em um texturômetro (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Inglaterra), operando de acordo com o método padrão ASTM D-882 (ASTM, 2001), com separação inicial das garras e velocidade de realização dos testes de 50 mm e 100 mm/min. Os filmes foram recortados formando corpos de prova de 80 mm de comprimento e 25 mm de largura. O módulo de Young (MY) foi calculado a partir da tangente da porção linear inicial da curva força-deformação (CAO et al., 2007). Foram realizadas 5 determinações para cada filme.

5.2.7 Análise de aminoácidos

A determinação da composição dos aminoácidos totais do CPFA, CPFF e do fungo seco foi realizada no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Amostras (5-50 mg de sólidos, previamente desengordurados) foram colocadas em ampolas de borossilicato de 10×150 mm, previamente pirolisadas a 400°C por 8 horas. A seguir, foram adicionadas 500µL de HCl 6N, bidestilado em vidro a 104°C. As ampolas foram submetidas a vácuo, seladas e mantidas a 110°C por 22 h. Após este período, o HCl foi evaporado em concentrador rotatório SpeedVac AS160 e as amostras hidrolisadas foram ressuspensas em 1,0mL de água MilliQ. Alíquotas de 5µL do sobrenadante foram transferidas para outro tubo de ensaio, secas e submetidas à reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag, Waters, 3,9x150mm) com monitoramento em comprimento de onda de 254nm. A quantificação da amostra foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando-se como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida, sendo que o padrão foi derivado nas mesmas condições e, ao mesmo tempo, que as amostras (BIDLINGMEYER et al., 1984).

5.2.8 Perfil eletroforético das proteínas

Amostras de CPFA e de CPFF foram caracterizadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), usando a metodologia adaptada de LAEMMLI (1970). O gel de aplicação, contendo 10% de poliacrilamida, foi formado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 0,3% (p/v). O gel de separação, contendo 15% de poliacrilamida, foi formado em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8, contendo SDS a 0,3%.

Os concentrados proteicos foram diluídos em uma solução alcalina de NaOH a pH 10,5 a uma concentração proteica de 1mg/mL. Foram tomados 100 uL dos extratos e adicionada acetona na proporção 2:1 para precipitação das proteínas. Após evaporação da acetona sob corrente de nitrogênio, as proteínas foram suspensas em um tampão de desnaturação (100 mL de Tris-HCl 0,15 M pH 6,8, 10 g de SDS, 20 mL de 2 β -Mercaptoetanol, 0,02 g de bromofenol e 20 mL glicerol), tratadas a 100°C por 5 minutos e centrifugadas em Eppendorf a 5.000 rpm por 1 minuto. Alíquotas de 15 μ L de cada amostra foram aplicadas nos poços do gel. A corrida eletroforética foi realizada sob corrente de 30 mA e 300V, sendo o tampão de corrida composto por glicina 1,5 %p/v, SDS 0,1 %p/v e Tris 0,3 %p/v. Após a eletroforese, o gel foi corado em Coomassie blue R-250 a 0,27% preparado em metanol, ácido acético e água (4:1:2,5, v/v/v), e o descoramento do gel e visualização das unidades proteicas foi realizada com metanol, ácido acético e água (4:1:9, v/v/v).

Para avaliar a massa molecular das unidades proteicas separadas, o gel foi calibrado com marcador proteico contendo 7 bandas de resolução em 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 KDa (Amresco's PreciseTM, EUA).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à extração de proteína da biomassa fúngica apresentar uma maior dificuldade de extração, foram testados diferentes procedimentos mecânicos. Foi constatado que a utilização de banho ultrassônico impede a extração de uma maior quantidade de amostra, assim como a utilização de pérolas de vidro que necessitam de uma agitação muito elevada quando se utilizam grandes quantidades de amostra. Com relação à precipitação das proteínas, embora tenha sido obtida uma maior massa precipitada com acetona, esse resíduo precipitado não foi capaz de formar uma matriz filmogênica quando este foi utilizado para elaboração dos filmes.

Portanto, foi adotado extrair as proteínas dos farelos usando uma solução de NaOH a pH 11,5, com agitação orbital em equipamento de bancada e precipitação das proteínas com uma solução de HCl 0,1M até o ponto isoelétrico de 4,5. A Tabela 5.1 apresenta a composição dos concentrados proteicos e o rendimento destes concentrados utilizando o método de extração escolhido.

Tabela 5.1 – Composição proximal (base seca) e rendimentos dos concentrados proteicos de farelo de arroz (CPFA) e de farelo de arroz fermentado (CPFF).

Componente (%)	CPFA	CPFF
Proteínas	71,7 ± 5,3 ^a	43,4 ± 2,1 ^b
Lipídeos	0,5 ± 0,3 ^a	31,4 ± 0,9 ^b
Cinzas	2,9 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,1 ^a
Carboidratos	24,9 ± 4,7 ^a	21,6 ± 2,4 ^b
Umidade	68,1 ± 5,9 ^a	76,8 ± 2,2 ^b
Rendimento (%)	CPFA	CPFF
massa	7,7	2,4
proteína	44,9	8,5

Onde: CPFA = concentrado proteico de farelo de arroz; CPFF = concentrado proteico de farelo de arroz fermentado.

O CPFA resultou em maior conteúdo proteico e um reduzido valor de lipídeos, comparados com o CPFF. Embora, com o processo fermentativo tenha ocorrido um aumento no conteúdo proteico, as proteínas do farelo fermentado se tornaram mais difíceis de extrair, assim como os lipídeos que permaneceram elevados no CPFF, refletindo no baixo rendimento proteico e no elevado teor de lipídios deste concentrado, afetando consequentemente as propriedades dos filmes elaborados (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Filmes de concentrados proteicos de farelo de arroz (CPFA) e de farelo de arroz fermentado (CPFF).

Filmes	CPFA	CPFF
Caracterização dos Filmes		
Umidade (%)	9,4 ± 0,8 ^a	11,0 ± 0,7 ^b
Espessura (mm)	0,24 ± 0,05 ^a	0,20 ± 0,04 ^a
Solubilidade (%)	65,7 ± 3,5 ^a	94,8 ± 3,4 ^b
Propriedades Ópticas		
L*	42,0 ± 4,6 ^a	27,1 ± 1,7 ^b
a*	22,4 ± 2,0 ^a	11,8 ± 2,2 ^b
b*	34,3 ± 7,7 ^a	7,5 ± 2,4 ^b
Op	40,0 ± 6,0 ^a	56,0 ± 5,6 ^b
Propriedades Mecânicas		
TR (MPa)	3,29 ± 0,61 ^a	0,12 ± 0,01 ^b
E (%)	38,3 ± 6,1 ^a	14,2 ± 2,1 ^b
MY (MPa)	97,4 ± 1,80 ^a	1,8 ± 0,2 ^b

Onde: CPFA= concentrado proteico de farelo de arroz; CPFF = concentrado proteico de farelo de arroz fermentado; Op = opacidade; TR = tensão de ruptura; E = elongação; MY = módulo de Young. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

Os filmes de CPFF apresentaram elevada solubilidade, acima de 90%. Com relação às propriedades ópticas, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os parâmetros analisados. Filmes de CPFA apresentaram maior luminosidade do que os filmes de CPFF. Os filmes de CPFA tenderam a tonalidades mais avermelhadas ($a^* = 22,4$) e amareladas ($b^* = 34,3$) do que os filmes de CPFF ($a^* = 11,8$ e $b^* = 7,5$). Os resultados obtidos para os filmes de CPFA indicam que estes foram mais transparentes, pois apresentaram menor valor de opacidade do que os filmes de CPFF. Esses resultados são consistentes com a observação visual, pois os filmes mais transparentes foram obtidos com as proteínas de farelo de arroz sem fermentar (Figura 5.1).

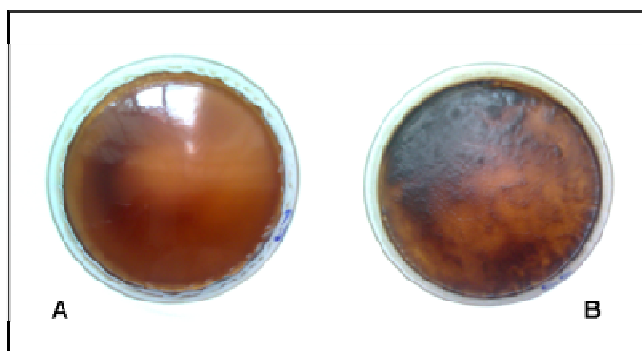


Figura 5.1 - Filmes de concentrado proteico de farelo de arroz (A) e de concentrado proteico de farelo fermentado (B).

Esta diferença, nas propriedades ópticas, verificada entre os filmes, deve-se ao fato de que os concentrados proteicos obtidos de farelo de arroz fermentado apresentavam uma coloração mais escura, pois o fungo *Rhizopus oryzae* produz hifas escuras, que acabaram influenciando na coloração dos filmes elaborados a partir de farelo fermentado.

A tensão de ruptura obtida para os filmes de CPFA foi muito superior a apresentada pelos filmes de CPFF. Os filmes de CPFF se apresentaram muito frágeis, o que resultou em um baixo valor do módulo de Young. Tanto a TR como o MY medem a resistência do filme. Com relação à elongação, filmes de CPFA apresentaram um maior percentual de elongação do que os filmes de CPFF.

A diferença apresentada entre os filmes de CPFA e os filmes de CPFF nas propriedades mecânicas está relacionada com a fermentação. Embora o processo fermentativo tenha elevado o conteúdo proteico do farelo de arroz, a proteína oriunda da biomassa gerada e a alteração na estrutura da proteína nativa do farelo não foram benéficas para a obtenção de filmes proteicos com propriedades desejáveis.

A falta de homogeneidade da superfície dos filmes de CPFF, observada visualmente (Figura 5.1), pode ter afetado as propriedades apresentadas por esses filmes. Resíduos de peptídeos com diferentes massas moleculares poderiam ter sido precipitados durante a obtenção do CPFF e assim contribuído negativamente tanto nas propriedades ópticas, quanto nas propriedades mecânicas dos filmes.

As proteínas são capazes de formar filmes comestíveis devido à habilidade de suas cadeias laterais para formar ligações intermoleculares cruzadas. A presença de aminoácidos polares e não polares ao longo da cadeia proteica cria diversos potenciais químicos (DANGARAN et al., 2009). Com a fermentação ocorre uma

alteração das cargas das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, devido a mudança no conteúdo destes aminoácidos (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Perfil de aminoácidos nos concentrados proteicos de farelo de arroz (CPFA) e de farelo fermentado (CPFF) e na massa fúngica seca (mol/%).

aminoácido	CPFA	CPFF	massa fúngica
Aspargina	8,71 ± 0,11	8,47 ± 0,44	12,71 ± 0,65
Glutamina	12,45 ± 0,03	8,54 ± 0,11	12,14 ± 0,78
Serina	6,19 ± 0,06	6,22 ± 0,42	7,22 ± 0,01
Glicina	8,44 ± 0,06	8,77 ± 0,52	7,92 ± 0,20
Histidina	3,13 ± 0,08	2,68 ± 0,06	2,94 ± 0,11
Arginina	7,73 ± 0,01	5,54 ± 0,04	4,49 ± 0,26
Treonina	4,50 ± 0,01	5,32 ± 0,11	5,60 ± 0,01
Alanina	9,27 ± 0,03	9,75 ± 0,21	8,15 ± 0,33
Prolina	5,77 ± 0,07	5,56 ± 0,33	5,52 ± 0,46
Tirosina	3,14 ± 0,01	3,25 ± 0,04	2,60 ± 0,59
Valina	6,32 ± 0,06	7,17 ± 0,84	5,48 ± 0,71
Metionina	2,26 ± 0,06	2,28 ± 0,22	2,04 ± 0,18
Cisteína	0,82 ± 0,04	0,72 ± 0,12	1,10 ± 0,23
Isoleucina	3,39 ± 0,08	4,61 ± 0,69	3,69 ± 0,13
Leucina	7,95 ± 0,05	10,19 ± 0,78	6,73 ± 0,06
Fenilalanina	4,30 ± 0,01	4,95 ± 0,18	3,48 ± 0,42
Lisina	5,66 ± 0,04	6,03 ± 0,19	8,25 ± 0,40

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 2 amostras. Onde: CPFA = concentrado proteico de farelo de arroz; CPFF = concentrado proteico de farelo de arroz fermentado.

Entre os concentrados, foi observada principalmente uma redução no conteúdo de glutamina e arginina, um aminoácido polar e outro carregado, respectivamente; e um aumento no conteúdo de isoleucina e leucina, aminoácidos não polares. Foi verificado um pequeno aumento em vários aminoácidos não polares, como glicina, triptofano, alanina, valina e fenilalanina, indicando que com a fermentação ocorre uma alteração na polaridade da cadeia proteica, o que pode estar relacionado com a menor resistência mecânica da rede proteica dos filmes de CPFF.

As interações proteicas que ocorrem entre suas cadeias determinam a formação e as propriedades dos filmes. A presença de cisteína permite a formação de pontes dissulfeto, como ocorre no caso da beta-lactoglobulina. Elevadas concentrações de leucina, alanina e outros aminoácidos não polares podem criar proteínas hidrofóbicas, como no caso da alfa-zeína (DANGARAN et al., 2009).

Os principais aminoácidos produzidos pelo fungo *Rhizopus* foram aspargina, glutamina e lisina, sendo que não foi relacionado um aumento no conteúdo desses aminoácidos no conteúdo do CPFF, somente no caso da lisina. Através da análise de eletroforese (Figura 5.2) pode ser observado a diferença entre as proteínas do CPFA e o CPFF.

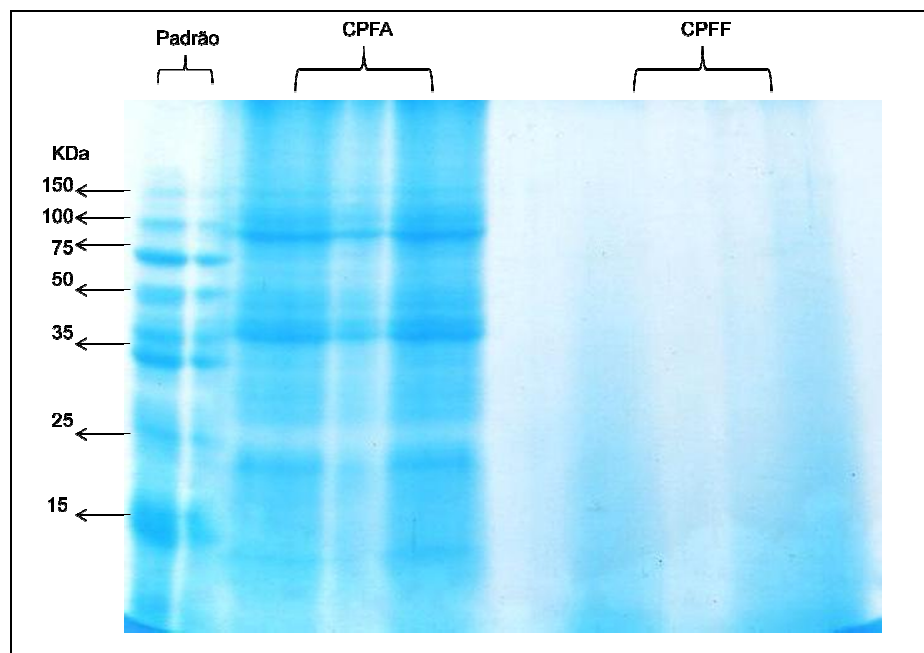


Figura 5.2 – Análise de eletroforese das proteínas do concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) e do concentrado proteico de farelo de arroz fermentado (CPFF).

As proteínas são classificadas com base na solubilidade em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em álcool) e glutelinas (solúveis em álcalis) (VIERA et al., 2008). Portanto, no CPFA que foi extraído com solução alcalina, além das glutelinas, pode haver albuminas e globulinas. Segundo WALTER et al. (2008), o farelo de arroz apresenta aproximadamente 60% de albumina, seguido por prolamina e glutelina (27%) e globulina (7%). De acordo com Sgarbieri (1996), com relação às proteínas do arroz, as albuminas apresentam bandas de absorção variando de 15 a 95 kDa, sendo que as três subunidades principais apresentam massas moleculares de 8,5, 16 e 11 kDa. Já as globulinas podem apresentar bandas de absorção ao redor de 18 kDa. Enquanto que as glutelinas, que são a principal fração proteica do arroz, possuem três subunidades principais com bandas de absorção ao redor de 38, 25 e 16 kDa.

O CPFA apresentou fortes bandas de absorção entorno de 100 e 35 kDa (Figura 5.2), as quais podem corresponder à albumina e à uma das subunidades de glutelina, respectivamente. Também apresentou absorções em 25 e 15 kDa, podendo estas corresponder as demais subunidades das glutelinas ou das globulinas. Enquanto que o CPFF não apresentou bandas de absorção ao longo da corrida eletroforética, indicando que possivelmente as proteínas do CPFF são menores que 15 kDa. Os fungos do gênero *Rhizopus* produzem uma série de enzimas proteolíticas (TAHERZADEH et al., 2003), as quais possivelmente hidrolisaram drasticamente as proteínas do farelo de arroz, reduzindo a sua massa molecular. Além disso, as proteínas produzidas pelo fungo também poderiam ser de menor massa molecular, o que contribuiria para redução da capacidade destas proteínas em formar filmes mais fortes, uma vez que proteínas de maior massa molecular produzem uma quantidade maior de ligações inter-cruzadas que formam filmes mais fortes (DANGARAN et al., 2009).

Outros testes foram feitos visando a aplicação de proteína obtida a partir da biomassa fermentada para elaboração de filmes biodegradáveis. Foram testados: farelo de arroz fermentado em um menor tempo de fermentação (48 h); farelo de arroz desengordurado para fermentação; adição de argila montmorilonita (MMT) aos filmes de concentrado proteico de farelo de arroz fermentado. Em todos os testes, os filmes obtidos foram muito frágeis. Devido à impossibilidade das proteínas obtidas da biomassa fermentada formar uma matriz filmogênica coesa, e também ao baixo rendimento na extração das proteínas (Tabela 5.1), optou-se por trabalhar com as proteínas do farelo de arroz natural (sem fermentar) para elaboração de filmes e coberturas comestíveis.

5.4 CONCLUSÃO

O concentrado proteico de farelo de arroz fermentado apresentou um baixo rendimento, além disso, as proteínas obtidas a partir da fermentação não produziram filmes com boas propriedades de solubilidade, ópticas e mecânicas. As mudanças no perfil de aminoácidos e no tamanho das proteínas do concentrado proteico de farelo de arroz fermentado influenciaram negativamente nas propriedades destes filmes. Enquanto que o concentrado proteico de farelo de arroz sem fermentar apresentou melhores propriedades de solubilidade, ópticas e mecânicas.

CAPÍTULO 6

FILMES PROTEICOS DE FARELO DE ARROZ ADICIONADOS DE EXTRATO FENÓLICO DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO E ARGILA MONTMORILONITA

Este capítulo apresenta o trabalho realizado com as proteínas extraídas de farelo de arroz e utilizadas para preparar filmes biodegradáveis, elaborados com diferentes concentrações de glicerol, extrato fenólico de farelo de arroz fermentado e argila montmorilonita, sendo caracterizados os filmes produzidos.

6.1 INTRODUÇÃO

Os filmes biodegradáveis são usados como barreiras semipermeáveis para reduzir a taxa de respiração, retardar a perda de umidade e variação de cor, melhorar a textura e a integridade mecânica, reter aromas e inibir o crescimento de micro-organismos (MORETTI, 2007, EMBUSCADO e HUBER, 2009). O desenvolvimento de filmes comestíveis ou biodegradáveis decorre da demanda por alimentos de alta qualidade e de fácil preparo, bem como de preocupações ambientais com o descarte de materiais não renováveis resultando em oportunidades para criar novos mercados de matérias-primas para embalagens (FAKHOURI et al., 2007).

A eficiência funcional desses revestimentos depende da natureza de seus componentes, que determinam a composição e a estrutura do filme (ANDREUCCETTI, 2011; CERQUEIRA et al., 2011b). Estes podem ser obtidos a partir de polissacarídeos, proteínas e/ou lipídios, sendo as propriedades mecânicas dos filmes à base de proteínas, geralmente, superiores as obtidas com os demais polímeros (AZEREDO, 2003). As proteínas podem formar filmes devido à habilidade de suas cadeias laterais participarem de ligações inter cruzadas, cuja natureza determinará as propriedades dos filmes (EMBUSCADO e HUBER, 2009).

As proteínas de origem vegetal são mais utilizadas que as proteínas de origem animal para a produção de filmes em decorrência da disponibilidade e baixo custo das delas (ROJAS-GRAU et al., 2009; ADEBIYI et al., 2008). Os filmes proteicos também podem ser produzidos a partir de proteínas recuperadas de resíduos gerados durante o beneficiamento de cereais. Dentre estes está o arroz (*Oryza sativa*), um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, considerado o principal alimento para mais da metade da população mundial. Deste grão beneficiado resulta o farelo integral (OLIVEIRA et al., 2011; ÁVILA et al., 2008), que se constitui em uma fonte de proteína fácil de ser extraída e com aplicação para diferentes fins, inclusive elaboração de filmes biodegradáveis ou comestíveis (ADEBIYI et al., 2008).

A escolha de uma substância formadora de filme ou de um aditivo irá depender do objetivo desejado, da natureza do produto e da aplicação específica. No caso das proteínas, estas requerem aditivos como plastificantes para melhorarem a resistência e a elasticidade dos filmes (EMBUSCADO e HUBER, 2009). O glicerol é um dos plastificantes mais utilizados na elaboração de filmes e coberturas (BAE et al., 2009; ADEBIYI et al., 2008; CAO et al., 2007).

Sistemas híbridos orgânico-inorgânico, em particular, aqueles em que silicatos são dispersos em uma matriz polimérica, têm sido utilizados na formulação de filmes para melhorar suas propriedades. A montmorilonita, caracterizada pela sua moderada carga superficial negativa (TUNC et al., 2007), incluída na formulação de filmes biodegradáveis melhora a resistência mecânica, a resistência ao calor e as propriedades de barreira dos filmes (BAE et al., 2009; CHEN et al., 2006; ZHENG et al., 2002).

Além disso, esses revestimentos possuem um elevado potencial para transportar ingredientes ativos, tais como, agentes antiescurecimento, corantes, sabores, nutrientes, especiarias e compostos antimicrobianos que podem estender a vida útil ao reduzir o risco de crescimento de patógenos nas superfícies de alimentos (ROJAS-GRAU et al., 2009). Os compostos fenólicos oriundos da fermentação do farelo de arroz possuem atividade antioxidante e antimicrobiana (SOUZA et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2007b), com potencial para serem aplicados na elaboração de filmes e coberturas protetoras. Neste trabalho foi avaliado o efeito da adição de glicerol, argila montmorilonita e de extrato fenólico de farelo de arroz fermentado nas características físicas e mecânicas de filmes proteicos de farelo de arroz.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA)

O concentrado proteico utilizado na elaboração dos filmes foi obtido de farelo de arroz integral segundo metodologia adaptada por ADEBIYI et al. (2008). As amostras de farelo de arroz (granulometria de 32 mesh) foram desengorduradas utilizando éter de petróleo (3 vezes na proporção 1:7 m/v) sob agitação orbital a 100 rpm durante 1h. Após evaporação do excesso de éter de petróleo, o farelo de arroz desengordurado foi submetido a uma extração proteica em meio alcalino, sendo o pH do meio ajustado a 11,5 com uma solução de NaOH 0,1 M, na proporção 1:10 m/v, durante 30 min, a 25°C, com agitação orbital a 200 rpm. Após centrifugação (15200 g, 30 min, 10 °C), o sobrenadante foi recolhido e o resíduo submetido à nova extração. O sobrenadante das duas extrações foram reunidos e as proteínas extraídas foram precipitadas pelo ajuste do pH do meio a 4,5 com uma solução de HCl 0,1 M. Após repouso a 4 °C *overnight*, as proteínas foram separadas por centrifugação (15200 g, 30 min, 10 °C), seguido de lavagem do precipitado com água destilada. O concentrado proteico foi armazenado a -18 °C até a caracterização físico-química e

aplicação. Foram determinados os percentuais de proteína, lipídeos, cinzas e fibras, segundo metodologia da AOAC (2000) e carboidratos totais estimados por diferença.

6.2.2 Extrato fenólico

O extrato fenólico foi obtido a partir da fermentação em estado sólido do farelo de arroz integral com o fungo *Rhizopus oryzae* (CCT 1217), segundo método proposto por Oliveira et al. (2011). Amostras de farelo de arroz foram incubadas com uma solução de 4×10^6 esporos/g de farelo em biorreatores do tipo bandeja por 96 h a 30°C, onde foram adicionadas 45 mL de uma solução nutriente (2g/L de KH_2PO_4 , 1g/L de MgSO_4 e 5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) para cada 100 g farelo. A umidade do meio foi corrigida para 50 % com água destilada estéril.

Os compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado foram extraídos com metanol na proporção 1:10 (p/v), segundo método descrito por SOUZA et al. (2010b). Alíquotas de 5 g foram submetidas a agitação orbital (150 rpm) durante 3 h com metanol e filtrada para a obtenção do extrato bruto que foi submetido a uma partição com 10 mL de hexano (3 vezes). O solvente extrator foi evaporado em um rota-evaporador a 50 °C sob pressão reduzida e os compostos fenólicos foram ressuspensos com 10 mL de água destilada em banho ultrassônico por 10 min. O extrato resultante foi clarificado com 5 mL de ZnSO_4 0,1M e 5 mL $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,1M, permanecendo em repouso por 20 min. Após centrifugação (3200 g, 10 min, 25 °C) o sobrenadante contendo os compostos fenólicos foi recolhido, liofilizado e quantificado espectrofotometricamente a 750 nm com reagente de Folin-Ciocalteu utilizando uma curva padrão de ácido felúrico (0 – 20 mg).

6.2.3 Planejamento experimental e análise de efeitos

O CPFA foi utilizado como a matriz proteica para elaboração dos filmes e o glicerol foi utilizado como agente plastificante. Os compostos fenólicos oriundos da fermentação do farelo de arroz e a MMT foram utilizados como aditivos na formulação dos filmes. Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^4 para determinar o efeito da concentração de cada um destes componentes nas propriedades dos filmes (Tabela 6.1), sendo analisada a espessura, solubilidade, luminosidade, opacidade, tensão de ruptura, elongação, módulo de Young e permeabilidade ao vapor de água. Os resultados foram avaliados por análise de efeitos e de superfície de resposta usando o software *Statistica 7.0*. Foram geradas superfícies de resposta que apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,9 e valor F calculado para o

modelo matemático de no mínimo 2 vezes maior que o F de Fischer, considerando apenas os efeitos significativos ($p < 0,05$) em cada propriedade. Em anexo (Apêndice 4) constam as tabelas de Anova para verificação da validade estatística de cada modelo.

Tabela 6.1 - Valores reais e codificados dos fatores estudados.

Fator	Níveis		
	-1	0	1
Proteína (% m/v)	2	3	4
Glicerol (% m/m _{prot})	20	30	40
EF (mg/g _{prot})	0	20	40
MMT (% m/m _{prot})	0	5	10

Onde: EF = extrato fenólico; MMT = argila montmorilonita.

6.2.4 Elaboração dos filmes

O CPFA obtido de farelo de arroz integral e o extrato fenólico (EF) oriundo da fermentação do farelo de arroz foram utilizados na elaboração de filmes comestíveis, juntamente com o glicerol (agente plastificante) e a argila montmorilonita (MMT) (agente reticulante) que foram obtidos dos fabricantes Synth (Brasil) e Sigma-Aldrich (USA), respectivamente. O CPFA foi ressuspenso em meio alcalino utilizando uma solução de NaOH 0,1M para ajustar a pH 10. A solução foi aquecida até 85 °C, então foram adicionados o glicerol e a MMT (pré-hidratada com água destilada por 16 h antes de ser adicionada), mantendo o volume final da mistura em 20 mL, que foram submetidos a agitação (150 rpm) por 30 min. A mistura foi resfriada a 40 °C antes da adição do extrato fenólico e mantida sob agitação magnética por mais 10 min e em banho ultrassônico por 5 min para remoção das bolhas de ar. Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*, adicionando 20 mL da solução filmogênica em placas de petri de poliestireno (9 cm de diâmetro) que foram secas em estufa com circulação de ar por aproximadamente 24 h a 30 °C. Os filmes foram mantidos em dessecador contendo uma solução saturada de NaBr (UR de 58%) por 96 h antes das análises.

6.2.5 Caracterização dos filmes

6.2.5.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando um micrômetro digital (Insize IP54, Brasil) com sensibilidade de 0,001 mm. Sendo tomadas dez medidas para cada filme.

6.2.5.2 Solubilidade

Amostras circulares dos filmes de 2 cm de diâmetro foram secas em estufa a 105 °C até peso constante, sendo posteriormente imersas em 50 mL de água destilada e submetidas a agitação orbital (70 rpm) à temperatura ambiente por 24 h. Após este período, as amostras foram filtradas em cadinho poroso com lã de vidro e secas até peso constante a 105 °C, sendo determinada a massa de matéria seca que não foi solubilizada em água. A solubilidade foi determinada em triplicata de amostra.

6.2.5.3 Propriedades Ópticas

Os parâmetros de luminosidade (L^*) e a opacidade (Op) foram determinados utilizando um colorímetro *Minolta* (modelo Chroma Meter CR400, Brasil). Amostras dos filmes foram sobrepostos a um padrão branco ($Y = 93,5$; $x = 0,3114$; $y = 0,3190$) para a determinação da luminosidade. A opacidade foi calculada como sendo a relação entre a opacidade do filme sobreposto a um padrão preto e a um padrão branco, conforme proposto por Carvalho e Grosso (2006), segundo a Equação 6.1. Foram realizadas seis determinações para cada filme.

$$Op(\%) = \frac{P_{\text{Preto}}}{P_{\text{Branco}}} \times 100 \quad \text{Equação 6.1}$$

Onde: Op = opacidade; P_{preto} = valor da coordenada Y no padrão preto; P_{branco} = valor da coordenada Y no padrão branco.

6.2.5.4 Propriedades Mecânicas

A tensão de ruptura (TR) e a porcentagem de alongação (%E) dos filmes foram obtidas a partir das curvas de força-deformação determinadas em um texturômetro (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Inglaterra), operando de acordo com o método padrão ASTM D-882 (ASTM, 2001), separação inicial das garras de 50 mm e velocidade de realização dos testes de 100 mm/minuto. Os filmes foram recortados formando corpos de prova de 80 mm de comprimento e 25 mm de largura. O módulo de Young (MY) foi calculado a partir da tangente da porção linear inicial da curva

força-deformação (CAO et al., 2007a). Foram realizadas 5 determinações para cada filme.

6.2.5.5 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada utilizando uma adaptação da metodologia da ASTM E-9600 (ASTM, 2001). Aproximadamente 10 g de CaCl_2 (0% UR) foram colocadas em recipientes de poliestireno (área = $18,85 \text{ cm}^2$), selados com os filmes e acondicionados em dessecador contendo uma solução saturada de NaCl (75 %UR) a 25°C . A cada 24 h durante 7 dias foram realizadas determinações de massa. A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TVA) dos filmes foi determinada pelo coeficiente angular da curva ganho de massa de água versus tempo (coeficientes de correlação $> 0,99$). A partir do levantamento da taxa, foi calculada a permeabilidade segundo a Equação 6.2, determinada em triplicata.

$$PVA = TVA * \left(\frac{x}{\Delta P} \right) \quad \text{Equação 6.2}$$

Onde: PVA = permeabilidade ao vapor de água; x = espessura; ΔP = diferença de pressão parcial de vapor.

6.2.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos filmes foi examinada usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Nova NanoSEM 200, Holanda). As amostras foram montadas em base de alumínio usando fita adesiva de carbono e revestida por pulverização catódica com ouro (cerca de 10 nm de espessura) antes das análises.

6.2.5.7 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

O espectro no infravermelho dos filmes foi determinado usando a Transformada de Fourier no infravermelho (Perkin-Elmer 16 PC spectrometer, Estados Unidos), utilizando a técnica de refletância total atenuada e análise do espectro na faixa entre 600 e 4000 cm^{-1} usando 16 scans.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Caracterização da matéria-prima

O farelo de arroz integral, subproduto do processamento do arroz, possui um conteúdo proteico superior a 16% (Tabela 6.2). A partir deste foi obtido o CPFA com teor de proteína acima de 70 g/100g_{bs}, similar ao encontrado por Gnanasambandam et al. (1997) e maior do que o encontrado por Adebiyi et al. (2008) e Chandi e Sogi (2007), entre 54 e 59%, respectivamente.

O CPFA apresentou um aumento de mais de 4 vezes em proteína, mas os níveis de carboidratos permaneceram elevados em função da difícil separação da celulose, lignina, hemicelulose e do próprio amido associado à proteína (ADEBIYI et al., 2008). O residual de lipídios embora inferior a 1%, ainda pode influenciar algumas propriedades dos filmes (EMBUSCADO e HUBER, 2009).

Tabela 6.2 - Composição do farelo de arroz integral e do concentrado proteico (base seca).

Componente (g/ 100g)	FA	CPFA
Proteínas	16,5 ± 0,4	71,7 ± 5,3
Lipídeos	18,1 ± 0,2	0,5 ± 0,3
Cinzas	9,4 ± 0,1	2,9 ± 0,3
Carboidratos	50 ± 0,4	24,9 ± 4,7
Umidade	16,4 ± 1,6	68,1 ± 5,9
Conteúdo Fenólico	FA	FAF
mg/g	2,41 ± 0,01	4,33 ± 0,06

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Onde: FA = farelo de arroz; CPFA = concentrado proteico de farelo de arroz. FAF = farelo de arroz fermentado.

O conteúdo fenólico foi aumentado em cerca de 80% com a fermentação (Tabela 6.2). Um aumento significativo no conteúdo de compostos fenólicos após o processo fermentativo também vêm sendo relatado por outros pesquisadores (SCHMIDT e FURLONG, 2012; MARTINS et al., 2011).

Os compostos fenólicos contidos na parede celular do farelo de arroz estão ligados a carboidratos e a lignina (POURALI et al. 2010; ZHANG et al., 2010) e durante a fermentação estes são liberados pela atuação do microrganismo sob os compostos estruturais do farelo de arroz (SCHMIDT e FURLONG, 2012). Os fenóis predominantes no arroz são os ácidos fenólicos (ZHOU et al., 2004), principalmente

ferúlico e o ácido cumárico que possuem atividade antioxidante, podendo apresentar também atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2010b), o que os tornam potenciais ingredientes para aplicação em filmes biodegradáveis ou em revestimentos comestíveis.

6.3.2 Planejamento experimental

As propriedades dos filmes foram fortemente afetadas pelos compostos utilizados na elaboração da solução filmogênica (Tabela 6.3) a partir das formulações adotadas segundo o planejamento experimental. A espessura dos filmes variou entre 0,08 mm até 0,19 mm, a solubilidade entre 24,7 e 40,2%, os valores de luminosidade e opacidades na faixa entre 60 e 81 (L^*) e 14 e 27%, respectivamente. As propriedades mecânicas dos filmes foram as que apresentaram maiores variações, sendo que a tensão de ruptura variou entre 1,5 e 8,6 MPa, a elongação entre 0,8 e 70,1% e módulo de elasticidade entre 16,7 e 617,5 MPa. Os filmes apresentaram permeabilidade ao vapor de água na faixa entre 7,5 e 24,8 g.mm/d.m².KPa.

Tabela 6.3 - Valores de espessura, solubilidade, luminosidade, opacidade, tensão de ruptura, elongação, elasticidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

Ensaio	[P] %m/v	[G] %m/mg ²	[EF] mg/g ²	[MMT] %m/mg ²	Espessura mm	Solubilidade %	Luminosidade L [*]	Opacidade %	TR Mpa	Elongação %	MY Mpa	PVA g ² /m ² .kPa
1	-1 (2)	-1 (20)	-1 (0)	-1 (0)	0,08 ± 0,01	37,2 ± 3,1	78,9 ± 0,8	18,1 ± 1,5	5,2 ± 0,2	26,1 ± 3,7	216,0 ± 81,4	7,7 ± 0,2
2	1 (4)	-1 (20)	-1 (0)	-1 (0)	0,16 ± 0,01	24,7 ± 0,8	61,6 ± 4,7	26,5 ± 2,0	6,5 ± 1,0	7,8 ± 0,9	218,6 ± 31,3	10,2 ± 1,2
3	-1 (2)	1 (40)	-1 (0)	-1 (0)	0,09 ± 0,01	29,4 ± 2,5	81,0 ± 2,4	15,5 ± 1,0	3,3 ± 0,5	29,0 ± 0,2	84,5 ± 4,1	11,7 ± 1,2
4	1 (4)	1 (40)	-1 (0)	-1 (0)	0,18 ± 0,01	30,1 ± 0,4	63,9 ± 3,8	23,3 ± 1,7	4,3 ± 0,2	52,7 ± 4,2	98,7 ± 2,3	17,1 ± 0,4
5	-1 (2)	-1 (20)	1 (40)	-1 (0)	0,08 ± 0,01	36,0 ± 1,7	77,7 ± 4,3	15,4 ± 1,5	8,6 ± 1,9	1,6 ± 0,9	617,5 ± 97,4	10,6 ± 0,3
6	1 (4)	-1 (20)	1 (40)	-1 (0)	0,13 ± 0,01	31,6 ± 2,1	66,3 ± 3,6	19,6 ± 1,7	6,9 ± 0,7	0,8 ± 0,2	551,9 ± 94,3	10,4 ± 0,2
7	-1 (2)	1 (40)	1 (40)	-1 (0)	0,08 ± 0,01	36,4 ± 1,3	80,1 ± 2,6	14,1 ± 1,4	3,3 ± 0,6	33,4 ± 4,2	51,3 ± 2,4	11,8 ± 1,1
8	1 (4)	1 (40)	1 (40)	-1 (0)	0,16 ± 0,02	34,5 ± 1,5	65,3 ± 4,3	20,1 ± 1,7	2,3 ± 0,2	56,8 ± 6,9	41,1 ± 4,1	21,3 ± 1,1
9	-1 (2)	-1 (20)	-1 (0)	1 (10)	0,07 ± 0,01	33,7 ± 1,0	80,5 ± 2,6	16,3 ± 1,4	3,1 ± 0,1	17,9 ± 1,1	57,7 ± 11,6	7,5 ± 0,5
10	1 (4)	-1 (20)	-1 (0)	1 (10)	0,15 ± 0,01	28,1 ± 0,7	60,2 ± 5,6	26,9 ± 3,5	5,8 ± 0,7	4,9 ± 2,3	147,4 ± 3,2	9,3 ± 0,9
11	-1 (2)	1 (40)	-1 (0)	1 (10)	0,09 ± 0,01	40,2 ± 5,1	80,2 ± 1,7	15,4 ± 1,1	1,5 ± 0,1	31,2 ± 4,1	16,7 ± 2,9	13,1 ± 1,3
12	1 (4)	1 (40)	-1 (0)	1 (10)	0,17 ± 0,01	30,2 ± 1,6	65,0 ± 3,7	23,5 ± 2,2	2,4 ± 0,1	31,2 ± 6,8	46,0 ± 5,9	19,5 ± 0,6
13	-1 (2)	-1 (20)	1 (40)	1 (10)	0,09 ± 0,01	31,7 ± 1,5	73,4 ± 6,7	16,5 ± 1,8	6,1 ± 0,7	1,6 ± 0,4	261,4 ± 69,6	7,5 ± 0,8
14	1 (4)	-1 (20)	1 (40)	1 (10)	0,16 ± 0,01	26,1 ± 0,6	64,0 ± 3,7	21,7 ± 1,8	7,6 ± 0,3	1,6 ± 0,3	318,9 ± 55,5	10,8 ± 1,3
15	-1 (2)	1 (40)	1 (40)	1 (10)	0,11 ± 0,01	37,8 ± 0,9	79,3 ± 2,4	16,4 ± 0,8	2,3 ± 0,1	22,2 ± 3,7	30,9 ± 2,4	12,2 ± 1,9
16	1 (4)	1 (40)	1 (40)	1 (10)	0,19 ± 0,01	32,2 ± 0,4	64,2 ± 1,6	21,8 ± 0,5	2,4 ± 0,1	30,9 ± 3,7	35,8 ± 2,3	24,8 ± 2,1
17	0 (3)	0 (30)	0 (20)	0 (5)	0,11 ± 0,01	36,3 ± 0,9	76,4 ± 1,9	16,4 ± 1,5	2,5 ± 0,2	69,6 ± 1,2	33,8 ± 4,8	12,8 ± 0,5
18	0 (3)	0 (30)	0 (20)	0 (5)	0,11 ± 0,01	34,2 ± 0,5	74,9 ± 2,2	17,7 ± 1,3	2,3 ± 0,3	68,5 ± 9,1	24,3 ± 3,7	13,7 ± 1,5
19	0 (3)	0 (30)	0 (20)	0 (5)	0,13 ± 0,01	35,8 ± 0,2	74,1 ± 1,6	16,7 ± 1,2	2,2 ± 0,2	70,1 ± 16,6	23,7 ± 1,0	12,8 ± 0,9

Onde: [P] = concentração de proteína; [G] = concentração de glicerol; [EF] = concentração de extrato fenólico; [MMT] = concentração de montmorilonita; TR = tensão de ruptura; MY = módulo de Young; PVA = permeabilidade ao vapor de água.

6.3.3 Efeito da concentração de proteína

O único fator que afetou significativamente ($p < 0,05$) a espessura dos filmes foi a concentração de proteína (Tabela 6.4), demonstrado pelo aumento de 0,077 mm na espessura ao ser duplicada a concentração proteica, comportamento também foi observado por outros autores (SOBRAL 2000, KOKOSZKA et al., 2010a). No entanto, a espessura final não é uma função linear do conteúdo de matéria seca da solução filmogênica. A espessura final do filme depende principalmente da retração do filme quando o solvente evapora, da taxa de evaporação do solvente, que afeta a organização da rede proteica, e da desnaturação da proteína em função da temperatura de secagem (SOBRAL, 2000; KOKOSZKA et al., 2010a).

Concentrações proteicas de 2% e 3% produziram filmes de espessura abaixo e em torno de 0,1 mm, respectivamente, enquanto que concentrações de 4% produziram filmes de elevadas espessuras (0,19 mm). Valores semelhantes de espessuras foram reportados por Adebiyi et al. (2008), Kokoszka et al. (2010b) e Munõz et al. (2012) para filmes proteicos de farelo de arroz, isolado de soja e concentrado proteico de soro de leite, respectivamente.

A concentração de proteína foi também o fator que mais afetou a solubilidade dos filmes (Tabela 6.4), acarretando em uma diminuição de até 10% na solubilidade, devido ao aumento da interação proteína-proteína, promovida pela presença de ligações dissulfeto intermoleculares (GOUNGA et al., 2007). No entanto, a solubilidade dos filmes foi menor do que as obtidas de outras fontes como soro de leite (OZDEMIR e FLOROS, 2008), isolado proteico de soja e de gelatina de bacalhau (DENAVI et al., 2009).

A solubilidade direciona a aplicação do filme como revestimento em produtos alimentícios. Em alguns casos, a sua total solubilização em água pode ser benéfica, como nos produtos semiprontos, destinados ao preparo sob cozimento (FAKHOURI et al., 2007). Entretanto, para alimentos com elevado teor de água, como a maioria dos tecidos vegetais, filmes com elevada solubilidade não são indicados, além disso, filmes com agentes antimicrobianos de fraca resistência a água poderão se dissolver, causando a perda deste agente (OZDEMIR e FLOROS, 2008).

Tabela 6.4 – Efeito das concentrações de proteína, glicerol, fenóis e argila montmorilonita nas propriedades dos filmes.

Fator	Espessura (mm)		Solubilidade (%)		Luminosidade (L [*])		Opacidade (%)		TR (MPa)		Elongação (%)		MY (MPa)		PVA (g mm/d m ² KPa)	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Media	0,123	0,0004	32,96	0,0001	71,83	<0,0001	19,04	0,0001	4,14	0,0001	29,36	<0,0001	151,37	0,0001	12,87	0,0001
[P]	0,077	0,0046	-5,81	0,0003	-14,82	0,0015	6,98	0,0026	0,56	0,0212	2,97	0,0180	15,29	0,0329	5,16	0,0025
[G]	0,019	0,0691	2,70	0,0386	2,29	0,0580	-1,35	0,0629	-3,51	0,0006	28,15	0,0002	-248,06	0,0001	7,18	0,0013
[EF]	0,001	0,8326	1,58	0,1014	0,11	0,8625	-2,51	0,0196	0,93	0,0079	-6,48	0,0039	127,92	0,0005	1,68	0,0230
[MMT]	0,009	0,2347	0,02	0,9778	-0,73	0,3311	0,74	0,1721	-1,12	0,0055	-8,32	0,0024	-120,62	0,0006	0,49	0,1984
[P] x [G]	0,006	0,3789	1,42	0,1215	-0,73	0,3328	-0,14	0,7307	-0,34	0,0545	11,00	0,0013	-5,77	0,1800	3,29	0,0062
[P] x [EF]	-0,007	0,3287	1,24	0,1515	2,16	0,0648	-1,75	0,0391	-0,87	0,0090	4,86	0,0068	-19,64	0,0225	1,16	0,0469
[P] x [MMT]	0,000	1,0000	-1,09	0,1942	-0,16	0,8086	0,36	0,4187	0,71	0,0135	-4,05	0,0098	30,06	0,0088	0,96	0,0797
[G] x [EF]	0,002	0,7276	1,17	0,1059	-0,41	0,6501	1,15	0,0636	-1,20	0,0048	6,27	0,0041	-149,58	0,0004	0,51	0,1892
[G] x [MMT]	0,005	0,4714	2,51	0,0442	0,35	0,6044	0,30	0,4902	-0,01	0,9109	-5,75	0,0049	84,05	0,0011	1,44	0,0308
[EF] x [MMT]	0,015	0,1072	-2,72	0,0379	-1,36	0,1420	1,07	0,0654	0,48	0,0290	-0,76	0,2005	-33,12	0,0073	-0,19	0,5399

Onde: [P] = concentração de proteína; [G] = concentração de glicerol; [EF] = concentração de extrato fenólico; [MMT] = concentração de montmorilonita; TR = tensão de ruptura; MY = módulo de Young; PVA = permeabilidade ao vapor de água.

As características ópticas dos filmes são importantes para aceitação pelos consumidores, além de prevenir a oxidação induzida pela exposição à luz. Novamente a concentração proteica foi o fator que mais afetou as propriedades ópticas dos filmes, sendo o único fator que afetou a luminosidade ($p<0,05$). A luminosidade dos filmes apresentou valores semelhantes aos encontrados por Guerrero et al. (2011) para filmes de isolado proteico de soja, com uma tonalidade amarelada (b^{*+} , Anexo 5) que pode ser verificada na Figura 6.1. O incremento na concentração de proteína promoveu um aumento na absorção de luz, reduzindo a passagem dela e a quantidade transmitida, assim diminuindo a luminosidade e aumentando a opacidade dos filmes.

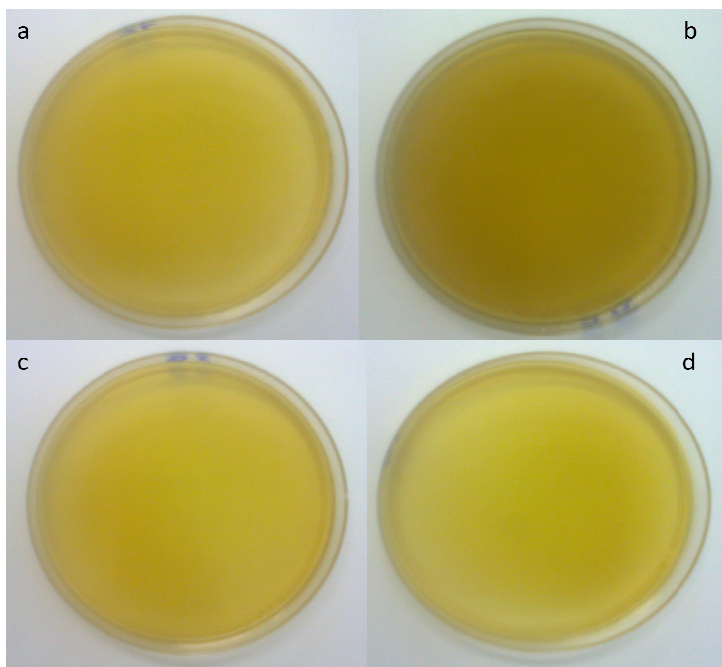


Figura 6.1 – Filmes proteicos de farelo de arroz com formulação correspondente aos ensaios 1 (2% de proteína + 20% de glicerol), 2 (4% de proteína + 20% de glicerol), 5 (2% de proteína + 20% de glicerol + 40 mg/g de extrato fenólico) e 9 (2% de proteína + 20% de glicerol + 10% de MMT).

O aumento na concentração de proteína nos filmes produziu efeitos positivos ($p<0,05$) nas propriedades mecânicas e na permeabilidade ao vapor de água. As proteínas são muito diferentes dependendo da origem, estrutura e a composição de aminoácidos. As interações proteína-proteína envolvidas na formação do filme determinam o grau de reticulação e o caráter hidrofílico/hidrofóbico destes, estando

também relacionadas com as propriedades físico-químicas, mecânicas e de barreira (DENAUI et al., 2009). Além disso, a natureza hidrofílica/hidrofóbica dos aminoácidos presentes em filmes proteicos pode influenciar a liberação e retenção de compostos antimicrobianos incorporados.

6.3.4 Efeito da concentração de glicerol

O glicerol é um dos plastificantes de grau alimentício mais utilizado na elaboração de revestimentos comestíveis. Um plastificante é uma pequena molécula de baixa volatilidade, que se soma aos materiais poliméricos, modificando a organização tridimensional, diminuindo as forças intermoleculares atrativas, e aumentando o volume livre e mobilidade da cadeia polimérica. Em consequência o plastificante altera as propriedades funcionais dos filmes, promovendo uma maior extensibilidade e flexibilidade, diminuindo a coesão, a elasticidade, as propriedades mecânicas e a rigidez (KOKOSZKA et al., 2010a; ADEBIYI et al., 2008), prevenindo as quebras durante a embalagem e o transporte (CAO et al., 2007). Neste caso, estas modificações ficaram demonstradas, pois o aumento na concentração de glicerol afetou a solubilidade, as propriedades mecânicas e a PVA dos filmes (Tabela 6.4).

O efeito da adição de glicerol sobre a solubilidade de filmes elaborados com proteína de farelo de arroz também foi verificada por Adebisi et al. (2008), que relataram que o aumento da concentração de glicerol poderia abrir a estrutura do polímero e aumentar a permeabilidade à água.

A adição de glicerol produziu um efeito negativo de 3,5 MPa na tensão de ruptura dos filmes, cuja interação com as proteínas promoveu um efeito positivo na elongação dos filmes. Com relação à elasticidade, o aumento na concentração de glicerol acarretou no enfraquecimento das ligações, diminuindo a elasticidade dos filmes. O efeito do aumento da concentração de glicerol nas propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis também foi relatado por Cao et al. (2007), que verificaram que a tensão e a elasticidade diminuíam enquanto que a elongação aumentava. Um grande número de grupos hidroxila e grupos carboxila ao longo das moléculas de proteínas podem ser responsáveis por numerosas pontes de hidrogênio entre as cadeias moleculares. Essas extensivas interações contribuem para a resistência mecânica dos filmes. Porém uma maior concentração de glicerol pode perturbar a ligação de hidrogênio entre as moléculas de proteína, enfraquecendo assim a resistência mecânica dos filmes de proteínas (ADEBIYI et al., 2008).

Com relação à PVA, esta deve ser a mais baixa possível para evitar a transferência de umidade entre o alimento e a atmosfera ao redor (DIAS et al., 2010). A PVA dos filmes de farelo de arroz foi principalmente afetada pela concentração de glicerol e de proteína (Tabela 6.4). O aumento na concentração desses componentes promoveu um aumento na PVA dos filmes, e a interação entre estas duas variáveis também provocou um aumento na taxa de permeação, como também foi observado por Kokoszka et al. (2010a) para filmes proteicos a base de soja. Os menores valores de PVA foram obtidos em baixas concentrações de proteína e glicerol (Figura 6.2), obtendo-se valores inferiores a 7,5 g.mm/d.m².KPa, inferiores aos encontrados por Ozdemir e Floros (2008) para filmes de proteínas do soro de leite.

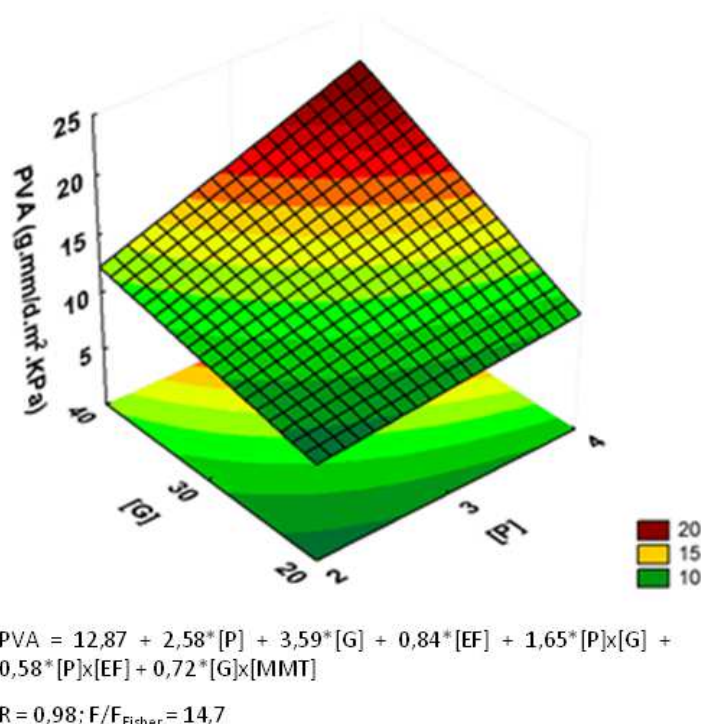


Figura 6.2 - Superfície de resposta relacionando a permeabilidade ao vapor de água com as concentrações de glicerol e de proteína. Onde: [P] = concentração de proteína (% m/v); [G] = concentração de glicerol (% m/m_{proteína}); [EF] = concentração de extrato fenólico (mg/m_{proteína}); [MMT] = concentração de argila montmorilonita (% m/m_{proteína}); R = coeficiente de correlação do modelo matemático; F = valor F do modelo matemático; F_{Fisher} = valor F de Fischer.

Um aumento na concentração de plastificante normalmente causa um aumento na PVA de filmes devido à reorganização da rede proteica e consequente aumento no volume livre (DIAS et al., 2010; GOUNGA et al., 2007). Além disso, o glicerol

apresenta uma ação favorável à adsorção e absorção de moléculas de água pelos filmes (COUPLAND et al., 2000).

6.3.5 Efeito da adição de extrato fenólico

A adição de extrato fenólico na elaboração dos filmes afetou as propriedades ópticas, mecânicas e de PVA (Tabela 6.4). A interação entre o EF e a concentração de proteína também afetou a opacidade dos filmes ($p < 0,05$). A opacidade é um importante elemento para controlar a incidência de luz em um alimento (CARNEIRO-da-CUNHA et al., 2009), sendo um indicativo da quantidade de luz que passa através de um material (LIMA et al., 2010), o que pode proteger contra processos oxidativos. Os maiores valores de opacidade foram obtidos em menores concentrações de EF e maiores de proteína, obtendo-se um valor de opacidade de 27% (Figura 6.3).

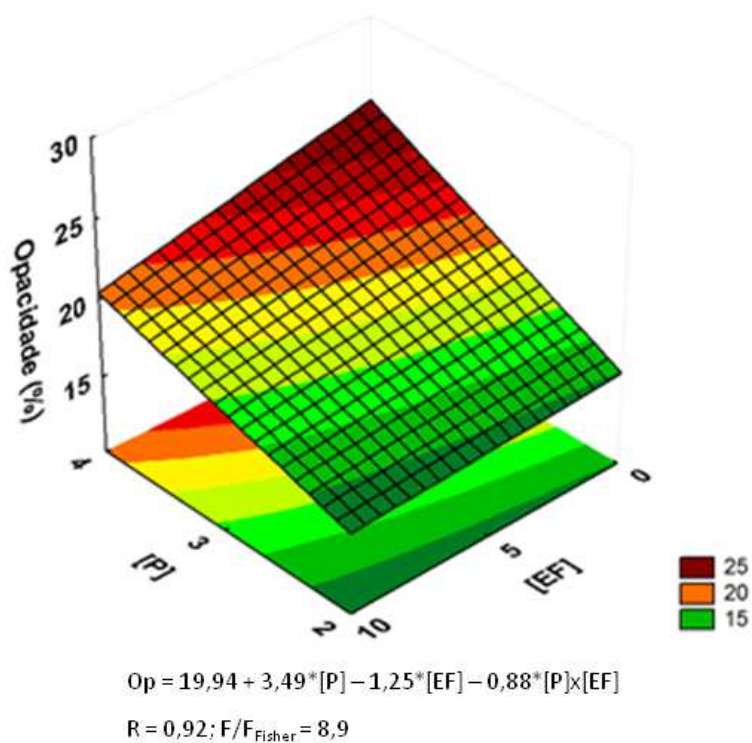
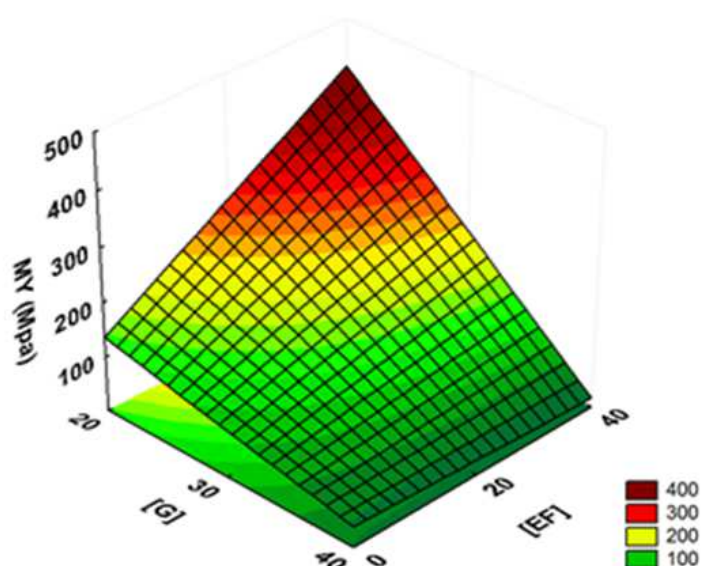


Figura 6.3 - Superfície de resposta relacionando a opacidade dos filmes com as concentrações de proteína e extrato fenólico. Onde: [P] = concentração de proteína (% m/v); [G] = concentração de glicerol (% m/m_{proteína}); [EF] = concentração de extrato fenólico (mg/ m_{proteína}); [MMT] = concentração de argila montmorilonita (% m/m_{proteína}); R = coeficiente de correlação do modelo matemático; F = valor F do modelo matemático; F_{Fisher} = valor F de Fischer.

A adição de EF produziu um efeito positivo na tensão de ruptura e um efeito negativo na elongação dos filmes, sendo o fator que mais contribuiu para o aumento da elasticidade dos filmes (Tabela 6.4). Através da Figura 6.4, pode-se notar que a elasticidade dos filmes foi maior para maiores concentrações de EF e menores de glicerol, obtendo-se valores superiores a 600 MPa, valores bem superiores aos encontrados para filmes de isolado proteico de soja e de gelatina, cuja valores máximos foram em torno de 160 MPa (GUERRERO et al., 2011).



$$MY = 151,37 + 7,65 * [P] - 124,03 * [G] + 63,96 * [EF] - 60,31 * [MMT] - 9,32 * [P] \times [EF] \\ + 15,03 * [P] \times [MMT] - 74,79 * [G] \times [EF] + 42,03 * [G] \times [MMT] - 16,56 * [EF] \times [MMT]$$

$$R = 0,94; F/F_{Fisher} = 2,2$$

Figura 6.4 - Superfície de resposta relacionando o módulo de Young com as concentrações de glicerol e de extrato fenólico. Onde: [P] = concentração de proteína (% m/v); [G] = concentração de glicerol (% m/m_{proteína}); [EF] = concentração de extrato fenólico (mg/ m_{proteína}); [MMT] = concentração de argila montmorilonita (% m/m_{proteína}); R = coeficiente de correlação do modelo matemático; F = valor F do modelo matemático; F_{Fisher} = valor F de Fischer.

Os compostos fenólicos oriundos da fermentação do farelo de arroz possuem atividade antioxidante e antimicrobiana (SOUZA et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2007b). Porém a inclusão de um aditivo também pode modificar as propriedades de filmes e coberturas comestíveis, devido as mudanças físicas induzidas na estrutura do filme promovendo alterações nas interações polímero-polímero (EMBUSCADO e HUBER, 2009), interagindo em mais de um local na proteína e induzindo a formação de ligações cruzadas entre proteínas (NUTHONG et al., 2009).

Essas interações são influenciadas pelo tipo de composto fenólico, no caso do extrato fenólico de farelo de arroz fermentado há uma mistura de compostos com diferentes níveis de associação. Sendo que o ácido ferúlico, um dos principais compostos fenólicos do farelo de arroz, pode reagir com os aminoácidos da proteína como demonstrado por Ou et al. (2005), que ao adicionarem ácido ferúlico em filmes de isolado protéico de soja, relataram um aumento na força de tensão dos filmes.

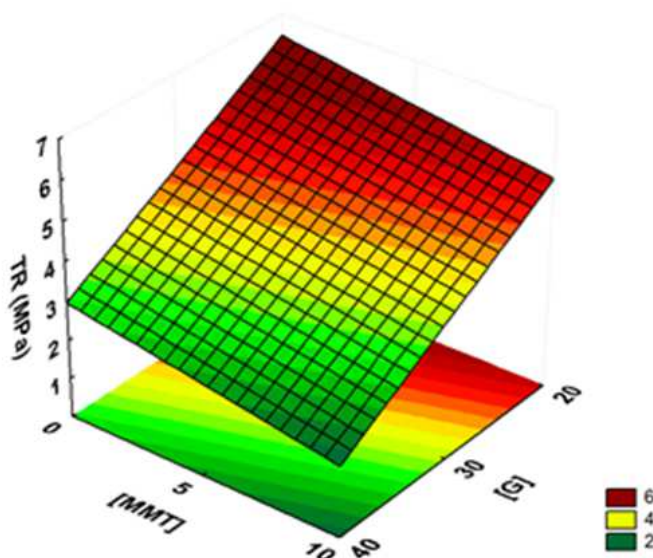
Nas formulações estudadas a adição de extrato fenólico também promoveu um acréscimo significativo ($p < 0,05$) na PVA dos filmes (Tabela 6.4). Os compostos fenólicos são o maior grupo de substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana da maioria dos extratos vegetais, pois promovem alterações nas membranas celulares bacterianas, retardando o crescimento e a multiplicação (GUERRERO et al., 2011; SIVAROUBAN et al., 2008). Além do efeito antimicrobiano, os compostos fenólicos de vegetais possuem elevada capacidade antioxidante, principalmente devido às propriedades redox, que incluem removedores de radicais livres, doando hidrogênio e oxigênio singleto (MAYACHIEW e DEVAHASTIN, 2010). Portanto, a utilização destes compostos na formulação de revestimentos comestíveis pode ser interessante para aplicação como películas em produtos vegetais minimamente processados (*fresh-cut*), que possuem uma taxa metabólica mais acelerada devido as reações de degradação induzidas pelo corte, e a exposição de seus tecidos.

6.3.6 Efeito da adição de MMT

A MMT é um tipo de argila que vem sendo utilizada ultimamente na elaboração de filmes comestíveis visando à melhoria em suas propriedades mecânicas (CHEN et al., 2006; ZHENG et al., 2002). Neste estudo a utilização de argila MMT não apresentou melhorias significativas nas propriedades dos filmes. A adição de MMT aos filmes afetou negativamente ($p < 0,05$) as propriedades mecânicas (Tabela 6.4), sendo que maiores valores de TR (8,6 MPa) foram obtidos sem a adição de MMT e menores concentrações glicerol (Figura 6.5).

A adição de MMT não afetou ($p < 0,05$) as outras propriedades, somente suas interações, com o glicerol aumentou a solubilidade e a PVA dos filmes, enquanto que a interação com o EF diminuiu a solubilidade dos filmes. Quando as camadas de argila são uniformemente distribuídas em uma matriz polimérica contínua, resulta em uma estrutura esfoliada. A esfoliação completa pelas técnicas convencionais é muito difícil, devido à grande dimensão lateral das camadas, da alta viscosidade intrínseca do

polímero e da forte tendência dos tactóides de argila em se aglomerar (ZHU e WOOL, 2006; RAY e BOUSMINA, 2005).



$$TR = 4,14 + 0,28*[P] - 1,75*[G] + 0,47*[EF] - 0,56*[MMT] - 0,44*[P] \times [EF] + 0,36*[P] \times [MMT] - 0,60*[G] \times [EF] + 0,24*[EF] \times [MMT]$$

$R = 0,91; F/F_{Fisher} = 2,1$

Figura 6.5 - Superfície de resposta relacionando a tensão de ruptura com as concentrações de argila montmorilonita e glicerol. Onde: [P] = concentração de proteína (% m/v); [G] = concentração de glicerol (% m/m_{proteína}); [EF] = concentração de extrato fenólico (mg/ m_{proteína}); [MMT] = concentração de argila montmorilonita (% m/m_{proteína}); R = coeficiente de correlação do modelo matemático; F = valor F do modelo matemático; F_{Fisher} = valor F de Fischer.

6.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A observação microscópica da superfície dos filmes fornece informações sobre a integridade, continuidade e também sobre a organização estrutural da matriz polimérica filmogênica. Estas características podem ajudar a explicar a funcionalidade dos filmes quanto à sua resistência física e às propriedades de barreira à permeação de água e gases (SOUZA et al., 2010a; FAKFOURI, 2002). A superfície dos filmes elaborados apenas com proteínas de farelo de arroz em baixa concentração de glicerol não apresentaram características estruturais visivelmente diferentes dos filmes adicionados de extrato fenólico (Figuras 6.6a e 6.6c), onde pequenos orifícios foram observados na superfície, possivelmente em decorrência de bolhas de ar.

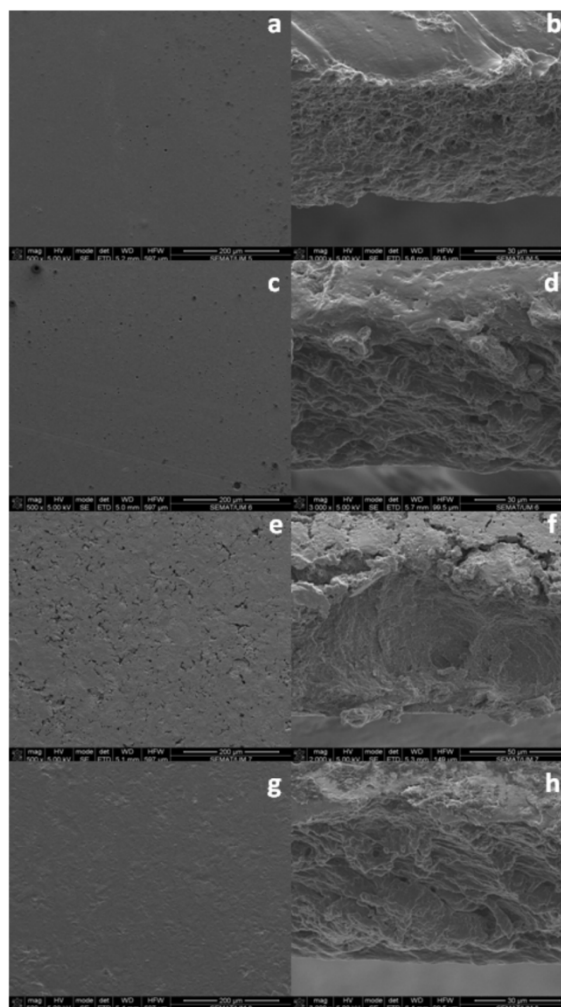


Figura 6.6 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies (a,c,e,g) e da seção transversal (b,d,f,h) de filmes proteicos de farelo de arroz elaboradas a partir das formulações referentes aos ensaios 1, 5, 9 e 17.

Algumas irregularidades também foram observadas nas superfícies dos filmes, que podem estar relacionadas com a presença de mais de uma macromolécula na matriz polimérica. O CPFA apresentava cerca de 25% de polissacarídeos em sua composição (Tabela 6.2), o que poderia influenciar na homogeneidade dos filmes. Efeito semelhante foi relatado por Dias et al. (2010) em filmes de farinha de arroz.

Um pequeno aumento na porosidade dos filmes adicionados de EF (Figura 6.6d) em relação aos filmes sem EF (Figura 6.6b) pode ser observada, o que contribuiu para o aumento na PVA dos filmes (Tabela 6.4). Comportamento semelhante foi relatado por Arcan et al. (2011) para filmes de zeína adicionados de ácidos ferúlico e gálico.

A adição de MMT aos filmes em concentrações de 5 %m/v pareceu corrigir algumas imperfeições (Figuras 6.6g e 6.6h), diminuindo a porosidade e formando uma superfície mais densa (Figura 6.6f), porém concentrações de 10 %m/v provocaram excessos de rachaduras nas superfícies dos filmes (Figura 6.6e) o que corrobora os efeitos negativos produzidos na tensão de ruptura, alongação e elasticidade dos filmes (Tabela 6.4). A adição de MMT aos filmes provoca uma diminuição da sensibilidade à água, que pode ser atribuída a uma mudança na estrutura da rede proteica na presença das partículas de MMT (DIEGUÉZ, 2010; TUNC et al., 2007), favorecendo a perda de água durante a secagem, causando fissuras na superfície dos filmes.

6.3.8 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A análise estrutural dos filmes foi realizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho para avaliar as interações entre os componentes da formulação (AKHTAR et al., 2012). Os filmes apresentaram uma ampla banda de absorção em torno de 3280 cm^{-1} (Figura 6.7), esta absorção é característica dos compostos que contem água, pois correspondem ao estiramento das ligações -OH e absorção da banda amida A das proteínas (MORAES et al., 2007). Os picos em 2950 e 2850 cm^{-1} correspondem aos estiramentos C-H (das ligações CH_2 assimétrica e simétrica, respectivamente). Todas as proteínas de origem vegetal apresentam uma absorção similar na faixa de $1630\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$, $1510\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$, e $1310\text{-}1235\text{ cm}^{-1}$, correspondentes as bandas amida I, II e III, respectivamente (MATHEW e ABRAHAM, 2008; GORINSTEIN et al., 2005).

Os espectros de absorção dos filmes de diferentes formulações apresentaram regiões de absorção semelhantes, diferindo apenas na intensidade de absorção das bandas. Filmes adicionados com EF (Figura 6.7) apresentaram maiores absorções em todo o espectro quando comparados com filmes sem EF, indicando uma maior interação dos compostos contidos no extrato fenólico com as proteínas do CPFA, possivelmente decorrente da presença de hidroxilas que promovem o aumento do número de pontes de hidrogênio na matriz proteica. Bandas de absorção em 1600 e 1520 cm^{-1} também podem ser atribuídas a vibrações das ligações $\text{C}=\text{C}$ típicas de sistemas aromáticos. Uma forte contribuição da deformação -OH pode ser encontrada na região de $1410\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$. Vibrações fortes de valência entre 1150 e 1040 cm^{-1} sobrepõem a impressão aromática de bandas em $1225\text{-}950\text{ cm}^{-1}$. Vibrações simétricas

de deformação CH_3 ocorrem na região de $1190\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ (EDELMANN et al., 2001). Essas bandas coincidiram com as bandas apresentadas pelo CPFA.

Ao contrário, a adição de MMT aos filmes diminuiu a absorção dos picos ao longo de toda faixa do espectro (Figura 6.7), principalmente na região em torno de 3400 cm^{-1} e entre 1700 e 1500 cm^{-1} , regiões características de absorção dos grupos --NH dos aminoácidos e das bandas amida I e II das proteínas, indicando a interação da MMT com esses grupamentos proteicos, resultando na redução da vibração desses grupos funcionais das proteínas.

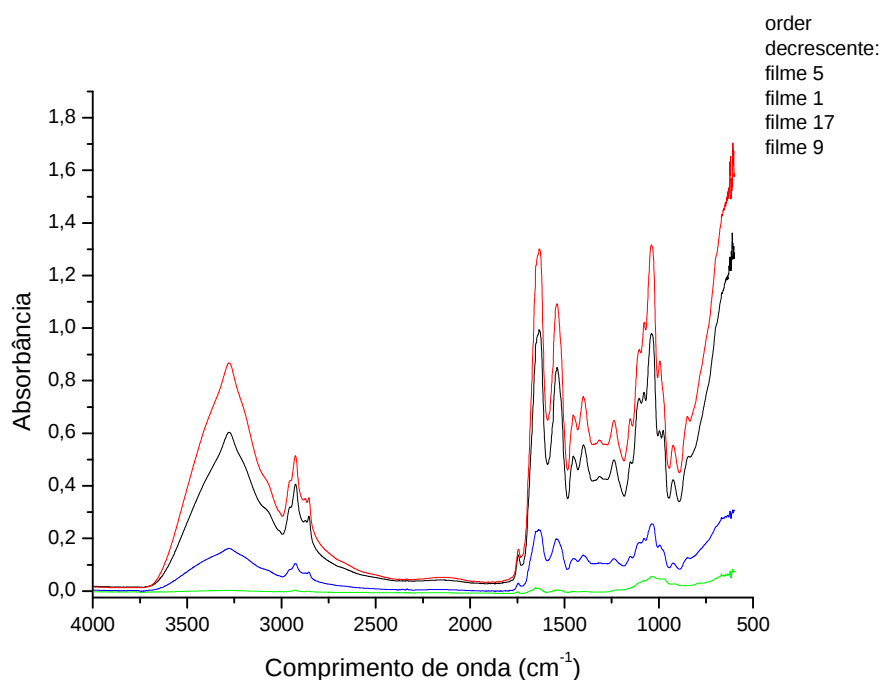


Figura 6.7 – FTIR de filmes proteicos de farelo de arroz elaboradas a partir das formulações referentes aos ensaios 1(proteína 2 %m/v + glicerol 20% m/m_{prot}), 5 (proteína 2 %m/v + glicerol 20 %m/m_{prot} + extrato fenólico 40 mg/g_{prot}), 9 (proteína 2 %m/v + glicerol 20 %m/m_{prot} + argila MMT 10 %m/g_{prot}) e 17 (proteína 3 %m/v + glicerol 30 %m/m_{prot} + extrato fenólico 20 mg/g_{prot} + argila MMT 5 %m/g_{prot}).

Os espectros na região do infravermelho são comumente congestionados pela contribuição de vários modos vibracionais entre 3000 e 3700 cm^{-1} e abaixo de 1700 cm^{-1} . O glicerol e a MMT não puderam ser identificados, pois seus modos vibracionais estão sobrepostos pelas várias bandas provenientes da proteína e dos compostos

fenólicos. No caso da MMT, esta apresenta bandas de absorção características em 3600 cm^{-1} (estiramento OH da molécula de água), $1110 - 993\text{ cm}^{-1}$ (estiramento da ligação Si-O), $914-842\text{ cm}^{-1}$ (deformação O-H ligados ao cátion) (KATTI e KATTI, 2003; MADEJOVÁ 2003).

Os filmes proteicos de farelo de arroz apresentaram características que podem se adequar a aplicação tanto para elaboração de embalagens biodegradáveis, como para elaboração de películas protetoras, onde o uso de revestimentos comestíveis tem sido estudado como uma boa alternativa para preservação de frutas e vegetais inteiros ou minimamente processados, uma vez que esses revestimentos podem criar barreiras semipermeáveis para gases e vapor de água, mantendo a qualidade do produto, além de serem potenciais portadores de aditivos para ajudar a preservar, ou até mesmo melhorar a qualidade do produto (EMBUSCADO e HUBER, 2009; OMS-OLIU et al., 2008).

6.4 CONCLUSÃO

Os filmes proteicos de farelo de arroz apresentaram melhores propriedades em menores concentrações de proteína e glicerol, adicionados de extrato fenólico sem a presença de argila montmorilonita. A concentração de proteína foi o único fator que afetou a espessura dos filmes, além disso, foi o principal fator que afetou a solubilidade, a luminosidade e a opacidade dos filmes. As propriedades mecânicas dos filmes foram afetadas principalmente pela concentração de glicerol. A adição de extrato fenólico aos filmes afetou a opacidade, TR, %E, MY e a PVA. A adição de MMT afetou negativamente as propriedades mecânicas dos filmes. Os filmes proteicos de farelo de arroz sem MTT (ensaios 1, 2, 5 e 6) apresentaram características satisfatórias para aplicação na elaboração de embalagens biodegradáveis e películas protetoras para frutas e vegetais *in natura* ou minimamente processados.

CAPÍTULO 7

FILMES E COBERTURAS COMESTÍVEIS APLICADAS EM BATATAS MINIMAMENTE PROCESSADAS (*Solanum tuberosum* L.)

Neste capítulo foram estudadas as propriedades de filmes e coberturas comestíveis elaborados com proteínas extraídas de farelo de arroz e galactomananas extraídas de semente de *Caesalpinia pulcherrima*, variando a relação proteína:galactomanana e as concentrações de glicerol e surfactante Tween 80 sobre os coeficientes de espalhamento, adesão e coesão de soluções de cobertura na superfície de batatas minimamente processadas. Diferentes soluções foram utilizadas na elaboração de filmes e coberturas comestíveis.

7.1 INTRODUÇÃO

Os filmes e coberturas comestíveis vêm recebendo uma considerável atenção nos últimos anos devido as suas vantagens em relação aos filmes sintéticos. A principal vantagem destes filmes é que estes podem ser consumidos com os produtos (SOUZA et al., 2010b). Em relação à nomenclatura, a maioria dos pesquisadores usa os termos “filme” e “cobertura” indiscriminadamente. No entanto, a cobertura é uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que o filme é pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto (FAKHOURI et al., 2007).

A maior aplicação de filmes e coberturas comestíveis vem sendo em produtos hortícolas, como frutas e vegetais, inteiros ou minimamente processados onde são utilizados com o objetivo de melhorar ou substituir algumas das características da epiderme natural (FILHO, 2000). A utilização desses revestimentos cria uma atmosfera modificada em torno do produto, semelhante à que se obtém em condições de armazenagem controlada ou atmosfera modificada (CERQUEIRA et al., 2010). No caso da aplicação em batatas minimamente processadas, a utilização de revestimentos comestíveis pode reduzir a perda de umidade, restringir o ingresso de oxigênio, diminuir a taxa respiratória, retardar a produção de etileno, conter a saída de compostos voláteis, além de carrear aditivos que retardam a descoloração, o escurecimento e o crescimento microbológico (MORETTI et al., 2007).

Uma estratégia promissora para melhorar as propriedades de filmes e coberturas é o emprego de mistura de polímeros, as chamadas blendas (FERREIRA et al., 2009; JIA et al., 2009). Vários compostos, tais como proteínas, polissacarídeos e lipídios vêm sendo combinados na elaboração de filmes e coberturas comestíveis. No caso de misturas entre proteínas e polissacarídeos, estes compostos possuem a habilidade de estabelecer interações poliméricas, criando assim uma matriz contínua determinante das propriedades funcionais destes revestimentos (MUÑOZ et al., 2012; YOO e KROCHTA, 2011).

A utilização de filmes proteicos oferece potencial para o emprego de coprodutos e resíduos gerados durante o beneficiamento de cereais. O arroz (*Oryza sativa*) um cereal de importância nutricional e comercial destacada, apresenta como resultado de seu beneficiamento o farelo integral com elevado conteúdo de proteína e lipídio (ÁVILA et al., 2008; AMATO e ELIAS, 2005).

As galactomananas são polissacarídeos que estão presentes no endosperma de várias plantas (CERQUEIRA et al., 2011a), apresentando como principal

característica a capacidade de formar soluções muito viscosas em baixas concentrações, necessitando somente de água na sua preparação (CERQUEIRA et al., 2011b).

Os revestimentos podem transportar ingredientes ativos tais como agentes de antiescurecimento, corantes, sabores, nutrientes, especiarias e compostos antimicrobianos que podem estender a vida útil de produtos alimentícios por reduzir também o risco de crescimento de patógenos nas superfícies de alimentos (ROJAS-GRAU et al., 2009). Neste contexto, os compostos fenólicos oriundos da fermentação do farelo de arroz que possuem atividade antioxidante e antimicrobiana (SOUZA et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2007b) são portanto, interessantes para aplicação na elaboração de revestimentos comestíveis.

Uma adequada formulação do revestimento é essencial para a manutenção e a durabilidade de produtos alimentícios (SOUZA et al., 2010a), requerendo a mistura proporcional de ingredientes com funções distintas que podem ser avaliadas pela determinação da molhabilidade, juntamente com o estudo das propriedades superficiais. A eficiência do revestimento comestível utilizado depende principalmente do controle da molhabilidade das soluções de revestimento, o que pode ser obtido através do coeficiente de espalhamento. As formulações de revestimentos comestíveis devem molhar e espalhar-se uniformemente sobre a superfície do produto, e após secagem, formar uma película com adequada adesão, coesão e durabilidade (RIBEIRO et al., 2007; LIN e ZHAO 2007; CHOI et al., 2002). O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades de filmes e coberturas elaboradas a partir de misturas de proteínas de farelo de arroz com galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima* adicionados de extrato fenólico de farelo de arroz fermentado.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Obtenção do concentrado proteico de farelo de arroz

O concentrado proteico utilizado na elaboração dos filmes foi obtido de farelo de arroz integral. Amostras de farelo de arroz (granulometria de 32 mesh) foram desengorduradas com éter de petróleo (3 vezes na proporção 1:7 m/v) sob agitação orbital de 100 rpm durante 1h. Após evaporação do excesso de éter de petróleo, o farelo de arroz desengordurado foi submetido a extração proteica em meio alcalino, sendo o pH do meio ajustado a 11,5 com uma solução de NaOH 0,1M, na proporção 1:10 m/v, durante 30 min, a 25°C e com agitação de 200 rpm. Após centrifugação

(15200 g, 30 min, 10 °C), o sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi submetido a uma nova extração. O sobrenadante das duas extrações foram reunidos e a proteína precipitada pelo ajuste do pH da solução a 4,5 com uma solução de HCl 0,1N. Após repouso da solução a 4 °C *overnight*, a proteína foi separada por centrifugação (15200 g, 30 min, 10 °C) e lavada com água destilada para remoção dos sais. O concentrado proteico úmido foi seco em estufa com circulação de ar a 45 °C durante 24h, moído e armazenado a -18°C. A composição centesimal dos concentrados foi determinada segundo metodologia da AOAC (2000) para umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e fibras. O conteúdo dos carboidratos estimados por diferença.

7.2.2 Obtenção das galactomananas de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*

As galactomananas foram obtidas de sementes de *C. Pulcherrima* de acordo com a metodologia descrita por Cerqueira et al. (2009). As sementes foram trituradas em um blender e seu endosperma foi removido manualmente. Este foi suspenso em etanol a 70 °C por 15 min. Após remoção do etanol, adicionou-se água destilada na proporção 1:10 (endosperma:água), deixando a mistura em repouso por 24 h, sendo a suspensão triturada em blender por 5 min, filtrada e centrifugada a 3800 g por 20 min a 20 °C. Ao sobrenadante foi adicionado etanol na relação 1:2, e as galactomananas precipitadas foram liofilizadas.

7.2.3 Elaboração e caracterização das soluções de revestimento na superfície de batatas

Foram preparadas soluções com uma concentração final de 2% (m/v) a partir de misturas de proteínas e galactomananas. Foi utilizado glicerol como agente plastificante e Tween 80 como agente surfactante. Um planejamento experimental fatorial 2^3 foi usado para avaliar o efeito da proporção proteína:galactomanana (3:1 – 1:3), da concentração de glicerol (20 – 100 %m/m_{sólidos}) e de Tween 80 (0,01 - 0,1%), sobre as propriedades molhantes das soluções de revestimentos comestíveis em batatas minimamente processadas. A Tabela 7.1 apresenta os níveis estudados.

A mistura foi submetida à agitação e aquecimento a 80 °C durante 30 min. A solução foi resfriada e aplicada sobre a superfície de batatas. As batatas foram descascadas, fatiadas, imersas em água destilada, e secas sob corrente de ar comprimido durante 1 min, antes da aplicação das soluções.

Tabela 7.1 - Valores reais e codificados dos fatores estudados.

Fator	Níveis		
	-1	0	1
Proporção P:G	3:1	1:1	1:3
Glicerol (% m/m _{sólidos})	20	60	100
Tween (% m/v)	0,01	0,05	0,1

Onde: P:G proteína:galactomanana.

7.2.4 Propriedades molhantes

A tensão superficial crítica da superfície da batata foi determinada pela extrapolação do gráfico de Zisman (ZISMAN, 1964) de acordo com a Equação 7.1, utilizando bromoftaleno, formamida e tolueno, como soluções padrão. A tensão superficial e o ângulo de contato formado entre a solução e a superfície da batata foram determinados utilizando um medidor de ângulo de contato OCA 20, usando o método da gota pendente e gota sésil, respectivamente (RIBEIRO et al., 2007). A molhabilidade foi estudada pela determinação dos valores de coeficiente de espalhamento (W_s) e dos trabalhos de adesão (W_a) e coesão (W_c), calculados a partir dos valores de tensão superficial e ângulo de contato (LIMA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010), conforme as equações 7.2, 7.3 e 7.4. Gráficos de Pareto foram utilizados para avaliar a influência dos fatores estudado nos coeficientes de W_s , W_a e W_c .

$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad \text{Equação 7.1}$$

$$W_s = W_a - W_c \quad \text{Equação 7.2}$$

$$W_a = \gamma_L (1 + \cos \theta) \quad \text{Equação 7.3}$$

$$W_c = 2\gamma_{LV} \quad \text{Equação 7.4}$$

7.2.5 Elaboração dos filmes

A partir da solução que apresentou as melhores propriedades molhantes foram elaborados filmes comestíveis. Foram avaliadas as propriedades de filmes (obtidos por

técnica de *casting* em estufa com circulação de ar por 24 h a 30 °C) dos seguintes tratamentos:

- TT1: 75% proteína e 25% galactomanana;
- TT2: 75% proteína e 25% galactomanana + extrato fenólico (0,1 mg/mL);
- TT3: 100% proteína;
- TT4: 100% proteína + extrato fenólico (0,1 mg/mL).

7.2.6 Obtenção do extrato fenólico de farelo de arroz fermentado

O extrato fenólico foi obtido a partir da fermentação em estado sólido do farelo de arroz integral com o fungo *Rhizopus oryzae* (CCT 1217) em 96 h, segundo método proposto por Schmidt e Furlong (2012). A extração dos compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado foi realizada utilizando metanol (SOUZA et al. 2010b). O extrato fenólico obtido foi liofilizado e quantificado espectrofotometricamente a 750 nm com reagente de Folin-Ciocalteu utilizando uma curva padrão de ácido ferúlico.

7.2.7 Propriedades dos filmes

7.2.7.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando um micrômetro digital (Insize IP54, Brasil) com sensibilidade de 0,001 mm. Foram tomadas dez medidas para cada filme.

7.2.7.2 Solubilidade

Amostras circulares dos filmes de 2 cm de diâmetro foram secas em estufa a 105 °C até peso constante, sendo posteriormente imersas em 50 mL de água destilada e submetidas a agitação orbital (70 rpm) à temperatura ambiente por 24 h. Após este período, as amostras foram filtradas em papel filtro (Watmann nº 4) e secas até peso constante a 105 °C, sendo determinada a massa de matéria seca insolúvel em água. A solubilidade foi determinada em triplicata.

7.2.7.3 Propriedades Ópticas

Os parâmetros de luminosidade (L^*) e a opacidade (Op) foram determinados utilizando um colorímetro *Minolta* (modelo Chroma Meter CR400, Japão). A opacidade foi calculada como sendo a relação entre a opacidade do filme sobreposto a um

padrão preto e a um padrão branco, conforme proposto por Carvalho e Grosso (2006), segundo a Equação 7.5. Sendo realizadas seis determinações para cada filme.

$$Op(\%) = \frac{P_{Preto}}{P_{Branco}} \times 100 \quad \text{Equação 7.5}$$

Onde: Op = opacidade; P_{preto} = valor da coordenada Y no padrão preto; P_{branco} = valor da coordenada Y no padrão branco.

7.2.7.4 Propriedades Mecânicas

A tensão de ruptura (TR) e a porcentagem de alongação (%E) dos filmes foram estimadas a partir das curvas de força-deformação determinadas utilizando uma máquina de teste Instron (Modelo 4500, Instron Corporation, USA), operando de acordo com o método padrão da ASTM (2001). Os filmes foram recortados formando corpos de prova de 80 mm de comprimento e 25 mm de largura. Foram realizadas 8 determinações para cada tipo de filme.

7.2.7.5 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada gravimetricamente baseada no método ASTM E96-92 (ASTM, 2002). Os filmes foram selados no topo de uma célula de permeação contendo água destilada (100% UR, pressão de vapor de 2337 Pa a 20 °C), colocados em um dessecador contendo sílica (0% UR, pressão de vapor de 0 Pa a 20 °C). As células foram pesadas em intervalos de 2 h durante 10 h. Um mini-ventilador (tipo coller) foi usado dentro do dessecador para manter a circulação de ar constante, assumindo um estado estacionário e uniforme para as condições pressão da água. A taxa de permeabilidade (TVA) dos filmes foi determinada pelo coeficiente angular da curva ganho de massa de água versus tempo ($r > 0,99$). A partir do levantamento da taxa, foi calculada a permeabilidade segundo a Equação 7.6:

$$PVA = TVA * \left(\frac{x}{\Delta P} \right) \quad \text{Equação 7.6}$$

Onde PVA = permeabilidade ao vapor de água; TVA = taxa permeabilidade; x = espessura; ΔP = diferença de pressão parcial de vapor.

7.2.7.6 Permeabilidade ao Oxigênio e ao Dióxido de Carbono

A permeabilidade aos gases O_2 e CO_2 foi determinada baseada na ASTM D 3985-02 (2002), seguindo metodologia proposta por Cerqueira et al. (2009). Um filme foi colocado entre as duas câmaras do módulo de medição gasosa (Figura 7.1), sendo que cada câmara possui dois canais, na câmara inferior passa uma corrente de O_2 ou CO_2 (J & W Scientific, ADM 2000, USA) com caudal controlado de modo a manter a pressão constante nesse compartimento. No outro compartimento passa uma corrente constante de nitrogênio para arraste de O_2 ou CO_2 permeado. Como o oxigênio permeado é continuamente arrastado pelo N_2 , assume-se que a pressão parcial de oxigênio na câmara superior é nula, então Δp é igual a 1 atmosfera. Os caudais de entrada dos dois compartimentos foram ligados a um manômetro para garantir que não existam diferenças de pressão entre os dois compartimentos. Para determinar a concentração dos gases, a cada 10 min eram removidos 1 mL de amostra e injetada em um cromatógrafo gasoso (Chrompack 9001, Middelburg, Holanda). Como padrão foi utilizado uma mistura de gases contendo 10% de CO_2 , 20% de O_2 e 70% de N_2 .



Figura 7.1 – Módulo de permeação gasosa (RIBEIRO, 2005).

7.2.7.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A morfologia da superfície dos filmes foi examinada usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Nova NanoSEM 200, Holanda). As amostras foram montadas em base de alumínio usando fita adesiva de carbono e revestida por pulverização catódica com ouro (cerca de 10 nm de espessura) antes das análises. O espectro no infravermelho dos filmes foi determinado usando a Transformada de Fourier no infravermelho (Perkin-Elmer 16 PC spectrometer, USA), utilizando a técnica

de refletância total atenuada (ATR) e análise do espectro na faixa entre 600 e 4000 cm^{-1} usando 16 scans.

7.2.8 Aplicação dos revestimentos em batatas minimamente processadas

As batatas (*Solanum tuberosum* L.) submetidas ao processamento mínimo foram da variedade *Monalisa*, obtidas do comércio local da cidade do Rio Grande, Brasil. O processamento mínimo seguiu as etapas propostas por Moretti et al. (2007). As batatas foram imersas em água gelada (4 °C) para redução do seu metabolismo por cerca de 15 min, descascadas, fatiadas (3x3x1 cm), lavadas com água destilada, imersas por 10 min em uma solução de água clorada contendo 100 mg/L de cloro livre, lavadas e imersas em água destilada por mais 5 min. As batatas ficaram escorrendo sobre peneira em ambiente refrigerado (4 °C) por cerca de 30 min e em seguida foram imersas nas soluções correspondentes aos tratamentos TT1 a TT4 (Figura 7.2) por 1 min. Foram escorridas sob refrigeração por cerca de 15 min e imersas novamente na solução filmogênica por mais 1 min e escorridas por mais 30 min. Após, foram embaladas em bandejas de poliestireno recobertas com filme plástico. Como controle foram utilizadas batatas minimamente processadas sem imersão nas soluções filmogênicas.



Figura 7.2 – Imersão das batatas nas soluções filmogênicas.

7.2.8.1 Análises Físicas e Físico-químicas

Foram determinados a perda de massa, firmeza, cor, pH, acidez titulável e sólidos solúveis das amostras de batatas. A perda de massa foi obtida relacionando a

diferença entre o peso inicial e final da amostra em cada tempo de armazenamento. A firmeza foi medida utilizando um texturômetro (TA.XT *plus*, Stable Micro Systems, Inglaterra), usando um probe tipo *Knife blade* (HDP/BS, Aluminium & Delrin) com velocidade de teste de 2,0 mm/s, sendo os resultados expressos em Newton(N). A cor foi avaliada utilizando um colorímetro Minolta (modelo Chroma Meter CR400, Brasil) para detecção dos parâmetros L*, a* e b*.

O pH, acidez e sólidos solúveis foram determinados utilizando uma suspensão de 20 g de amostra em 100 mL de água destilada, medindo o pH em um pH-metro (Lutron, modelo pH-206, Taiwan), acidez titulável com uma solução de NaOH 0,1M com resultados expressos em porcentagem de ácido cítrico, e o teor de sólidos solúveis foi determinado utilizando um refratômetro de bancada (tipo Abbé) (AOAC, 2000).

7.2.8.2 Análises Microbiológicas

Foram avaliados o crescimento de micro-organismos psicotróficos e bolores e leveduras segundo procedimento da APHA (2001). Sendo 25 gramas de amostras homogeneizadas em 225 ml de água salina peptonada (10^{-1}), seguindo diluições decimais subsequentes em tubos contendo 9 ml do mesmo diluente para a obtenção das concentrações de 10^{-2} a 10^{-3} . Foram transferidos 0,1 mL de cada diluição para placas contendo ágar Plate Count (PCA, Acumedia, EUA), espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski, sendo as placas incubadas invertidas durante 10 dias a 7°C para determinação do conteúdo de micro-organismos psicotróficos.

Para enumeração de bolores e leveduras, foi utilizado o plaqueamento em superfície de 0,1 ml das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , em meio de cultura ágar Batata Dextrose (PDA, Himedia, Índia), acidificado com ácido tartárico 10%. As placas inoculadas foram incubadas a 25 °C por 5 dias. Os resultados foram expressos em UFC/g.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Propriedades molhantes

Foi obtido um concentrado proteico de farelo de arroz com teores de proteína de $71,7 \pm 5,3\%$, $0,5 \pm 0,3\%$ de lipídeos, $2,9 \pm 0,3\%$ cinzas e $24,9 \pm 4,7\%$ de carboidratos, em base seca. Enquanto que, segundo Cerqueira et al. (2007), as galactomananas de

C. pulcherrima apresentam manose e galactose como os maiores polissacarídeos presentes no material extraído, apresentando uma relação M:G (manose:galactose) de cerca de 2,9. Em geral, as galactomananas com maiores valores relativos de galactose são mais solúveis em H₂O, mas têm menor capacidade para formar gel, enquanto que galactomananas com maior teor de manose possuem tendência a interagir com polissacarídeos gelificantes.

O método de Zisman é aplicável para superfícies de baixa energia, menores que 100 mN/m, tornando necessária a determinação da tensão superficial da batata para garantir aplicabilidade deste método (RIBEIRO et al., 2007; ZISMAN, 1964). A tensão superficial de um líquido pode ser separada de acordo com suas interações entre moléculas, que podem ser polares e dispersivas (RABEL, 1971 e KAEUBLE, 1970). Com os valores dos ângulos de contatos obtidos pelos líquidos selecionados sobre a superfície das batatas e com os valores de tensão superficial dos líquidos apresentados na Tabela 7.2, foi possível transformar os dados experimentais, obtendo-se a variável independente e a variável dependente da equação de Zisman (Equação 1). A Figura 7.3 apresenta o ajuste dos dados experimentais.

Tabela 7.2 - Tensão superficial dos líquidos testados e suas componentes e valor do ângulo de contato desses líquidos na superfície de batata (T = 20 °C).

Composto	γ_L (mN/m) ^a	γ_L^d (mN/m) ^a	γ_L^p (mN/m) ^a	θ (graus) ^b	batata	
					γ_L^d (mN/m) ^b	γ_L^p (mN/m) ^b
Bromoftaleno	44,4	44,0	0,0	64,1 ± 8,2		
Formamida	56,9	23,5	33,4	76,5 ± 7,3	23,8	4,8
Tolueno	28,5	27,2	1,3	20,9 ± 2,6		

^a dados obtidos de Ribeiro et al. (2007).

^b deste trabalho.

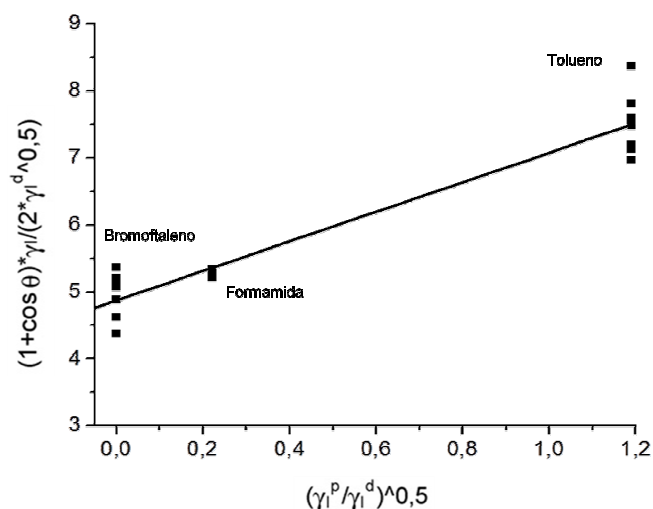


Figura 7.3 - Ajuste dos dados experimentais a um modelo linear de acordo com a Equação 1 ($y = 2,2006x + 4,8732$; $R^2 = 0,9338$).

Os valores da tensão superficial polar e dispersiva da batata foram de 4,84 mN/m e 23,75 mN/m, respectivamente. Sendo a soma destas duas componentes o valor da tensão superficial da batata, que foi de 28,6 mN/m. O valor permite concluir que se trata de uma superfície de baixa energia, que interage com líquidos primariamente por forças de dispersão. A estimativa da tensão superficial crítica da superfície da batata ($\cos \theta = 1$) a partir da extrapolação do gráfico de Zisman da regressão linear da tensão superficial (Figura 7.4) resultou num valor de 24,7 mN/m.

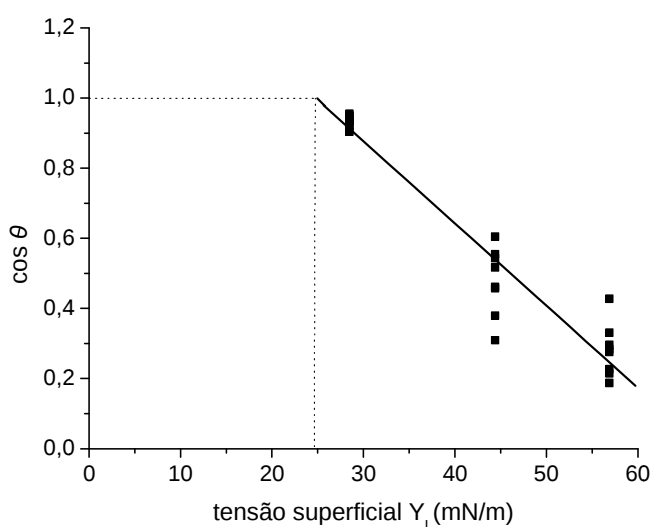


Figura 7.4 - Gráfico de Zisman da regressão linear da tensão superficial ($y = -0,0235x + 1,5805$; $R^2 = 0,9291$).

A Tabela 7.3 apresenta os valores de tensão superficial, ângulo de contato, coeficientes de espalhamento, adesão e coesão das soluções testadas na superfície de batatas minimamente processadas. A elaboração de soluções para revestimentos visando a sua capacidade em se espalhar de forma adequada sobre a superfície a ser aplicada deve considerar três parâmetros: a molhabilidade, a adesão e a coesão. A molhabilidade ou coeficiente de espalhamento é uma das propriedades mais importantes quando se pretende avaliar a capacidade de uma solução em cobrir uma determinada superfície (LIMA et al., 2010). Quanto mais perto de zero o valor de W_s , melhor será coberta a superfície.

Tabela 7.3 - Valores de tensão superficial (γ_L), ângulo de contato (θ), coeficientes de espalhamento (W_s), adesão (W_a) e coesão (W_c) das soluções de revestimento.

Ensaio	P:G	[G] (%m/v)	[S] (%m/v)	γ_L (mN/m)	θ (graus)	W_s (mN/m)	W_a (mN/m)	W_c (mN/m)
1	-1 (3:1)	-1 (20)	-1 (0,01)	32,1 ± 2,4	104,5 ± 5,8	-40,1 ± 3,1	24,1 ± 3,1	64,2 ± 4,8
2	1 (1:3)	-1 (20)	-1 (0,01)	30,9 ± 1,5	107,7 ± 5,0	-40,3 ± 2,5	21,5 ± 2,5	61,8 ± 3,0
3	-1 (3:1)	1 (100)	-1 (0,01)	33,2 ± 2,2	72,1 ± 8,9	-23,1 ± 4,9	43,2 ± 4,9	66,3 ± 4,5
4	1 (1:3)	1 (100)	-1 (0,01)	27,5 ± 2,6	103,0 ± 4,9	-33,7 ± 2,3	21,3 ± 2,3	55,0 ± 5,2
5	-1 (3:1)	-1 (20)	1 (0,1)	27,4 ± 2,8	61,2 ± 8,9	-14,3 ± 3,8	40,5 ± 3,8	54,8 ± 5,5
6	1 (1:3)	-1 (20)	1 (0,1)	25,8 ± 3,3	103,1 ± 4,8	-31,7 ± 2,1	20,0 ± 2,1	51,7 ± 6,7
7	-1 (3:1)	1 (100)	1 (0,1)	23,8 ± 3,5	84,9 ± 12,6	-21,7 ± 5,1	25,9 ± 5,1	47,6 ± 7,0
8	1 (1:3)	1 (100)	1 (0,1)	27,4 ± 1,6	102,6 ± 6,8	-33,3 ± 3,2	21,5 ± 3,2	54,8 ± 3,2
9	0 (1:1)	0 (60)	0 (0,05)	31,9 ± 0,9	82,9 ± 4,9	-28,0 ± 2,7	35,9 ± 2,7	63,9 ± 1,9
10	0 (1:1)	0 (60)	0 (0,05)	31,2 ± 1,3	77,7 ± 5,1	-24,5 ± 2,7	37,8 ± 2,7	62,3 ± 2,7
11	0 (1:1)	0 (60)	0 (0,05)	29,2 ± 1,0	78,3 ± 5,1	-23,2 ± 2,6	35,1 ± 2,6	58,3 ± 2,0

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 15 determinações. Onde: P:G = proporção proteína:galactomanana; [G] = concentração de glicerol; [S] = concentração de surfactante; γ_L = tensão superficial da solução; θ = ângulo de contato entre a solução e a superfície da batata; W_s = coeficiente de espalhamento; W_a = coeficiente de adesão e W_c = coeficiente de coesão.

As soluções filmogênicas apresentaram valores de tensão superficial entre 23,8 e 33,2 mN/m e valores de ângulos de contato sobre a superfície de batatas entre 61,2 e 107,7 graus (Tabela 7.3). Foram obtidos valores de coeficiente de espalhamento entre -40,3 e -14,3 mN/m, adesão entre 20 e 43,2 mN/m e coesão entre 47,6 e 66,3 mN/m. A proporção proteína:galactomanana foi o fator que mais influenciou ($p < 0,05$) no coeficiente de espalhamento de batatas (Figura 7.5a), indicando que maiores concentrações de proteína em relação a galactomanana favorecem o espalhamento

das soluções sobre a superfície das batatas. O aumento na concentração de surfactante também beneficiou ($p < 0,05$) o espalhamento das soluções, enquanto a interação deste fator com a concentração de glicerol apresentou um efeito negativo ($p < 0,05$) sobre esta propriedade.

A proporção proteína:galactomanana também foi o fator que mais afetou ($p < 0,05$) a adesão das soluções na superfície das batatas (Figura 7.5b), sendo que um aumento na concentração de galactomanana na solução reduziu a adesão das soluções. Como no espalhamento, um aumento simultâneo da concentração de glicerol e de surfactante também reduziu a adesão. A adesão de soluções filmogênicas é um parâmetro importante nos processos de *casting* e de coberturas, sendo que uma baixa força de adesão resulta em um incompleto revestimento sobre a superfície ou em uma fraca performance de cobertura (HAN e GENNADIOS, 2005).

A concentração de surfactante foi o único fator que afetou ($p < 0,05$) a coesão das soluções (Figura 7.5c). A adição de surfactante reduz a tensão superficial das soluções, diminuindo a coesão e aumentando o espalhamento das soluções. Enquanto que concentração de glicerol não apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) nas propriedades molhantes na faixa em estudo.

Maiores proporções de proteína em relação à galactomanana promoveram uma maior adesão da solução. As galactomananas de *C. pulcherrima* possuem elevada viscosidade intrínseca (LIMA et al., 2010), o que contribui para a redução nos valores de W_a . Além disso, a solução de galactomananas possui valores de cargas próximos da neutralidade, potencial zeta próximo de zero em uma ampla faixa de pH (CERQUEIRA, 2010), enquanto as proteínas do CPFA possuem valores de potencial zeta negativos, entorno de -33 mV em pH entorno de 10. Indicando que uma solução mais hidrofílica interage mais com a superfície das batatas que é constituída por cadeias hemicelulósicas hidrofílicas. Lima et al. (2010) também obtiveram melhores valores de W_s para mistura de colágeno e galactomanana na proporção de 3:1, em superfícies de maçãs e mangas.

Como pode ser visto na Figura 7.5, o glicerol não afetou as propriedades molhantes das soluções filmogênicas sobre a superfície de batatas na faixa de concentração estudada, provavelmente devido ao glicerol ser uma substância polar, e a superfície da batata apresentar uma menor interação com as substâncias polares. Enquanto que a adição de Tween 80 diminuiu as forças de coesão, aumentando o coeficiente de espalhamento. Este dado é bastante importante uma vez que, enquanto

as forças adesivas promovem o espalhamento do líquido sobre a superfície sólida, as forças coesivas promovem a sua contração.

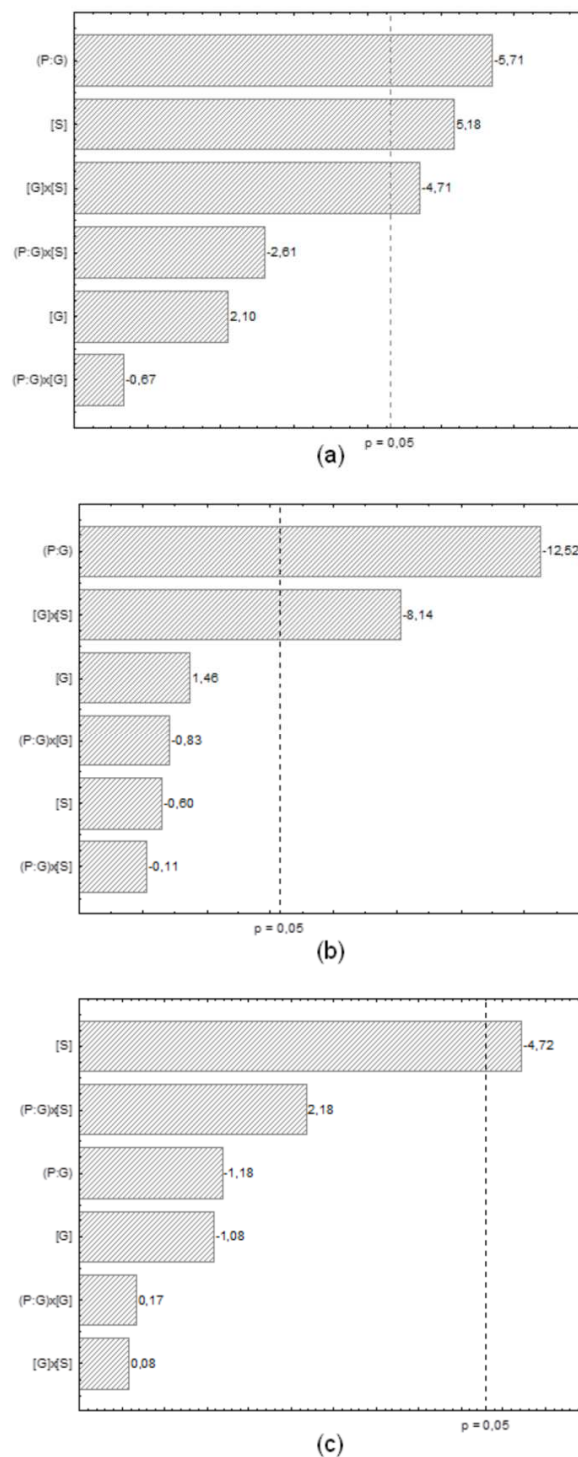


Figura 7.5. Gráfico de Pareto mostrando o efeito da proporção proteína:galactomanana (P:G), das concentrações de glicerol ([G]) e Tween [S] nos coeficientes de espalhamento (a), adesão (b) e coesão (c).

As melhores propriedades foram verificadas na solução elaborada com uma maior proporção P:G, menor concentração de glicerol e maior concentração de surfactante (ensaio 5), apresentando valores de -14,3 mN/m, 40,5 mN/m e 54,8 mN/m, respectivamente para W_s , W_a e W_c . Esses valores foram melhores que os obtidos por Casariego et al. (2008) que aplicaram soluções de quitosana em tomate e cenoura, e que Ramírez et al. (2012) usando soluções de carboximetilcelulose em maçãs, cujos valores de W_s eram inferiores a -20 mN/m, indicando que a adição de uma solução proteica na mistura filmogênica pode melhorar o espalhamento das soluções.

7.3.2 Propriedades dos filmes

A melhor solução em termos de molhabilidade (ensaio 5) foi utilizada para elaboração de filmes, onde foram analisadas as propriedades de solubilidade, ópticas, mecânicas, de permeabilidade e estruturais. Também foi aplicada como cobertura em batatas minimamente processadas, sendo monitorados os indicativos de maturação e avaliação microbiológica. O ensaio 5 foi comparado com mais 3 formulações, uma adicionada de extrato fenólico, uma elaborada somente com proteína e outra com proteína mais extrato fenólico. As tabelas 7.4 e 7.5 apresentam os valores de espessura, solubilidade, luminosidade, opacidade, tensão de ruptura, alongação e as permeabilidades ao vapor de água, dióxido de carbono e oxigênio.

Os filmes não apresentaram diferença ($p < 0,05$) na espessura, na solubilidade, luminosidade e opacidade, embora seja observada uma tendência a uma maior solubilidade nos filmes elaborados com galactomananas. Com relação às propriedades mecânicas ficou claro o aumento na resistência dos filmes de blendas de proteína e galactomananas, enquanto que as blendas adicionadas de extrato fenólico apresentaram maior alongação do que os filmes de proteínas com extrato fenólico.

A permeabilidade aos gases seguiu ordem decrescente, para oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água, sendo que as menores moléculas apresentaram maior permeabilidade. As blendas apresentaram menor permeabilidade ao vapor de água e ao O_2 , enquanto nenhuma diferença ($p < 0,05$) foi observada na permeabilidade ao CO_2 para os diferentes filmes. A adição de extrato fenólico aos filmes pareceu aumentar a permeabilidade destes gases.

A PVA é um fenômeno que implica na solubilidade e na difusão das moléculas de água através de uma matriz filmogênica (OSÉS et al., 2009). Os valores de PVA obtidos para as blendas de proteína de farelo de arroz e galactomananas foram menores

que as de blendas constituídas de glicomananos, quitosana e isolado de soja, elaboradas por Jia et al. (2009).

O O_2 é essencial para as reações de oxidação, que causam mudanças no odor, cor, flavor e deterioração de nutrientes dos alimentos. Filmes com boas barreiras ao oxigênio podem ajudar a melhorar a qualidade e a vida útil dos alimentos. Enquanto que o CO_2 é muito importante no processo de respiração dos tecidos vegetais, sendo que elevado teor de CO_2 pode adiar o amadurecimento dos vegetais (CERQUEIRA et al., 2009). A natureza apolar das moléculas de O_2 e CO_2 não permite a interação com os inúmeros grupos polares presentes nas proteínas e galactomananas, aumentando a permeabilidade destas moléculas através dos filmes. Valores muito menores de permeabilidade a estes gases foram obtidos por Lima et al. (2010) para blendas de galactomanas e colágeno.

Tabela 7.4 - Valores de espessura, solubilidade, luminosidade, opacidade, tensão de ruptura e alongação.

Filmes	Espessura (mm)	Solubilidade (%)	Luminosidade (L^*)	Opacidade (%)	Tensão (MPa)	Elongação (%)
TT1	$0,104 \pm 0,006^a$	$44,6 \pm 8,0^a$	$78,5 \pm 5,8^a$	$15,5 \pm 0,9^a$	$8,02 \pm 1,51^a$	$11,9 \pm 3,9^{ab}$
TT2	$0,107 \pm 0,002^a$	$41,5 \pm 10,6^a$	$72,9 \pm 0,4^a$	$14,8 \pm 0,2^a$	$7,10 \pm 2,11^a$	$13,0 \pm 5,9^a$
TT3	$0,104 \pm 0,008^a$	$35,1 \pm 3,8^a$	$72,1 \pm 2,4^a$	$16,3 \pm 3,5^a$	$2,16 \pm 0,50^b$	$10,3 \pm 5,7^{ab}$
TT4	$0,102 \pm 0,008^a$	$29,6 \pm 3,0^a$	$72,1 \pm 3,9^a$	$12,7 \pm 0,9^a$	$1,77 \pm 0,39^b$	$6,9 \pm 1,2^b$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. Onde: TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico.

Tabela 7.5 - Valores de permeabilidades ao vapor de água, oxigênio de dióxido de carbono.

Filmes	PVA ($g \cdot m / Pa \cdot s \cdot m^2$) $\times 10^{-10}$	P_{CO_2} ($g \cdot m / Pa \cdot s \cdot m^2$) $\times 10^{-10}$	P_{O_2} ($g \cdot m / Pa \cdot s \cdot m^2$) $\times 10^{-10}$
TT1	$0,24 \pm 0,01^b$	$3,19 \pm 0,50^a$	$25,32 \pm 0,94^b$
TT2	$0,27 \pm 0,01^{ab}$	$3,67 \pm 0,82^a$	$32,39 \pm 2,99^a$
TT3	$0,26 \pm 0,04^{ab}$	$3,50 \pm 0,69^a$	$31,87 \pm 3,41^a$
TT4	$0,31 \pm 0,02^a$	$3,78 \pm 0,24^a$	$31,50 \pm 3,72^a$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. Onde: TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico; PVA = permeabilidade ao vapor de água; P_{CO_2} = permeabilidade ao dióxido de carbono; P_{O_2} = permeabilidade ao oxigênio.

Através da análise de microscopia dos filmes foi observada a diferença estrutural na superfície dos filmes elaborados a partir de misturas de proteína com galactomanana (Figura 7.6).

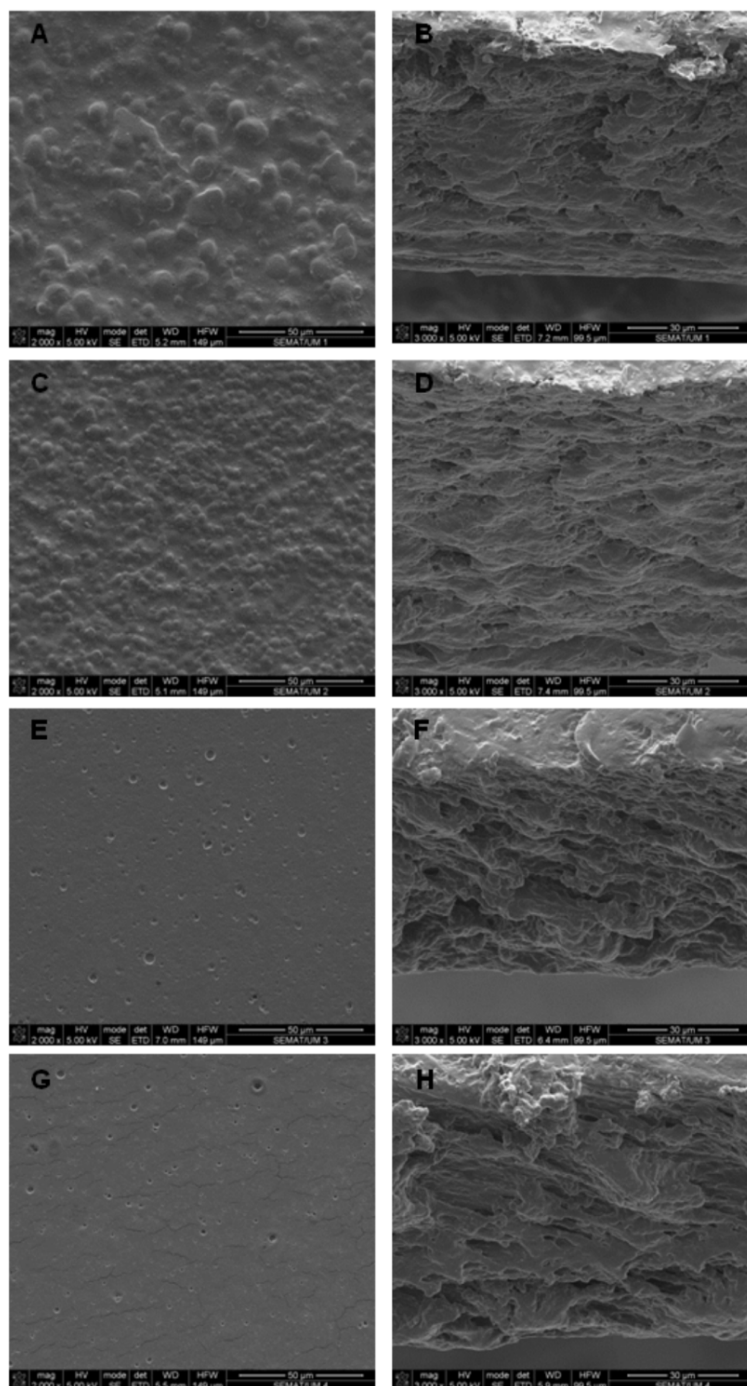


Figura 7.6 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies (a,c,e,g) e da seção transversal (b,d,f,h) de filmes proteicos de farelo de arroz elaboradas a partir das formulações referentes aos tratamentos TT1, TT2, TT3 e TT4.

Os filmes elaborados com galactomanana apresentaram uma superfície mais heterogênea (Figuras 7.6a e 7.6b), com partículas granulares, quando comparados com os filmes somente de proteína (Figuras 7.6e e 7.6g). Comportamento semelhante foi observado por outros autores (MUÑOZ et al., 2012; FERREIRA et al., 2009; OSÉS et al., 2009). Osés et al. (2009) relataram que proteínas e polissacarídeos em soluções aquosas podem ser compatíveis ou incompatíveis. A incompatibilidade ocorre quando existe repulsão entre os biopolímeros (como exemplo quando ambos são negativamente carregados). Neste caso, as interações entre o solvente e o biopolímero são favorecidas, desfavorecendo as interações entre os biopolímeros, formando um sistema de duas fases, com cada fase sendo rica em um dos biopolímeros. Em outro estudo, Muñoz et al. (2012) verificaram que mucilagem de *Salvia hispânica* e concentrado proteico de soro de leite possuíam carga negativa no pH usado (pH 10), sendo que a carga livre de cada componente poderia promover uma incompatibilidade eletrostática entre estes. No entanto, a presença de sítios de cargas positivas na proteína poderia induzir a formação de agregados antes da formação do filme.

A adição de extrato fenólico às blendas pareceu deixar esses filmes um pouco mais homogêneos (Figuras 7.6c e 7.6d), enquanto que a adição de extrato fenólico aos filmes somente de proteína promoveu o desenvolvimento de algumas fissuras microscópicas, o que acarretou em perda nas propriedades mecânicas (Tabela 7.4).

Na Figura 7.7 pode ser observado o espectro no infravermelho dos diferentes filmes elaborados. Quando compostos são misturados, interações físicas e químicas são indicadas pelas mudanças nos picos característicos dos espectros (XU et al., 2005). Nota-se que a adição de galactomananas aos filmes reduziu a absorção das vibrações em toda faixa do espectro na região do infravermelho, indicando que há ocorrência de fortes interações entre as proteínas e os polissacarídeos, principalmente na faixa entre 1750 e 1250 cm^{-1} , onde ocorrem as bandas de absorção amida I, II e III das proteínas (MATHEW e ABRAHAM, 2008; GORINSTEIN et al., 2005) e as bandas de absorção das deformações angulares das ligações C-H de carbonos primários e secundários e deformações angulares e axiais da ligação C-OH das galactomananas (SOUZA, 2009), indicando uma forte interação entre esses grupamentos.

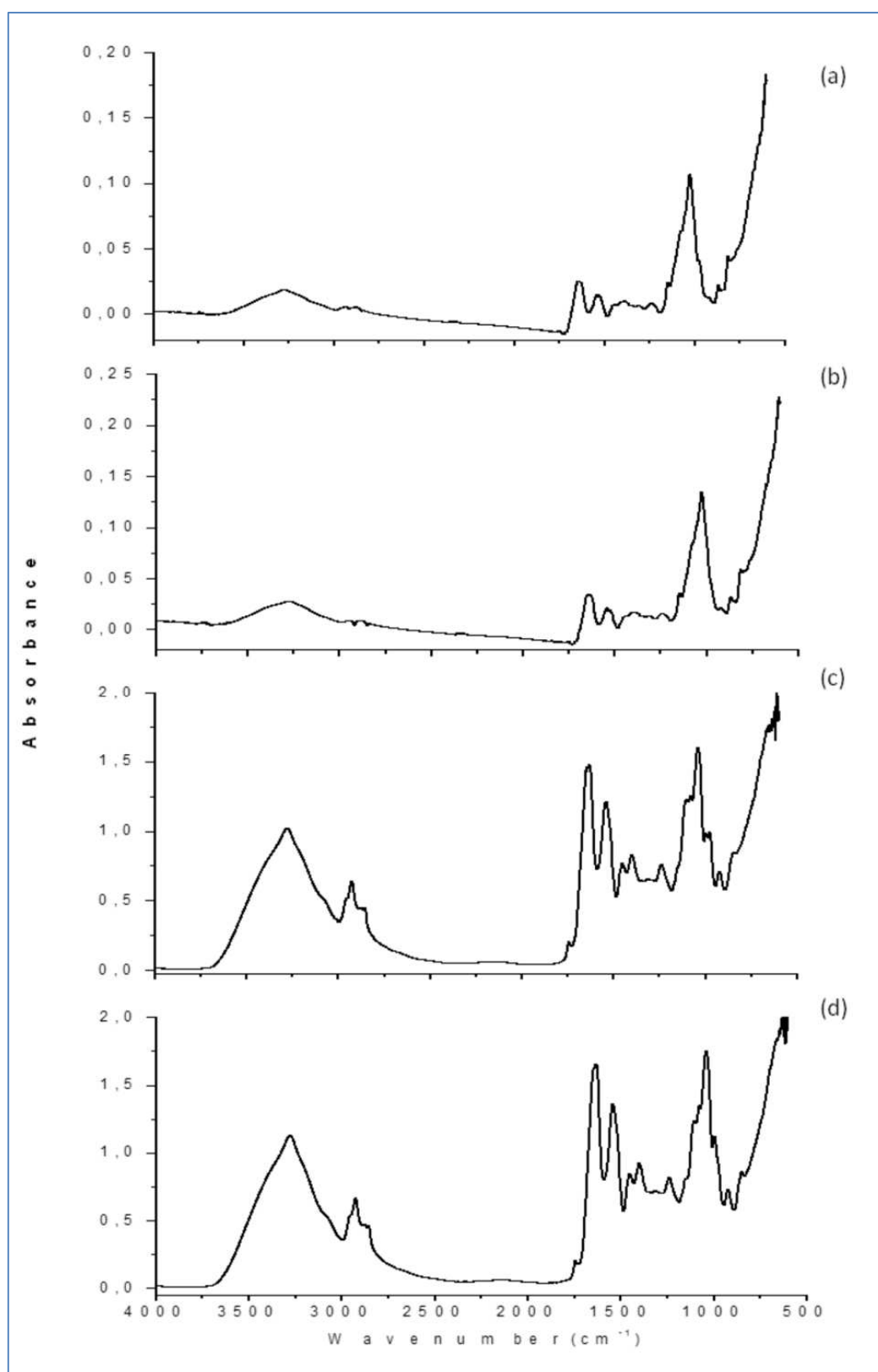


Figura 7.7 – FTIR dos filmes elaboradas a partir das formulações referentes aos tratamentos TT1 (a), TT2 (b), TT3 (c) e TT4 (d).

Cerqueira (2010) analisou as galactomananas de *C. purcherrima* por FTIR e encontrou picos em 815 e 872 cm^{-1} , mencionando a presença de configurações anoméricas (conformações α e β) e ligações glicosídicas atribuídas a unidades de α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose, respectivamente. As bandas de absorção entre 1198 e 983 cm^{-1} resultavam da vibração das ligações C-O e C-O-H (das ligações glicosídicas); um pico ao redor 1152 cm^{-1} correspondia ao modo de vibração C-O do anel pirose; uma ampla faixa de absorção entre 2800-3000 e 3100-3500 atribuídas as vibrações C-H e O-H, respectivamente.

A adição de extrato fenólico aos filmes quase não alterou o espectro de absorção, produziu apenas um pequeno aumento na intensidade de absorção dos picos (Figura 7.7b e 7.7d), devido à inclusão de diversos grupos funcionais dos compostos presentes no extrato. Os espectros na região do infravermelho são comumente mal resolvidos pela contribuição de vários modos vibracionais, dificultando uma análise mais específica dos mesmos, especialmente em misturas de vários componentes utilizados na elaboração dos filmes.

7.3.3 Avaliação dos revestimentos em batatas minimamente processadas

As soluções filmogênicas usadas na elaboração dos filmes foram aplicadas como coberturas em batatas minimamente processadas pela técnica de imersão, sendo monitorados seus indicativos de qualidade. A Tabela 7.6 apresenta os valores de sólidos solúveis, pH e acidez das batatas ao longo de 8 dias após o processamento e aplicação das coberturas, armazenadas em geladeira a 4 ± 1 °C.

Foi observado um pequeno aumento nos valores de sólidos solúveis ao fim de 8 dias de armazenamento em todas as amostras, no entanto nos tratamentos controle, TT3 e TT4, este aumento não foi significativo ($p>0,05$). Esse aumento no conteúdo de sólidos solúveis pode ser devido à perda de água durante o armazenamento, com consequente concentração dos sólidos solúveis.

O comportamento dos teores de sólidos solúveis totais no produto também está relacionado aos estresses mecânicos associados ao processamento mínimo, provocando aumento na atividade metabólica dos tubérculos, o que contribui para a degradação de componentes estruturais. Paralelamente, ocorre a conversão do amido em açúcares pelo armazenamento em torno de 5°C (PINELI et al., 2005). Quando os tubérculos de batata são expostos a baixas temperaturas, verificam-se aumentos na atividade de algumas enzimas envolvidas na degradação do amido, bem como

aumentos na atividade de enzimas envolvidas na síntese da sacarose (GOMES, 2008).

Tabela 7.6 – Sólidos solúveis totais, pH e acidez de batatas minimamente processadas revestidas com diferentes coberturas e armazenadas a 4±1 °C.

Dia		0	1	2	4	6	8
C	SS	3,8 ± 0,3 ^a	3,8 ± 0,3 ^a	3,8 ± 0,3 ^a	4,2 ± 0,3 ^a	4,2 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,3 ^a
	pH	6,2 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0,2 ^a	6,2 ± 0,1 ^a	6,1 ± 0,1 ^a	6,2 ± 0,1 ^a	6,2 ± 0,1 ^a
	acidez	0,12 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,01 ^b	0,15 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a
TT1	SS	3,8 ± 0,3 ^{bc}	3,7 ± 0,3 ^d	3,5 ± 0,1 ^{cd}	4,5 ± 0,1 ^a	4,3 ± 0,3 ^{ab}	4,8 ± 0,3 ^a
	pH	6,8 ± 0,2 ^a	6,3 ± 0,1 ^{bc}	6,1 ± 0,1 ^{bc}	6,1 ± 0,1 ^{bc}	6,1 ± 0,1 ^c	6,4 ± 0,1 ^b
	acidez	0,12 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a
TT2	SS	3,8 ± 0,3 ^{bc}	3,3 ± 0,3 ^c	3,3 ± 0,3 ^c	4,2 ± 0,3 ^{ab}	4,3 ± 0,3 ^{ab}	4,7 ± 0,3 ^a
	pH	6,7 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,1 ^b	6,2 ± 0,1 ^c	6,2 ± 0,1 ^c	6,3 ± 0,1 ^{bc}	6,2 ± 0,1 ^{bc}
	acidez	0,12 ± 0,01 ^{bc}	0,12 ± 0,01 ^{bc}	0,12 ± 0,01 ^c	0,14 ± 0,01 ^{ab}	0,14 ± 0,01 ^{abc}	0,16 ± 0,01 ^a
TT3	SS	3,8 ± 0,3 ^{ab}	3,2 ± 0,6 ^b	3,5 ± 0,5 ^{ab}	4,5 ± 0,5 ^{ab}	4,2 ± 0,3 ^{ab}	4,7 ± 0,3 ^a
	pH	6,7 ± 0,1 ^a	6,3 ± 0,1 ^c	6,5 ± 0,1 ^b	6,3 ± 0,1 ^c	6,2 ± 0,1 ^c	6,3 ± 0,1 ^c
	acidez	0,12 ± 0,02 ^{bc}	0,13 ± 0,01 ^{bc}	0,11 ± 0,01 ^c	0,12 ± 0,01 ^{bc}	0,15 ± 0,01 ^{ab}	0,16 ± 0,01 ^{ab}
TT4	SS	3,8 ± 0,3 ^{abc}	3,7 ± 0,3 ^{bc}	3,3 ± 0,3 ^c	4,3 ± 0,3 ^{ab}	4,2 ± 0,3 ^{abc}	4,7 ± 0,3 ^a
	pH	6,5 ± 0,3 ^a	6,4 ± 0,1 ^{ab}	6,2 ± 0,2 ^{ab}	6,3 ± 0,1 ^{ab}	6,1 ± 0,1 ^b	6,4 ± 0,1 ^{ab}
	acidez	0,12 ± 0,01 ^{bc}	0,12 ± 0,01 ^{bc}	0,09 ± 0,01 ^c	0,14 ± 0,01 ^{ab}	0,16 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^{ab}

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. Onde: C = amostra controle; TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico; SS = teor de sólidos solúveis totais em %; acidez expressa em % de ácido cítrico.

Comportamento contrário foi verificado por Pineli et al. (2005), onde batatas 'Ágata' minimamente processadas e armazenadas em diferentes atmosferas modificadas reduziram o teor de sólidos solúveis ao longo do tempo de armazenamento. Neste caso, açúcares foram consumidos nos processos respiratório e fermentativo, com produção de CO₂ e água, e ácidos orgânicos, respectivamente, sendo que, tais processos contribuem para a redução dos sólidos solúveis totais com o tempo, cujos valores estão associados à diferença entre liberação e degradação de açúcares.

Quanto ao pH, as amostras tratadas com coberturas apresentaram maior valor de pH no dia 0, pois as suspensões filmogênicas possuíam um pH mais elevado. O controle não mostrou variações no pH, enquanto as demais amostras apresentaram

variações, mas que na maioria dos casos não foram significativas ($p < 0,05$) até o final do armazenamento.

A acidez das amostras apresentou um pequeno aumento durante o armazenamento, chegando a 0,16%. Rocha et al. (2003) avaliaram o efeito da embalagem a vácuo em batatas 'Desirée' minimamente processadas e também observaram um aumento na acidez titulável após sete dias de armazenamento. Em geral, as amostras tratadas com coberturas apresentaram pouca diferença tanto no teor de sólidos solúveis, no pH e na acidez das amostras ao longo do armazenamento. Os valores obtidos para amostra controle no experimento estão em concordância com a literatura (FERNANDES et al., 2009; PINELI et al., 2005).

A Tabela 7.7 apresenta os valores das coordenadas de cromaticidade L^* , a^* e b^* e do índice de escurecimento para as amostras de batatas minimamente processadas tratadas com diferentes coberturas. Os parâmetros L^* e b^* praticamente não se alteraram durante o armazenamento das amostras, somente o TT4 apresentou um aumento ($p < 0,05$) ao final do armazenamento. O parâmetro L^* indica a luminosidade das amostras que varia de 0 (preto) a 100 (branco), enquanto o parâmetro b^* indica a variação de cor entre azul (-) e amarelo (+). Os valores de L^* oscilaram de 62,9 a 59,9. Estes valores são comparáveis aos observados por outros pesquisadores para batatas minimamente processadas (ENDO et al., 2006). Os valores médios obtidos para a coordenada b^* variaram de 22,51 a 18,3, situando-se na faixa positiva e tendendo à coloração amarela, característica da batata (ENDO et al. 2006). O parâmetro a^* , que indica a variação de cor entre verde (-a) e vermelho (+), apresentou uma elevação em seus valores para todas as amostras ao longo do tempo de armazenamento, indicando uma alteração na tonalidade das amostras. Segundo Fontes et al. (2008), valores de croma a^* próximos do eixo central, onde todas as cores se misturam, proporcionam uma coloração levemente marrom.

Tabela 7.7 - Valores de L*, a*, b* e índice de escurecimento das amostras de batatas minimamente processadas utilizando diferentes coberturas e armazenadas a 4±1 °C.

Parâmetros	Tempo	Controle	TT1	TT2	TT3	TT4
L*	0	59,0 ± 2,4 ^a	62,7 ± 1,3 ^a	61,3 ± 3,0 ^a	62,4 ± 1,2 ^a	60,5 ± 1,8 ^a
	1	61,3 ± 1,7 ^a	59,6 ± 3,7 ^a	62,8 ± 0,9 ^a	60,5 ± 2,4 ^a	60,9 ± 1,1 ^a
	2	61,7 ± 3,6 ^a	63,0 ± 2,7 ^a	59,7 ± 1,7 ^a	62,3 ± 2,0 ^a	62,5 ± 2,2 ^a
	4	61,8 ± 2,9 ^a	62,9 ± 1,7 ^a	60,5 ± 3,3 ^a	61,5 ± 1,0 ^a	61,4 ± 4,3 ^a
	6	62,5 ± 2,1 ^a	59,5 ± 2,3 ^a	59,0 ± 4,2 ^a	59,5 ± 2,3 ^a	60,9 ± 1,3 ^a
	8	59,7 ± 3,1 ^a	59,7 ± 3,4 ^a	60,0 ± 2,0 ^a	60,0 ± 4,4 ^a	60,6 ± 3,2 ^a
a*	0	-2,1 ± 0,2 ^c	-2,4 ± 0,2 ^c	-2,5 ± 0,3 ^c	-2,7 ± 0,3 ^d	-2,3 ± 0,2 ^e
	1	-2,0 ± 0,2 ^c	-1,6 ± 0,6 ^{bc}	-2,2 ± 0,3 ^c	-1,5 ± 0,4 ^{bc}	-1,4 ± 0,3 ^{bc}
	2	-1,7 ± 0,5 ^{bc}	-2,0 ± 0,6 ^{bc}	-1,3 ± 0,4 ^b	-1,8 ± 0,3 ^c	-2,1 ± 0,4 ^{de}
	4	-1,3 ± 0,5 ^{bc}	-1,5 ± 0,4 ^b	-1,1 ± 0,3 ^b	-1,3 ± 0,2 ^{bc}	-1,6 ± 0,5 ^{cd}
	6	-1,1 ± 0,6 ^b	-0,5 ± 0,4 ^a	-0,3 ± 0,5 ^a	-0,9 ± 0,4 ^{ab}	-0,9 ± 0,4 ^b
	8	0,1 ± 0,6 ^a	0,1 ± 0,6 ^a	-0,2 ± 0,4 ^a	-0,2 ± 0,7 ^a	0,3 ± 0,3 ^a
b*	0	22,7 ± 2,0 ^a	22,3 ± 2,5 ^{ab}	21,6 ± 1,7 ^a	22,3 ± 0,9 ^a	21,6 ± 1,0 ^b
	1	18,7 ± 0,9 ^c	20,1 ± 1,3 ^b	21,9 ± 1,4 ^a	21,7 ± 1,8 ^a	21,4 ± 0,8 ^b
	2	18,3 ± 1,0 ^c	21,3 ± 1,6 ^{ab}	21,0 ± 1,9 ^a	20,6 ± 0,7 ^a	21,4 ± 0,9 ^b
	4	20,1 ± 0,3 ^{bc}	22,6 ± 1,9 ^{ab}	21,7 ± 0,5 ^a	21,2 ± 1,5 ^a	22,8 ± 1,3 ^{ab}
	6	22,4 ± 0,5 ^a	22,0 ± 1,7 ^{ab}	22,8 ± 0,2 ^a	21,6 ± 2,0 ^a	22,2 ± 0,8 ^b
	8	21,5 ± 1,6 ^{ab}	24,3 ± 3,5 ^a	23,0 ± 1,6 ^a	22,9 ± 2,2 ^a	25,3 ± 2,9 ^a
IE	0	40,4 ± 5,4 ^{ab}	39,5 ± 6,2 ^b	39,1 ± 6,7 ^{ab}	39,4 ± 3,2 ^{ab}	39,8 ± 3,1 ^b
	1	32,7 ± 2,4 ^c	38,2 ± 7,6 ^b	38,8 ± 2,7 ^b	41,1 ± 4,7 ^{ab}	40,0 ± 2,4 ^b
	2	32,0 ± 3,5 ^c	37,2 ± 1,8 ^b	40,3 ± 6,0 ^{ab}	36,4 ± 2,3 ^b	37,7 ± 3,4 ^b
	4	36,3 ± 3,3 ^{bc}	41,1 ± 4,9 ^b	41,6 ± 3,1 ^{ab}	39,3 ± 4,0 ^{ab}	43,5 ± 5,6 ^b
	6	41,6 ± 2,4 ^{ab}	43,8 ± 5,0 ^{ab}	47,0 ± 4,8 ^a	42,6 ± 5,9 ^{ab}	42,7 ± 3,1 ^b
	8	43,3 ± 3,1 ^a	53,6 ± 10,3 ^a	46,4 ± 2,4 ^{ab}	46,0 ± 2,8 ^a	52,1 ± 5,0 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. Onde: TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico; IE = índice de escurecimento.

As amostras tratadas com coberturas foram as que apresentaram um maior índice de escurecimento, alcançando valores acima de 50% para os tratamentos TT1 e TT4. O menor índice de escurecimento (IE) para as amostras sem coberturas se deve ao fato que as batatas minimamente processadas apresentam um rápido ressecamento de sua superfície, tornando-se esbranquiçadas (Figura 7.8) devido ao ressecamento de resquícios celulares que permanecem na superfície do tecido (MORETTI, 2007), afetando a correta detecção do índice de escurecimento. Os tratamentos com coberturas pareceram reduzir este ressecamento, porém não foram

efetivos para reduzir o escurecimento das amostras (Figura 7.9), causado por processos oxidativos. Um aumento no IE também foi observado por Pineli et al. (2005) para batatas minimamente processadas e armazenadas sob diferentes atmosferas modificadas. Segundo Endo et al. (2006), o escurecimento observado através da mudança de coloração de amarelo-esverdeado para amarelo-avermelhado pode estar relacionado à produção de melaninas, que são pigmentos insolúveis resultantes de reações não enzimáticas provocadas pelas o-quinonas, os produtos intermediários do escurecimento enzimático.



Figura 7.8 – Ressecamento em batata minimamente processada.

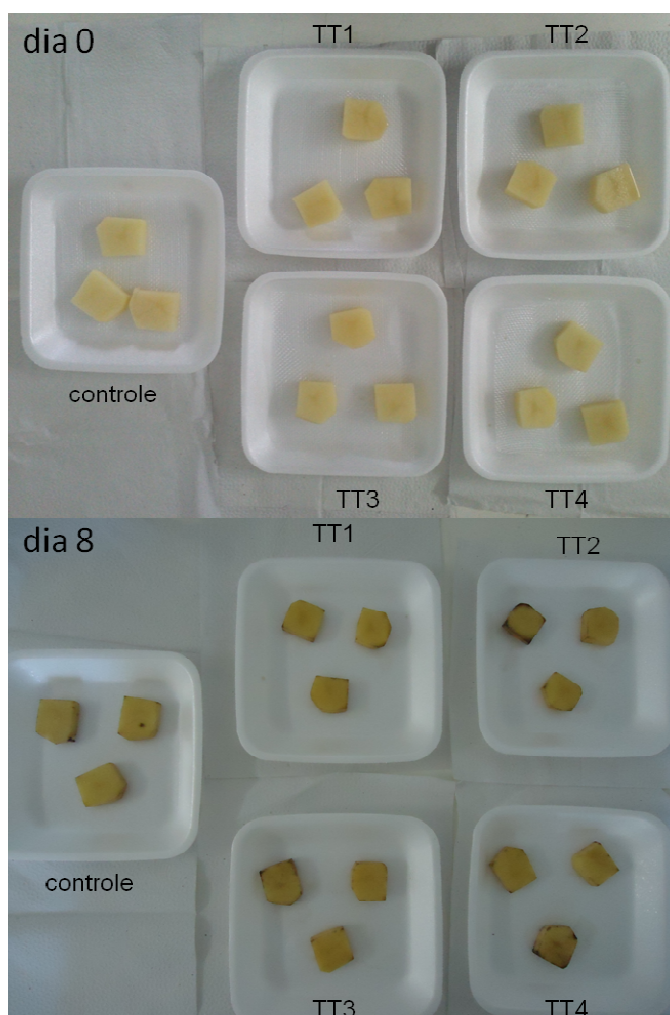


Figura 7.9 – Amostras de batatas minimamente processadas no dia do processamento (dia 0) e no oitavo dia de armazenamento. Onde: TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico.

A Figura 7.10 apresenta o percentual de perda de massa das amostras tratadas com as coberturas e armazenadas durante 10 dias a 4 °C. Pode ser observado que a batata minimamente processada apresenta uma elevada perda de massa, chegando a perder cerca de 40% de sua massa em 10 dias de armazenamento. Até o sexto dia de armazenamento as amostras praticamente não apresentaram diferença entre si. As amostras tratadas somente com coberturas proteicas (TT3 e TT4) foram as que perderam mais massa.

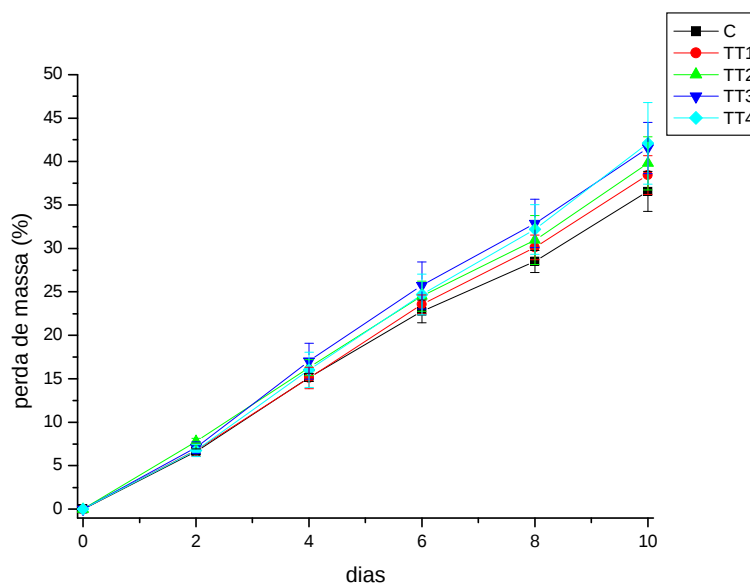


Figura 7.10 – Perda de massa das amostras de batatas minimamente processadas tratadas com diferentes coberturas e armazenadas a 4±1 °C. Onde: TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico

A redução de umidade em frutas e hortaliças, associada a outras alterações metabólicas, leva o produto ao murchamento, tornando-o inaceitável ao consumo. As perdas econômicas devido à perda de peso também podem ser elevadas, fato que demonstra a importância da embalagem, cujos materiais devem ter uma permeabilidade adequada ao oxigênio e ao vapor de água, para diminuir a taxa respiratória e minimizar a perda de peso e a desidratação superficial. Neste caso, as coberturas testadas não foram capazes de minimizar a perda de água das batatas minimamente processadas. Como observado na Tabela 7.5, os filmes obtidos destes tratamentos apresentaram propriedades de barreira relativamente moderadas, não sendo suficientes para retardar a respiração elevada das batatas e consequentemente a perda de água.

A Tabela 7.8 apresenta os resultados de firmeza das amostras de batatas minimamente processadas tratadas com as coberturas. Houve uma redução na firmeza em todos os tratamentos ao final do tempo de armazenamento, porém somente no controle e no tratamento TT1, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$). No dia do início dos experimentos, as amostras apresentam diferentes valores de firmeza, uma heterogeneidade normal em tecidos vegetais, e ao final de 8

dias de armazenamento, as amostras apresentaram valores de firmeza similares, ao redor de 65 N.

Tabela 7.8 - Firmeza (N) das amostras de batatas minimamente processadas tratadas com coberturas e armazenadas durante 8 dias a 4 ± 1 °C.

Dia	Controle	TT1	TT2	TT3	TT4
0	93,6 $\pm$ 11,7 ^a	84,8 $\pm$ 12,8 ^{ab}	73,2 $\pm$ 9,3 ^a	70,9 $\pm$ 6,0 ^b	75,5 $\pm$ 5,5 ^a
1	87,3 $\pm$ 10,5 ^a	91,1 $\pm$ 8,1 ^a	74,3 $\pm$ 9,2 ^a	89,8 $\pm$ 10,3 ^a	78,6 $\pm$ 3,9 ^a
2	77,6 $\pm$ 11,7 ^{ab}	73,7 $\pm$ 5,8 ^{abc}	77,6 $\pm$ 2,6 ^a	74,2 $\pm$ 7,3 ^{ab}	68,1 $\pm$ 5,0 ^a
4	71,2 $\pm$ 4,2 ^b	72,5 $\pm$ 8,7 ^{abc}	66,7 $\pm$ 8,5 ^a	74,6 $\pm$ 7,1 ^{ab}	65,5 $\pm$ 13,1 ^a
6	63, $\pm$ 3,0 ^b	67,4 $\pm$ 7,3 ^{bc}	63,8 $\pm$ 4,4 ^a	67,3 $\pm$ 7,9 ^b	64,5 $\pm$ 3,4 ^a
8	62,3 $\pm$ 3,5 ^b	64,8 $\pm$ 5,9 ^c	65,2 $\pm$ 7,9 ^a	64,4 $\pm$ 3,0 ^b	68,6 $\pm$ 4,5 ^a

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. Onde: TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico.

O processamento mínimo de hortaliças causa várias alterações físicas, com redução da firmeza do produto processado, durante o armazenamento. O corte e o descasque ativam os mecanismos de defesa culminando na deposição de lignina e suberina nas paredes das células danificadas, possivelmente seguido da divisão celular sob o tecido suberizado para recomposição da periderme (PINELI et al., 2006; PINELI et al., 2005). A desidratação e a deposição de lignina e suberina podem também afetar as perdas de firmeza em batatas minimamente processadas.

A Tabela 7.9 apresenta os resultados da determinação de micro-organismos psicotróficos nas amostras dos experimentos ao longo de 9 dias de armazenamento a 4 °C. Neste estudo, os micro-organismos avaliados foram escolhidos com base na sua importância para a batata minimamente processada, com a contagem de psicotróficos e dos fungos representando os micro-organismos deteriorantes (ENDO et al., 2008).

As amostras tratadas com coberturas proteicas foram as que apresentaram menor crescimento microbiano ao final do tempo de processamento. O tratamento onde a cobertura com galactomanana foi adicionada teve a maior taxa de crescimento de microrganismos, ao fim dos 9 dias de armazenamento. A adição de extrato fenólico as soluções não inibiu o crescimento microbiano.

Tabela 7.9 – Contagem de micro-organismos psicotróficos das amostras de batatas minimamente processadas utilizando diferentes coberturas ao longo de 9 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

dias	Controle	TT1	TT2	TT3	TT4
0	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd
6	nd	$5,5 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$	$0,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
9	$2,2 \times 10^4$	$1,26 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$0,4 \times 10^2$	$7,7 \times 10^2$

Onde: TT1= proteína + galactomanana; TT2 = proteína + galactomanana + extrato fenólico; TT3 = solução proteica; TT4 = proteína + extrato fenólico. nd = não detectada a presença.

As amostras tratadas com coberturas apresentaram crescimento microbiano a partir do sexto dia de armazenamento. Pineli et al. (2005) relataram que batatas minimamente processadas armazenadas a 5° C, sob vácuo parcial, apresentaram superfície enrugada, embalagem encharcada e leve odor desagradável a partir do sexto dia, relacionados a processos fermentativos indesejáveis, comprometendo a aceitação do produto.

Não foi detectada a ocorrência de bolores e leveduras até 9 dias de armazenamento. Segundo Moretti (2007), a microbiota de produtos frescos minimamente processados geralmente consiste de espécies de bactérias das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, enquanto que fungos são menos frequentes.

As amostras apresentaram valores de pH acima de 6, considerados elevados e favoráveis ao crescimento dos microrganismos, uma vez que o pH é um dos fatores determinantes para a estabilidade microbiológica dos alimentos. De acordo com Soares et al. (2006), não existe padrão microbiológico na legislação vigente para microrganismos deteriorantes em vegetais minimamente processados. No entanto, o consumo de produtos com contagens de psicotróficos acima de 10^5 é considerada perigosa, pois este valor apresenta maior probabilidade do desenvolvimento de microrganismos patogênicos (VITTI, 2007).

Os diferentes filmes elaborados apresentaram propriedades muito semelhantes, com exceção da tensão de ruptura dos filmes com galactomananas que foi bem superior aos filmes somente com proteína. Não foi possível observar uma relação das propriedades dos filmes produzidos pela técnica de *casting* com as

coberturas aplicadas nas batatas. Principalmente, por que nem sempre o melhor filme será a melhor cobertura e vice-versa, pois muitos fatores estão envolvidos quando se aplicam as películas em tecidos vegetais, tais como, a respiração e a maturação (FAKHOURI et al., 2007). A adesão das soluções filmogênicas sobre as superfícies pode ocorrer por diferentes tipos de mecanismos, sendo os principais aqueles por forças hidrofóbicas ou hidrofílicas e por interações iônicas. Ambos podem gerar ligações covalentes entre as moléculas e a superfície celulósica, consolidando a cobertura após a evaporação do solvente.

7.4 CONCLUSÃO

Maiores concentrações de proteína em relação a galactomanana favoreceram a adesão das soluções à superfície da batata enquanto que incremento na adição de surfactante reduziu a coesão das soluções favorecendo o espalhamento. A solução de proporção 3:1 (P:G) contendo 0,1% de Tween apresentou melhores propriedades para aplicação em batatas minimamente processadas. Filmes preparados nestas condições apresentaram melhores valores de resistência à tração e de permeabilidade ao vapor de água e oxigênio. A adição de extrato fenólico aos filmes praticamente não influenciou nas propriedades analisadas.

As soluções filmogênicas utilizadas na elaboração dos filmes que foram usadas como coberturas em batatas minimamente processadas não influenciaram a maioria dos parâmetros avaliados. Foi observada uma moderada inibição do crescimento microbiano quando as coberturas não continham galactomananas.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES GERAIS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Neste capítulo constam as conclusões gerais, as sugestões para trabalhos futuros e as referências bibliográficas utilizadas no trabalho.

8.1 CONCLUSÕES GERAIS

- A fermentação em estado sólido do farelo de arroz com o fungo *Rhizopus oryzae* promoveu um aumento nos conteúdos de proteínas, das fibras e das cinzas, e uma diminuição nos conteúdos de lipídeos e carboidratos.
- Partículas menores de farelo de arroz favoreceram a produção de proteína e de compostos fenólicos, enquanto que a elevação da concentração de sulfato de amônio ao meio fermentativo influenciou principalmente a produção de biomassa.
- A fermentação aumentou o conteúdo fenólico livre em mais de 100%, sendo observada uma mudança no perfil dos ácidos fenólicos, principalmente no conteúdo dos ácidos gálico e ferúlico.
- O extrato fenólico de farelo de arroz fermentado apresentou uma cinética lenta de inibição do radical DPPH e diminuiu a atividade da enzima peroxidase, atuando como inibidor competitivo, mas não inibiu a enzima polifenoloxidase.
- O concentrado proteico de farelo de arroz fermentado não produziu filmes com boas propriedades. Filmes com melhores propriedades foram obtidos a partir de concentrado proteico de farelo de arroz sem fermentar.
- Filmes proteicos de farelo de arroz apresentaram melhores propriedades de solubilidade, ópticas e mecânicas em menores concentrações de proteína e glicerol, adicionados de extrato fenólico sem a presença de argila montmorilonita.
- A concentração de proteína na formulação dos filmes foi o único fator que afetou a espessura dos filmes, sendo o principal fator que afetou a solubilidade, a luminosidade e a opacidade dos filmes. As propriedades mecânicas dos filmes foram afetadas principalmente pela concentração de glicerol. A adição de extrato fenólico aos filmes afetou a opacidade, TR, %E, MY e a PVA. A adição de MMT afetou negativamente as propriedades mecânicas dos filmes.
- Maiores concentrações de proteína em relação a galactomanana favoreceram a adesão das soluções à superfície de batatas minimamente processadas enquanto que a adição de surfactante reduziu a coesão das soluções favorecendo o espalhamento.

- Filmes utilizando uma proporção 3:1 proteína:galactomanana apresentaram melhores valores de resistência à tração e de permeabilidade ao vapor de água e oxigênio do que os filmes elaborados somente com proteínas.
- As soluções filmogênicas usadas como coberturas em batatas minimamente processadas não influenciaram a maioria dos parâmetros avaliados, a exceção de uma certa inibição de micro-organismos psicotróficos nas amostras tratadas somente com soluções proteicas.

8.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar as películas proteicas de farelo de arroz em outros tecidos vegetais, minimamente processados ou inteiros;
- Testar o uso combinado das proteínas com os próprios carboidratos do farelo de arroz;
- Testar o uso dos compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado encapsulados na elaboração das películas protetoras.
- Utilizar outros tipos de agentes antiescurecimento e antimicrobianos, como o ácido ascórbico e sorbato de potássio, respectivamente, na elaboração das películas.

8.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA. Associação Brasileira da Batata - Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br/2008>> Acesso em: Novembro. 2010.

ADEBIYI, A.P.; ADEBIYI, A.O.; JIN, D. H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. Rice bran protein-based edible films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 476-483, 2008.

ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50(21), p. 6182-6187, 2002.

AIDOO, K. E.; HENRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6 - 9, 1981.

- AKHTAR, M. J.; JACQUOT, M.; JASNIEWSKI, J.; JACQUOT, C.; IMRAN, M.; JAMSHIDIAN, M.; PARIS, C.; DESOBRY, S. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1150-1158, 2012.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M.; **Introductory Mycology**, 4 ed. John Wiley & Sons, New York, 1996.
- AMATO, G. W.; ELIAS, M. C. **Parboilização do arroz**. Porto Alegre: Editora Ricardo Lenz Ziede, 2005.
- ANDREUCCETTI, C.; ROSEMARY, A. C.; GALICIA-GARCÍA, T.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; GROSSO, C. R. F. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 129 – 136, 2011.
- ANUPAMA, E.; RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 14thed. Washington, 2000.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001.
- ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, v. 44, p. 550-556, 2011.
- ASHA-AUGUSTINE.; IMELDA-JOSEPH.; RAJ. R. P. Biomass estimation of *Aspergillus niger* S4 a mangrove fungal isolate and *A. oryzae* NCIM 1212 in solid-state fermentation, **Journal of the Marine Biological Association of India**, v. 48 (2), p. 139 – 146, 2006.
- ASTM. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting**. In Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 2001.
- ASTM. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting**. In Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 2002.

AVILA, L. A. de; MARCHEZAN, E; WALTER, M. **Arroz: composição e características nutricionais**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38(4), p.1184-1192, 2008.

AZEREDO H. M. C. Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial da aplicação. **B. CEPPA**, v.21(2), p.267-278, 2003.

BAE, H. J.; PARK, H. J.; HONG, S. I.; BYUN, Y.J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1179-1186, 2009.

BANERJEE, R.; CHEN. H. Functional properties of edible films using whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 78(8), p. 1673-1683, 1995.

BEMVENUTI, R. H.; NORA, N. S.; FURLONG, E. B. Extraction of γ -oryzanol from rice bran. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36(6), p. 665-673, 2012.

BENOIT, I.; NAVARRO, D.; MARNET, N., RAKOTOMANOMAN, N.; LESAGE-MEESSEN, L.; SIGOILLOT, J. C. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1820-1827, 2006.

BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatograph**, v.336(1), p.93-104, 1984.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U.; SCHMIDEL, L. **Biotecnología Industrial**, v. 2, p. 247-56, 2001.

BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15(3), 2008.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRINDLE, L. P.; KROCHTA, J. M. Physical properties of whey protein–hydroxypropylmethylcellulose blend edible films. **Journal of Food Science**, v. 73(9), p. 446-454, 2008.

BUTSAT, S.; SIRIAMORNUN, S. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. **Food Chemistry**, v.119, p. 606-613, 2010.

CANTOS, E.; TUDELA, J. A.; GIL, M. I.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3015-3023, 2002.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p.1153-1162, 2007.

CARDOSO, N. F.; LIMA, E. C.; CALVETE, T.; PINTO, I. S.; AMAVISCA, C. V.; FERNANDES, T. H. M.; PINTO, R. B.; ALENCAR, W. S. Application of Acai Stalks as biosorbent for the removal of the dyes Reactive Black 5 and Reactive Orange 16 from aqueous solutions. **Journal of Chemical Engineering and Data**, v. 56, p. 1857-1868, 2011.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; SOUZA, M. P.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 379-385, 2009.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26(3), p. 495-501, 2006.

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

CERQUEIRA, M. A. **Development and characterization of edible coatings to the preservation of cheese quality**. Tese de doutorado, Universidade do Minho, 2010.

CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 662-671, 2011a.

CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M. P.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. **Journal of Food Engineering**, v. 94, p. 372-378, 2009.

CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A. **Novel functional polysaccharides as edible coatings for cheese**. International

Symposium on Food and Agricultural Products: Processing and Innovations, Naples, Itália, 2007.

CERQUEIRA, M. A.; SOUSA-GALLAGHER, M. J.; ISABEL MACEDO B, RODRIGUEZ-AGUILERA, R.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of "Regional" cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 87-94, 2010.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Utilization of galactomannan from *gleditsia triacanthos* in polysaccharide-based films: effects of interactions between film constituents on film properties. **Food Bioprocess Technology**, doi 10.1007/s11947-011-0753-x, 2011b.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 175-184, 2012.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 592-597, 2007.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 78(11), p. 2563-2583, 1995.

CHEN, P.; ZHANG, L. Interaction and properties of highly exfoliated soy protein/montmorillonite nanocomposites. **Biomacromolecules**, v.7, p. 1700-1706, 2006.

CHEN, S.; NUSSINOVITCH, A. Permeability and roughness determinations of wax-hydrocolloid coatings, and their limitations in determining citrus fruit overall quality. **Food Hydrocolloids**, v. 15(2), p. 127-137, 2001.

CHIA, L.; RICKETTS, S. **Basic techniques and experiments in infrared and FTIR Spectroscopy**, Perkin-Elmer Corp., 1984.

CHILLO, S. FLORES, S.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; GERSCHENSON, L.; NOBIL, D. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 159–168, 2008.

CHITARRA, M. I. F. **Processamento Mínimo de Frutos e Hortalças**. – Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 1998.

CHO, K. M.; HONG, S.Y.; MATH, R. K.; LEE, J. H.; KAMBIRANDA, D. M.; KIM, J. M. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the

fermentation of cheonggukjang by *Bacillus pumilus* HY1. **Food Chemistry**, v. 114 p. 413-419, 2009.

CHOI, W.Y.; PARK, H.J.; D.J. LEE, J.; LEE, C.Y. Wettability of chitosan coating solution on 'Fuji' apple skin. **Journal of Food Science**, v. 67(7), p. 2668-2672, 2002.

CONAB. **Conselho Nacional de Abastecimento**. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> Acesso: Janeiro, 2013.

COUPLAND, J. N.; SHAW, N. B.; MONAHAN, F. J.; O'RIORDAN, E. D., O'SULLIVAN, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 43, p. 25 - 30, 2000.

DAL MORO, J.; ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C. S. M. Composição centesimal e ação do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. **Ciências da Saúde**, v. 4(1), p. 33-44, 2004.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. **Structure and function of protein-based edible films and coatings**. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer, eds. Embuscado, M. E.; Huber, K. C., 2009.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A., *Edible Films and Coatings: Tomorrow Packaging: A Review*. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, p. 299-313, 1998.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Aroma compound and water vapor permeability of edible films and polymeric packagings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42(12), p. 2871-2875, 1994.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. **Lipid-based edible films and coatings**. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer, eds. Embuscado, M. E.; Huber, K. C., 2009.

DEL BIANCHI, V.L.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O. **Fermentação em estado sólido**. In: *Biotecnologia Industrial*, Coord. Schmidell, W. *et al.*, v. 2, p. 247-276, 2001.

DENAVI, G. A.; PÉREZ-MATEOS, M.; AÑÓN, M. C.; MONTERO, P.; MAURI, A. N.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, 2094-2101, 2009.

DIAS, A. B.; MULLER, C. M.O.; LAROTONDA, F. D. S.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 213-219, 2010.

DIEGUÉZ, M. C. V. **Desenvolvimento e caracterização de filmes nanocompósitos de farinha e amaranto-montmorillonita**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2011.

DURNER, J.; KLESSIG, D. F. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 11312-11316, 1995.

DURU, C. C.; UMA, N. U. Protein enrichment of solid waste from cocoyam(*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) cormel processing using *Aspergillus oryzae* obtained from flour. **African Journal of Biotechnology**, v. 2(8), p. 228-232, 2003.

EDELMANN, A.; DIEWOK, J.; SCHUSTER, K. C.; LENDL, B. Rapid Method for the Discrimination of Red Wine Cultivars Based on Mid-Infrared Spectroscopy of Phenolic Wine Extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, 1139-1145, 2001.

EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K.C. **Edible films and coatings for food applications**, Springer, New York, 2009.

ENDO, E.; SOARES, N. F. F.; SANTOS, D. A. A.; BORGES, S. V.; FONTES, E. A. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Alterações físicas e físico-químicas de batatas (*Solanum tuberosum* L.) minimamente processadas intercaladas com diferentes filmes ativos. **Alimentos e Nutrição**, v.17(3), p. 239-249, 2006.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, R. F.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas *Crimson*. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 27(2), p. 369-375, 2007.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 292-303, 2011.

FEDDERN, V.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 800-804, 2007.

FERNANDES, A. M.; SORATTO, R. P.; EVANGELISTA, R. M.; NARDIN, I. Características físico-químicas de tubérculos de cultivares de batata produzidos na safra de “inverno”. *Horticultura Brasileira* 27(2), p. 1398-1404, 2009.

FERREIRA, A. H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

FERREIRA, C. O.; NUNES, C. A.; DELGADILLO, I.; LOPES-DA-SILVA, J. A. Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v. 42, p. 807-813, 2009.

FERREIRA, P.; DIEZ, N.; FAULDS, C. B.; SOLIVERI, J.; COPA-PATÍÑO, J. L; Release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by *Streptomyces tendae*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1522-1528, 2007.

FILHO, C. C. D. **Conservação de cerejas (*Prunus avium* L.) com coberturas comestíveis.** Tese de doutorado da Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

FONSECA, S. F. **Utilização de Embalagens Comestíveis na Indústria de Alimentos.** Trabalho acadêmico apresentado ao curso de Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, 2009.

FONTES, L. C. B.; SARMENTO, S. B. S.; SPOTO, M. H. F.; DIAS, C. T. S. Conservação de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28(4), 872-880, 2008.

FURLONG, E. B.; CACCIAMANI, J. L. M.; BUFFON, J. G. Fermentação fúngica: enriquecimento proteico e degradação de micotoxinas em farelo de cereal contaminado com aflatoxina B₁ e ocratoxina A. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 233-239, 2007.

GALLO, J. A. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipidic hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science**, v. 180(1), p. 37- 46, 2000.

GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of starch and composite edible films and coatings. *In* Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, eds. Embuscado, M. E.; Huber, K. C., 2009.

GNANASAMBANDAM, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; COLEMAN, M. Mechanical and Barrier Properties of Rice Bran Films. **Journal of Food Science**, v. 62(2), p. 395-398, 1997.

GOFFMAN, F. D.; BERGMAN, C. J. Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. **Journal on the Science and Food Agriculture**, v. 84, p. 1235–1240, 2004.

GOMES, I. A. C. **Expressão de genes de enzimas envolvidas no adoçamento de tubérculos de batata**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

GORINSTEIN, S.; DRZEWIECKI, J.; DELGADO-LICON, E.; PAWELZIK, E.; AYALA, A. L. M.; MEDINA, O. J.; HARUENKIT, R.; TRAKHTENBERG, S. Relationship between dicotyledone-amaranth, quinoa, fagopyrum, soybean and monocots- sorghum and rice based on protein analyses and their use as substitution of each other. **Europe Food Research Technology**, v. 221, p. 69-77, 2005.

GOUNGA, M. E.; XU, S. WANG Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p. 521-530, 2007.

GUERRERO, P.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A.; CABA, K. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 65-72, 2011.

HAN, J. H.; GENNADIOS, A. **Edible films and coatings: an review**. In: Innovations in Food Packanging, Han, J. H. editor, Elsevier Academic Press, 2005.

HE, Q.; LUO, Y.; CHEN, P. Elucidation of the mechanism of enzymatic browning inhibition by sodium chlorite. **Food Chemistry**, v. 110, 847-851, 2008.

HEGDE, S.; KAVITHA, S.; VARADARAJ, M.C.; MURALIKRISHNA, G. Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid complexes by *Aspergillus niger* CFR 1105. **Food Chemistry**, v. 96, p. 14–19, 2006.

IKASARI, L.; MITCHELL, D. A. Two-Phase Model of the Kinetics of Growth of *Rhizopus oligosporus* in Membrane Culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 619-627, 2000.

JACOMETTI, G. A.; MENEGHEL, R. F. A.; YAMASHITA, F. Aplicação de revestimentos comestíveis em pêssego (*Prunus persica*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23(1), p. 95-100, 2003.

JIA, D.; FANG, Y.; YAO, K. Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan–chitosan–soy protein isolate edible films. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 7-10, 2009.

JIN, B.; YIN, P.; MA, Y.; ZHAO, L. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, pp. 678–686, 2005.

JU, H. K.; CHO, E. J.; JANG, M. H.; LEE, Y. Y.; HONG, S. S.; PARK, J. H.; KWON, S. Characterization of increased phenolic compounds from fermented Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and related antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 820–827, 2009.

JUNQUEIRA, M. S.; SOARES, N. F. F.; REIS, R. C.; CARNEIRO, J. D. S.; BENICIO, R. T.; YOKOTA, S. R. C. Efeito de embalagens ativas no escurecimento enzimático de batatas (*solanum tuberosum*) fatiadas e minimamente processadas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30 (3), p. 613-618, 2009.

KAELBLE, D. H. Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. **Journal of Adhesion**, v. 2, p. 66-81, 1970.

KAMPER, S. L.; FENNEMA, O. Use of an edible film to maintain water vapor gradients in foods. **Journal Food Science**, v. 49, 1985.

KATTI, K.; KATTI, D.R., 2003. **Effect of Clay-Water Interactions on Swelling in Montmorillonite Clay**. Disponível em: <<http://faculty.mu.edu.sa/public/uploads/1337959846.6166812.pdf>> Acesso em: 20 junho de 2010.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v. 40(12), p. 47-59, 1986.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENART, A.; VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 503–510, 2010a.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; LENART, A.; VOILLEY, A. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 53–60, 2010b.

KYU, P. S.; BAE, D. Film-forming properties of proteinaceous fibrous material produced from soybean fermented by *Bacillus natto*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16 (7), p. 1053-1059, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685,1970.

LEE, I.; HUNG, Y.; CHOU, C. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 150-156, 2008.

LEE, J. Y.; PARK, H. J.; LEE, C. Y.; CHOI, W. Y. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. **Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie**, v. 36, p. 323-329, 2003.

LEE, J., KIM, K. M. Characteristics of soy protein isolate-montmorillonite composite **Films Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p. 2257 – 2263, 2009.

LIMA, A. M.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; SANTOS, E. C. M.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits – Influence on fruits gas transfer rate. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 101-109, 2010.

LIN, D.; ZHAO, Y. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, p. 60-75, 2007.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

LONGARES, A.; MONOHAN, F.J.; O'RIORDAN, E.D.; O'SULLIVAN, M. Physical properties of edible films made from mixtures of sodium caseinate and WPI. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1255-1260, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MADEJOVA, J. FTIR techniques in clay mineral studies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 31, p. 1-10, 2003.

MAHMOUD, R.; SAVELLO, P.A. Mechanical properties of water vapor transferability through whey protein films. **Journal of Dairy Science**, v.75(4), p. 942-946, 1992.

MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira à umidade e oxigênio. **B. CEPPA**, v.18(1), p.105-128, 2000.

MARIUTTI, L. R. B.; BARRETO, G. P. M.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51(6), p.1225-1232, 2008.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 826 - 835, 2008.

MATUSCHEK, E.; SVANBERG, U. The effect of fruit extracts with polyphenol oxidase (PPO) activity on the in vitro accessibility of iron in high-tannin sorghum. **Food Chemistry**, v. 90, p. 765-771, 2005.

MAYACHIEW, P.; DEVAHASTIN, S. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. **Food Chemistry**, v. 118, p. 594-601, 2010.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7842-7847, 2008.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, 1581-1586, 2011.

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

MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFERMARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28(4), p. 994-1002, 2008.

MIRA, N. V. M.; MASSARETTO, I. L.; PASCUAL, C. S. C. I.; MARQUEZ, U. M. L. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 405-409, 2009.

MONTERREY, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo usando uma metodologia de superfície-resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19(2), p. 294-301, 1999.

MORAES, I. C.; SILVA, G. G. D.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B.; BERBO, P. V. A.; SOBRAL, P. J. A. Influence of the degree of hydrolysis of poly(vinyl alcohol) on the physical properties of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) plasticized with glycerol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28(3), p. 738-745, 2008.

MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília. SEBRAE, 2007.

MUÑOZ, L. A.; AGUILERA, J. M.; RODRIGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A.; DIAZ, O. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 511 - 516, 2012.

MUNTANA, M.; PRASONG, S. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13(4), p. 170-174, 2010.

NARA, K.; MIYOSHI, T.; HONMA, T.; KOGA, H. Antioxidante activity of bound-form phenolics in potato pell. **Bioscience and Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 1489-1491, 2006.

NIGAM, P. S.; GUPTA, N.; ANTHWAL, A. **Pre-treatment of agro-industrial residues**. In *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilization*. Springer, eds. Nigam, P. S.; Pandey, A., 2009.

NUTHONG, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 736-741, 2009.

ODUGUWA, O. O.; EDEMA, M. O.; AYENI, A. J. Physico-chemical and microbiological analyses of fermented corn cob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1816-1820, 2008.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Edible coating for fresh-cut fruits. **Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 657-670, 2005.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Edible films and coatings for fruits and vegetables**. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer, eds. Embuscado, M. E.; Huber, K. C., 2009.

OLIVEIRA, C. S.; GRDEN, L.; RIBEIRO, M. C. O. Utilização de filmes comestíveis em alimentos. **Série Ciência e Tecnologia de Alimentos: Desenvolvimentos em Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 52-57, 2007a.

OLIVEIRA, F. E. R.; ABREU, C. M. P.; ASMAR, S. A.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D. Firmeza de pêssegos “diamante” tratados com 1-MCP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27 (3), p. 366-368, 2005.

OLIVEIRA, M. S. **Disponibilização de compostos funcionais em farelo de arroz fermentado**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 267-275, 2007b.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTa – Journal of Food**, v.8, p. 269-236, 2010.

OLIVEIRA, M.S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. **Bioresource Technology**, v.102, p. 8335-8338, 2011.

OMS-OLIU, G., SOLIVA-FORTUNY, R., MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, p. 87- 94, 2008.

- OSÉS, J.; FABREGAT-VÁZQUEZ, M.; PEDROZA-ISLAS, R.; TOMÁS, S. A.; CRUZ-OREA, A.; MATE, J. I. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 56-62, 2009.
- OU, S.; WANG, Y.; TANG, T.; HUANG, C.; JACKSON, M. G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v.70, p. 205 - 210, 2005.
- OWENS, D. K.; WENDT. Estimation of the surface free energy of polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 13, p. 1741-1747, 1969.
- OZDEMIR, M. **Antimicrobial releasing edible whey protein films and coatings**. Tese de doutorado, Purdue University, 1999.
- OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 215-224, 2008.
- PATINO, J. M. R.; PILOSO, A. M. R. Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1925-1937, 2011.
- PAVLATH, A. E.; ORTS, W. **Edible films and coatings: Why, what, and how?** In *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer, eds. Embuscado, M. E.; Huber, K. C., 2009.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.
- PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PAPADOPOULOU, K.; LAKHTAR, H.; ROUSSOS, S.; PARISSOPOULOS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 285–297, 2011.
- PIAZZA, L.; DURR-AUSTER, N.; GIGLI, J.; WINDHAB, E. J.; FISCHER, P. Interfacial rheology of soy proteins – High methoxyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, v.23, p. 2125-2131, 2009.

PILON, L. **Conservação de abacaxi minimamente processado utilizando como coadjuvantes cloreto de cálcio, película comestível e radiação gama**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2007.

PINELI, L. L. O.; MORETTI, C. L.; ALMEIDA, G. C.; ONUKI, A. C. A.; NASCIMENTO, A. B. G. Caracterização química e física de batatas 'Ágata' minimamente processadas, embaladas sob diferentes atmosferas modificadas ativas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40 (10), p. 1035-1041, 2005.

PINELI, L. L. O.; MORETTI, C. L.; ALMEIDA, G. C.; SANTOS, J. Z.; ONUKI, A. C. A.; NASCIMENTO, A. B. G. Caracterização química e física de batatas Ágata e Monalisa minimamente processadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26(1), p. 127-134, 2006.

PIRAN, A. P.; RIGO, L.; CARDOSO, J. C.; ALMEIDA, M. S.; JACQUES, R. A.; PADILHA, F. F. Avaliação de filmes fortificados com ferro. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 152-157, 2008.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, B.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 224-231, 2013.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2^a ed. Blackie Academic & Professional, London, 1997.

POGAKU, R.; RUDRAVARAM,; CHANDEL, A. K. R.; LINGA, V. R.; YIM, Z. H. The effect of de-oiled rice bran for single cell protein production using fungal cultures under solid state fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5(2), p. 1-12, 2009.

PORTE, P.; MAIA, L. H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim CEPPA**, v. 19(1), p. 105-118, 2001.

POURALI, O.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 259-266, 2010.

QUEIROZ, C.; SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. **Food Chemistry**, v. 125, p. 128-132, 2011.

QUEZADA-GALLO, J. **Delivery of food additives and antimicrobials using edible films and coatings**. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer, eds. Embuscado, M. E.; Huber, K. C., 2009.

RABEL, W. Einige aspekte der benetzungstheorie und ihre anwendung auf die untersuchung und veränderung der oberflächeneigenschaften von polymeren. **Farbe und Lack**, v. 77(10), p. 997-1006, 1971.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**, v.1(3), 1998.

RAMÍREZ, C.; GALLEGOS, I.; IHL, M.; BIFANI, V. Study of contact angle, wettability and water vapor permeability in carboxymethylcellulose (CMC) based film with murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) extract. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 424-429, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5^aed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1996.

RAVINDER, R.; LINGA, V. R.; POGAKU, R. Production of SCP from deoiled rice bran. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 243–246, 2003.

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, v. 50, p. 962-1079, 2005.

REGULY J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Editora e gráfica universitária (UFPEL), Pelotas, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27(5), p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. M. C. P. **Estudo de estratégias para a valorização industrial do morango**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, 2005.

RIBEIRO, C.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; MIRANDA, C. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 63-70, 2007.

RIGO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes**. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2006.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866-2887, 2003.

ROCHA, A. M. C. N.; COULON, E. C.; MORAIS, A. M. M. B. Effects of vacuum packaging on the physical quality of minimally processed potatoes. **Food Service Technology**, v.3, p.81-88, 2003.

ROJAS-GRAU, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to freshcut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 438- 447, 2009.

RUDRAVARAM, R.; CHANDEL, A. K.; LINGA, V. R. POGAKU, R. Optimization of protein enrichment of deoiled rice bran by solid state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 1846. **International Journal of Food Engineering**, v. 2(4), p. 1-14, 2006.

RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Free radical-scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v.114, p. 693–695, 2009.

RULON, J.; ROBERT, H. **Wetting of low-energy surfaces**. Marcel Dekker Inc., 1993.

RYAN, E. P.; HEUBERGER, A. L.; WEIR, T. L.; BARNETT, B.; BROECKLING, C. D.; PRENNI, J. E. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1862-1870, 2011.

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

SALTVEIT, M. E. **Edible Coatings**. In: Fresh-Cut Products: Maintaining Quality and Safety, 5^a edição, 1998.

SALVALAGGIO, M. O. **Galactomananas de sementes de espécies brasileiras: Otimização da extração, caracterização físico-química e por espalhamento de luz**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2010.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p. 270-276. 1998.

SCHMIDT, C. G.; FURLONG, E. B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 36-41, 2012.

SILVA, A.R.Z. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de fitase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando subprodutos agrícolas para aplicação como aditivo na alimentação de aves e suínos.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2002.

SILVA, J. S. Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. In: Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. **Aprenda Fácil**, p. 416-444, 2000.

SILVEIRA C. M.; FURLONG E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 805-811, 2007.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. **Food Research International**, v. 41, p. 781-785, 2008.

SOARES, N. F. F.; PIRES, A. C. S.; ENDO, E.; VILELA, M. A. P.; SILVA, A. F.; FONTES, E. A. F.; MELO, N. R. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo na conservação de batata minimamente processada. **Revista Ceres**, v. 53, p. 387-393, 2006.

SOBRAL, P. J. A. Thickness effects of myofibrillar protein based edible films on their functional properties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35(6), p. 1251-1259, 2000.

SOTOKUBA, C. M. K. **Farelo de arroz como fonte de antioxidantes.** Monografia de Especialização. São Paulo: FACIS-IBEHE, 2001.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. The Use of Electric Fields for Edible Coatings and Films Development and Production: A Review. **Food Engineering Reviews**, v. 2, p. 244 - 255, 2010a.

SOUZA, C. F. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea*: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2009.

SOUZA, M. M. **Avaliação da atividade antifúngica e antimicotoxinas de extratos de farelo de arroz, cebola e microalga *Chlorella***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, 2007.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extrato fenólico de *Spirulina platensis* contra *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35(6), p. 1050-1058, 2011.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidos*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30(3), p. 680-685, 2010b.

SPARRINGA, R. A.; OWENS, J. D. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 153-157, 1999.

SUMANTHA, A.; DEEPA, P.; SANDHYA, P.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. Brazilian **Archives of Biology and Technology**, v. 49, (5), p. 843-851, 2006.

TAHERZADEH, M. J.; FOX, M.; HJORTH, H.; EDEBO, L. Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 167-177, 2003.

TANADA-PALMU, P.; FAKHOURI, F. M.; GROSSO, C. R. F. Extensão da vida útil de frutas tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 12-17, 2002.

TEIXEIRA, A. M. **Nanocompósitos de argila montmorilonita, amido, gelatina, isolado proteico de soja e quitosana**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2011.

TEIXEIRA, V. G.; COURINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24(6), p. 808-818, 2001.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. N. **Microbiologia**, 3ª edição, Atheneu, São Paulo, 2000.

TUNC, S.; ANGELLIER, H.; CAHYANA, Y.; CHALIER, P.; GONTARD, N.; GASTALDI, E. Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. **Journal of Membrane Science**, v. 289, p. 159-168, 2007.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**, v. 48, p. 414-424, 2010.

UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION. **Rice bran: an under-utilized raw material**. United Nations, New York, 1985.

VALERA, H. R.; GOMES, J.; LAKSHMI, S.; GURURAJA, R.; SURYANARAYAN, S.; KUMAR, D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 521-526, 2005.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, v.39, p. 367-79, 2003.

VENDRUSCOLO, F. RIBEIRO, C. S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L.; Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13(4), p.487-493, 2009.

VIEIRA, C. R.; LOPES, C. O.; RAMOS, C. S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M. P. C. Enzymatic extraction of proteins from rice flour. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28(3), p. 599-606, 2008.

VITTI, M. C. D. **Respostas fisiológicas e bioquímicas de diferentes cultivares de batatas ao processamento mínimo**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba, 2007.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38(4), p.1184-1192, 2008.

WANG, Y.; TIAN, S.; XU, Y. Effects of high oxygen concentration on pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruits during postharvest periods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 99-104, 2007.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Science**. Marcel Decker, New York, 1994.

XIE, C.; GU, Z.; YOU, X.; LIU, G.; TAN, Y.; ZHANG, H. Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 125-128, 2010.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 185-192, 2005.

YANG, H. J.; YUE, Q.; CAO, Y. C.; ZHANG, D. F.; WANG, J. Q. Effects of crude feruloyl and acetyl esterase solutions of *Neocallimastix* sp. YQ1 and *Anaeromyces* sp. YQ3 isolated from Holstein steers on hydrolysis of Chinese wildrye grass hay, wheat bran, maize bran, wheat straw and corn stalks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 154, p. 218-227, 2009.

YOO, S.; KROCHTA, J. M. Whey protein–polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 91, p. 2628-2636, 2011.

ZHANG, M. W.; ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; LIU, R. H. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7580-7587, 2010.

ZHENG, J. P.; LI, P.; MA, Y. L.; YAO, K. D. Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. Preparation and Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, p. 1189-1194, 2002.

ZHENG, L.; ZHENG, P.; SUN, Z.; BAI, Y.; WANG, J.; GUO, X. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1115-1119, 2007.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, v. 87, p. 401–406, 2004.

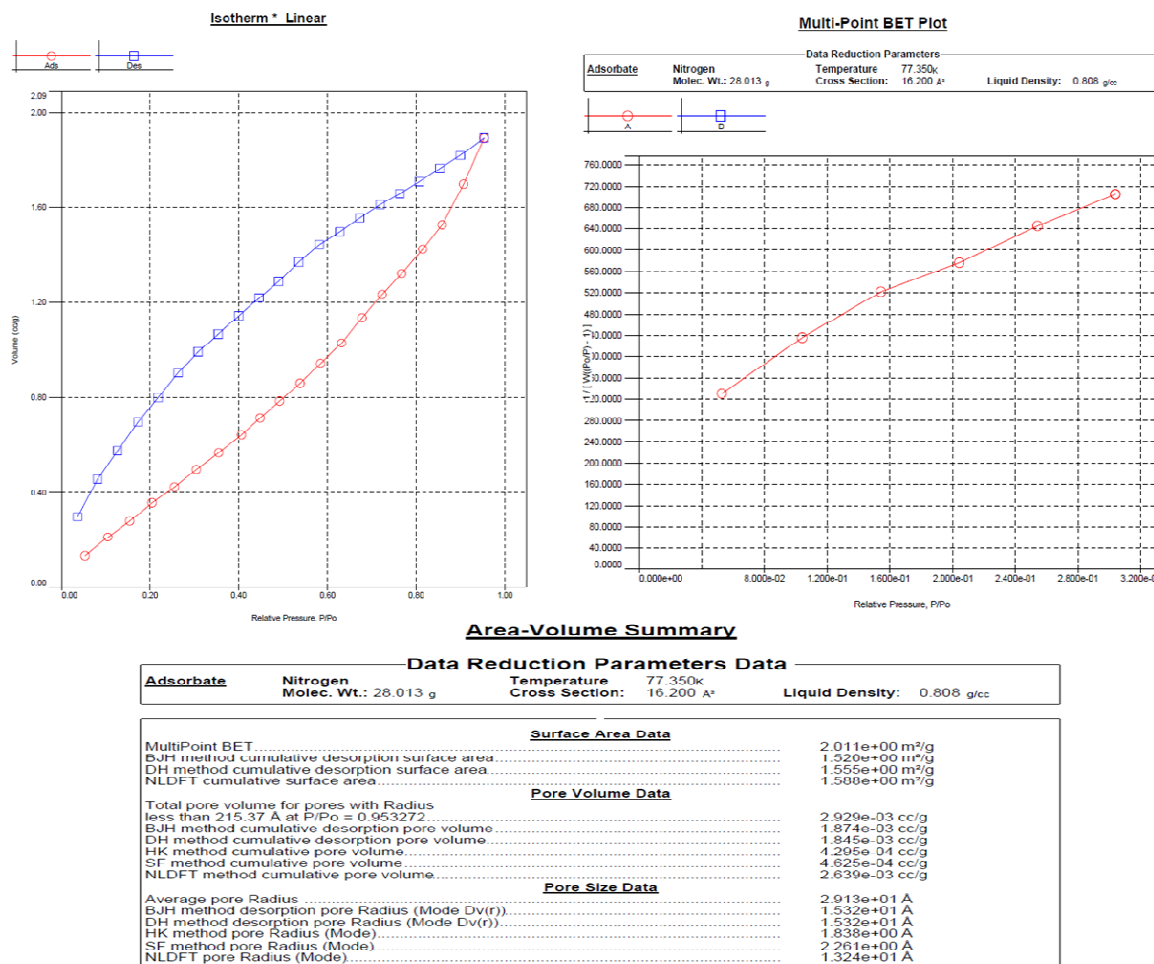
ZHU, L.; WOOL, R. P. Nanoclay reinforced bio-based elastomers: Synthesis and characterization. **Polymer**, v. 47, p. 8106 – 8115, 2006.

ZIANI, K.; OSES, J.; COMA, V.; MATÉ, R. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 2159-2165, 2008.

ZISMAN, W. A. **Contact angle wettability and adhesion**. In *Advances in Chemistry Series*. American Chemical Society. vol. 43, 1964.

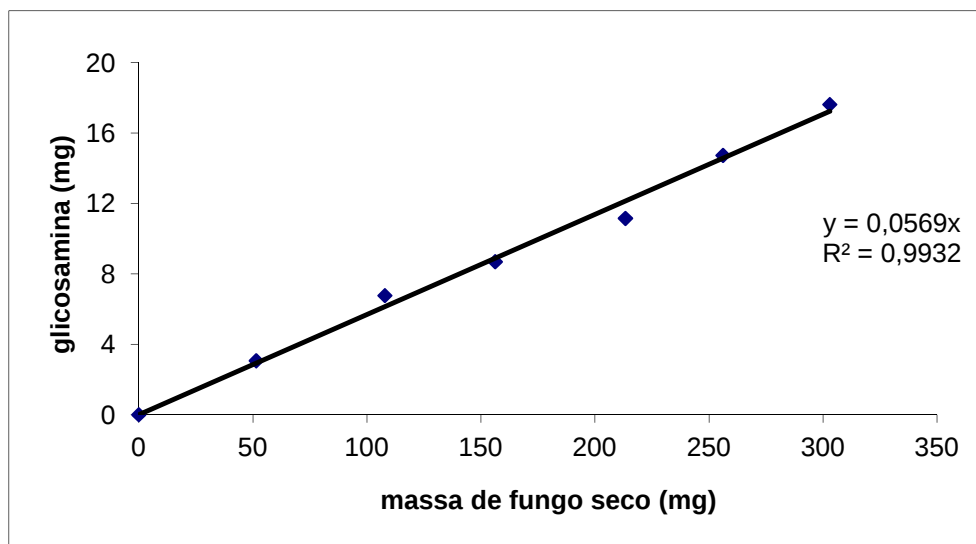
APÊNDICES

APÊNDICE 1



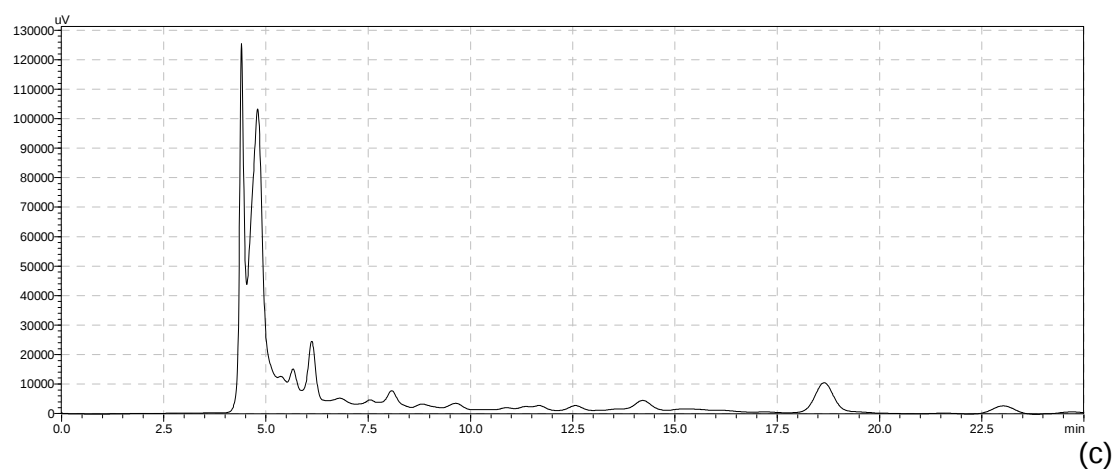
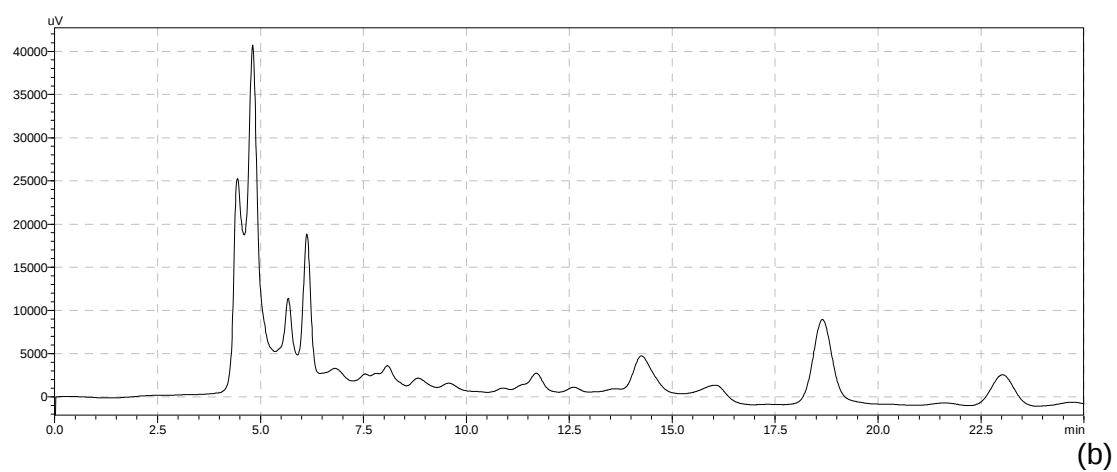
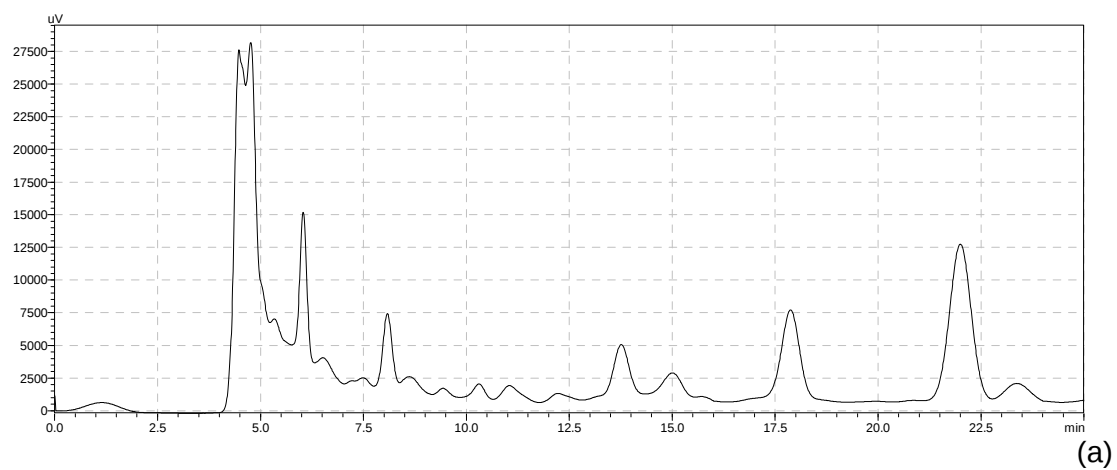
Dados da análise de BET (Brunauer-Emmett-Teller) para as partículas de farelo de arroz de diâmetro médio de 0,18 mm fornecidos pelo Laboratório de Materiais Cerâmicos da UFRGS.

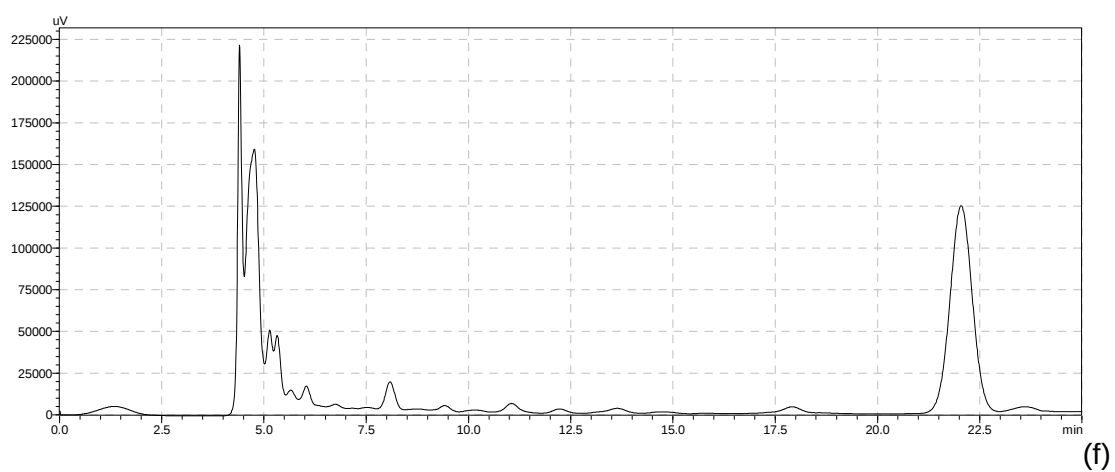
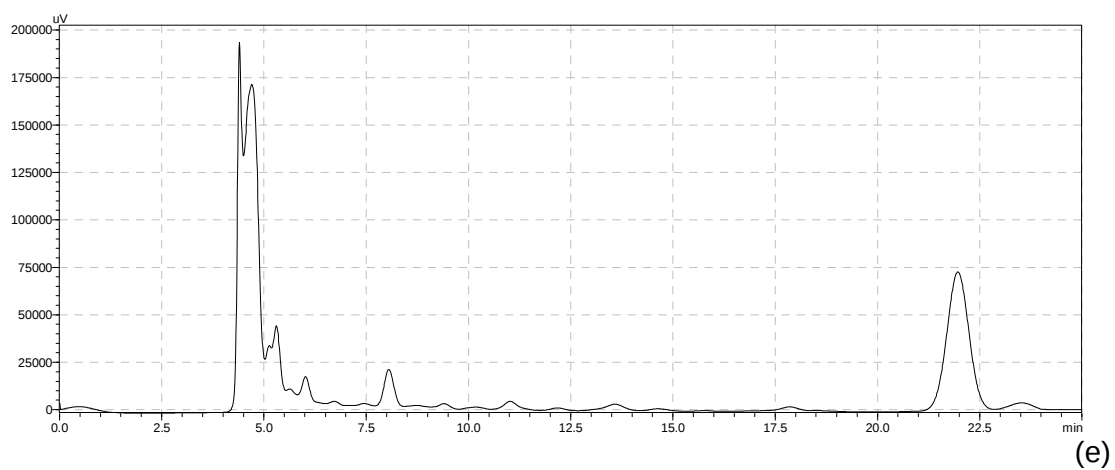
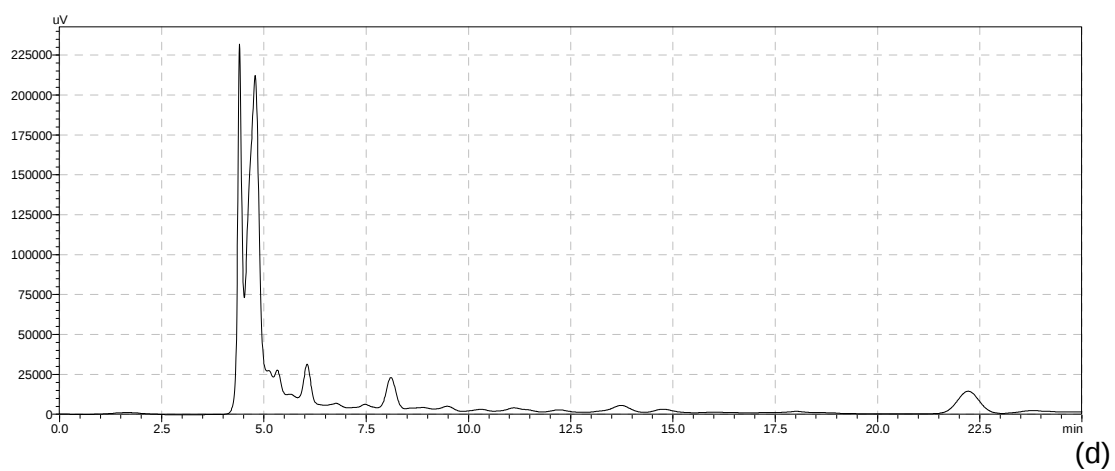
APÊNDICE 2

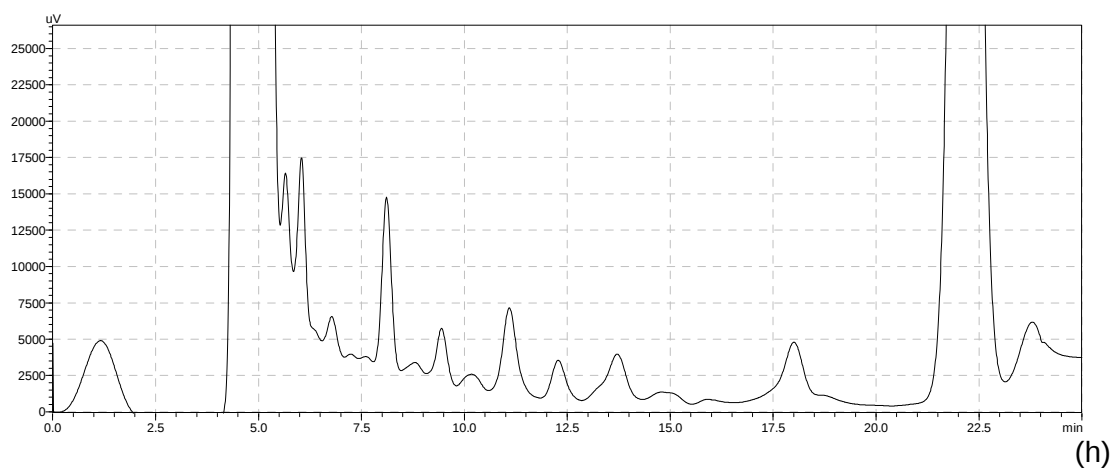
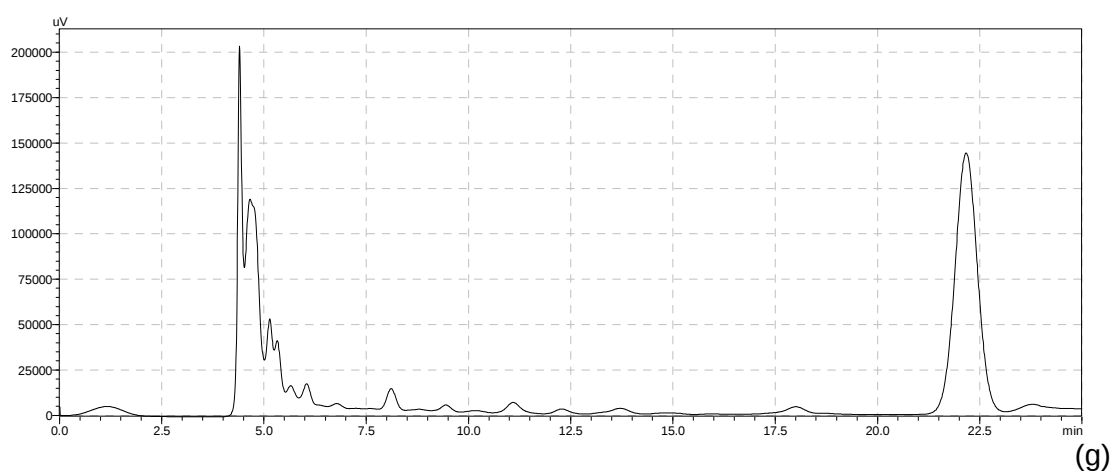


Curva relacionando o teor de glicosamina com a massa de fungo seco.

APÊNDICE 3







Cromatogramas das amostras de farelo de arroz (a), farelo de arroz fermentado no tempo de 0 h (b), 24 h (c), 48 h (d), 72 h (e), 96 h (f), 120 h (g) e 120 h com zoom.

APÊNDICE 4 – Verificação da validade estatística para os modelos matemáticos.

Solubilidade						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	209,55	4	52,39	7,24	3,11	2,33
Resíduos	101,31	14	7,24			
Falta de ajuste	98,93	12				
Erro puro	2,38	2				
Total	310,87					
R ²	0,67					
Opacidade						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	232,19	3	77,40	29,29	3,29	8,91
Resíduos	39,64	15	2,64			
Falta de ajuste	1,02	13				
Erro puro	271,82	2				
Total	271,82					
R ²	0,85					
Tensão de Ruptura						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	70,77	8	8,85	6,39	3,07	2,08
Resíduos	13,84	10	1,38			
Falta de ajuste	84,61	8				
Erro puro	13,78	2				
Total	0,06					
R ²	0,84					
Elongação						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	4582,66	9	509,18	0,77	3,18	0,24
Resíduos	5937,78	9	659,75			
Falta de ajuste	5936,47	7				
Erro puro	1,31	2				
Total	10520,44					
R ²	0,44					
Módulo de Young						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	497870,18	9	55318,91	7,08	3,18	2,23
Resíduos	70322,45	9	7813,61			
Falta de ajuste	70257,66	7				
Erro puro	64,79	2				
Total	568192,63					
R ²	0,88					
Permeabilidade ao vapor de água						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	380,92	6	63,49	44,03	3,00	14,70
Resíduos	17,30	12	1,44			
Falta de ajuste	16,76	10				
Erro puro	0,54	2				
Total	398,23					
R ²	0,96					

Onde: SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F_{calc} = valor de F calculado para o modelo; F_{tab} = valor F de Fischer.

APÊNDICE 5 – Valores das coordenadas de cromaticidade a* e b* de filmes proteicos de farelo de arroz elaborados com extrato fenólico e argila montmorilonita.

Filmes	croma a*	croma b*
1	2,7 ± 0,7	42,0 ± 1,3
2	8,5 ± 2,2	42,8 ± 1,0
3	0,3 ± 0,8	34,6 ± 3,2
4	7,4 ± 1,7	41,3 ± 0,3
5	2,2 ± 2,0	39,4 ± 5,2
6	7,6 ± 2,2	46,5 ± 1,1
7	0,6 ± 1,2	39,1 ± 3,8
8	7,9 ± 2,6	46,5 ± 1,4
9	0,3 ± 1,2	39,0 ± 3,8
10	8,1 ± 1,3	41,8 ± 2,3
11	0,2 ± 0,8	39,5 ± 2,2
12	7,4 ± 2,1	45,3 ± 0,7
13	1,1 ± 2,1	41,5 ± 5,3
14	8,6 ± 1,9	46,1 ± 1,6
15	0,6 ± 1,2	42,0 ± 3,2
16	8,0 ± 1,1	47,8 ± 0,6
17	2,3 ± 1,2	44,5 ± 1,9
18	3,0 ± 1,2	46,1 ± 1,7
19	3,0 ± 0,9	46,4 ± 1,5