



João Ricardo Afonso Pires

Licenciado em Ciências de Engenharia de Materiais

Desenvolvimento de biofilmes para a indústria alimentar

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz
Fernando, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Co-orientador: Victor Gomes Lauriano de Souza, Bolseiro
de doutoramento, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, Professora Associada
com Agregação, FCT/UNL

Arguente: Mestre Patrícia Freitas Rodrigues, Estudante de Doutoramento,
FCT/UNL

Vogal: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, Professora
Auxiliar, FCT/UNL

João Ricardo Afonso Pires

Licenciado em Ciências de Engenharia de Materiais

**Desenvolvimento de biofilmes para a
indústria alimentar**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz
Fernando, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Co-orientador: Victor Gomes Lauriano de Souza, Bolseiro
de doutoramento, FCT/UNL

Setembro 2017

“Desenvolvimento de biofilmes para a indústria alimentar” © João Ricardo Afonso Pires, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Um muito obrigado à Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, Professora Auxiliar da UNL/FCT e ao aluno de doutoramento do DCTB da UNL/FCT Victor Souza, pela orientação do presente trabalho de dissertação, pela constante partilha de conhecimento, disponibilidade, paciência e apoio prestado durante a realização desta dissertação. Sem o vosso apoio, seria impossível alcançar o objetivo proposto.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Benilde Mendes, Professora Associada da UNL/FCT e Presidente do DCTB da UNL/FCT, pela oportunidade concedida para a realização desta dissertação e por todo o apoio e disponibilidade demonstrada ao longo de todo o mestrado.

Muito obrigado ao Professor Doutor Francisco Braz Fernandes e a toda a sua equipa pela gentileza de prestar todo o apoio necessário durante os ensaios mecânicos, tal como a disponibilidade de usufruir do seu laboratório e do fornecimento do equipamento necessário para os ensaios,

Agradeço à minha avó Maria pelo constante carinho e apoio e dedico este trabalho aos meus avós já falecidos José Maria, Lisete e Manuel.

Agradeço aos meus pais Liliana e Ílidio e aos meus irmãos Diogo e Beatriz pelo esforço, apoio incondicional, paciência, motivação e carinho ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos os meus colegas de licenciatura, mestrado e colegas de laboratório que sempre estiveram presentes no melhores e piores momentos, pela amizade, companheirismo, apoio e diversão.

PARTES DO PRESENTE TRABALHO FORAM JÁ PUBLICADAS:

RESUMOS EM ATAS DE CONFERÊNCIAS NACIONAIS:

Almeida K, Souza VGL, **Pires JRA**, Augusto ASP, Fernandes PDS, Salvador M, Santos MP, Fernando AL (2017), Propriedades antioxidantes e antibacterianas de biofilmes de quitosano, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.125-126

Augusto ASP, Souza VGL, Almeida K, **Pires JRA**, Fernandes PDS, Santos MP, Salvador M, Fernando AL (2017), Extensão do tempo de prateleira de carne fresca de aves com filmes de quitosana incorporados com extractos hidro-alcoólicos, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.127-128

Pires JRA, Souza VGL, Santos MP, Salvador M, Fernandes PDS, Almeida K, Augusto ASP, Fernando AL (2017), Utilização de bionanocompósitos de quitosano/Montmorilonita incorporados com óleo essencial de alecrim na conservação de carne de aves fresca, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.129-130

Souza VGL, Salvador M, Fernandes PDS, Santos MP, **Pires JRA**, Almeida K, Augusto ASP, Fernando AL (2017), Desenvolvimento e aplicação de filmes ativos de quitosano em carne crua de frango, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.131-132

RESUMOS EM ATAS DE CONFERÊNCIAS INTERNACIONAIS:

Souza VGL, **Pires JRA**, Rodrigues PF, Lopes AAS, Fernandes FMB, Fernando AL (2017), Physical characterization of chitosan/montmorillonite incorporated with *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil, in RL Evangelista and MP Hojilla-Evangelista (Eds.). 2017. Industrial Crops and Products: Renewable Feedstocks for a sustainable Bioeconomy, Program and Abstracts – 29th Annual Meeting of the Association for the Advancement of Industrial Crops. September 10-13, 2017, Ames, Iowa, USA. p. 58

RESUMO

O desenvolvimento de novos conceitos de embalagens para a indústria alimentar, biodegradáveis e utilizando recursos renováveis, e com propriedades mecânicas e de barreira semelhantes às tradicionais, é um desafio premente. Assim sendo, este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de bionanocompósitos de quitosano/montmorilonite incorporados com óleos essenciais (alecrim e gengibre), tendo-se estudado as suas propriedades e a sua ação como embalagem primária na conservação de carne de aves fresca. Os biofilmes de quitosano (um material biodegradável abundante na natureza) foram incorporados com a nanoargila montmorilonite (MMTCa), com vista a melhorar as propriedades mecânicas, e com óleos essenciais, de modo a aumentar a capacidade antimicrobiana e antioxidante dos mesmos.

Os filmes foram produzidos através do método *casting*. Às soluções de quitosano (1,5% m/v) foi incorporado 2,5% de Cloisite®Ca⁺⁺ (MMTCa) (m/m quitosano). A exfoliação das nanoargilas foi feita através de métodos mecânicos (três ciclos em banho de ultrassons intercalado com agitação em ultra-turrax). Os óleos de alecrim (OEA) e gengibre (OEG) foram incorporados antes do último ciclo de agitação nas proporções de 0,5, 1 e 2%, tendo-se também testado biofilmes sem óleo. Os bionanocompósitos fundidos foram introduzidos em moldes de vidro e secos naturalmente. Biofilmes sem incorporação de MMTCa foram também testados, como controlo. Todos os biofilmes foram caracterizados em termos de propriedades ópticas, humidade, *swelling* e solubilidade, propriedades mecânicas e análises de migração. Na avaliação da ação dos biofilmes como embalagem primária, a carne de aves fresca foi embalada nos biofilmes e guardada em refrigeração (5 °C ± 2 °C) durante 15 dias. Ao logo do armazenamento, estudou-se a ação dos biofilmes na carne, tendo-se avaliado características físicas e químicas (pH, acidez, humidade e cinzas, índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e cor) assim como o grau de contaminação microbiológica (contagem de micro-organismos viáveis totais e coliformes totais), na carne. Testou-se carne sem estar embalada, como controlo.

Os biofilmes produzidos resultaram num plástico homogéneo, predominantemente amarelado, flexível e sem grandes variações na espessura. A incorporação de OE e MMTCa nos biofilmes fez com que estes ficassem menos transparentes aumentando assim a barreira à luz ultravioleta. A incorporação de óleos essenciais, sobretudo de OEA, nos biofilmes de quitosano contribuiu para o aumento da migração de compostos com actividade antioxidante. Em termos mecânicos, a adição de OE fez com que os filmes ficassem mais flexíveis e menos resistentes à rutura, com menor *swelling* e solubilidade. A adição de MMTCa resultou na diminuição da migração de compostos com actividade antioxidante, observando-se uma menor humidade, *swelling* e solubilidade dos biofilmes. Em termos de propriedades mecânicas, o efeito observado foi apenas significativo no módulo de elasticidade, tendo-se verificado que a

incorporação de MMTCa associada à incorporação de óleos resultou em filmes mais flexíveis. No quitosano sem adição de óleos o MMTCa torna o filme mais rígido.

Os biofilmes demonstraram ser eficazes no processo de preservação da carne, reduzindo a oxidação lipídica e a contaminação microbiológica, e mantendo a cor, por comparação com os resultados obtidos nas amostras de carne sem proteção. A incorporação de MMTCa e de OE's (em especial do OEG) contribuiu de forma significativa para o prolongamento da vida útil da carne de frango, tendo-se demonstrado o potencial de aplicação destes biofilmes em embalagens alimentares.

TERMOS CHAVE: Embalagens Ativas, Biofilmes, Quitosano, Óleos Essenciais, Alecrim, Gengibre, Montmorilonita

ABSTRAT

The development of new packaging concepts for the food industry, biodegradable and using renewable resources, and with mechanical and barrier properties similar to traditional ones, is a pressing challenge. Thus, the objective of this work was to develop chitosan/montmorillonite bionanocomposites incorporated with essential oils (rosemary and ginger) and studied their properties and their action as primary packaging in the preservation of fresh poultry meat. Biofilms of chitosan (a naturally abundant biodegradable material) were incorporated with montmorillonite nanoclays (MMT_{Ca}) to improve mechanical properties and with essential oils in order to increase their antimicrobial and antioxidant capacity.

The films were produced using the *casting* method. To the chitosan solutions (1.5% w/v) was added 2.5% Cloisite®Ca⁺⁺ (MMT_{Ca}) (m/m chitosan). The exfoliation of nanoargilas was done by mechanical methods (three cycles in ultrasound bath intercalated with ultra-turrax shaking). Rosemary (OEA) and ginger (OEG) oils were incorporated before the last stirring cycle in the proportions of 0.5, 1 and 2%, and biofilms without oil were also tested. The melted bionanocomposites were introduced into glass molds and dried naturally. Biofilms without incorporation of MMT_{Ca} were also tested as a control. All biofilms were characterized in terms of optical properties, moisture, *swelling* and solubility, mechanical properties and migration analyzes. In evaluating the action of biofilms as primary packaging, the fresh poultry meat was packaged in the biofilms and stored in refrigeration (5°C ± 2°C) for 15 days. At the time of storage, the action of the biofilms in the meat was studied and physical and chemical characteristics (pH, acidity, humidity and ash, index of substances reactive to thiobarbituric acid and color) were evaluated as well as the degree of microbiological contamination (counts of total viable microorganisms and total coliforms) in meat. Meat was tested unpackaged as a control.

The biofilms produced resulted in a homogeneous plastic, predominantly yellowish, flexible and without great variations in thickness. The incorporation of OE and MMT_{Ca} into biofilms made them less transparent, thus increasing the barrier to ultraviolet light. The incorporation of essential oils, mainly of OEA, in the chitosan biofilms contributed to the increase of the migration of compounds with antioxidant activity. In mechanical terms, the addition of OE made the films more flexible and less resistant to rupture, with less *swelling* and solubility. The addition of MMT_{Ca} resulted in decreased migration of compounds with antioxidant activity, with lower moisture, *swelling* and solubility of biofilms. In terms of mechanical properties, the observed effect was only significant in the modulus of elasticity, and the incorporation of MMT_{Ca} associated with the incorporation of oils resulted in more flexible films. In chitosan without addition of oils, the MMT_{Ca} makes the film more rigid.

Biofilms have been shown to be effective in the meat preservation process, reducing lipid oxidation and microbiological contamination, and maintaining color, in comparison to the results obtained in unprotected meat samples. The incorporation of MMT_{Ca} and OE's (in particular

OEG) contributed significantly to the prolongation of the shelf life of chicken meat, demonstrating the potential of application of these biofilms in food packaging.

KEY WORDS: Active Packaging, Biofilms, Chitosan, Essential Oils, Rosemary, Ginger, Montmorillonite

Índice Geral

1	Introdução	1
1.1	Biofilmes.....	1
1.2	Quitosano.....	6
1.2.1	Atividade Antimicrobiológica.....	8
1.2.2	Atividade Antioxidante.....	13
1.3	Bionanocompósitos.....	14
1.4	Objetivo do Trabalho.....	17
2	Materiais e métodos	18
2.1	Materiais e Reagentes.....	18
2.2	Preparação das Amostras.....	18
2.2.1	Preparação do Filme.....	18
2.2.2	Preparação da Carne.....	18
2.3	Caracterização do Biofilme.....	19
2.3.1	Medição da Espessura.....	19
2.3.2	Propriedades Ópticas.....	19
2.3.3	Humidade, <i>Swelling</i> e Solubilidade.....	20
2.3.4	Propriedades Mecânicas.....	21
2.3.5	Análises de Migração.....	21
2.4	Caracterização da Carne.....	22
2.4.1	Cor da Carne.....	22
2.4.2	pH e Acidez Total Titulável.....	22
2.4.3	Humidade e Cinzas.....	22
2.4.4	Oxidação Lipídica (Ensaio de TBARS).....	23
2.4.5	Análises Microbiológicas.....	23
2.5	Análise de Dados.....	23
3	Resultados e Discussão	24
3.1	Caracterização do Biofilme.....	24
3.1.1	Preparação e Espessura do Filme.....	24

3.1.2	Propriedades Ópticas	24
3.1.3	Propriedades Mecânicas	32
3.1.4	Humidade, <i>Swelling</i> e Solubilidade	37
3.1.5	Análises de Migração	41
3.2	Caracterização da Carne	50
3.2.1	Cor	50
3.2.2	pH e Acidez Total Titulável	58
3.2.3	Humidade e Cinzas	64
3.2.4	Oxidação Lipídica (Ensaio TBARS)	69
3.2.5	Análises Microbiológicas	73
4	Conclusão	80
5	Referência Bibliográficas	82
6	Anexos	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Aspeto de morangos revestidos com formulação modificada de quitosano (adaptado Vu et al., 2011).....	4
Figura 1.2 - Estrutura da quitina e do quitosano (adaptado de Bégin e Calsteren, 1999).....	6
Figura 1.3 - Representação esquemática de mecanismos antimicrobianos do quitosano e dos seus derivados (adaptado de Hosseinnejad e Jafari, 2016).....	9
Figura 1.4 – Estrutura química da montmorilonita (adaptado de Ray e Okamoto, 2003).....	15
Figura 1.5 - Tipos de estruturas compósitas de materiais poliméricos com camadas de argilas de silicatos (adaptado de McGlashan e Halley, 2003).....	16
Figura 3.1 - Valores médios do chroma para os diferentes biofilmes produzidos.....	26
Figura 3.2 - Comparação dos valores médios (com e sem MMTCa) de Chroma variando o tipo de óleo incorporado e a sua concentração.....	27
Figura 3.3 - Valores médios do ângulo de Hue para os diferentes biofilmes produzidos.....	27
Figura 3.4 - Valores médios da opacidade para os diferentes biofilmes produzidos.....	29
Figura 3.5 - Comparação dos valores médios (com e sem MMTCa) da opacidade variando a tipo de óleo incorporado e a sua concentração.....	30
Figura 3.6 - Espectro de varredura dos biofilmes de quitosano com incorporação de OE sem MMT.....	30
Figura 3.7 - Espectro de varredura dos biofilmes de quitosano com incorporação de OE com MMT.....	31
Figura 3.8 - Diferenças no espectro de varredura dos biofilmes de controlo com e sem adição de MMTCa.....	31
Figura 3.9 - Comportamento típico de esforço-deformação de um ensaio de tração, onde o ponto F indica a fratura do provete. A resistência à tração é indicada no ponto M. As inserções circulares representam a geometria do espécime deformado (biofilme) em vários pontos ao longo da curva (adaptado de Callister, 2007).....	32
Figura 3.10 - Aparelho utilizado para realizar testes de tensão-deformação em tração (Autograph Shimadzu, Australia).....	33
Figura 3.11 - FT (MPa) dos diferentes biofilmes produzidos.....	35
Figura 3.12 - %E dos diferentes biofilmes produzidos.....	36
Figura 3.13 - ME (MPa) dos diferentes biofilmes produzidos.....	36
Figura 3.14 - Teor de humidade presente nos diferentes biofilmes produzidos.....	38
Figura 3.15 - Teor de <i>swelling</i> presente nos diferentes biofilmes produzidos.....	39

Figura 3.16 - Teor de solubilidade presente nos diferentes biofilmes produzidos.....	41
Figura 3.17 - Conteúdo fenólico total para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo	43
Figura 3.18 - Conteúdo fenólico total para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	44
Figura 3.19 - %Inibição do radical DPPH para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) sem MMTCa , ao longo do tempo.....	47
Figura 3.20 - %Inibição do radical DPPH para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	48
Figura 3.21 - Valores médios de L* da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo.....	51
Figura 3.22 - Valores médios de L* da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	52
Figura 3.23 - Valores médios do ângulo de Hue da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, longo do tempo.....	53
Figura 3.24 - Valores médios do ângulo de Hue da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	54
Figura 3.25 - Valores médios da variação da cor da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, longo do tempo.....	55
Figura 3.26 - Valores médios da variação da cor da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, longo do tempo.....	56
Figura 3.27 - Valores médios do pH da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo.....	59
Figura 3.28 - Valores médios do pH da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	60
Figura 3.29 - Valores médios da acidez total titulável da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo.....	61
Figura 3.30 - Valores médios da acidez total titulável da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	62
Figura 3.31 - Valores médios da percentagem de humidade da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo.....	65
Figura 3.32 - Valores médios da percentagem de humidade da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	66

Figura 3.33 - Valores médios da percentagem de cinzas da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo.....	67
Figura 3.34 - Valores médios da percentagem de cinzas da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo.....	67
Figura 3.35 - Valores médios da concentração de MDA (mg/kg), para os biofilmes controlo, com e sem MMTCa ao longo do tempo.....	69
Figura 3.36 - Valores médios da concentração de MDA (mg/kg), para os biofilmes com óleos essenciais, sem MMTCa, variando a sua concentração ao longo do tempo.....	70
Figura 3.37 - Valores médios da concentração de MDA (mg/kg), para os biofilmes com óleos essenciais, com MMTCa, variando a sua concentração ao longo do tempo.....	71
Figura 3.38 - Contagem total de mesófilos, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) , sem MMTCa, ao longo do tempo.....	74
Figura 3.39 - Contagem de total de mesófilos, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração), com MMTCa, ao longo do tempo	75
Figura 3.40 - Contagem de coliformes totais, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração), sem MMTCa, ao longo do tempo.....	77
Figura 3.41 - Contagem de coliformes totais, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração), com MMTCa, ao longo do tempo.....	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Resultados dos parâmetros da cor para os diferentes biofilmes produzidos.....25

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE - Ácido gálico equivalente

AO - Ácido oleico

C - Celsius

Ch - Quitosano

cm - Centímetro

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

E - Elongamento na quebra

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FT - Força de tração

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

g – gramas

HDPE - Polietileno de alta densidade

LDPE - Polietileno de baixa densidade

Log - Logaritmo

kg - Kilograma

kN - Kilonewton

m - Massa

MDA - Malonaldeído

ME - Módulo de elasticidade

mg - Miligrama

min - Minuto

mL - Mililitro

MMTCa - Montmorillonita cálcica

mPa - Megapascal

nm - Nanometro

NMP - Número mais provável

OE - Óleo essencial

OEA - Óleo essencial de alecrim

OEG - Óleo essencial de gengibre

PET - Polietilenotereftalato

PHA - Polihidroxialcanoatos

PHB - Polihidroxibutirato

PLA - Ácido poliláctico

PS - Poliestireno

SEM - Microscópio eletrónico de varrimento

SF - Suspensão filmogénica

TCA - Ácido tricloroacético

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEP - 1,1,3,3-tetraetoxipropano

UFC - Unidade de formação de colónias

UV - Ultravioleta

v - Volume

Vis - Vísivel

μMol – Micromol

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOFILMES

Ao longo das últimas décadas, a indústria das embalagens transformou-se numa indústria de serviços altamente sofisticada e inteligente, particularmente para alimentos perecíveis, aproveitando-se do estado de arte na ciência de materiais, fabricação e engenharia de processos, juntamente com o conhecimento cada vez mais avançado da ciência alimentar (Imam et al., 2008). Sendo uma indústria que está frequentemente exposta a novos desafios, é necessário que haja uma constante atualização na busca de novas abordagens específicas para os superar (Aider, 2010; Fernando, 2006).

Vidro, metal, papel e cartão, e plásticos são os materiais tradicionais utilizados por esta indústria. Devido às suas propriedades funcionais, conveniência, resistência, baixo peso e custos, o plástico surgiu como o principal material utilizado na embalagem de alimentos nas últimas décadas (Souza e Fernando, 2016). Em 2005 a produção global anual de plásticos já ultrapassava os 250 milhões de toneladas, dos quais cerca de 40% ou 100 milhões de toneladas eram utilizados em embalagens, sendo que esta produção tem tendência para aumentar (Platt, 2006). Os polímeros sintéticos são fortes fisicamente, são quimicamente e biologicamente inertes e oferecem boas propriedades de barreira (a humidade e gases) e de isolamento térmico (Imam et al., 2008). Estas propriedades são consideradas críticas quando se fala em alimentos embalados, visto que o principal desafio das embalagens é o de retardar os processos naturais que levam à degradação do género alimentício, protegendo-o de adulterações ou contaminações provenientes de fontes físicas, químicas e biológicas (Sanches-Silva et al., 2014; Souza e Fernando, 2016). Embora o uso de materiais como os plásticos e os seus derivados nas embalagens convencionais seja eficaz na preservação dos alimentos, estes criam sérios problemas ambientais que continuam a apontar a indústria alimentar como uma fonte de poluição e de preocupação social (Aider, 2010). Devido ao facto dos consumidores estarem cada vez mais consciencializados sobre os problemas ambientais que afetam o nosso planeta, é fundamental o desenvolvimento de novos conceitos de embalagens (Aider, 2010) utilizando materiais derivados de recursos renováveis de modo a reduzir as emissões de CO₂ e a dependência de recursos fósseis (Peelman et al., 2013). A ambição de substituir os recursos não renováveis por recursos renováveis, tornando esta indústria mais sustentável, é a principal motivação que está por detrás do desenvolvimento e introdução de biopolímeros em embalagens ativas. Outra motivação é o desejo de reduzir a quantidade de embalagens usadas que se acumulam em aterros ou no ambiente (principalmente nos oceanos), convertendo-as em embalagens biodegradáveis (Robertson, 2008). A contribuição da embalagem para o custo total do produto final é elevada, assim sendo, a procura por materiais mais económicos é um aspeto que também não pode ser negligenciado (Aider, 2010).

Os biopolímeros são materiais poliméricos derivados de recursos naturais (Mensitieri et al., 2011) e estes materiais são biodegradáveis e compostáveis, encontrando-se em muitos casos em abundância na natureza, onde são considerados excedentes ou resíduos (Kim et al., 2006; Galus e Kadzińska, 2015; Souza e Fernando, 2016). Os biopolímeros podem ser divididos em duas classes principais, consoante o seu processo de degradação: fotodegradáveis e biodegradáveis (Souza e Fernando, 2016). Os primeiros, após exposição à luz solar, sofrem degradação foto-oxidativa. Nos biodegradáveis, o processo de degradação resulta em fragmentos de baixo peso molecular produzidos pela acção de micro-organismos de ocorrência natural tais como bactérias, fungos e algas. A degradação pode ser aeróbia ou anaeróbia, obtendo-se como resultado dióxido de carbono, água, compostos inorgânicos, metano e biomassa (Robertson, 2008; Souza e Fernando, 2016).

Os biopolímeros são geralmente hidrocolóides, como polissacáridos ou proteínas de fontes animais ou vegetais (McMillin, 2017). Podem ser extraídos/removidos da biomassa, ou produzidos por síntese química clássica a partir de monómeros renováveis ou ainda podem ser produzidos por micro-organismos geneticamente modificados (Mensitieri et al., 2011).

As proteínas utilizadas mais frequentemente nos biofilmes são o colagénio, gelatina, caseína, proteína do soro do leite, zeína de milho, glúten de trigo, proteína de soja, proteína de clara de ovo, proteína miofibrilar, proteína de quinoa e queratina (Galus e Kadzińska, 2015). Os polissacáridos, polímeros estereoregulares de monossacáridos (açúcares), são matérias-primas únicas na medida em que são polímeros naturais muito abundantes, baratos, amplamente disponíveis em muitos países e considerados como recursos renováveis, estando o amido, a celulose e os seus derivados, a pectina e o quitosano entre os principais polissacáridos testados como materiais para embalagens comestíveis (Galus e Kadzińska, 2015). Têm propriedades biológicas e químicas tais como não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, polifuncionalidade, reatividade química, quiralidade, quelação e capacidade de adsorção. O excelente comportamento de adsorção dos polissacáridos é atribuído principalmente à alta hidrofiliidade do biopolímero devido aos grupos hidroxilo de unidades de glicose, à presença e elevada reatividade química de um grande número de grupos funcionais (acetamido, amino primário e/ou grupos hidroxilo) e à estrutura flexível da cadeia polimérica (Crini, 2005). A estrutura linear de alguns destes polissacáridos como por exemplo, a celulose, amilose e o quitosano torna os biofilmes flexíveis, transparentes e resistentes a gorduras e óleos (Dhall, 2013).

Atualmente alguns biopolímeros já se encontram disponíveis no mercado (como por exemplo, o ácido poliláctico (PLA), o amido e o polihidroxibutirato (PHB)) sendo utilizados por grandes empresas do ramo alimentar como por exemplo a McDonald's, a Pepsi ou a Danone, e são utilizados maioritariamente para embalar produtos perecíveis, como as frutas e vegetais, ou produtos com uma longa vida de prateleira, como massas e batatas, que não exigem grandes propriedades de barreira a água e oxigénio (Peelman et al., 2013). O PLA (ácido poliláctico) faz parte da família do poliéster termoplástico biodegradável feito a partir de recursos renováveis e

é hoje considerado um dos biopolímeros mais promissores para uso comercial como um substituto para o polietileno de baixa densidade (LDPE), polietileno de alta densidade (HDPE), poliestireno (PS) e polietilenotereftalato (PET) (Peelman et al., 2013). É produzido através da conversão do milho, ou outras fontes de hidratos de carbono, em dextrose, seguido por uma fermentação em ácido láctico, sendo o passo final para se obter o granulado de PLA uma policondensação direta ou polimerização de monómeros de ácido láctico (Peelman et al., 2013). O amido é economicamente competitivo com o petróleo sendo o milho a sua principal fonte para a formação de bioplásticos, tendo sido mais recentemente avaliado o seu uso derivado da batata, trigo, arroz, cevada, aveia e soja (Liu, 2006). Só por si, o amido não forma películas com propriedades mecânicas satisfatórias, a menos que seja plastificado, misturado com outros materiais, quimicamente modificado ou modificado com uma combinação destes tratamentos (Liu, 2006). Plastificantes como o glicerol, sorbitol, monoglicéridos, polietilenoglicol e glicose são frequentemente utilizados para aumentar a flexibilidade e a elasticidade dos filmes e revestimentos (Galus e Kadzińska, 2015). Os materiais termoplásticos à base de amido têm sido aplicados com êxito a nível industrial através de técnicas de processamento como a espumação, sopragem de películas, moldagem por injeção, moldagem por sopro e extrusão (Peelman et al., 2013). Os polihidroxicanoatos (PHA) são polímeros termoplásticos biodegradáveis, produzidos por uma ampla gama de microorganismos (Peelman et al., 2013). Este polímero é produzido nas células microbianas através de um processo de fermentação e depois colhido utilizando solventes tais como clorofórmio, cloreto de metileno ou cloreto de propileno. São conhecidos mais de 100 compósitos de PHA, dos quais o polihidroxitirato (PHB) é o mais comum (Peelman et al., 2013).

Recentemente tem sido conduzida uma pesquisa notável para desenvolver e aplicar biopolímeros em biofilmes, tendo estes sido destacados como uma possível nova geração de materiais para embalagens (Mensitieri et al., 2011). Podem ser usados como material de base para se obter biofilmes finos mas também em revestimentos edíveis prontos para cobrir alimentos frescos ou processados com o objetivo de prolongar a sua vida útil (Elsabee e Abdou, 2013) e são definidos como uma embalagem primária (Galus e Kadzińska, 2015). Os revestimentos são suspensões que podem ser obtidas por pulverização, espalhamento ou imersão, que depois de secarem formam uma camada fina transparente sobre a superfície do alimento (Sánchez-Ortega et al., 2014). Por outro lado, os biofilmes são obtidos a partir de suspensões filmogénicas que são normalmente fundidas sobre uma superfície inerte, que após secagem podem ser colocadas em contacto com superfícies alimentares (Sánchez-Ortega et al., 2014). Dado que podem ser consumidos, o material utilizado na preparação dos biofilmes deve ter o estatuto "Generally Regarded As Safe" (GRAS) e deve estar em conformidade com as regulamentações aplicáveis ao produto alimentar em causa (Krkić et al., 2011). A tecnologia de revestimento comestível é um método promissor especialmente para preservar a qualidade das frutas e legumes frescos (Dhall, 2013). Por exemplo, Vu et al., (2011) desenvolveu um revestimento bioativo comestível baseado em quitosano modificado para aumentar a vida útil

do morango durante o armazenamento, tendo obtido excelentes resultados como podemos ver pela Fig 1.1.

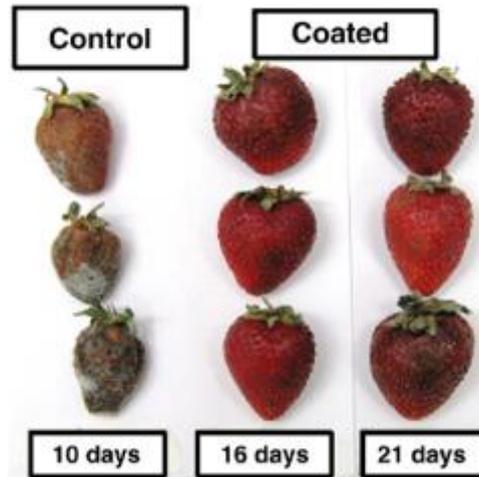


Fig. 1.1 Aspecto de morangos revestidos com formulação modificada de quitosano (adaptado de Vu et al., 2011)

Os biofilmes oferecem vantagens como a comestibilidade, biocompatibilidade, barreira a gases, não toxicidade, não serem poluentes, boa aparência estética, baixo custo (Elsabee e Abdou, 2013; Galus e Kadzińska, 2015), mas existem ainda alguns constrangimentos quanto à utilização de biofilmes no embalamento de géneros alimentícios. As propriedades e funcionalidades dos biopolímeros ainda não estão ao mesmo nível das dos plásticos tradicionais (Peelman et al., 2013). Apesar da sua característica biodegradável, os biopolímeros têm três problemas principais: desempenho, processamento e custo. Em especial, as suas propriedades mecânicas e de barreira (fragilidade, a instabilidade térmica, a baixa resistência à fusão, a dificuldade de selagem a quente e a permeabilidade ao oxigénio) são precárias e estão a limitar o seu uso, particularmente nas embalagens de alimentos (Souza e Fernando, 2016). Além do preço ser mais elevado, as preocupações sobre a disponibilidade, bem como sobre o uso da terra para produzir bioplásticos ainda trazem grandes limitações (Fernando et al., 2015; Peelman et al., 2013). Devido à natureza hidrofílica dos polissacáridos, os materiais com base nestes materiais têm uma barreira de vapor de água baixa, o que provoca uma estabilidade limitada a longo prazo e fracas propriedades mecânicas, sabendo-se que as propriedades de barreira em embalagens de alimentos são de extrema importância (Peelman et al., 2013). A interação entre o oxigénio ou o vapor de água e o produto pode deteriorar a qualidade dos alimentos. Uma das principais funções dos biofilmes nas embalagens de alimentos é retardar a transferência de oxigénio e humidade entre o alimento e o ambiente, de modo que a permeabilidade ao oxigénio e a permeabilidade ao vapor de água devem ser tão baixas quanto possível para aumentar a vida útil do produto (Robertson, 2008). Essas características dos biofilmes podem ser modificadas pela adição de alguns compostos de reforço, geralmente na dimensão nanométrica, formando compósitos/ nanocompósitos

(Sadeghi & Mahsa, 2015). O uso da nanotecnologia como reforço para esses materiais surgiu como uma solução, porque os “nanofillers” são capazes de melhorar a barreira e as propriedades mecânicas diminuindo as dimensões do enchimento e também reduzindo o custo de produção, pois é necessário menos material para obter as propriedades desejadas (Rhim et al., 2013).

Os biofilmes podem ser também modificados de modo a apresentarem maior atividade, permitindo o aumento do prazo de vida útil dos alimentos. As embalagens ativas são sistemas/tecnologias de embalagens inovadoras que permitem que o produto e o ambiente em que está envolto interajam de modo a prolongar a sua vida útil e/ou garantir a sua segurança microbiana, mantendo a qualidade dos alimentos embalados (Fang et al., 2017). Oficialmente, com base na European Union Guidance to the Commission Regulation (EUGCR) N° 450/2009 (UE, 2009), a embalagem ativa é um tipo de embalagem de alimentos com uma função extra, além de proporcionar uma barreira protetora contra influências externas. A embalagem absorve produtos químicos derivados da comida ou do ambiente dentro da embalagem que envolve a comida; ou liberta substâncias, como conservantes, antioxidantes e aromas, nos alimentos ou no meio ambiente que envolve os alimentos (UE, 2009). Muitas vezes, isso é conseguido incorporando compostos ativos nos materiais das embalagens, podendo conter componentes químico/bioativos (McMillin, 2017; Pascoal et al., 2015). As funções e tecnologias do empacotamento ativo incluem controlo de humidade, controlo de difusão de oxigénio e etileno, controlo de dióxido de carbono, eliminação ou absorção de oxigénio ou dióxido de carbono, controlo de odores, aumento de sabores, agentes antimicrobianos, indicadores de compostos específicos, entre outras (Kruif et al., 2002). Os tipos de embalagens ativas e aplicações comerciais para alimentos são principalmente categorizados em absorventes de humidade, embalagens antimicrobianas, emissores de CO₂ e antioxidantes, sendo as mais comuns as que têm funções antioxidantes e antimicrobianas (McMillin, 2017).

Para que os biofilmes sejam aplicáveis e lançados no mercado, é necessário fazer uma avaliação completa ao material como, por exemplo, conhecer as taxas de degradação do polímero sob várias condições, alterações nas propriedades mecânicas durante o armazenamento, potencial crescimento microbiano e libertação de compostos nocivos (Robertson, 2008; Rhim et al., 2013). É necessário fazer uma avaliação completa das propriedades funcionais do bioplástico antes que ele possa ser usado como uma alternativa aos materiais tradicionais (Peelman et al., 2013).

1.2 QUITOSANO

O quitosano tem sido amplamente estudado no que diz respeito à sua origem, composição, estrutura e propriedades físico-químicas, sendo que sua caracterização funcional e dos seus derivados é na atualidade uma das áreas de pesquisa mais produtivas (Zivanovic et al., 2005). A crescente consciencialização dos potenciais e do valor deste biopolímero leva à sua utilização em muitas aplicações de interesse técnico, principalmente nas áreas da agricultura, alimentação e biomédica (Raafat e Sahl, 2009). Na agricultura pode ser usado como revestimento de sementes para se obter melhor rendimento e proteção contra doenças fúngicas (Zivanovic et al., 2015). Na biomedicina tem sido aplicado como revestimento de fármacos, revestimento para acelerar o processo de cicatrização, anticoagulante de sangue, lentes de contacto e pele artificial (Zivanovic et al., 2015). Na indústria alimentar têm sido sugeridas inúmeras aplicações tais como, aditivo alimentar, agente espessante em bebidas, agente clarificante em sumos, material para embalagens ou como revestimento edível para frutas e vegetais (Zivanovic et al., 2015).

O quitosano é um polissacárido linear catiónico composto por glucosamina (70-100%) e acetilglucosamina (0-30%) com um alto peso molecular e é obtido através da desacetilação da quitina (Fig. 1.2), que é o segundo polissacárido mais abundante encontrado na natureza a seguir à celulose (Zivanovic et al., 2005; Dutta et al., 2009; Giannakas et al., 2014). Embora a estrutura do quitosano seja representado como um homopolímero, a operação de desacetilação é raramente completa e a maioria dos produtos comerciais são copolímeros compostos por unidades repetidas de quitosano e quitina alternadamente, sendo que o grau de desacetilação pode variar entre 70 e 95%, dependendo da metodologia utilizada. Possui semelhança na sua estrutura química com a celulose, porém exibe propriedades diferenciadas devido à presença dos grupos amina (Damian et al., 2005). As duas unidades repetidas, N-acetil-2-amino-2-d-glucopirranose e 2-amino-2-desoxi-d-glucopirranose estão ligadas por uma ligação β -(1→4)-glicósida, conferindo ao quitosano uma estrutura cristalina rígida. Por possuir dois grupos reativos -NH_2 e -OH , o quitosano exibe propriedades químicas e biológicas excepcionais (Shukla et al., 2013).

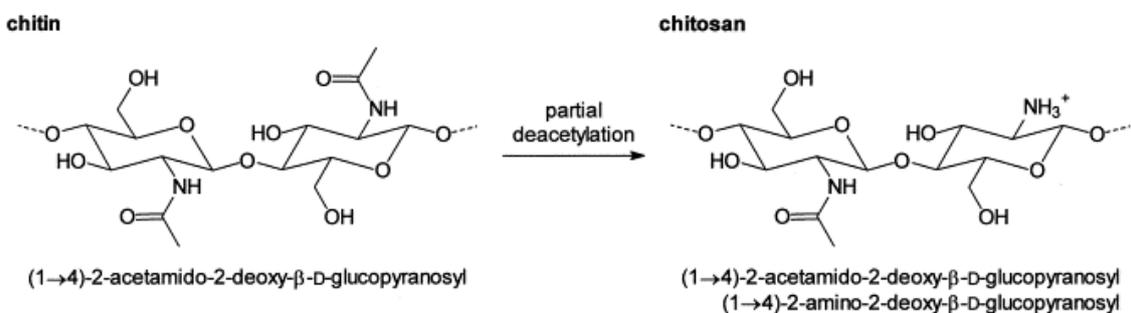


Fig. 1.2 Estrutura da quitina e do quitosano (adaptado de Bégin e Calsteren, 1999)

É maioritariamente extraído das cascas de crustáceos (caranguejos, camarões e lagostins) (Devlieghere et al., 2004), mas também pode ser encontrado na natureza, como nas paredes celulares de fungos da classe *Zygomycetes*, nas algas verdes *Chlorella sp.*, leveduras e protozoários, bem como em alguns insetos. Os avanços na tecnologia de fermentação sugerem que o cultivo de fungos (*Aspergillus niger*) pode fornecer uma fonte alternativa de quitosano (Raafat e Sahl, 2009). No entanto, o quitosano de ambas as fontes difere ligeiramente: enquanto os grupos acetilo nos quitosanos produzidos a partir de quitina de crustáceos são uniformemente distribuídos ao longo da cadeia polimérica, um quitosano de grau semelhante de desacetilação isolado a partir de paredes celulares fúngicas possuirá resíduos de acetilo que são agrupados em cachos não uniformes (Raafat e Sahl, 2009).

Uma grande parte do interesse comercial pelo quitosano e seus derivados deriva do facto de estes combinarem várias características biológicas favoráveis, incluindo biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade (Dutta et al., 2009).

Uma das propriedades biológicas mais importantes para qualquer biomaterial implantável é a sua biocompatibilidade, isto é, não deve ser afetado pelo hospedeiro e, ao mesmo tempo, não deve provocar quaisquer efeitos locais ou sistémicos indesejáveis (Raafat e Sahl, 2009). O quitosano é bem tolerado pelos tecidos vivos, incluindo a pele, as membranas oculares, bem como o epitélio nasal, tornando-se valioso para uma vasta gama de aplicações biomédicas (Raafat e Sahl, 2009). O baixo perfil de toxicidade do quitosano em comparação com outros polissacáridos naturais é outra das suas características atraentes, tendo sido relatado que a pureza do quitosano influencia o seu perfil toxicológico, mas a sua segurança em termos de baixa ou nenhuma toxicidade foi demonstrada por estudos de toxicidade *in vivo* (Singla e Chawla, 2001). Para além das boas propriedades biológicas, o quitosano também dispõe de propriedades físico-químicas interessantes, como viscosidade, solubilidade em vários meios, mucoadesividade, capacidade para formar películas e quelação de metais (Shukla et al., 2013). A maioria dos polissacáridos naturais tais como a pectina, dextrina, agar e celulose têm uma natureza acídica, enquanto que o quitosano é um polissacárido básico (Zivanovic et al., 2005). O quitosano não é solúvel em água pura ou solventes orgânicos mas é solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos ou minerais com pH inferior a 6 (Damian et al., 2005; Kim et al., 2006). Devido ao seu elevado peso molecular e solubilidade em soluções aquosas ácidas, o quitosano pode formar géis, filmes e fibras (Zivanovic et al., 2005). As suas propriedades mecânicas e permeabilidade à humidade não são as melhores e devem por isso ser melhoradas (Giannakas et al., 2014). Isto deve-se à natureza hidrofílica do quitosano o que limita a sua utilização em filmes funcionais (Ghelejlou et al., 2016). Devido ao facto de ter uma estrutura cristalina rígida os biofilmes de quitosano necessitam de plastificantes para reduzir as forças de fricção entre as cadeias poliméricas, tais como as ligações de hidrogénio ou forças iónicas, para melhorar as propriedades mecânicas, sendo que a incorporação de polióis na formulação do filme pode ultrapassar este inconveniente e manter as propriedades mecânicas do filme estáveis durante o tempo desejado (Leceta et al., 2013).

Tendo em conta que é um potencial conservante alimentar de origem natural, foi classificado como “Generally Regarded As Safe” (GRAS) pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos (USFDA) (USFDA, 2013).

1.2.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIOLÓGICA

O crescimento microbiano na superfície dos alimentos é uma das principais causas da deterioração dos alimentos, tendo nos últimos anos havido desenvolvimentos notáveis nos filmes de embalagens poliméricas incorporados com agentes antimicrobianos para melhorar a preservação de alimentos embalados (Ojagh et al., 2010). Estes filmes possuem o potencial para melhorar a estabilidade microbiana dos alimentos atuando na superfície dos mesmos (Ojagh et al., 2010). As substâncias antimicrobianas incorporadas nos materiais das embalagens, através dos biofilmes de quitosano, podem controlar a contaminação microbiana, reduzindo a taxa de crescimento e o máximo crescimento da cultura, ou mesmo inativando os micro-organismos por contacto direto (Quintavalla e Vicini, 2002).

O quitosano apresenta uma atividade antimicrobiológica intrínseca, a qual é efetivamente expressa em sistemas aquosos (Aider, 2010). A atividade antimicrobiana varia consideravelmente com o tipo de quitosano utilizado, particularmente com o seu grau de desacetilação, peso molecular, organismo alvo e as condições do meio no qual é aplicado (especialmente o pH, temperatura e humidade relativa), força iónica e presença de solutos suscetíveis a reagir com o quitosano através de interações eletroestáticas e/ou ligações covalentes que podem servir de barreira à reatividade dos grupos amina ativos (Devlieghere, et al., 2004; Zivanovic et al., 2005; Aider, 2010).

O mecanismo exato da ação antimicrobiana da quitina, do quitosano e dos seus derivados ainda não é totalmente conhecido mas várias abordagens têm sido propostas para explicar tal fenómeno (Fig. 1.3), tais como: a) as moléculas NH^{3+} positivamente carregadas do quitosano interagem com as membranas carregadas negativamente da bactéria alterando a permeabilidade das células, causando disrupção e a morte celular; b) o quitosano inibe o crescimento microbiano através da quelação de nutrientes e metais essenciais; c) o quitosano forma uma membrana polimérica na superfície da célula impedindo que os nutrientes entrem na mesma; d) o quitosano atua como uma barreira ao oxigénio que pode inibir o crescimento de bactérias aeróbias (Zivanovic et al., 2005 ; Hosseinnejad e Jafari, 2016).

A atividade antibacteriana é um processo complicado que difere entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido às diferentes características da superfície celular (Kong et al., 2010). Nas bactérias Gram-positivas, o principal constituinte da sua parede celular é o peptidoglicano, tendo também uma pequena percentagem de proteína. A parede celular das bactérias Gram-negativas, por outro lado, é mais fina, mas mais complexa e contém vários polissacáridos, proteínas e lípidos, além do peptidoglicano (Elsabee e Abdo, 2013). Ainda não é certo qual o tipo de bactérias mais sensível a esta atividade, há estudos que afirmam que as bactérias

Gram-positivas são mais sensíveis (No et al., 2002), enquanto há outros autores que observaram mais sensibilidade em bactérias Gram-negativas (Devlieghere et al., 2004; Younes et al., 2014). Mesmo assim, é comumente reconhecido pela comunidade científica que as leveduras e os bolores são os grupos mais sensíveis ao quitosano, seguindo-se as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Aider, 2010). O quitosano também exerce um efeito antifúngico suprimindo a esporulação e a germinação dos esporos. (Aider, 2010; Kong et al., 2010).

Existem inúmeros relatos sobre a potência antimicrobiana de diferentes tipos de quitosanos e derivados, vindos de várias fontes e testados em condições diversas. Em muitos casos observaram-se diferenças nos resultados obtidos, o que não foi surpreendente, uma vez que a atividade antimicrobiana *in vitro* do quitosano é influenciada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos, relacionados tanto com o próprio quitosano (tipo, peso molecular, grau de desacetilação, viscosidade, solvente e concentração) como com condições ambientais (tipo de micro-organismo em teste, estado fisiológico do meio de cultura bacteriana, pH, temperatura, força iônica, íons metálicos, EDTA, matéria orgânica), respectivamente (Raafat e Sahl, 2009).

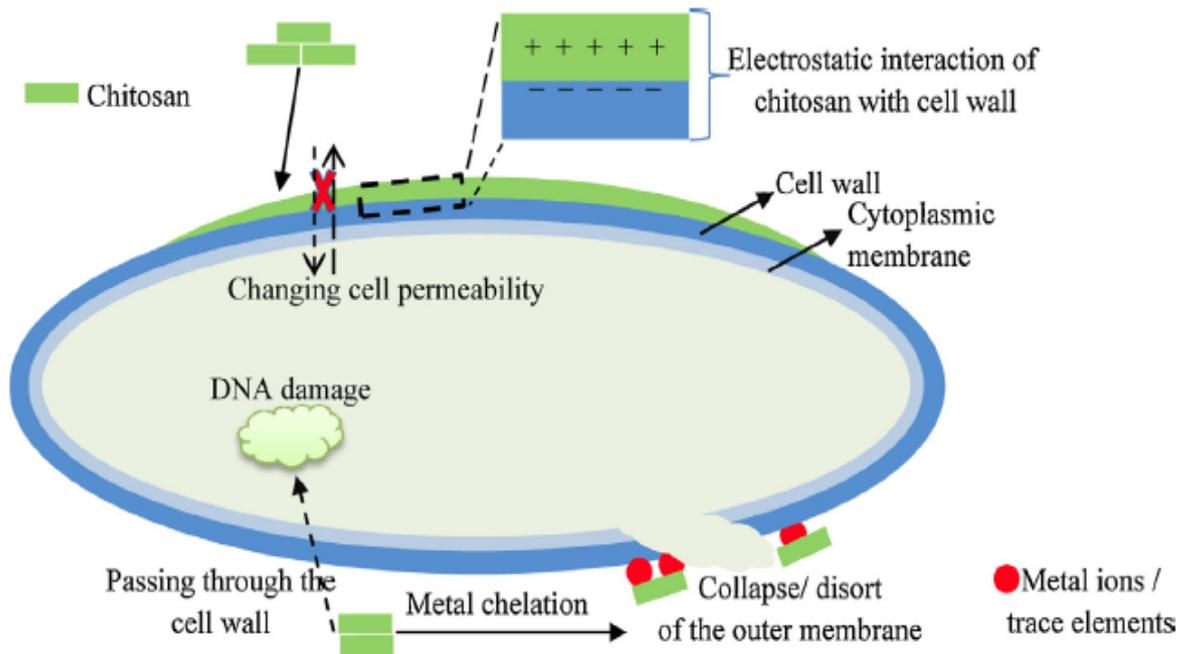


Fig. 1.3 Representação esquemática de mecanismos antimicrobianos do quitosano e dos seus derivados (adaptado de Hosseinnejad e Jafari, 2016)

1.2.1.1 FATORES INTRÍNSECOS QUE AFETAM A ATIVIDADE ANTIMICROBIOLÓGICA

A estrutura policatiônica do quitosano desempenha um papel fundamental na sua atividade antimicrobiológica (Damian et al., 2005). O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importantes do quitosano, pois este determina o conteúdo de grupos amina livres no polissacárido, diferenciando-o da quitina, sendo que quanto maior for o grau, maior vai ser a densidade de carga positiva e conseqüentemente a solubilidade (Damian et al., 2005). Estes dois fatores são importantes para a adesão do quitosano às células das bactérias, sabendo que uma maior densidade de carga positiva leva a que haja uma forte interação eletroestática. Por conseguinte, verifica-se que graus de desacetilação maiores demonstram uma atividade antimicrobiana mais eficaz (Aider, 2010; Kong et al., 2010).

O quitosano pode ser distinguido pelo seu peso molecular em, quitosano de alto peso molecular, quitosano de baixo peso molecular e oligoquitosano (quitosano de cadeia curta). O quitosano de alto peso molecular não consegue atravessar a membrana celular, portanto acumula-se na sua superfície, fazendo com que bloqueie o transporte de nutrientes para a célula dando origem à lise celular. Por outro lado, as moléculas de quitosano dissociadas em solução, com um menor peso molecular, podem ligar-se ao DNA e inibir a síntese de mRNA ao penetrar os núcleos dos micro-organismos (Hosseinnejad e Jafari, 2016). Quitosanos de menor peso molecular têm melhor atividade antimicrobiana que os quitosanos de maior peso molecular. Este comportamento pode ser explicado pelo motivo do primeiro ser mais solúvel em meios aquosos que o segundo e esta solubilidade é de extrema importância para reagir com os locais ativos do micro-organismo alvo, mas há que ter em atenção que pesos moleculares muito baixos têm muito pouca ou nenhuma atividade antibacteriana e antifúngica sendo necessário um grau de polimerização de pelo menos sete unidades básicas de glucosamina (Aider, 2010).

Recentemente, Younes et al., (2014) demonstraram que a atividade antibacteriana melhorou para as bactérias Gram-negativas com o decréscimo do peso molecular, enquanto que o efeito oposto foi observado com bactérias Gram-positivas. Relativamente à atividade antifúngica, a influência das características do quitosano foi dependente do tipo de fungo. No mesmo estudo, o crescimento fúngico diminuiu com o aumento do peso molecular para o *F. oxysporum* e com o decréscimo dos graus de acetilação para o *A. solani*, mas não foram observadas dependências de peso molecular e graus de acetilação para o *Aspergillus niger*. Este estudo demonstrou que ainda não está completamente explícito qual a influência do tipo de micro-organismo na atividade antimicrobiológica do quitosano. A macromolécula de quitosano contém uma grande quantidade de grupos amina e hidroxilo que lhe conferem a capacidade de formar complexos metálicos (Hosseinnejad e Jafari, 2016). Normalmente, a estrutura dos complexos quitosano-metal depende da relação molar entre o quitosano e o íon metálico, peso molecular, grau de desacetilação e condições de preparação (Hosseinnejad e Jafari, 2016). Wang

et al., (2004) caracterizaram cinco complexos de quitosano-zinco com diferentes teores de zinco, verificando que complexos com diferentes teores de zinco tinham uma estrutura molecular diferente. As atividades antimicrobianas *in vitro* dos complexos foram avaliadas contra 11 espécies de bactérias e fungos. Os complexos mostraram um amplo espectro de atividades antimicrobianas eficazes, que foram de 2-8 vezes e 4-16 vezes mais elevadas do que as do quitosano e sulfato de zinco, respectivamente, e melhoraram com o aumento do teor de iões de zinco. Para além disto o estudo mostrou que os complexos tinham uma melhor actividade antibacteriana do que a actividade antifúngica, e mostraram excelentes resultados particularmente contra *E. coli* e *Corynebacterium*.

A atividade antimicrobiológica do quitosano pode ser potenciada com a incorporação de óleos essenciais (OE) (Zivanovic et al., 2005). Esta incorporação de OE tem ganho especial interesse devido às propriedades bactericidas, fungicidas e antioxidantes associadas. Os terpenos e os compostos fenólicos são os responsáveis maioritários pelos efeitos antimicrobianos dos OE, se bem que a sua atividade antimicrobiana total não pode ser atribuída apenas à mistura dos principais componentes que têm esta capacidade (Sánchez-González et al., 2011a). Os OE são misturas complexas de numerosas moléculas, e os seus efeitos biológicos são o resultado de um sinergismo de todos os (Hosseinnejad e Jafari, 2016). Os terpenos têm a capacidade de penetrar a estrutura lipídica da membrana celular das bactérias, levando à desnaturação das proteínas e à destruição da membrana celular (Turina et al., 2006). Apesar do grande potencial dos óleos essenciais, o seu uso na preservação de alimentos permanece limitado principalmente devido ao seu aroma intenso e a problemas de toxicidade (Sánchez-González et al., 2011a). Para minimizar as doses requeridas é necessário então um veículo de transporte como os biofilmes de quitosano. A principal vantagem desta tecnologia é que a taxa de difusão do agente antimicrobiano/antioxidante pode ser retardada, mantendo assim altas concentrações dos compostos ativos na superfície do produto (onde a contaminação existe) durante períodos prolongados de tempo (Sánchez-González et al., 2011a). Outras limitações do uso dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos incorporados numa matriz polimérica são a sua baixa estabilidade térmica e alta volatilidade (Efrati et al., 2014). Nos resultados apresentados por Zivanovic et al., (2005), filmes de quitosano puro reduziram a *L. monocytogenes* em 2 logs, enquanto filmes enriquecidos com 1% e 2% de óleo de orégão o número da *L. monocytogenes* foi reduzido entre 3,6 e 4 logs e a *E. coli* em 3 logs. Também Ojagh et al., (2010) mostraram uma excelente compatibilidade entre o OE de canela e o quitosano. A sua incorporação melhorou a capacidade antibacteriana do biofilme, sendo este uma boa alternativa para o revestimento de alimentos altamente perecíveis, como peixes e aves.

1.2.1.2 FATORES EXTRÍNSECOS QUE AFETAM A ATIVIDADE ANTIMICROBIOLÓGICA

O quitosano é policatiónico a pH inferior a 6 e interage de imediato com substâncias carregadas negativamente, tais como as proteínas, ácidos gordos, ácidos biliares e fosfolipídios devido à alta densidade de grupos amina presentes no biopolímero (Hosseinnejad e Jafari, 2016). Demonstra assim um efeito inibidor mais forte para pH mais baixo, com esta atividade a diminuir com o aumento do pH, tal como demonstraram Younes et al., (2014). O facto do quitosano não permanecer bactericida a pH 7 pode ser devido à diminuição grupos amina carregados positivamente bem como à fraca solubilidade do quitosano (Kong et al., 2010).

A alternância da força iónica num meio pode perturbar a atividade antimicrobiana do quitosano, provavelmente causada por dois mecanismos: primeiro, o aumento de iões metálicos, especialmente iões divalentes, pode atenuar a capacidade quelante eficaz do quitosano; em segundo lugar, juntamente com o quitosano policatiónico, os catiões existentes no meio podem interagir competitivamente com os componentes negativos que dominam a parede celular da bactéria, conseqüentemente enfraquecendo a actividade antimicrobiana (Kong et al., 2010). Mas os resultados quanto ao efeito da força iónica sobre a atividade do quitosano ainda são contraditórios. Enquanto Chung et al., (2003) propõem que uma força iónica mais elevada pode aumentar a solubilidade do quitosano e assim aumentar a sua atividade antibacteriana, independentemente do tipo de cultura em teste, Tsai e Su (1999) sugerem que a presença de iões de sódio reduzem a atividade contra a *E. coli*.

Para aplicações comerciais, seria prático preparar grandes quantidades de soluções de quitosano e armazená-las para utilização posterior. Durante o armazenamento, as características específicas do quitosano, viscosidade ou peso molecular podem ser alteradas (Kong et al., 2010). Desse modo, a viscosidade alterada de uma solução de quitosano deve ser monitorizada uma vez que pode influenciar outras propriedades funcionais da solução (Kong et al., 2010). A estabilidade das soluções de quitosano e a sua atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*Salmonella enteritidis* e *E. coli*) foram investigadas a 4° C e 25° C após 15 semanas de armazenamento (No et al., 2006). Geralmente, as soluções de quitosano antes do armazenamento apresentaram maior atividade antibacteriana do que aquelas após 15 semanas de armazenamento. As soluções de quitosano armazenadas a 25° C possuíam atividade antibacteriana paralela ou mais fraca em comparação com aquelas a 4° C. Noutro estudo, a suscetibilidade da *E. coli* ao quitosano aumentou com o aumento da temperatura de 4 a 37° C (Tsai e Su, 1999), sugerindo que o stress a baixa temperatura era capaz de alterar a estrutura da superfície celular de forma a diminuir o número de locais de ligação à superfície (ou eletronegatividade) para derivados de quitosano.

1.2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes, são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com os substratos oxidáveis, atrasam ou inibem significativamente a oxidação desses substratos, podendo atuar em diferentes níveis numa sequência oxidativa (Wan et al., 2013).

As reações oxidativas nos alimentos representam um processo de deterioração grave, levando a um desperdício significativo. Estas promovem a descoloração e o desenvolvimento de rancidade e de aromas, afetando negativamente o aspeto, o valor nutricional e a qualidade dos géneros alimentícios (Talón et al., 2017). Para superar estes problemas, a indústria alimentar utiliza frequentemente antioxidantes sintéticos, com propriedades para a saúde duvidosas, para evitar estes processos indesejáveis (Talón et al., 2017). Atualmente, os antioxidantes mais utilizados na indústria alimentar são o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (Siripatrawan e Harte, 2010). Embora estes antioxidantes sintéticos possam ser efetivamente utilizados em embalagens alimentares ativas devido à sua elevada estabilidade, baixo custo e eficiência, existem preocupações significativas relacionadas com os seus aspetos toxicológicos. Além disso, o uso de antioxidantes sintéticos está sob estrita regulamentação devido ao risco potencial para a saúde causado por tais compostos (Siripatrawan e Harte, 2010).

O facto de os consumidores exigirem cada vez mais a não utilização de produtos químicos em produtos alimentares minimamente processados, tem feito com que seja dada mais atenção à procura de substâncias naturais capazes de atuar como antioxidantes alternativos (Ponce et al., 2008). A incorporação dessas substâncias em embalagens antioxidantes é uma alternativa, sendo considerada como um dos sistemas de embalagens ativas mais promissores (Wan et al., 2013).

O quitosano para além da atividade antimicrobiana também possui uma atividade antioxidante intrínseca (Siripatrawan e Harte, 2010), mas esta atividade não é significativa (Kanatt et al., 2008). Quando utilizado como aditivo alimentar, a atividade antioxidante do quitosano é geralmente atribuída à sua eficiência de quelação, uma vez que, ao se ligar com os iões metálicos, o quitosano impede a iniciação da oxidação dos lípidos, atuando como um antioxidante secundário (Schreiber et al., 2013). Além disso, devido à baixa permeabilidade ao oxigénio, as películas e os revestimentos de quitosano reduzem a taxa de oxidação dos alimentos embalados simplesmente ao impedir o seu contacto com o oxigénio (Schreiber et al., 2013). Existe a possibilidade de melhorar a propriedade antioxidante das películas de quitosano, incorporando por exemplo com agentes antioxidantes, como os óleos essenciais (Siripatrawan e Harte, 2010). Os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais podem terminar as reações de propagação, induzidas pelos intermediários de radicais livres, por reação quer diretamente com o radical livre ou prevenindo que os hidroperóxidos se decomponham em radicais livres (Talón et al., 2017).

Os alimentos musculares, como a carne, têm uma baixa estabilidade oxidativa e são muito suscetíveis ao ranço durante a produção e o armazenamento (Kanatt et al., 2008). Estudos demonstram que o quitosano misturado com extrato de alecrim previne a oxidação lipídica em salsichas (Georgantelis et al., 2007a) e hambúrgueres de carne de bovino (Georgantelis et al., 2007b). Kanatt et al., (2008) demonstraram também a capacidade antioxidante do quitosano misturado com extrato de hortelã em salame de porco e Giatrakou et al., (2010) obteve bons resultados na combinação de quitosano com óleo de tomilho em carnes de aves de capoeira.

1.3 BIONANOCOMPÓSITOS

A procura por materiais com novas propriedades, sejam elas ópticas, eletrônicas e mecânicas, desperta sempre muito interesse. Neste sentido surgiram os denominados compósitos. Tais sistemas constituem uma classe de materiais constituídos por duas ou mais fases distintas, separadas entre si por uma interface, e exibem propriedades únicas, as quais não são possíveis de serem obtidas a partir dos seus componentes individuais (Darder et al., 2007). Quando pelo menos uma das fases constituintes do compósito possui dimensões na escala manométrica (< 100 nm), o material é denominado de nanocompósito (Frisch e Mark, 1996).

Os trabalhos na área dos nanocompósitos poliméricos emergiu nos últimos anos. A perspectiva de uma nova tecnologia de materiais que pode funcionar como uma alternativa de baixo custo para compósitos de alto desempenho para aplicações que vão da indústria automóvel às embalagens de alimentos tornou-se irresistível para investigadores de todo o mundo (Rhim, 2007). Um nanocompósito polimérico é um material híbrido que consiste numa matriz polimérica reforçada com uma fibra ou partículas com uma dimensão na escala manométrica (Utracki et al., 2007). Devido às partículas de tamanho nanométrico dispersas na matriz polimérica, os nanocompósitos exibem propriedades mecânicas, térmicas, ópticas e físico-químicas melhoradas em relação aos compósitos puros de polímero ou convencionais. Estes incluem aumento no módulo de força, diminuição da permeabilidade ao gás, aumento do solvente e resistência ao calor e diminuição da inflamabilidade (Rhim, 2007). Consequentemente, o reforço dos biopolímeros com camadas de silicatos, tem por fim melhorar certas propriedades, mantendo a sua biodegradabilidade (Schmidt et al., 2002). Estes aprimoramentos das propriedades dos materiais dos biofilmes nanocompósitos em comparação com os biopolímeros puros podem ser alcançados sem a necessidade de processamentos ou pós-tratamentos adicionais e aumentos de custos (Schmidt et al., 2002).

Os nanocompósitos de polímero-argila pertencem a uma classe de materiais híbridos compostos por materiais poliméricos orgânicos e nanopartículas de argila. A Montmorillonite (MMT), hectorite e saponite são os silicatos em camadas mais frequentemente combinados com materiais poliméricos para formar nanocompósitos (Ray e Okamoto, 2003). O MMT é um mineral de argila constituído por folhas de sílicato empilhadas em formato semelhante a placas. Com uma alta área de superfície (700-800 m²/g) e espessura de cerca 1 nm, as nanopartículas de MMT desempenham um importante papel no aprimoramento das propriedades mecânicas e

físicas dos materiais compósitos. Quimicamente, o MMT consiste em 2 folhas tetraédricas de silicato fundido que emparelham uma folha octaédrica (Fig. 1.4) (Rhim, 2007). Dentro do MMT existem várias categorias, sendo que a usada neste trabalho é a Cloisite®Ca⁺⁺ (MMTCa). O MMTCa é uma bentonite natural, projetada para ser usada como um aditivo para plásticos e borrachas com o objetivo de melhorar várias propriedades físicas, tais como reforço mecânico, coeficiente de dilatação térmica e propriedades de barreira (Koo, 2016). A montmorilonita cálcica é hidrofílica como a maioria dos outros minerais de argila. Aumenta a absorção de água, o que aumenta muito o seu volume. A água penetra nos espaços moleculares entre aspas e a variação no nível de inchaço é possível em várias classes (Uddin, 2008).

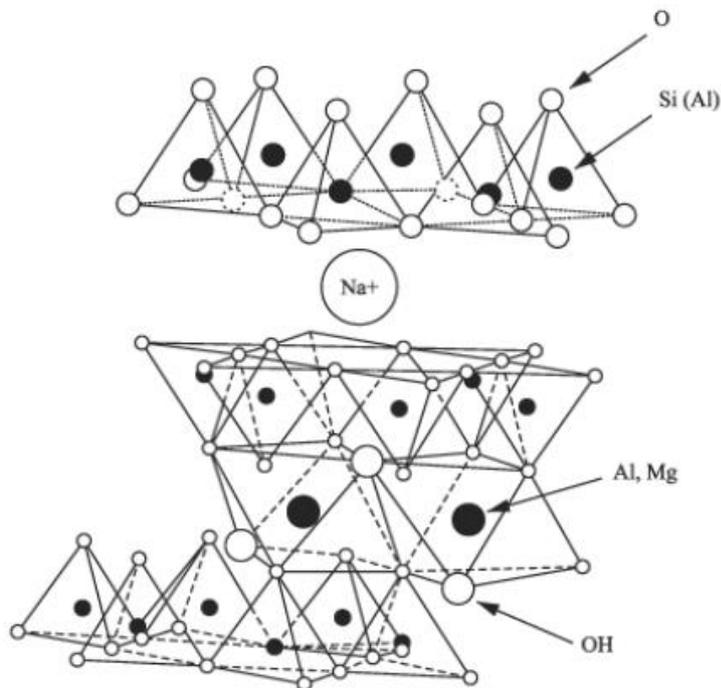


Fig. 1.4 Estrutura química da montmorilonita (adaptado de Ray e Okamoto, 2003)

Quando as nanopartículas de argilas de silica em camada são misturadas com um polímero, normalmente podem ser obtidos 3 tipos de compósitos: i) estruturas imiscíveis, ii) intercaladas e iii) esfoliadas (Fig. 1.5). Nas estruturas imiscíveis, as partículas de argila são dispersas dentro da matriz da argila e as camadas não se separam. A mistura do polímero com as argilas são compósitos em microescala, sendo que a argila serve apenas para enchimento. As estruturas intercaladas e esfoliadas produzem um compósito em nanoescala ideal. Num nanocompósito intercalado, muitas vezes uma única cadeia de polímero fica entre as camadas da argila, mas o sistema permanece bastante bem ordenado e empilhado. Num nanocompósito esfoliado, as

camadas de silicato estão completamente deslaminadas umas das outras e ficam bem dispersas. Este último nanocompósito é o que exibe as melhorias mais significativas nas propriedades mecânicas. A formação de estruturas intercaladas ou esfoliadas depende do tipo de argila utilizada e das condições de processamento (McGlashan e Halley, 2003).

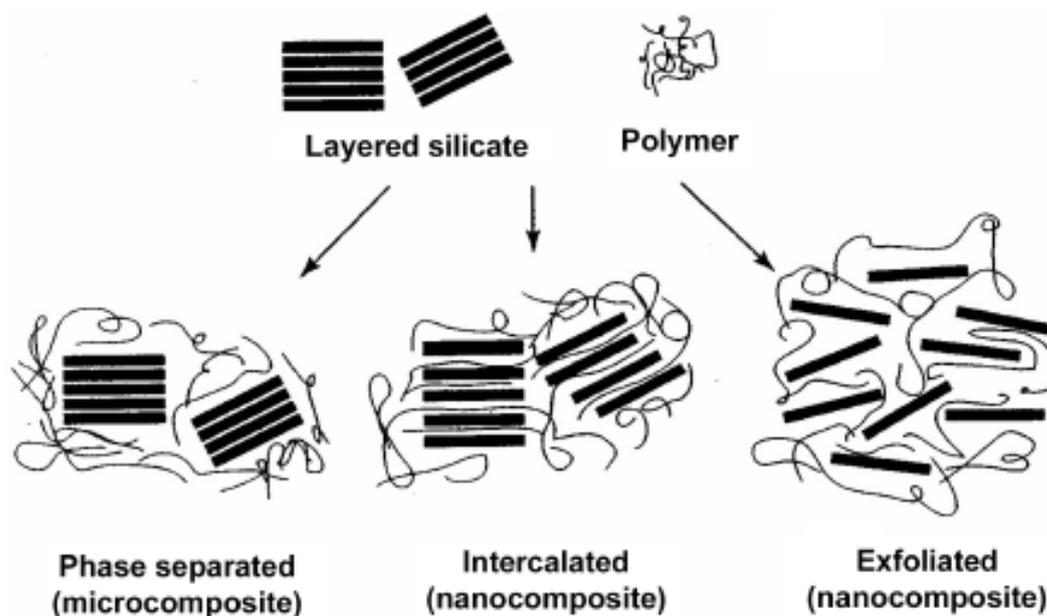


Fig. 1.5 Tipos de estruturas compósitas de materiais poliméricos com camadas de argilas de silicatos
(adaptado de McGlashan e Halley, 2003)

Muitos estudos com nanocompósitos à base de biopolímeros e MMT têm sido investigados nos últimos anos e, em geral, têm sido verificadas melhorias em várias propriedades, principalmente mecânicas, térmicas e de barreira, tais como, Sothrvit et al., (2010) que concluíram que a resistência à tração e o alongamento na ruptura de nanocompósitos à base de isolado proteico de soro de leite com adição de MMT ou MMT organicamente modificada, não sofreram alterações com o aumento da concentração das nanopartículas. Além disso, a permeabilidade ao vapor de água de todos os nanocompósitos foi significativamente menor do que a permeabilidade dos filmes sem MMT. Abdollahi et al., (2012a), por sua vez, avaliaram o efeito da adição de MMT e óleo essencial de alecrim sobre a matriz polimérica de quitosano. A incorporação de MMT nos níveis testados (1 a 5% w/w), além de melhorar a capacidade de retenção de água, diminuiu a permeabilidade e a solubilidade dos filmes em mais de 50%. Além disso, os autores observaram melhorias nas propriedades mecânicas de resistência à tração e alongamento na ruptura. Dias et al., (2014) também estudaram o efeito da incorporação de MMT em filmes de quitosano e os resultados indicaram que a incorporação da nanopartícula

resultou em filmes com menor permeabilidade, maior hidrofobicidade e menor humidade. Filmes à base de metilcelulose, carvacrol e MMT foram avaliados por Tunç e Duman (2011). Segundo esses autores, o aumento na concentração de MMT promoveu o decréscimo da libertação de carvacrol dos filmes a 25° C. Esse resultado indica a capacidade das nanopartículas em controlar a libertação de compostos ativos, o que é desejável do ponto de vista da estabilidade do filme ao longo da vida útil do alimento embalado. Alterações na espessura e opacidade, bem como melhoria na estabilidade térmica dos biofilmes também foram observadas.

Sendo assim, como os materiais à base de biopolímeros apresentam inúmeras aplicações e a adição de MMT melhora essas propriedades e, conseqüentemente o potencial de aplicação industrial desses materiais, estudos com o objetivo de entender melhor as interações entre polímeros e MMT devem ser conduzidos, permitindo assim uma melhor compreensão do potencial de aplicação desses biofilmes na indústria alimentar.

1.4 OBJETIVO DO TRABALHO

Esta tese de mestrado tem por objetivo o estudo e caracterização de biofilmes de quitosano incorporados com um tipo de nanoargilas, Cloisite®Ca⁺⁺ (MMTCa), e também com óleos essenciais de alecrim e gengibre, tendo-se avaliado diversas propriedades dos bionanocompósitos (propriedades óticas, humidade, swelling e solubilidade, propriedades mecânicas e análises de migração). Pretende-se saber quais as interações que a nanoargila estudada (MMTCa) tem com o quitosano, assim como o efeito nos bionanocompósitos resultante da incorporação dos óleos essenciais. Foi igualmente estudada a aplicação dos bionanocompósitos desenvolvidos numa matriz alimentar (carne de frango), tendo-se avaliado, na carne, as suas características físico-químicas (pH, acidez, humidade e cinzas, índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e cor) assim como o grau de contaminação microbiológica (contagens de micro-organismos viáveis totais e coliformes totais), de modo a verificar quais os efeitos da aplicação dos biofilmes na carne.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS E REAGENTES

O quitosano de alto peso molecular foi comprado na Sigma Aldrich (Alemanha) e a nanoargila MMT Cloisite®Ca⁺⁺ foi comprada na BYK-Chemie (Alemanha). Dois óleos essenciais da Biover (Bélgica) foram comprados num mercado local: Gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis L. ct. camphor*). As soluções reagentes utilizadas para análises de migração, Folin-Ciocalteu e Carbonato de Sódio foram adquiridas na Panreac AppliChem (Espanha) enquanto que a solução de DPPH foi adquirida na Sigma Aldrich (Alemanha). Ácido acético glacial, etanol 95%, glicerol e tween 80 foram comprados na Alfa Aesar (Alemanha). A água usada foi purificada utilizando um sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA).

2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

2.2.1 PREPARAÇÃO DO FILME

A preparação da suspensão filmogénica (SF) de quitosano foi preparada de acordo Souza et al., (2017). A SF foi preparada dissolvendo 1,5% (m/v) de quitosano numa solução de 1% (v/v) de ácido acético glacial em constante agitação usando uma placa de agitação magnética durante 24 horas a temperatura ambiente. Após o quitosano estar totalmente dissolvido, foi adicionado glicerol na proporção de 30% (m/m quitosano) juntamente com 2,5% de Cloisite®Ca⁺⁺ (m/m quitosano). A exfoliação da nanoargila foi feita através de métodos mecânicos (3 ciclos em banho de ultrassons (Selecta, Barcelona, Espanha) durante 15 minutos intercalado com agitação em ultra-turrax® (Model IKA®T18, Alemanha) durante 5 minutos). O OEA e o OEG foram incorporados antes do último ciclo de agitação na proporção de 0,5%, 1% e 2%. Para que os óleos tenham uma melhor incorporação no filme foi adicionado um emulsificador tween 80 na proporção 0,2% (m/v óleo essencial). Após a solução filmogénica estar completamente homogeneizada, esta é vertida em formas retangulares de vidro (18x25 cm). Biofilmes de quitosano com e sem adição de MMT, sem incorporação dos óleos essenciais, foram utilizados como tratamento controlo. A secagem dos filmes fez-se em sala ventilada com ventoinha rotativa durante 3 dias.

2.2.2 PREPARAÇÃO DA CARNE

A carne de aves fresca picada foi comprada num supermercado local, tendo sido selecionadas as embalagens que apresentavam um maior prazo de validade. Para a experiência, 30g de carne foi embalada nos biofilmes produzidos (5x18 cm) e armazenada em caixas plásticas com tampa roscada sob refrigeração (5 °C ± 2 °C) até 15 dias. Além dos biofilmes sem incorporação dos óleos essenciais, também será considerado um tratamento controlo da carne sem filme, ou seja, carne picada acondicionada nas caixas plásticas, para simular a condição máxima oxidativa. A carne foi avaliada nos tempos 0, 3, 7, 10 e 15 dias de

armazenamento quanto às características físicas e químicas (pH e acidez, cinzas e humidade, índice de TBARS e cor) e contagem de microorganismos totais viáveis e coliformes totais), sendo que as metodologias estão descritas no ponto 2.4.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME

2.3.1 MEDIÇÃO DA ESPESSURA

A espessura das amostras foi medida utilizando um micrómetro digital (0,001 mm, Mitutoyo, Japan). As medidas foram efetuadas em 10 pontos diferentes da amostra, sendo que a média destes valores foi usada para cálculos noutras propriedades (Souza et al., 2017).

2.3.2 PROPRIEDADES ÓPTICAS

2.3.2.1 COR SUPERFICIAL

A cor do filme foi obtida através da medição das coordenadas CIE-L*a*b* (onde o L* é 0 para preto e 100 para branco, os valores a* indicam a cromaticidade do verde (-60) ao vermelho (+60), e o parâmetro b* indica a cromaticidade do azul (-60) ao amarelo (+60) das amostras utilizando um colorímetro CR 410 (Minolta Co., Tokyo, Japão) com fonte de luz D 65, e ângulo visual de 10°. As coordenadas Chroma (c*) e ângulo (hue) foram calculadas utilizando as equações (2.1)-(2.3), respetivamente. As medições foram retiradas sobre fundos brancos padronizados (Souza et al., 2017; Pastor et al., 2013).

$$c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (2.1)$$

$$hue = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (se \ a^* > 0) \quad (2.2)$$

$$hue = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) + 180^\circ \quad (se \ a^* < 0) \quad (2.3)$$

2.3.2.2 OPACIDADE E TRANSPARÊNCIA

A opacidade do filme foi calculada de acordo com a equação (2.4) seguindo o método de Park e Zhao (2004) através da leitura direta da absorvância de amostras retangulares de cada tratamento a 600 nm num espectrofotómetro UV/VIS (Modelo Spekol 1500, Analytikjena, Alemanha).

$$Opacidade \ (mm^{-1}) = \frac{absorvância \ 600 \ nm}{espessura \ da \ amostra \ (mm)} \quad (2.4)$$

A transparência dos filmes foi determinada fazendo um espectro de varredura (comprimentos de onda entre 190 e 900 nm) de cada amostra usando o espectrofotômetro (Model Spekol 1500, Analytikjena, Alemanha). As medições foram feitas considerando o ar como referência e os resultados foram expressos em percentagem de transmitância (Souza et al., 2017).

2.3.3 HUMIDADE, *SWELLING* E SOLIBILIDADE

Estas análises foram realizadas segundo Pastor et al., (2013) e Peng e Li (2014). Pedacos de cada tipo de biofilme foram cortados num retângulo (2x2 cm) e pesados (com uma precisão de 0,0001 g) numa balança analítica (Mettler Toledo AB204, Suíça), sendo este o peso registado como inicial (M1). As amostras foram então secas numa estufa convencional (WTB binder, Alemanha) a 70° C durante 24 horas para se obter a massa seca inicial (M2). Após essa medida, as amostras dos biofilmes foram colocadas em caixas de Petri contendo 30 mL de água Milli-Q, tapadas e armazenadas durante 24 horas a temperatura ambiente (25° C ± 2° C). Após essas 24 horas, a água restante (não absorvida pelas amostras dos biofilmes) foi deitada fora e as amostras foram secas superficialmente com papel de filtro, tendo sido registada nova pesagem (M3). Por fim, cada amostra foi novamente seca na estufa a 70° C durante 24 horas para determinar a massa seca final (M4). Foram realizadas duas medidas para cada amostra de filme para ser calculado o valor médio dos parâmetros. Estes três parâmetros foram calculados utilizando as equações (2.5)-(2.7).

$$\textit{Humidade} (\%) = \frac{(M1-M2)}{M1} * 100 \quad (2.5)$$

$$\textit{Solubilidade} (\%) = \frac{(M2-M4)}{M2} * 100 \quad (2.6)$$

$$\textit{Swelling} (\%) = \frac{(M3-M2)}{M2} * 100 \quad (2.7)$$

2.3.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas (módulo de elasticidade (ME), resistência à tração (RT) e percentagem de alongamento na rutura (%E)) foram determinads de acordo a ASTM D882-12 (ASTM, 2012). 5 tiras de cada filme (150x 25,4 mm) foram colocadas individualmente nas garras com uma célula de carga de 0,5 kN (Autograph Shimadzu, Australia), um comprimento do calibre inicial de 50 mm e esticado a uma velocidade de 50 mm/min até à rotura.

2.3.5 ANÁLISES DE MIGRAÇÃO

A quantificação *in vitro* da difusão dos compostos antioxidantes dos biofilmes ao logo do tempo será realizado por meio de teste de difusão utilizando uma solução de 95% de etanol (meio simulante de alimentos gordurosos). Para este propósito um pequeno pedaço de cada biofilme (2,4 cm²) foi colocado em frascos que continham 4 mL do meio simulante e posteriormente postos a incubar numa estufa a 37°C ± 2°C. As amostras foram avaliadas para diferentes tempos de incubação, 12 horas, 1, 2, 4, 7 e 10 dias. Para cada amostra foram efetuadas duas repetições (López-de-Dicastillo et al., 2012).

2.3.5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos filmes foi medida através da determinação “*in vitro*” do efeito de eliminação de radicais livres no radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), seguindo o método descrito por Brand-Willians et al., (1995). Em tubos de ensaio juntou-se 1 mL do meio simulante (onde esteve o biofilme) a 3 mL da solução metanólica de DPPH 60 µMol e ficaram a incubar a temperatura ambiente (25° C ± 1° C) no escuro durante 20 minutos. A quantificação desta atividade foi realizada através da leitura da absorvância no comprimento de onda de 517 nm num espectrofotómetro UV/VIS. 1 mL de etanol 95% foi utilizado como controlo. A percentagem de inibição será calculada usando a equação 2.8.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{controlo} - Abs_{amostra})}{Abs_{controlo}} \times 100 \quad (2.8)$$

2.3.5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos totais que migraram dos filmes de quitosano para o meio simulante foi determinado de acordo o método de Folin-Ciocalteu descrito por Siripatrawan e Harte (2010) com ligeiras modificações. Resumidamente, 1 mL do meio simulante onde esteve o biofilme) foi misturada com 3 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura esteve a incubar por 6 minutos à temperatura ambiente antes de ser adicionado 0,75 mL de carbonato de sódio. A mistura foi a incubar no escuro durante 1 hora a temperatura ambiente (25° C ± 1° C). A absorvância da mistura foi medida num comprimento de onda de 765 nm usando um espectrofotómetro UV/VIS. Para construção da curva analítica será

utilizado ácido gálico (0-200 mg.L⁻¹) em diferentes concentrações e o resultado expresso em ácido gálico equivalente (mg de AGE.L⁻¹).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DA CARNE

2.4.1 COR DA CARNE

A análise será conduzida de acordo com a escala de cor CIELab, utilizando o colorímetro Minolta com fonte de luz D 65, e ângulo visual de 10°. As medidas da cor foram efetuadas 3 vezes e 3 pontos distintos da carne para efeitos de média. Para além do ângulo de Hue (já descrito pelas equações (2.2) e (2.3)), um novo parâmetro foi avaliado, variação da cor (ΔE) (Kaewprachu et al., 2015). Este novo parâmetro têm como equação (2.9), respetivamente.

$$\Delta E = \sqrt{(L - L^*)^2 + (a - a^*)^2 + (b - b^*)^2} \quad (2.9)$$

2.4.2 PH E ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL

Tanto o pH como a acidez foram determinados de acordo com o método descrito em Lutz (2008). 5 g de carne foi homogeneizado em 50 mL de água Milli Q (Milipore) previamente aquecida até 40° C durante 15 minutos em agitação, posteriormente, o pH foi determinado num medidor de pH digital (Crison micropH 2001, Espanha) pela imersão direta do eletrodo. A acidez total titulável foi determinada através de uma titulação com solução NaOH 0,1N até a amostra ter apresentado uma coloração rosa, tendo sido utilizado fenolftaleína 0,1% como indicador, e os resultados expressos como gramas de ácido oleico por 100g de carne.

$$\text{Acidez Total Titulável} = \left(\frac{\text{Volume (NaOH ml)} * 0,1 * 28,2}{\text{Peso da Carne}} \right) \quad (2.10)$$

2.4.3 HUMIDADE E CINZAS

A determinação da humidade e das cinzas da carne segue a metodologia adoptada em Lutz (2008) e Fernando (1996, 2015). 2g de carne foram pesadas e colocadas em cadinhos, tendo estado posteriormente 12 horas numa estufa a 105° C. As amostras de 7 e 15 dias estiveram ainda mais 2 horas na mufla a 550° C. Os valores das humidades e cinzas (em matéria fresca) foram retirados através das equações (2.11) e (2.12) respetivamente.

$$\% \text{ Humidade} = \left(\frac{(\text{Peso Cápsula} + \text{Peso da Carne}) - (\text{Peso após Estufa})}{(\text{Peso Cápsula} + \text{Peso da Carne}) - (\text{Peso da Cápsula})} \right) * 100 \quad (2.11)$$

$$\% \text{ Cinzas} = \left(\frac{(\text{Peso após Mufla}) - (\text{Peso da Cápsula})}{(\text{Peso Cápsula} + \text{Peso da Carne}) - (\text{Peso da Cápsula})} \right) * 100 \quad (2.12)$$

2.4.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA (ENSAIOS DE TBARS)

O grau oxidativo das amostras será determinado por meio da medida do TBARS, segundo Rosmini et al., (1996). Amostras de 5 g de carne serão pesadas em erlenmeyers e adicionados 10 mL ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (m/v). Os tubos serão submetidos à agitação por 1 hora. Os sobrenadantes serão filtrados em papel de filtro qualitativo e 5 mL do filtrado serão combinados com 5 mL de ácido 2-tiobarbiturico 0,02 M em tubos de ensaio, os quais serão levados a banho maria à 95 °C durante 30 minutos. Depois de arrefecidas em água, as amostras serão levadas ao espectrofotômetro UV/VIS para leitura da absorvância a 530 nm. A quantificação de malonaldeído (MDA) será feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de MDA, utilizando-se 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). A curva será montada utilizando-se 5 tubos contendo 5 mL de TCA e quantidades crescentes, 10 a 50 µL, de TEP 10⁻³ M. Os resultados serão expressos em mg de MDA/kg de amostra.

2.4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A contaminação microbiológica será determinada através da contagem total de mesófilos (ISO 4833-1:2013) e coliformes totais (ISO 4831:2006). Resumidamente, em frascos estéreis, 1 g da carne serão adicionados a 9 mL de água de diluição estéril (solução 1% m/v de peptona e 8,5% m/v NaCl) e homogeneizadas por 30 segundos. Serão feitas diluições seriadas, sob condições de assepsia e inoculadas em caixas de Petri contendo os meios ágar padrão para contagem (plate count agar – PCA) e tubos contendo caldo verde brilhante, incubados a 30 ± 2 °C por 72 h e 48 h, respectivamente para as análises de contagem microrganismos totais viáveis e coliformes totais.

2.5 ANÁLISE DE DADOS

Os dados serão submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando-se o teste Tukey no nível de 5% de probabilidade com o auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 23, IBM.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME

3.1.1 PREPARAÇÃO E ESPESSURA DO FILME

Os filmes biodegradáveis foram produzidos com sucesso através do método de *casting* resultando numa espécie de plástico homogéneo, predominantemente amarelado, flexível e sem variações significativas na espessura ($59 \pm 16 \mu\text{m}$), apesar de esta apresentar um aumento quando as nanopartículas de argila e os óleos são incorporados ($43 \pm 2 \mu\text{m}$ no quitosano para um valor médio de $63 \pm 16 \mu\text{m}$, nos filmes com argila e óleos). As imagens referentes aos biofilmes produzidos podem ser vistas em anexo (Anexos 1 a 4). A formação de fortes interações entre as nanopartículas e as cadeias poliméricas, a penetração das nanopartículas entre as cadeias de quitosano, e a dispersão uniforme de camadas exfoliadas de MMT podem ser as razões pelas quais as nanopartículas não afetaram de maneira significativa a espessura (Ghelejlou et al., 2016). O aumento da espessura dos biofilmes que contêm OE e MMTCa deveu-se provavelmente à redução do alinhamento ordenado das partículas, fazendo com que haja um aumento da distância espacial dentro da matriz de quitosano e diminuição da compacidade da matriz como resultado das interações entre os compostos fenólicos e o quitosano (Ghelejlou et al., 2016).

3.1.2 PROPRIEDADES ÓPTICAS

3.1.2.1 COR SUPERFICIAL

A cor dos biofilmes pode influenciar a aceitabilidade do produto por parte do consumidor (Ojagh et al., 2010). Os resultados dos parâmetros da cor obtidos podem ser observados na tabela 3.1.

Visualmente os biofilmes apresentaram uma cor entre o amarelo (valores positivos do parâmetro b^*) e o verde (valores negativos do parâmetro a^*). A luminosidade praticamente não variou entre os biofilmes, mas mostrou uma perda de brilho (não significativa, $p > 0,05$) à medida que se aumentou a concentração de OE ($p > 0,05$), principalmente com o óleo de gengibre. Esta diminuição de luminosidade mais acentuada no óleo de gengibre também foi observada por Souza et al., (2017). Visto que os resultados estão todos perto de 100 (branco), os biofilmes podem ser considerados brilhantes. Estes valores estão de acordo com os apresentados por Abdollahi et al., (2012a).

Tabela 3.1 Resultados dos parâmetros da cor para os diferentes biofilmes produzidos.

Biofilme	L*	a*	b*	Chroma	Ângulo de Hue
Controlo Sem MMTCa	90,5±0,0 ^{ab}	-1,9±0,0 ^{ab}	2,7±0,0 ^d	3,3±0,0 ^e	125±0 ^a
Controlo Com MMTCa	90,8±0,2 ^a	-1,8±0,0 ^{ab}	3,9±0,2 ^c	4,3±0,2 ^{de}	115±1 ^b
Ch-AI 0,5% Sem MMTCa	90,5±0,1 ^{ab}	-1,9±0,0 ^{ab}	3,8±0,1 ^c	4,3±0,0 ^{de}	116±0 ^b
Ch-AI 1% Sem MMTCa	90,4±0,0 ^{ab}	-1,9±0,0 ^{ab}	4,3±0,2 ^{bc}	4,7±0,2 ^{cde}	114±1 ^b
Ch-AI 2% Sem MMTCa	90,1±0,2 ^{ab}	-2,2±0,0 ^{ab}	5,9±0,4 ^b	6,3±0,4 ^{cd}	111±1 ^b
Ch-AI 0,5% MMTCa	90,6±0,1 ^{ab}	-1,7±0,0 ^a	4,5±0,1 ^{bc}	4,8±0,1 ^{cde}	111±0 ^{bc}
Ch-AI 1% MMTCa	90,4±0,0 ^{ab}	-1,9±0,0 ^{ab}	5,8±0,3 ^b	6,1±0,3 ^{cd}	108±1 ^{bc}
Ch-AI 2% MMTCa	90,0±0,3 ^{ab}	-1,9±0,1 ^{ab}	6,5±1,0 ^{ab}	6,8±0,9 ^{bcd}	106±2 ^{bc}
Ch-G 0,5% Sem MMTCa	90,8±0,0 ^a	-1,8±0,0 ^{ab}	4,9±0,2 ^{bc}	5,2±0,2 ^{cde}	111±1 ^b
Ch-G 1% Sem MMTCa	90,2±0,1 ^{ab}	-2,0±0,0 ^{ab}	6,3±0,1 ^{ab}	6,6±0,1 ^{bcd}	108±0 ^{bc}
Ch-G 2% Sem MMTCa	90,0±0,1 ^{ab}	-2,0±0,0 ^{ab}	6,8±0,2 ^{ab}	7,1±0,2 ^{bc}	107±0 ^{bc}
Ch-G 0,5% MMTCa	90,1±0,0 ^{ab}	-2,0±0,0 ^{ab}	6,4±0,2 ^{ab}	6,7±0,2 ^{bcd}	108±0 ^{bc}
Ch-G 1% MMTCa	89,6±0,2 ^{ab}	-2,2±0,0 ^{ab}	8,8±0,4 ^{ab}	9,1±0,4 ^b	104±1 ^{bc}
Ch-G 2% MMTCa	88,9±0,1 ^b	-2,4±0,2 ^b	11,9±1,3 ^a	12,1±1,4 ^a	101±0 ^c

a-e: Diferentes letras dentro da mesma coluna indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch-AI = Quitosano com óleo de alecrim; Ch-G = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

Para um estudo mais detalhado da cor dos biofilmes foram avaliados os parâmetros chroma e ângulo de Hue. O chroma é um parâmetro indicativo da intensidade da cor, enquanto que o ângulo de Hue estabelece uma relação entre a^* e b^* (Pastor et al., 2013).

Os valores do chroma variaram entre 3,3±0,2 e 12,1±1,4, sendo que a incorporação de OE aumentou os respetivos valores em relação à amostra de controlo. À medida que se vai aumentando a concentração de óleo nos biofilmes verificou-se um aumento nos valores de chroma, sendo este aumento significativo ($p < 0,05$) apenas entre o Ch+OEG de 1% e 2%. O óleo de gengibre mostrou ser o óleo que atribuiu mais intensidade à cor dos biofilmes. Perdones et al., (2014) também obtiveram valores maiores de saturação com a incorporação e respetivo aumento da concentração de óleo de folha de canela na matriz de quitosano. Visualizou-se também que os biofilmes incorporados com MMTCa apresentaram valores de saturação superiores, tendo sido este aumento significativo ($p < 0,05$) apenas para Ch+OEG 2%. De acordo com Pastor et al., (2013), as alterações ópticas observadas podem ser atribuídas à formação de cristais dos compostos incorporados, que interferem na reflexão da luz.

Os valores do ângulo de hue variaram entre 101 e 125. Segundo os valores tabelados do ângulo de hue, entre 90 e 120, a coloração ainda é amarela, mas quando se aumenta esse valor já passa a ser considerado verde. A incorporação de OE nos biofilmes sem MMTCa baixou significativamente ($p < 0,05$) o valor do ângulo de Hue em comparação com o controlo. Nos biofilmes com MMTCa os valores também diminuíram mas não significativamente ($p > 0,05$). O aumento da concentração do óleo fez com que os biofilmes ficassem ligeiramente mais amarelados, mas não mostrou ter influência neste parâmetro ($p > 0,05$). Os biofilmes sem

MMTCa apresentaram valores de Hue mais elevados do que os biofilmes com MMTCa, apresentando assim uma cor mais esverdeada, sendo que só foi verificada uma alteração significativa ($p < 0,05$) entre os biofilmes controlo.

De acordo com Du et al., (2009), a cor dos biofilmes é diretamente influenciada pela concentração de óleo essencial que é adicionado. Tal como era de esperar a cor mais amarelada revelada pelos biofilmes deve-se à cor amarela que os óleos utilizados possuem. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Perdones et al., (2016) que demonstraram que a adição de OE (tomilho e manjerição) à matriz de quitosano diminuiu o valor do ângulo de hue e aumentou a saturação do filme (maior valor de chroma).

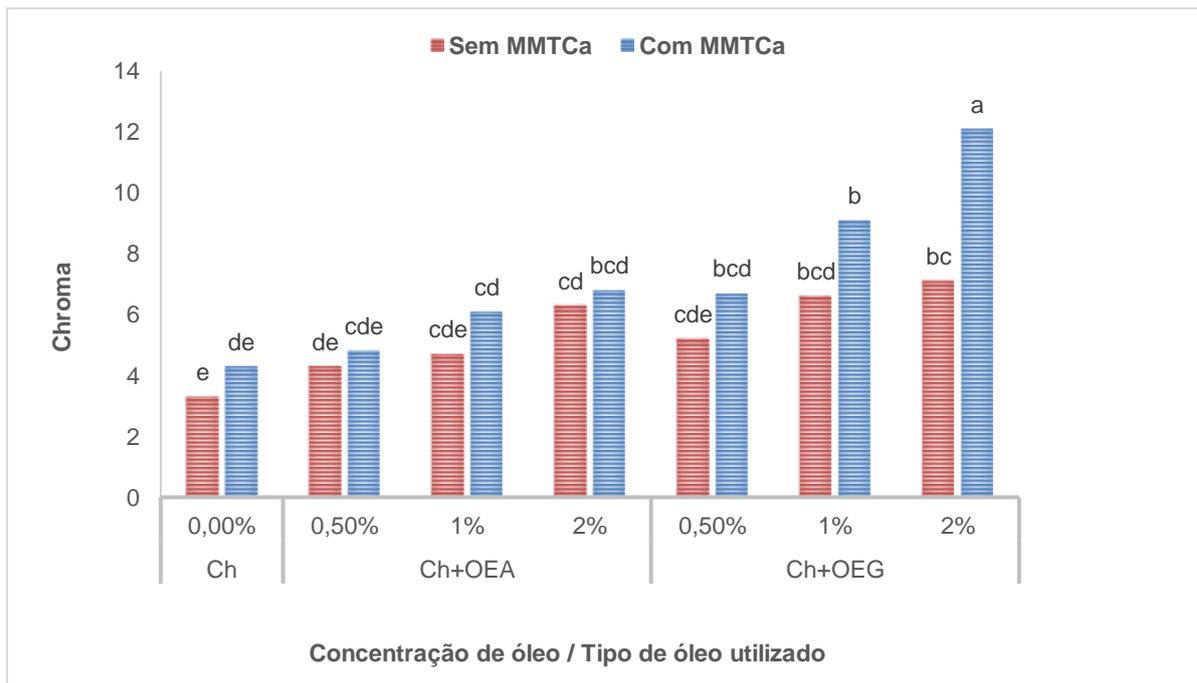


Fig. 3.1 Valores médios do Chroma para os diferentes biofilmes produzidos

a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

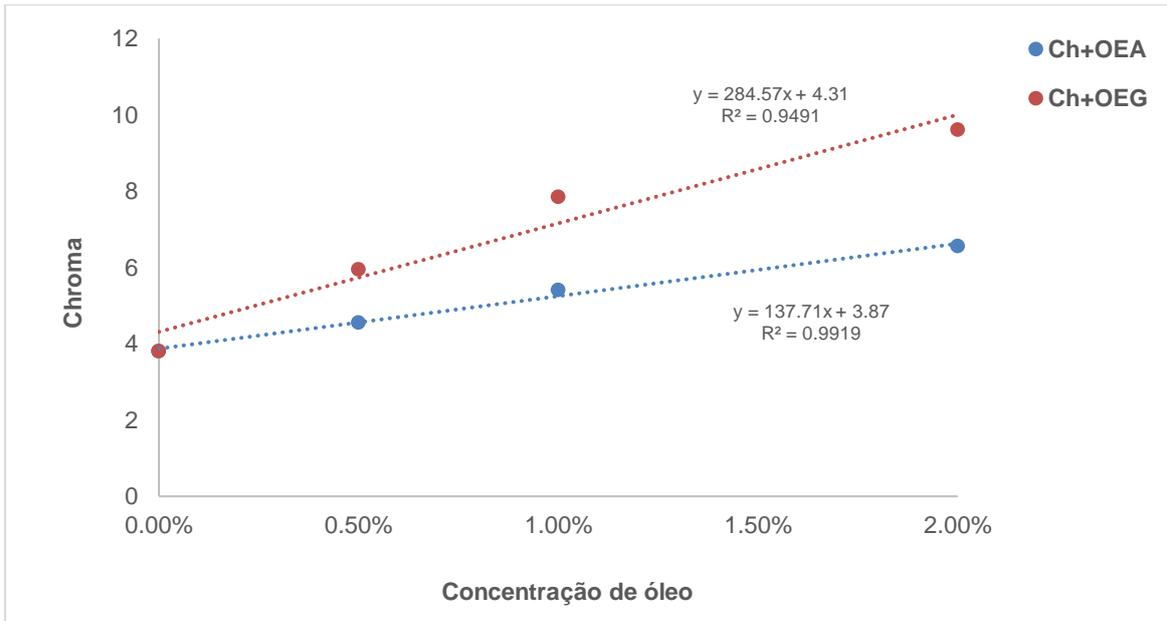


Fig. 3.2 Comparação dos valores médios (com e sem MMTCa) de Chroma variando o tipo de óleo incorporado e a sua concentração

Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre.

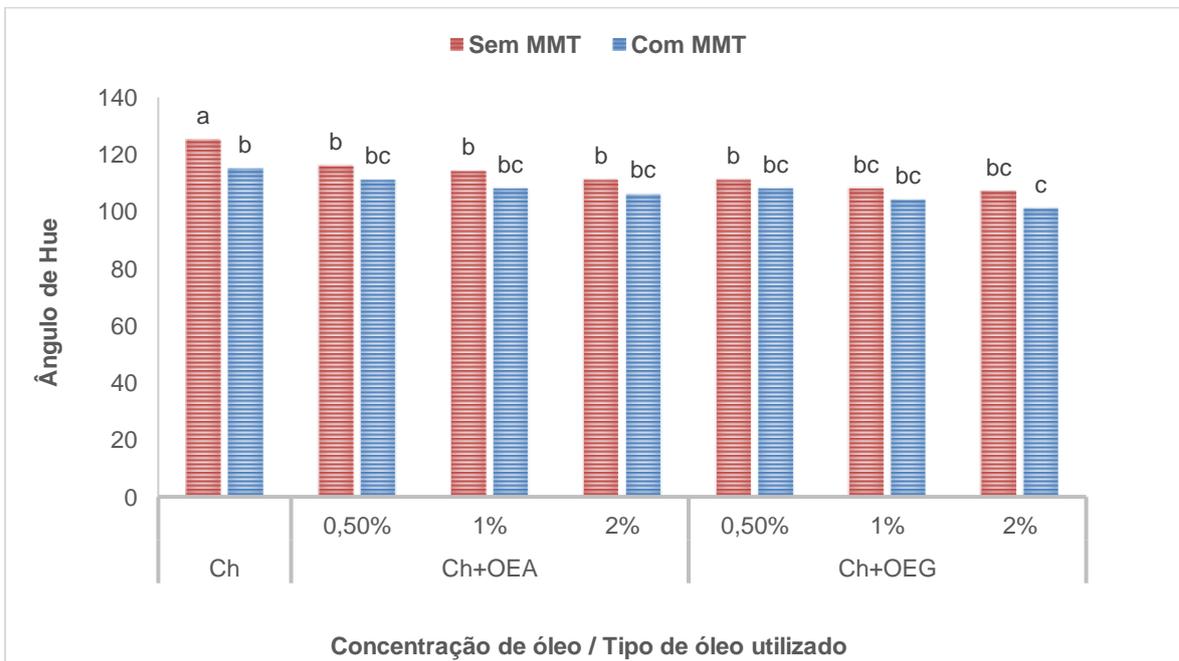


Fig. 3.3 Valores médios do ângulo de Hue para os diferentes biofilmes produzidos

a-c: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.1.2.2 OPACIDADE E TRANSPARÊNCIA

A luz, especialmente a luz ultravioleta, desempenha um papel importante no processo de oxidação, pois vai catalisar as reações químicas que aceleram a deterioração dos alimentos (Márquez-Ruiz et al., 2014; Tian et al., 2013). Os biofilmes que vão ser aplicados nos alimentos devem ter a capacidade de bloquear a luz ultravioleta, de modo a conferir uma proteção extra contra o processo de oxidação, aumentando assim a vida útil do produto embalado (Souza et al., 2017). Para os biofilmes que vão ser aplicados em acondicionamento de alimentos, a transparência é uma propriedade crítica, uma vez que estes são usados como revestimento de superfície ou para melhorar a aparência do produto, afetando a aparência geral e consequentemente a aceitação do consumidor. É desejável então que os compostos incorporados não diminuam significativamente a transparência do filme (Souza et al., 2017).

A opacidade do material é um indicador da quantidade de luz que atravessa o mesmo, sendo que maiores valores de opacidade indicam que a quantidade de luz que atravessa o material é menor (Kasirga et al., 2012). A incorporação de OE fez aumentar a opacidade dos biofilmes em relação ao controlo. Este aumento mostrou ser significativo ($p < 0,05$) para concentrações superiores a 1% de óleo de alecrim e superiores a 2% para o óleo de gengibre. Como se pode constatar (Fig. 3.5) o tipo de óleo que mais aumentou a opacidade do biofilme foi o óleo de alecrim. A introdução de MMTCa nas amostras também fez com que a opacidade aumentasse mas sem ser de forma significativa ($p > 0,05$). Alguns estudos já publicados mostram conclusões similares (Pastor et al., 2013; Siripatrawan e Harte, 2010). Kasirga et al., (2012) afirmaram no seu estudo que a opacidade do biofilme é diretamente proporcional à percentagem de MMT adicionada, sendo que vai aumentando com o aumento da concentração. Os biofilmes ficam cada vez mais opacos devido à perda de homogeneidade na matriz polimérica, que é causada pela presença de heterogeneidades estruturais com diferentes índices de refração, que vão promover fenómenos de dispersão da luz (Pastor et al., 2013). A presença de pequenas zonas cristalinas nos filmes de quitosano quando é adicionado óleo de gengibre e alecrim vai promover a dispersão da luz, aumentando assim a opacidade do filme (Pastor et al., 2013).

A transparência foi avaliada através da transmitância interna das amostras por varredura dos biofilmes em espectroscopia, tanto na luz UV como na luz visível. Para tornar a interpretação dos resultados mais clara, as varreduras foram separadas em duas figuras distintas (Fig. 3.6 e 3.7). O quitosano só por si já tem boas propriedades de barreira à luz ultravioleta (Aider, 2010). Para os biofilmes controlo de quitosano sem MMTCa a 200 nm e 300 nm, a percentagem de transmitância foi de 0,10% e 48%, respetivamente. Já para os biofilmes controlo de quitosano com MMTCa a 200 nm e 300 nm, a percentagem de transmitância foi de 0,01% e 44%, respetivamente. A incorporação de antioxidantes naturais alterou essa barreira em comprimentos de onda inferiores, e algumas tendências puderam ser observadas. Apesar de aos 200 nm os valores de transmitância já terem sido inferiores em comparação com os dos

biofilmes controlo mas sem significância ($p > 0,05$), já a 300 nm houve reduções muito significativas ($p < 0,05$). Para os biofilmes incorporados com óleo de alecrim a transmitância teve uma redução de 33%, 54% e 87% para as concentrações 0,5%, 1% e 2%, respectivamente. Os biofilmes de óleo de gengibre ainda obtiveram reduções maiores, tendo estas sido de 60%, 85% e 97%, para as mesmas concentrações de óleo. Souza et al., (2017) teve reduções entre 0-50% para óleos e extratos de plantas para concentrações de óleo de 1% verificando também que o óleo de gengibre era o óleo que mais reduzia a transmitância para os comprimentos de onda na gama dos ultravioletas. Observando os resultados concluiu-se que a adição de óleos essenciais aos biofilmes de quitosano fazem com que estes sejam eficazes na prevenção da oxidação lipídica induzida por raios ultravioletas quando aplicados em sistemas alimentares. Martins et al., (2012) obtiveram resultados semelhantes em termos de barreira aos raios UV quando incorporaram α -tocoferol em matrizes de quitosano. A adição de MMTCa fez diminuir a percentagem de transmitância em praticamente todo o espectro. Nos comprimentos de onda da gama dos ultravioletas esta queda verificou uma redução de 0-8% na transmitância do biofilme. O facto de o decréscimo da transmitância não ser significativo ($p > 0,05$) poderá indicar que as nanopartículas estão bem incorporadas na matriz polimérica. Rhim et al., (2006) também não obteve diferenças significativas na transmitância entre os filmes de quitosano sem nanopartículas e os filmes incorporados com MMTNa e Cloisite 30B. Como as camadas de silicatos têm apenas 1 nm de espessura, quando estão dispersas numa matriz polimérica, o nanocompósito resultante é opticamente limpo na luz visível (Ray e Okamoto, 2003).

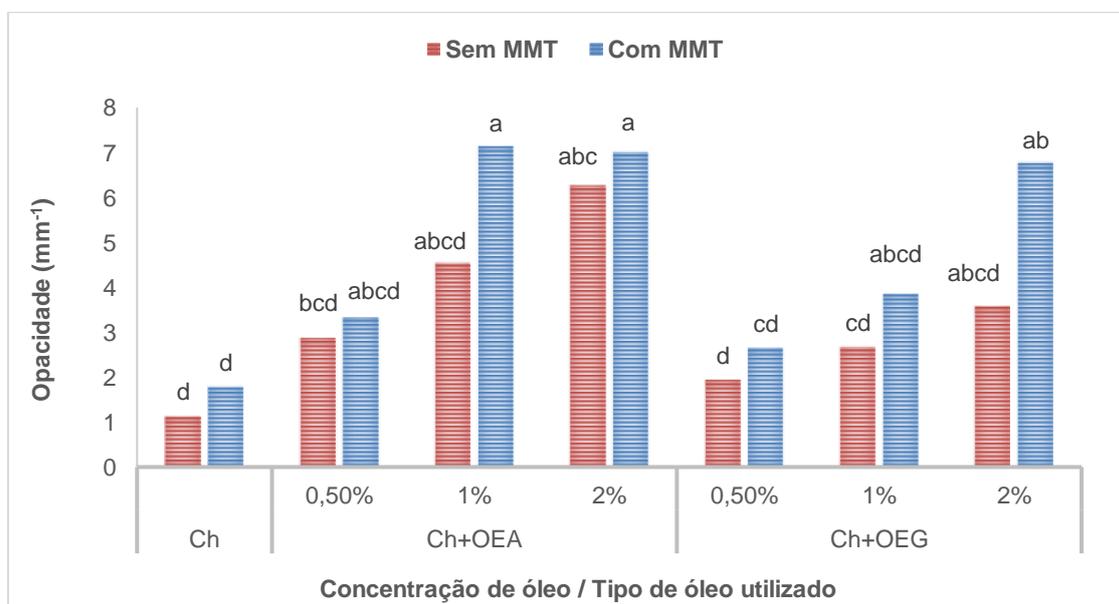


Fig. 3.4 Valores médios da opacidade para os diferentes biofilmes produzidos
a-d: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

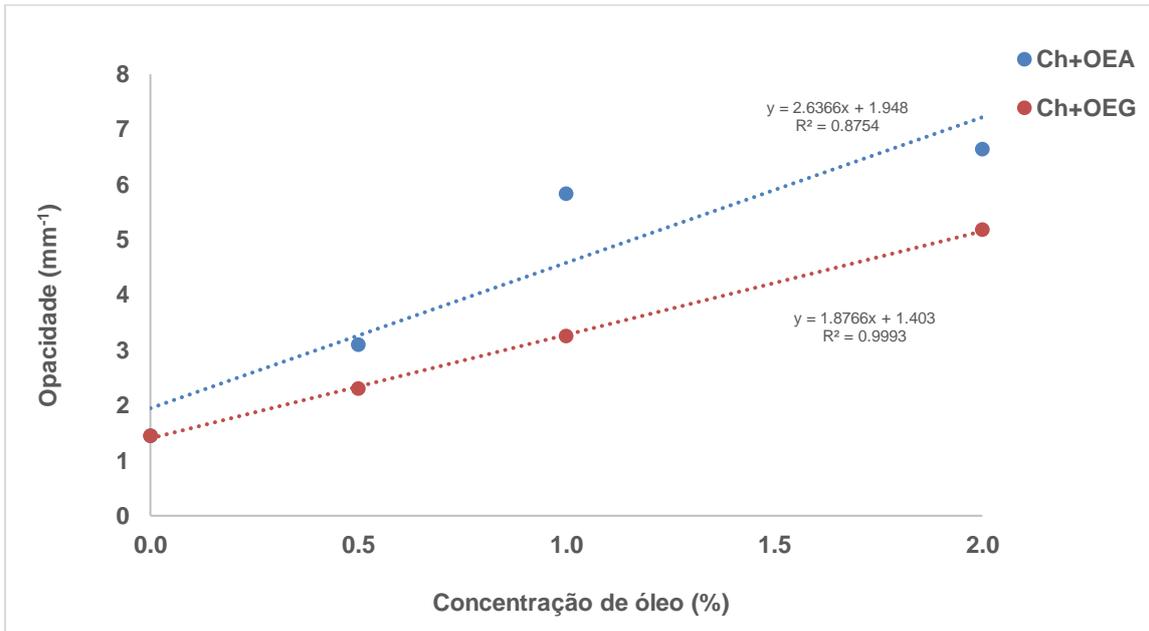


Fig. 3.5 Comparação dos valores médios (com e sem MMTCa) da opacidade variando a tipo de óleo incorporado e a sua concentração

Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre.

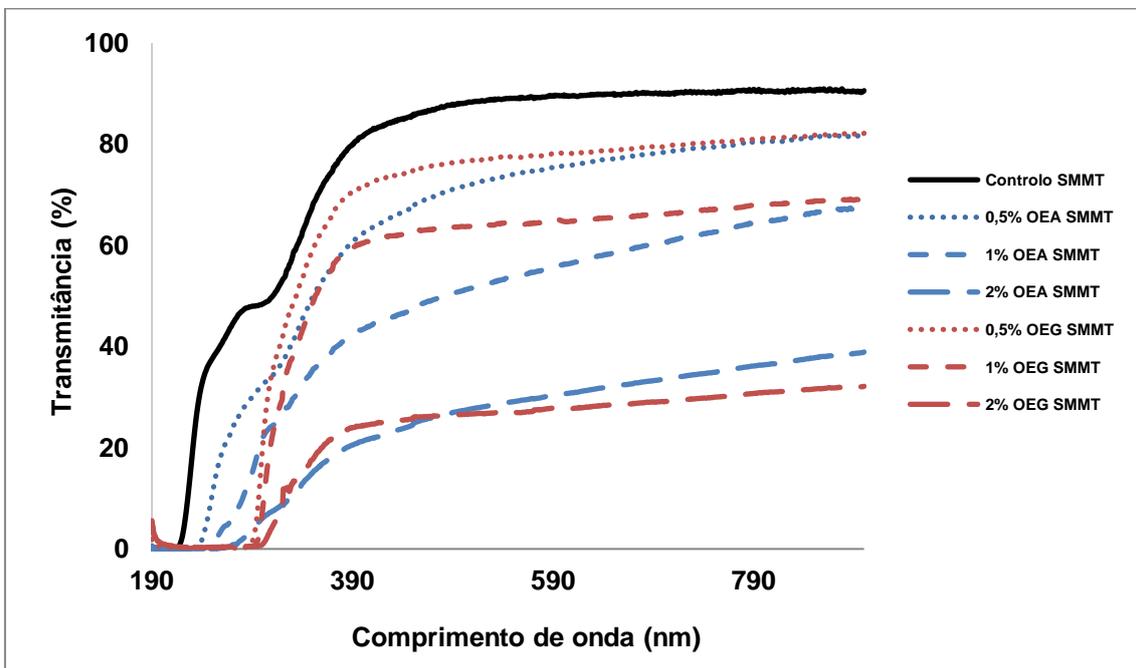


Fig. 3.6 Espectro de varredura dos biofilmes de quitosano com incorporação de OE sem MMTCa

OEA = Óleo de alecrim; OEG = Óleo de gengibre; SMMT = Sem Montmorilonita Cálcica; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

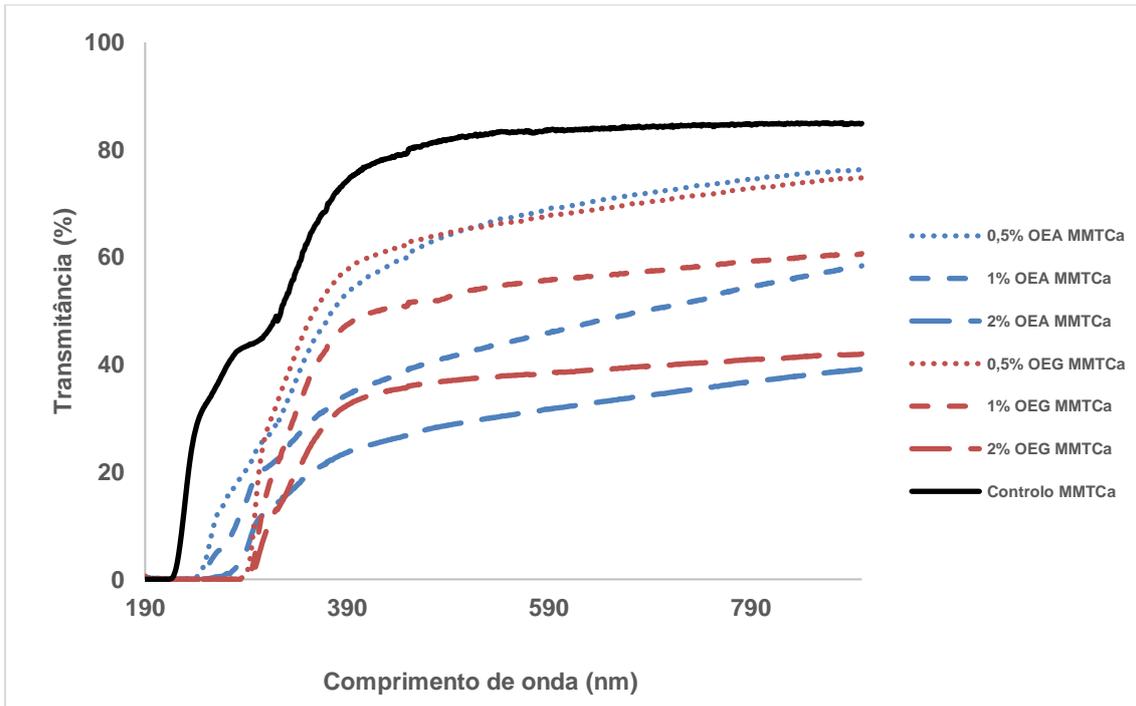


Fig. 3.7 Espectro de varredura dos biofilmes de quitosano com incorporação de OE com MMTCa
OEA = Óleo de alecrim; OEG = Óleo de gengibre; SMMT = Sem Montmorilonita Cálcica; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

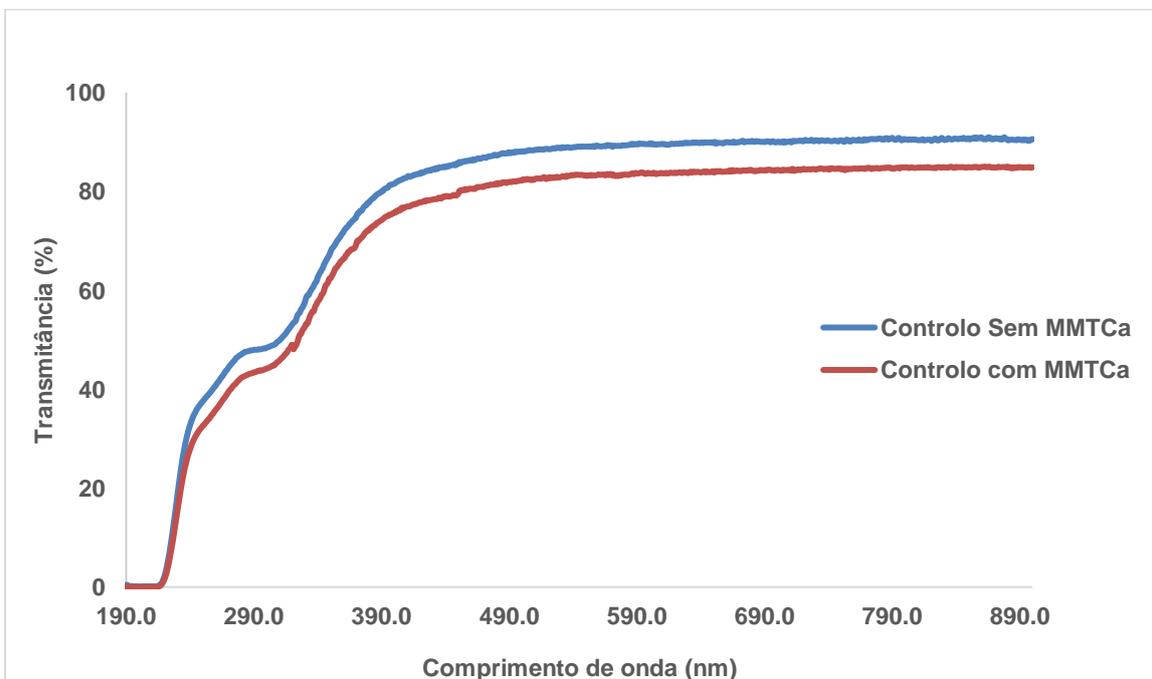


Fig. 3.8 Diferenças no espectro de varredura dos biofilmes de controle com e sem adição de MMTCa
MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.1.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS

A avaliação das propriedades mecânicas é um processo obrigatório quando se trata do desenvolvimento de novos materiais para embalagens uma vez que a força mecânica e a extensibilidade têm de ser adequadas para que o filme de embalagem resista a tensões externas e mantenha a sua integridade durante a aplicação na embalagem, existindo assim vários tipos de testes mecânicos (Souza et al., 2017). No ensaio de tração, o biofilme é submetido a uma força vertical. A força de tração (FT), o alongamento na rutura (%E) e o módulo de elasticidade (ME) são três parâmetros importantes na avaliação da força e flexibilidade dos biofilmes plásticos que podem ser retirados desse ensaio (Souza et al., 2017). FT indica a tensão máxima que o biofilme pode aguentar, %E é a deformação máxima que o provete de teste aguenta antes de partir e o ME é uma medida da rigidez do filme (Sánchez-González et al., 2010) (Fig. 3.9-3.10). As figuras 3.11-3.13 mostram os resultados obtidos para estes três parâmetros.

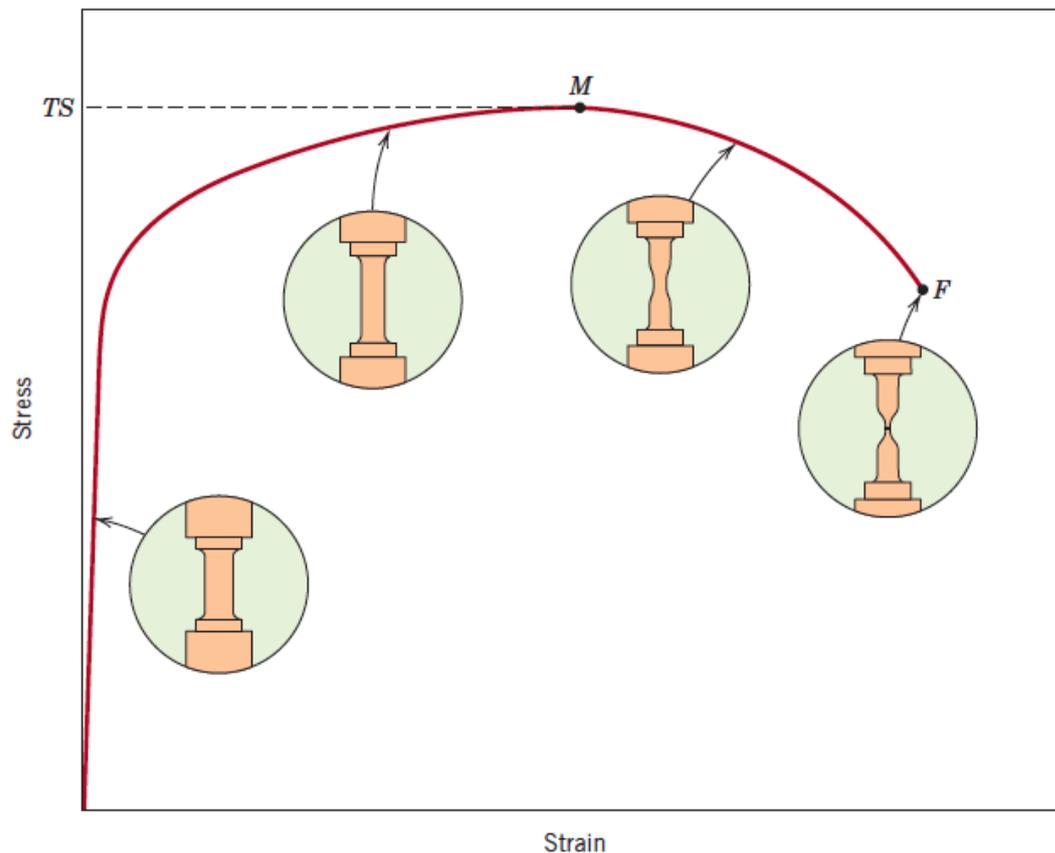


Fig. 3.9 Comportamento típico de esforço-deformação de um ensaio de tração, onde o ponto F indica a fratura do provete. A resistência à tração é indicada no ponto M. As inserções circulares representam a geometria do espécime deformado (biofilme) em vários pontos ao longo da curva (adaptado de Callister, 2007)

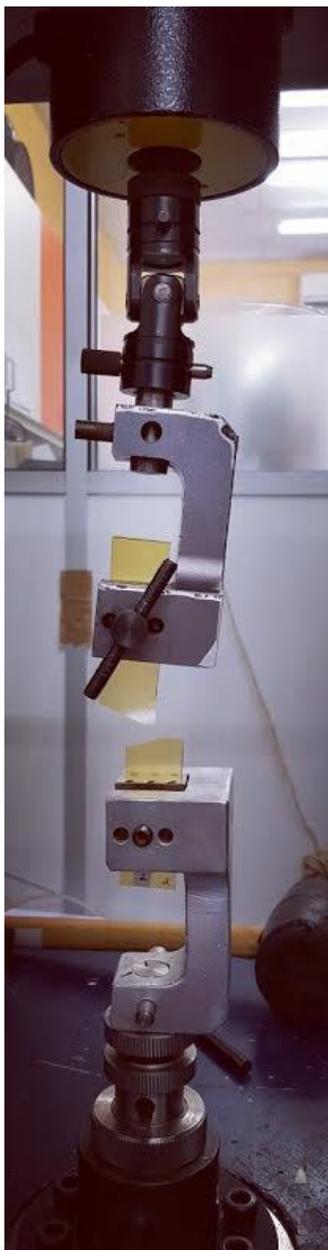


Fig. 3.10 Aparelho utilizado para realizar testes de tensão-deformação em tração (Autograph Shimadzu, Australia)

Em geral, a tensão dos biofilmes incorporados com OEA e OEG foram inferiores aos valores apresentados pelos provetes de quitosano controlo, sendo que não houve diferenças significativas entre os dois óleos ($p > 0,05$) (Fig 3.11). A incorporação da fase dispersa dos óleos conduz a biofilmes mais flexíveis e menos resistentes à rutura, tendo sido registado que o aumento da concentração de óleo faz decrescer o valor da tensão máxima mas sem que essa diminuição tenha uma expressão significativa ($p > 0,05$). Apenas a passagem de 0,5% para 1% no OEG sem MMTCa mostrou ter um decréscimo significativo ($p < 0,05$). Isto pode ser

explicado pelas descontinuidades na matriz do polímero introduzidas pela incorporação dos óleos e pelas mudanças nas interações da cadeia polimérica quando certos componentes do óleo estão presentes, o que leva a uma resposta mecânica mais fraca (Sánchez-González et al., 2010). A adição de MMTCa levou a que houvesse uma diminuição na tensão em todos os provetes mas não de forma significativa ($p > 0,05$) excetuando os casos do biofilme de 0,5% de óleo de gengibre. Era expectável que com a incorporação do MMTCa os biofilmes tivessem tensões máximas e módulos de Young superiores aos biofilmes sem MMTCa, seguindo assim os resultados obtidos na literatura em geral. Tal não se verificou. Ainda existem muitos poucos artigos científicos que mostrem a interação entre os óleos essenciais e as nanopartículas de argila. Testes como, por exemplo, Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) ou Microscópio eletrónico de varrimento (SEM), são essenciais para se puder entender melhor quais as interações que houve entre as nanopartículas e os óleos juntamente com a matriz polimérica.

A adição de OE à matriz fez com que a percentagem de alongamento dos biofilmes aumentasse, sem que tivesse sido de forma significativa ($p > 0,05$) (Fig 3.12). Este aumento só foi significativo ($p < 0,05$) entre a amostra controlo com MMTCa e as restantes amostras com MMTCa. Não se verificaram diferenças neste parâmetro para o tipo de óleo, concentração de óleo ($p > 0,05$). A adição de MMTCa aos biofilmes Ch+OEA aumenta ligeiramente ($p > 0,05$) o alongamento em comparação com os biofilmes Ch+OEA sem MMTCa, mas com nas amostras Ch+OEG acontece o contrário, ou seja, a incorporação de MMTCa diminui ligeiramente ($p > 0,05$) o alongamento. Sánchez-González et al., (2010) relataram que a tensão e o alongamento à rutura do biofilme de quitosano diminuíram com a incorporação de óleo de Bergamot. No entanto, Ojagh et al., (2010) relataram um resultado diferente, tendo a tensão aumentado e a percentagem de alongamento diminuído com a introdução de óleo de canela. A resistência à tração e o alongamento à rutura estão relacionados com a microestrutura da rede cristalográfica e com as forças intermoleculares (Peng e Li, 2014). As interações na matriz foram variadas para cada tipo de óleo. Muitos fatores têm influência sobre as propriedades mecânicas dos filmes e explicam essas diferenças de resultados, tais como o meio ácido utilizado, fonte e características do quitosano e a sua percentagem na solução filmogénica, e também as condições experimentais (Souza et al., 2017).

Embora o alongamento não tenha sido muito afetado, o módulo de Young (rigidez) foi (Fig 3.13). A adição de óleos essenciais fez diminuir a rigidez (significativamente menor, $p < 0,05$ no caso do óleo de gengibre) dos biofilmes pois apresentou valores menores no módulo de Young em comparação com os provetes de controlo. Os óleos desenvolveram uma função plastificante ao interromper as ligações químicas entre as cadeias do quitosano, reduzindo a sua rigidez. Segundo Siripatrawan e Harte (2010), os compostos voláteis do alecrim, foram preenchendo os buracos internos na matriz, induzindo o desenvolvimento de uma continuidade estrutural, produzindo filmes com cadeias transversais mais altas e conseqüentemente com uma rigidez superior à do gengibre. Ao se adicionar MMTCa verificou-se uma maior rigidez

(não significativa, $p > 0,05$) no biofilme controlo, em comparação com o biofilme de quitosano sem MMTCa, mas quando os óleos essenciais estão presentes verifica-se o comportamento contrário, ou seja, os biofilmes com OE e sem MMTCa são ligeiramente ($p > 0,05$) mais rígidos. No estudo de Cyras et al., (2008), os nanocompósitos de amido/MMT apresentaram uma melhoria notável nas propriedades mecânicas, como o módulo Young e a força de tração. No entanto, uma diminuição na percentagem do alongamento foi observada devido à ação de reforço do MMT. Segundo os autores, o principal motivo para esta melhoria nos nanocompósitos de argila polimérica é a forte interação interfacial entre matriz e argila. Por outro lado, tal como nos resultados obtidos neste estudo, Sothornvit et al., (2009) também obtiveram valores de rigidez e força de tração mais baixos quando adicionaram 3 tipos de MMT (Cloisite Na⁺, Cloisite 20A e Cloisite 30B) à matriz (proteína de soro). Os autores justificam estes resultados como uma dispersão incompleta da nano-argila na matriz polimérica, que é causada por uma incompatibilidade entre as nanoargilas com o biopolímero.

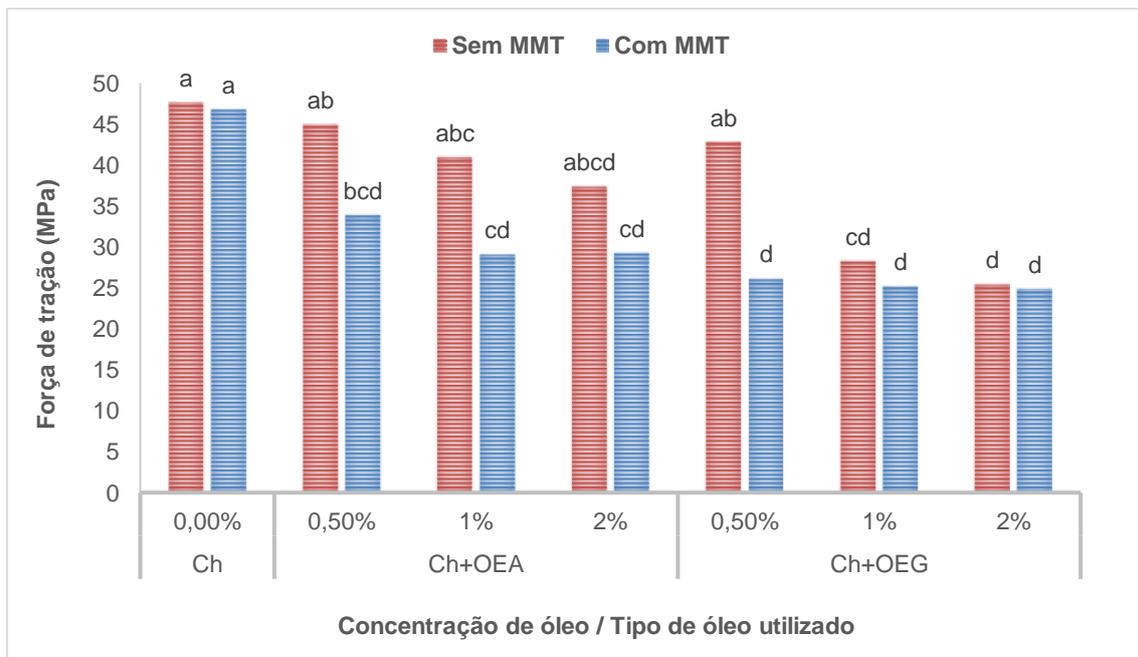


Fig. 3.11 FT (MPa) dos diferentes biofilmes produzidos

a-d: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

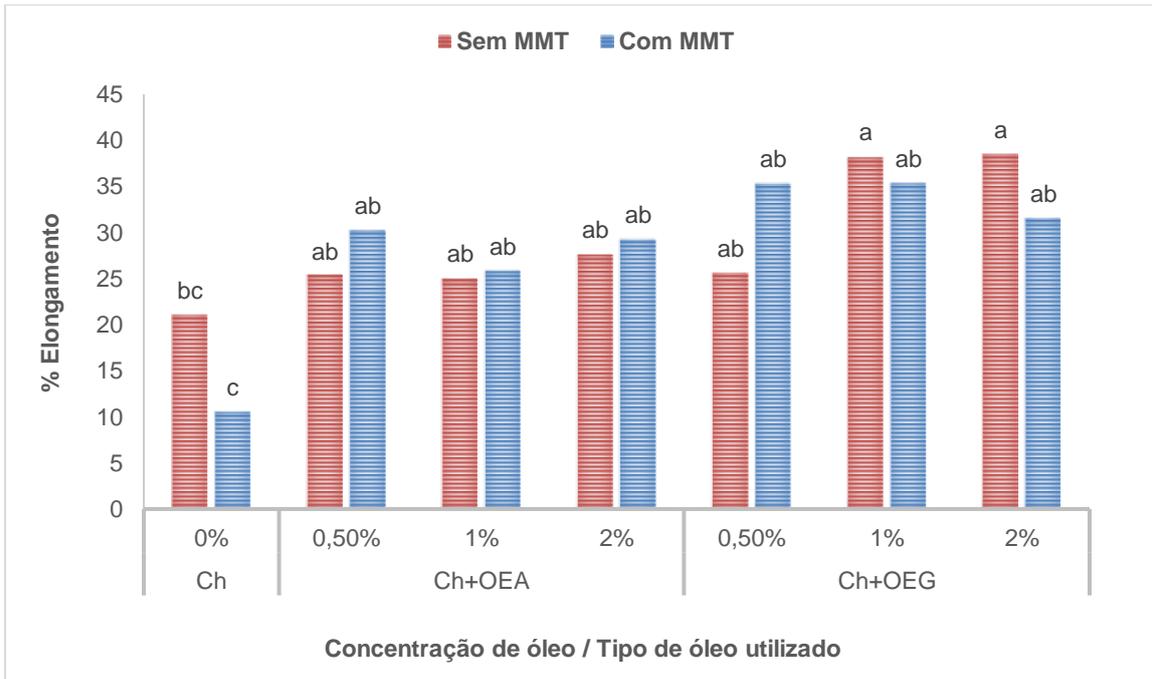


Fig. 3.12 %E dos diferentes biofilmes produzidos

a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

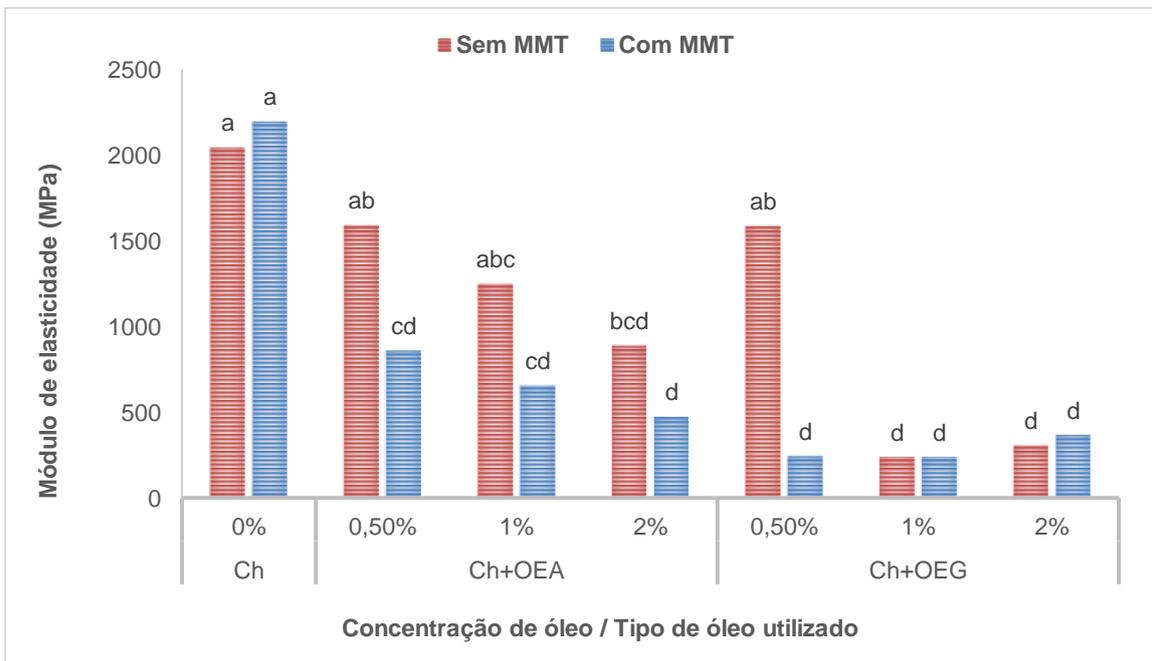


Fig. 3.13 ME (MPa) dos diferentes biofilmes produzidos

a-d: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.1.4 HUMIDADE, SWELLING E SOLUBILIDADE

Os resultados mostraram que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dois tipos de óleos em relação ao teor de humidade presente nos biofilmes (Fig 3.14). Em geral, tal como se previa, ambos os biofilmes incorporados com os OE e sem adição de MMTCa reduziram o valor da humidade em relação ao controlo. Tal só não aconteceu para o Ch+OEA 0,5% e para o Ch+OEG 2%. Isto deve-se pois os óleos essenciais como compostos lipídicos, são conhecidos por melhorar as propriedades de barreira à água dos biofilmes devido à sua natureza hidrofóbica (Sánchez-González et al., 2009). Estes resultados vão de encontro aos apresentados por Peng e Li (2014).

Os biofilmes de quitosano incorporados com OEA mostraram ter um ligeiro aumento da humidade para pequenas concentrações e um decréscimo constante para concentrações acima de 0,5% (variações sem expressão significativa, $p > 0,05$) (Fig 3.14). Estes resultados estão conformes com os apresentados por Abdollahi et al., (2012b), onde os autores afirmam que o aumento ligeiro do teor de humidade na presença de óleos de alecrim em baixas concentrações pode estar relacionado com a dissolução da rede do filme (demonstrado por micrografias SEM), o que provocou uma quantidade crescente de moléculas de água entre as cadeias do polímero. O estudo refere também que o facto da humidade ter tido um decréscimo para valores de concentração mais altos se deve à natureza hidrofóbica do óleo de alecrim que, conseqüentemente, aumentou a hidrofobicidade dos biofilmes.

Os biofilme de quitosano incorporados com OEG apresentaram resultados não significativos ($p < 0,05$) inferiores ao controlo para as concentrações 0,5% e 1%, enquanto que para a concentração de 2% os valores aumentam (também não significativamente, $p > 0,05$), comparativamente com o valor controlo. Resultados idênticos foram obtidos por Hosseini et al., (2009) com óleo de tomilho. Fundamentados por imagens SEM mostraram que a superfície e a secção transversal dos biofilmes estavam cobertas com poros e pareciam esponjosas. Embora a natureza hidrofóbica dos óleos essenciais possa afetar as propriedades do filme, os fatores físicos tiveram uma influência dominante neste caso, ou seja, apesar da hidrofobicidade dos óleos, se estes mesmo assim não estiverem uniformemente distribuídos pelos biofilme, a água vai continuar a ter locais onde se pode ligar com quitosano que é hidrofílico.

Entre os biofilmes de controlo, a adição de MMTCa faz diminuir a humidade. Casariego et al., (2009), tiveram um decréscimo da humidade nos biofilmes de quitosano quando adicionaram nanopartículas de argila. Os autores justificam dizendo que os filmes de quitosano têm uma maior afinidade pela água em comparação com a argila, provavelmente por estarem protonados, tornando assim os filmes mais hidrofílicos do que o próprio pó. Ghelejlou et al., (2016), também obtiveram o mesmo decréscimo com a adição de MMT aos filmes, justificando que tal acontece devido à estrutura semelhante a um disco do MMT e às interações específicas entre o quitosano e a argila que podem estabilizar a estrutura do filme.

Em relação à adição de MMTCa aos biofilmes que já continham óleos, houve uma diminuição não significativo da humidade ($p > 0,05$) para os biofilmes com óleo de alecrim e um aumento não significativo ($p > 0,05$) para os biofilmes com óleo de gengibre em comparação com o controlo com MMTCa e sem óleo. Muito poucos são ainda os estudos na literatura em que nanopartículas de argila são adicionadas a biofilmes que já contém óleos essenciais ou extratos. É difícil extrapolar uma relação entre estes dois fatores. Imagens de microscopia (SEM ou TEM) e análises de FTIR são essenciais para se perceber quais são as interações intermoleculares entre ambos e a matriz polimérica. Shojae-Aliabadi et al., (2014) adicionaram óleo essencial de *Zataria Multiflora* a biofilmes de kappa-carregenano com MMTNa e obtiveram um decréscimo na humidade em comparação com os biofilmes só com MMTNa, contrariando os nossos resultados. Explicaram que tal comportamento pode estar associado ao processo de dispersão da nanoargila, que reduziu a disponibilidade dos grupos hidroxilo para interagir com a água, reduzindo assim o teor de humidade dos biofilmes. Alexandre et al., (2016) também obtiveram resultados distintos quando juntaram óleo de gengibre e MMT a biofilmes de gelatina. O teor de humidade diminuiu com a adição do óleo e das nanopartículas (sem ser significativamente), sendo que o MMT foi o agente que mais efeito teve no decréscimo da propriedade.

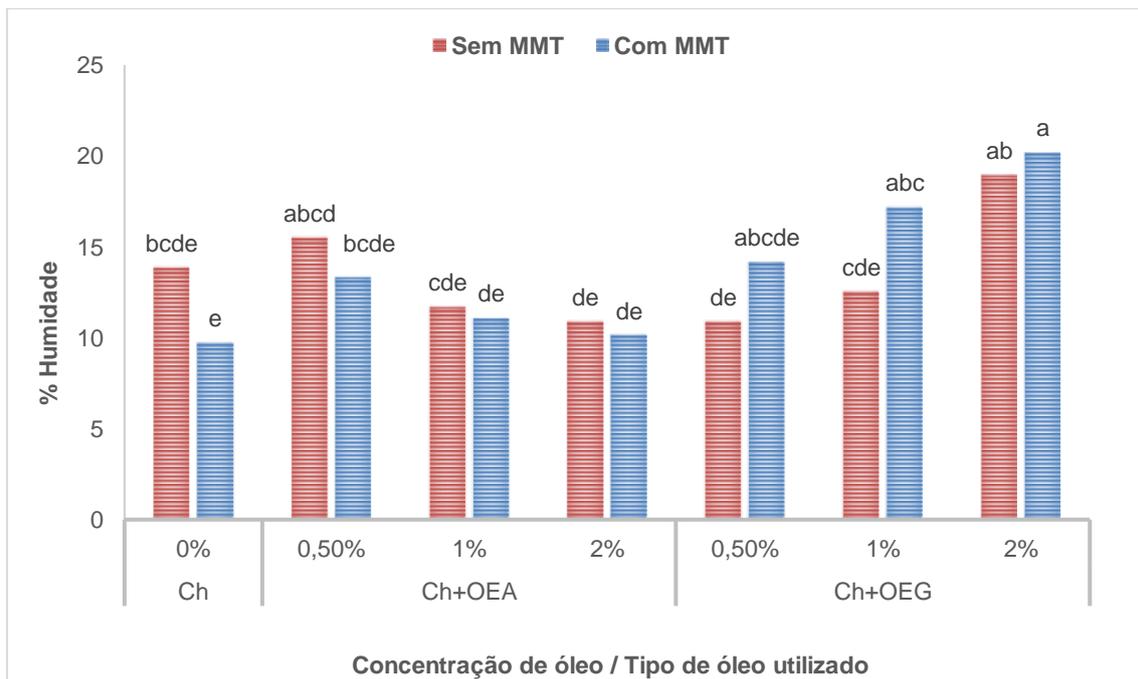


Fig. 3.14 Teor de humidade presente nos diferentes biofilmes produzidos

a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

O *swelling* é utilizado para caracterizar a absorção de água do filme, que por sua vez é transmitida para o interior do produto. O conhecimento desta cinética é importante para prever mudanças de estabilidade e de qualidade durante a embalagem e armazenamento de produtos alimentares (Abdollahi et al., 2012b). Verificou-se que em geral houve uma diminuição da percentagem de *swelling* com a incorporação dos dois tipos de óleo, sendo esta diminuição significativamente ($p < 0,05$) foi maior para o óleo de gengibre (Fig 3.15). Resultados semelhantes são encontrados na literatura (Abdollahi et al., 2012b; Hossein et al., 2009; Siripatrawan e Harte, 2010; Souza et al., 2017). O grau de *swelling* de uma matriz polimérica depende fortemente da quantidade e da natureza das interações intermoleculares (Abdollahi et al., 2012b). Siripatrawan e Harte (2010) no seu estudo propuseram que o hidrogénio e as interações covalentes entre a rede de quitosano e os constituintes dos óleos essenciais limitam a disponibilidade dos grupos de hidrogénio formarem ligações hidrófilas com as moléculas de água, fazendo com que haja uma diminuição da afinidade do biofilme com a água, tornando estes mais hidrofóbicos. Já Souza et al., (2017) disseram que a interação hidrofóbica entre polifenóis e a região hidrofóbica do quitosano é conhecida e que essas associações resultam no bloqueio de alguns grupos ativos para a absorção de água, contribuindo assim para a redução do *swelling* e da solubilidade. A adição de MMTCa fez com que se desse uma redução não significativa ($p > 0,05$) do *swelling*. A diminuição da absorção de água com um aumento no teor de MMTCa é uma indicação de que partículas inorgânicas estão a preencher fisicamente praticamente toda a rede polimérica (Zheng et al., 2008).

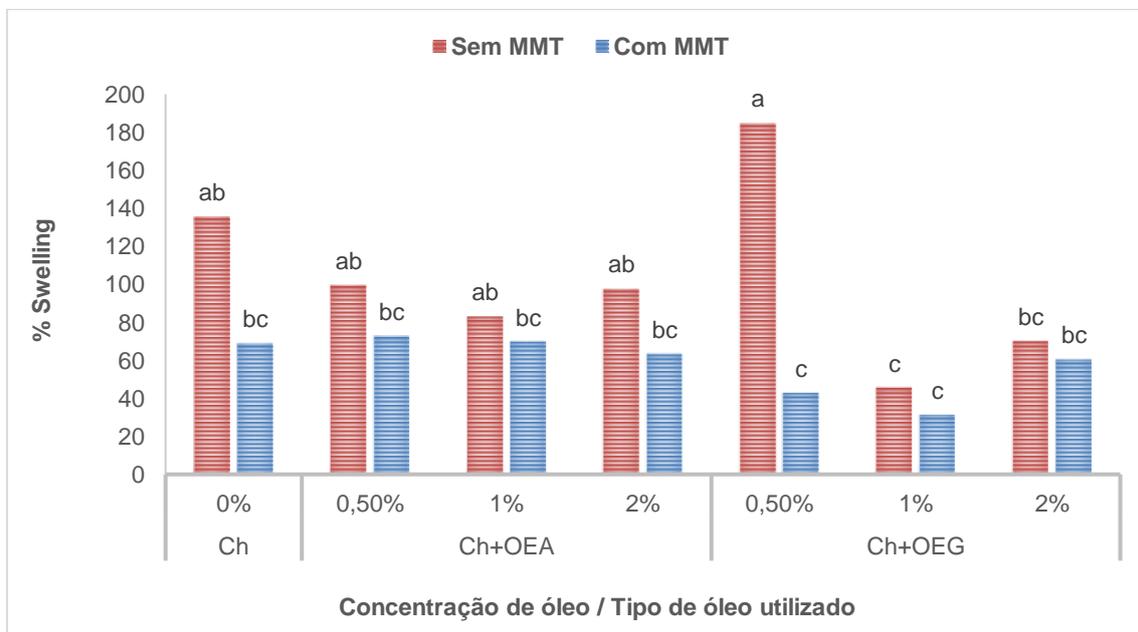


Fig. 3.15 Teor de *swelling* presente nos diferentes biofilmes produzidos

a-c: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

A resistência à água é uma propriedade importante de filmes biodegradáveis ou comestíveis aplicados na proteção de alimentos onde a atividade da água é alta ou quando o filme deve estar em contato permanente com água. Deve atuar como filme protetor de alimentos, por exemplo, para evitar a exsudação de produtos frescos ou produtos congelados (Abdollahi et al., 2012a). Caso isso não acontecesse, uma maior solubilidade em água poderia melhorar a biodegradabilidade do filme, embora limitaria o seu uso em aplicações para alimentos com alto teor de água, pois o bioplástico tenderia a solubilizar no alimento aumentando a dificuldade em separar o plástico dos alimentos embalados (Souza et al., 2017). Por outro lado a resistência à água, pode determinar também a libertação de compostos antioxidantes e antimicrobianos do filme quando colocados sobre a superfície do alimento, na medida que quanto mais solúveis forem os biofilmes mais rapidamente são libertados os compostos para o alimento (Abdollahi et al., 2012a). No geral, observou-se um ligeiro decréscimo não significativo ($p > 0,05$) na percentagem de solubilidade dos filmes quando os óleos e as nanopartículas de argila foram incorporados (Fig 3.16). Os biofilmes com óleo de gengibre apresentaram um decréscimo ligeiramente superior ao dos biofilmes com óleo alecrim o que pode ser justificado pelo alto carácter mais lipofílico do gengibre (Souza et al., 2017). Solubilidade mais baixa significa que os biofilmes de quitosano com óleo de gengibre podem libertar o óleo mais lentamente e mantê-lo por muito tempo numa superfície de alimentos que os biofilmes com óleo de alecrim (Abdollahi et al., 2012b). Anteriormente também vimos que o gengibre era o óleo que estava mais preso na matriz, e daí ter demonstrado ter uma atividade antioxidante inferior à do alecrim. Quando o MMTCa foi adicionado ao biofilme controlo, observou-se uma queda ligeira mas não significativa ($p > 0,05$), isto pode ser justificado pelo facto de que as nanopartículas de MMTCa têm interações específicas com a matriz de quitosano, estabilizando a estrutura do filme. Por outras palavras, as moléculas de água não conseguiram quebrar suficientemente as ligações de hidrogénio presentes entre as camadas de MMTCa e quitosano, causando uma menor solubilidade (Abdollahi et al., 2012a).

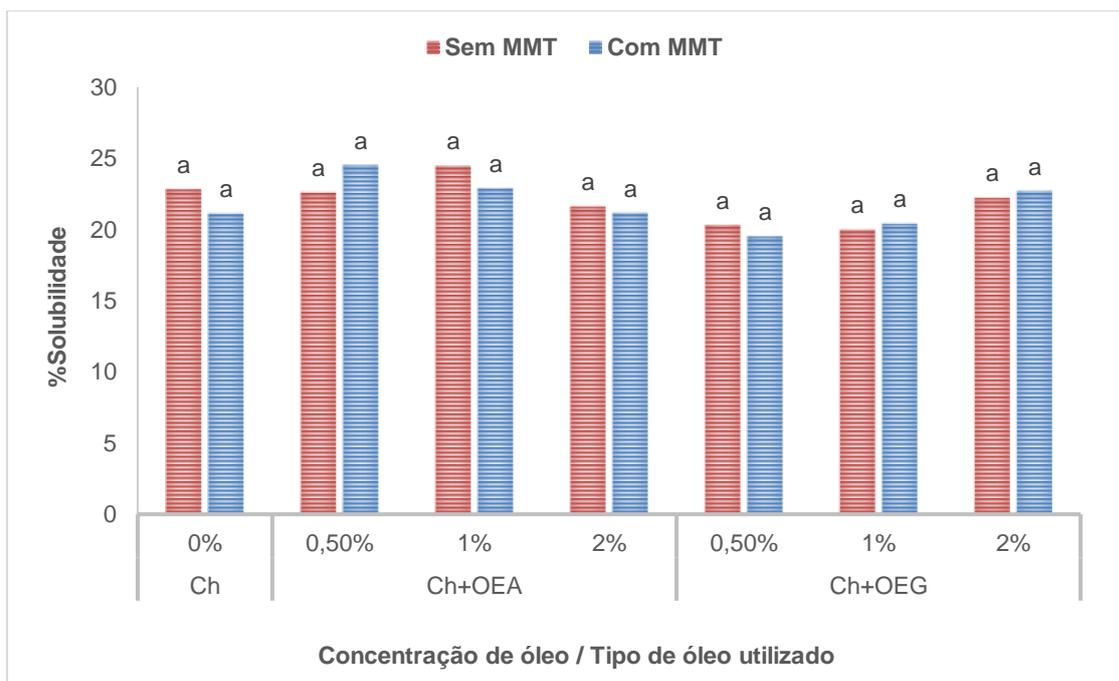


Fig. 3.16 Teor de solubilidade presente nos diferentes biofilmes produzidos

Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.1.5 ANÁLISES DE MIGRAÇÃO

Tem sido demonstrado nos últimos anos que a atividade antioxidante das plantas é causada principalmente por compostos fenólicos, sendo que o efeito de compostos fenólicos sobre as moléculas lipídicas pode depender de fatores estruturais (Abdollahi et al., 2012b). O alecrim e o gengibre são alternativas naturais aos antioxidantes sintéticos já existentes (BHT e BHA), pois têm uma atividade antioxidante similar ou ainda maior que estes (Bicchi et al., 2000). O potencial antioxidante dos óleos essenciais de alecrim e gengibre deve-se à presença de vários compostos, maioritariamente fenólicos (Abdollah et al., 2012b). Existem estudos que enfatizam o papel que os grupos fenólicos destes óleos têm na atividade antioxidante (Bozin et al., 2007; Singh et al., 2008). Lu e Foo (2001) reportaram que a maior parte dos compostos antioxidantes naturais trabalham frequentemente em sinergismo uns com os outros produzindo um espectro de propriedades antioxidativas que criam um sistema efetivo de defesa contra os radicais livres. Os óleos essenciais consistem numa complexa mistura de várias classes de compostos orgânicos que podem produzir efeitos sinérgicos ou antagónicos no processo de oxidação lipídica (Singh et al., 2008).

3.1.5.1 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas. Eles são doadores de hidrogénio e possuem propriedades estruturais ideais para eliminação de carbono e, conseqüentemente, têm potencialidades antioxidantes (Kanatt et al., 2012). O reagente de Folin-Ciocalteu é usado para se obter uma estimativa bruta da quantidade de grupos fenólicos presentes na amostra. Os compostos fenólicos sofrem uma reação complexa redox com os ácidos fosfotúngsticos e fosfomolibdicos presentes no reagente de Folin-Ciocalteu. O desenvolvimento da cor deve-se à transferência de elétrões no pH básico para reduzir os complexos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (Curcio et al., 2009).

De modo a facilitar a tarefa de leitura e análise dos dados, duas figuras foram feitas (Fig 3.17 e 3.18).

A atividade antioxidante no início do teste foi considerada nula e serviu de controlo para os restantes tempos de migração. Os valores de compostos fenólicos presentes na amostra de controlo é muito baixo, mas existente, talvez devido à degradação do quitosano ou podendo estar a ser confundidos com outro tipo de compostos. A incorporação de OE aumentou significativamente ($p < 0,05$) a migração de compostos fenólicos do biofilme para o meio simulante, encontrando-se em concordância com os resultados de Siripatrawan e Harte (2010) e Moradi et al., (2012). Os resultados dos ensaios indicaram uma quantidade de fenólicos praticamente nula (dados não apresentados) para os biofilmes de quitosano controlo. Isto pode dever-se provavelmente à formação de cromógenos, devido à reação do reagente de Folin-Ciocalteu com substâncias redutoras não fenólicas, sabendo-se também que a quantidade fenólica residual do quitosano é afetada pelas condições e método de secagem do filme (Moradi et al., 2012).

Excetuando raros casos, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois tipos de óleo, mas notou-se que nos biofilmes com OEG houve uma maior migração, atingindo um máximo de 33,17 mg/L de AEG para o biofilme sem MMTCa e de 33,82 mg/L para o biofilme com MMTCa, enquanto que os biofilmes incorporados com OEA apresentaram um máximo de 25,69 mg/L para o biofilme sem MMTCa e 12,66 mg/L para o biofilme com MMTCa. Segundo Rababat et al., (2004), o extrato de alecrim apresentou valores de migração do conteúdo fenólico bastante superior ao apresentado pelo extrato de gengibre, contrariando os resultados obtidos no presente estudo, mas estas diferenças podem ser devido ao facto dos óleos e os extratos aquosos terem composições diferentes. Este estudo de Rababat et al., (2014) é um pouco redutor visto que o extrato de alecrim até pode ter mais fenóis que o gengibre mas estes podem ter ficado presos na matriz e não terem migrado. Na investigação de Vallverdú-Queralt et al., (2014), os principais compostos fenólicos que atuam na atividade antioxidante do alecrim são o ácido rosmarínico, carnosol, rosmanol e epirosmal. Os grandes responsáveis pela atividade antioxidante do gengibre são o gingerol e o shogaol (Maizura et al., 2011). Após consulta da massa molecular destes compostos, verificou-se que os fenólicos do

alecrim têm uma massa molecular superior às do gengibre. Este factor pode ter sido responsável por uma libertação dos compostos da matriz de quitosano mais difícil de acontecer, podendo explicar assim o porquê dos biofilmes de Ch+OEG apresentarem resultados de migração do conteúdo fenólico total superior aos apresentados pelos biofilmes de Ch+OEA.

Em termos de concentrações de óleo adicionadas aos biofilmes, existem diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas entre as concentrações mínima (0,5%) e máxima (2%) para ambos os óleos. Mehdizadeh et al., (2012) também só verificaram diferenças significativas entre estas duas percentagens de concentrações quando adicionaram óleo de tomilho aos filmes, tendo referido mesmo que não houve diferenças entre 0,5%-1% e 1%-2%. Tal como era esperado, com o aumento da concentração, o conteúdo fenólico total também aumentou, o que vai de encontro com os resultados publicados por Siripatrawan e Harte (2010) e Abdollahi et al., (2012a). Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) com a incorporação de nanopartículas de argila no conteúdo fenólico total que migrou, mas verificou-se uma diminuição ainda acentuada para os biofilmes com OEA, dando a entender que o MMTCa aprisionou os fenóis presentes no alecrim. Os poucos fenóis que saem do filme com alecrim aparentam ter uma elevadíssima atividade antioxidante (de acordo com os dados apresentados) enquanto que há mais fenóis a sair dos filmes com gengibre mas que não têm tanta atividade antioxidante.

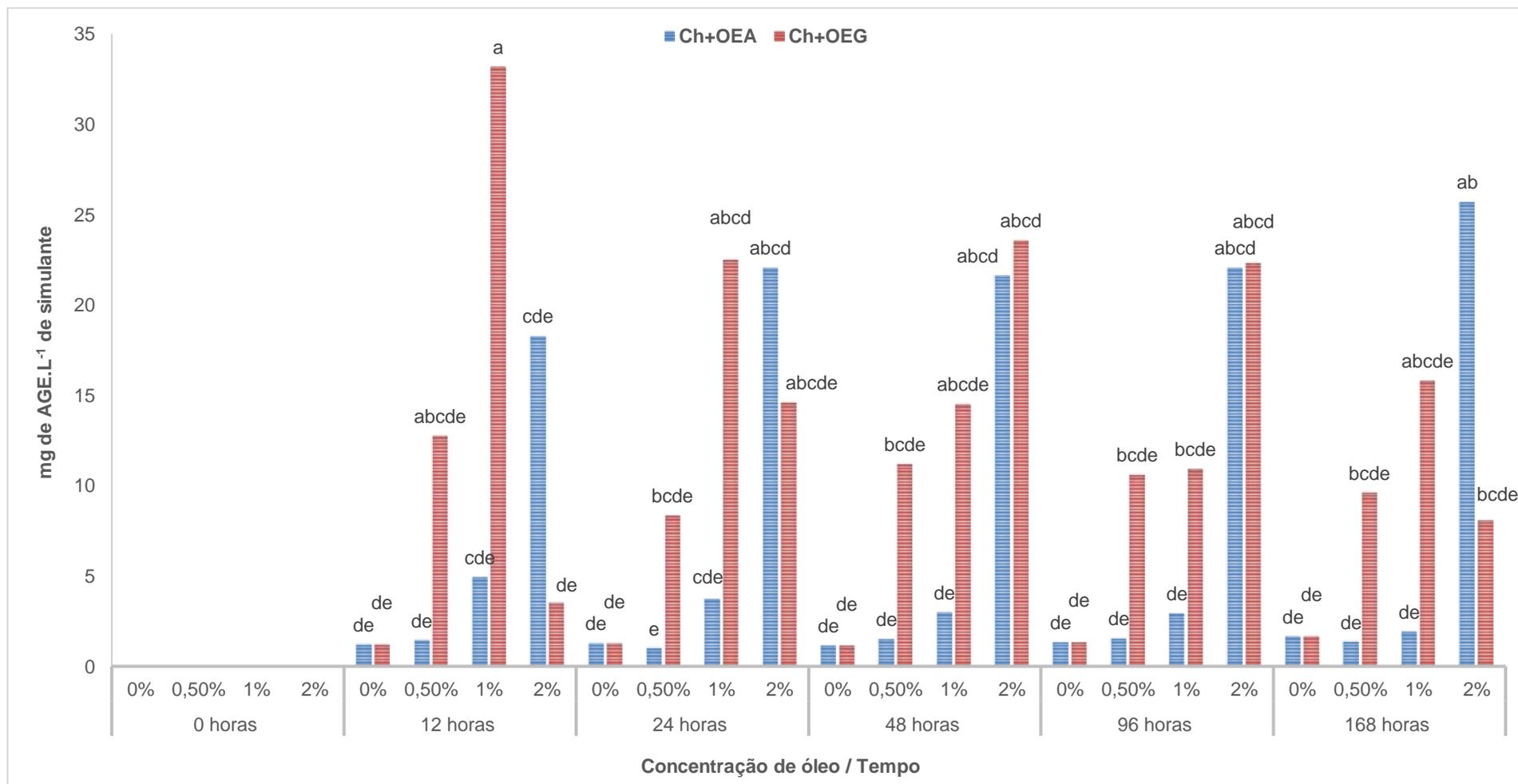


Fig. 3.17 Conteúdo fenólico total para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo

a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre.; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

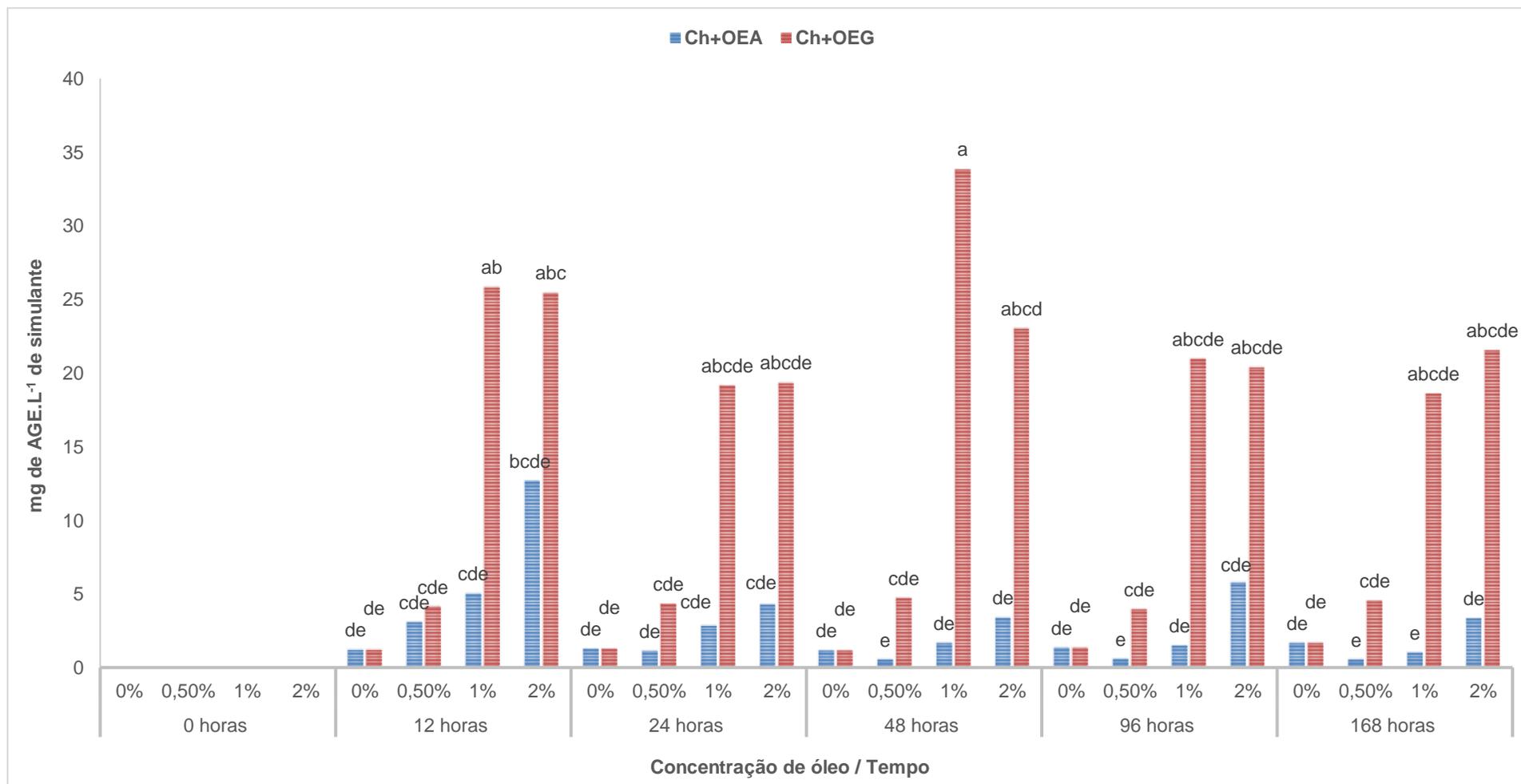


Fig. 3.18 Conteúdo fenólico total para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo

a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre.; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.1.5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O ensaio de DPPH é usado para indicar a atividade antioxidante do biofilme. Este ensaio baseia-se na capacidade do DPPH, um radical livre e estável, desaparecer e assim descolorir na presença de antioxidantes resultando numa redução dos valores de absorvância. Neste teste, os antioxidantes reduzem o radical DPPH num composto de cor amarelada, a difenilpicrilhidrazina, e a extensão da reação depende da capacidade de doação de hidrogénio dos antioxidantes (Siripatrawan e Harte, 2010).

Para ser mais fácil analisar os dados da percentagem de inibição do radical DPPH, duas figuras distintas são apresentadas (Fig. 3.19 e 3.20). Nas duas figuras, os dois óleos essenciais adicionados mostraram ter comportamentos distintos entre eles ($p < 0,05$), sendo que ambos demonstraram ter um efeito antioxidante. No geral, na migração de compostos, no biofilme com OEA houve uma maior migração para o meio simulante resultando num aumento da atividade antioxidante, o que vai de encontro com vários estudos realizados (Rababah et al., 2004; Sacchetti et al., 2005).

A atividade antioxidante no início do teste foi considerada nula e serviu de controlo para os restantes tempos de migração. A amostra de controlo tanto com e sem MMTCa teve uma atividade antioxidante bastante próxima de zero, mostrando que houve mudanças significativas ($p < 0,05$) para as restantes amostras estudadas.

A concentração de óleo adicionado não mostrou ter efeitos significativos na percentagem de inibição ($p > 0,05$), verificando-se em praticamente todos os tempos que um aumento da concentração levou a um ligeiro aumento da atividade antioxidante. Estes resultados estão em conformidade com os apresentados por Siripatrawan e Harte (2010).

A adição de nanopartículas de argila tiveram uma relação significativa ($p < 0,05$) com a percentagem de inibição do radical de DPPH. Sem argila, o biofilme com óleo de alecrim atingiu um máximo de inibição de 8,53%, enquanto que com argila, o máximo foi de 12,07%. Já nos biofilmes com óleo de gengibre sem argila o máximo atingido foi de 6,26%, enquanto que com argila foi de 8,62%.

Os resultados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) na percentagem de inibição do radical ao longo do tempo de incubação. Verificaram-se dois comportamentos diferentes consoante o óleo utilizado. Observou-se que nos biofilmes sem MMTCa com óleo de gengibre existe uma maior inibição logo nas primeiras 12 horas de incubação enquanto que nos biofilmes sem MMTCa com óleo de alecrim essa atividade surte mais efeito ao fim de 48 horas. Registou-se também que nos biofilmes com MMTCa há uma estabilização dos valores da percentagem de inibição a partir das 24 horas para o óleo de alecrim, e logo a partir das 12 horas para o óleo de gengibre, ou seja parece que não houve um aumento de migração de compostos a partir desta altura. Muito poucos são os estudos que incluem a adição de MMT nos biofilmes de quitosano com óleos essenciais e que analisam as suas interações, não

sendo ainda bem compreendido o porquê desta estabilização, sendo necessário estudos mais aprofundados sobre o assunto. Esta inibição controlada dos radicais pode ser devido ao facto dos óleos essenciais estarem esfoliados com as nanopartículas de argila, fazendo com que os seus compostos tenham uma libertação mais controlada (Tunç e Duman, 2011).

Os resultados sugeriram então que a incorporação de óleos essenciais nos biofilmes de quitosano aumenta a atividade antioxidante dos biofilmes. As interações entre o quitosano e os compostos fenólicos dos óleos pode desempenhar um papel fundamental nestas modificações das propriedades do filme, mas é necessário também uma análise mais aprofundada em FTIR para investigar melhor a interação entre os dois (Siripatrawan e Harte, 2010). À luz das diferenças entre o grande número de sistemas de testes disponíveis, os resultados de um único teste podem dar apenas uma sugestão redutora das propriedades antioxidantes dos óleos essenciais em relação às matrizes alimentares e por isso devem ser interpretados com alguma cautela. Além disso, a complexidade química dos óleos essenciais, muitas vezes uma mistura de dezenas de compostos com diferentes grupos funcionais, polaridade e comportamento químico, pode levar a resultados dispersos, dependendo do teste empregue (Prakash, 2010). O meio simulante utilizado também poderá alterar os resultados, por exemplo Prakash (2010) obteve melhores resultados de inibição para a raiz do gengibre com metanol do que em etanol. Por outro lado, não haver tanta atividade antioxidante no meio simulante pode também significar que os óleos ficaram presos na matriz polimérica e não se conseguiram libertar para o meio. Ao ficarem retidos na matriz podem também ter atividade antioxidante pois podem inibir a transferência de eletrões e de O₂ do ambiente externo para o alimento.

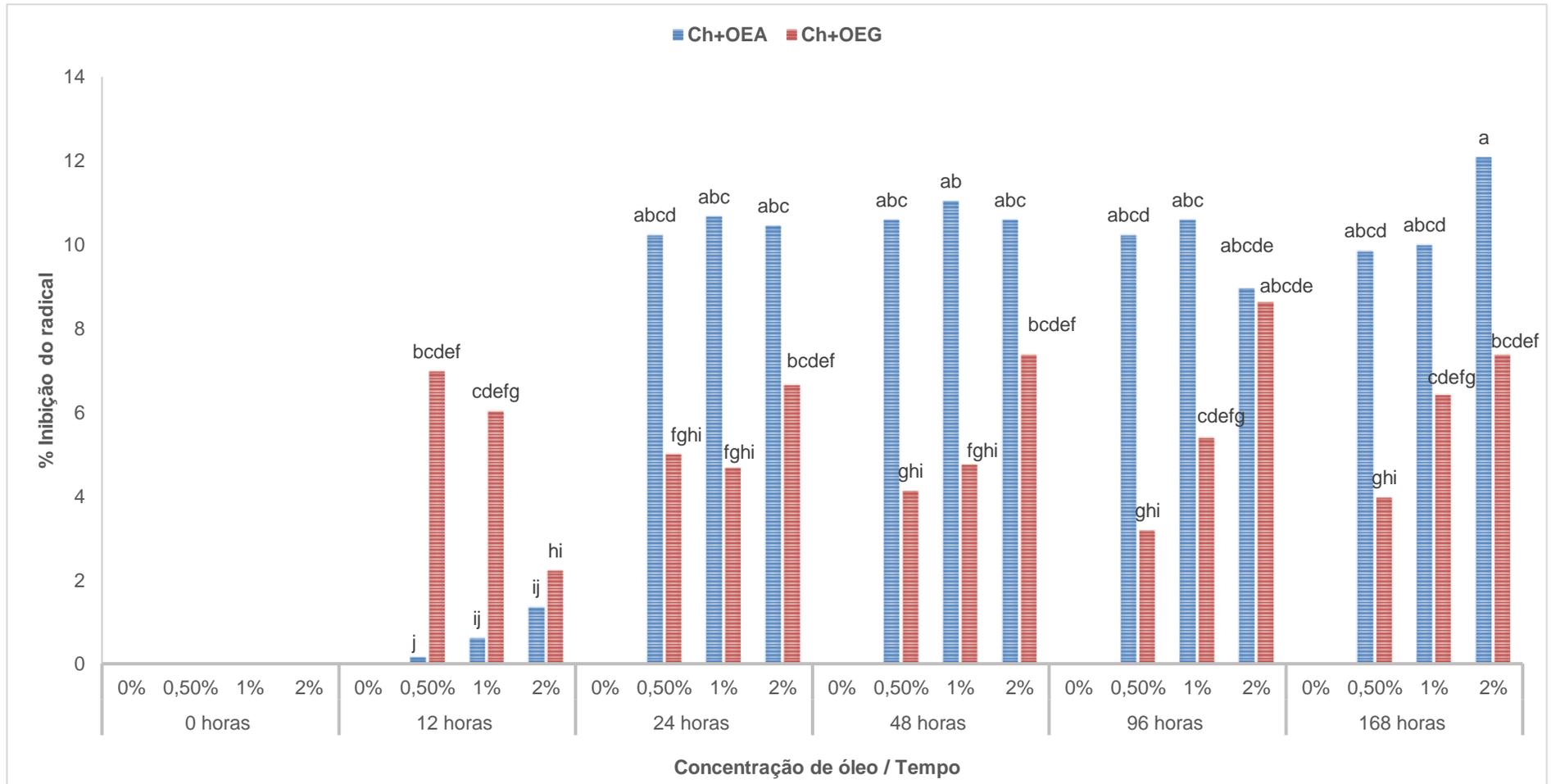


Fig. 3.19 %Inibição do radical DPPH para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) sem MMTCa , ao longo do tempo

a-h: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre.; MMTCa = Montmorilonita Cálcica

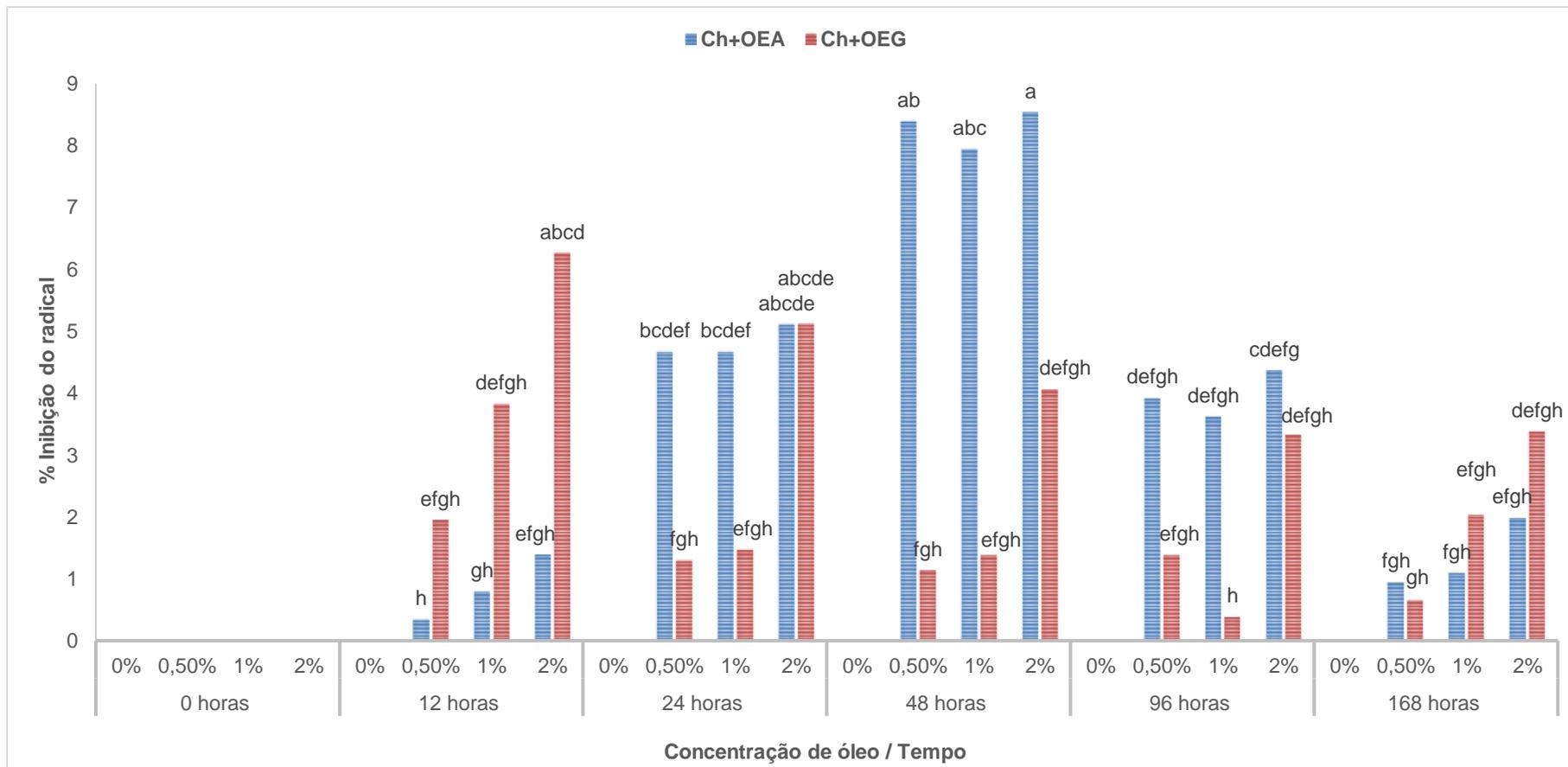


Fig. 3.20 %Inibição do radical DPPH para os biofilmes com OE (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo

a-j: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre.; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA CARNE

Cada vez mais os consumidores exigem que a carne e os produtos à base de carne sejam tenros, nutritivos, saudáveis e seguros (Scollan et al., 2006). A qualidade da carne e as suas propriedades de segurança são altamente dependentes dos materiais e tecnologias das embalagens onde estão aplicados (Brody et al., 2001). Os motivos fundamentais para a existência de embalagens em produtos de carne frescos e processados são o de prevenir a contaminação microbológica, atrasar a deterioração, permitir alguma atividade enzimática para melhorar a ternura, reduzir a perda de peso e manter a cor e o aroma (Brody et al., 2001). Com base nisso, as práticas atuais de embalamento de carne variam desde as embalagens de sobreposição para armazenamento de refrigeração a curto prazo, para sistemas de embalagem a vácuo ou com atmosfera modificada para armazenamento refrigerado a longo prazo. Cada tipo de embalagem possui diferentes atributos consoante a sua aplicação (Fang et al., 2017).

3.2.1 COR

De todos os atributos de qualidade, a aparência é a mais crítica para a seleção de muitos produtos alimentares, incluído produtos provenientes de aves de capoeira, fazendo com que os consumidores geralmente selecionam ou rejeitam um produto com base apenas na sua aparência (Fletcher, 2002). A aparência também é crítica na avaliação final do produto, uma vez que pode afetar as outras propriedades sensoriais (Fletcher, 2002). Um dos principais componentes contribuintes da aparência é a cor, no qual esta é conhecida por ser um critério de seleção importante para carnes de aves frescas tanto na seleção como no produto final (Fletcher, 2002).

A cor vermelha/rosa brilhante da carne é a mais desejada por parte do consumidor pois indica a frescura da mesma, sendo que esta cor brilhante e apelativa da carne resulta da oximioglobina (MbO_2), uma mioglobina oxigenada que contém iões de ferro. A mioglobina rapidamente é convertida em oximioglobina (MbO_2) na presença de oxigénio (Hunt et al., 2012). Este fenómeno é importante para a indústria da carne pois esta fica com uma coloração mais avermelhada e brilhante. No entanto, a oximioglobina não é muito estável e pode ser rapidamente oxidada em metamioglobina (MetMb) (Hunt et al., 2012). Esta forma de mioglobina faz com que a cor da carne fique mais acastanhada, diminuindo o seu valor de mercado (Hunt et al., 2012). A cor também é afetada por muitos outros fatores, tais como o tipo de espécie do animal, a genética e dieta, mudanças pós-morte nos músculos (especialmente a dinâmica do pH e declínio da temperatura da carne), efeitos inter e intramusculares, temperaturas e tempo de armazenamento pós-morte, intervenções antimicrobianas, embalamento e variáveis de exibição e iluminação (Cruz et al., 2017). De modo a ser mais fácil a interpretação dos resultados, para cada parâmetro da cor duas figuras distintas são apresentadas, diferindo apenas na incorporação de nanopartículas de MMTCa.

Não foram detetadas mudanças significativas ($p > 0,05$) no parâmetro da luminosidade entre todas as amostras em estudo para todos os tempos, mostrando que no geral este parâmetro se manteve constante ao longo do tempo (Fig. 3.21-3.22). No entanto verificou-se um valor máximo de luminosidade para a amostra de carne não embalada em comparação com as restantes ao fim dos quinze dias de armazenamento. Darmadji e Izumimoto (1994) obtiveram resultados semelhantes quando aplicaram quitosano em carne, explicando que tal efeito poderia ser causado devido à capacidade de ligação do quitosano à água, que vai reprimir a perda de gotejamento da carne, resultando numa diminuição da luminosidade.

O ângulo de Hue (Fig. 3.23-3.24) expressa a tonalidade que a carne apresentou, enquanto que a diferença de cor total é a medida da mudança da cor perante a cor da amostra original no tempo zero. A carne não embalada teve uma mudança significativa ($p < 0,05$) do ângulo de Hue do primeiro ao último dia, onde foi registado o máximo valor. Os valores indicaram que a carne teve uma mudança de cor do vermelho para o acastanhado. Todas as restantes amostras não tiveram variações significativas ($p > 0,05$) deste parâmetro da cor, constatando-se que a carne embalada em geral conseguiu preservar a sua tonalidade avermelhada ao longo de todo o tempo de armazenamento.

A amostra de carne não embalada foi a que mostrou ter uma mudança de cor maior ao longo dos quinze dias ($p < 0,05$) (Fig 3.25-3.26). As amostras de controlo e Ch+OEA também sofreram uma variação significativa ($p < 0,05$), ao longo do tempo, mas inferior à apresentada pela carne sem filme. Apesar de um ligeiro aumento ao longo do tempo, as amostras de Ch+OEG não mostraram mudanças significativas ($p > 0,05$) na cor da carne. As amostras de carne embalada com os biofilmes de quitosano demonstraram ser eficazes na preservação da cor, não sendo detetáveis quaisquer diferenças ($p > 0,05$) entre o tipo de óleo essencial, concentração. A incorporação de MMTCa nos biofilmes de quitosano fez com que os valores da variação de cor diminuíssem nas amostras de carne sendo que em comparação com os biofilmes sem MMTCa esta diminuição não foi significativa ($p > 0,05$).

O acumular de metamioglobina foi o principal fator que resultou numa descoloração gradual (do vermelho para o castanho) na amostra de carne sem biofilme. Uma retenção da cor pode ser conseguida diminuindo a concentração de metamioglobina e aumentando os valores de oximioglobina durante o armazenamento (Qin et al, 2013). O mecanismo de retenção da cor por parte do quitosano ainda não foi totalmente compreendido, mas pode estar relacionado com a capacidade de quelação do quitosano. O ferro (Fe^{3+}), que é um componente da metamioglobina e outros componentes da carne, pode ser absorvido pela quitosano a uma taxa de 17,6 mg por grama em 30 minutos segundo Knorr (1991). O ferro é conhecido por promover a oxidação através da geração de radicais livres. O ferro livre do tecido da carne pode ser absorvido pelo quitosano e essas interações entre o quitosano e o ferro podem estabilizar ao longo do tempo a cor da superfície da carne, mantendo a boa aparência da mesma (Park, Marsh e Dawson, 2010). Por outro lado, o quitosano e os óleos essenciais também exercem uma atividade antioxidante sobre a carne (Qin et al, 2013).

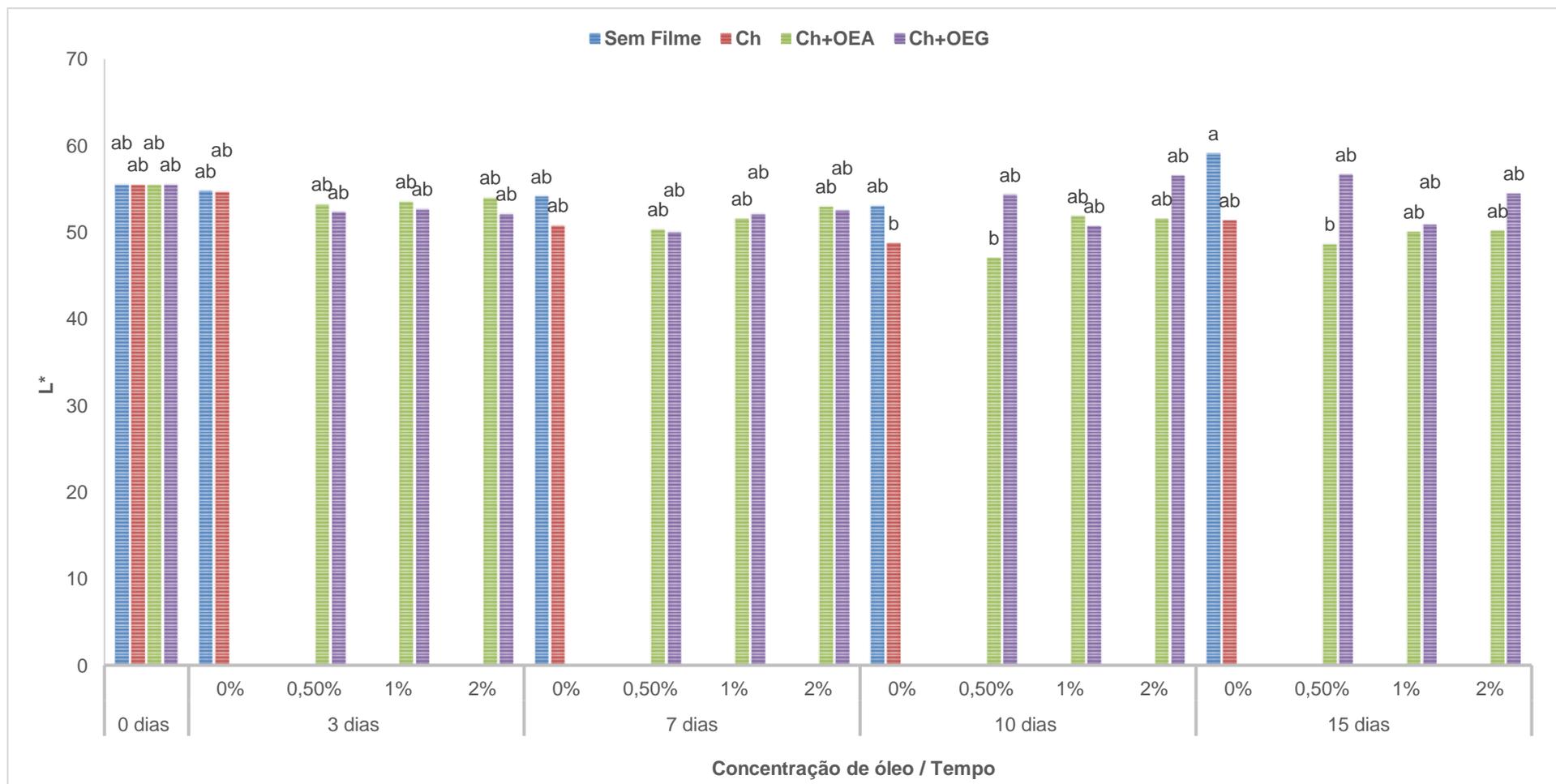


Fig. 3.21 Valores médios de L* da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo

a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$) Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

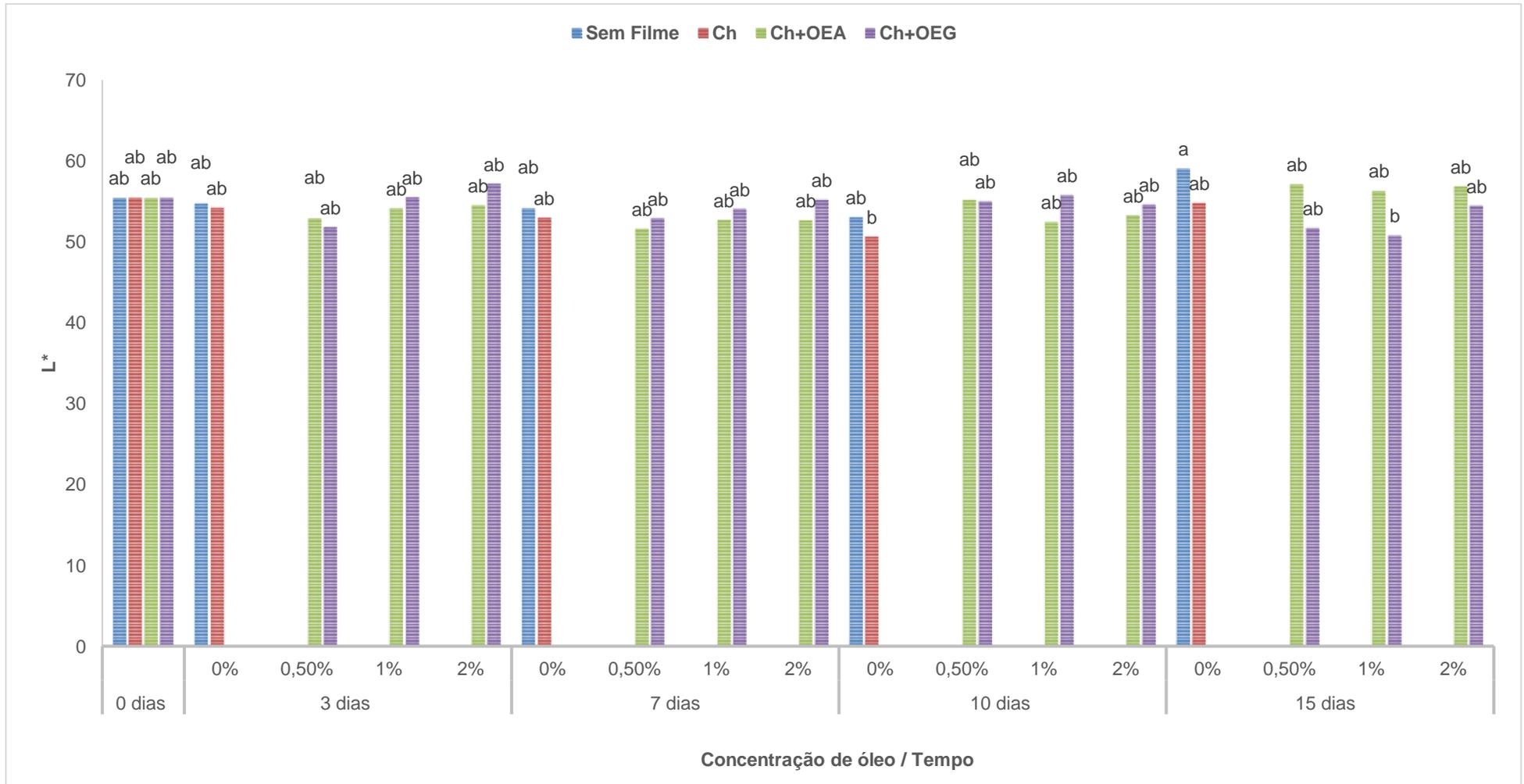


Fig. 3.22 Valores médios de L* da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo
a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações (p<0,05). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

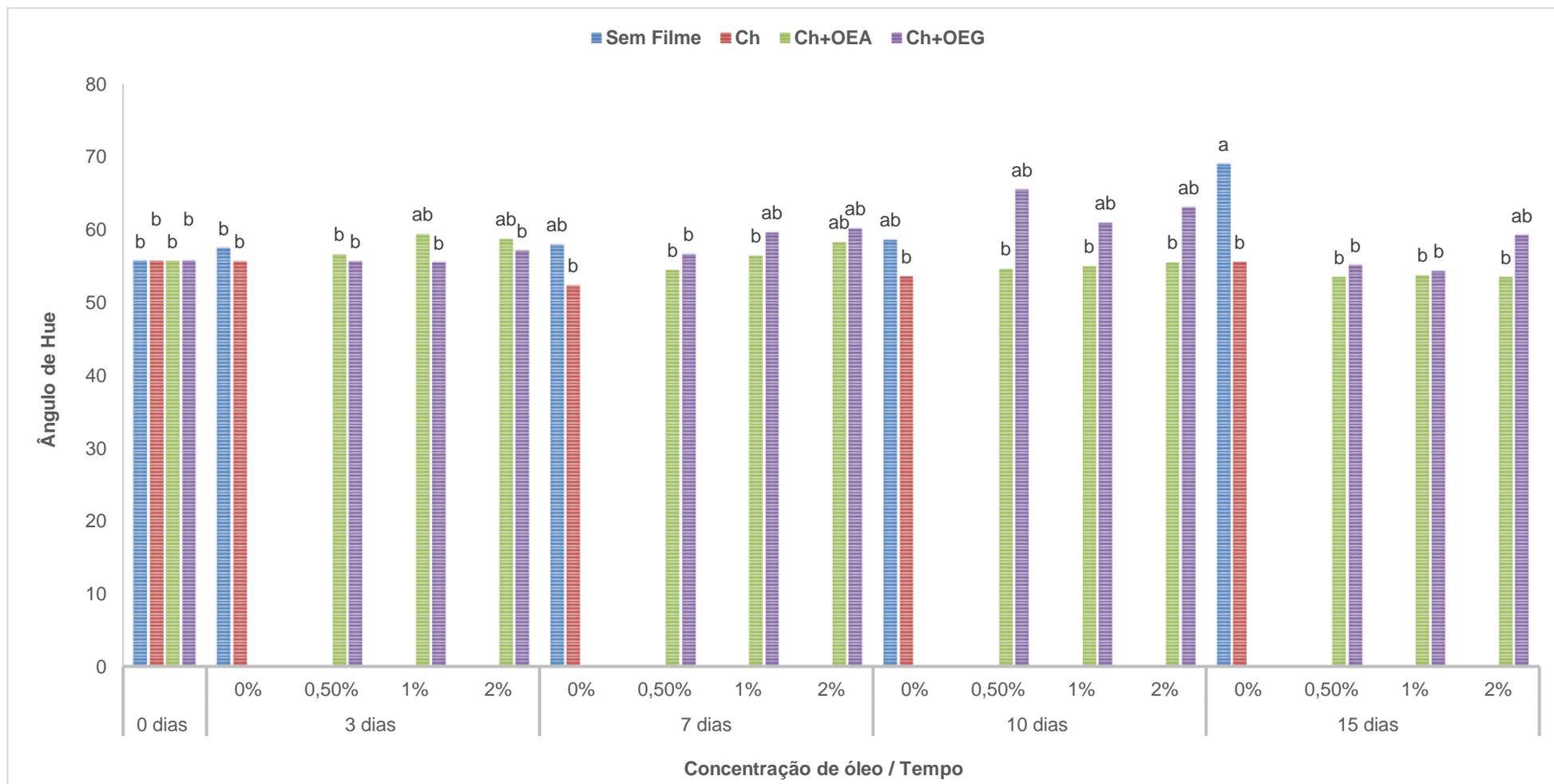


Fig. 3.23 Valores médios do ângulo de Hue da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, longo do tempo a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

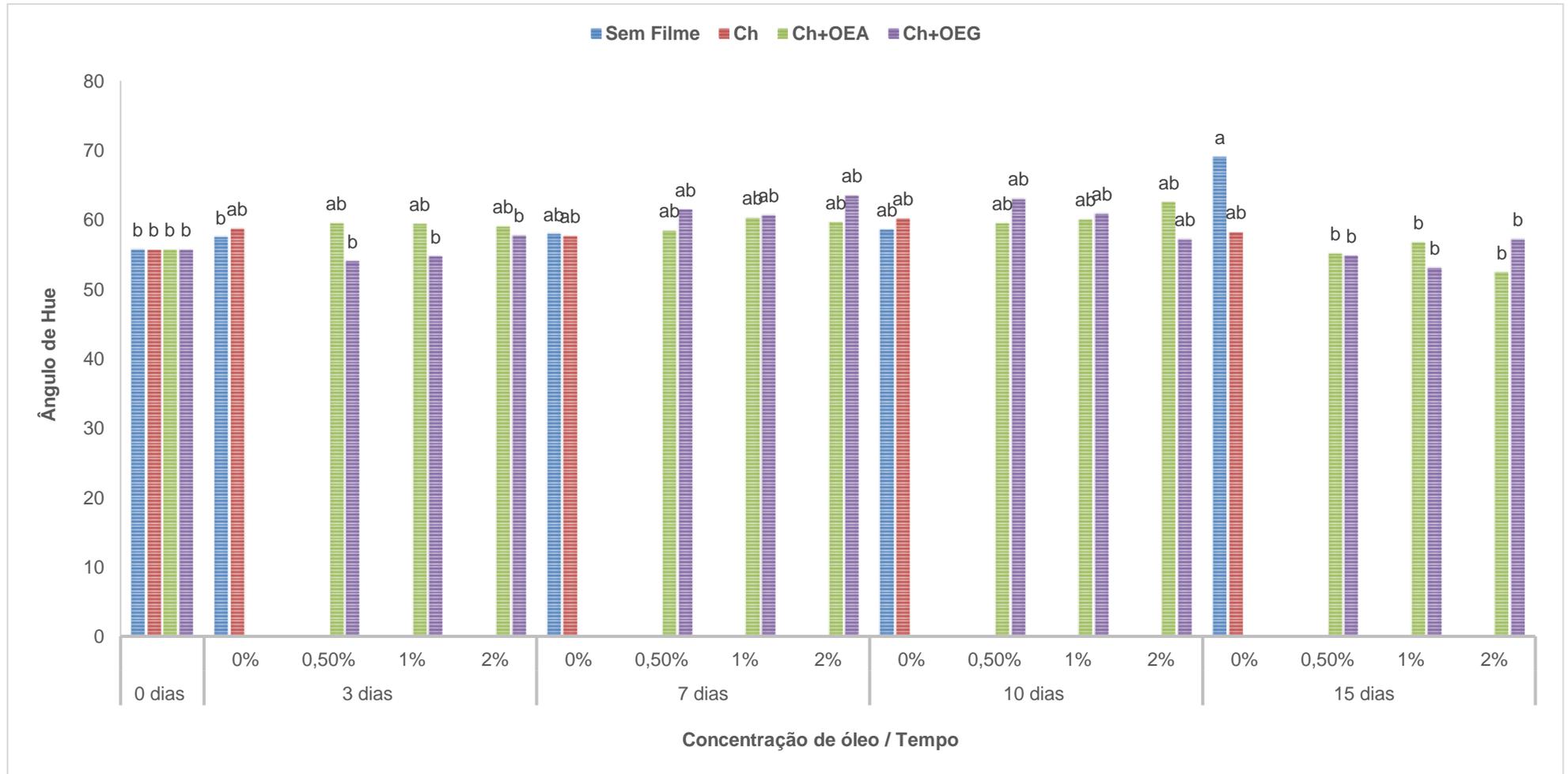


Fig. 3.24 Valores médios do ângulo de Hue da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

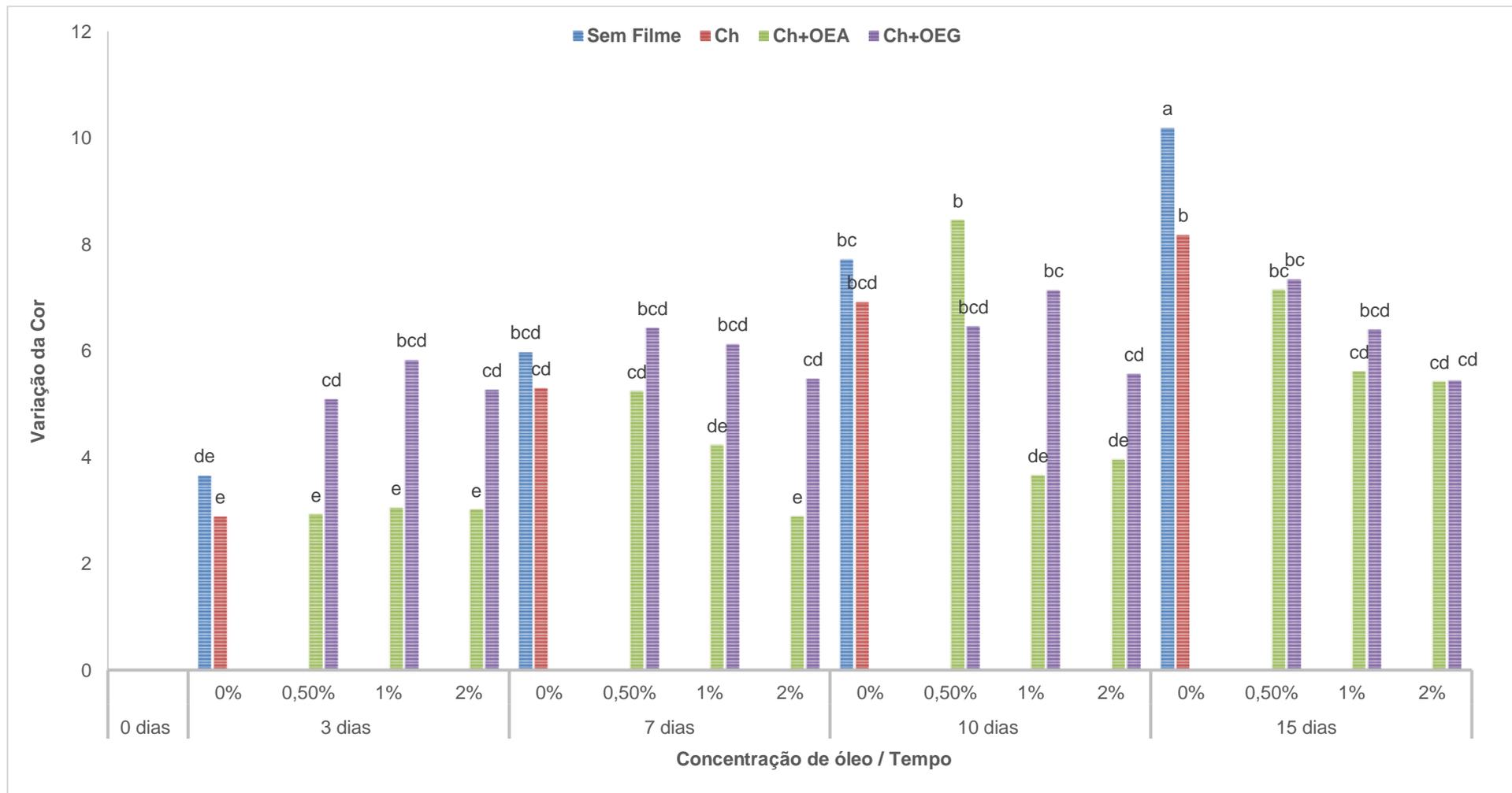


Fig. 3.25 Valores médios da variação da cor da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, longo do tempo a-d: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

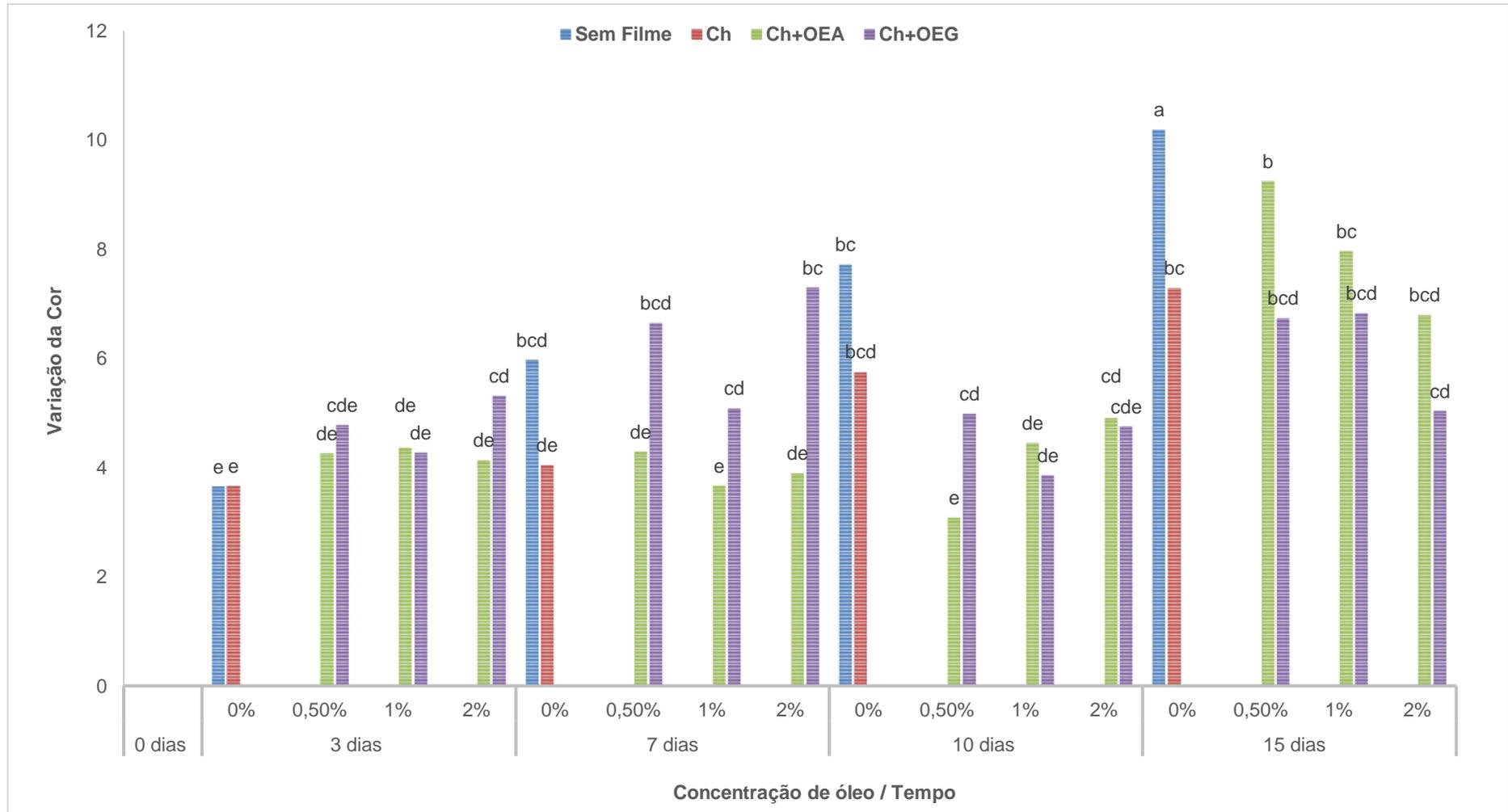


Fig. 3.26 Valores médios da variação da cor da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, longo do tempo a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.2.2 PH E ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL

Aumentar a acidez dos alimentos, tanto pela fermentação quanto pela adição de ácidos fracos, tem sido usado como método de preservação desde a antiguidade. Reduzir o pH de um alimento aumenta a eficácia de um ácido orgânico como conservante (Barbut, 2009). O tipo de ácido orgânico empregue pode influenciar dramaticamente a qualidade e a segurança da comida microbiológica. No seu estado natural, a maioria dos alimentos, como carne, peixe e vegetais, são ligeiramente ácidas, enquanto a maioria dos frutos é moderadamente ácida (USFDA, 2001).

O pH no músculo/carne é uma medida da sua acidez. No músculo vivo, estima-se que o pH ronde 7.2 (Barbut, 2009). Quando o animal é abatido, e o músculo é convertido em carne, o glicogénio é convertido em ácido láctico. Desta forma, o pH baixa, podendo variar de 5.2 a 7. Os produtos de maior qualidade variam normalmente entre valores de pH de 5.7 a 6 (menor variação de pH) (Barbut, 2009). O pH tem sido associado a vários atributos de qualidade da carne, incluindo a cor, ternura, capacidade de retenção de água, suculência e estabilidade microbiana, sendo que para pH mais elevados estão associados a uma carne mais escura, enquanto os valores mais baixos de pH do músculo estão associados a uma tonalidade mais leve (Fletcher, 2002). Enquanto uma é frequentemente caracterizada por ser escura, firme e seca (tipo DFD, do inglês dark, firm and dry), a outra é caracterizada por ser mais pálida, macia e exsudativa (tipo PSE, do inglês pale, soft and exudative) (Fletcher, 2002). O pH é um importante factor físico-químico que condiciona as reacções enzimáticas, a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos nos alimentos, constituindo uma potencial barreira que interessa conhecer e controlar ao longo de todo o processo produtivo, a fim de garantir uma maior segurança e a conservação dos géneros alimentícios até o seu consumo final (Mendes, 2013). Para melhor visualização dos resultados, duas figuras distintas foram feitas, a Fig. 3.27 e 3.28. A carne apresentou um pH inicial de 6,27. Ao longo do tempo a carne que não esteve protegida foi-se deteriorando e o seu pH foi subindo ($p > 0,05$), sendo que no dia 15 registou um valor máximo de 6,76. Um pH elevado favorece a proliferação de bactérias, enquanto que um pH baixo as paralisa, chegando, em alguns casos, a inibi-las completamente (Mendes, 2013). A carne embalada com biofilmes de controlo mostraram ter um ligeiro decréscimo ($p > 0,05$) em relação às amostras não embaladas. Nos primeiros 3 dias houve uma diminuição mais acentuada ($p < 0,05$) do pH da carne embalada com biofilmes de quitosano mais OE, provavelmente devido à presença do filme de quitosano que é ácido, mas a partir desse dia houve um ligeiro aumento sem diferenças significativas até ao último dia ($p > 0,05$). Georgantelis et al., (2007a) obteve resultados semelhantes de pH no seu estudo de salsichas de porco cozinhadas embaladas com filmes de quitosano e óleo essencial de cravo da Índia. Este estudo afirma que o aumento do pH da carne após o decréscimo inicial dos primeiros 5 dias se deve ao aumento de populações bacterianas, como as *Enterobacteriaceae* e as *Pseudomonas*, e também de fungos e bolores, que vão causar uma degradação das proteínas

e dos amino ácidos, resultando na formação de ião amónio e conseqüentemente num aumento do pH. O facto dos biofilmes de quitosano incorporados com óleos essenciais ter mostrado um aumento de pH ($p > 0,05$) muito inferior desde o dia 3 ao dia 15 em comparação com a carne sem filme mostra que estes são eficazes na preservação da carne de aves, podendo indicar que o crescimento microbiológico nas amostras protegidas foi inferior. Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o tipo de óleo utilizado ou a sua concentração. Mesmo assim verificou-se um pH mais baixo para o óleo de gengibre. Com a incorporação de MMTCa na matriz registou-se uma redução não significativa ($p > 0,05$) no pH da carne, em todos os tempos, em comparação com os biofilmes sem MMTCa, sendo então esta diferença de pH maior em comparação com as amostras sem filme.

A acidez titulável mede a concentração total de ácido num alimento e é um melhor indicador da estabilidade microbiológica de certos alimentos, do que o pH (USFDA, 2001). A acidez titulável é determinada neutralizando o ácido presente numa quantidade conhecida (peso ou volume) de amostra do alimento usando uma base padrão. O ponto final para a titulação geralmente é quando se atinge um pH alvo ou existe a mudança de cor de um corante sensível ao pH, tipicamente fenolftaleína. O volume de titulante utilizado, juntamente com a normalidade da base e o volume (ou peso) da amostra, é utilizado para calcular a acidez titulável, expressa em termos de ácido orgânico predominante (Sadler e Murphy, 2010). A acidez titulável é uma medida particularmente útil para alimentos altamente perecíveis ou altamente ácidos. Ácidos fracos (como ácidos orgânicos) são geralmente não dissociados e, portanto, não contribuem diretamente para o pH (USFDA, 2001). Os ácidos alimentares são geralmente ácidos orgânicos, sendo os ácidos cítrico, málico, láctico, tartárico e acético os mais comuns. No entanto, ácidos inorgânicos como o fosfórico e o carbónico têm um papel predominante na acidulação alimentar (Sadler e Murphy, 2010). A acidez é desejável nos alimentos, pois não permitem o crescimento de microrganismos indesejáveis, atuando também na cor, sabor e na qualidade dos alimentos (Bolzan e Silva, 2012). A acidez da carne sem filme teve um decréscimo acentuado ($p < 0,05$) desde o dia zero (1,86 g de AO por 100 g de carne) até ao dia quinze (0,61 g de AO por 100 g de carne), o que vai de encontro com os resultados obtidos do aumento do pH (Fig 3.29-3.30). Todas as amostras de carne protegida com biofilmes teve um decréscimo na acidez do entre o tempo zero e o terceiro dia. Este decréscimo, mas não significativo ($p > 0,05$) é mais acentuado nas amostras de carne embaladas com biofilme de Ch+MMTCa. Não foram detectadas ($p > 0,05$) diferenças entre o tipo de óleo utilizado, sendo que a concentração do óleo também não alterou os resultados ($p > 0,05$). Mesmo assim parece que nos filmes sem MMTCa os biofilmes Ch+OEA mantêm mais a acidez que os biofilmes Ch+OEG, sendo que quando se adiciona MMTCa o comportamento inverte-se. A redução dos valores da acidez pode ser derivado da degradação da carne através da contaminação microbiológica, no qual os microrganismos ao degradarem as proteínas, produzem aminas e amoníaco, neutralizando os ácidos (Heijnen et al., 2005).

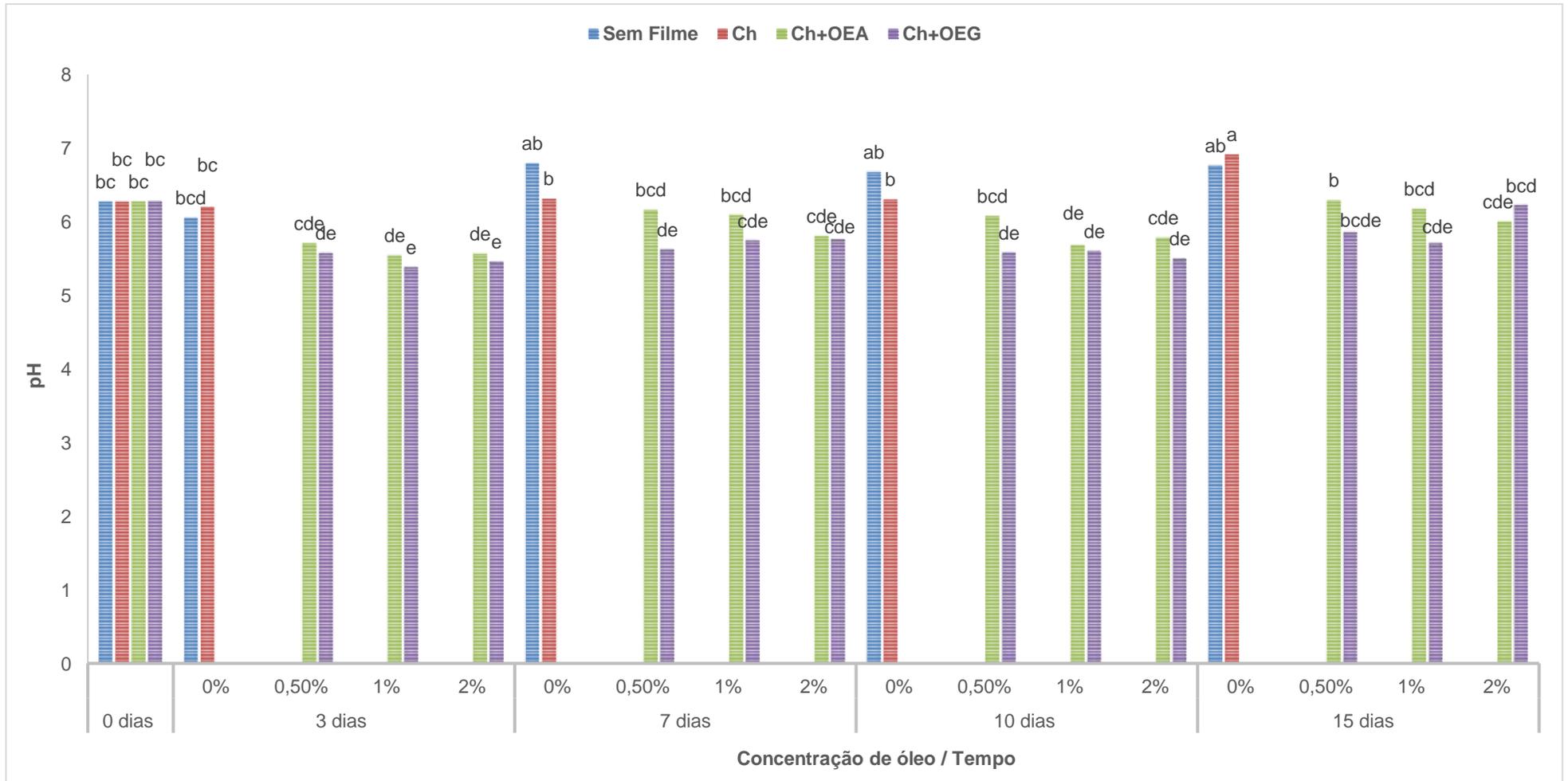


Fig. 3.27 Valores médios do pH da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo

a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

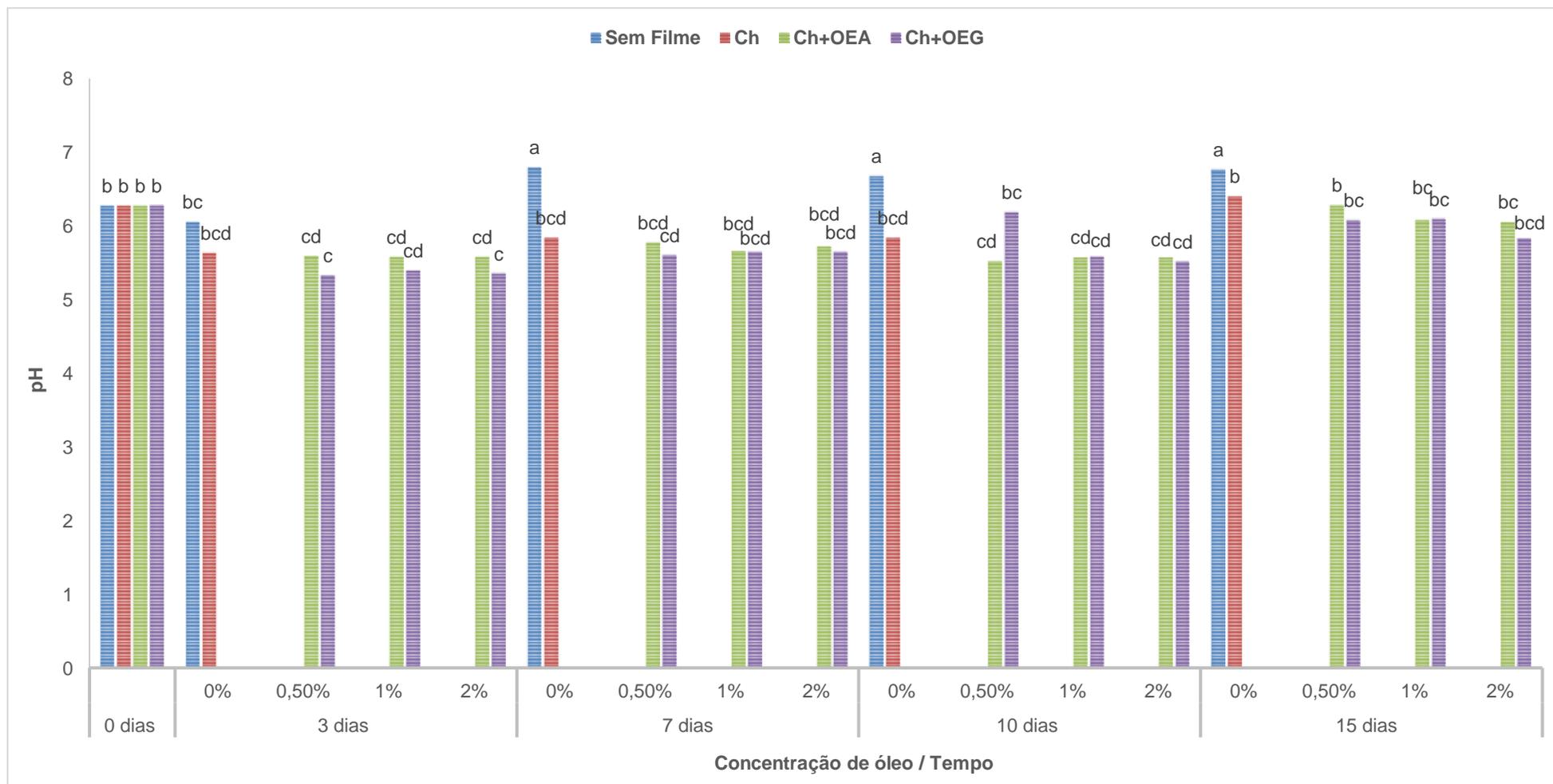


Fig. 3.28 Valores médios do pH da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo

a-d: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

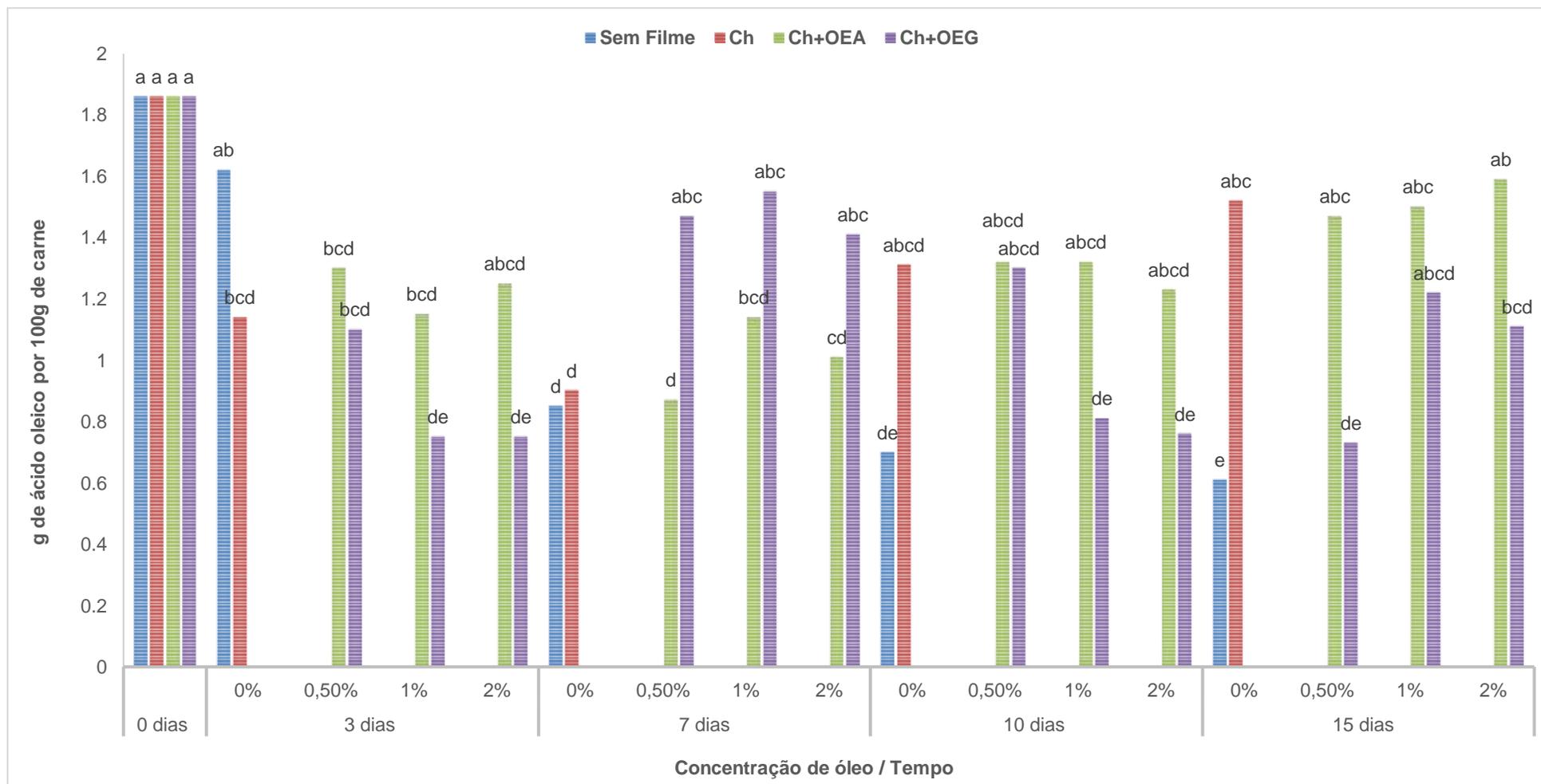


Fig. 3.29 Valores médios da acidez total titulável da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

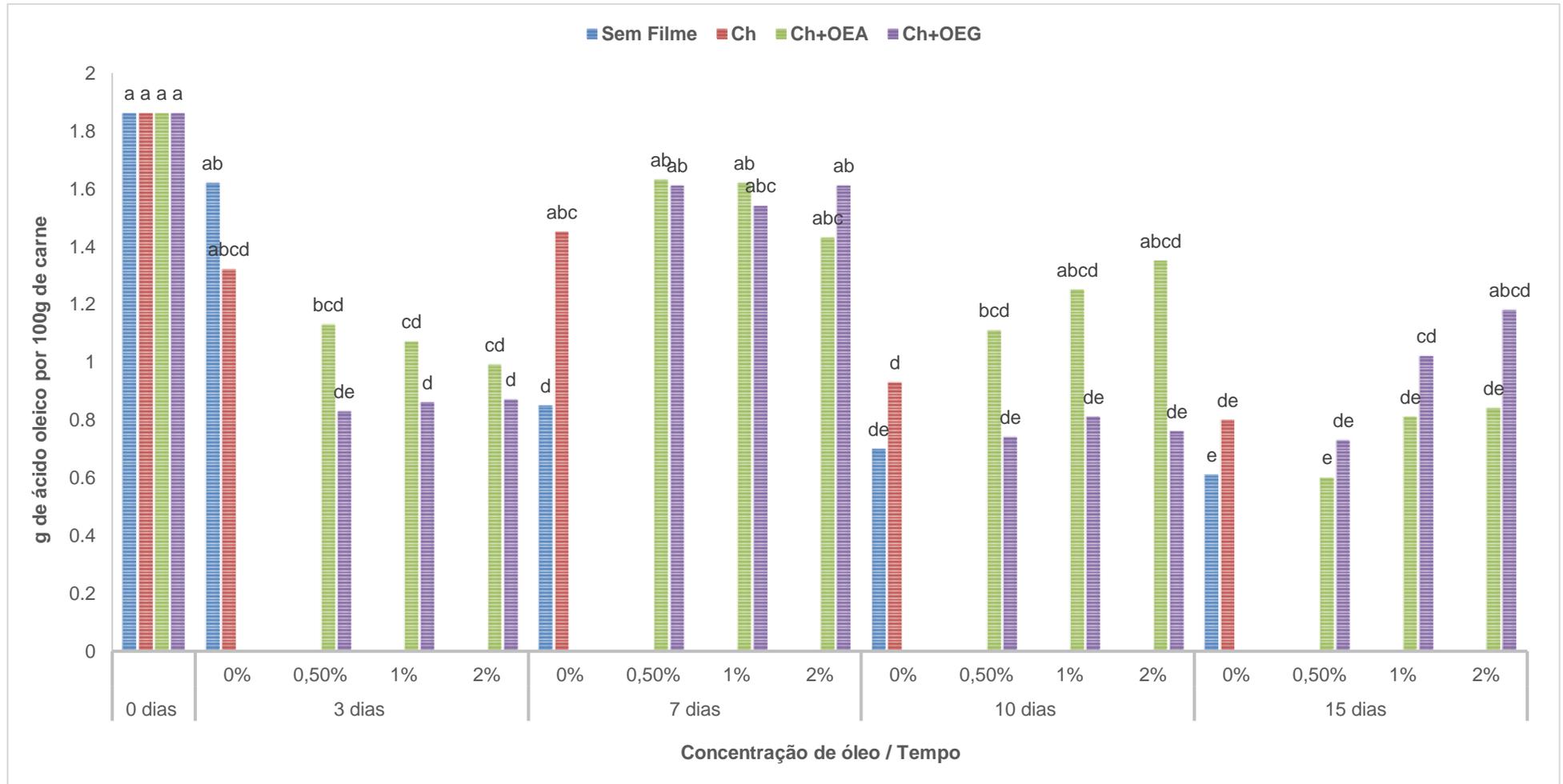


Fig. 3.30 Valores médios da acidez total titulável da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa= Montmorilonita Cálcica.

3.2.3 HUMIDADE E CINZAS

A humidade influencia fortemente a qualidade sensorial e a estabilidade dos produtos alimentares armazenados, no qual muitas das reações químicas e enzimáticas deteriorativas, como a oxidação lipídica, reação de Maillard e escurecimento enzimático, estão altamente dependentes do conteúdo de água presente no alimento (Kester e Fennema, 1989). Excessivas reações destas promovem mudanças deteriorativas no aroma, na cor, na textura e no valor nutricional dos produtos alimentícios (Kester e Fennema, 1989).

Os microrganismos precisam de água em uma forma disponível para crescer em produtos alimentares, para tal o controlo do teor de humidade nos alimentos é uma das mais velhas estratégias de preservação explorada (Pandey et al., 2014). Os microbiologistas alimentares geralmente descrevem os requisitos de água dos microrganismos em termos da atividade da água (a_w) dos alimentos ou do meio ambiente, sendo a atividade da água definida como a relação entre a pressão de vapor de água do substrato alimentar e a pressão de vapor de água pura à mesma temperatura (USFDA, 2001).

No tempo zero a carne apresentou um teor de humidade de 74,83% (segundo dados do Portfir (2017a) a média é de 73,8% no peito de frango cru sem pele fresco). Ao fim de três dias a carne não protegida mostrou um valor de humidade de 76,23% enquanto que ao fim de quinze dias esse valor manteve-se praticamente inalterado, 76,31%. Os resultados mostraram que a amostra de carne não protegida foi a que obteve índices de humidade, ao fim dos quinze dias de armazenamento, superior aos do tempo zero. Em comparação, a carne que esteve envolvida nos biofilmes apresentou ao fim dos quinze dias valores de humidade inferiores aos iniciais, sendo que os outros fatores (tipo de óleo, concentração e incorporação de MMTCa) não tiveram expressão significativa ($p > 0,05$) para que este decréscimo ocorresse. García-Esteban et al., (2004) tiveram reduções de 3% (semelhantes aos nossos resultados) na humidade em fiambre curado tanto para embalagens a vácuo como em embalagens com atmosfera modificada com N_2 , ao fim de 3 semanas. A ligeira perda de humidade da carne quando está em contacto com os biofilmes pode ser devido ao facto do quitosano ter uma boa capacidade de adsorção. Isto deve-se pois os polissacáridos têm uma alta hidrofiliçidade (Crini, 2005). Zivanovic et al., (2005) nos seus resultados também verificaram que os filmes de quitosano com oregão absorviam água da carne bolonhesa, aumentando a espessura dos mesmos.

As cinzas referem-se ao resíduo inorgânico remanescente após a ignição ou a oxidação completa da matéria orgânica num género alimentício. Os produtos com alto teor de gordura, como as carnes, podem precisar ser secos e extraídos com gordura antes do incinerar (Nielsen, 2010).

O conteúdo de cinzas representa o teor mineral total nos alimentos. Determinar o conteúdo de cinzas pode ser importante por vários motivos, sendo o primeiro passo na preparação de uma amostra de alimentos para análise elementar específica. Como certos alimentos são elevados em minerais particulares, o conteúdo de cinzas torna-se importante (Nielsen, 2010). Neste

trabalho analisou-se as cinzas para ver se o MMTCa poderia migrar para a carne aumentando assim o teor em cinzas.

Neste trabalho, o teor de cinzas foi determinado nos dias zero, sete e quinze após secagem prévia das amostras. No tempo zero o valor de teor de cinzas foi de 1,22%. Segundo Portfit (2017b) a média do teor de cinzas para a amostra de peito de frango sem pele cru fresco é de 0,8%. Os resultados desta experiência foram ligeiramente superiores. As amostras não protegidas foram as que apresentaram maior teor de cinzas tanto no sétimo como no décimo quinto dia, tendo havido um aumento não significativo em relação ao tempo zero ($p > 0,05$). As amostras revestidas com Ch, Ch+OE e Ch+OE+MMTCa apresentaram uma diminuição, não significativa ($p > 0,05$), no teor de cinzas sendo o controlo Ch sem MMTCa o biofilme que apresentou os valores mais baixos. Tal como vimos anteriormente o quitosano absorve água da carne (Zivanovic et al., 2005) e por conseguinte poderá absorver minerais que estivessem contidos nela, essa poderá ser uma explicação pelo qual o teor de cinzas terá diminuído. O facto do MMTCa ser uma argila mineral poderá ter transmitido minerais para a carne o que poderá ter feito com que a amostra de carne revestida com o biofilme controlo Ch+MMTCa tivesse valores superiores (não significativos, $p > 0,05$) à amostra de carne revestida com controlo Ch sem MMTCa. Os óleos essenciais, tal como a sua concentração não tiveram influência neste parâmetro ($p > 0,05$). O factor tempo também não influenciou os resultados ($p > 0,05$), tendo estes sofrido muito poucas alterações entre o sétimo e o décimo quinto dia. Seria importante determinar na carne se houve a migração de elementos do biofilme (e.g Mg). Sugere-se fazer esta determinação em trabalhos futuros.

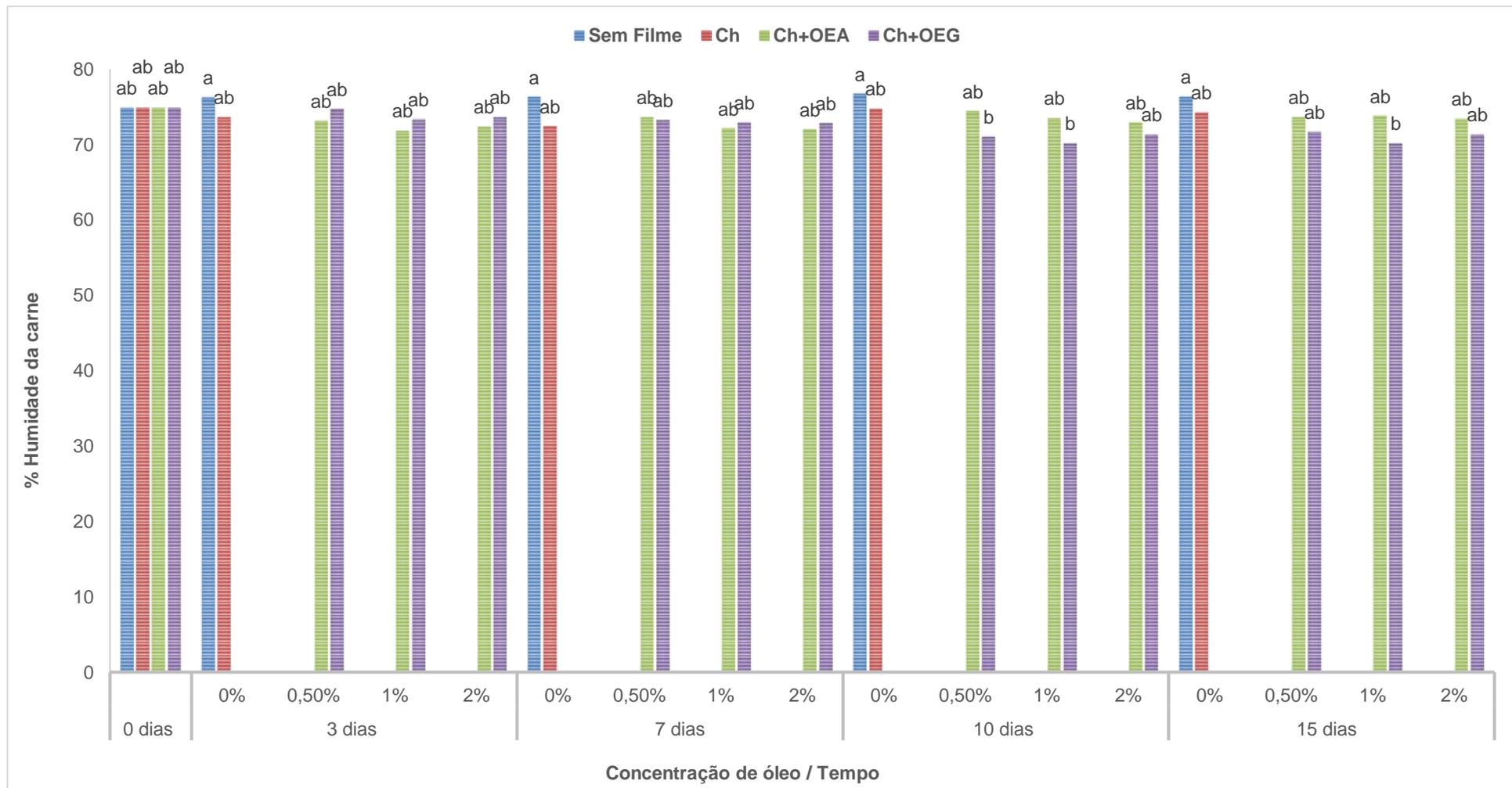


Fig. 3.31 Valores médios da percentagem de humidade da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

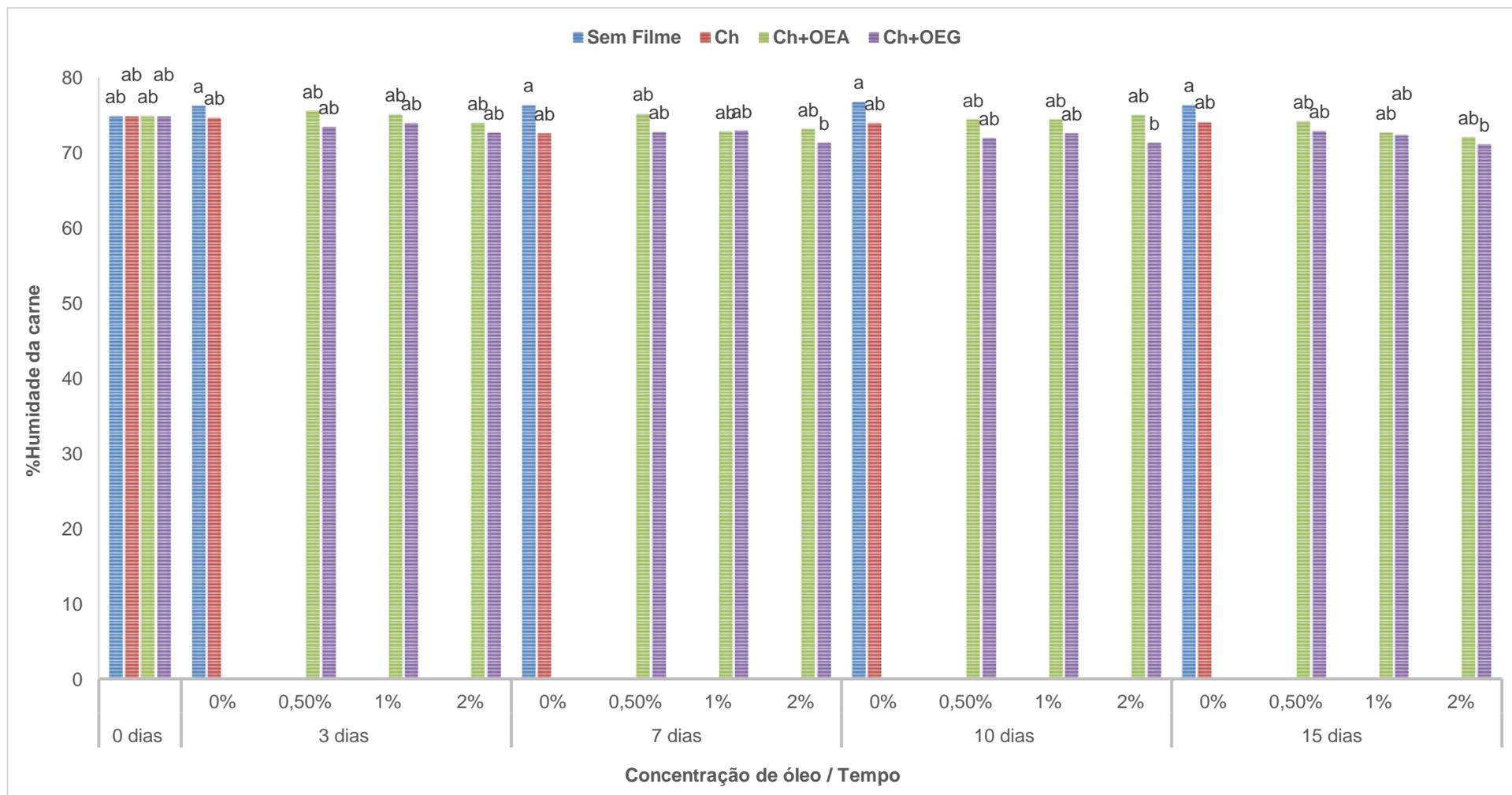


Fig. 3.32 Valores médios da percentagem de humidade da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

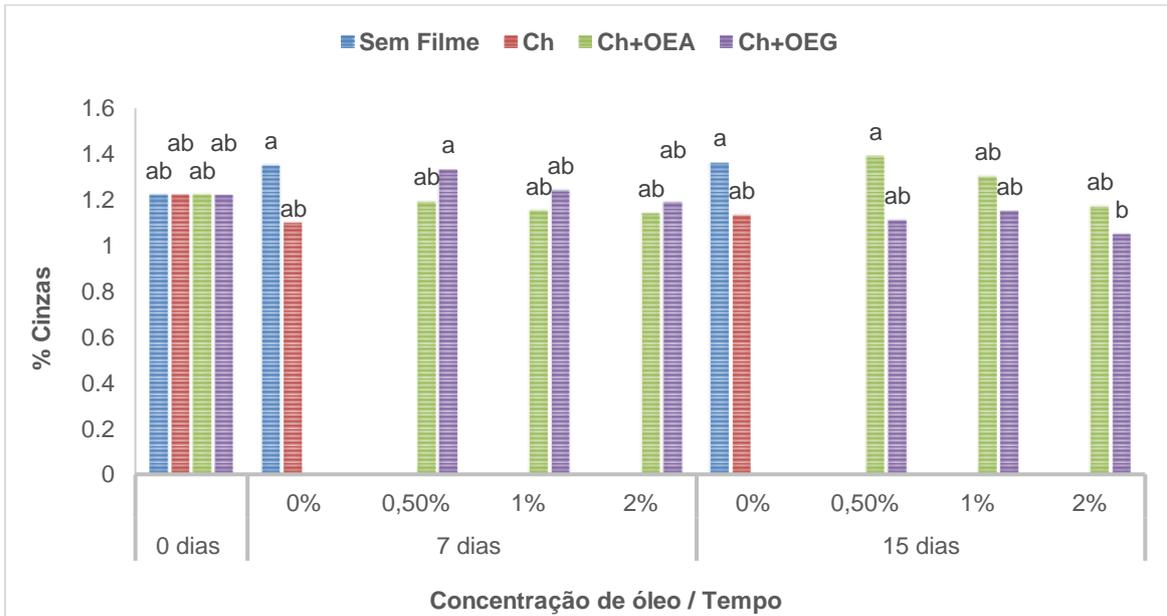


Fig. 3.33 Valores médios da percentagem de cinzas da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) sem MMTCa, ao longo do tempo

a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

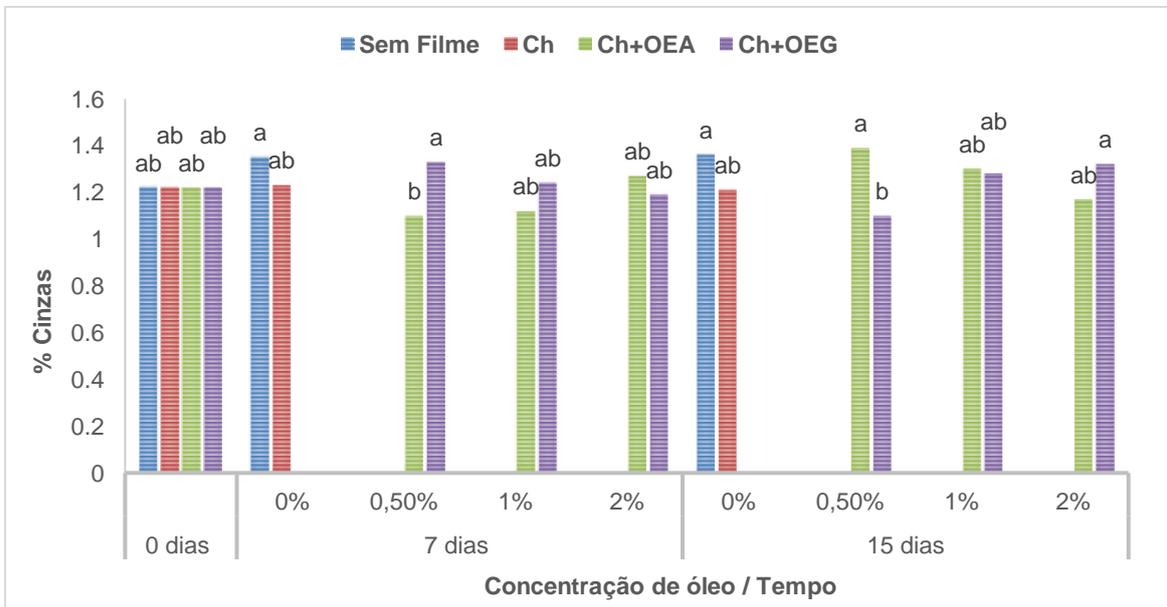


Fig. 3.34 Valores médios da percentagem de cinzas da carne, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) com MMTCa, ao longo do tempo

a-b: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.2.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA (ENSAIOS TBARS)

Os ensaios de TBARS medem o malonaldeído presente na amostra, bem como o malonaldeído gerado a partir de hidroperóxidos de lípidos pelas condições hidrolíticas da reação (Trevisan et al., 2001). Este é um indicador típico da rancidez lipídica em produtos à base de carne e fornece informações úteis sobre a oxidação lipídica. Os produtos com valores de TBARS inferiores a 1,00 mg/kg são considerados frescos e aceitáveis em termos de rancidez lipídica (Tornuk et al., 2015).

Ao longo dos quinze dias os valores de concentração de MDA aumentaram significativamente ($p < 0,05$) para as amostras que não foram revestidas, tal como era esperado, mostrando que houve uma deterioração da carne. No dia zero teve um valor de 0,025 mg/kg, e ao fim dos quinze dias de armazenamento apresentou um valor de 0,033 mg/kg. Os biofilmes de controlo mantiveram os valores de MDA constantes ao longo do tempo, tendo estes resultados sido inferiores ($p > 0,05$) aos das amostras não revestidas no último dia. As amostras revestidas com biofilmes de quitosano incorporados com OE também mantiveram os valores de MDA ao longo do tempo, tendo-se verificado que o OEG em geral teve valores inferiores aos apresentados pelo OEA, mostrando ter uma ação mais eficaz na prevenção da oxidação lipídica. Nas análises de DPPH do meio simulante no caso do OEG tivemos uma menor atividade antioxidante, ou seja os compostos que estão no OEG vão inibindo a oxidação da carne mesmo estando mais presos dentro dos biofilmes. A ação de embalagens ativas não resulta só da migração de compostos com atividade antioxidante mas também evitam que os radicais oxidem a carne e isso pode acontecer mesmo estando presos no filme (Azeredo et al., 2000). Estes resultados estão em conformidade com os apresentados por Tamade et al., (2002) que verificaram o gengibre inibiu fortemente a oxidação lipídica na carne de porco em cerca de 75% (expresso como nível de inibição) e foi das mais altas entre todas as 22 ervas e especiarias selecionadas (incluindo o alecrim). Não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos resultados devido à concentração de óleo, mas visualizou-se, em geral, uma maior atividade antioxidante consoante o aumento da concentração. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os biofilmes incorporados com MMTCa e os que não possuem MMTCa. Os resultados mostraram que a adição de nanopartículas de argila teve uma influência positiva na prevenção da oxidação lipídica da carne, tal como se pode ser na figura 3.35. Vilarinho et al., (2017) obtiveram resultados semelhantes, em que as amostras de salame revestidas com nanocompósitos de ácido poliláctico com MMT de sódio tiveram valores inferiores de MDA do que as apresentadas pelo controlo sem MMT. Tal como observado anteriormente, a adição de MMTCa vai é uma barreira extra aos raios ultravioleta que poderiam catalizar a oxidação lipídica na carne (Souza et al., 2017), tal como é também mais uma barreira ao oxigénio, não permitindo assim tantas trocas entre o alimento e o exterior (Uddin, 2008). O quitosano pode retardar a rancidez nos alimentos, atuando como um quelante de iões de metais de transição que iniciam a oxidação lipídica e as reações em cadeia, que, por sua vez, levam à deterioração

do sabor nos alimentos (Lekjing, 2016). Poucos estudos examinaram os efeitos combinados entre o quitosano, OE e MMTCa na oxidação lipídica de carnes. Os resultados dos biofilmes de Ch+OE seguem o que também foi observado pelos vários estudos que de seguida são apresentados.

No estudo de Georgantelis et al., (2007a), salsichas de porco frescas contendo quitosano e a sua combinação com alecrim apresentaram efeitos antioxidantes mais fortes do que o controlo de quitosano. Além disso, a combinação de extrato de alecrim e quitosano apresentou menores valores de MDA do que na utilização individual de quitosano e extracto de alecrim, indicando a existência de efeitos sinérgicos. Georgantelis et al., (2007b) relatam que o quitosano sozinho ou em combinação com alecrim usado em hambúrgueres de carne congelados (-18°C) armazenados por 180 dias apresentam efeitos antioxidantes mais fortes do que o o uso isolado do alecrim, sendo que os melhores resultados são obtidos com a combinação de quitosano e alecrim.

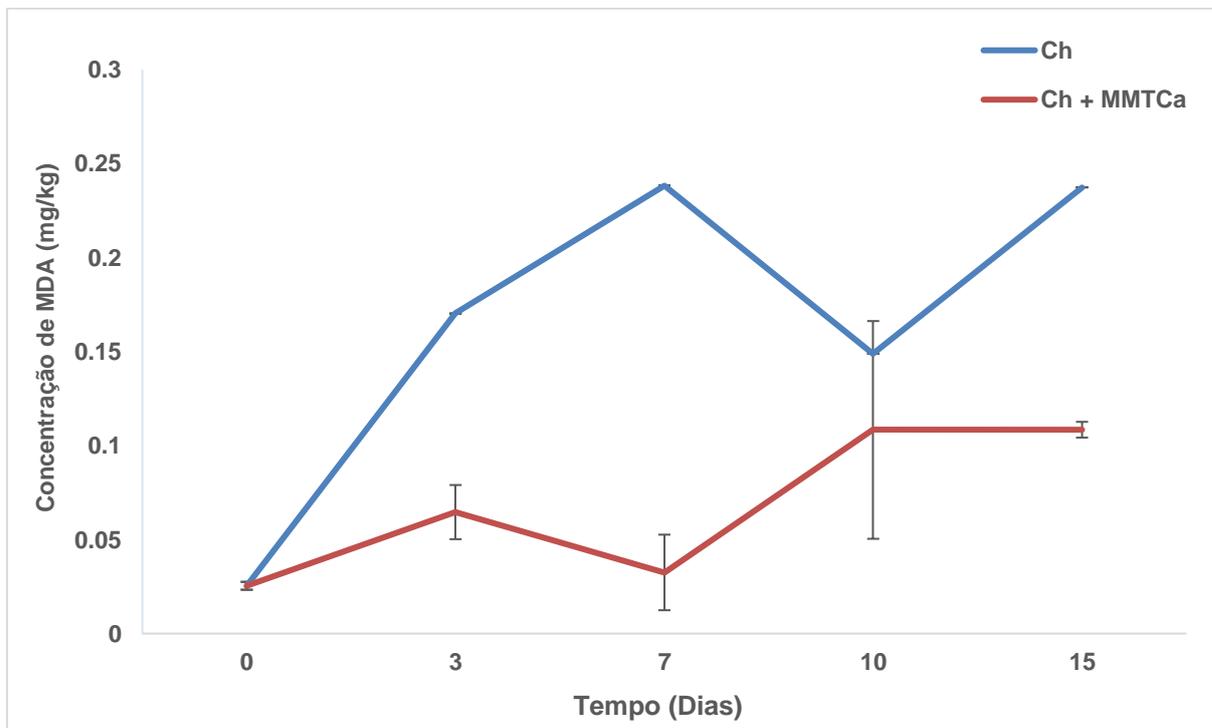


Fig. 3.35 Valores médios da concentração de MDA (mg/kg), para os biofilmes controlo, com e sem MMTCa ao longo do tempo

Ch = Quitossano; Ch + MMTCa = Quitossano com Montmorilonita Cálcica.

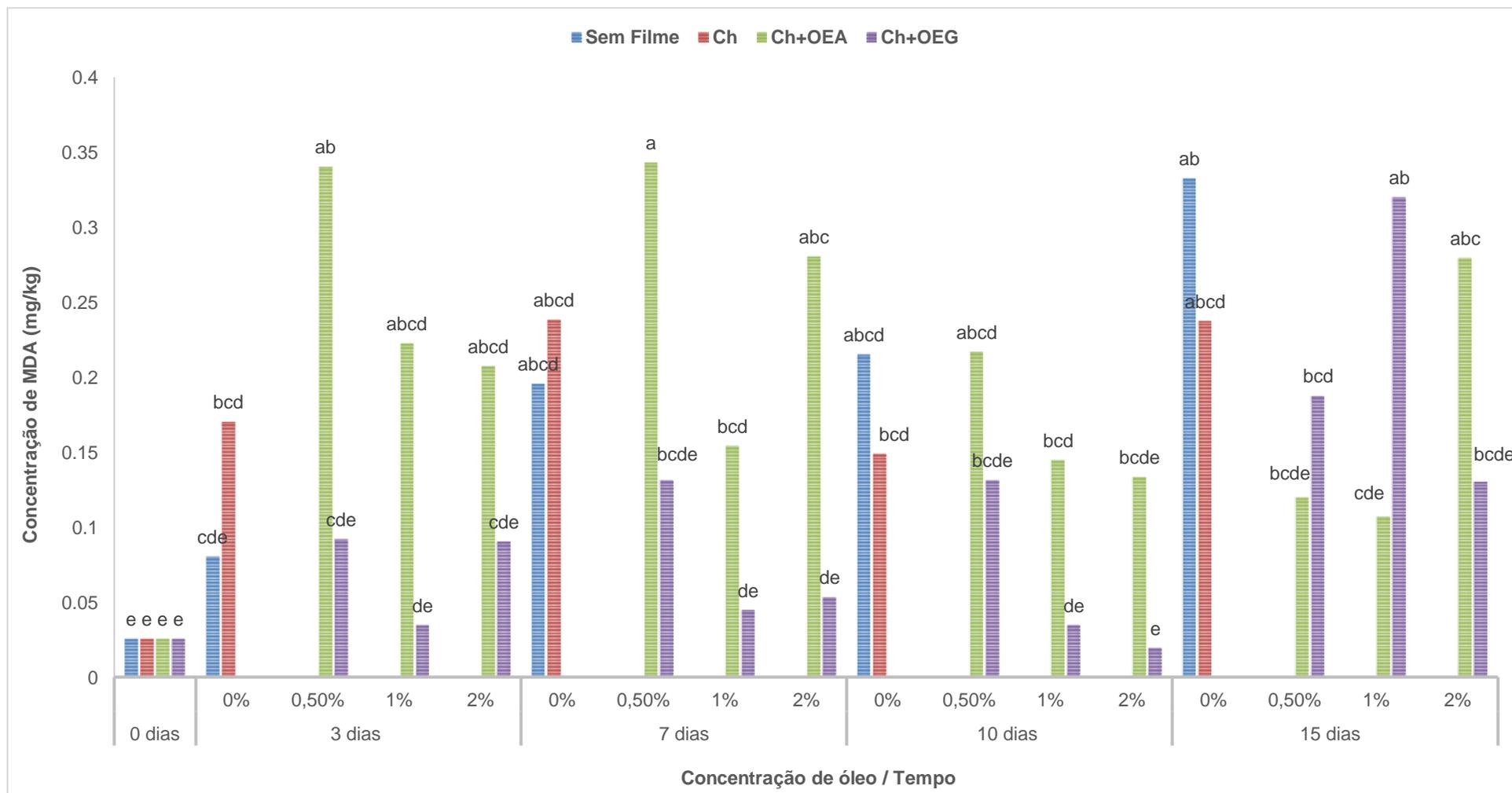


Fig. 3.36 Valores médios da concentração de MDA (mg/kg), para os biofilmes com óleos essenciais, sem MMTCa, variando a sua concentração ao longo do tempo
a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

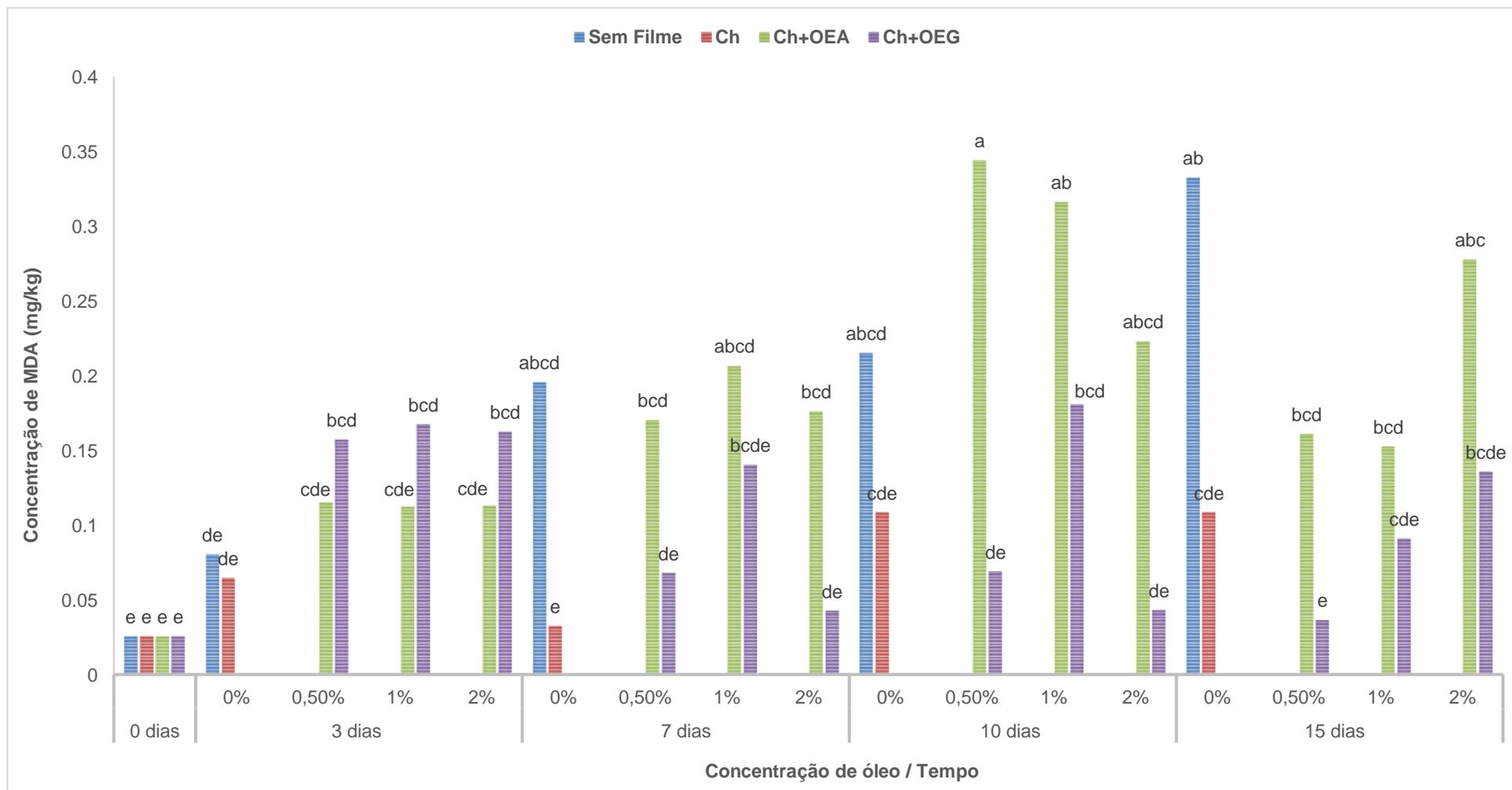


Fig. 3.37 Valores médios da concentração de MDA (mg/kg), para os biofilmes com óleos essenciais, com MMTCa, variando a sua concentração ao longo do tempo a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

3.2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O crescimento microbiano é geralmente responsável pela deterioração das carnes e produtos à base de carne, juntamente com as deteriorações bioquímicas e enzimáticas (Bonilla et al., 2014). De facto, a contaminação bacteriana é um dos principais fatores que determinam a perda de qualidade da carne fresca, pois esses produtos são muito propensos a serem contaminados com microrganismos se não forem devidamente conservados e manipulados, sendo portanto desejável usar um conservante com propriedades antimicrobianas (Kanatt et al., 2008).

Para entender a eficácia antimicrobiana dos biofilmes compósitos de Ch+OE, vários fatores devem ser considerados. Os parâmetros relativos aos microrganismos, como o seu tamanho, estado fisiológico e as condições de armazenamento (temperatura, meio de cultura) são importantes para explicar a atividade antimicrobiana do quitosano e dos óleos essenciais nos diferentes biofilmes produzidos (Sánchez-González et al., 2011a). No presente estudo, a influência desses fatores não foi avaliada.

A contagem total de mesófilos aumentou ($p < 0,05$) ao longo dos dez dias de armazenamento para a amostra de carne sem filme e para a amostra de controlo (Fig 3.38-3.39). Para as amostras de Ch+OE houve um aumento ($p > 0,05$) até ao sétimo dia e uma posterior estabilização até ao décimo dia. As amostras revestidas com os biofilmes mostraram valores de crescimento de microrganismos inferiores (com diferença de valores de 1 a 4 log (UFC/g)) relativamente à amostra não revestida, sendo essa redução significativa na maior parte dos casos ($p < 0,05$). Os biofilmes com MMTCa apresentaram contagens de mesófilos inferiores às dos biofilmes sem MMTCa, embora essa diferença não tenha sido significativa ($p > 0,05$) (Fig 3.39). Este resultado demonstra que os biofilmes com MMTCa são tendencialmente mais eficazes na prevenção de crescimento microbiológico. O mesmo resultado foi observado por Giannakas et al., (2016) quando adicionaram MMTNa aos biofilmes de quitosano, tendo-se verificado um decréscimo da atividade antibacteriana. Embora o MMTNa não tenha qualquer ação antibacteriana particular, demonstrou-se que, quando adicionado em matrizes poliméricas, leva a um desempenho superior do quitosano. A explicação para tal fenómeno pode estar na elevada área específica das placas de argila que podem absorver as bactérias da solução e imobiliza-las na sua superfície. Não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os biofilmes de controlo com os biofilmes incorporados com óleos essenciais, sendo que na maior parte dos casos, com a incorporação de óleo se verificou um ligeiro decréscimo de mesófilos. O tipo de óleo utilizado também não demonstrou qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) e a concentração utilizada também não ($p > 0,05$), sendo que na maior parte dos casos, com o aumento da concentração existe uma tendência para valores ligeiramente mais baixos de contaminação.

Bonilla et al., (2014) obtiveram resultados em que a adição de óleo essencial de manjerição ou tomilho ao quitosano levou a um decréscimo de eficácia contra o crescimento de mesófilos e coliformes, o que sugere que os óleos essenciais utilizados juntamente com quitosano são menos eficazes contra a carga microbiana do que utilizar o quitosano sozinho. Sánchez-González et al., (2011a) relatou os mesmos resultados sugerindo que isto se deve a um efeito de diluição, fazendo com que o quitosano quando está ligado aos óleos não esteja tão disponível para atuar como agente antimicrobiano. Este estudo sugeriu também que a redução antimicrobiana dos OE pode ser devido à ligação dos compostos ativos na rede de quitosano através das fortes interações com as cadeias poliméricas carregadas, dificultando o acesso aos microrganismos. Por outro lado, Zivanovic et al., (2005) obtiveram aumentos (cerca de 1 log (UFC/g)) na atividade antimicrobiológica dos biofilmes de quitosano quando incorporaram óleo essencial de oregão, reduzindo significativamente os organismos patogénicos da carne. Este aumento foi superior com o aumento da concentração do óleo. Kanatt et al., (2008) juntaram uma mistura de quitosano com extrato de menta a salsichas de porco e avaliaram a contagem total de microrganismos. Concluíram que a amostra controlo se degradou ao fim de 2 semanas de armazenamento (entre 0°C e 3°C) enquanto a amostra tratada apresentou um tempo de vida de 3 semanas. Ambas as contagens de microrganismos aumentaram ao longo do tempo, mas as amostras tratadas apresentaram valores de cerca de 1 log (UFC/g) a menos. Para interesse deste trabalho de investigação, Wang et al., (2017) também já verificaram o potencial do gengibre como agente antimicrobiano. No seu estudo verificaram que em carne de porco, a junção de óleo de gengibre e canela à matriz de quitosano reduz a contagem de microrganismos totais em comparação com o biofilmes de quitosano puro, sendo que a contagem é menor consoante o aumento da concentração dos óleos em questão. Isto deve-se maioritariamente a agentes químicos antimicrobianos presentes no gengibre, tais como o limomeno e o zingibereno (Wang et al., 2017).

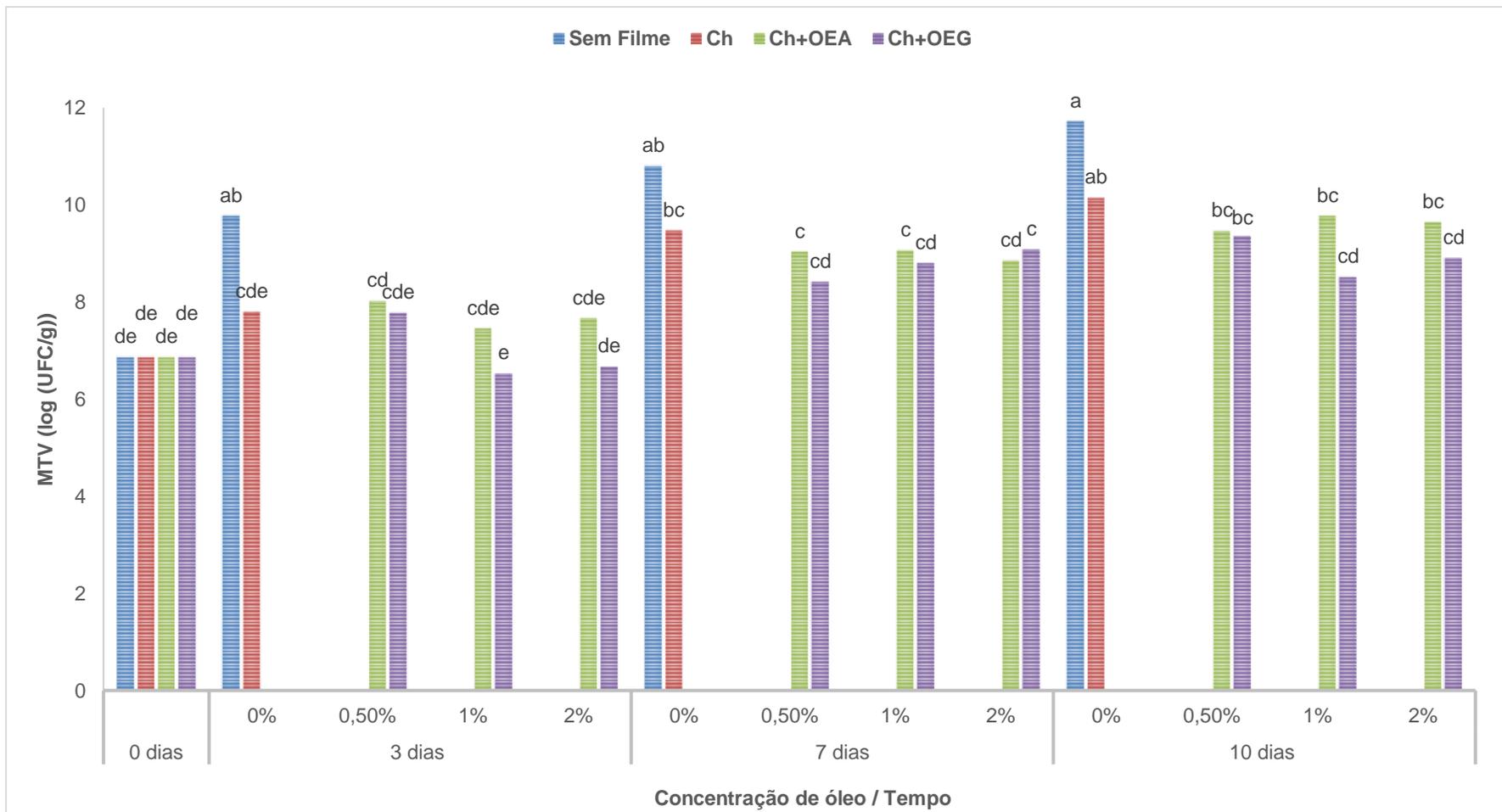


Fig. 3.38 Contagem total de mesófilos, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração), sem MMTCa, ao longo do tempo a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

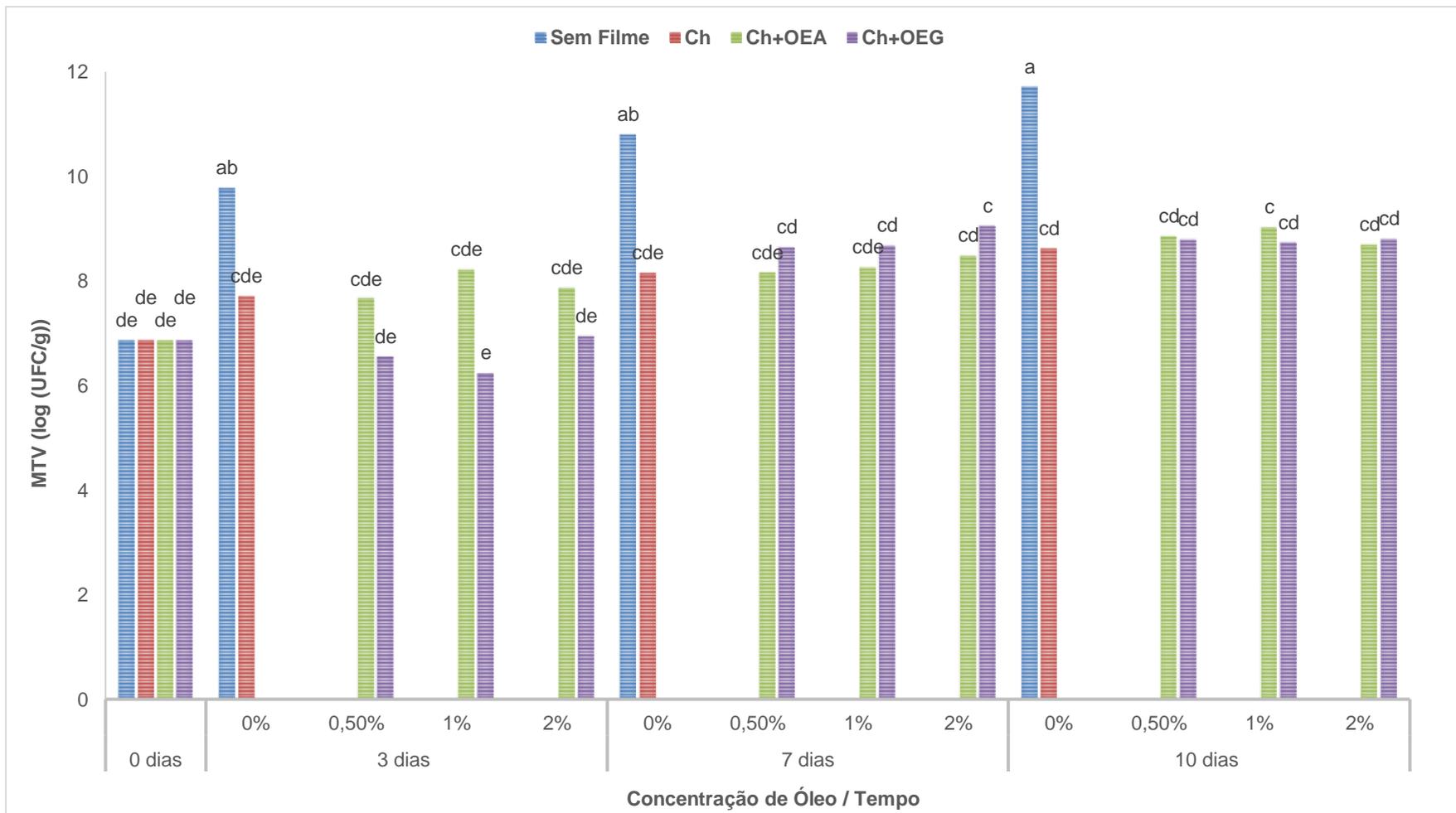


Fig. 3.39 Contagem de total de mesófilos, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração) , com MMTCa, ao longo do tempo
a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

Os coliformes são bactérias que estão sempre presentes nos tratos digestivos dos animais, incluindo os humanos, e são encontrados nos seus resíduos. Podem também ser encontrados em material vegetal e solo. São Gram-negativas, indicadoras de contaminação e formadas pelos géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (NYSHD, 2017). A contagem de coliformes totais na carne não revestida pelos biofilmes teve um crescimento linear significativo ($p < 0,05$) ao longo do tempo, atingindo um máximo no décimo dia de 4,38 log (NMP/g) (Fig 3.40-3.41). Durante todo o tempo de armazenamento a contagem de coliformes totais manteve-se estável ($p > 0,05$) com ligeiras alterações para as amostras revestidas com biofilmes, sendo que no último dia todas as amostras mostraram resultados inferiores aos da amostra de carne sem filme. As amostras revestidas com Ch+OEG foram as amostras que demonstraram ter um menor crescimento de coliformes (cerca de menos 1 log (NMP/g) que o OEA). Componentes não-polares tais como diterpenos fenólicos, responsáveis pelas propriedades antimicrobianas do alecrim, geralmente são considerados mais efetivos apenas contra bactérias Gram-positivas (Georgantelis et al., 2007a). Isto acontece porque os diterpenos fenólicos são moléculas orgânicas com substituintes volumosos de alto peso molecular, que pode fazer com que haja uma redução da capacidade de se atingir a membrana celular das bactérias Gram-negativas, tal como os coliformes (Georgantelis et al., 2007a). As amostras revestidas com biofilmes incorporados com MMTCa ainda conseguiram apresentar resultados mais baixos que as amostras sem nanopartículas de argila (Fig 3.41). Este decréscimo da contagem de coliformes totais foi de cerca 1 log (NMP/g), mostrando que a mistura do quitosano com óleo essencial de gengibre e MMTCa resultou nos biofilmes mais eficazes como agentes antimicrobianos. Para este biofilme, o valor mínimo registado ao fim de dez dias de armazenado foi de 1,85 log (NMP/g), bem inferior ao valor apresentado pela amostra não revestida. A explicação para tal fenómeno pode ser a mesma que a utilizada para a contagem de mesófilos, ou seja pode estar na elevada área específica das placas de argila que podem absorver as bactérias da solução e imobiliza-las na sua superfície (Giannakas et al., 2016).

Georgantelis et al., (2007a) no estudo com salsichas frescas de porco refrigeradas a 4°C, ao fim de vinte dias de armazenamento registaram um decréscimo na contagem de *Enterobacteriaceae* para amostras revestidas com biofilmes de quitosano com alecrim em relação às amostras sem filme. Este estudo refere também que os efeitos antimicrobianos, particularmente contra bactérias Gram-negativas, é mais pronunciado em meios com pH inferior a 6,3 e que temperaturas baixas, como as usadas no estudo, são consideradas ideias para favorecer o efeito antimicrobiano do quitosano.

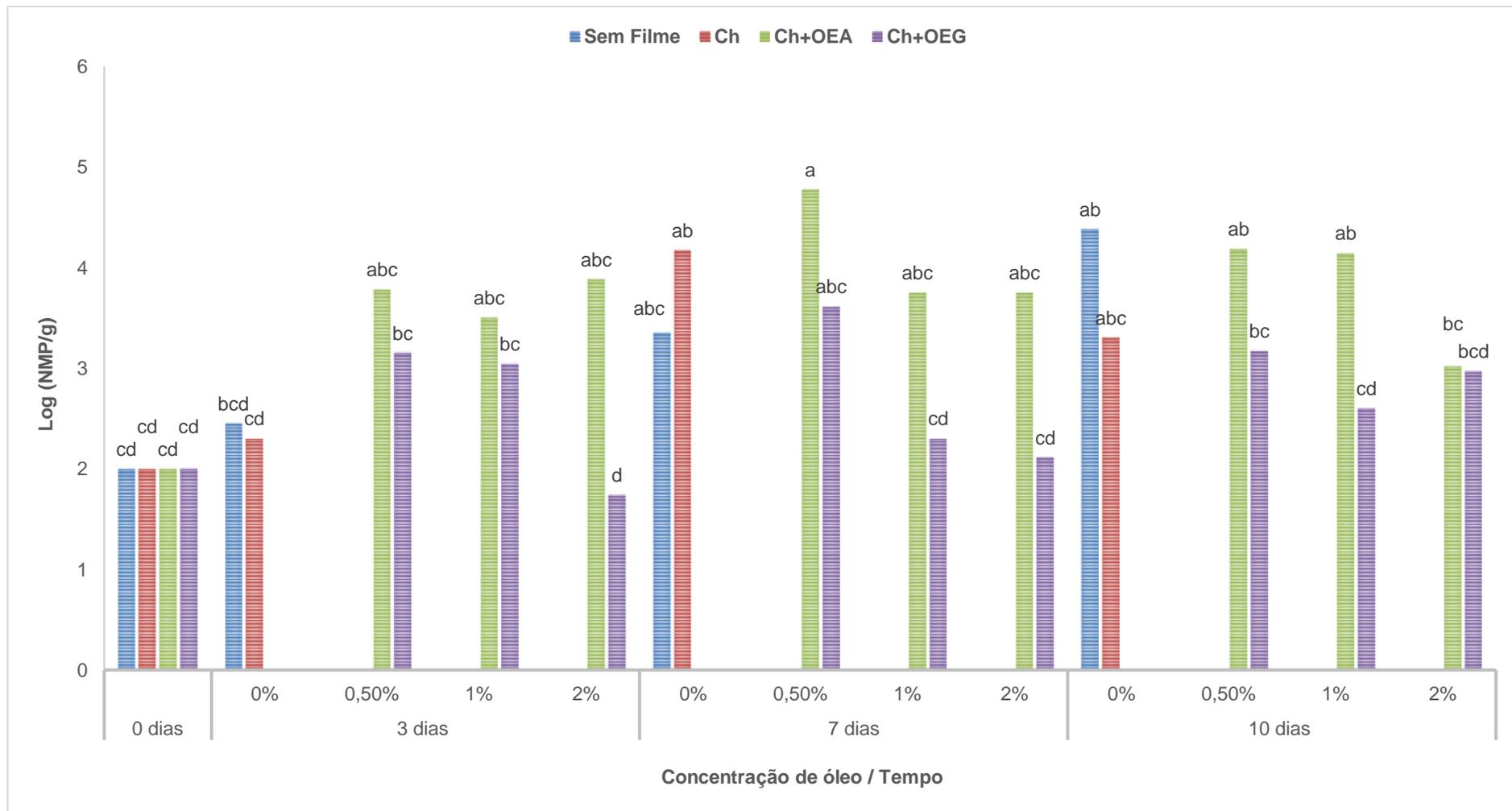


Fig. 3.40 Contagem de coliformes totais, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração), sem MMTCa, ao longo do tempo

a-d: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

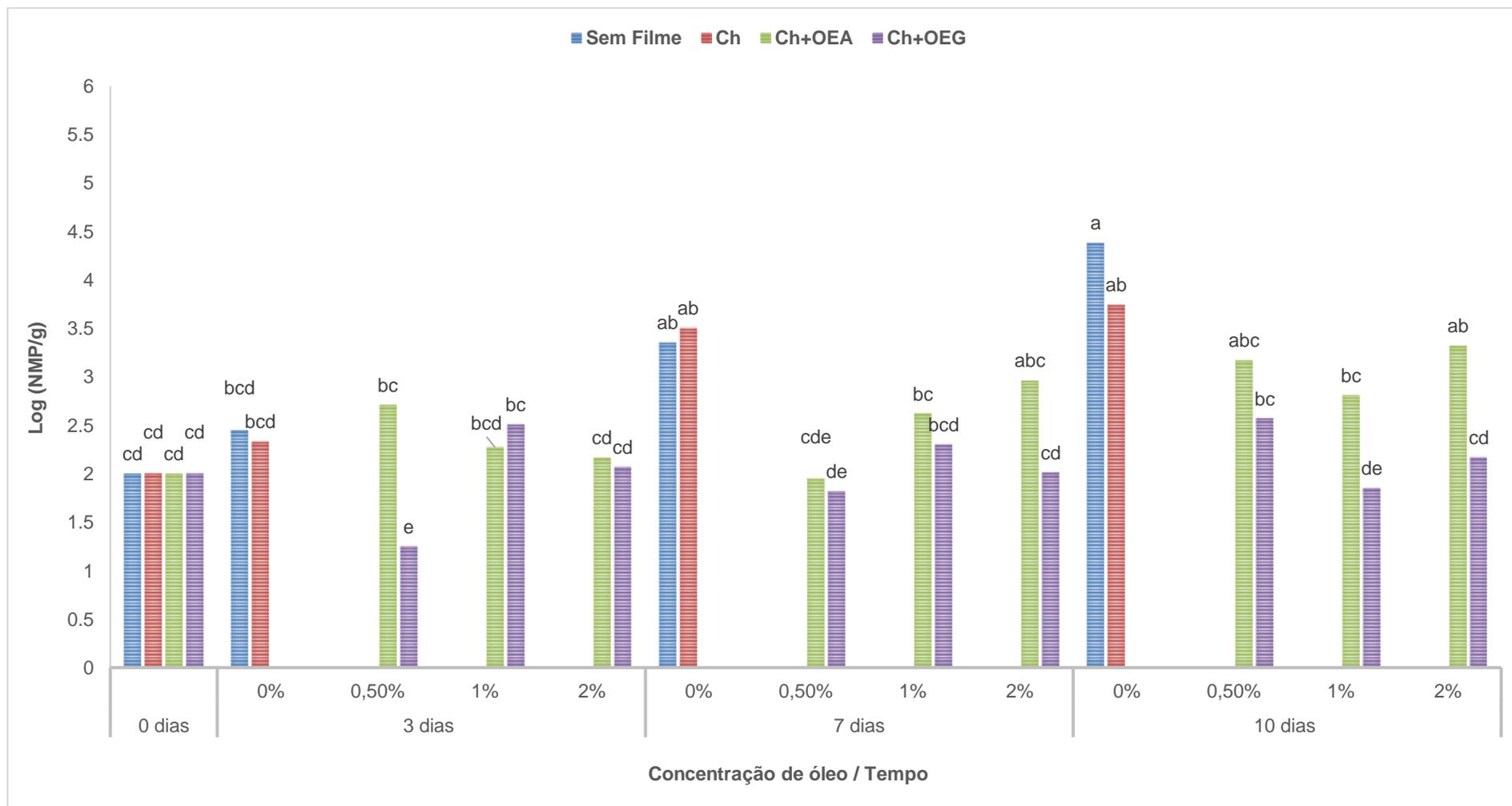


Fig. 3.41 Contagem de coliformes totais, para os biofilmes com óleos essenciais (variando a sua concentração), com MMTCa, ao longo do tempo
a-e: Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). Ch = Quitosano; Ch+OEA = Quitosano com óleo de alecrim; Ch+OEG = Quitosano com óleo de gengibre; MMTCa = Montmorilonita Cálcica.

4 CONCLUSÃO

Os biofilmes biodegradáveis foram produzidos com sucesso através do método de *casting* resultando numa espécie de plástico homogéneo, predominantemente amarelado, flexível e sem variações significativas na espessura. A incorporação de OE e MMTCa fez aumentar a opacidade dos biofilmes. A adição de óleos essenciais e MMTCa aos biofilmes de quitosano fazem com que estes sejam mais eficazes na prevenção da oxidação lipídica induzida por raios ultravioletas quando aplicados em sistemas alimentares, sendo o OEG o óleo que melhor atua neste aspeto. A incorporação de óleos essenciais nos biofilmes de quitosano aumenta a atividade antioxidante devido à libertação para o meio simulante de compostos fenólicos presentes nos óleos, sendo que a libertação dos compostos óleo de alecrim se traduziu numa atividade antioxidante superior à do óleo de gengibre. A adição de MMTCa resultou na diminuição da migração de compostos com actividade antioxidante. Nas propriedades mecânicas dos biofilmes, a força de tração dos biofilmes incorporados com OEA e OEG foram inferiores aos valores apresentados pelos provetes de quitosano controlo devido às descontinuidades criadas na matriz do polímero. A adição de OE à matriz fez com que a percentagem de alongamento dos biofilmes aumentasse e fez com que a rigidez dos mesmos fosse menor, pois os óleos desenvolveram uma função plastificante ao interromper as ligações químicas entre as cadeias do quitosano. As propriedades mecânicas foram então ligeiramente alteradas e a incorporação dos antioxidantes naturais teve um efeito plastificante nos biofilmes produzidos. Em relação ao efeito da incorporação de MMTCa, verificou-se que no quitosano sem adição de óleos o MMTCa torna o filme mais rígido. A incorporação de MMTCa associada à incorporação de óleos resultou em filmes mais flexíveis.

Ambos os biofilmes incorporados com os OE e sem adição de MMTCa reduziram o valor da humidade em relação ao controlo. Entre os biofilmes de controlo, a adição de MMTCa faz diminuir a humidade. Verificou-se que em geral houve uma diminuição da percentagem de *swelling* e de solubilidade com a incorporação dos dois tipos de óleo e MMTCa. Os tratamentos feitos em relação aos biofilmes controlo, com a incorporação de óleos essenciais e nanopartículas de argila mostraram-se assim eficazes pois podem interagir com as moléculas poliméricas, reduzindo a sua disponibilidade para reagir com a água.

As amostras de carne sem proteção deterioraram-se mais rapidamente desde o primeiro dia de armazenamento, mostrando uma subida ligeira do pH enquanto que nas amostras protegidas o pH desceu nos primeiros dias. Os níveis de acidez da carne tiveram uma redução inferior e mantiveram-se mais estáveis nas amostras embaladas comparativamente com as amostras sem filme, o que também é positivo. As amostras protegidas com os biofilmes mostraram um decréscimo nos valores de humidade e cinzas em relação à carne não protegida. A ligeira perda de humidade da carne quando está em contacto com os biofilmes pode ser devido ao facto do quitosano ter uma boa capacidade de adsorção, podendo também absorver minerais da carne para o filme reduzindo assim o valor das cinzas. A cor da carne das amostras com

biofilme também foi mantida durante o tempo de armazenamento em relação à carne não protegida em que se verificou variações de cor superiores.

Os biofilmes demonstraram ser mais eficazes no processo de preservação da carne, reduzindo a oxidação lipídica, porque o quitosano pode retardar a rancidez em alimentos, atuando como um quelante de íons de metais de transição que iniciam a oxidação lipídica e as reações em cadeia, que, por sua vez, levam à deterioração do sabor nos alimentos. Comparativamente com a carne sem filme, a carne envolta nos biofilmes teve uma redução na contagem de microorganismos totais e coliformes totais. Para se ter uma caracterização mais completa desses novos biofilmes, outras propriedades também devem ser avaliadas, como propriedades de barreira para vapor de água e gás.

No geral, as amostras protegidas obtiveram melhores resultados do que as amostras não protegidas e os biofilmes de quitosano tiveram as propriedades antimicrobianas e antioxidantes melhoradas pela introdução de OE e MMTCa, o que pode ser uma barreira importante contra a contaminação microbiana e química nos alimentos. A incorporação de MMTCa e de OE's (em especial do OEG) contribuiu então assim de forma significativa para o prolongamento da vida útil da carne de frango, tendo-se demonstrado o potencial de aplicação destes biofilmes em embalagens alimentares.

Estas descobertas terão aplicação em vários alimentos, especialmente alimentos que muitas vezes são afetados pela deterioração microbiana e química. No entanto, estudos adicionais são necessários antes de usar este filme como uma embalagem ativa para produtos alimentares.

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012a). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343-350.
- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012b). Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(4), 847-853.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Alexandre, E. M. C., Lourenço, R. V., Bittante, A. M. Q. B., Moraes, I. C. F., & do Amaral Sobral, P. J. (2016). Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 87-96.
- ASTM America Society Standart Testing and Materials, 2012. Standart Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting – D882-12.
- Azeredo, H. M. C. D., Faria, J. D. A. F., & Azeredo, A. M. C. D. (2000). Active packaging for foods. *Food Science and Technology (Campinas)*, 20(3), 337-341.
- Barbut, S. (2009). Pale, soft, and exudative poultry meat—Reviewing ways to manage at the processing plant. *Poultry science*, 88(7), 1506-1512.
- Bégin, A., & Van Calsteren, M. R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 63-67.
- Bicchi, C., Binello, A., & Rubiolo, P. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochemical analysis*, 11(4), 236-242.
- Bolzan, M. E., & Silva, J. D. (2012). *Avaliação dos parâmetros físico-químicos e qualidade microbiológica de salsichas acondicionadas em diferentes embalagens* (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná), 27-29.
- Bonilla, J., Vargas, M., Atarés, L., & Chiralt, A. (2014). Effect of chitosan essential oil films on the storage-keeping quality of pork meat products. *Food and bioprocess technology*, 7(8), 2443-2450.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(19), 7879-7885.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brody, A. L., Strupinsky, E. P., & Kline, L. R. (2001). *Active packaging for food applications*. CRC press.
- Callister, W. D., (2007). *Materials science and engineering: An Introduction*. NY: John Wiley & Sons, 7, 135-145.

- Casariago, A. B. W. S., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., & Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1895-1902.
- Chung, Y. C., Wang, H. L., Chen, Y. M., & Li, S. L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource technology*, 88(3), 179-184.
- Crini, G. (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in polymer science*, 30(1), 38-70.
- Cruz, F. L., Espósito, M., Nardelli, N. B. D. S., Fassani, É. J., Faria, P. B., & Esteves, C. (2017). Meat Quality Of Rodhe Island Red Poultry Reared In Alternative System. *Ciência Animal Brasileira*, 18.
- Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U. G., & Picci, N. (2009). Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(13), 5933-5938.
- Cyras, V. P., Manfredi, L. B., Ton-That, M. T., & Vázquez, A. (2008). Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 55-63.
- Damian, C., Beirão, L. H., Francisco, A. D., Espírito Santo, M. L. P., & Teixeira, E. (2005). Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentos e Nutrição*, 16(2), 195-205.
- Darmadji, P., & Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat science*, 38(2), 243-254.
- Darder, M., Aranda, P., & Ruiz-Hitzky, E. (2007). Bionanocomposites: a new concept of ecological, bioinspired, and functional hybrid materials. *Advanced Materials*, 19(10), 1309-1319.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, 21(6), 703-714.
- Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(5), 435-450.
- Dias, M. V., Azevedo, V. M., Borges, S. V., Soares, N. D. F. F., de Barros Fernandes, R. V., Marques, J. J., & Medeiros, É. A. A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food chemistry*, 165, 323-329.
- Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., & Friedman, M. (2009). Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. *Journal of Food Science*, 74(7) 372-378.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- Efrati, R., Natan, M., Pelah, A., Haberer, A., Banin, E., Dotan, A., & Ophir, A. (2014). The combined effect of additives and processing on the thermal stability and controlled release of essential oils in antimicrobial films. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(15) n-a.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841.

Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R., & Johnson, S. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science and Technology*, 61, 60-71.

Fernando, A.L. (2006). *Folhas de Apoio à disciplina de Acondicionamento e Embalagem de Alimentos*, GDEH, FCT/UNL.

Fernando, A.L.A.C. (1996) *Valorização da biomassa obtida em lagoas fotossintéticas de alta carga a partir de um efluente de suinicultura*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Alimentar, FCT/UNL, Caparica, Portugal, 147.

Fernando A.L.A.C. (2015) *Análise de alimentos: caracterização físico-química*, FCT/UNL, disponível em <http://docentes.fct.unl.pt/ala/publications>.

Fernando, A. L., Duarte, M. P., Vatsanidou, A., & Alexopoulou, E. (2015). Environmental aspects of fiber crops cultivation and use. *Industrial Crops and Products*, 68, 105-115.

Fletcher, D. L. (2002). Poultry meat quality. *World's Poultry Science Journal*, 58(02), 131-145.
Frisch, H. L., & Mark, J. E. (1996). Nanocomposites prepared by threading polymer chains through zeolites, mesoporous silica, or silica nanotubes. *Chemistry of materials*, 8(8), 1735-1738.

Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 273-283.

García-Esteban, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, 67(1), 57-63.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007a). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science*, 76(1), 172-181.

Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., & Fletouris, D. J. (2007b). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science*, 75(2), 256-264.

Ghelejlju, S. B., Esmaili, M., & Almasi, H. (2016). Characterization of chitosan–nanoclay bionanocomposite active films containing milk thistle extract. *International journal of biological macromolecules*, 86, 613-621.

Giannakas, A., Grigoriadi, K., Leontiou, A., Barkoula, N. M., & Ladavos, A. (2014). Preparation, characterization, mechanical and barrier properties investigation of chitosan–clay nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 108, 103-111.

Giannakas, A., Vlachas, M., Salmas, C., Leontiou, A., Katapodis, P., Stamatis, H., ... & Ladavos, A. (2016). Preparation, characterization, mechanical, barrier and antimicrobial properties of chitosan/PVOH/clay nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 140, 408-415.

Giatrakou, V., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N. (2010). Combined chitosan-thyme treatments with modified atmosphere packaging on a ready-to-cook poultry product. *Journal of Food Protection*, 73(4), 663-669.

Heijnen, C., van den Boogaard, B., & Maas van Berkel, B. (2005). Conservação de peixe e carne. *Agromisa/CTA*, 8-17

Hosseini, M. H., Razavi, S. H., & Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(6), 727-743.

- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 85, 467-475.
- Hunt, M. C., King, A., Barbut, S., Clause, J., Cornforth, D., Hanson, D., ... & Pohlman, F. (2012). AMSA meat color measurement guidelines. *American Meat Science Association, Champaign, Illinois USA*, 61820, 1-135.
- ISO. ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. 2013.
- ISO. ISO 4831:2006(en) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique. 2006
- Imam, S., Glenn, G., Chiou, B. S., Shey, J., Narayan, R., & Orts, W. (2008). Types, production and assessment of biobased food packaging materials. *Environmentally compatible food packaging*, 29-62.
- Kaewprachu, P., Osako, K., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2015). Quality attributes of minced pork wrapped with catechin-lysozyme incorporated gelatin film. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 88-96.
- Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107(2), 845-852.
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2012). Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 290-297.
- Kasirga, Y., Oral, A., & Caner, C. (2012). Preparation and characterization of chitosan/montmorillonite-K10 nanocomposites films for food packaging applications. *Polymer Composites*, 33(11), 1874-1882.
- Kendra, D. F., & Hadwiger, L. A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, 8(3), 276-281.
- Kester, J. J., & Fennema, O. (1989). An edible film of lipids and cellulose ethers: barrier properties to moisture vapor transmission and structural evaluation. *Journal of Food Science*, 54(6), 1383-1389.
- Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S. K., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2006). Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *Journal of food science*, 71(3), 119-124.
- Knorr, D. (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food technology (USA)*, n-a.
- Koo, J. (2016). Fundamentals, Properties, and Applications of Polymer Nanocomposites. *Cambridge University Press*, 34-35.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
- Krkić, N., Lazić, V., & Gvozdenović, J. (2011). Chitosan biofilm properties as affected by the addition of oregano essential oil. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 15(3), 165-168.

- Kruijf, N. D., Beest, M. V., Rijk, R., Sipiläinen-Malm, T., Losada, P. P., & Meulenaer, B. D. (2002). Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives & Contaminants*, 19(S1), 144-162.
- Leceta, I., Guerrero, P., & De la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate polymers*, 93(1), 339-346.
- Lekjing, S. (2016). A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. *Meat science*, 111, 192-197.
- Liu, L. (2006). Bioplastics in food packaging: Innovative technologies for biodegradable packaging. *San Jose State University Packaging Engineering*, 13, n-a.
- López-de-Dicastillo, C., Gómez-Estaca, J., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Active antioxidant packaging films: development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, 131(4), 1376-1384.
- Lu, Y., & Foo, L. Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food chemistry*, 75(2), 197-202.
- Lutz, I. A. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. *São Paulo: ANVISA*.
- Maizura, M., Aminah, A., & Wan Aida, W. M. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal*, 18(2), n-a.
- Marquez—Ruiz, G., & Holgado, F. (2013). Oxidation in Food Lipids. *Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties*, 79, n-a.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220-227.
- McGlashan, S. A., & Halley, P. J. (2003). Preparation and characterisation of biodegradable starch-based nanocomposite materials. *Polymer International*, 52(11), 1767-1773.
- McMillin, K. W. (2017). Advancements in meat packaging. *Meat Science*, 132, 153-162.
- Mehdizadeh, T., Tajik, H., Razavi, R. S., & Oromiehie, A. R. (2012). Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. *In Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 3(3), 167.
- Mendes, J. I. S. (2013). *Qualidade nutricional e microbiológica de enchidos* (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária).
- Mensitieri, G., Di Maio, E., Buonocore, G. G., Nedi, I., Oliviero, M., Sansone, L., & Iannace, S. (2011). Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2), 72-80.
- Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 477-484.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2010). *Food analysis*, 107-115. New York: Springer.
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, 74(1), 65-72.

- No, H. K., Kim, S. H., Lee, S. H., Park, N. Y., & Prinyawiwatkul, W. (2006). Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydrate polymers*, 65(2), 174-178.
- NYSDH. (2017). Coliform Bacteria in Drinking Water Supplies. No. 3226, www.health.ny.gov
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161-166.
- Pandey, P. K., Kass, P. H., Soupir, M. L., Biswas, S., & Singh, V. P. (2014). Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*, 4(1), 51.
- Park, S. I., & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(7), 1933-1939.
- Park, S. I., Marsh, K. S., & Dawson, P. (2010). Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. *Meat science*, 85(3), 493-499.
- Pascoal, A., Quirantes-Piné, R., Fernando, A. L., Alexopoulou, E., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of kenaf leaves. *Industrial Crops and Products*, 78, 116-123.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Cháfer, M., & González-Martínez, C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 272-280.
- Peelman, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., ... & Devlieghere, F. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 128-141.
- Peng, Y., & Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
- Perdones, Á., Vargas, M., Atarés, L., & Chiralt, A. (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids*, 36, 256-264.
- Perdones, Á., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids*, 57, 271-279.
- Petracci, M., Betti, M., Bianchi, M., & Cavani, C. (2004). Color variation and characterization of broiler breast meat during processing in Italy. *Poultry Science*, 83(12), 2086-2092.
- Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., & Savvaidis, I. N. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International journal of food microbiology*, 156(3), 264-271.
- Platt, D. K. (2006). *Biodegradable polymers: market report*, n-a. iSmithers Rapra Publishing.
- Prakash, J. (2010). Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (*Zingiber officinale*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2674-2679.
- Ponce, A. G., Roura, S. I., del Valle, C. E., & Moreira, M. R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. *Postharvest biology and Technology*, 49(2), 294-300.

Portfit. (2017). Tabela de composição dos alimentos. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*, <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?305>

Qin, Y. Y., Yang, J. Y., Lu, H. B., Wang, S. S., Yang, J., Yang, X. C., ... & Cao, J. X. (2013). Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties. *International journal of biological macromolecules*, *61*, 312-316.

Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, *62*(3), 373-380.

Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, *2*(2), 186-201.

Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S., & Horax, R. (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(16), 5183-5186.

Ray, S. S., & Okamoto, M. (2003). Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in polymer science*, *28*(11), 1539-1641.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9), 1231-1237.

Rhim, J. W., Hong, S. I., Park, H. M., & Ng, P. K. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(16), 5814-5822.

Rhim, J. W., & Ng, P. K. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, *47*(4), 411-433.

Rhim, J. W., Park, H. M., & Ha, C. S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, *38*(10), 1629-1652.

Rhoades, J., & Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and environmental microbiology*, *66*(1), 80-86.

Robertson, G. (2008). State-of-the-art biobased food packaging materials. *Environmentally compatible food packaging*, 3-28.

Rosmini, M. R., Perlo, F., Pérez-Alvarez, J. A., Pagán-Moreno, M. J., Gago-Gago, A., López-Santoveña, F., & Aranda-Catalá, V. (1996). TBA test by an extractive method applied to 'paté'. *Meat Science*, *42*(1), 103-110.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, *91*(4), 621-632.

Sadeghi, G. M. M., & Mahsa, S. (2015). Compostable Polymers and Nanocomposites—A Big Chance for Planet Earth. In *Recycling Materials Based on Environmentally Friendly Techniques*, n-a.

Sadler, G. D., & Murphy, P. A. (2010). pH and titratable acidity. In *Food analysis*, 219-238. Springer US.

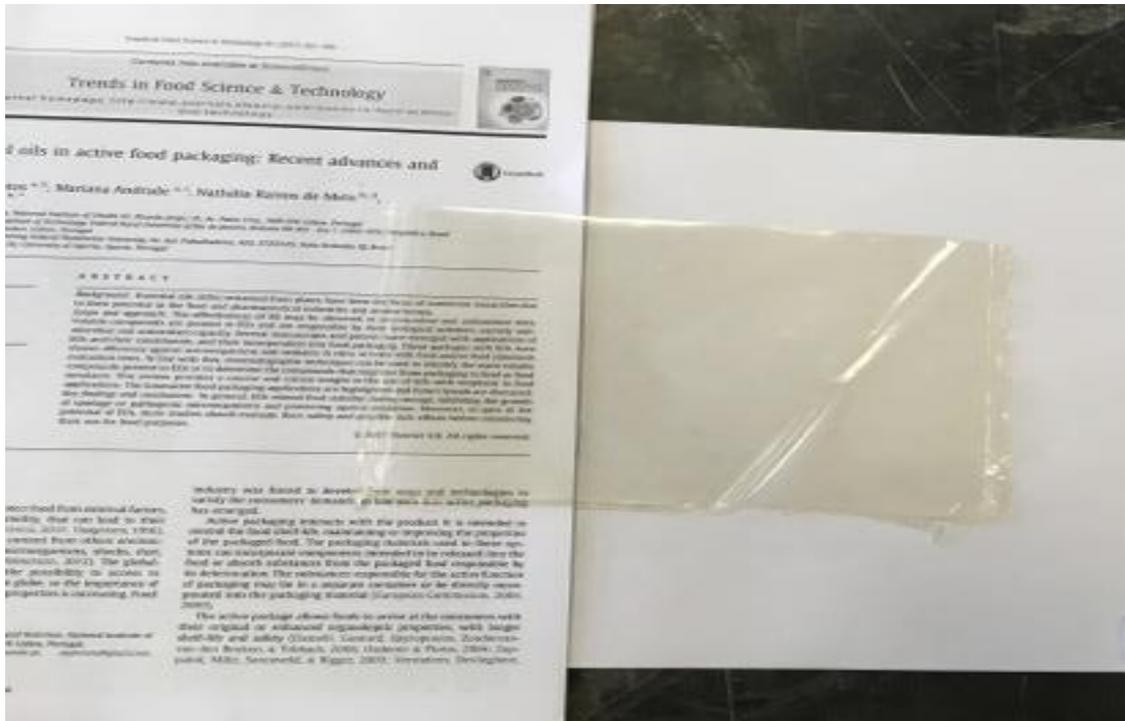
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2102-2109.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate polymers*, 82(2), 277-283.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Hernández, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2011a). Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control*, 22(8), 1302-1310.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011b). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1-16.
- Sanches-Silva, A., Costa, D., Albuquerque, T. G., Buonocore, G. G., Ramos, F., Castilho, M. C., & Costa, H. S. (2014). Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(3), 374-395.
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., & Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-18.
- Schmidt, D., Shah, D., & Giannelis, E. P. (2002). New advances in polymer/layered silicate nanocomposites. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(3), 205-212.
- Schreiber, S. B., Bozell, J. J., Hayes, D. G., & Zivanovic, S. (2013). Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 207-214.
- Scollan, N., Hocquette, J. F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, I., & Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat science*, 74(1), 17-33.
- Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M. A., Hosseini, H., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S. M., ... & Khaksar, R. (2014). Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with *Zataria multiflora* essential oil and nanoclay. *International journal of biological macromolecules*, 69, 282-289.
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*, 59, 46-58.
- Singh, G., Kapoor, I. P. S., Singh, P., de Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46(10), 3295-3302.
- Singla, A. K., & Chawla, M. (2001). Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(8), 1047-1067.
- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775.
- Sothornvit, R., Rhim, J. W., & Hong, S. I. (2009). Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 468-473.

- Sothornvit, R., Hong, S. I., An, D. J., & Rhim, J. W. (2010). Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(2), 279-284.
- Souza, V. G. L., & Fernando, A. L. (2016). Nanoparticles in food packaging: biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packaging and Shelf Life*, *8*, 63-70.
- Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A., & Fernandes, F. M. B. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, *107*, 565-572.
- Talón, E., Trifkovic, K. T., Nedovic, V. A., Bugarski, B. M., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2017). Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 1153-1161.
- Tanabe, H., Yoshida, M., & Tomita, N. (2002). Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. *Animal Science Journal*, *73*(5), 389-393.
- Tian, F., Decker, E. A., & Goddard, J. M. (2013). Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food & function*, *4*(5), 669-680.
- Tornuk, F., Hancer, M., Sagdic, O., & Yetim, H. (2015). LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. *LWT-Food Science and Technology*, *64*(2), 540-546.
- Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim, J., Carosella, A. M., & Armstrong, D. (2001). Correlates of markers of oxidative status in the general population. *American journal of epidemiology*, *154*(4), 348-356.
- Tsai, G. J., & Su, W. H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, *62*(3), 239-243.
- Tunç, S., & Duman, O. (2011). Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(2), 465-472.
- Turina, A. D. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., & Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical chemistry*, *122*(2), 101-113.
- Uddin, F. (2008). Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals. *Metallurgical and Materials Transactions A*, *39*(12), 2804-2814.
- Ulanski, P., Wojtasz-Pajak, A., Rosiak, J. M., & Von Sonntag, C. (2000). Radiolysis and sonolysis of chitosan—two convenient techniques for a controlled reduction of the molecular weight. *Advances in chitin science*, *4*, 429-435.
- UE. (2009). *Guidance to the commission regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Version 10*. European Commission Health and Consumers Directorate-General Directorate E-Safety of the Food chain. E6- Innovation and sustainability.
- USFDA. (2001). Safe practices for food processes. *Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth*, www.fda.gov.
- USFDA. (2013). GRAS notice inventory. GRN, No. 397, www.fda.gov.

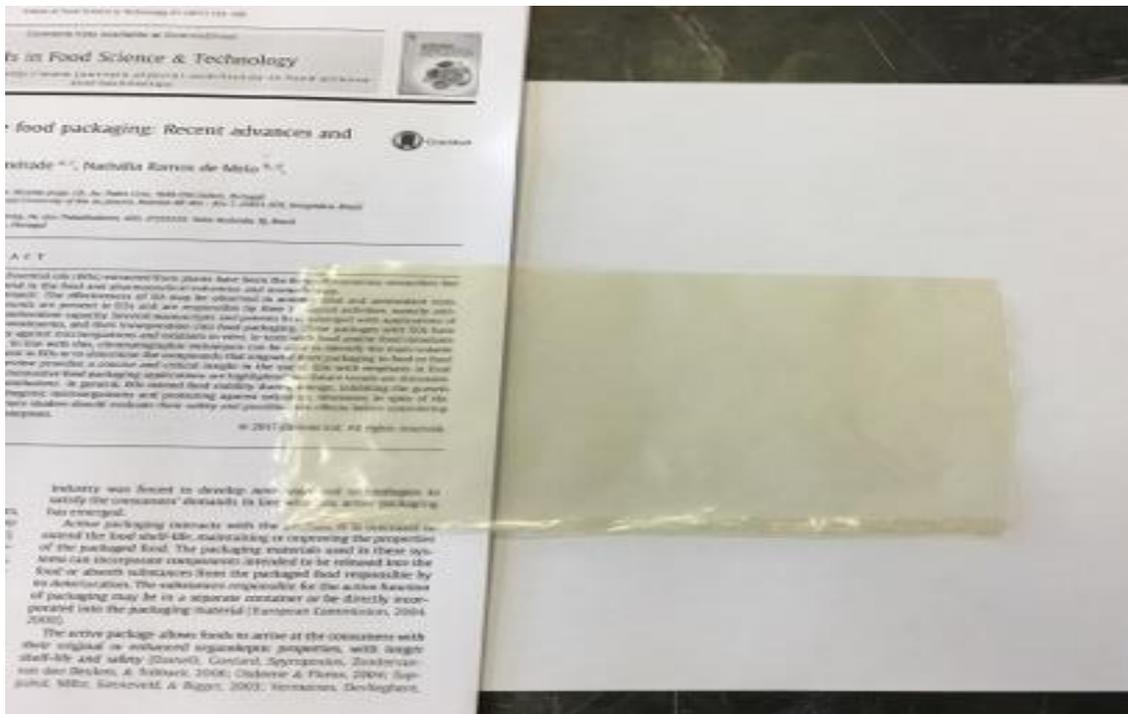
- Utracki, L. A., Sepehr, M., & Boccaleri, E. (2007). Synthetic, layered nanoparticles for polymeric nanocomposites (PNCs). *Polymers for advanced technologies*, 18(1), 1-37.
- Vilarinho, F., Buonocore, G., Vaz, M., & Sanches-Silva, A. (2017). Lipid oxidation of a meat product packaged with poly (lactic acid)/clay nanocomposites. In *MATBIM conference-4th international meeting on Material/Bioproduct Interaction, 26-28 abril 2017*.
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Alvarenga, J. F. R., Leal, L. N., & Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, 154, 299-307.
- Vu, K. D., Hollingsworth, R. G., Leroux, E., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198-203.
- Wan, A., Xu, Q., Sun, Y., & Li, H. (2013). Antioxidant activity of high molecular weight chitosan and N, O-quaternized chitosans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(28), 6921-6928.
- Wang, X., Du, Y., & Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate polymers*, 56(1), 21-26.
- Wang, Y., Xia, Y., Zhang, P., Ye, L., Wu, L., & He, S. (2017). Physical Characterization and Pork Packaging Application of Chitosan Films Incorporated with Combined Essential Oils of Cinnamon and Ginger. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 503-511.
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International journal of food microbiology*, 185, 57-63.
- Zheng, Y., Gao, T., Wang, A. (2008). Preparation, Swelling, and Slow-Release Characteristics of Superabsorbent Composite Containing Sodium Humate. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, 1766-1773
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(1), 45-51.
- Zivanovic, S., Davis, R. H., & Golden, D. A. (2015). Chitosan as an antimicrobial in food products. *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality*, 20(1), 153-181.

6 ANEXOS

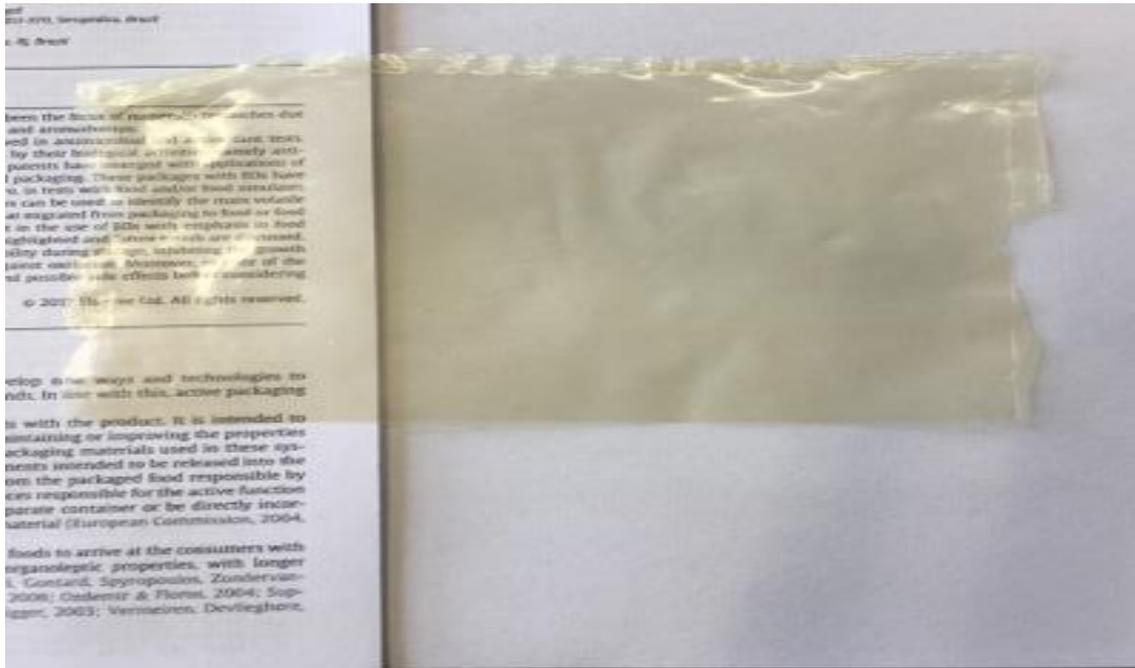
Anexo 1 – Exemplo de um biofilme controlo de Ch com MMTCa produzido



Anexo 2 – Exemplo de um biofilme de Ch com 0,5% OEA e MMTCa produzido



Anexo 3 – Exemplo de um biofilme de Ch com 0,5% OEG e MMTCa produzido



Anexo 4 – Exemplo de um biofilme de Ch com 2% OEG e sem MMTCa produzido

