

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Desenvolvimento e avaliação toxicológica de filmes proteicos com adição de nanofibras de celulose para recobrimento de frutas.

Tassiane Regina Alves Corrêa

São Carlos / SP

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Desenvolvimento e avaliação toxicológica de filmes proteicos
com adição de nanofibras de celulose para recobrimento de
frutos.**

Tassiane Regina Alves Corrêa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento.

Orientadores: Dr. Rubens Bernardes Filho

Dra. Lucimara Aparecida Forato

São Carlos / SP

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C824da

Corrêa, Tassiane Regina Alves.

Desenvolvimento e avaliação toxicológica de filmes proteicos com adição de nanofibras de celulose para recobrimento de frutos / Tassiane Regina Alves Corrêa. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
91 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Filmes comestíveis 3. Zeína. 4. Nanofibra de celulose. 5. Frutas. 6. Nanotoxicologia. I. Título.

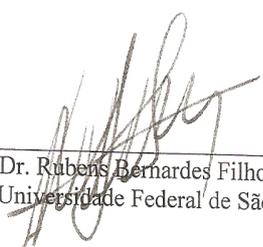
CDD: 660.6 (20^a)

Tassiane Regina Alves Corrêa

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Aprovado em: 27/11/2013

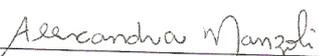
BANCA EXAMINADORA



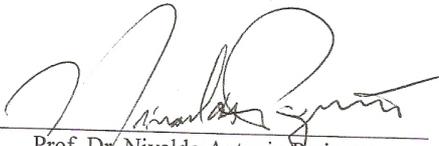
Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho (Orientador)
(Universidade Federal de São Carlos)



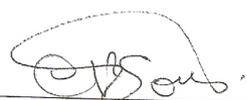
Dr. Douglas de Brito
(EMBRAPA – Instrumentação)



Dr.ª Alexandra Manzoli
(EMBRAPA – Instrumentação)



Prof. Dr. Nivaldo Antonio Barizotto
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof.ª Dr.ª Cristina Paiva de Souza
(Universidade Federal de São Carlos)

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia Aparecida Shinkai Corrêa e Valdelil Aparecido Alves Corrêa pela minha formação pessoal e profissional, por todo o apoio nas minhas escolhas. Amo vocês;

À minha irmã Kellen Cristiane Alves Corrêa Schlittler pelo carinho e apoio incondicional e por ter me dado um sobrinho Matheus Schlittler que alegra meus dias com o mais puro sorriso;

Ao meu marido Rodrigo Donato por me apoiar e compreender a ausência e nervosismo nessa etapa da minha vida;

Ao Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho, por me ter aceitado como aluna de iniciação científica, depois de doutorado. Não existem palavras para demonstrar a minha gratidão pelas oportunidades e pela confiança. Um grande exemplo de pessoa e profissional. Carregarei eternamente o seu carinho e seu exemplo;

À Profa. Dra. Lucimara Aparecida Forato por me co-orientar, pela paciência, amizade, orientação e incentivo;

Ao Prof. Dr. Odílio B. Garrido de Assis, pelas inúmeras dicas, apoio, incentivo e ajuda na pesquisa.

A Embrapa Instrumentação pela disponibilidade dos laboratórios e da infra- estrutura utilizadas, para execução do trabalho experimental;

À Franciéle Oliveira, pós doutoranda da Embrapa Instrumentação, pela produção das nanofibras de celulose, sem as quais este trabalho não seria possível;

Aos técnicos da Embrapa Instrumentação Viviane, Silviane, Alice, Adriana, Marcelo e Joana pela ajuda na realização dos experimentos;

A CAPES pelo auxílio financeiro disponibilizado para realização deste trabalho;

Aos professores e as secretárias do programa de pós-graduação em biotecnologia, aos pesquisadores e colegas da Embrapa Instrumentação, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, que prontamente permitiu a utilização de seu laboratório para a realização do teste de toxicidade;

Ao Sr. Sérgio Dias, técnico do Laboratório de Neuroendocrinologia, pela amizade e as inúmeras ajudas durante toda a minha estadia no laboratório;

Aos amigos Charles Chenwei Wang, Bruna Biffe e Karina Ana Silva do laboratório de Neuroendocrinologia, pela ajuda com os animais e pelos ensinamentos;

A Juliana Aparecida Scramin, minha concorrente eterna. Obrigado pela amizade, carinho, companheirismo, incentivo e apoio em toda a nossa trajetória de iniciação científica e doutorado juntos. Obrigado de coração;

Aos ex e atuais amigos de laboratório: Paulo Falco Cobra, Maria Gabriela Carosio, Melina Zuzi Fabiano, Jacqueline Salmeirão Rizzo, Tais Gastaldi, Tais Néó, Carolina Prado Fernandes, Rodrigo Pepino, Rafaella Takehara, Carolina Gallarti pela amizade e o companheirismo, fundamentais no nosso trabalho;

Aos meus queridos amigos: Ariangela Frigo, Gustavo Frigo, Ana Livia Schiavone, Vinícius Torres, Carolina Bedendo, Leonardo Torres, Ana Maria Vasconcelos, Denis Silva, Camila Romano, André Michelotto pela amizade e pelos vários momentos de descontração;

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com equipamentos, metodologias, análises, críticas, sugestões e discussões para realização deste trabalho.

A todos o meu sincero muito obrigada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Dinâmica de Amadurecimento das frutas	3
2.1.1. Ciclo de vida dos frutos	3
2.1.2. Respiração de um fruto.....	7
2.1.3. Produção de hormônios do amadurecimento (Etileno).....	8
2.2. Filmes Comestíveis	10
2.2.1. Polímeros de origem vegetal e animal utilizados na obtenção de filmes comestíveis.....	11
2.2.1.1. Polissacarídeos	11
2.2.1.2. Lipídeos	12
2.2.1.3. Proteínas.....	13
2.2.2. Características desejáveis de um filme comestível	15
2.3. As zeínas	16
2.4. Fibras Vegetais	18
2.4.1. Métodos Químicos de Isolamento da celulose	20
2.4.2. Nanofibras de Celulose	22
2.5. Nanotoxicidade	26
2.5.1. Definição de Nanotoxicologia	28
2.5.2. Testes de Toxicidade	29
2.6. Técnicas usadas em estudos para caracterização de filmes finos.....	32
2.6.1. Ângulo de Contato	32
2.6.2. Microscopia de Força Atômica	33
3 – OBJETIVOS E METAS	36
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Amostras, materiais e reagentes	37
4.2. Preparação dos filmes de zeína com nanofibra de celulose.....	37
4.3. Revestimento das frutas e teste das frutas revestidas.....	38
4.3.1. Perda de massa	38
4.3.2. Medidas Colorimétricas.....	38

4.3.3. Medidas de firmeza	39
4.4. Testes com os filmes obtidos	39
4.4.1. Ângulo de contato	39
4.4.2. Microscopia de Força Atômica	40
4.4.3. Teste de Toxicidade	40
4.4.3.1. Protocolo Experimental	41
4.4.3.2. Parâmetros analisados	42
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1. Perda de Massa	45
5.2. Ângulo de Contato	50
5.3. Texturômetro	52
5.4. Colorimetria	55
5.5. Microscopia de Força Atômica	56
5.6. Testes para avaliação de ação tóxica do filme	59
5.6.1. Parâmetros alimentação e excreção	59
5.6.2. Parâmetros Bioquímicos	66
5.6.3. Parâmetros Biomecânicos	67
6 – CONCLUSÃO	70
7 – PERSPECTIVAS FUTURAS	71
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO A	88
ANEXO B	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Etapas do desenvolvimento fisiológico dos frutos. 1) Início da formação da polpa; 2) Término do crescimento em tamanho; 3) Início do período de consumo, mas, ainda imaturo; 4) Período ótimo de consumo; 5) Predominância de reações degradativas e 6) Não utilizável para consumo.	4
Figura 2.2: Exemplo de estrutura de um dipeptídeo formado a partir de dois aminoácidos	14
Figura 2.3: Estrutura básica de um aminoácido.	14
Figura 2.4: Condições ideais de permeação em coberturas comestíveis protetoras. O comprimento das retas indicam a proporcionalidade de permeação ideal.	16
Figura 2.5: Estrutura molecular do polímero natural celulose.	19
Figura 2.6: Estrutura molecular dos monômeros comumente encontrados na hemicelulose	19
Figura 2.7: Etapas gerais de isolamento da celulose das fibras vegetais.	20
Figura 2.8: Esquema ilustrativo da ocorrência das fibrilas de celulose na estrutura hierárquica de uma fibra vegetal de eucalipto.	23
Figura 2.9: Ângulo de contato de equilíbrio entre um líquido e uma superfície sólida ideal	32
Figura 2.10: Valores de ângulo de contato e suas respectivas classificações.	33
Figura 2.11: Esquema de funcionamento do microscópio de força atômica.	35
Figura 4.1: Circunferência para localização de cores do ângulo de Hue.	39
Figura 4.2: Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) preparada para o teste de flexão a três pontos em fêmur de rato. A: Célula de carga (1kN); B: Haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: Amostra a ser analisada (Fêmur); D: Suporte; E: Painel de controle.	42
Figura 4.3: Fêmur submetido a ensaio de flexão a três pontos.	43
Figura 4.4: Foto do equipamento microtomógrafo de raios-X Sky Scan 1172.	44
Figura 5.1: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de maçãs revestidas com 4% de zeína, 0,25% de nanofibra e AO (ácido oleico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).	46

Figura 5.2: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de maçãs revestidas com 4% de zeína, 0,5% de nanofibra e AO (ácido oleico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).	46
Figura 5.3: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de peras revestidas com 4% de zeína, 0,25% de nanofibra e AO (ácido oleico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).	47
Figura 5.4: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de peras revestida com 4% de zeína, 0,5% de nanofibra e AO (ácido oléico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).	47
Figura 5.5: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de maçãs revestidas com zeína + 0.1% de nanofibra de celulose, variando-se a concentração de ácido oleico (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.	48
Figura 5.6: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de peras revestidas com eína + 0.1% de nanofibra, variando-se a concentração de ácido oleico (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.	49
Figura 5.7: Gráfico do ângulo de contato em relação ao tempo de filmes contendo 4% de zeína + 0.1% de nanofibras de celulose, variando a concentração de AO em 0,25; 0,5 e 1%.	51
Figura 5.8: Fotos de ângulo de contato dos filmes de 4% Z + 0.1% de NFC + 0.5% de AO nos tempos de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 segundos.	51
Figura 5.9: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de maçãs (epicarpo). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.	52
Figura 5.10: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de peras (casca). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%......	53
Figura 5.11: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de maçãs (polpa). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.	54

Figura 5.12: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de peras (polpa). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.	54
Figura 5.13: Gráfico de coloração do epicarpo em relação ao tempo de maçãs revestidas com 4% de zeína, 0,1% de nanofibra de celulose e variação de ácido oleico em 0,25; 0,5 e 1%.	55
Figura 5.14: Gráfico de coloração do epicarpo em relação ao tempo de peras revestidas com 4% de zeína, 0,1% de nanofibra de celulose e variação de ácido oleico em 0,25; 0,5 e 1%.	56
Figura 5.15: Imagem de microscopia de força atômica de filmes contendo 4% de zeína + 0.1% de nanofibras de celulose + 0,25% de AO.....	57
Figura 5.16: Imagem de microscopia de força atômica de filmes contendo 4% de zeína + 0.1% de nanofibras de celulose + 0,5% de AO.	58
Figura 5.17: Imagem de microscopia de força atômica de filmes contendo 4% de zeína + 0.1% de nanofibras de celulose + 1% de AO.	59
Figura 5.18: Gráfico de massa média dos animais durante as 8 semanas do experimento.	60
Figura 5.19: Gráfico da média acumulada de ingestão hídrica dos animais.	61
Figura 5.20: Gráfico da média acumulada do consumo de ração dos animais	62
Figura 5.21: Gráfico da média acumulada da eliminação de urina dos animais.	63
Figura 5.22: Gráfico da média acumulada da eliminação das fezes dos animais.	64
Figura 5.23: Imagem 3D do corte transversal de vértebras dos animais em experimento (a) experimental (b) controle.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Tipos de nanocristais de celulose obtidos a partir da hidrólise ácida.	25
Tabela 5.1: Teor de proteína realizado em rações revestida e não revestida.	62
Tabela 5.2: Tabela de peso dos testículos, próstata e vesícula seminal dos ratos após a eutanásia	65
Tabela 5.3: Tabela de peso dos órgãos: Rim, Baço, Fígado e Coração.	65
Tabela 5.4: Testes Sanguíneos dos animais.	66
Tabela 5.5: Parâmetros biomecânicos dos ossos dos animais.	67
Tabela 5.6: Tabela de densitometria óssea dos animais.	68
Tabela 5.7: Tabela de Microtomografia da vértebra dos animais.	68

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

PIB – Produto Interno Bruto

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

FDA – Food and drugs administration

NFC – Nanofibras de celulose

SAM - S-adenosil L-metionina

ACC - ácido 1- amino-acil-ciclo-propano 1-carboxílico

CMC - Carboximetilcelulose

HMPC - Hidroxipropilcelulose

GRAS - Generally Recognized as Safe

KDa - KiloDalton

Mr – Massa relativa

α - Alfa

β - Beta

θ - Teta

Å - Angstrom

MFA – Microscopia de Força Atômica

PID – Proporcional, Integral, Diferencial

AO – Acido oleico

AC – Ângulo de Contato

Z - Zeína

TGO – Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP – Transaminase Glutâmico Pirúvica

MC – Massa Corporal

CMO – Conteúdo Mineral Ósseo

DMO – Densidade Mineral Óssea

Resumo

O Brasil é um grande produtor de frutas, porém as perdas relacionadas ao manuseio pós-colheita são consideráveis, sendo importante o desenvolvimento de metodologias que as reduzam. Uma técnica que tem sido usada é aplicação de revestimentos comestíveis com o objetivo aumentar o tempo de prateleira do fruto. O presente trabalho avaliou o uso de filmes a base de zeína, proteínas de reserva do milho, com a adição de plastificantes e nanofibras de celulose, para recobrimento de peras e maçãs. As zeínas são proteínas hidrofóbicas e podem formar uma barreira contra a perda de umidade e as trocas gasosas, reduzindo assim a taxa de respiração dos frutos e conseqüentemente aumentando o seu tempo de prateleira. As soluções filmogênicas testadas foram obtidas utilizando-se 4% de zeína com adição de diversas concentrações de nanofibras de celulose e plastificantes. As soluções foram aplicadas sobre peras e maçãs por imersão. As frutas foram avaliadas quanto a perda de massa, aparência e textura. Para isso utilizamos as técnicas de: colorimetria, texturômetro e acompanhamento da perda de massa, onde foi mostrado que a melhor concentração foi a de 4% de zeína + 0,1% de nanofibras de celulose + 0,5% de ácido oleico, pois obtivemos um aumento de cerca de 30 dias no tempo de prateleira das frutas, além disso, houve uma melhor conservação na coloração natural das frutas e na textura em relação as outras concentrações. Para caracterização dos filmes foram utilizadas as técnicas de análise de ângulo de contato e microscopia de força atômica, onde também podemos observar que o melhor resultado para esses dois parâmetros foi o filme de 4% de zeína + 0,1% de nanofibras de celulose e 0,5% de ácido oleico, pois os filmes ficaram menos hidrofílicos e mais homogêneos. Para avaliar a toxicidade do filme produzido foi feito um experimento com ratos machos da linhagem Wistar, divididos em dois grupos, sendo que o primeiro grupo foi alimentado com ração revestida com solução filmogênica, e o segundo grupo recebeu a ração sem revestimento. Durante o experimento foram compilados o consumo de ração e água e coletadas todas as excreções. Após o experimento foram coletados vários órgãos para análise.

Palavras – chave: filmes comestíveis, zeína, nanofibra de celulose, frutas, nanotoxicologia.

ABSTRACT

Brazil is a major producer of fruit, but the losses related to postharvest handling are considerable high, and it is important to develop methods to reduce them. Analysis techniques were used is the application of edible coatings in order to increase the shelf life of the fruit. This study evaluated the use of zein based films, storage proteins from corn, with the addition of plasticizers and cellulose nanofibers, for covering pears and apples. The zein are hydrophobic proteins and can form a barrier against moisture loss and gas exchange, thus reducing the rate of fruit respiration and consequently increasing its shelf life. The filmogenic solutions tested were obtained using 4% zein with addition of different concentrations of cellulose nanofibers and plasticizers. The solutions were applied on apples and pears by immersion. Fruits were evaluated for weight loss, appearance and texture, where it was shown that the optimal concentration was 4% + 0.1% zein cellulose nanofibers + 0.5% oleic acid, as obtained an increase of about 30 days the shelf life of fruit in addition there was better preservation of fruits in natural color and texture compared to other concentrations. For this we use techniques: colorimetry, texturometer and monitoring of mass loss. For characterization of the films were used analysis techniques and contact angle atomic force microscopy, where we also observe that the best result for these two parameters was the movie 4% zein + 0.1% cellulose nanofibers and 0.5% oleic acid, because the films were less hydrophilic and more homogeneous. To evaluate the toxicity of produced film an experiment was conducted with male Wistar rats that were divided into two groups: the first group was fed with feed coated with filmogenic solution, and the second group received a diet without coating. During the experiment they documented the intake of food and water, and collected all excrement. After the experiment various organs were collected for analysis. The results of this experiment indicated that the solution filmogenic showed no toxic effect on the mice. The results of the experiments with the fruit specified the solutions were more efficient for the preservation of fruit quality in the study.

Key Words: Edible films, zein, cellulose nanofiber, fruits, nanotoxicology.

1. Introdução

Nas últimas décadas, a alimentação tem sido motivo de preocupação em todos os países, tanto pela comercialização, quanto pelos problemas de contaminação dos alimentos. Entre as principais causas do aumento das doenças transmitidas por alimentos, está a mudança dos hábitos alimentares com a preferência pelos alimentos frescos e *in natura* (ZANELLA, 2007).

Hoje o Brasil conta com uma produção de frutas que supera os 34 milhões de toneladas. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas abrange 2,2 milhões de hectares, gera 4 milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de US\$ 11 bilhões (SPOTO, 2009). As exportações de frutas do Brasil cresceram nos últimos 10 anos em torno de 200%. No entanto ainda há muitas perdas no que se refere ao manuseio, armazenamento e transporte. (VILELA et al, 2003).

Estudos realizados constataam que no Brasil os níveis médios de perdas em pós-colheita são de 35%, chegando a atingir mais de 40% para algumas frutas (BARROS, 1994). Índice muito alto em comparação com a Europa, cujas perdas são inferiores a 25% (ARTÉS, 2008) e Estados Unidos, onde as médias aproximam-se de 16% (BURG, 2004). Na safra de 2001, por exemplo, foram colhidas 15 milhões de toneladas de frutas, das quais foram perdidas mais de 5 milhões de toneladas, que gerou, para a sociedade um prejuízo de US\$ 1,026 milhões¹.

As perdas agrícolas se constituem de reduções na quantidade física do produto disponível, que podem diminuir a qualidade, o valor comercial e nutritivo. (TSUNECHIRO et al., 1994). A utilização de embalagem imprópria, comercialização do produto a granel, a não utilização da cadeia do frio durante o processo de comercialização, transporte inadequado, condições das estradas, classificação não padronizada, toque excessivo por parte dos consumidores e exposição inadequada são as principais causas de perdas de frutas e hortaliças no Brasil segundo os relatos do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MARTINS & FARIAS, 2002).

Desta forma, é fundamental a busca por melhorias no processo de pós-colheita, que minimizem as perdas decorrentes de tais processos. Hoje a técnica mais empregada para a conservação, seja na comercialização ou na estocagem, é a manutenção da cadeia do frio. Porém uma forma que tem sido cada vez mais empregada é o acondicionamento em embalagens poliméricas semipermeáveis.

1 Valor estimado com base nos preços médios de atacado no CEAGESP em 2001 (VILELA et. al, 2003).

Uma alternativa é uso de coberturas aplicadas diretamente sobre as frutas para preservá-las. As coberturas atuam tornando as frutas mais resistentes às perdas gasosas, que é um dos principais fatores responsáveis pela perda de qualidade e, conseqüente, alteração das características desejáveis em uma fruta para ser consumida *in natura* (MARTINS & FARIAS, 2002).

Neste sentido, existe forte demanda para o desenvolvimento de novas tecnologias para a conservação pós-colheita, como as coberturas ou filmes comestíveis, que, isoladas ou associadas às práticas convencionais, podem elevar significativamente a manutenção dos parâmetros de qualidade e vida de prateleira.

O emprego de filmes ou coberturas comestíveis aplicados diretamente sobre produtos alimentícios, particularmente frutas, pode contribuir para minimizar perdas permitindo manuseio e transporte. Os filmes comestíveis agem como barreiras para a entrada e saída da água, oxigênio. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não descreve uma legislação específica para revestimentos comestíveis. Assim, estes revestimentos são considerados ingredientes, quando melhoram a qualidade nutricional do produto, ou aditivos, quando não aumentam o seu valor nutricional. Devem obedecer ao Decreto 55.871, de 26 de março de 1965; à Portaria no 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 e à Resolução CNS/MS no 04, de 24 de novembro de 1998, referentes ao regulamento sobre aditivos e coadjuvantes de tecnologia e também às considerações do *Codex Alimentarius*, do *Food and Drugs Administration* (FDA) e todas suas atualizações pertinentes.

Este trabalho teve como objetivo estudar a aplicação de revestimentos comestíveis baseados em proteínas de reserva do milho, as zeína, com adição de nanofibras de celulose (NFC) em frutas e a influência que exercem sobre a manutenção da qualidade e na vida de prateleira do fruto.

2.Revisão Bibliográfica

2.1 Dinâmica de Amadurecimento das frutas.

As frutas, legumes e hortaliças são componentes essenciais da dieta humana. Eles se caracterizam por não possuírem colesterol, como a maioria dos produtos de origem vegetal e apresentarem, normalmente, baixos teores de gorduras. Desempenham um importante papel nutricional na alimentação do dia a dia, fornecendo principalmente vitaminas, minerais, fibras e energia.

Entretanto, os frutos e hortaliças são produtos perecíveis que apresentam metabolismo ativo, durante o período pós-colheita. Logo, a forma como são processados, neste período, assume um papel de destaque no incremento da disponibilidade de alimentos.

A fisiologia pós-colheita trata dos processos funcionais do vegetal de seu ambiente normal de crescimento e o momento final de sua utilização ou deterioração completa. Os fatores relacionados à pré-colheita e colheita também são considerados como componentes vitais no estudo da pós-colheita, pois influenciam diretamente a qualidade e durabilidade do produto.

Algumas hortaliças, botanicamente, são frutos e, como tal, os processos fisiológicos e metabólicos são os mesmos que os dos frutos carnosos e adocicados. Estes últimos são colhidos maduros² ou completamente maduros, ao passo que aqueles consumidos como hortaliças são colhidos, em sua maioria, ainda imaturos

2.1.1 Ciclo de Vida dos Frutos

As mudanças físicas e físico-químicas durante o desenvolvimento e maturação dos frutos são usadas como critério para determinar padrões de maturidade, ponto de colheita e qualidade em vários frutos.

Durante a vida do fruto, esse passa por diversas etapas ou estádios (Figura 2.1) com características bem definidas, sendo a conceituação dos mesmos de fundamental importância para o entendimento das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento dos frutos.

2 Frutos fisiologicamente bem desenvolvidos.

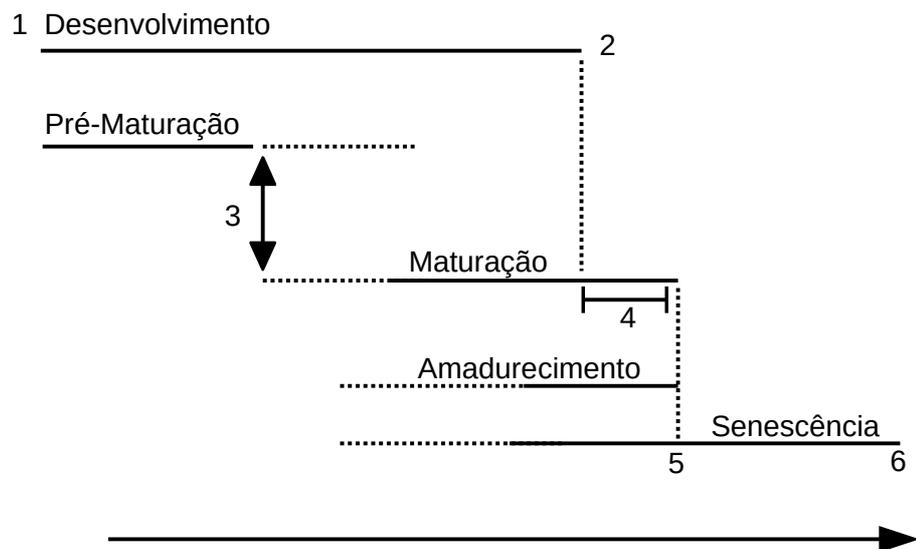


Figura 2.1: Etapas do desenvolvimento fisiológico dos frutos. 1) Início da formação da polpa; 2) Término do crescimento em tamanho; 3) Início do período de consumo, mas, ainda imaturo; 4) Período ótimo de consumo; 5) Predominância de reações degradativas e 6) Não utilizável para consumo, (RYALL; LIPTON, 1979).

Chitarra & Chitarra (2005) utilizam as seguintes terminologias e conceitos para caracterizá-los:

- *Pré-maturação:* como o nome indica, corresponde ao estágio de desenvolvimento que antecede a maturação e, geralmente, inclui a metade do período entre a floração e a colheita. Esse estágio é caracterizado pelo extensivo aumento de volume e termina quando o desenvolvimento do fruto é apenas aceitável, mas não ótimo para o consumo.
- *Maturação:* pode ser definida como a sequência de mudanças bioquímicas, fisiológicas e estruturais dos frutos, conduzindo a um estado que os torna comestíveis. Esse, entretanto, não é um estado fisiológico fixo, pois, pode variar de um para outro fruto e, em alguns casos, as mudanças podem ocorrer até em direções opostas. Por exemplo, em mamão, há uma perda de ácido cítrico no fruto maduro, ao passo que, em bananas, ocorre o inverso, ou seja, um acúmulo desse ácido.
- *Amadurecimento:* é um evento interessante no ciclo vital dos frutos, por transformá-los em produtos atrativos e aptos para o consumo humano. É uma etapa intermediária entre o final do desenvolvimento e o início da senescência, sendo um processo normal e irreversível.
- *Pré-climatério:* etapa da maturação que antecede a elevação súbita da produção de etileno e da atividade respiratória em alguns tipos de frutos.

- *Climatério: corresponde a elevação súbita da produção autocatalítica de etileno e da respiração em alguns tipos de frutos, induzindo ao rápido amadurecimento dos mesmos (frutos climatéricos, ex.: mamão).*
- *Pós-climatério: fase de declínio na produção súbita de etileno e na atividade respiratória de alguns tipos de frutos, indicativa do início de senescência.*
- *Senescência: corresponde aos processos que ocorrem após a maturidade fisiológica ou horticultural e por serem processos degradativos, resultam na morte dos tecidos.”*

O ciclo de vida dos frutos é composto por três fases fisiológicas após a germinação: crescimento, maturação e senescência. O crescimento corresponde ao aumento do tamanho ou volume celular, pela biossíntese de novos constituintes celulares, e às mudanças qualitativas nas células. O volume das células é o fator mais importante no crescimento do fruto. A expansão celular, é influenciada pela plasticidade da parede celular, pelo grau de desenvolvimento da parede secundária, pelo turgor e pela resistência do epicarpo e de outras camadas protetoras. Esses fatores são influenciados pelos reguladores de crescimento e pelo ambiente. As variações nos fatores ambientais (luz, temperatura, precipitação pluviométrica, solo, etc.) tem influência marcante na fase de desenvolvimento do produto. O desenvolvimento (formação, crescimento e maturação) das plantas e seus órgãos ocorre mediante uma série dinâmica de processos fisiológicos e bioquímicos geneticamente programados, culminando com a senescência e morte celulares. (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

Inibição dos mecanismos de oposição ao crescimento, a produção de energia necessária para o processo, a canalização de nutrientes para o órgão em crescimento e o estímulo dos mecanismos biossintéticos, são os processos fisiológicos e metabólicos que fazem com que ocorra o crescimento dos frutos. A vida dos frutos pode ser separada em dois períodos de crescimento: a pré-antese, e a pós-fertilização. Na pré-antese, o crescimento ocorre principalmente por divisão celular e na pós-fertilização ocorre a expansão celular que é o evento principal do crescimento. A divisão celular cessa gradualmente durante a antese, a passo que a expansão celular inicia-se e torna-se responsável pela última parte do aumento de volume do fruto (CHITARRA & CHITARRA, 2005). Segundo Berilli et al. (2007), a fase de crescimento é uma etapa de desenvolvimento do fruto onde ocorrem as alterações quantitativas que resultam no aumento de peso, volume, diâmetro, comprimento, cavidade ovariana e espessura de polpa desse órgão. Tal fase é bastante influenciada por fatores do ambiente, como temperatura, radiação solar e precipitação, além de fatores genéticos intrínsecos de cada material vegetal.

A maturação ocorre antes que o seu completo desenvolvimento fisiológico seja atingido, é uma etapa intermediária entre o final do desenvolvimento e o início da senescência, sendo um processo irreversível; porém, pode ser retardado com o uso de meios adequados. É uma etapa interessante no ciclo de vida do fruto, por transformá-los em produtos atrativos e aptos para o consumo humano. Os frutos são normalmente colhidos nesse estágio, e após vivem utilizando-se dos nutrientes acumulados. Inicia-se, em geral, antes que o crescimento termine e inclui diferentes alterações na composição, que variam de acordo com o tipo de fruto. Este emerge de um estágio incompleto, atingindo o crescimento pleno e máxima qualidade comestível. Grande parte do processo ocorre com o fruto ainda não colhido. Após a maturação, não há mais aumento no tamanho do fruto. A fase final da maturação é designada como amadurecimento, sendo, porém, excluída do desenvolvimento, uma vez que nessa etapa há predominância de processos degradativos (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

O amadurecimento corresponde basicamente às mudanças nos fatores sensoriais: sabor, odor, cor e textura, que tornam o fruto aceitável para o consumo. Ocorrem desde os últimos estádios de desenvolvimento até as etapas iniciais da senescência, resultando em características de estética e qualidade para o fruto. É nessa fase que, as mudanças sensoriais, desenvolvem-se em conjunto com o aumento da doçura e com a redução da acidez. O fruto torna-se macio e mais colorido em decorrência da degradação da clorofila e do desenvolvimento acentuado de pigmentos carotenoides e flavonoides. Algumas dessas mudanças podem ser detectadas por análise ou observação visual das transformações físicas, ou pela análise das transformações endógenas, como mudanças nos teores de pigmentos, ácidos, taninos, carboidratos, pectinas, etc. Essas transformações parecem estar sincronizadas e encontram-se, provavelmente, sob controle genético. Essa afirmativa tem suporte no fato de que o intervalo entre a antese e o amadurecimento, em condições climáticas similares, é relativamente constante, para um determinado fruto (SALUNKHE & DESAI, 1984).

Não há uma distinção bem delineada entre amadurecimento e senescência. A senescência é um período na vida de um órgão vegetal, no qual as sínteses diminuem (processos anabólicos), havendo predominância nas degradações (processos catabólicos), que são responsáveis pelo envelhecimento e morte dos tecidos. O processo de senescência aumenta a probabilidade de morte, não só porque há predominância de reações catabólicas, mas, também, porque há desidratação dos tecidos e, em alguns casos, invasão acentuada de microrganismos. Nos frutos, esses processos bioquímicos do envelhecimento substituem as trocas químicas do

amadurecimento. A senescência pode ocorrer antes ou após a colheita e ocorre porque, na fase final, a capacidade de síntese do tecido vegetal é muito limitada. Nesse período, as transformações tendem para o lado das degradações, o que determina a perecibilidade dos órgãos vegetais (SALUNKHE & DESAI, 1984).

Os frutos são similares em suas atividades fisiológicas e comportamento metabólico, embora apresentem diferenças na sua morfologia e em sua composição. Para que ocorra o completo desenvolvimento fisiológico, e para que ocorram as alterações metabólicas, o fruto depende da planta mãe para realizar a fotossíntese nas folhas, absorção de minerais e água pelas raízes, transporte de materiais orgânicos e inorgânicos pelo sistema radicular e depende, principalmente, dos fitormônios, que estão presentes ou sintetizados nos tecidos, que regulam o processo de desenvolvimento e de amadurecimento (CHITARRA & CHITARRA, 2005). Portanto é fundamental o conhecimento das diferentes fases ou etapas da vida do fruto, não só para a realização da colheita na época apropriada, mas também para a utilização de tecnologias que propiciem a manutenção da qualidade com aumento da vida útil do produto.

2.1.2 Respiração de um fruto

O processo de respiração é fundamental no amadurecimento dos frutos, pois várias reações acopladas à respiração são responsáveis pela síntese de inúmeros compostos, tais como pigmentos, compostos fenólicos e fitormônios (PURVIS, 1997), assim como influenciam a longevidade das frutas na pós-colheita, provocam modificações profundas nos seus constituintes químicos, levando à perda de umidade e à rápida senescência (WILLS et al., 1981).

O padrão da atividade respiratória em frutos pode ser dividido em climatéricos e não-climatéricos. Frutos climatéricos são caracterizados por apresentarem aumento na produção de CO₂ acompanhado de um pico autocatalítico de produção de etileno (KAYS & PAULL, 2004; LELIÈVRE et al., 1997; P'ERIN et al., 2002), o que não é observado nos frutos não-climatéricos (KAYS & PAULL, 2004; LURIE & KLEIN, 1989; RHODES, 1980). Em frutos climatéricos o etileno é necessário para coordenar e completar o amadurecimento (Giovannoni, 2001). Nos frutos não climatéricos a respiração diminui durante o amadurecimento e as transformações bioquímicas, que tornam o fruto maduro, ocorrem de

forma mais lenta (Wills et al., 1998). Nestes o amadurecimento só ocorrerá se o fruto estiver ligado à planta, diferentemente dos frutos climatéricos que possuem a capacidade de amadurecer mesmo após a colheita.

Iwata et. al (1969), propõem uma classificação mais conveniente para os padrões respiratórios dos frutos, sendo eles: decréscimo gradual, como o próprio nome diz a respiração diminuiria gradualmente; ascensão temporária, na qual a respiração aumentaria temporariamente com completo amadurecimento após o pico respiratório; e pico tardio, no qual a taxa máxima de respiração é apresentada desde o estágio completamente maduro até o supermaduro. De um modo geral, a taxa de respiração é indicativa da rapidez com que as mudanças de composição ocorrem no fruto. Se o fruto for colhido na fase de ótima qualidade comestível, ou próximo a essa condição, poderá apresentar uma elevada taxa de deterioração antes da comercialização, ou seja, frutos com taxas de respiração relativamente baixas são os que podem ser armazenados por períodos mais longos sem perda da aceitabilidade.

2.1.3 Produção de hormônios do amadurecimento (etileno)

O hormônio do amadurecimento, como é conhecido o etileno, é formado a partir do aminoácido metionina, via SAM (S-adenosil L-metionina). O SAM é convertido em ACC (ácido 1- amino-acil-ciclo-propano 1-carboxílico), sendo catalisado pela enzima ACC sintase. A ACC é então oxidada a etileno através da ação da enzima ACC oxidase (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O etileno é biologicamente ativo em quantidades não detectadas e seus efeitos são comercialmente importantes na agricultura (ABELES et. al, 1992). As taxas de produção do etileno pelos tecidos são geralmente baixas, e a concentração necessária para induzir o amadurecimento é dependente da espécie e do estágio de maturação dos frutos (YANG, 1985).

O etileno intervém, em nível molecular, na indução da expressão de numerosos genes, que durante o amadurecimento parece ser regulada por dois caminhos, um é etileno-dependente e o outro etileno-independente. De acordo com Taiz & Zeiger (2004), num estudo realizado com

tomates, observaram que os genes envolvidos com a biossíntese de licopeno, aroma e metabolismo respiratório são considerados dependentes, enquanto os genes que codificam a enzima clorofilase e a ACC oxidase parecem ser independentes do etileno.

Em frutos climatéricos, o etileno promove aumento da biossíntese das enzimas da sua própria rota metabólica, caracterizando a produção autocatalítica. O aumento da biossíntese de etileno, durante o período climatérico, é considerado o fator responsável pelo início do amadurecimento em frutos climatéricos (ABELES et. al, 1992; BIALE, 1960; GRIERSON, 1987; MCGLASSON, 1985; OETIKER & YANG, 1995).

Biale (1960) distinguiram dois sistemas de produção de etileno (sistema I e sistema II), os quais estão associados com as fases pré-climatérica e climatérica. O sistema I é responsável pelos baixos níveis de produção de etileno presente no pré-climatérico e na produção de etileno pelos tecidos vegetais e frutos não climatéricos (ABELES et. al, 1992; OETIKER & YANG, 1995).

A fase climatérica é decorrente do sistema II da biossíntese de etileno, no qual ocorre a produção autocatalítica. Neste processo ocorre o aumento na produção autocatalítica do etileno, devido ao aumento na atividade da ACC sintase (VENDRELL & PALOMER, 1997).

Yang (1985) afirma que o fator que leva ao amadurecimento é a diminuição da resistência à ação do etileno, portanto, o aumento da produção de etileno pelo sistema I não seria pré-requisito para iniciar o amadurecimento. Este autor classifica os frutos climatéricos em frutos do tipo I, os quais apresentam aumento na produção de etileno antes do início do amadurecimento e frutos do tipo II, nos quais o começo do amadurecimento não é precedido por aumento na produção de etileno.

A aplicação de etileno no pré-climatérico, em frutos do tipo climatérico, antecipa o amadurecimento e por consequência a senescência. Em frutos não climatéricos ocorre aumento na atividade respiratória, seguida de queda imediata, o que não se reflete em amadurecimento.

2.2. Filmes Comestíveis.

Filmes comestíveis têm recebido considerável atenção nos últimos anos devido às suas vantagens sobre os filmes sintéticos, quanto à biodegradabilidade, biocompatibilidade e por causarem menor impacto ambiental, embora a principal vantagem seja que, por serem atóxicas, são passíveis de serem consumidas com os produtos (BOUTOOM et. al., 2006). Podem ser definidas como uma fina camada de material que pode ser consumida junto ou separado do alimento e tem por objetivo protegê-lo, atuando como uma barreira à umidade, gases e movimento de solutos entre o alimento e o meio em que se encontra. Essas coberturas são produzidas a partir de formulações de produtos renováveis, associados a ingredientes e plastificantes naturais que, portanto, se degradam facilmente no ambiente

Um dos primeiros revestimentos utilizados em frutas foi a cera e está em uso na China desde o século XII e XIII, para conservação de laranja e limão. Nessa época, a função de barreira atuando na redução das trocas gasosas em frutos (respiração – transpiração) não era plenamente entendida, mas constatava-se que, quando os frutos eram revestidos com cera, podiam ser estocados por um maior período, com a taxa de preservação das características iniciais superior à dos não revestidos. Na Inglaterra no século XVI, foi utilizada gordura animal (banha) para a conservação de frutos e outros alimentos, principalmente daqueles vindos, via rota marítima, dos países tropicais.

O primeiro plástico obtido foi a partir de uma reação de eliminação de fenol com formaldeído em 1907 pelo químico belga Leo Baekeland e, desde então, uma série de polímeros vêm sendo produzidos fazendo com que a partir de 1950 as embalagens sintéticas predominem no uso em alimentos (KROCTHA & MILLER, 1997).

Os materiais biodegradáveis vêm ganhando espaço na vida dos consumidores e uma busca por iniciativas e qualidade de vida saudáveis vem sendo cada vez mais estudados e avaliados como matéria-prima para a confecção de embalagens alimentares seja para a aplicação *in situ* ou *ex situ*, uma vez que com o amplo uso de materiais sintéticos vem causando impactos ambientais. Dentre os principais materiais biodegradáveis de interesse, estão os de origem agrícola, como proteínas, os polissacarídeos e os lipídeos (ZHANG & MITTAL, 2010). No caso de aplicações específicas como coberturas comestíveis, os filmes formados podem ser

divididos em três categorias: *i*) hidrocolóides, incluindo proteínas e derivados de celulose; *ii*) alginatos, pectinas, amidos e outros polissacarídeos; *iii*) lipídeos, incluindo ceras, acil-gliceróis e ácidos graxos.

Materiais nesta categoria que apresentam potencial para uso na formulação de coberturas e embalagens demonstram propriedades adequadas para atuar como barreira a gases, reduzindo a taxa de respiração, transpiração e perda de água de frutas, elevando o tempo de prateleira destes alimentos (KUORWEL et. al., 2011, MASTROMATTEO et. al., 2011).

Além dos polímeros mencionados acima, para a obtenção de um filme ou revestimento com propriedades mecânicas adequadas, há a necessidade da adição de plastificantes para que apresente relativa flexibilidade e que permita moldar e adequar as alterações de formato ao produto recoberto.

Os plastificantes, quando adicionados aos materiais poliméricos, podem diminuir suas forças intermoleculares e aumentar o volume livre entre as cadeias poliméricas em geral, por serem moléculas pouco voláteis. Os plastificantes reduzem a deformação à tensão, dureza, viscosidade e densidade, ao mesmo tempo que aumentam a flexibilidade e resistência à fratura (VIEIRA et. al., 2011). Os plastificantes comumente adicionados são glicerol, o monoglicerídeo acetilado, o sorbitol e a sacarose (DONHOWE & FENNEMA, 1994). O uso de ácidos carboxílicos, por exemplo, o oleico ou linoleico, também tem sido considerado, principalmente para a elaboração de filmes para aplicação em alimentos.

2.2.1 Polímeros de origem vegetal e animal utilizados na obtenção de filmes comestíveis.

2.2.1.1 Polissacarídeos.

Os polissacarídeos normalmente usados para a confecção de filmes comestíveis incluem a celulose, amido e seus derivados, a pectina e derivados, além de gomas exsudadas, gomas de fermentação e da quitosana. Os polissacarídeos são normalmente obtidos pela biossíntese em plantas ou animais e ainda há polissacarídeos microbianos, como as gomas xantana, gelana entre outros (RINAUDO, 2008).

Revestimentos à base de polissacarídeos, não são adequados para uso como barreira à umidade e, portanto, não previnem os alimentos revestidos quanto à perda de umidade devido à sua natureza hidrofílica. No entanto, por possuírem alto número de grupos polares, reduzem significativamente a permeação de gases apolares como o oxigênio (O₂) e, em certa quantidade, também o dióxido de carbono CO₂ (BALDWIN, 1994).

A celulose é um polissacarídeo passível de uso como aditivo na preparação de coberturas comestíveis, pois em seu estado nativo é insolúvel em meio aquoso. Essa limitação é superada utilizando-se derivados iônicos e não iônicos (grupo hidróxi), da celulose por meio de reação em meio alcalino com ácido cloroacético, cloreto de metila e óxido de propileno para a obtenção de derivados metilados como a carboximetilcelulose (CMC), a metilcelulose (MC) e a hidroxipropilcelulose (HMPC), respectivamente. Os filmes obtidos a partir de MC, HMPC e CMC são geralmente incolores, insípidos, transparentes e com boa resistência a óleos e gorduras (BOUTOOM et. al., 2006).

Um outro polissacarídeo muito importante para o estudo de filmes e embalagens comestíveis é a quitosana, que é um produto derivado da desacetilação da quitina. A quitina está presente no exoesqueleto de insetos e crustáceos, sendo, portanto abundante na natureza (ASSIS & SILVA, 2003). A quitosana forma filmes com boa pasticidade, é considerada não tóxica, além de apresentar atividade antimicrobiana (AIDER, 2010). Diversos autores têm estudado este polissacarídeo para produção de revestimentos capazes de aumentar o tempo de prateleira de morango, lichia, maçã, pêssegos entre outros (ROMANAZZI et. al., 2002).

2.2.1.2 Lipídeos

São representados por uma classe de compostos que têm em comum a insolubilidade em solventes polares. Os lipídeos mais abundantes são os triéster do glicerol (triglicerídeos: óleos e gorduras) e ácidos graxos de cadeia longa, são exemplos: óleos e gorduras, fosfolipídeos, terpenos e esteroides. (BALDWIN, 1994)

Dos diversos tipos de materiais descritos na literatura com propriedades adequadas ao uso como coberturas comestíveis, apenas alguns são empregados em escala comercial. As misturas de componentes de base lipídica, na forma de emulsões mais comuns e disponíveis em

toda uma rede de comercialização são feitas à base de ceras naturais como carnaúba, candelilla, cera de abelha, ceras derivadas de petróleo como polietileno, parafina e PVA e óleos vegetais e minerais.

As ceras, são misturas complexas de lipídeos não polares e demais carboidratos e podem ser classificadas como sendo de origem animal: por exemplo, a cera de abelha ou a cera de *Shellac*; ou de origem vegetal: por exemplo, a cera de carnaúba, a cera de candelilla e a cera de palma, entre outras. A legislação também permite o emprego de ceras de origem mineral e sintética, como a ozocerita, a montânica e a de polietileno. Essas coberturas são consideradas seguras e sua principal atividade é reduzir as trocas gasosas, principalmente o vapor de água, e conferir brilho, aumentando a atratividade do produto aos olhos do consumidor.

2.2.1.3 Proteínas.

São biopolímeros cujas unidades monoméricas são resíduos de aminoácidos unidos por meio de ligações peptídicas. As proteínas são consideradas polipeptídeos, ou seja, resultado da junção de vários aminoácidos, estes, por sua vez, contêm uma cadeia lateral R, a qual pode ser polar ou não. Na figura 2.2, está representada a estrutura de um dipeptídeo formado por dois aminoácidos quaisquer, onde é possível identificar as ligações peptídicas que unem os resíduos de aminoácidos. Assim, dependendo do tipo de aminoácido predominante (Figura 2.3), a estrutura primária de uma proteína (sequencia de aminoácidos) pode ser considerada hidrofílica ou hidrofóbica.

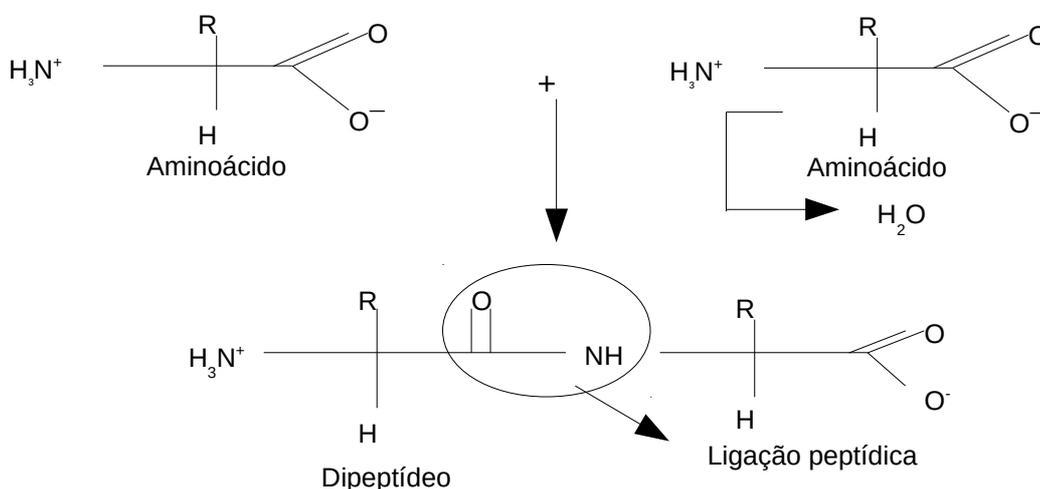


Figura 2.2: Exemplo de estrutura de um dipeptídeo formado a partir de dois aminoácidos (GILLGREN et. al, 2011).

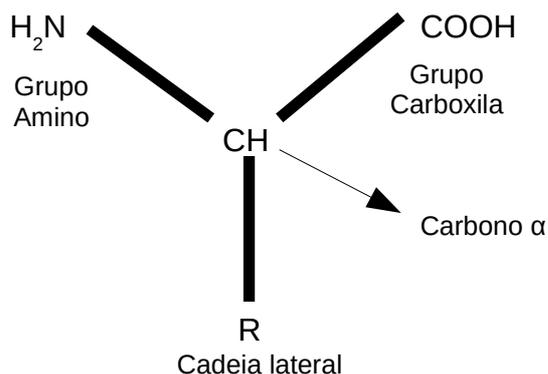


Figura 2.3: Estrutura básica de um aminoácido (GILLGREN et. al, 2011).

As principais proteínas utilizadas para a confecção de filmes comestíveis são as de soja, as proteínas de reserva de cereais como as zeína do milho, o glúten de trigo e as kafirinas do sorgo. Uma das principais características da zeína e das kafirinas é sua hidrofobicidade que permite produzir filmes que servem de barreira contra umidade e oxigênio. No entanto, filmes formados com essas proteínas tendem a ser quebradiços e com baixa flexibilidade, havendo a necessidade da adição de plastificantes, que podem melhorar estas características e permitir a diversificação de aplicações para os filmes (GILLGREN et. al., 2011). Scramin et. al. (2010), obtiveram um aumento no tempo de prateleira de 7 dias em peras revestidas com um tipo semelhante de cobertura. E Colzato et. al. (2011) demonstraram que nozes-macadâmia revestidas com filmes à base de zeína, com a adição de plastificante, tiveram seu processo de rancificação retardado, ou seja, houve aumento em seu tempo de prateleira.

Um outro tipo de filme pode ser obtido a partir de isolados proteicos de soja, e possuem capacidade de formar filmes quando adicionados emulsificantes. Estes interagem com as proteínas, as partes hidrofílicas tanto das proteínas como dos emulsificantes se ligam, aumentando a sua homogeneidade e o mesmo acontece com as partes lipofílicas de ambos,

umentando a estabilidade dos filmes formados estabilidade (OSÉS et. al., 2008, CHAO et. al., 2010). Coberturas, a base de proteínas, têm sido utilizadas para maçãs, peras e oleaginosas com resultados satisfatórios no aumento do tempo de prateleira.

2.2.2 Características desejáveis de um filme comestível.

A principal característica para a formulação de um filme ou cobertura comestível é a de estabelecer uma diferença de pressão de vapor entre o fruto e o meio externo (WORRELL et. al., 2002). Nestas condições são preservadas as características iniciais criando-se, assim, condições para que os atributos de qualidade encontrados no momento do revestimento sejam preservados por um maior período de tempo, independentemente das características hidrofóbicas ou hidrofílicas do material.

A manutenção da qualidade em frutos, no período pós-colheita, está associado a um ambiente de baixo oxigênio associado a níveis moderados de CO₂ (PARK et. al., 1994, ROJAS-GRAU et. al., 2009). Essas condições são mais críticas em produtos minimamente processados, nos quais a presença de O₂ é alta, acelerando as reações de escurecimento enzimático. Assim, coberturas ou filmes que reduzam a penetração de O₂ são desejáveis pois, minimizam reações de peroxidases, contribuindo para evitar alterações colorimétricas indesejáveis. Um aspecto importante é a espessura e a homogeneidade da cobertura, que pode interferir diretamente na estabilidade do produto revestido. A taxa de permeação é função da porosidade e da espessura da cobertura. Em resumo, as condições ideais estão colocadas de forma ilustrativa na figura 2.4.

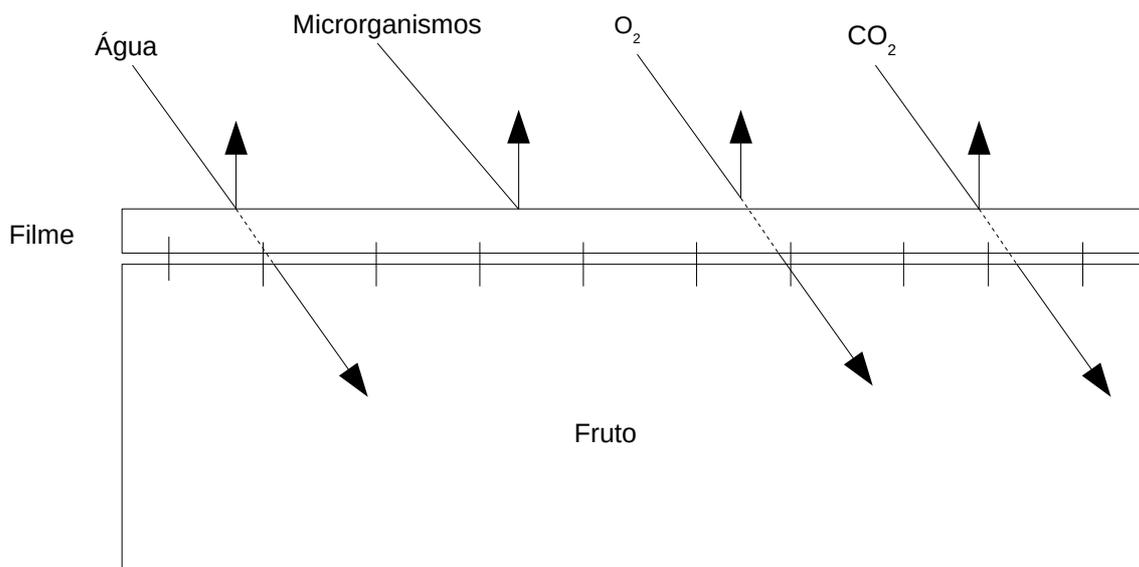


Figura 2.4: Condições ideais de permeação em coberturas comestíveis protetoras. O comprimento das retas indicam a proporcionalidade de permeação ideal.

2.3 A Zeína.

Em função de sua composição química e valor nutricional o milho destaca-se como um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos em todo mundo, seja na alimentação humana ou animal (NUSSIO,1990). O grão de milho possui aproximadamente 70 a 73% de amido, 9 a 10% de proteínas, 4 a 5% de óleos, 1 a 2% de cinzas, 2% de açúcares e 9 a 10% de fibras (JACKSON & SHANDERA, 1995). Uma parcela das proteínas, denominadas proteínas de reserva, recebe o nome de zeína. Estas proteínas recebem esta denominação por serem reserva de nutrientes que o embrião da nova planta a utilizará durante o processo de germinação e de crescimento inicial. Elas são formadas durante o desenvolvimento da planta, acumulando-se nos grãos (TORRES et. al, 2009).

O Brasil, como terceiro maior produtor mundial de milho e primeiro do Mercosul, tem cerca de 15% de sua produção destinada ao consumo industrial nos processos de moagem seca e úmida. A moagem úmida é um processo que envolve transformações químicas, bioquímicas e

operações mecânicas (SINGH et. al, 1996) e, através da qual se inicia o refinamento para a obtenção dos produtos derivados básicos: germe, fibra, proteína (glúten) e amido (LOPES FILHO,1999).

No processo de moagem úmida, há a necessidade de buscar alternativas de uso dos subprodutos obtidos, principalmente para os de menor valor agregado como as frações de fibra e glúten, que vem sendo utilizados, pelo seu baixo custo, basicamente para ração animal. O seu uso em produtos mais elaborados permitirá agregar valor, proporcionando melhores alternativas de uso.

A zeína, prolaminas do milho, são compostas por vários polipeptídeos que representam entre 60 e 70% da massa total das proteínas presentes no endosperma do milho (WU et al, 1997).

Devido à sua natureza hidrofóbica e por serem consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*), a zeína é utilizada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos como material de cobertura para doces, frutas secas, castanhas e comprimidos (LEE et al., 2008). Embora pertençam à família equivalente ao glúten de trigo, a zeína não apresentam a sequência de aminoácidos responsável pela irritação alérgica do trato intestinal em pessoas susceptíveis, conhecida como celíaca.

As zeína são classificadas de acordo com o seu tamanho e solubilidade. As zeína mais abundantes são conhecidas como zeína α , são solúveis em soluções aquosas de etanol a 70% e são constituídas por duas frações proteicas com 19 e 22 KDa de massa relativa (Mr) no de gel de eletroforese contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE) (FORATO, 2000a). Essas proteínas são hidrofóbicas e, devido à presença significativa de resíduos de aminoácidos apolares nos seus domínios repetitivos, são insolúveis em água (POL et. al, 2002; FORATO et. al, 2000b).

Outro interesse pelas zeína é o fato de serem biodegradáveis e renováveis, causando assim mínimo impacto ambiental com seu uso (BAI et. al, 2003; BALDWIN et. al, 1999; OH et. al, 2004; ROTHFUS, 1996).

Estudos preliminares realizados com filmes à base de zeína e propilenoglicol, como plastificante, para proteger maçãs gala indicaram a presença de uma larga faixa de pressões parciais externas na fruta coberta com tais misturas, ou seja, a permeabilidade a gases é maior do que nos revestimentos normalmente utilizados (BAI et. al, 2003).

Os filmes de zeína possuem baixa permeabilidade a oxigênio e dióxido de carbono (LAWTON, 2002) no entanto uma maior permeabilidade a gases pode ser obtida alterando-se a quantidade de plastificante empregada na confecção do filme (PARK et. al, 1999).

2.4 Fibras Vegetais

As fibras vegetais são exemplos de sistema complexos desenvolvidos pela natureza. Seja por funções no universo biológico ou pelas aplicações industriais, as fibras vegetais são um dos materiais biodegradáveis de uso como agente de reforço de maior importância nos dias de hoje (MOREIRA et. al, 2010).

Devido à sua estrutura única, as fibras vegetais têm sido consideradas como um composto de ocorrência natural. As fibras vegetais correspondem a uma sobreposição de camadas (parede primária e secundária, lamela média) que são constituídas quimicamente por uma intrincada mistura de macromoléculas. Celulose, lignina e hemicelulose são os três principais constituintes destes materiais, os quais servem como agente de reforço e matriz polimérica (JOHN & THOMAS, 2008; N-S HON & SHIRAIISHI, 2000). As fibras contêm ainda outras substâncias de menor massa molecular como fenóis, minerais e ceras. A proporção destes componentes depende do tempo de maturação, origem botânica e das condições utilizadas para se obter a fibra (N-S HON & SHIRAIISHI, 2000).

A celulose é o polímero natural mais abundante na natureza, sendo produzida a uma velocidade anual de 10^{11} - 10^{12} toneladas. É o componente predominante em quase todas as fibras vegetais e consiste em um polissacarídeo formado por unidades anelares denominadas D-glicopirranose, figura 2.5. Estes anéis são unidos por ligações glicosídicas do tipo β entre os carbonos 1 e 4 gerando cadeias altamente lineares e com massa molar tão alta quanto $3,2 \times 10^6$ g/mol (JOHN & THOMAS, 2008; KLEM et. al., 1998).

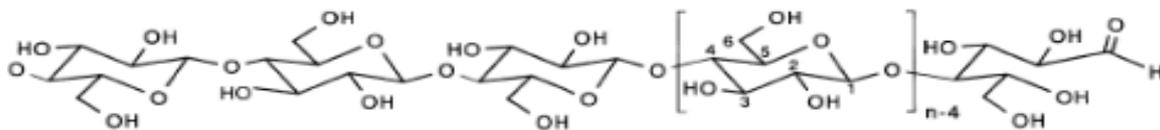


Figura 2.5: Estrutura molecular do polímero natural celulose (KLEM et al., 1998).

Em um vegetal a principal função da celulose é conferir resistência e estabilidade à parede celular das fibras. A celulose apresenta estrutura cristalina e é insolúvel em água, enquanto o resto dos componentes das fibras são materiais amorfos facilmente permeáveis, formada de polissacarídeos não celulósicos, tais como, hemiceluloses, pectinas, glicoproteínas (proteínas estruturais e enzimas) (N-S HON & SHIRAIISHI, 2000; KLEM et. al, 1998).

A lignina, atua como um agente permanente de ligação com as cadeias de celulose, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobramento, além de causar um decréscimo na permeação de água através das paredes das fibras vegetais (N-S HON & SHIRAIISHI, 2000; FENGEL & WENEGER, 1984).

A hemicelulose é um polímero formado por diversas unidades monoméricas, figura 2.6. Ela exerce importante função na regulação do crescimento das estruturas vegetais, além de atuar como ligante entre celulose e lignina, porém tem pouca contribuição sobre a resistência mecânica das fibras (N-S HON & SHIRAIISHI, 2000).

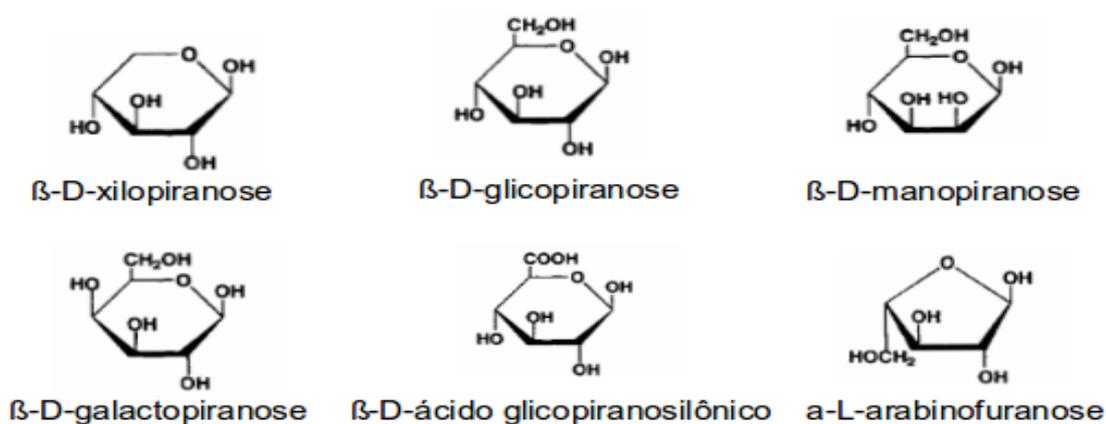


Figura 2.6: Estrutura molecular dos monômeros comumente encontrados na hemicelulose (N-S HON & SHIRAIISHI, 2000).

Ao contrário da celulose, a hemicelulose tem baixa massa molar e é amorfa o que a torna mais facilmente hidrolisável. A grande importância da hemicelulose reside em vários processos industriais como a produção de açúcares fermentáveis e combustíveis como o etanol (LIMA et. al., 2003).

2.4.1 Métodos Químicos de Isolamento da Celulose.

A celulose como uma matéria-prima vegetal tem sido empregada aos longos dos séculos para diversos fins, tais como material de construção, fibras têxteis, papel e para síntese química de derivados hidrossolúveis. Contudo, o uso da celulose depende primeiramente do isolamento dos demais componentes das fibras vegetais, o que requer tratamentos de grande seletividade (KLEM et. al., 1998; FENGEL & WENEGER, 1984).

Vários tratamentos químicos de larga escala têm sido desenvolvidos e aprimorados para isolamento da celulose, e pode-se afirmar que a área papelreira é a maior responsável por este desenvolvimento. Eles compreendem a digestão química das fibras, eliminando seletivamente a lignina e a hemicelulose e tendo a celulose como o produto sólido final em um estado quase intacto. Estes tratamentos são conduzidos como processos multi-etapas, figura 2.7, as quais envolvem um tratamento principal chamado deslignificação, ou polpação, seguido por um tratamento final denominado branqueamento (KLEM et al., 1998).

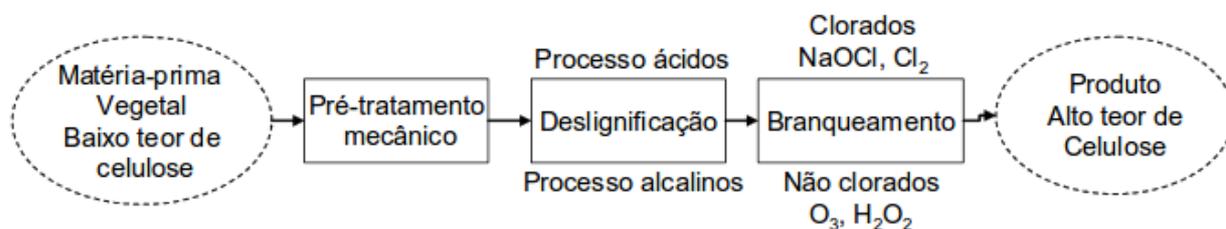


Figura 2.7: Etapas gerais de isolamento da celulose das fibras vegetais (KLEM et. al., 1998).

A deslignificação consiste basicamente na separação da celulose dos demais constituintes mediante utilização de energia de reações químicas. Neste tratamento ocorre elevada degradação da lignina das fibras além de haver solubilização da hemicelulose. Os

métodos de polpação química classificam-se em alcalinos, por exemplo, o método à soda e o Kraft, sendo este último o mais utilizado na fabricação de papel, e os ácidos ou ao sulfito que se baseiam na reação da lignina com $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$, NaHSO_3 ou $\text{Mg}(\text{HSO}_3)_2$ em combinação com SO_2 livre (D'ALMEIDA, 1986).

O branqueamento consiste em um tratamento químico que visa à melhoria das propriedades ópticas da celulose como alvura, clareza e opacidade. O branqueamento envolve a eliminação por hidrólise e oxidação dos grupos cromóforos da lignina residual, aumentando a brancura do produto celulósico. Além das melhorias das propriedades ópticas, o branqueamento pode ser conduzido de forma a preservar ou remover a lignina residual presente na celulose. Neste último caso, o branqueamento pode também ser considerado como uma etapa adicional de purificação da celulose (KLEM et. al., 1998; FENGEL & WENEGER, 1984; D'ALMEIDA, 1986).

A grande maioria dos tratamentos para isolamento da celulose envolve uma série de produtos químicos, especialmente aqueles a base de cloro, os quais geram resíduos de impacto ambiental negativo, como os compostos organoclorados (VENSON, 2008). No entanto, fibras de celulose com alto nível podem ser obtidas a partir de processos TCF (“*totally chlorine-free*”) que utilizam agentes fortemente oxidantes, como ozônio, peróxido de hidrogênio, ácido permonossulfúrico etc. que são menos agressivos ao meio ambiente se comparados às sequências a base de cloro e enxofre (VENSON, 2008; SILVA et. al., 2009).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos reagentes mais versáteis que existem atualmente e tem se tornado essencial em muitos sistemas de branqueamento da celulose. É dos mais fortes agentes oxidantes (potencial padrão de 1,77 V) sendo superior ao permanganato de potássio, dióxido de cloro e cloro molecular além de ser comparável ao ozônio. Seu uso melhora a eficiência dos processos TCF, produzindo fibras celulósicas de elevada alvura e causando menor impacto ao meio ambiente (VENSON, 2008). Dessa forma, o uso do H_2O_2 se mostra como uma rota viável para obtenção de fibras de celulose branqueadas.

2.4.2 Nanofibras de celulose (NFCs)

Nanocristais de celulose, também referidos como *whiskers* ou celulose nanocristalina, são os domínios cristalinos de fonte celulósica isolados por meio de hidrólise ácida e tem encontrado aplicações únicas no desenvolvimento de materiais nanocompósitos. Inseridos neste contexto, os últimos 15 anos têm sido cenário de estudos importantes sobre o uso da celulose como agente de reforço para matrizes poliméricas (EICHHORN et. al., 2010). Isto se deve ao desenvolvimento de metodologias de produção de fragmentos nanométricos de celulose, referidos como fibrilas, de elevada resistência mecânica, na construção hierárquica das fibras vegetais (HUGGE et. al., 2008; PÄÄKÖ et. al., 2007).

A localização e construção desses fragmentos na estrutura de uma fibra são ilustradas no esquema da figura 2.8. As fibrilas são formadas pelo empacotamento de um conjunto de cadeias celulósicas que se baseia no arranjo cristalino do seu polimorfo natural, denominado como celulose I. Este polimorfo apresenta células unitárias monoclinicas ($I\beta$) e triclinicas ($I\alpha$) cuja proporção na fibrila depende unicamente da matéria-prima de origem (EICHHORN et. al., 2010; HUGGE et. al., 2008; LARSSON et al., 1997). Por conseguinte, as fibrilas se agregam para formar estruturas maiores, denominadas como agregados fibrilares. Estes agregados por sua vez atuam como agentes de reforço naturais na matriz amorfa constituída de lignina e hemicelulose, sustentando, por fim, os diferentes tecidos das fibras vegetais (N-S HON & SHIRAISHI, 2000; FENGEL & WENEGER, 1984; SILVA et. al., 2009).

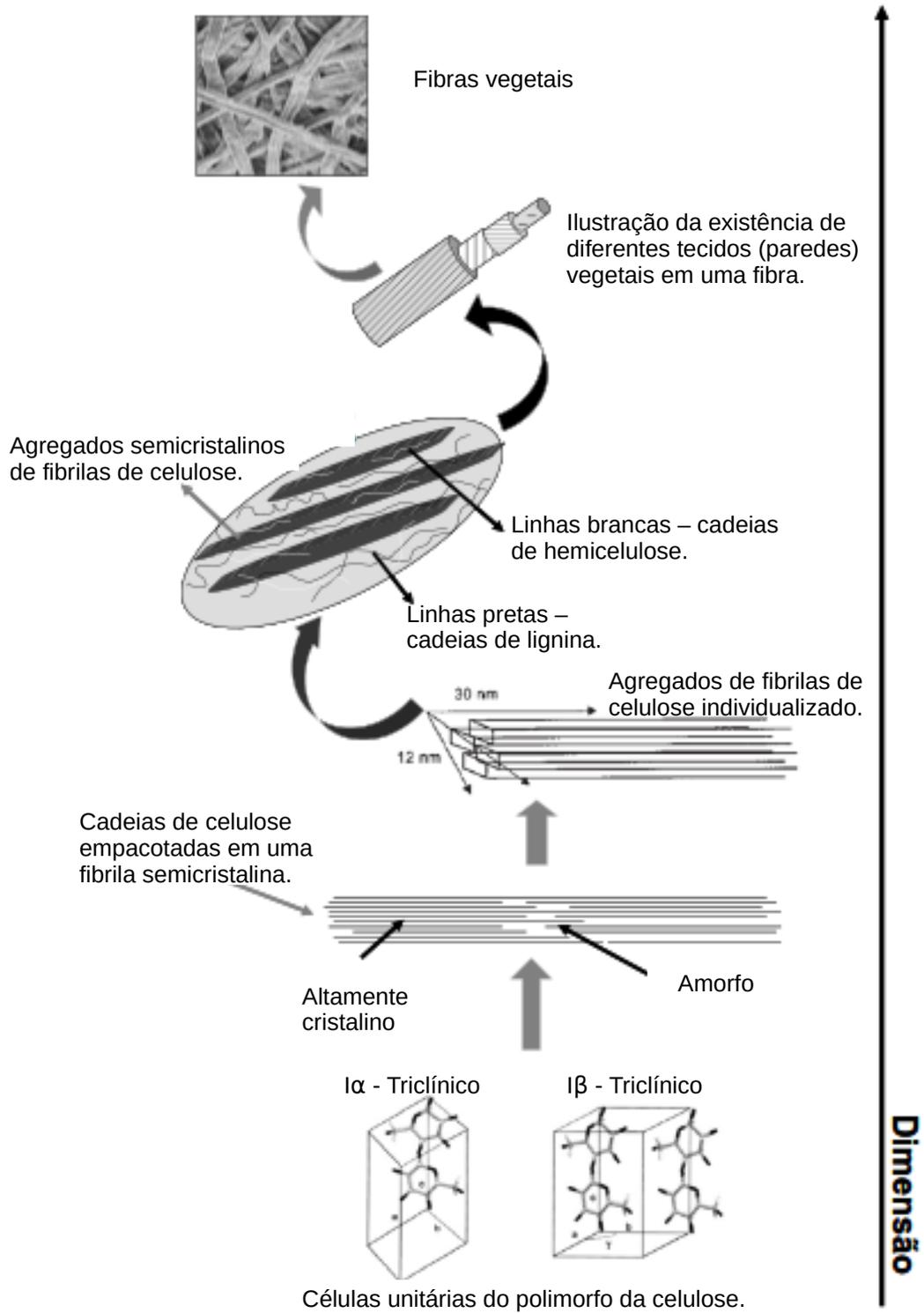


Figura 2.8: Esquema ilustrativo da ocorrência das fibrilas de celulose na estrutura hierárquica de uma fibra vegetal de eucalipto. Figuras adaptadas das referências: N-S HON & SHIRAIISHI, 2000; FENGEL & WENEGER, 1984; SILVA et. al., 2009.

O elevado grau de empacotamento das cadeias de celulose, devido as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, torna difícil a desestruturação dos agregados fibrilares e isolamento das fibrilas por métodos de desmontagem. Todavia, os defeitos de desordem (regiões amorfas) existentes nestes fragmentos têm sido utilizados como pontos de quebra em processos mecânicos e químicos específicos permitindo, dessa forma, a obtenção das nanoestruturas celulósicas (EICHHORN et. al., 2010; OKSMAN & SAIN, 2005).

A desordem nas fibrilas está associada principalmente a dois tipos de regiões amorfas. A primeira resulta de imperfeições de empacotamento das cadeias de celulose localizadas na superfície da nanoestrutura. A segunda, e de maior importância, resulta do término de encadeamento das cadeias de celulose ao longo da direção longitudinal das fibrilas, como ilustrado na figura 2.8, o que gera regiões amorfas intercaladas com as regiões altamente cristalinas (EICHHORN et. al., 2010; FENGEL & WENEGER, 1984; OKSMAN & SAIN, 2005).

Em geral, as características das nanoestruturas de celulose nas aplicações como agente de reforço, tais como morfologia, dimensões e cristalinidade são então altamente dependentes do método de preparação. A hidrólise ácida tem sido um dos métodos mais utilizados para obtenção de nanocristais de celulose. Sob condições controladas, a hidrólise provoca a dissolução das regiões amorfas (superficiais e intercaladas), sem danos significativos das regiões cristalinas da fibrila. Isto ocorre devido a maior facilidade de permeação do ácido nas regiões amorfas, o que gera uma cinética de hidrólise diferenciada das cadeias de celulose nestas regiões (PÄÄKÖ et. al., 2007; OKSMAN & SAIN, 2005; SIQUEIRA et. al., 2009).

Os segmentos cristalinos obtidos por este método apresentam geralmente um formato de bastão, ou agulhas, e são denominados como whiskers de celulose (HUGGE et. al., 2008; SIQUEIRA et. al., 2009). Os *whiskers* são referidos na literatura algumas vezes como celulose microcristalina (MCC), “*nanorods*”, “*nanowires*” e também como nanofibras de celulose, uma vez que apresentam diâmetro menor que 100 nm (HUGGE et. al., 2008; ABE et. al., 2007). Este último termo será adotado ao longo desta tese.

As condições de hidrólise afetam as características finais das nanofibras de celulose. Por exemplo, tempos longos de hidrólise resultam em nanocristais mais curtos. Diferentes tipos de ácido também afetam as propriedades dessas nanoestruturas: hidrólise por ácido clorídrico (HCl), por exemplo, resulta em nanofibras de celulose com carga superficial mínima, enquanto o uso de ácido sulfúrico (H₂SO₄) promove a formação de suspensões aquosas estáveis devido à reação dos grupos hidroxila das cadeias de celulose com os grupos sulfatos ionizáveis. A repulsão eletrostática em determinados valores de pH entre os grupos sulfato evita a agregação e precipitação dos nanocristais nestas suspensões (BECK-CANDANEDO et. al., 2005; ROMAN & WINTER, 2004).

Utilizando o método da hidrólise ácida, suspensões de nanocristais têm sido obtidas a partir de uma variedade de fontes como celulose bacteriana, algodão, tunicina (celulose animal), polpas celulósicas e fibras vegetais como de sisal e bagaço de cana-de-açúcar (BECK-CANDANEDO et. al., 2005; BHATTACHARYA et. al., 2008; LIMA et. al., 2004). Na tabela 2.1 são mostrados exemplos das nanoestruturas obtidas pela hidrólise ácida a partir de diferentes fontes de celulose e condições de tratamento.

Tabela 2.1: Tipos de nanocristais de celulose obtidos a partir da hidrólise ácida.

Matéria-prima	Condição	Nanoestrutura
Fibra da casca de banana ^a	Ácido acético/ácido nítrico 120°C, 15 min.	<i>Whiskers</i> com 5 nm de diâmetro
Fibra de sisal ^b	H ₂ SO ₄ 50°C, 40 min	<i>Whiskers</i> (L = 215 nm e D = 5 nm)
Celulose bacteriana ^c	H ₂ SO ₄ 40-104°C, 1-3h	<i>Whiskers</i> (L entre 200 nm a vários microns)
Celulose microfibrilada ^d	H ₂ SO ₄ 44°C, 130 min	<i>Whiskers</i> (L = 200nm e D = 5nm)
Casca de galhos de amoeira ^e	H ₂ SO ₄ 60°C, 30 min	<i>Whiskers</i> (D entre 20 e 40 nm), cristalinidade de 73,4%
Algodão ^f	H ₂ SO ₄ , 30 min, 45-72°C	<i>Whisker</i> (L entre 100-300nm)

Fonte: a – (ZULLUAGA et. al., 2007); b – (SIQUEIRA et. al., 2009); c – (ROMAN & WINTER, 2004); d – (PETERSSON et. al., 2007); e – (LI et. al., 2009); f – (ELAZZOUI-HAFRAOUI et. al., 2008).

Uma fonte viável para extração de nanofibras de celulose é o bagaço da cana-de-açúcar. Este bagaço é um resíduo fibroso gerado pelas indústrias de beneficiamento da cana para geração de álcool e açúcar (SUN et. al., 2004). Representa uma fonte abundante de celulose, geralmente com um teor de 50% do polímero, dependente da variedade e maturidade da planta, além da qualidade do solo (MEZA et. al., 2006). Estima-se que 1 tonelada de cana gere 280 kg de bagaço (SUN et. al., 2004). O Brasil é atualmente o principal produtor de cana-de-açúcar no mundo, com produção de cerca de 691 milhões de toneladas em junho de 2009 (IBGE: <http://www.ibge.br>, acessado em 02 agosto. 2013). O bagaço também representa o maior subproduto gerado nos programas do etanol e açúcar no país, especialmente no estado de São Paulo, onde se concentram as plantações tradicionais da cultura (HOAREAU et. al., 2004). O destino comum do bagaço é geralmente a incineração para cogeração de energia e vapor nas indústrias da cana (KIATKITTIPONG et. al., 2009). Contudo, quantidade que é gerada deste resíduo torna atrativo seu uso como fonte de nanofibras de celulose.

2.5 Nanotoxicidade.

A nanotecnologia é a ciência que estuda os materiais na escala nanométrica, isto é, estuda os materiais que possuem tamanho compreendido na faixa de 0,1 a 100 nm, que apresentam características diferenciadas em relação ao mesmo material com dimensões maiores. Esta tecnologia tem ganhado ênfase atualmente, pois o mundo moderno tem se interessado muito pelo estudo dos materiais na nanoescala. Um material estudado na escala macrométrica tem propriedades muito diferenciadas daquele mesmo material estudado na escala nanométrica. Desta forma, a nanotecnologia abre um leque muito grande de possibilidade no desenvolvimento de novos materiais, partindo de materiais já conhecidos.

Existem dois tipos de fabricação de materiais nanoestruturados, que o método de fabricação de cima para baixo (ou *top-down*) e o método de fabricação de baixo para cima (ou *bottom-up*), sendo a fabricação de cima para baixo é um método físico e pode ser realizado através de várias técnicas e a fabricação de baixo para cima é um método químico e pode ser realizado através de diferentes técnicas de síntese.

A nanotoxicologia é o estudo da toxicidade dos nanomateriais. Atualmente existe uma grande preocupação com a toxicidade das nanopartículas, pois estes novos materiais nunca foram produzidos e utilizados em produtos comerciais em tão larga escala como tem ocorrido nos dias de hoje e, assim, o risco de alcançarem os diferentes lugares do meio ambiente (atmosfera, águas e solo) e se tornarem disponíveis é muito grande (LOVERN et al., 2007; LYON et al., 2006).

Assim sendo é de extrema importância o conhecimento dos problemas associados à nanotecnologia, assim como os efeitos destes nanomateriais no organismo. É portanto, necessário ter um amplo conhecimento sobre as nanopartículas para poder definir como estes materiais podem se comportar após adentrarem em um organismo.

Como a nanotecnologia tem avançado significativamente, muitos são os materiais comerciais que utilizam nanopartículas e desta forma é importante pensar na toxicologia ocupacional, na qual é uma área da toxicologia que se dedica ao estudo dos efeitos nocivos produzidos pela interação de agentes químicos contaminantes do ambiente de trabalho com o trabalhador exposto. Assim, é importante ter um conhecimento dos riscos gerados pelas nanopartículas e conhecer as leis e normas técnicas para trabalhar com nanomateriais.

Agências reguladoras (EPA, FDA, OECD, ISO, ABNT) já possuem protocolos padronizados para realização desses ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Contudo, para nanomateriais esses ensaios precisam ser reavaliados, levando sempre em consideração como o material é produzido e descartado, tendo como perspectiva o desenvolvimento de um método apropriado para a determinação da nanotoxicidade.

Desde 2003 os riscos dos nanomateriais tem sido abordado por pesquisadores em várias regiões e países, entre eles, Comunidade Econômica Europeia, Estados Unidos, Canadá e Austrália. No Brasil, a toxicidade associada às nanopartículas é um tema que começa a ser tratado, sobretudo após a iniciativa do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) que passou a financiar especificamente esses estudos, através de redes nacionais de nanotoxicologia, criadas em 2011 (CNPQ: <http://memoria.cnpq.br/resultados/2011/017.htm>, acessado em 30 de Outubro de 2013).

De acordo com o Centre for Nano BioSafety and Sustainability (CNBSS, em português Centro para Nanobiossegurança e Sustentabilidade) o ano de 2012 foi importante para as questões relacionadas com a regulação das nanotecnologias. Foi compilado no site desse centro espanhol os mais relevantes documentos relacionados com regulação, recomendações,

relatórios, registro de nanomateriais e padrões, entre outros.

De modo geral, os estudos toxicológicos envolvendo nanopartículas ainda são escassos, sendo seus resultados controversos quando comparados entre si, principalmente pela padronização incipiente. Os trabalhos são omissos principalmente na caracterização das partículas, contribuindo pouco na compreensão da interação destes no ambiente, tornando difícil a avaliação do real risco de exposição a estes materiais. Apesar disso, a maioria dos estudos indica algum efeito tóxico agudo, o que demonstra a necessidade de um melhor entendimento dos efeitos desses materiais antes de serem utilizados em processos/produtos do cotidiano (MARTINEZ & ALVES, 2013).

2.5.1 Definição de Nanotoxicologia.

Nanotoxicologia é o estudo da toxicidade dos nanomateriais (QUINA, 2004; PASCHOALINO et. al., 2010). A crescente produção e aplicação de nanomateriais tem causado uma ampla discussão sobre os riscos potenciais destes materiais ao ambiente e à saúde humana (SEATON & DONALDSON, 2005). A análise desta questão, bastante polêmica, é bem pertinente, uma vez que, além das inúmeras perspectivas originadas do desenvolvimento de uma gama de novos materiais, há o potencial risco de contaminação ambiental, dadas as características intrínsecas das nanopartículas, como tamanho, área superficial e capacidade de aglomeração, as quais podem facilitar a translocação destas pelos compartimentos ambientais e ocasionar, de forma acumulativa, danos à cadeia alimentar. Estes aspectos justificam a importância da investigação sobre a disponibilidade, degradabilidade e toxicidade dos nanomateriais.

As mesmas propriedades que tornam os nanomateriais tão atrativos, como pequeno tamanho de partícula, forma variada e alta área superficial (SONG et. al., 2005), podem também ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos vivos, conforme estudos toxicológicos com microrganismos, algas, peixes, ratos e células humanas (PASCHOALINO et. al., 2010; TONG et. al., 2007; AUFFAN et. al, 2006). Assim, diferentes tipos de nanomateriais estão sendo

desenvolvidos a cada dia e, por viabilizarem produtos finais mais eficientes, leves, adequados e principalmente de baixo custo, muitos destes se encontram em fase de comercialização em cosméticos, eletrodomésticos, vestimentas, em diversos utensílios e equipamentos.

Alguns estudos sugerem que os nanomateriais, por sua pequena dimensão podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares, podendo ter o seu efeito tóxico magnificado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido ao aumento da área superficial. Um exemplo clássico é o ouro, que é um metal praticamente inerte, mas que na forma de nanopartículas se torna altamente reativo (SERVICE, 2004).

As várias formas como as partículas podem se apresentar após o contato com o ambiente ou organismos vivos é um outro fator importante a ser considerado no estudo da toxicidade dos nanomateriais, podendo estar presentes em sua forma livre assim como em aglomerados. Este processo é dinâmico e também pode ser acompanhado pela funcionalização da superfície destas por diferentes grupamentos químicos presentes no meio (FARRÉ et. al., 2009).

Um trabalho de revisão mostrou possíveis rotas das NFCs em diferentes formas de administração, dentre elas a ingestão (água e alimentos). A ingestão de NFCs permite a absorção pelo trato gastrointestinal, podendo ser eliminada pelas fezes ou circular na linfa e sangue, onde são distribuídas para os diferentes órgãos, tais como fígado, rim, baço, sistema nervoso central, medula óssea, músculo e coração. Após a passagem pelo fígado, as NFCs podem retornar ao trato gastrointestinal e serem eliminadas pelas fezes; do rim podem ser eliminadas na urina (OBERDORSTER, et. al, 2005). As rotas propostas por estes autores não consideram quantitativa nem qualitativamente os efeitos das NFCs.

A nanotoxicologia é responsável pela avaliação dos riscos envolvidos nos processos de síntese e na manipulação de materiais nanométricos.

O estudo nanotoxicológico de um material se constitui condição indispensável para o estabelecimento de medidas de segurança na utilização dos materiais nanométricos e, por conseguinte a proteção dos indivíduos expostos.

2.5.2 Testes de Toxicidades.

A avaliação da toxicidade dos nanomateriais é de grande importância para determinar se o material apresenta perigo ou não.

Diversos ensaios toxicológicos padronizados estão disponíveis para avaliar a resposta biológica de uma substância química. No entanto, não há padronização para a avaliação da toxicidade de nanopartículas, o que dificulta a comparação de resultados e o consenso sobre a toxicidade de um material. Os estudos realizados até o momento são adaptações dos procedimentos padrões utilizados para outras substâncias, em dimensões que podem ser consideradas *macro*, uma vez que não tem nanoestruturas envolvidas nos materiais utilizados nas análises (PASCHOALINO et. al., 2010). Os testes de toxicidade podem ser realizados em culturas de células (*in vitro*) ou com organismos vivos (*in vivo*) como peixes, ratos e, até, seres humanos.

A maioria dos testes de toxicidade de nanomateriais é realizada *in vitro*, usando culturas de células de mamíferos, as quais foram extraídas das mais diferentes partes do corpo como cérebro, pulmões, coração, pele e fígado (LONG et. al., 2006; NEMMAR & INUWA, 2008; VILENO et. al., 2007).

Grande parte dos nanomateriais utilizados, nanotubos de carbono e nanopartículas de prata foram testados para avaliar principalmente alterações na taxa de crescimento (AUFFAN et. al., 2006; LONG et. al., 2006; YEHA et. al., 2007; JIN et. al., 2007). Alguns trabalhos também realizaram sequenciamento de DNA para avaliar possíveis alterações genéticas (ZHANG et. al., 2007), sendo as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) muito utilizadas neste tipo de ensaio para avaliar alterações morfológicas nas células ou a absorção das nanopartículas (FORTNER et. al., 2005).

A técnica *in vitro* é mais estudada por ser mais barata e requerer menos tempo do que a técnica *in vivo*, no entanto, através dela é difícil deduzir implicações que signifiquem riscos para saúde humana. SAYES et. al (2007) observaram que os estudos *in vivo* são mais confiáveis na previsão dos efeitos reais em um dado organismo. Apesar disso, é consensual que este tipo de ensaio seja fundamental como etapa inicial de um estudo de toxicidade.

Em relação aos testes *in vivo*, observa-se que grande parte destes testes utilizam organismos aquáticos, os quais traduziriam o impacto destes nanomateriais no ambiente, já que as águas continentais e marinhas seriam o principal compartimento receptor. Nestes testes normalmente são utilizados bactérias (*V. fischeri*), peixes (peixe-zebra), crustáceos (*Daphnia*) e algas (OBERDÖRSTER et. al., 2006; JIN et. al., 2007; HUND-RINKE & SIMON, 2006).

Os parâmetros de avaliação mais utilizados são o LC50, que é a concentração do nanomaterial que causa a morte de 50% da população, o LOEC, que é a menor concentração que provoca efeito observável no organismo, e o NOEC, que é a concentração máxima na qual nenhum efeito é observado nos organismos (LOVERN et. al, 2007; HUND-RINKE & SIMON, 2006). Variando-se a concentração do nanomaterial em contato com os animais, o teste permite calcular estatisticamente os indicadores que possibilitarão a comparação de toxicidade entre diferentes nanomateriais e/ou entre nanomateriais e substâncias químicas tradicionais.

Ensaio, para avaliar a toxicidade dos nanomateriais no meio aquático, estão sendo realizados com organismos do gênero *Daphnia*, como a *Daphnia magna*, que é um crustáceo que se alimenta de algas e é a presa principal de vários peixes (OBERDÖRSTER et. al, 2006) e em função de sua relativa simplicidade com relação a outras técnicas usando animais maiores, e em função de ser um organismo representativo já que sua extinção poderia causar grave desequilíbrio pela drástica diminuição de peixes, o teste com *Daphnia* provavelmente é o teste mais indicado no momento para avaliação da ecotoxicidade de nanomateriais, conforme mostra a tendência observada nos poucos trabalhos publicados (PASCHOALINO et. al., 2010). Os principais testes *in vivo* que estão sendo usados para avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas são os de toxicidade aguda.

A maioria dos estudos de ecotoxicidade utilizou nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e de fulereno (C_{60}), devido sua maior aplicação comercial. A comparação da toxicidade entre estes dois materiais pode levar a importantes observações sobre o impacto de diferentes partículas no ambiente, já que estas possuem características físico-químicas muito distintas, tendo em vista que o TiO_2 é hidrofílico e o nano- C_{60} lipofílico (PASCHOALINO et. al., 2010).

Já para os animais de vida terrestre, além dos vários estudos *in vitro*, a preocupação é para a exposição direta de animais às nanopartículas, principalmente em mamíferos roedores. As técnicas mais utilizadas para exposição aos receptores, são a administração intravascular e a inalação de nanopartículas por mamíferos (PASCHOALINO et. al., 2010).

O principal acesso das nanopartículas ao sistema circulatório provavelmente é através da nanotecnologia, por isso há uma grande preocupação em avaliar essa situação. Alguns estudos já simulam tal situação injetando suspensões de nanopartículas diretamente na corrente sanguínea de ratos (NEMMAR & INUWA, 2008; CHEN & SCHLUESENER, 2008). Este tipo de teste provavelmente será uma tendência para a obtenção de respostas mais concretas sobre um risco agudo da exposição a cada tipo de nanopartícula. Nestes testes, ratos saudáveis e com

massa semelhante recebem doses conhecidas de uma dada nanopartícula suspensa em algum líquido inócuo. Normalmente 48 h após a administração das partículas, amostras de sangue são coletadas para contagem de células, tais como monócitos, granulócitos, linfócitos, plaquetas, glóbulos vermelhos, além de medidas das concentrações de hemoglobina (SAYES et. al., 2007). Este tipo de teste também pode ser usado para avaliar a provável distribuição e a bioacumulação de nanopartículas em órgãos vitais. Através deste procedimento, também é possível avaliar a distribuição do nanomaterial no organismo, o que é interessante para a indústria farmacêutica que pretende utilizar estes materiais como nanotransportadores.

A maioria dos estudos que busca correlacionar efeitos da inalação de nanopartículas foi realizado *in vitro* usando células de brônquios e alvéolos, ou *in vivo* injetando suspensão de nanopartículas na traqueia de ratos observando, em ambos, alterações relevantes no sistema respiratório como inflamações nos alvéolos (GEYS et. al., 2006). A tendência nos testes *in vivo* aponta para a simulação de atmosferas contaminadas, como descrito por alguns autores em que expuseram ratos e *hamsters* a um aerossol de TiO_2 dentro de um recipiente selado, em condição de oxigenação normal, onde também foi observada inflamações dos alvéolos (BERMUDEZ et. al., 2004; TAKENAKA et. al., 2001).

2.6 Técnicas usadas em estudos para caracterização de filmes finos.

2.6.1 Ângulo de Contato.

Quando uma gota de líquido é colocada sobre uma superfície sólida forma-se uma interface tripla entre o sólido, o líquido e o vapor, cuja posição de equilíbrio depende das forças associadas às três tensões interfaciais. A situação encontra-se ilustrada na Figura 2.9, que mostra uma gota de líquido (L) sobre uma superfície sólida (S), com o vapor (V) como a terceira fase. O ângulo θ , entre a superfície sólida e a tangente à superfície do líquido num ponto da linha de contacto com o sólido é designado de ângulo de contato (BARNES & GENTLE, 2005).

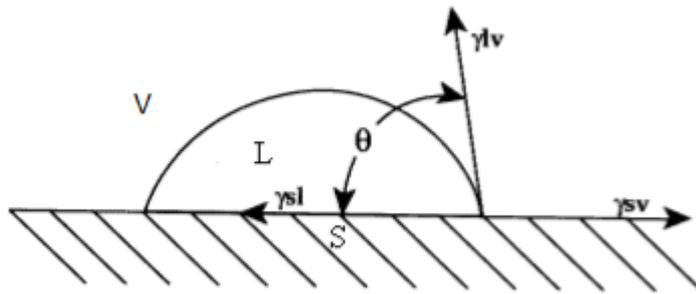


Figura 2.9: Ângulo de contato de equilíbrio entre um líquido e uma superfície sólida ideal (BARNES & GENTLE, 2005).

A hidrofobicidade de uma superfície pode ser medida através do depósito de uma gota de água, com o auxílio de uma seringa, sobre esta. O ângulo de contato igual a 0° é um caso extremo de máxima afinidade química entre a superfície e o líquido e, portanto, haverá espalhamento completo do líquido no sólido. Um ângulo de contato igual a 180° é o outro caso extremo, onde o líquido não apresenta qualquer interação com a superfície. Quando o ângulo de contato é menor que 90° podemos considerar que a superfície é molhada pelo líquido (Figura 2.10).

Uma modificação química na superfície, por reação ou adsorção, pode ser usado para aumentar ou diminuir o ângulo de contato, quando houver necessidade, influenciando assim no molhamento do sólido pelo líquido.

$\theta = 0^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$
espalhamento	molhamento	retração

Figura 2.10: Valores de ângulo de contato e suas respectivas classificação (BARNES & GENTLE, 2005).

2.6.2 Microscopia de Força Atômica.

Em 1986 foi desenvolvido o microscópio de força atômica (MFA) (Binning & QUATE, 1986; Hermann et al., 1997). O seu princípio de funcionamento (geração de imagens) baseia-se na força de atração ou repulsão entre os átomos que compõem a sonda e a amostra. De forma idêntica ao microscópio de tunelamento, o microscópio de força atômica utiliza o mesmo sistema de varredura, porém a amostra é percorrida por um cantiléver, ou seja, uma ponta piramidal montada sobre uma haste flexível (figura 2.11). Com a atração ou repulsão da sonda pela amostra, o cantiléver é puxado para cima ou para baixo. Essa variação de altura é monitorada por um feixe de laser e um detector de posição. Esse sistema de detecção é capaz de reconhecer variações da ordem de 0.1 Å. Na parte superior da haste existe uma superfície espelhada, que reflete a luz de um feixe de laser, que em seguida passa através de uma lente e incide sobre um fotodetector (matriz de fotodiodos). Assim os movimentos nanométricos podem ser detectados, gerando sinais elétricos que são processados e convertidos em imagem topográfica por um computador, bi ou tridimensionais da superfície do material em resolução atômica.

Durante a varredura o sistema é controlado por um sistema tipo PID (Proporcional – Integral – Diferencial), que com o ajuste dos parâmetros possibilita que a distância entre a ponta da agulha de varredura e a amostra seja mantida constante durante o processo de aquisição da imagem. Os valores dos parâmetros PID são definidos em função da rugosidade, tipo de material, modo de trabalho do equipamento e velocidade de varredura. Esses parâmetros também são influenciados pela umidade do ar e temperatura, durante a aquisição da imagem.

Os modos básicos de funcionamento do MFA são: modo contato, contato intermitente e o não contato. No primeiro modo utiliza-se um cantiléver de baixa constante de mola, na faixa de 0,001 a 1,5 N/m e tanto para os modos de contato intermitente quanto para o de não contato, a faixa utilizada é de ~5 a 100 N/m. A técnica de MFA tem sido usada para análise de estruturas quaternárias, crescimento de cristais de proteínas e topografia de filmes de proteínas (HERMMANN, 1999; HALLET et. al, 1996).

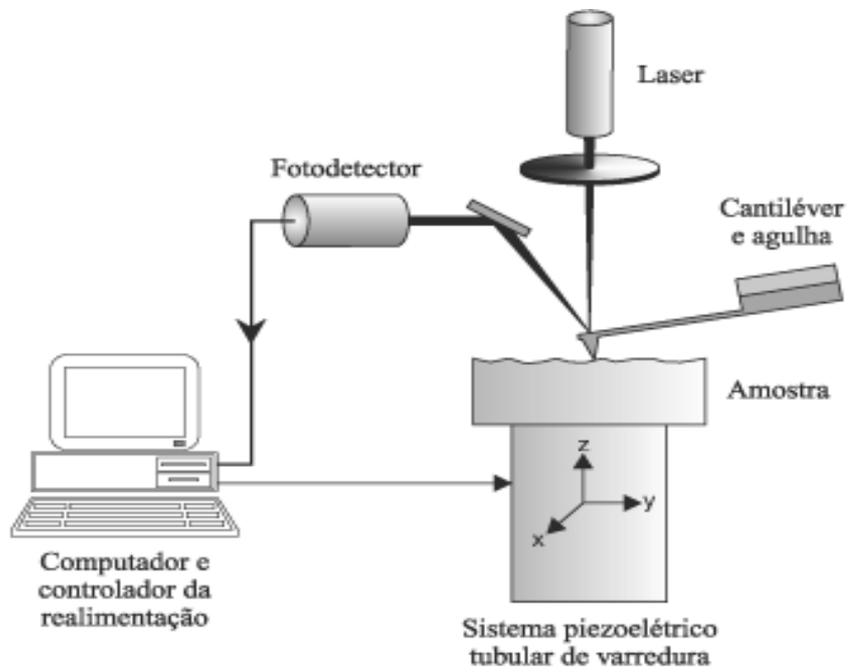


Figura 2.11: Esquema de funcionamento do microscópio de força atômica (HERRMANN et.al, 1997).

3. Objetivos e Metas

O objetivo deste trabalho foi formular e analisar filmes comestíveis a base de zeína com adição de nanofibras de celulose e plastificante, para o revestimento de frutas de clima temperado, pera e maçã, visando o aumento do seu tempo de prateleira.

As principais metas foram:

- Identificar concentrações dos componentes dos filmes eficientes para retardar o processo de amadurecimento das frutas em estudo (maçã e pera);
- Caracterizar fisicamente os filmes finos obtidos através das técnicas de Microscopia de Força Atômica e análise de Ângulo de Contato;
- Caracterizar o comportamento das frutas revestidas e não revestidas com medidas de rigidez (texturômetro).
- Realizar ensaios toxicológicos dos filmes com nanofibras de celulose *in vivo* com ratos Wistar (*Rattus norvegicus*);

4. Materiais e Métodos

4.1 Amostras, materiais e reagentes

As Peras Williams (*Pyrus communis*) e Maçãs Gala (*Malus domestica*) foram adquiridas no CEAGESP (Centro de Abastecimento Geral de São Paulo) de Araraquara em caixas fechadas, onde estavam armazenadas à -1°C. Após o recebimento das frutas, estas foram higienizadas com água e sabão e a aplicação do filme foi feita logo após secagem das mesmas em temperatura ambiente.

A zeína usada na confecção dos filmes para o revestimento das frutas, foram adquiridas da Sigma-Aldrich, código Z3625. As nanofibras de celulose foram gentilmente cedidas pelo grupo de Novos Materiais da Embrapa Instrumentação.

O etanol utilizado foi da marca.... e o Ácido oleico utilizado era da marca....

4.2 Preparação dos filmes de Zeína com Nanofibras de celulose.

Extração de organo-solúveis. A zeína teve o óleo extraído através de agitação em solução de clorofórmio por 2 horas, após este processo, filtrou-se a solução utilizando filtro de papel com auxílio de sistema de vácuo. O material retido no filtro foi colocado para secar, em dessecador com sílica gel, e a solução foi devidamente descartada.

As nanofibras de celulose foram dispersas em água em uma ponteira ultrassônica por 5 minutos em uma amplitude de 60%. Após a dispersão das nanofibras adicionou-se etanol P.A. até obter uma solução de etanol 70%, em seguida foi adicionada a zeína em quantidade para se obter uma solução com 4% de massa. Após a adição de todos os componentes a solução foi homogeneizada sob agitação por 20 minutos.

Após a homogeneização, foi adicionado o plastificante, no caso, ácido oleico (AO) e a solução foi mantida sob agitação por mais 10 minutos para total homogeneização da solução.

Com a finalidade de se obter amostras dos filmes para realizar medidas de ângulo de contato e microscopia de força atômica, aproximadamente 8 ml de solução filmogênica utilizada para recobrir a superfície de placas de acrílico. Após estas permanecerem em repouso sob temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente e formação da película sobre a

placa. A película resultante foi destacada e submetida às análises, supracitadas, para caracterização do filme.

4.3 Revestimento das frutas e teste das frutas revestidas.

As peras e maçãs foram pesadas e imersas nas misturas filmogênicas, aquosas contendo 500 mL de etanol 70% (v/v), 4% de zeína (v/m), nanofibra de celulose (0.1, 0.25 e 0.5%) (v/m), ácido oleico (0.25, 0.5 e 1%)(v/m) de filmes por aproximadamente 3 segundos e a seguir colocadas em bancadas para secagem.

Ao todo foram utilizadas 96 peras e 96 maçãs para os experimentos descritos abaixo, e esses experimentos foram repetidos duas vezes para cada formulação.

Após a secagem do filme depositado sobre as peras e maçãs, foram realizadas medidas de perda de massa, colorimetria da casca e textura.

4.3.1 Perda de Massa.

Após as frutas serem revestidas com os filmes de zeína com nanofibra de celulose, estas foram secas em temperatura ambiente e foram analisadas quanto à perda de massa, para isso as frutas foram pesadas em uma balança semi-analítica todos os dias e praticamente no mesmo horário pelo período de seu amadurecimento, cerca de 20 dias para as maçãs e 15 dias para as peras. Os resultados foram apresentados na forma de gráficos.

4.3.2 Medidas colorimétricas.

A coloração da casca e da polpa foi determinada por reflexometria, utilizando-se um colorímetro Chroma Meter CR-400 / 410 (Konica Minolta®, Japão), calibrado em superfície de porcelana branca sob condições de iluminação. As leituras foram expressas no módulo L^* , a^* e b^* que, segundo a CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), definem a cor: L^* , que corresponde à luminosidade (brilho, claridade ou refletância; 0 = escuro/opaco e 100 = branco); a^* , indica a cromaticidade em um eixo verde (-) para vermelho (+); e b^* , indica a cromaticidade em um eixo azul (-) para amarelo (+). Assim pela equação que segue se encontrou o valor de Hue que indica a saturação da cor e será proporcional a sua intensidade.

$$H^* = \tan^{-1} (b^*/a^*) = \text{Tom}$$

O ângulo Hue é um ângulo em uma circunferência de cor de 360° em que os ângulos 0° = vermelha; 90° = amarelo; 180° = verde; 270° = azul. O croma é a intensidade de Hue. As medidas foram feitas tomando-se 2 pontos equidistantes. Sendo os resultados considerando a média das duas leituras.

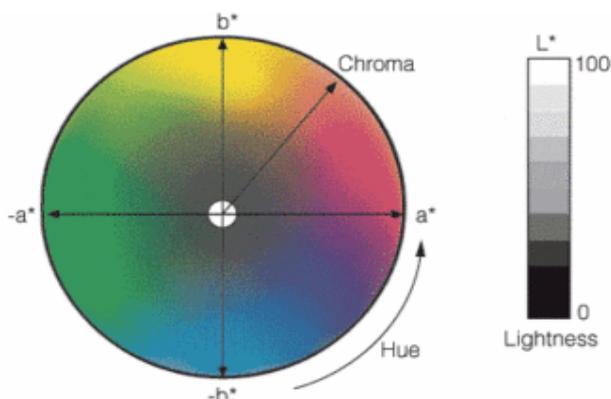


Figura 4.1: Circunferência para localização de cores do ângulo de Hue.

4.3.3 Medidas de firmeza.

As medidas foram feitas com o auxílio do texturômetro que permite a medição da resistência à penetração de um corpo de prova. Foram efetuados ensaios de penetração na fruta inteira utilizando o texturômetro da marca STABLE MICRO SYSTEMS – TA.TX Express, com *probe* cilíndrico de aço inoxidável com diâmetro de 4 mm (modelo P/4) e célula de carga de 5 kg. A fruta, com casca, foi colocada sob a *probe* e foram realizadas três penetrações na parte superior e/ou central. A profundidade de cada penetração foi de 10 mm para a casca e de 5 mm para a polpa, com uma velocidade de penetração de 1,0mm/s.

A caracterização da taxa de tensão- compressão se deu por meio do gradiente numérico entre os valores de tensão e compressão da fruta.

4.4 Testes com os filmes obtidos.

4.4.1 Ângulo de Contato.

A hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade dos filmes obtidos foi estimada pela medida de ângulo de contato formado por uma gota de água desionizada sobre o filme. Para isto as soluções com diferentes concentrações de AO foram depositada em uma placa de acrílico e deixadas secar em temperatura ambiente, dentro de um dessecador com sílica gel.

Após a total secagem dos filmes, estes foram destacados das placas e cortados em vários retângulos e analisados. Em média foi realizado 5 medidas para cada concentração de filme.

Imagens da gota de água sobre a superfície do filme foram gravadas em tempo real a partir de uma câmera CAN 101 da KSV Instruments com intervalos de 30 segundos e os valores de ângulo de contato foram obtidos através do software FTA32 Image Software. (Esses valores foram plotados em um gráfico contra o tempo).

4.4.2 Microscopia de Força Atômica.

O microscópio de força atômica utilizado foi um modelo Veeco Instrument Dimension V, atualmente Bruker, as pontas de MFA utilizadas foram nanosensors pppNCST com frequência típica de 73 a 263 kHz e constante de mola de 1.2 a 29 N/m.

A MFA foi utilizada para se determinar a espessura dos filmes, bem como para avaliar a uniformidade e topografia dos mesmos. O modo de operação utilizado foi o contato intermitente (Tapping), onde o cantiléver percorre a amostra oscilando, próximo a sua frequência de ressonância e as imagens foram obtidas em $4 \mu\text{m}^2$.

4.4.3 Teste de Toxicidade.

Não existem trabalhos publicados *in vivo* com tratamento crônico utilizando filmes de zeína com nanofibras de celulose. Na literatura pode ser encontrado trabalhos *in vitro*. Por isso um dos objetivos deste trabalho é de grande importância para melhor compreender a interação crônica dos filmes finos com o organismo, uma vez que estes revestiram frutas para o consumo humano. Este é um dos primeiros trabalhos sugerindo dieta crônico em animais, onde os filmes de zeína com nanofibras de celulose foram administradas oralmente através da dieta dos animais, durante 50 dias.

4.4.3.1 Protocolo Experimental.

Além disso foi feito teste de toxicidade do filme, e para isso foi utilizado ratos da linhagem Wistar para ingerir a ração triturada e revestida com a formulação que obtivemos os melhores resultados, como está descrito na sessão 5.

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar com idade de três meses de vida, procedentes do Biotério da Universidade Federal de São Carlos, os animais foram pesados e colocados em gaiolas metabólicas em um regime de 12 horas / luz e 12 horas / escuridão. A temperatura foi mantida continuamente a aproximadamente 23° C e tiveram a dieta padronizada com ração Nuvilab-Mantença ® e água, ambos à vontade. O peso dos animais foram analisados uma vez por semana com a finalidade de acompanhar o crescimento dos animais.

Um grupo de animais foram tratados, com ração revestida com filme de 4% de zeína, 0.1% de nanofibra de celulose e 0.25% de ácido oleico por 50 (cinquenta) dias, ou seja, por 7 semanas.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em:

- Grupo Controle (n=10): Ratos tratados com ração sem revestimento;
- Grupo Experimental (n=10): Ratos tratados com ração revestida.

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas durante as 7 semanas e diariamente foi quantificado o consumo de ração e o consumo hídrico.

Diariamente foram coletadas as fezes e urina. As fezes foram pesadas em balança analítica e o volume da urina quantificado com o auxílio de uma pipeta automática, todos os dias por volta de umas 9h da manhã.

A massa corporal de cada animal dos dois grupos (Experimental e Controle) foi verificada uma vez por semana através de uma balança analítica.

Após as 7 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e os seguintes tecidos retirados: fêmur, tíbia, terceira vértebra lombar, próstatas ventrais, glândulas seminais, testículos, fígado, coração, rim, baço e sangue.

Os fêmures, as tíbias e as terceiras vértebras lombares foram dissecados e congelados à -20°C. As glândulas seminais, próstatas ventrais e testículos foram pesadas imediatamente após

a retirada e descartados. O coração, fígado, rim e baço foram imediatamente congelados à -80°C e o sangue coletado do tronco foi centrifugado para separar o soro do plasma.

4.4.3.2 Parâmetros Analisados.

Após a eutanásia, as glândulas seminais, as próstatas ventrais e os testículos foram retirados e pesados a fim de verificar se houve alteração do peso dos órgãos do grupo controle com o grupo experimental.

Os parâmetros biomecânicos ósseos foram obtidos através de ensaios mecânicos de flexão a três pontos (com os fêmures), realizados em uma máquina universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente. No teste de flexão a três pontos em fêmures, as extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes, com diâmetros de 3,0mm, suportados por apoios distanciados de 21,70mm. A força foi aplicada utilizando uma célula de carga Instron, modelo CM, com capacidade máxima de 1kN. Esta força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no ponto médio entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com o rolete de 3,0 mm fixada na sua extremidade, a uma velocidade constante de 5 mm/min até o momento de ruptura do osso (Figura 4.2). A força aplicada e o deslocamento da haste da máquina foram monitorados e registrados através do programa Instron Series IX (figura 4.3).

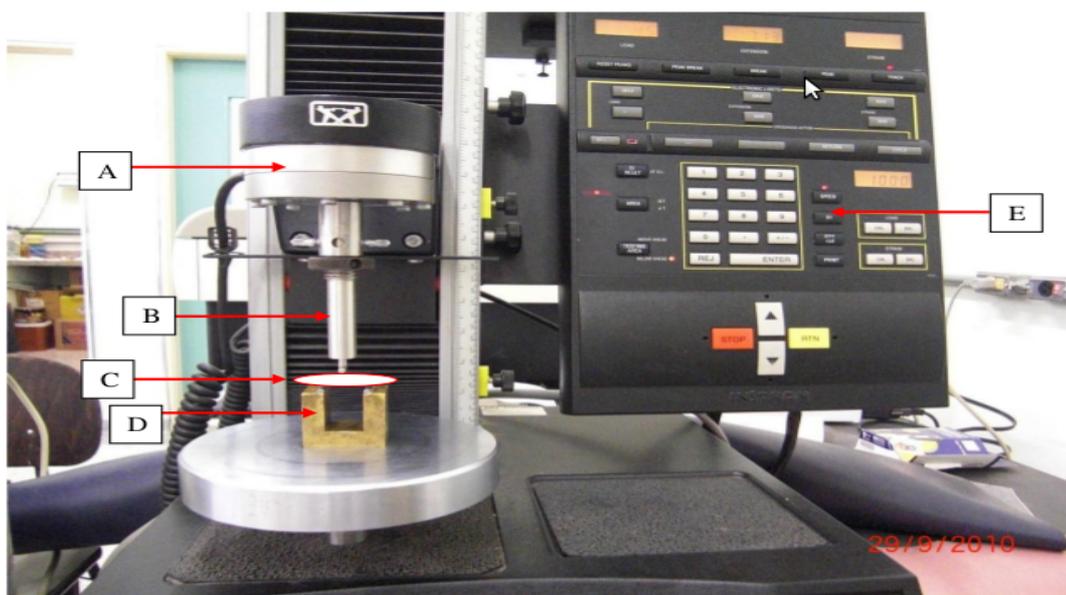


Figura 4.2: Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) preparada para o teste de flexão a três pontos em fêmur de rato. A: Célula de carga (1kN); B: Haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: Amostra a ser analisada (Fêmur); D: Suporte; E: Painel de controle.

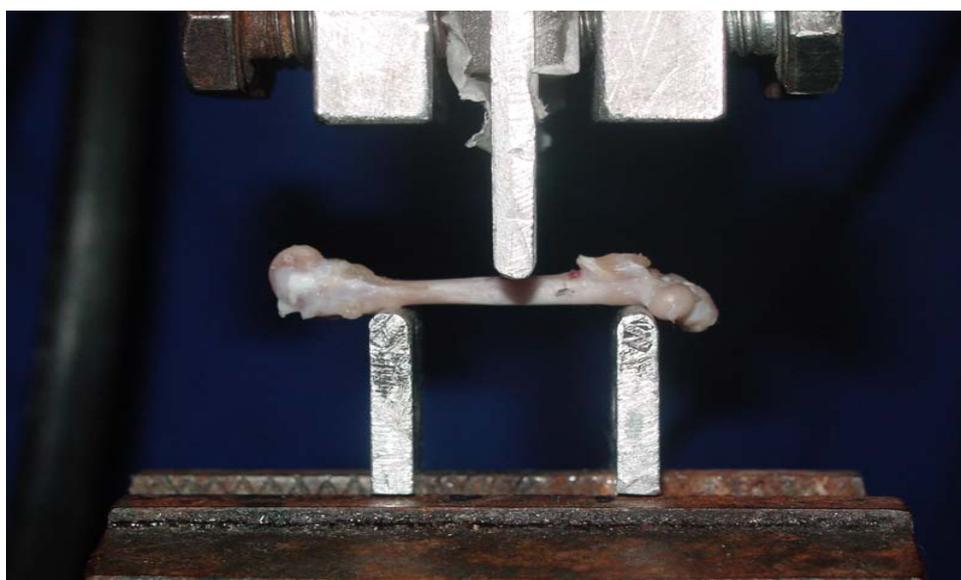


Figura 4.3: Foto de um fêmur submetido a ensaio de flexão a três pontos.

A densitometria óssea é uma medida quantitativa da massa óssea que permite o diagnóstico e o seguimento de tratamento da osteoporose, bem como a avaliação do risco de fratura.

Para a Tíbia o ensaio realizado foi o de densitometria óssea, que foram encaminhados para o Laboratório de Metabolismo Ósseo da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” de Araçatuba. Foi utilizado o densitômetro DPX-Alpha Lunar, EUA e o programa “Small Animal”. Os resultados foram expressos em g/cm^2 .

Já para as terceiras vértebras lombar, foi realizada a microtomografia de raio-x que é uma técnica que permite a visualização e a medida de parâmetros morfológicos do interior de materiais sem destruí-lo, sendo uma técnica de caracterização e medida de propriedades físicas de amostras e materiais.

As análises foram feitas utilizando o equipamento Micro – Skyscan 1172 (figura 4.4) no laboratório de Ciências Agrárias e Biológicas na Embrapa Instrumentação. Utilizou-se filtro de

alumínio de 0,5mm em 8 frames com raio-x de aproximadamente 100 Kv e a resolução da câmera de 2K e a resolução das imagens de 12 μm , uma análise típica leva em média 35 minutos para obtenção das imagens tomográficas e outros 35 minutos para a reconstrução de seções transversais. O tempo para outras análises, como morfologia e modelagem em três dimensões (3D), variam de acordo com a amostra.



Figura 4.4: Foto do equipamento microtomógrafo de raios-X Sky Scan 1172

O soro sanguíneo foi analisado no laboratório Maricondi na cidade de São Carlos e os seguintes testes foram feitos: Ácido Úrico, Creatinina, Triglicérides, Colesterol, Glicose, TGO, TGP, Fosfatase Alcalina, Fósforo, Cálcio, Bilirrubina total, direta e indireta e seguiram os padrões do laboratório.

5. Resultados e Discussão

Foram utilizadas um total de 96 maçãs e 96 peras nos experimentos para verificação da eficácia da deposição dos filmes de zeína com adição de nanofibras de celulose e plastificante, por meio de medidas de perda de massa, texturômetro, colorimetria, ângulo de contato, microscopia de força atômica e testes toxicológicos do filme.

Nas medidas de perda de massa, pode-se analisar o quanto de água a fruta está perdendo de seu interior, ou seja, é possível verificar se o revestimento contribui para diminuir a troca gasosa do fruto com o ambiente. Nas medidas de texturômetro é possível analisar a textura pela resistência à deformação apresentada pelos alimentos, a análise de textura realizada por esse tipo de equipamento pode medir de acordo com o teste a dureza, a fragilidade, a aderência, a fraturabilidade, a elasticidade, a firmeza e a consistência (STABLE,2013). Já nas medidas de colorimetria, avalia-se a alteração na cor das frutas.

A técnica de ângulo de contato permite avaliar a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade dos filmes obtidos, valores de ângulo de contato menores do que 90° , indicam que a superfície em análise é considerada hidrofílica, porém, se tais valores forem maior do que 90° , o material é considerado hidrofóbico. Pela técnica de Microscopia de força atômica pode-se determinar a espessura dos filmes, bem como avaliar a uniformidade e topografia dos mesmos.

Abaixo seguem os resultados.

5.1 Perda de Massa.

Nas figuras 5.1 e 5.2 são apresentados gráficos da perda de massa média de maçãs, onde notamos que o revestimento contendo 4% Z + 0,25% de NFC e 1% de AO e 4% Z +0,25% de NFC e 0,5% de AO mostraram-se mais eficientes para a redução da perda de massa em relação às outras concentrações de AO, no entanto, estas formulações de filmes deixaram as frutas com aspecto esbranquiçadas, alterando significativamente o aspecto das frutas podendo causar má aceitação, pois, segundo Chitarra e Chitarra (2005) a coloração e o brilho da fruta está

diretamente relacionada com a percepção da aparência pelo consumidor, e é de interesse que o produto apresente intensidade e uniformidade de coloração.

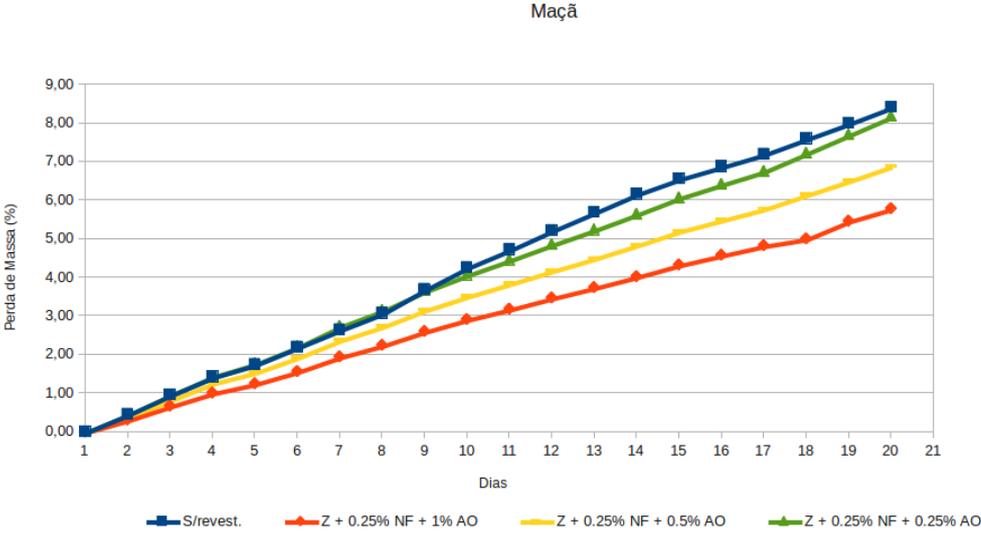


Figura 5.1: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de maçãs revestidas com 4% de zeína, 0,25% de nanofibra e AO (ácido oleico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).

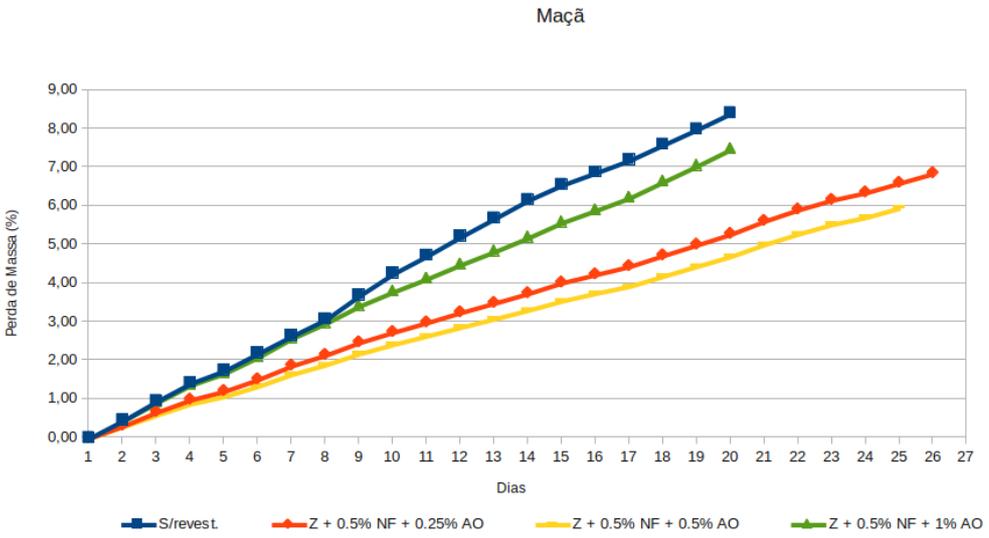


Figura 5.2: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de maçãs revestidas com 4% de zeína, 0,5% de nanofibra e AO (ácido oleico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).

Já nas figuras 5.3 e 5.4 são apresentados gráficos da perda de massa média de peras com revestimento de 4% Z + 0,25% e 0,5% NFC + variação de AO em 0.25, 0,5 e 1%, onde foi observado que as duas formulações atuaram praticamente da mesma forma, ou seja, não houve diferença significativa na perda de massa entre esses revestimentos, além disso as frutas também ficaram com aspecto esbranquiçados.

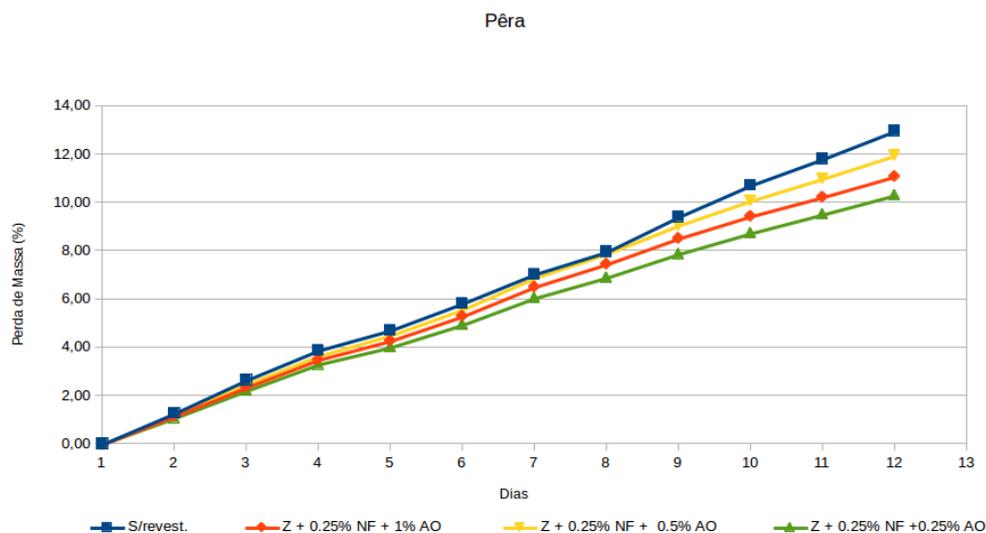


Figura 5.3: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de peras revestidas com 4% de zeína, 0,25% de nanofibra e AO (ácido oleico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).

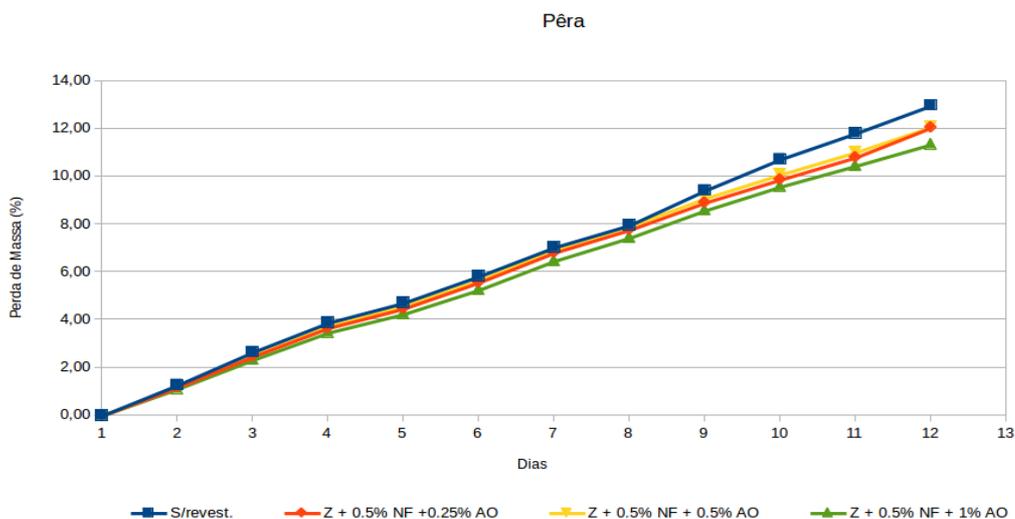


Figura 5.4: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de peras revestida com 4% de zeína, 0,5% de nanofibra e AO (ácido oléico) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%).

Devido ao aspecto esbranquiçado observado tanto com a utilização de 0,5% e 0,25% de NFC, reduziu-se então a sua proporção nos filmes para 0,1%. Então observou-se que as maçãs revestidas com 4% de Z + 0,1% NFC e 0,5% AO (figura 5.5), apresentaram menor perda percentual de massa em relação as outras concentrações testadas devido, principalmente, a diminuição da taxa de transpiração e, por consequência, a diminuição da perda de água do interior do fruto, além disso as frutas não ficaram com aspecto esbranquiçados como ficaram nas demais formulações. Assis et al (2012) relata que filmes de zeína com 0,25% de AO são mais eficazes para maçãs, porém neste caso com a adição da NFC o filme nesta concentração tornou-se mais hidrofílico como será comprovado na seção 5.2.

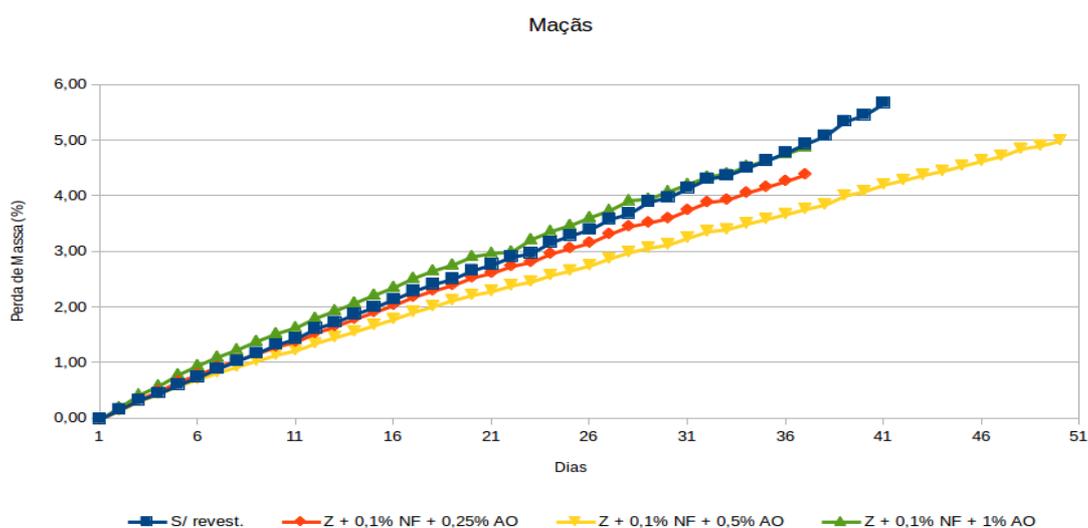


Figura 5.5: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de maçãs revestidas com zeína + 0,1% de nanofibra de celulose, variando-se a concentração de ácido oleico (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.

Já para os resultados em peras (figura 5.6) a concentração não foi significativa, todas as variações de AO na concentração de 4% Z + 0,1% NFC atuaram da mesma maneira, isso pode ser explicado, porque houve um aumento na troca gasosa entre o fruto e o ambiente aumentando

a perda de massa, porém as frutas também não ficaram com aspecto esbranquiçados e as peras sem revestimento tiveram o melhor comportamento, ao que parece que o mesmo revestimento para pera não é tão efetivo quanto para maçã.

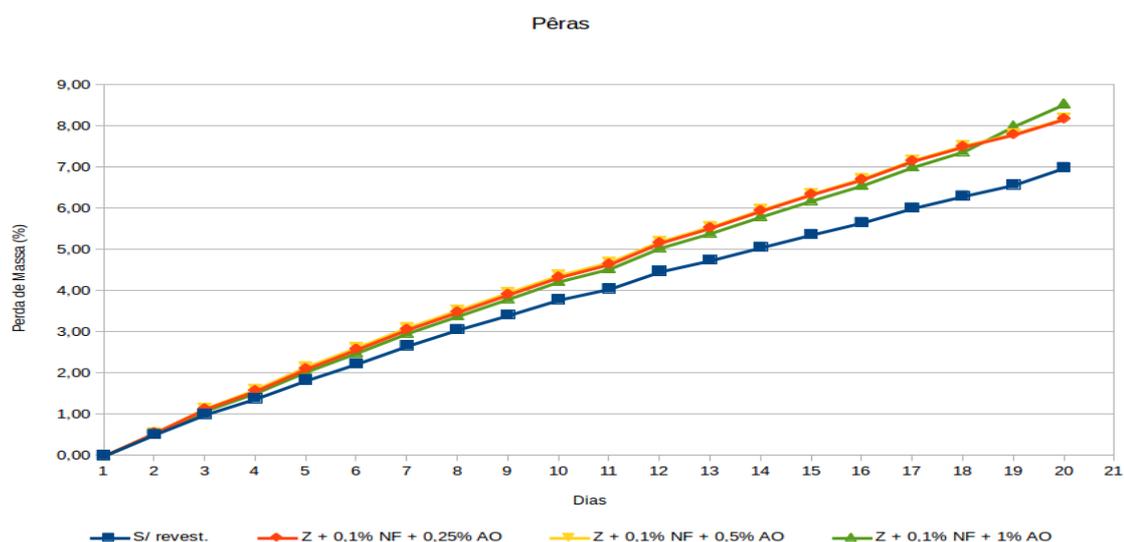


Figura 5.6: Gráfico de perda de massa durante o tempo de estocagem de peras revestidas com eína + 0.1% de nanofibra, variando-se a concentração de ácido oleico (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.

A perda de massa pela transpiração ocorre principalmente na água existente no interior do fruto. Quando revestido sobre o pericarpo dos frutos, o filme bloqueia os estômatos, influenciando nas trocas gasosas (CHITARRA & CHITARRA, 2005). Menores taxas de transpiração mantém ao redor do fruto, menor temperatura, reduzindo a senescência (NETO et. al., 1999).

As aplicações de pequenas concentrações de ácido oleico aumentam a homogeneidade do filme e sua resistência, deixando-os menos quebradiço. No entanto, o ácido oleico também deixa o filme mais hidrofílico, aumentando a passagem de vapor de água, que seria inibida se o material fosse hidrofóbico. Na concentração de 0,5% em massa de AO, o aumento do caráter hidrofílico interfere muito pouco nas trocas gasosas e as propriedades de barreira do filme acabam compensando tal aumento. Por outro lado, quando a concentração de AO é de 1% em massa, as propriedades de barreira não conseguem mais compensar o aumento das trocas gasosas, pois o filme torna-se muito hidrofílico, o que facilita a perda de massa dos frutos.

Portanto, para as demais análises (ângulo de contato, texturômetro, colorimetria e microscopia) utilizamos apenas a solução de 4% Z + 0.1% NFC + variação de AO em 0.25, 0.5

e 1% que foram as que apresentaram melhores resultados de diminuição de perda de massa, aumentando o tempo de prateleira e mantendo a coloração e brilho natural das frutas.

5.2 Ângulo de Contato

Analisando os resultados da média de 5 medidas realizadas nas diferentes formulações dos filmes, observamos que a variação no teor de nanofibra de celulose (NFC) de 0,25 e 0,5% não influenciaram significativamente o caráter hidrofílico dos mesmos. Desta forma as variações observadas no comportamento da absorção de água, por parte dos filmes, se deve preponderantemente ao teor de AO.

Para os filmes com 0,1% de NFC variando as concentrações de AO em 0,25%, 0,5% e 1% (figura 5.7), os valores iniciais de AC foram de $69^\circ (\pm 3^\circ)$. Entretanto foi possível observar um comportamento dependente do tempo. Os filmes com 0,25% e 1% de AO apresentaram um decaimento mais acentuado no valor do ângulo de contato, o que caracteriza maior grau da hidrofiliicidade (figura 5.8). Assim, esses filmes são mais hidrofílicos em relação ao filme contendo 0,5% de AO. Uma hipótese para este efeito é a alta afinidade da zeína com o AO. Colzato et al (2011) utilizou revestimento de zeína em noz macadâmia e a melhor concentração foi de 0,25 e a pior de 0,5% de AO, porém quando foi adicionados NFC ao revestimento que tem caráter hidrofóbico, reduziu-se a hidrofiliicidade devido ao AO na formulação, ou seja, a pior concentração de AO para Colzato et al, para esse trabalho ficou melhor talvez pela inserção do caráter hidrofóbico das fibras.

A zeína em contato com o grupo carboxila do AO tem interações eletrostáticas com este grupo pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácido arginina, o grupo guanidina, carregado positivamente (FORATO et. al, 2004). Isto pode levar a uma orientação da parte hidrofóbica do AO (cadeia carbônica) para a superfície do filme, reduzindo assim sua hidrofiliicidade. Este fenômeno de reorientação do plastificante, na superfície de filmes, já foi observado na literatura para filmes de zeína com glicerol (MUTHUSELVI & DHATHATREYAN, 2006).

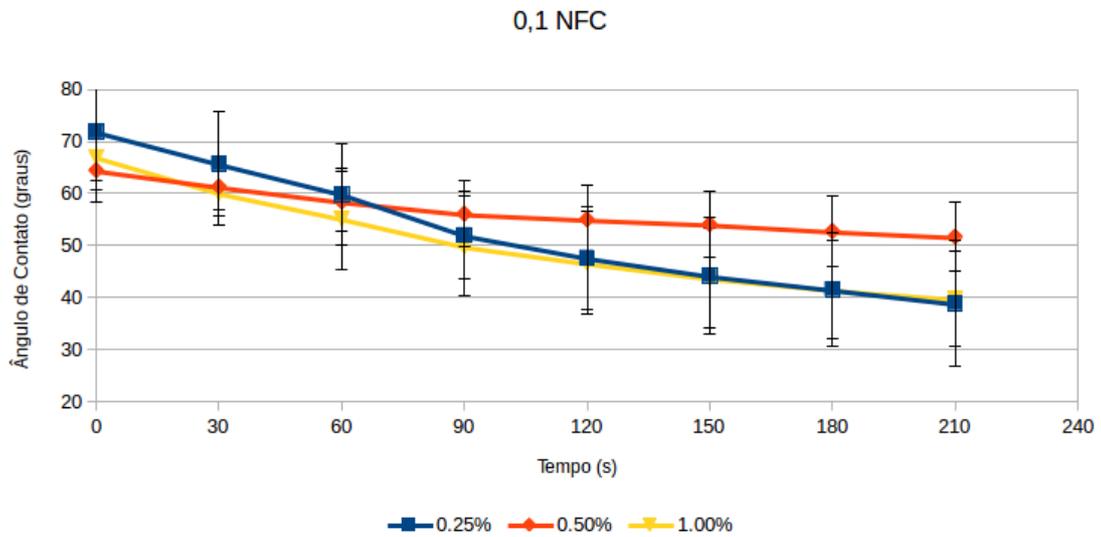


Figura 5.7: Gráfico do ângulo de contato em relação ao tempo de filmes contendo 4% de zeína + 0.1% de nanofibras de celulose, variando a concentração de AO em 0,25; 0,5 e 1%.

Fotos Ângulo de Contato

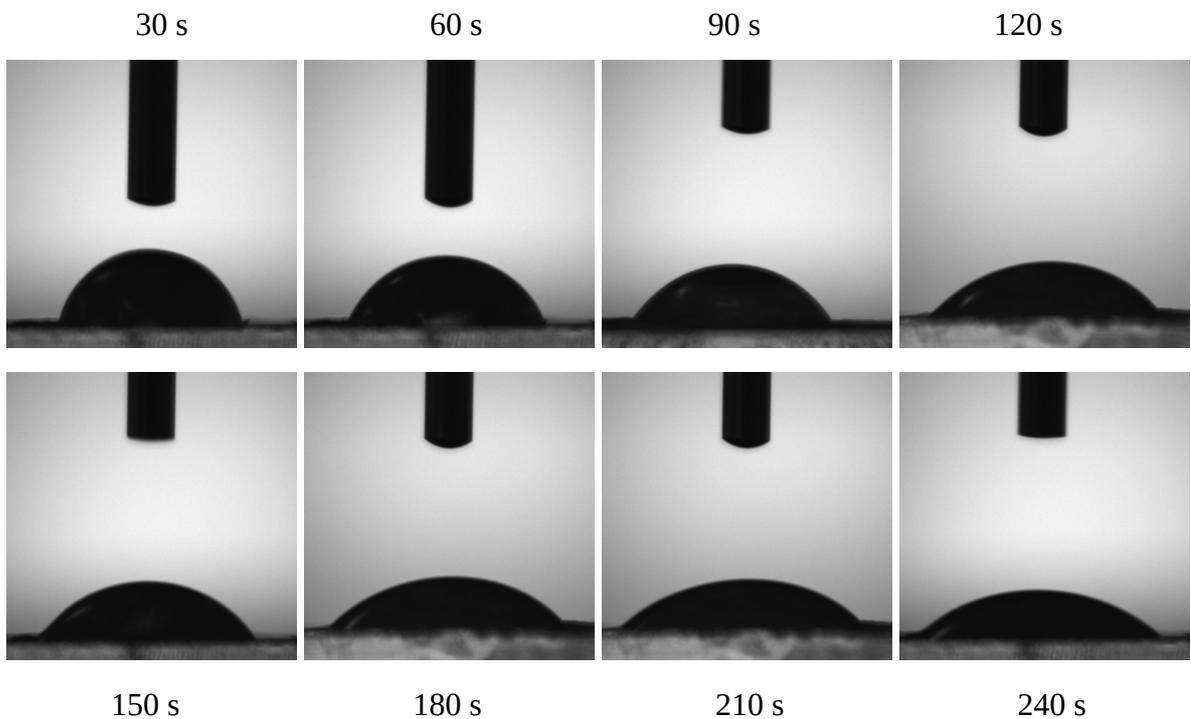


Figura 5.8: Fotos de ângulo de contato dos filmes de 4% Z + 0.1% de NFC + 0.5% de AO nos tempos de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 segundos.

5.3 Texturômetro

A firmeza é considerada um dos atributos de importância na qualidade de frutos, já que afeta a resistência ao transporte, à conservação pós-colheita e ataque de microrganismos (JERÔNIMO et al., 2007). Assim como é uma das características da textura e corresponde ao grau de resistência dos tecidos vegetais à compressão. A caracterização da taxa de tensão-compressão se deu por meio do gradiente numérico entre os valores de tensão e compressão da fruta (ASMAR et. al, 2010). As medidas foram divididas entre “medidas do epicarpo (casca)” e “medidas da polpa”. Foram realizadas, no total, 7 medições ao longo de 15 dias. Todos os filmes continham 4% de zeína e 0,1% de nanofibras de celulose variando a concentração de ácido oleico em 0,25, 0,5 e 1%.

Para os resultados no epicarpo em maçãs (figura 5.9), as alterações da rigidez e textura das frutas não foram significativas. Já os resultados no epicarpo de peras (figura 5.10), os valores de resistência à penetração decaíram com o tempo para todos os grupos, e é importante ressaltar que todos os grupos apresentaram maior valor final de textura do que o controle no dia 13, isso deve ser consequência do avanço do processo natural de amadurecimento e senescência dos frutos para todos as concentrações.

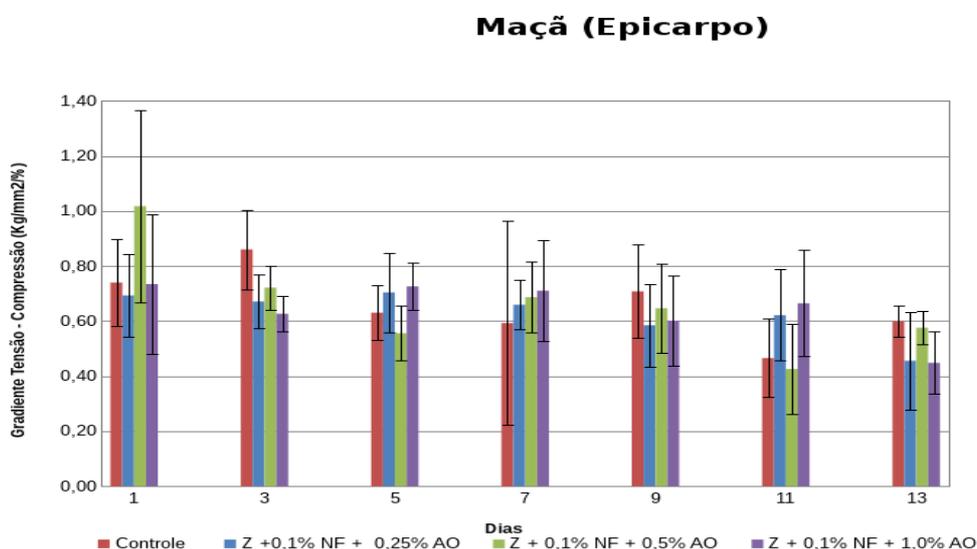


Figura 5.9: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de maçãs (epicarpo). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.

Pera (epicarpo)

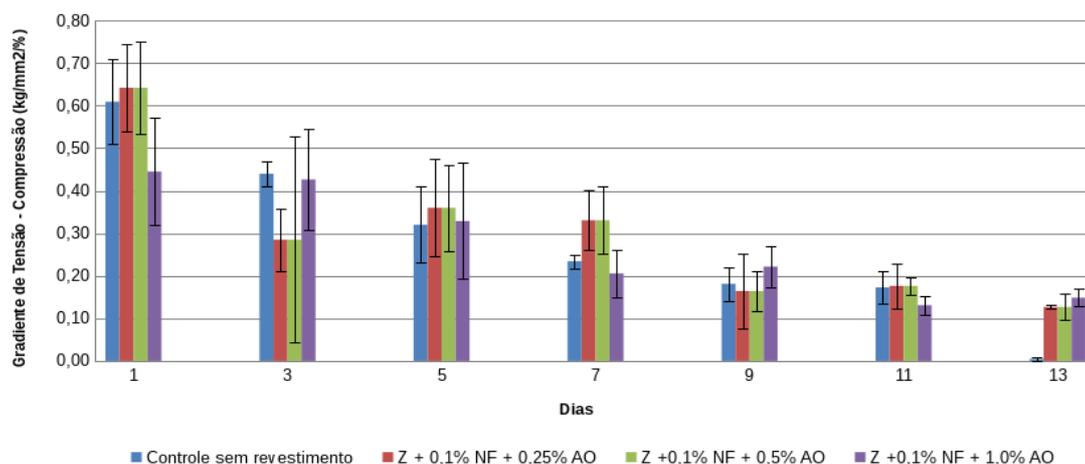


Figura 5.10: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de peras (casca). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.

A caracterização da taxa de tensão – compressão se deu por meio do gradiente numérico entre os valores de tensão e compressão da fruta. Quanto maior o índice de tensão-compressão dada pelo ensaio, maior é a dureza do fruto, visto que é necessário maior força para que o mesmo seja perfurado.

Para os resultados da polpa em maçãs e peras (figura 5.11 e 5.12), o revestimento foi capaz de preservar os tecidos das frutas, provavelmente pela diminuição da taxa de transpiração e perda de água, ou seja, consequência de menor perda de massa.

Com relação à firmeza da polpa, houve efeito significativo das diferentes formulações mais para peras do que para maçãs, e em peras a melhor formulação que manteve a firmeza da polpa do fruto foi 0,5% de AO. Observou-se efeito significativo também devido ao tempo de armazenamento, ocorrendo redução da resistência da polpa, característica normal do processo de amadurecimento. Isso reflete uma maior durabilidade da fruta revestida, uma vez que sua consistência está mais preservada do que a da fruta sem revestimento.

Maçã (polpa)

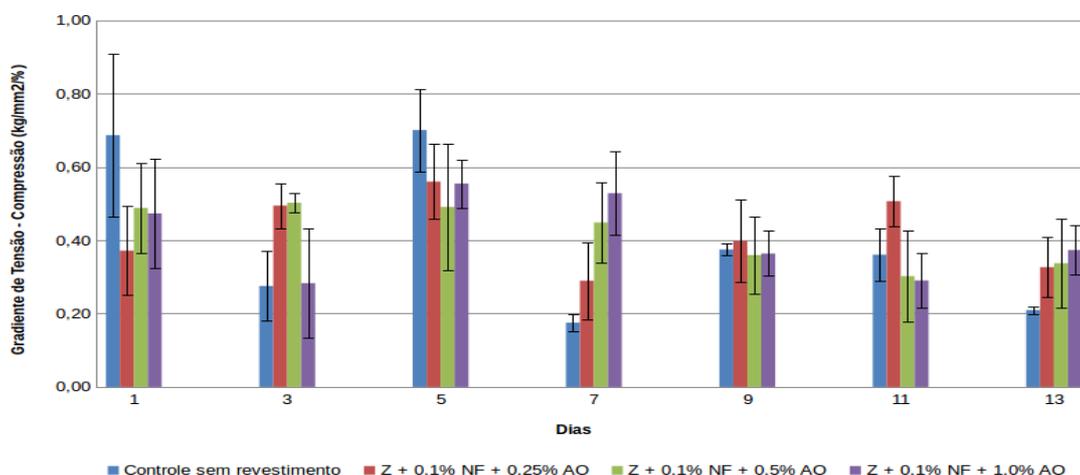


Figura 5.11: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de maçãs (polpa). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.

Pera (polpa)

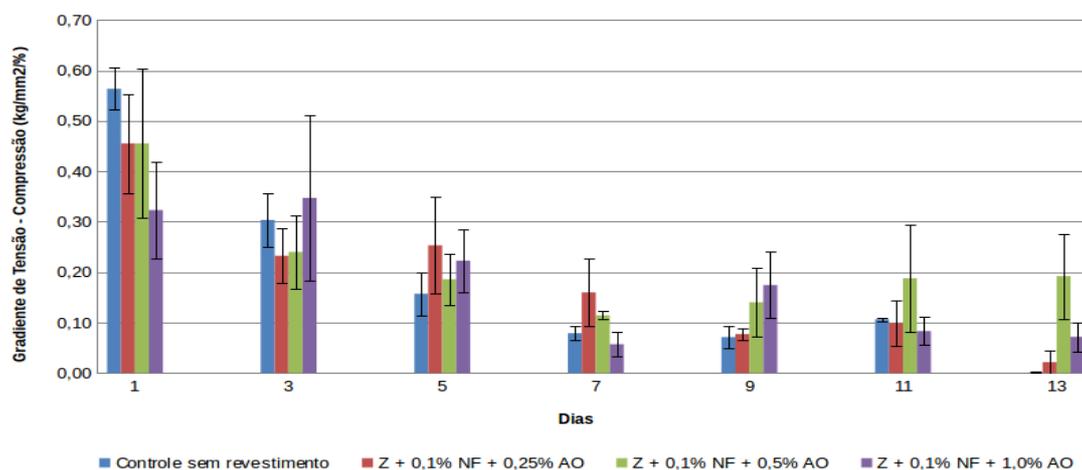


Figura 5.12: Registros do gradiente de tensão-compressão em relação ao tempo de peras (polpa). Frutas revestidas com filmes contendo zeína (4%), nanofibras de celulose (0,1%) e variando-se a concentração do plastificante (AO) em 0,25; 0,5 e 1%.

5.4 Colorimetria

É de interesse comercialmente que o produto apresente intensidade e uniformidade de coloração, a qual pode ser avaliada no epicarpo de frutas (CHITARRA & CHITARRA, 2005). A coloração se relaciona diretamente com a percepção da aparência pelo consumidor, ao passo que a concentração de pigmentos pode estar relacionada com a maturidade do produto.

O ângulo de Hue representa a localização da cor em um diagrama pela atribuição de ângulos, sendo: 0° representa vermelho, 90° representa o amarelo, 180° o verde e 270° o azul. A coloração do epicarpo que é dado pelo ângulo de Hue (h°) sofreu variação significativa apenas em função do período de armazenamento. Foi observando um aumento do seu valor, com o passar do período de armazenamento, independente da concentração de ácido oleico utilizado.

Na figura 5.13, foi possível observar que a coloração das frutas revestidas tiveram comportamento semelhante ao das frutas não revestidas. A variação de cor neste caso, embora partindo de ângulos de Hue diferentes, foi característica do amadurecimento destas frutas, pois sua coloração inicial foi praticamente mantida. O que podemos observar também, é que conforme aumentamos a concentração de ácido oleico nas soluções, as frutas revestidas mantiveram sua coloração e brilho natural.

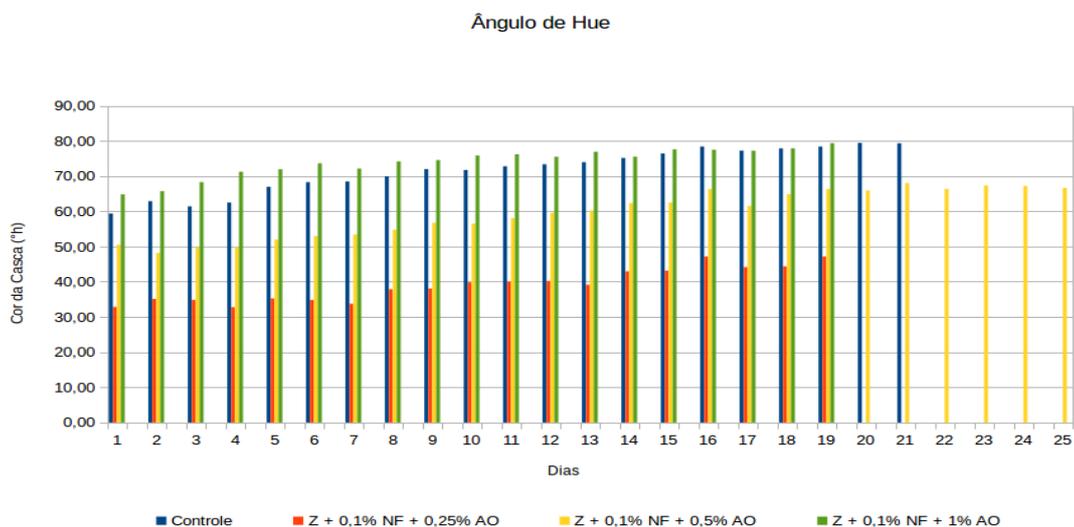


Figura 5.13: Gráfico de coloração do epicarpo em relação ao tempo de maçãs revestidas com 4% de zeína, 0,1% de nanofibra de celulose e variação de ácido oleico em 0,25; 0,5 e 1%.

No gráfico 5.14, é possível observar que no início a coloração observada era o amarelo, posteriormente tendendo para um amarelo mais escuro, indicando o amadurecimento da pera, portanto o filme não alterou a coloração das frutas durante o experimento. Não houve mudanças significativas em relação a saturação da coloração, mantendo somente as características de amadurecimento da fruta.

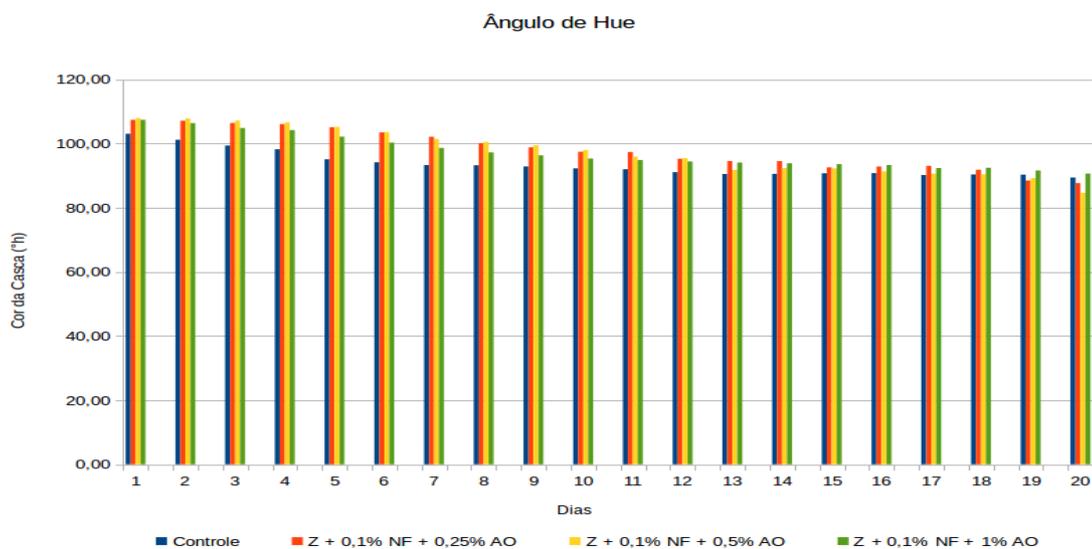


Figura 5.14: Gráfico de coloração do epicarpo em relação ao tempo de peras revestidas com 4% de zeína, 0,1% de nanofibra de celulose e variação de ácido oleico em 0,25; 0,5 e 1%.

5.5 Microscopia de Força Atômica

As imagens de microscopia de força atômica permitiram observar vários tamanhos e concentrações de poros nos filmes obtidos. A superfície dos filmes apresentam deformações lineares causados pelo processo de secagem, que consiste em depositar a solução de zeína + nanofibras + plastificante em uma placa de acrílico. Os sulcos das placas utilizadas aparecem como linhas nos filmes, pois estes se moldam muito bem a eles. A capacidade de se moldar a superfícies é altamente desejável para o uso no recobrimento de frutos. Isto garante que o filme, em escala microscópica, tenha capacidade de cobrir todas as imperfeições da superfície dos frutos.

As figuras abaixo mostram imagens de microscopia de força atômica dos filmes contendo 4% de zeína, 0,1% de nanofibras de celulose e ácido oleico em várias concentrações.

Na figura 5.15, o filme apresenta estruturas semelhantes a poros. Essas estruturas semelhantes a poros podem explicar o motivo deste filme não ter apresentado bom desempenho para aumentar o tempo de prateleira das frutas recobertas, pois esta não homogeneidade no filme pode ter facilitado significativamente a troca gasosa do fruto com o ambiente.

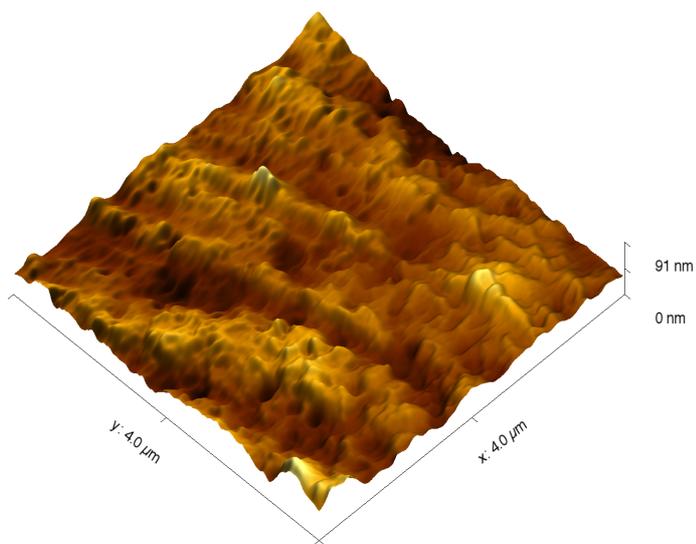


Figura 5.15: Imagem de microscopia de força atômica de filmes contendo 4% de zeína + 0,1% de nanofibras de celulose + 0,25% de AO.

Utilizando a formulação do filme, mostrado na figura 5.16, obtivemos o melhor resultado para conservação das frutas. Este apresentou boa homogeneidade e poros de diâmetro inferior ao das outras formulações e em menor quantidade. Esta característica, na nossa interpretação, é a responsável pela diminuição significativa da troca gasosa do fruto com o ambiente e consequente aumento no tempo de prateleira, observado nos experimentos descritos de perda de massa e ângulo de contato.

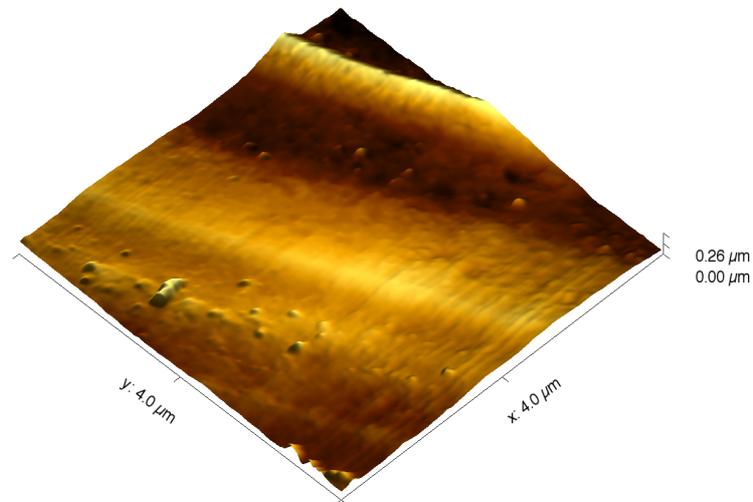


Figura 5.16: Imagem de microscopia de força atômica de filmes contendo 4% de zeína + 0.1% de nanofibras de celulose + 0,5% de AO.

Em filmes de zeína com formulações de 0,1% de nanofibra de celulose e 1% de AO, não obtivemos um bom resultado, pois os filmes ficaram muito quebradiços (figura 5.17), além disso apresentou aglomerados. Esses aglomerados podem ser resultado da complexação do ácido oleico com as nanofibras de celulose. Experimentos realizados anteriormente, utilizando a formulação de 4% de zeína + 1% de AO para recobrimento de peras, não apresentaram bons resultados de aumento de tempo de prateleira, os autores atribuíram ao excesso de AO, que poderia aumentar a hidrofiliabilidade do filme. (SCRAMIN, 2010).

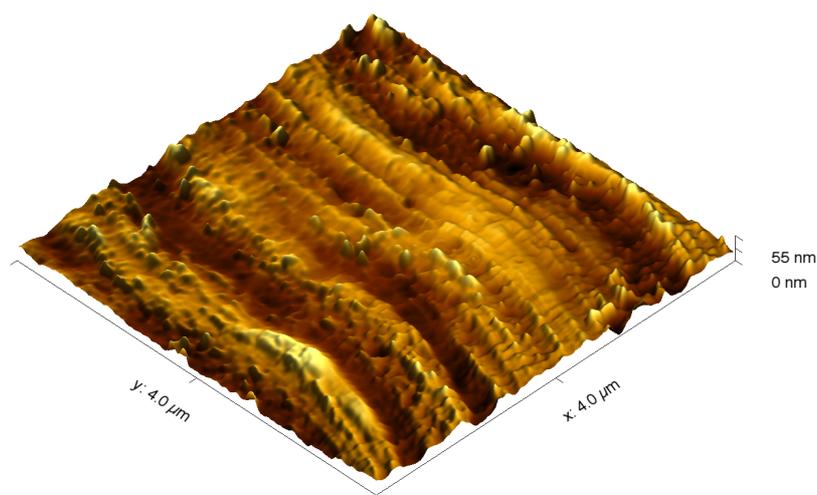


Figura 5.17: Imagem de microscopia de força atômica de filmes contendo 4% de zeína + 0.1% de nanofibras de celulose + 1% de AO.

5.6 Testes para avaliação de ação tóxica do filme

5.6.1. Parâmetros alimentação e excreção

Os resultados apresentados, nesta seção, como média acumulada da semana \pm EPM (Erro Padrão da Média), comparados entre o grupo de ratos experimental e o controle pela análise de variância ANOVA seguido do teste t de Student aplicados utilizando o software Origin Pro 9.0. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para análise dos resultados, foram descartados 3 animais (2 do grupo controle e 1 do grupo experimental), pois ao longo do experimento, estes apresentaram comportamento que pode ser atribuído, desde a primeira semana, a alguma disfunção ou doença.

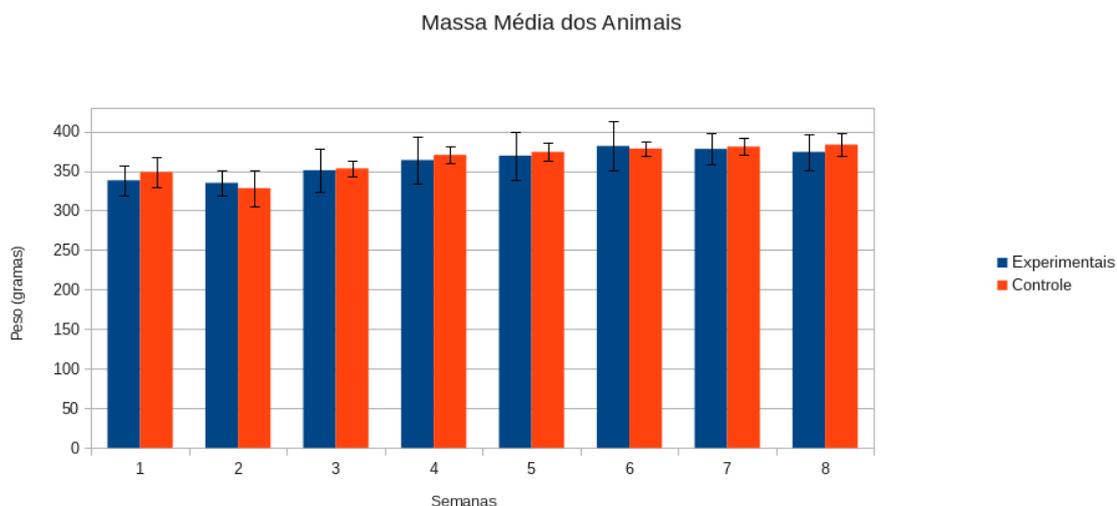


Figura 5.18: Gráfico de massa média dos animais durante as 8 semanas do experimento.

Os animais foram pesados 1 (uma) vez por semana, sempre o mesmo dia da semana (quinta-feira), com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento dos animais.

A massa corporal inicial foi semelhante nos dois grupos. Durante a primeira semana pode-se observar uma perda de massa corporal (MC) em todos os animais, isso provavelmente se deve ao estresse de adaptação à gaiola metabólica, pois antes do tratamento os animais eram mantidos em gaiolas coletivas. A partir da segunda semana, após a adaptação ao novo ambiente, o peso passou a ter o comportamento esperado com pequeno aumento progressivo semanal.

Na terceira e quarta semana o ganho de peso dos dois grupos foram semelhantes e após a quinta semana de tratamento, os animais do grupo experimental apresentaram um ganho de massa corporal maior do que o do grupo controle (figura 5.18 e tabela 5.1), porém essa diferença não foi significativa estatisticamente.

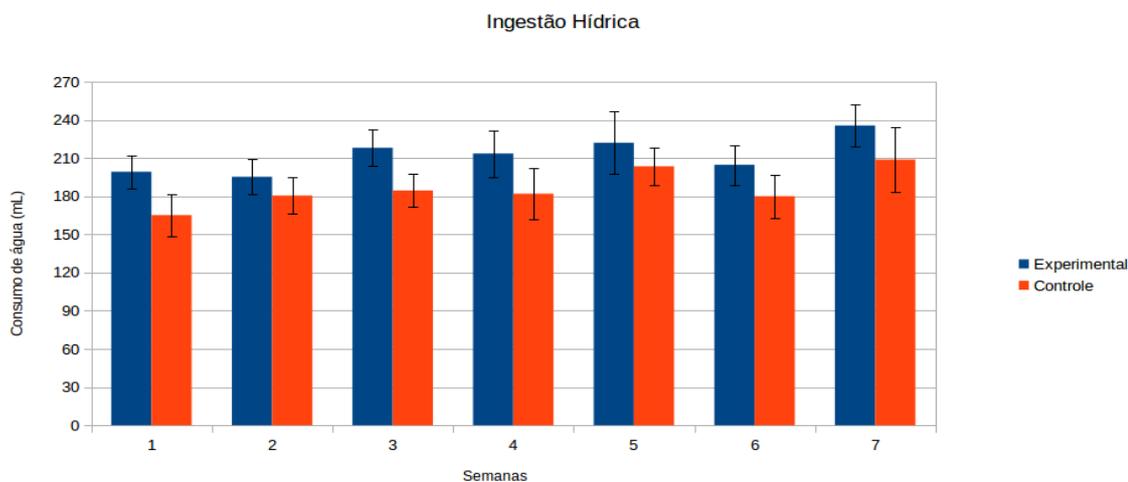


Figura 5.19: Gráfico da média acumulada de ingestão hídrica dos animais.

O consumo de água dos animais foi quantificado diariamente, durante todos os 50 dias do experimento.

O volume de água consumido pelos animais não manteve um padrão durante todo o período experimental (Figura 5.19 e tabela 5.2), porém ao analisarmos o consumo acumulado médio de água dos animais, observamos que o grupo experimental consumiu volume maior do que o grupo controle, e isso foi significativamente diferente. Isto pode ser explicado, pelo aumento no consumo de proteína dos animais, pois segundo Freudenberg et. al (2012) e Pedrosa et.al (2009), ratos foram tratados com uma dieta rica em proteínas e houve um aumento considerável na ingestão hídrica e excreção de urina dos mesmos. O que condiz com os resultados de teor de proteína realizado na Embrapa Pecuária Sudeste na ração revestida e não revestida oferecida aos ratos, onde mostrou que a ração revestida com zeína + nanofibras de celulose aumentou o teor proteico da mesma em aproximadamente 5%.

Tabela 5.1: Teor de proteína realizado em rações revestida e não revestida.

Análise Teor de proteína	SETEMBRO - 2013	g/Kg
Nº. Lab.		
1	Ração Revestida (Zeina) + nanofibra celulose	37,14
2	Ração sem Revestimento	35,41

Aumento de 5%

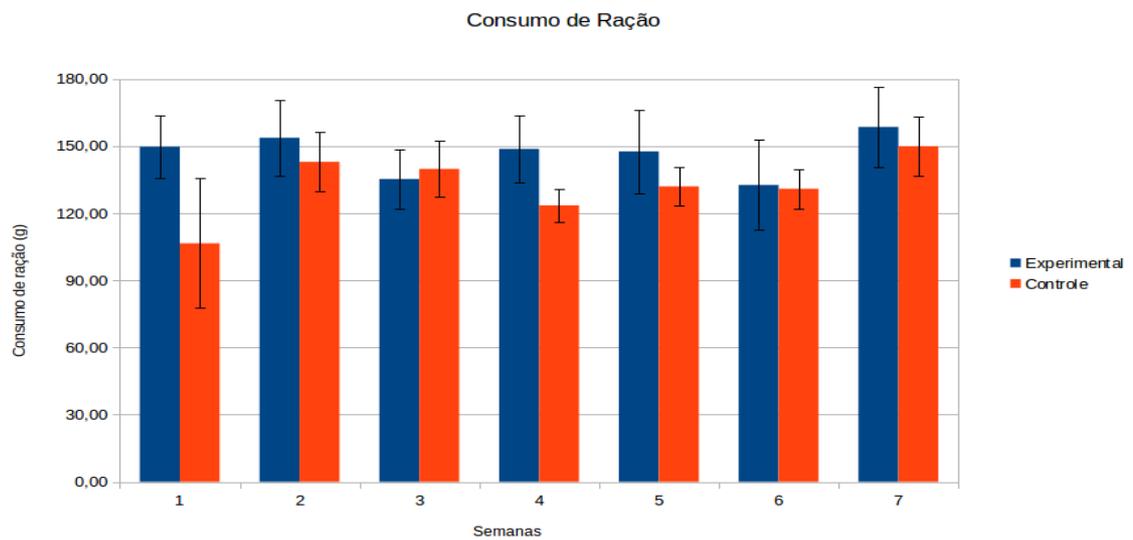


Figura 5.20: Gráfico da média acumulada do consumo de ração dos animais.

A ingestão de ração do grupo experimental se manteve maior do que a do grupo controle durante todo o período experimental (figura 5.20 e tabela 5.4), porém, segundo a análise dos dados estatísticos esta diferença no consumo de ração não foi significativa.

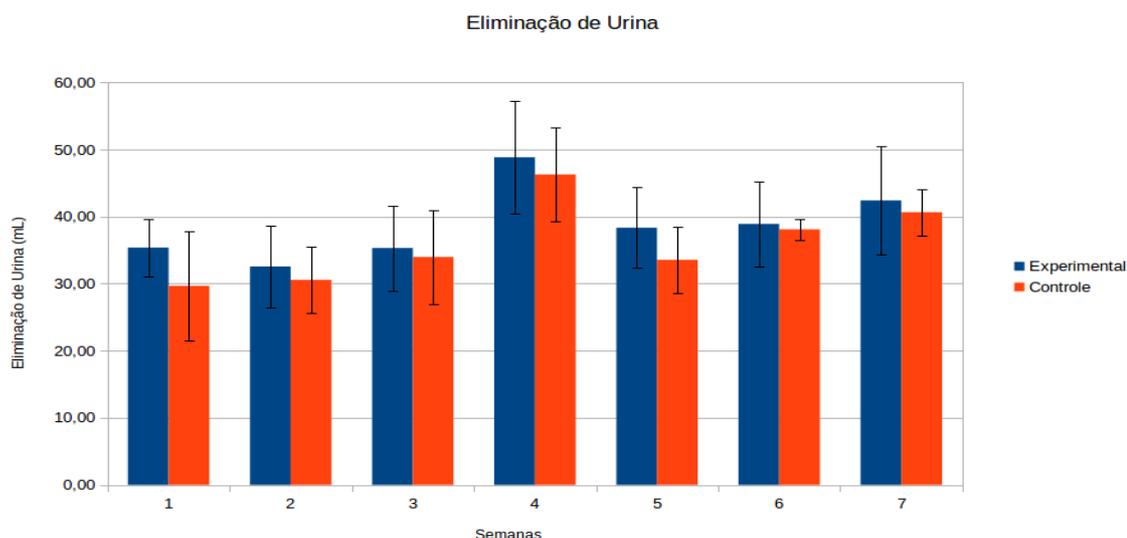


Figura 5.21: Gráfico da média acumulada da eliminação de urina dos animais.

O volume de urina excretada em aproximadamente 24 horas foi quantificado. Analisando a quantidade de urina excretada durante todo o período de tratamento foi observado que o volume de urina dos animais do grupo experimental foi maior que a do grupo controle durante todo o experimento (Figura 5.21 e tabela 5.5). Este dado pode ser confirmado ao analisarmos a excreção média de urina, em que podemos observar que os animais do grupo experimental excretaram maior volume urinário do que os animais do grupo controle, apesar dessa diferença não ser significativa estatisticamente, isso também pode ser explicado como mencionado acima, pelo aumento no consumo do teor de proteína na dieta alimentar dos animais.

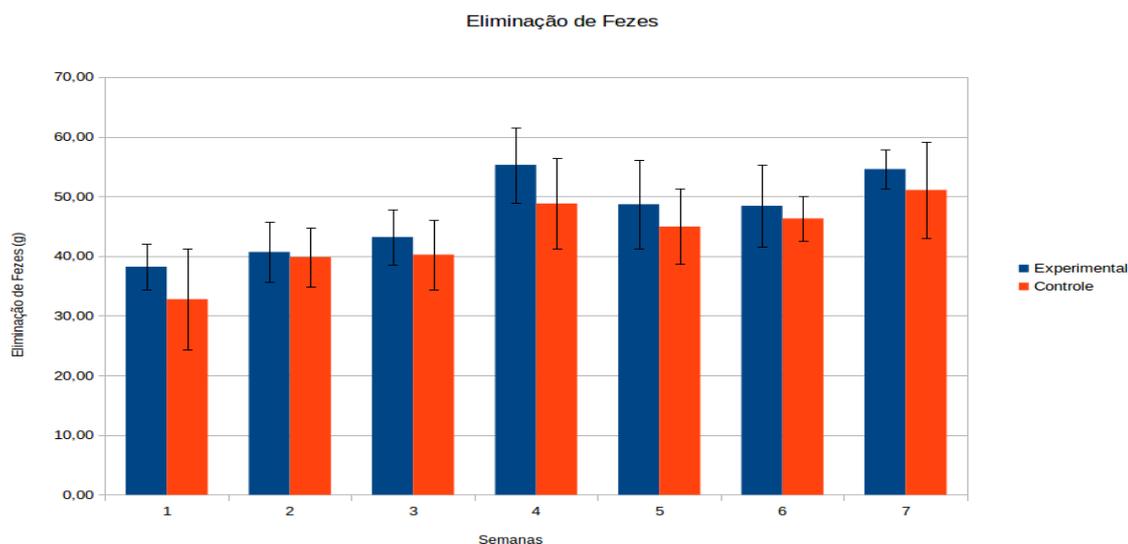


Figura 5.22: Gráfico da média acumulada da eliminação das fezes dos animais.

As fezes foram coletadas e pesadas diariamente. Não foram observadas diarréias, a consistência estava normal em todos os animais (experimental e controle), possivelmente os filmes de zeína com nanofibras de celulose não causaram qualquer irritação ou dano à mucosa intestinal dos animais. A quantidade média de fezes excretada pelos animais do grupo experimental foi maior do que a dos animais do grupo controle (figura 5.22 e tabela 5.6), provavelmente se deve ao aumento do consumo de ração e ingestão hídrica, o que também pode explicar o aumento na massa corporal. Quando analisamos a excreção diária, observamos que da segunda até a sétima semana do experimento, a quantidade de fezes excretada do grupo experimental manteve-se maior do que a dos animais do grupo controle.

A análise do peso das glândulas seminais (testículos) e próstatas ventrais dos animais do grupo experimental apresentaram normal em relação aos órgãos dos animais do grupo controle (Tabela 5.7), exceto de um único animal experimental ter apresentado o testículo esquerdo atrofiado, mas isso não interferiu na média do grupo. As glândulas seminais e as próstatas ventrais são órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino e a testosterona é responsável pelo trofismo destes órgãos.

Tabela 5.2: Tabela de peso dos testículos, próstata e vesícula seminal dos ratos após a eutanásia.

	Testículos	Próstata	Vesícula Seminal
Experimental	3,0 g ± 0,4	0,4 g ± 0,1	0,5 g ± 0,1
Controle	3,0 g ± 0,2	0,4 g ± 0,1	0,5 g ± 0,1

Como descrito por Oberdorster et al (2005), uma das possíveis rotas das NFCs é a absorção pelo trato gastrointestinal podendo ser eliminada pelas fezes ou circular na linfa e sangue e ser distribuídos para vários órgão como rim, baço, fígado e coração. Na análise do peso do rim, baço, fígado e coração, se mantiveram com pesos semelhantes entre os dois grupos, no entanto o baço apresentou um aumento significativo segundo o teste T de Student em relação ao grupo controle.

Esse aumento no peso do baço do grupo experimental, pode ser explicado pelo aumento no nível do colesterol (tabela 5.8), pois segundo estudos realizados, normalmente as concentrações elevadas de gorduras podem provocar aumento no tamanho do baço (Disponível em <http://www.msdonline.com.br>).

Tabela 5.3: Tabela de peso dos órgãos: Rim, Baço, Fígado e Coração.

	Rim	Baço	Fígado	Coração
Experimental	2,4 g ± 0,2	1,1 g ± 0,2	11,4 g ± 1,7	1,2 g ± 0,1
Controle	2,3 g ± 0,1	0,9 g ± 0,1	10,2 g ± 0,8	1,3 g ± 0,2

5.6.2 Parâmetros Bioquímicos Sanguíneos.

Como mostrado na tabela 5.9, a análise bioquímica sanguínea (ácido úrico, creatinina, triglicérides, colesterol total, glicose, TGO, TGP, fosfatase alcalina, fósforo, cálcio bilirrubina total, direta e indireta) do grupo de ratos experimental mostrou que a ingestão da ração revestida com filmes de zeína com adição de nanofibras de celulose durante 50 dias não provocaram nenhuma alteração significativa nos parâmetros sanguíneos, exceto o colesterol total que no grupo experimental houve um aumento significativo.

Provavelmente a taxa metabólica dos animais foi aumentada, isto é, o gasto energético foi maior. Segundo Lei et. al (2008) isto pode ser devido à alteração nas fisiologias da tireoide, das adrenais ou da hipófise.

A demanda energética pode ser suprida pela lipólise, o que poderia acarretar no aumento dos níveis séricos de colesterol como foi observado nestes animais. O aumento do colesterol não afetou o fígado, pois os níveis de TGO, TGP e fosfatase alcalina não foram alteradas.

Tabela 5.4: Testes Sanguíneos dos animais.

Testes Sanguíneos dos Animais		
	Controle	Experimental
Ácido Úrico (mg/dL)	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,5
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Triglicérides (mg/dL)	72,4 ± 22,3	84,4 ± 30,7
Colesterol Total (mg/dL)	57,5 ± 4,5	66,6 ± 5,1
Glicose (mg/dL)	95,6 ± 9,7	88,7 ± 14,1
TGO (U/L)	286,8 ± 74,3	260,9 ± 94,9
TGP (U/L)	71 ± 23	61,3 ± 18,8
Fosfatase Alcalina (U/L)	123,5 ± 21,2	107,9 ± 24,4
Fósforo (mg/dL)	6,4 ± 0,7	6,3 ± 0,4
Cálcio (mg/dL)	9 ± 0,3	8,9 ± 0,3
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2 ± 0	0,2 ± 0
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,1 ± 0	0,1 ± 0

5.6.3 Parâmetros Biomecânicos.

Na análise realizada para identificar se houve alguma alteração na estrutura óssea dos animais, a força máxima, que corresponde a carga máxima suportada pelo osso, apresentada pelos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimental e controle não apresentaram diferenças significativas. O mesmo ocorre com a resiliência (energia suportada pelo osso durante a fase elástica), tenacidade (energia suportada pelo osso durante o ensaio até o momento da fratura) e a rigidez (capacidade do osso resistir a deformação) (Tabela 5.10). Esses parâmetros biomecânicos são referências para analisar a qualidade óssea em relação a forças mecânicas. Os filmes de zeína com adição de nanofibras de celulose não alteraram nenhum dos parâmetros analisados, indicando ausência da influência sobre as estruturas ósseas dos grupos experimental e controle.

Tabela 5.5: Parâmetros biomecânicos dos ossos dos animais.

	Experimental	Controle
Força Máxima (KN)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
ΔS Força Máx. (mm)	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2
Força de Rupt. (KN)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
ΔS Força de Rupt. (mm)	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,3
Resiliência (J)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Tenacidade (J)	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Rigidez (N/mm)	299,4 ± 37,7	314,0 ± 40,0

Os dados da tabela 5.11 indicam que os dois grupos de animais não tiveram variações nos valores do Conteúdo Mineral ósseo (CMO) e na Densidade Mineral óssea (DMO). Os valores desses dois parâmetros comparando os animais que foram alimentados com a ração com revestimento, com os animais que foram alimentados com a ração sem revestimento, não tiveram diferença para nos mostrar que a ração revestida poderia interferir ou alterar a estrutura óssea desses animais, ou seja, esse tipo de alimentação proporcionada aos animais não causou nenhum dano, ou algum tipo de propensão à doenças relacionadas aos ossos, e isso pode ser confirmado com as análises de microtomografia de raio-x.

Tabela 5.6: Tabela de densitometria óssea dos animais.

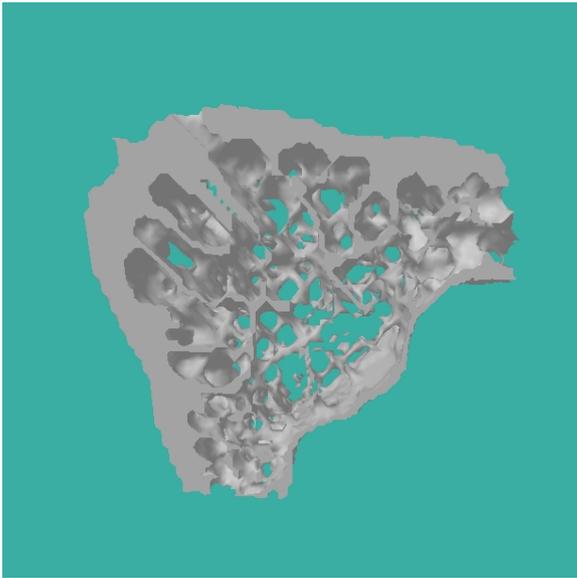
	CMO	Area	DMO
Experimental	0,3 ± 0,0	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0
Controle	0,3 ± 0,0	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0

Na tabela 5.12 são mostrados os resultados de Microtomografia de Raio-x, nessa análise conseguimos calcular o volume do tecido nos ossos, o volume do osso, quantidade de trabéculas e a espessura delas. Comparando os valores dos animais controle com os experimentais, observamos que todos os parâmetros do grupo experimental, foram superior ao grupo controle, isso talvez se deve ao grupo experimental ter se alimentado melhor com a ração revestida em relação ao grupo controle com a ração não revestida. Porém essa alteração nos parâmetros não é prejudicial, muito pelo contrário, quanto maior o volume ósseo, mais massa óssea, ou seja, mais cálcio, fósforo e outros minerais.

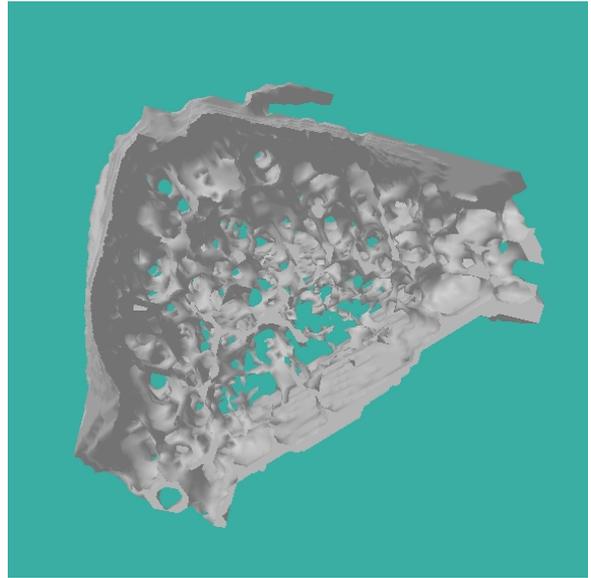
Tabela 5.7: Parâmetros de Histomorfometria óssea da vértebra dos animais.

	Controle	Experimental
Volume do tecido ósseo (mm³)	564,02 ± 39,08	686,29 ± 33,51
Volume do osso (mm³)	69,61 ± 5,95	79,38 ± 5,49
Porcentagem do volume do osso (%)	32,87 ± 1,32	34,69 ± 1,74
Espessura da trabécula (mm)	0,33 ± 0,05	0,35 ± 0,05
Número de trabéculas (mm)	3,00 ± 0,42	3,50 ± 0,48
Separação das trabéculas (mm)	2,76 ± 0,58	3,19 ± 0,69

Na figura 5.23 é mostrado imagens do corte transversal de vértebras dos ratos feito por microtomografia, onde podemos observar que a estrutura óssea dos animais experimentais (b) não foram afetadas com a ingestão da ração revestida com zeína e adição de nanofibras de celulose, comparando com a imagem da estrutura óssea dos ratos controles (a).



(a)



(b)

Figura 5.23: Imagem 3D do corte transversal de vértebras dos animais (a) controle e (b) experimental.

6. Conclusões

1. O filme formado com: 4% de zeína, 0,1% nanofibra de celulose e ácido oleico não interferiram significativamente no aspecto das frutas (peras e maçãs) e foram capazes de preservar a qualidade das frutas diminuindo as trocas gasosas e a perda de massa dos frutos revestidos.

2. O uso de concentrações superiores a 0,1% de nanofibras de celulose, na solução filmogênica tornou as frutas esbranquiçadas.

3. A análise de textura e rigidez da polpa das frutas, utilizando o texturômetro, e perda de massa permitiram concluir que a formulação de 4% de zeína + 0,1% de nanofibras de celulose e 0,5% de ácido oleico é a mais eficiente para manter a textura da casca e da polpa em frutas revestidas do que as demais soluções.

4. Baseado nas medidas de ângulo de contato e microscopia de força atômica, pode-se afirmar que a formulação do filme supracitado apresentou carácter hidrofóbico e aspecto mais homogêneo, ou seja, mais uniforme em relação aos outros filmes que se apresentaram mais hidrofílicos e menos homogêneos, deixando-os assim mais susceptíveis à umidade.

5. No experimento com os ratos Wistar alimentados por 7 semanas com filmes de zeína, com adição de nanofibras de celulose, para avaliar a nanotoxicidade, aumentou as concentrações séricas do colesterol total e peso do baço dos ratos experimentais em relação aos ratos controles. Porém não foi observado alterações nos parâmetros biomecânicos do tecido ósseo e na maioria dos parâmetros bioquímicos analisados, além disso, tanto o grupo controle como o grupo experimental manteve um ganho na massa corporal durante todo o experimento, consumiram ração e ingeriram água de forma normal e excretaram também de forma normal, o que é um indicativo de que a ração não causou problemas à saúde dos animais.

7. Perspectivas Futuras

- Testar novas concentrações de ácido oleico e outras concentrações filmogênicas para o melhor revestimento para peras.
- Testar o revestimento em outros tipos de frutas, para observar se o mesmo revestimento serviria para outras frutas.
- Analisar histologicamente os órgãos dos animais que estão devidamente guardados em freezer -80°C.
- Realizar outras análises com as excreções dos animais (fezes e urina) que estão guardadas.

8. Referências Bibliográficas

ABDI, N.; HOLFORD, P.; McGLASSON, W.B.; MIZRAHI, Y. Ripening behaviour and responses to propylene in four cultivars of Japanese type plums. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 12, p. 21 - 34, Aug. 1997.

ABE, K., IWAMOTO, S., YANO, H., Obtaining Cellulose Nanofibers with a Uniform Width of 15 nm from Wood, *Biomacromolecules*, 8, 3276 - 3278, 2007.

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E. *Ethylene in plant biology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 414 p., 1992.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production in the potential in food industry: review. *LWT – Food Science Technology*, London, v. 43, p. 837 – 842, 2010.

ALVARENGA, N. Estudos em textura de Queijo Serpa. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos; Universidade Técnica de Lisboa –Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2000.

ARTÉS, F. Panorâmica actual de la Postcosecha Hortofrutícola y de los Productos Vegetales Mínimamente Procesados. In: Curso Internacional de Tecnología Postcosecha y Procesad Mínimo, 2., 2008, Cartagena, Espanha. [Madri: 5 al día, 2008]. palestra.

ASMAR, S. A.; DE ABREU, C. M. P. ; LIMA, R. A. Z.; CORRÊA, A. D.; DOS SANTOS, C. D. Firmeza de mamão tratado com 1-MCP em diferentes tempos de exposição. Ciência e Agrotecnologia, vol. 34, n. 2, p. 440 – 444, 2010.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. Polímeros, Ciência e Tecnologia, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 223 – 228, 2003.

ASSIS, O. B. G.; SCRAMIN, J. A.; CORREA, T. R. A.; BRITTO, D. de; FORATO, L. A. A comparative evaluation of integrity and colour preservation of sliced apples protected by chitosan and zein edible coating. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 13, n. 1, p. 76 - 85, 2012.

AUFFAN, M.; DECOME, L.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; MEO, M.; BRIOIS, V.; CHANEAC, C.; OLIVI, L.; BERGE-LEFRANC, J.; BOTTA, A.; WIESNER, M.; BOTTERO, J. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. Environ. Sci. Technol., v. 40, p. 4367 – 4373, 2006

BAI, J., ALLEYNE, V., HAGERMAIER, R.D., MATTEIS, J.P., BALDWIN, E.A. Formulation of zein coatings for apples (*Malus domestica* Borkh), Post harvest Biol. And Technol., v. 28, p. 259-268, 2003.

BALDWIN, E. A. Edible Coatings for fresh fruits and vegetables: past, present and future. In: KROTCHA, J. M.; BALDWIN, E. A.; CARRIEDO-NISPEROS, M. (Ed.). Edible Coatings and Films to improve Food Quality. New York: CRC Press, p. 25 – 64, 1994.

BALDWIN, E. A. et al. E. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. *Post harvest Biol. Technol.*, v. 17, p. 215-226, 1999.

BARNES, G.T.; GENTLE, I.R. *Interfacial Science an Introduction*. Oxford University, Press., 2005.

BARROS, S. M.; de GOES Á.; MINAM, K. Condições de conservação pós-colheita de frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.). *Scientia agricola*, Piracicaba, v. 51, n. 2, p. 363 – 368, 1994.

BECK-CANDANEDO, S., ROMAN, M., GARY, D. G., Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions, *Biomacromolecules*, 6, 1048 - 1054, 2005.

BERILLI, S. da S; OLIVEIRA, J. G. de; MARINHO, A.B.; LYRA, G.B; SOUSA, E.F. de; VIANA, A.P.; BERNARDO, S.; PEREIRA, M.G. Avaliação da taxa de crescimento de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) em função das épocas do ano e graus-dias acumulados. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 11 - 14, Abril 2007.

BERMUDEZ, E.; MANGUM, J. B.; WONG, B. A.; ASGHARIAN, B.; HEXT, P. M.; WARHEIT, D. B.; EVERITT, J. I. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles. *Toxicol. Sci.*, v. 77, Issue 2, p. 347 – 357, 2004.

BHATTACHARYA, D., GERMINARIO, L. T., WINTER, W. T., Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse, *Carbohydrate Polymers*, 73, 371 – 377, 2008.

BIALE, J.B. The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits. *Advances in Food Research*, New York, v. 10, p. 293 - 354, Apr. 1960.

BINNING,G.; QUATE, C.F. Atomic force microscopy. *Physical Review Letters*, v.56, n.9, p. 930 – 933, 1986.

BOUTOOM, T.; CHINAN, M. S.; JANTAWAT, P.; SNAGUADEEKUL, R. Effect of plasticizer type and concentration on the edible film from water soluble fish proteins in Surimi wash water. *Food Science and technology international*, London, v. 12, n. 2, p. 119 – 162, 2006.

BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A new method for obtaining of quaternary salt of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 69, p. 305 – 310, 2007.

BURG, S. P. *Postharvest Physiology and Hypobaric Storage of Fresh Produce*. Cambridge, Ma: Cabi Publishing, 2004. 670 p.

CHAMADA MCTI/CNPQ Nº 17/2011 – Apoio à criação de redes cooperativas de pesquisa e desenvolvimento em nanotoxicologia e nanoinstrumentação (12/09/2011). <http://memoria.cnpq.br/resultados/2011/017.htm> (acesso em Outubro de 2013).

CHAO, Z.; ZHAO, Y. M.; XIAOYAMM, Z.; DAN, M. Development of soybean protein-isolate edible films incorporated with beeswax. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 75, n. 6, p. C493 – C497, 2010.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicol. Lett.*, v. 176, Issue 1, p. 1 – 12, 2008.

CLEMENTE, P. R. *Avaliação sensorial no controle de qualidade de alimentos*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, UFLA / FAEPE, 81 p., 2001.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo*. 2. ed. Lavras, 785p., 2005.

COLZATO, M.; SCRAMIN, J. A.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. 1H NMR investigation of oil oxidation in macadamia nuts coated with zein based films. *Journal of Food Processing and Preservation*, Westport, 2011. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2011.00530.x. Published online: 26 Apr. 2011.

CORRÊA, P. C. Avaliação destrutiva e não destrutiva de qualidade de produtos vegetais. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola*, 27, Poços de Caldas, p. 59 – 81, 1998.

D'ALMEIDA, M. L. O.; *Celulose e papel – Tecnologia de fabricação da pasta celulósica*; v.I; 2ª edição; Escola Senai, ITP; São Paulo-SP; pp. 45-105, 169-312, 427-509, 1986.

Disponível em:< ICEPA www.icepa.com.br/observatorio/noticias0404/no2904e.htm>
Acessado em 29/07/2013.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods. In: KROTCHA, J. M.; BALDWIN, E. A.; CARRIEDO-NISPEROS, M. (Ed.). *Edible Coatings and Films to improve Food Quality*. New York: CRC Press, p. 1 – 24, 1994.

EICHHORN, S. J., DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; MARCOVICH, N. E.; CAPADONA, R.; ROWAN, S. J.; WEDER, C.; THIELEMANS, W.; ROMAN, M.; RENNECKAR, S.; RENNECKARGINDL, W.; VEIGEL, S.; KECKES, J.; YANO, H.; ABE, K.; NOGI, M.; NAKAGAITO, A. N.; MANGALAM, A.; SIMONSEN, J.; BENIGHT, A. S.; BISMARCK, A.; BERGLUND, L. A.; PEIJS, T. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites, *Journal of Materials Science*, 45, 1 - 33, 2010.

ELAZZOUI-HAFRAOUI, S.; NISHIYAMA, Y.; PUTAUX, J.; HEUX, L.; DUBREUIL, F., ROCHAS, C., *Biomacromolecules*, 9, 57 - 65, 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA); Food and Drug Administration (FDA); Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD); International Organization for Standardization (ISO); e Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

FARRÉ, M.; GAJDA-SCHRANTZ, K.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 81 – 95, 2009.

FENGEL, D.; WENEGER, G., WOOD – Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, Berlim, New York 1984.

FORATO, L.A. Estudo das Estruturas das Zeínas por RMN, FTIR e MFA. São Carlos: USP, 2000a. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos , São Carlos, 2000a.

FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A.; GARRAT, R. C.; LOPES, M. A. Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified alpha zeins by ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1543, p. 106-114, 2000b.

FORATO, L. A.; YUSHMANOV, V. E.; COLNAGO, L. A. Interaction of two prolamins with ¹³C oleic acid by ¹³C NMR. *Biochemistry*, ed. 43(22), p. 7121-7126, 2004.

FORTNER, J. D.; LYON, D. Y.; SAYES, C. M.; BOYD, A. M.; FALKNER, J. C.; HOTZE, E. M.; ALEMANY, L. B.; TAO, Y. J.; GUO, W.; AUSMAN, K. D.; COLVIN, V. L.; HUGHES, J. B. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ. Sci. Technol.*, v. 39, p. 4307 - 4316, 2005.

FRANCIS, F. V. Color quality evaluation of horticultural crops. *Hort. Science*, Alexandria, v. 15, n. 1, p. 58 – 59, 1980.

FREUDENBERG, A.; PETZKE, K. J.; KLAUS, S. Dietary L-leucine and L-alanine supplementation have similar acute effects in the prevention of high-fat diet-induced obesity. *Amino Ácidos*, vol. 44, n. 2, p. 519 – 528, 2012.

GEYS, J.; COENEGRACHTS, L.; VERCAMMEN, J.; ENGELBORGHES, Y.; NEMMAR, A.; NEMERY, B.; HOET, P. H. M. In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: A preliminary study. *Toxicol. Lett.*, v. 160, Issue 3, p. 218 – 226, 2006.

GILLGREN, T.; FAYE, M. V.; STADING, M. Mechanical and barrier properties of films from millet protein pennisetin. *Food Biophysics*, [S.1], 2011. DOI: 10.1007/s11483-011-9228-x. online first.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 52, p. 725 - 749, June 2001.

GRIERSON, D. Senescence in fruits. *Hort. Science*, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 859 - 862, May, 1987.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press, USA, 2003.

HALLET, P.; TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, J.; OFFER, F.G.; MILLES, M. J. Improvements in atomic force microscopy protocols for imaging fibrous proteins. *J. Vac. Technol. B.*, v. 14, n. 2, p. 1444 – 1448, 1996.

HERMMANN, P.S.P. Estudo de filmes finos automontados de proteínas por U.V. e microscopia de força atômica. São Carlos: USP. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, 1999.

HERRMANN, P. S. P.; COLNAGO, L. A.; MATTOSO, L. H. C.; CRUVINEL, P. E.; FRAMMER, J. E. Analysis of spatial variability of lysozyme thin film by AFM. In: Meeting of the Brazilian Society for Electron Microscopy, Caxambú, MG. *Acta Microscopica*, v.6, suppl A, p.290 – 291, 1997.

HOAREAU, W.; TRINDADE, W. G.; SIEGMUND, B.; CASTELLANA, A.; FROLLINIB, E., Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability, *Polymer Degradation and Stability*, 86, 567 - 576, 2004.

HUGGE, M. A., ROJAS, O. J., LUCIA, L. A., SAIN, M. Cellulosic Nanocomposites: A review, *Bioresource*, 3, 928 - 980, 2008.

HUND-RINKE, K.; SIMON, M. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids (8 pp). *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 13, p. 225 – 232, 2006.

ISO 1444. Meat and meat products -Determination of free fat content. International Organization for Standardization, Genova, Switzerland, 1996.

IWATA, T.; OMATO, I.; OGATA, K. Relationship between the ripening of harvested fruits and the respiratory pattern. III. Changes of ethylene concentration in fruits and responses to applied ethylene with relation to the respiratory pattern. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Tokyo, v. 38, p. 64 – 72, Jan. 1969.

JERONIMO, E. M.; BRUNINI, M. A.; ARRUDA, M. C. de.; CRUZ, J. C. S.; FISCHER, I. H.; GAVA, G. J. de C. Qualidade de mangas 'Tommy Atkins' armazenadas sob atmosfera modificada. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, vol. 31, n. 4, p. 122 - 130, 2007.

JIN, Y.; KANNAN, S.; WU, M.; ZHAO, J. X. Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 20, p.1126 - 1133 , 2007.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites, *Carbohydrate Polymers*, 71, 343 – 364, 2008.

KAYS, S.J.; PAULL, R.E. *Postharvest biology*. Athens: EP press, 568 p., 2004.

KIATKITTIPONG, W.; WONGSUCHOTO, P.; PAVASANT, P., Life cycle assessment of bagasse waste management options, *Waste Management*, *Waste Management*, 29, 1628 – 1633, 2009.

KLEM, D., PHILIPP, B., HEINZE, T., HEINZE, U., WAGENKNECHT, W., *Comprehensive Cellulose Chemistry*, Volume 1, Fundamentals and Analytical Methods, WILEY, Weinheim, 1998.

KROCTHA, J. M.; MILLER, K.S. Oxygen and aroma barriers of edible films: A review. Trends in Food Science and Technology, Cambridge, v. 8, p. 228 – 237, 1997.

KUORWEL, K. K; CRAN, M. J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S. Antimicrobial Activity of biodegradable polysaccharide and protein-base films containing active agents. Journal of Food Science, Chicago, v. 76, n. 3, p. R90 – R102, 2011.

LARSSON, P.; WICKHOLM, K.; IVERSEN, T.; A CP/MAS ¹³C NMR investigation of molecular ordering in cellulose, Carbohydrate Research, 302, 19 - 25, 1997.

LAWTON, J.W. Zein: A history of processing and use, Cereal Chemistry, v. 79, p. 1-18, 2002.

LEE, J.-W.; SON, S.-M. & HONG, S.-I. - J. Food Eng., 86, p.484, 2008. Disponível em : <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.025>> Acessado em 06 de Agosto de 2013.

LEI, R., WU, C., YANG, B., MA, H., SHI, C., WANG, Q., YUAN, Y., LIAO, M. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol, v. 232, n. 2, p. 292-301, Oct 15 2008.

LELIÈVRE J.M.; LATCHÉ, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M. PECH J.C. Ethylene and fruit ripening. Physiology Plantarum, Copenhagen, v. 101, p. 727 - 739, July 1997.

LI, R., FEI, J., CAI, Y., LI, Y., FENG, J., YAO, J., Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production, Carbohydrate Polymers, 76, 94 – 99, 2009.

LIMA, M. S., BORSALI, R., Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, and Applications, Macromolecules, 25, 771 – 787, 2004.

LIMA, D. U., OLIVEIRA, R. C., BUCKERIDGE, M. S., Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking, Carbohydrate polymers, 52, 367 - 373, 2003.

LONG, T. C.; SALEH, N.; TILTON, R. D.; LOWRY, G. V.; VERONESI, B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ. Sci. Technol.*, v. 40, p. 4346 - 4352, 2006.

LOVERN, S. B.; STRICKLER, J. R.; KLAPER, R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ. Sci. Technol.*, v. 41, p. 4465 – 4470, 2007.

LURIE, S.; KLEIN, J.D. Cyanide metabolism in relation to ethylene production and cyanide insensitive respiration in climacteric and non-climacteric fruits. *Journal of Plant Physiology*, Leipzig, v. 135, n. 5, p. 518 – 521, Apr., 1990.

LYON, D. Y.; ADAMS, L. K.; FALKNER, J. C.; ALVAREZ, P. J. J. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effect of Preparation Method and Particle Size. *Environ. Sci. Technol.*, v.40, p. 4360 – 4366, 2006.

MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. *Ciência e Cultura*, vol. 65, n. 3, p. 32 – 36, ISSN 0009-6725, 2013.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R. M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola: revisão. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiana*, v. 9, n. 1, p. 20-32, 2002.

MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; NOBILE, M. A. Combined effect of active coating and MAP to prolong the shelf life of minimally processed kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward). *Food Research International*, Barking, v. 44, p. 1224 – 1230, 2011.

MANUAL MERCK. Distúrbio da nutrição e metabolismo: distúrbio do colesterol e de outras gorduras, seção 12, capítulo 139. <http://www.msdonline.com.br>. (Acessado em 31 de Outubro de 2013).

McGLASSON, W.B. Ethylene and fruit ripening. Hort. Science, Alexandria, v. 20, n. 1, p. 51 - 54, Jan. 1985.

MEZA, J. C.; SIGOILLOT, J.; LOMASCOLO, A., NAVARRO, D.; AURIA, R., New Process for Fungal Delignification of Sugar-Cane Bagasse and Simultaneous Production of Laccase in a Vapor Phase Bioreactor, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 3852 - 3858, 2006.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 02 de agosto de 2013.

MOREIRA, F. K. V. Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos biodegradáveis a partir de pectina, amido e nanofibras de celulose. São Carlos: UFSCar, 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, 181 p., São Carlos, 2010.

MUTHUSELVI, L.; DHATHATREYAN, A. Contact angle hysteresis of liquid drops as means to measure adhesive energy of zein on solid substrates. Journal of Physics, vol. 66, n. 3, p. 563 – 574, 2006.

NEMMAR, A.; INUWA, I. M. Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. Toxicol. Lett., v. 176, p. 20 - 30, 2008.

NETO, L. G.; CRISTO, A. S.; CHOUDHURY, M. M. Conservação pós-colheita de frutos de goiabeira, variedade Paluma. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 34, n. 1, p. 1 – 6, Jan. 1999.

N-S HON, D. e SHIRAISHI, N., Wood and cellulosic chemistry, 2ª edição, ed. Marcel Dekker, New York, 2000.

OBERDÖRSTER, E.; ZHU, S.; BLICKLEY, T. M.; MCCLELLAN-GREEN, P.; HAASCH, M. L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. Carbon, v. 44, p. 1112 – 1120, 2006.

OETIKER, J.H.; YANG, S. F. The role of ethylene in fruit ripening. Acta Horticultural, The

Hague, v. 398, p. 167 - 178, Mar. 1995.

OH, J-H.; WANG, B.; FIELD, P.D.; AGLAN, H.A. Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v. 39, p. 287-294, 2004.

OKSMAN, K. (ED); SAIN, M. (ed), *Cellulose Nanocomposites, Processing, Characterization and Properties*, ACS symposium series, 938, 2005.

OSÉS, J.; FERNÁNDEZ-PAN, I.; ZIANI, K.; MATE, J. I. Use of edible films based on whey protein isolate to protect foods rich in polyunsaturated fatty acids. *European Food Research and Technology*, Berlin, v. 227, p. 623 – 628, 2008.

PÄÄKÖ, M., ANKERFORS, M., KOSONEN, H., NYKANEN, A., AHOLA, S., OSTERBERG, M., RUOKOLAINEN, J., LAINE, J., LARSSON, P. T., IKKALA, O., LINDSTROM, T. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels, *Biomacromolecules*, 8, 1934 - 1941, 2007.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. S.; SHEWFELT, R. Edible corn-zein film coating to extend storage life of tomatoes. *Journal of Food Processing and Preservation*, Westport, v. 18, p. 317 – 331, 1994.

PARK, H.J. Development of advanced edible coating for fruits. *Trends in food Sci. Technol.*, v. 10, p. 254-260, 1999

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S.; JARDIM, W.F. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Quimica Nova*, v. 33, p. 421 – 430, 2010.

PEDROSA, R. G.; DONATO JUNIOR, J.; TIRAPEGUI, J. Dieta rica em proteína na redução do peso corporal. *Revista de Nutrição*, vol. 22, n. 1, p. 105 – 111, 2009.

PÉERIN, C.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M.; HAGEN, L.; DOGIMONT, C.; PECH, J. C.; LATCHÉ, E.

A.; PITRAT, M.; LELIÈVRE, J. M.. Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiology*, Rockville, v. 129, p. 300 – 309, Apr. 2002.

PETERSSON, L., KVIEN, I., OKSMAN, K., Structure and thermal properties of poly(lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials, *Composites Science and Technology* 67, 2535 – 2544, 2007.

POL, H., DAWSON, P., ACTON, J., OGALE, A. Soy Protein Isolate/Corn-Zein Laminated Films: Transport and Mechanical Properties. *J. Food Sci.*, v. 67, p. 212-217, 2002.

PURVIS, A.C. The role of adaptive enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plant tissues. *Hortscience*, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 195 - 168, Dec. 1997.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o Meio Ambiente: perspectivas e riscos. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p.1028 - 1029, 2004.

RHODES, M.J.C. The maturation and ripening of fruits. In: THIMANN, K.V.; ADELMAN, R. C.; ROTH, G.S. *Senescence in plants*. Florida: CRC Press, cap. 8 p.157 - 205, 1980.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials: A Review. *Polymer International*, London, v. 57, p. 397 – 430, 2008.

ROJAS-GRAU, M. A.; OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 44, p. 875 – 889, 2009.

ROMAN, M., WINTER, W. T., Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose, *Biomacromolecules*, 5, 1671 - 1677, 2004.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; DI VINERE, D.; SALERMO, M. Effects of pré

and post harvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1862 – 1867, 2002.

ROTHFUS, J. A. Potential β -sheet surfaces of corn and wheat proteins. *J. Agr. Food Chem.*, v. 44, p. 3143-3152, 1996.

RYALL, A.L; LIPTON, W.J. Vegetables as living products respiration and heat production. *Handling, transportation and storage of fruits and vegetables*. Westport, Avi, v. 1, p. 1 – 34, 1979.

SALUNKHE, D.K.; DESAI, B.B. *Postharvest biotechnology of fruits*. Boca Raton, v .1, 168 p., 1984.

SAYES, C. M.; REED, K. L.; WARHEIT, D. B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.*, v. 97, p. 163 – 180, 2007.

SCRAMIN, J. A.; ASSIS, O. B. G.; COLNAGO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; FORATO, L. A. The use of zein based films to improve pears shelf life. In: *International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies – Nanoagri*, 2010, São Pedro, SP [Anais] São Pedro: Aptom Software, 2010, p. 134.

SEATON, A.; DONALDSON, K. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *The Lancet*, v. 18, p. 923 – 924, 2005.

SERVICE, R. F. Nanotechnology Grows Up. *Science*, v. 304, n. 5678, p.1732 – 1734, 2004.

SILVA, R., HARAGUSHI, S. K., MUNIZ, E. C., RUBIRA, A. F., Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos, *Química Nova*, 32, N°3, 661 - 671, 2009b.

SIQUEIRA, G., BRAS, J., DUFRESNE, A., Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence

of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites, *Biomacromolecules*, 10, 425 – 432, 2009.

SONG, W.; LI, G.; GRASSIAN, V. H.; LARSEN, S. C. Development of improved materials for environmental applications: nanocrystalline NaY zeolites. *Environ. Sci. Technol.*, v. 39, p. 1214 – 1220, 2005.

SPOTO, M. H. F. Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP. 2009. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/FrutasHortalicas.pdf>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2013.

STABLE MICRO SYSTEM. Disponível em: www.stablemicrosystems.com. Acessado em 11/11/2013.

SUN, J.X.; SUN, X. F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q.; Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses, *Carbohydrate Polymers*, 56, 195 – 204, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.

TAKENAKA, S.; KARG, E.; ROTH, C.; SCHULZ, H.; ZIESENIS, A.; HEINZMANN, U.; SCHRAMEL, P.; HEYDER, J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ. Health Perspect.*, v. 4, p. 547 – 551, 2001.

TONG, Z.; BISCHOFF, M.; NIES, L.; APPELEGATE, B.; TURCO, R. F. Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environ. Sci. Technol.*, v. 41, p. 2985 – 2991, 2007.

TORRES, G. A. M.; SIMIONI, A.; GAMBIM, E.; TOMAZIN, T. Proteínas de reserva do trigo: gluteínas. Documentos online Embrapa Trigo, n. 117, 2009.

TSUNECHIRO, A.; UENO, L. H.; PONTARELLI, C. T. G. Avaliação econômica das perdas de

hortaliças e frutas no mercado varejista da cidade de São Paulo, 1991/92. *Agricultura em São Paulo*, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 1-15, 1994.

VENDRELL, M.; PALOMER, X. Hormonal control of fruit ripening in climateric fruits. *Acta Horticulturae*, Leuven, v. 463, p. 325 - 334, Sept. 1997.

VENSON, I. Estudos em deslignificação de Polpas Kraft de Pinus spp. Com oxigênio e peróxido, Tese de Doutorado, UFPR, 2008.

VIEIRA, M. G. A.; SILVA, M. A.; SANTOS, L. O.; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A Review. *European Polymer Journal*, New York, v. 47, p. 254 – 263, 2011.

VILELA, N.J.; LANA, M.M.; NASCIMENTO, E.F.; MAKISHIMA, N. O peso da perda de alimentos para a sociedade: o caso das hortaliças. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 2, p. 141-143, abril/junho 2003.

VILENO, B.; LEKKA, M.; SIENKIEWICZ, A.; JENEY, S.; STOESSEL, G.; LEKKI, J.; FORRÓ, L.; STACHURA, Z. Stiffness alterations of single cells induced by UV in the presence of nanoTiO₂. *Environ. Sci. Technol.*, v. 41, p. 5149 - 5153, 2007.

WILLS, R.H.H.; LEE, T.H.; GRAHAM, W.B.; HALL, E.G. *Postharvest an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables*. Kensington: New South Wales University Press, 161 p., 1981.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. *Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales*. Trad. de J.B. Gonzáles. 2nd .ed. Zaragoza: Acribia, 240 p., 1998.

WORRELL, D. B.; CARRINGTON, C. M. S.; HUBER, D. J. The use of low temperature and

coating to maintain storage quality of breadfruit, *Artocarpus altilis* (Parks) Fosb. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 25, p. 33 – 40, 2002.

WU, Q., YOSHINO, T., SAKABE, H., ZHANG, H., ISOBE, S. Chemical modification of zein by bifunctional polycaprolactone (PCL). *Polymer*, v. 44, p. 3909-3919, 2003. Disponível em <<http://www2.ital.sp.gov.br/fruthotec/boletim10>> Acessado em 29/07/2013.

YANG, S.F. Biosynthesis and action of ethylene. *Hort. Science*, Alexandria, v. 20, n. 1, p.41 - 45, Feb, 1985.

YEHIA, H. N.; DRAPER, R. K.; MIKORYAK, C.; WALKER, E. K.; BAJA, P.; MUSSELMAN, I. H.; DAIGREPONT, M. C.; DIECKMANN, G. R.; PANTANO, P. Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J. Nanobiotechnol.*, v. 5, p. 8, 2007.

ZANELLA, Julio. Alimentos Contaminados rondam a mesa. *Jornal da Unesp*, 2007.

ZHANG, Z.; YUAN, Y.; SHI, G.; FANG, Y.; LIANG, L.; DING, H.; JIN, L. Photoelectrocatalytic activity of highly ordered TiO₂ nanotube arrays electrode for azo dye degradation. *Environ. Sci. Technol.*, v. 41, p. 6259 - 6263, 2007.

ZHANG, H.; MITTAL, G. Biodegradable protein-based films from plant resources. A Review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, [S.1], v. 29, n. 2, p. 203 – 220, 2010.

ZULLUAGA, R., PUTAUX, J., RESTREPO, A., MONDRAGON, I., GAÑÁN, P., Cellulose microfibrils from banana farming residues: isolation and characterization, *Cellulose*, 14, 585 – 592, 2007.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

nº 079/2012

Protocolo nº. 075/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Desenvolvimento e avaliação toxicológica de filmes protéicos com adição de nanofibras para recobrimento de frutos e hortigranjeiros*", submetido pela pesquisadora *Tassiane Regina Alves Correa*.

São Carlos, 23 de novembro de 2012.

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B

Tabela : Médias da massa corporal dos ratos determinados em pesagens semanais durante as 8 semanas do experimento.

Semanas	1	2	3	4	5	6	7	8
Experimentais	338,22	334,89	350,89	363,78	369,33	381,56	377,78	374,00
Desv. Padrão	19,30	16,07	26,80	29,59	30,41	31,40	20,01	22,67
Controle	348,5	328,25	353,25	370,25	374	378,25	380,75	383,25
Desv. Padrão	18,38	23,06	9,32	11,08	11,51	8,58	10,29	14,38

Tabela : Médias do consumo hídrico dos ratos determinados durante as 8 semanas do experimento.

Semana	1	2	3	4	5	6	7
Experimental	199,22	195,22	218,00	213,56	222,00	204,67	235,56
Desv. Padrão	12,99	14,12	14,35	18,38	24,60	15,72	16,24
Controle	165,13	180,50	184,50	182,00	203,50	180,00	208,75
Desv. Padrão	16,47	14,22	12,77	20,06	15,11	16,87	25,57

Tabela : Médias do consumo de ração dos ratos determinados durante as 8 semanas do experimento.

	1	2	3	4	5	6	7
Experimental	149,7	153,7	135,3	148,7	147,6	132,6	158,5
Desv. Padrão	13,8	17,0	13,2	14,7	18,6	20,2	17,7
Controle	106,6	143,0	139,8	123,5	132,0	130,9	149,9
Desv. Padrão	29,0	13,3	12,4	7,3	8,6	8,9	13,1

Tabela : Médias da eliminação de urina dos ratos determinados durante as 8 semanas do experimento.

	1	2	3	4	5	6	7
Experimental	35,4	32,6	35,3	48,8	38,3	38,9	42,4
Desv. Padrão	4,3	6,1	6,4	8,4	6,0	6,3	8,1
Controle	29,7	30,6	34,0	46,3	33,6	38,1	40,6
Desv. Padrão	8,1	4,9	7,0	7,0	5,0	1,6	3,4

Tabela : Médias da excreção de fezes dos ratos determinados durante as 8 semanas do experimento.

	1	2	3	4	5	6	7
Experimental	38,2	40,7	43,2	55,3	48,7	48,4	54,6
Desv. Padrão	3,8	5,1	4,6	6,3	7,4	6,9	3,2
Controle	32,8	39,8	40,2	48,8	44,9	46,3	51,1
Desv. Padrão	8,4	5,0	5,8	7,6	6,3	3,7	8,1