

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Tese de Doutorado

**Desenvolvimento e avaliação toxicológica de filmes comestíveis hidrofóbicos com
incorporação de nanopartículas de quitosana.**

Juliana Aparecida Scramin

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Dra: Lucimara Aparecida Forato

Dr: Rubens Bernardes Filho

São Carlos
2013

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

S433da Scramin, Juliana Aparecida.
Desenvolvimento e avaliação toxicológica de filmes
comestíveis hidrofóbicos com incorporação de
nanopartículas de quitosana / Juliana Aparecida Scramin. --
São Carlos : UFSCar, 2014.
121 f.

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

1. Biotecnologia. 2. Kafirinas. 3. Filmes comestíveis. 4.
Nanopartículas poliméricas. 5. Toxicidade. I. Título.

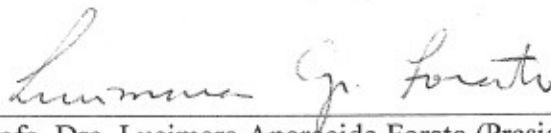
CDD: 660.6 (20^a)

Juliana Aparecida Scramin

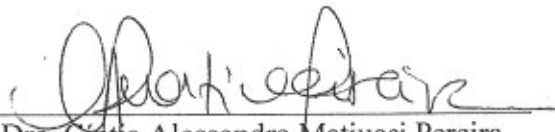
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 20/12/2013

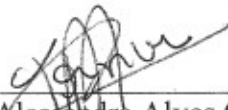
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Lucimara Aparecida Forato (Presidente)
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/Instrumentação)



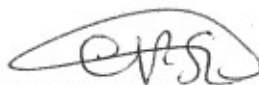
Profa. Dra. Cintia Alessandra Matiucci Pereira
(Centro Universitário Central Paulista – UNICEP)



Dra. Alessandra Alves Correa Forner
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/Instrumentação)



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



Profa. Dra. Cristina Paiva de Souza
(Universidade Federal de São Carlos)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King).

*“Dedico esta tese a minha mãe **Leonice** pelo apoio, pelos ensinamentos, pelo exemplo de vida e principalmente pelo indescritível amor de Mãe; ao meu irmão **Marcio** pelo companheirismo, cuidado, pela convivência, por me fazer rir quando estou triste e pela inestimável ajuda, e ao meu amado **Pai** (in memórian) que mesmo não estando fisicamente presente, está vivo em meu coração”.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ Primeiramente a Deus, pelas oportunidades que colocastes em minha vida, pelo Seu amor que me fortalece e por todos os momentos já vividos.
- ❖ À Dra: Lucimara Aparecida Forato pela orientação, dedicação, convivência, paciência e principalmente pela amizade de todos esses anos. Não existem palavras para demonstrar a minha gratidão pelas oportunidades e por toda confiança depositada em mim. Um grande exemplo de pessoa e profissional. Meus sinceros agradecimentos.
- ❖ Ao Dr: Rubens Bernardes Filho pela orientação, amizade e agradável convivência, os quais foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese.
- ❖ Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) pelo apoio institucional. Em especial a secretária do programa, Claudia Pastega pela ajuda prestada no atendimento.
- ❖ À CAPES pelo suporte financeiro.
- ❖ À Embrapa Instrumentação pela infraestrutura e aos seus funcionários, em especial ao Renê, Silvine, Joana, Adriana, Alice, Viviane e Marcelo pela ajuda na realização dos experimentos. Ao Ednaldo pela indispensável ajuda nas análises estatísticas, ao Paulo Lasso que realizou as medidas de μCT e a todos os colegas e outros funcionários que colaboraram com a elaboração deste trabalho.
- ❖ À Professora Dra: Keico Okino Nokata do laboratório de neuroendocrinologia da UFSCar pela indispensável ajuda na realização dos experimentos toxicológicos e discussões dos resultados. Ao Sr. Sergio Dias, técnico deste laboratório pelas inúmeras ajudas durante a minha estadia no laboratório e a todos os alunos que fazem parte deste grupo de pesquisa, em especial ao Charles, Karina, Bruna, Leo e Vitor.
- ❖ Ao Dr. Jose Avelino Santos Rodrigues, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas pela colaboração e disponibilidade em fornecer os grãos de sorgo utilizados neste trabalho. Muito obrigada.

- ❖ Aos meus queridos amigos da Embrapa: Paulo Cobra, Gabriela Carosio, Douglas de Britto, Carolina Galharte, Cristiane, Fabiana Diuk, Alexandra Manzoli, Rafaela Takerrara, Rejane Goy e Lilian Marteli por todos esses anos de muitas risadas, convivência e amizade.

- ❖ À Tassiane Regina Alves Corrêa por todos esses anos de muito trabalho, companheirismo e amizade. Obrigada pelas “discussões”, conselhos e por todos os momentos que certamente jamais serão esquecidos.

- ❖ À orientada Tais Téo pela colaboração e apoio na realização dos experimentos.

- ❖ Ao meu amor Patrick Cristiano Mendes, pelo carinho, companheirismo e incentivo. Por estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos e por ser esta pessoa tão especial e essencial em minha vida.

- ❖ À minha família que sem dúvida é meu alicerce, meu refugio e minha calma. É no aconchego do meu lar que eu encontro a paz nos momentos difíceis e o amor que eu preciso para continuar a caminhada. Mãe e Marcio, meu irmão...amo vocês!

- ❖ Enfim a todos que foram e são importantes na minha vida pessoal e profissional. Minha eterna gratidão.

RESUMO

O sorgo sacarino está sendo avaliado como uma alternativa para produção de etanol durante a safra da cana de açúcar e parte do resíduo desta produção é constituída de grãos, ricos em proteínas de reserva, conhecidas como kafirinas. Neste trabalho foram extraídas e caracterizadas as kafirinas do sorgo sacarino, cultivar BR 501 (branco) livre de taninos, com e sem agente redutor, e as mesmas foram caracterizadas por eletroforese em gel contendo deodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE). As estruturas secundárias das kafirinas foram estudadas por técnicas espectroscópicas como infravermelho com transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear ^{13}C em estado sólido. Pela técnica de infravermelho observou-se que as kafirinas têm estrutura predominante do tipo α hélice e que na presença do agente redutor houve um aumento nas estruturas do tipo folhas β . Este resultado foi confirmado pelas análises de ressonância magnética nuclear que revelaram proporções similares entre essas estruturas. Após a extração e caracterização dessas proteínas, foram desenvolvidos revestimentos comestíveis contendo 2% de kafirinas variando-se a concentração de plastificante, o óleo de canola, em 0,10; 0,25; e 0,50% com e sem a adição de nanopartículas de quitosana, no qual a concentração utilizada foi de 0,1%. Os revestimentos foram aplicados na superfície de maçãs e peras e caracterizados pelas técnicas de microscopia de força atômica, ângulo de contato, colorimetria, perda de massa bem como análise da textura dos frutos com e sem revestimentos. Através dos resultados obtidos, os revestimentos contendo 0,25% e 0,50% de óleo de canola com e sem nanopartículas prolongaram o tempo de prateleira das frutas, sendo que as maçãs duraram aproximadamente 25 dias, 10 dias a mais que a fruta controle (sem revestimento) e as peras 17 dias, 7 dias a mais que o controle. A partir destes resultados, foram realizados testes toxicológicos em ratos da linhagem Wistar machos. Os animais foram alimentados durante 30 dias com ração revestida contendo 2% de kafirinas com 0,25% de óleo de canola e 0,1% de nanopartículas de quitosana (grupo experimental) e comparados com um grupo controle, alimentos com ração sem revestimento. Foram realizados os seguintes parâmetros: ingestão hídrica e consumo de ração, excreção de fezes e urina, massa corporal e massa dos órgãos parâmetros bioquímicos realizados através do soro sanguíneo e parâmetros biofísicos e biomecânicos realizados nos ossos coletados após a eutanásia. Não foi possível identificar efeito nocivo ao ingerir o revestimento, pois os resultados obtidos para o grupo experimental foram semelhantes aos adquiridos para o grupo controle.

ABSTRACT

The sweet sorghum is being evaluated as an alternative for the production ethanol during between harvest the sugar cane crop residue and part of this production consists of grains, rich in storage proteins, known as kafirins. In this work were extracted and characterized the kafirins of sweet sorghum cultivar BR 501 (white) free of tannins, with and without reducing agent, and the same were characterized by gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS/PAGE). The secondary structures of kafirins were studied by spectroscopic techniques such as Fourier transform infrared and solid state ^{13}C nuclear magnetic resonance. For the infrared technique it was observed that the predominant kafirins have α propeller-type structure and reducing agent in the presence of an increase in β sheet-like structures. This result was confirmed by nuclear magnetic resonance analysis revealed that similar proportions of these structures. After extraction and characterization of these proteins, edible coatings have been developed containing 2% kafirins varying the concentration of plasticizer, canola oil, 0,10, 0,25, and 0,50% with and without the addition of chitosan nanoparticles, wherein the concentration used was 0,1%. The coatings were applied on the surface of apples and pears and characterized by the techniques of atomic force microscopy, contact angle, colorimetry, mass loss and texture analysis of fruits with and without coatings. From the results obtained, the coatings containing 0,25% and 0,50% canola oil with and without NP extended the shelf life of fruit, and apples lasted approximately 25 days, 10 days longer than the control fruit (uncoated) and pears 17 days, 7 days longer than the control. From these results, toxicological tests were performed on male Wistar rats where these animals were fed for 30 days coated with a diet containing 2% kafirins with 0,25% canola oil and 0,1% chitosan nanoparticles (group experimental) and compared with a control group, with food rations without coating. Water intake and feed intake, excretion of feces and urine, body weight and organ weights biochemical parameters carried through the blood serum and performed biophysical and biomechanical parameters in the bones collected after euthanasia: The following parameters were performed. From the results obtained, it was not possible to identify any harmful effects to ingesting the coating, because the results obtained for the experimental group were similar to those obtained for the control group.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ILUSTRAÇÃO DA AÇÃO PROTETORA DE UM REVESTIMENTO COMESTÍVEL COM E SEM NANOPARTÍCULAS.	22
FIGURA 2: CALENDÁRIO ENERGÉTICO REPRESENTANDO O PLANTIO DO SORGO SACARINO, NA ENTRESSAFRA DA CANA NOS MESES DE NOVEMBRO A ABRIL..	22
FIGURA 3: ESQUEMA DO GRÃO DE SORGO.	26
FIGURA 4: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS α KAFIRINAS E α ZEÍNAS. OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS CONSERVADOS PARA AMBAS AS PROTEÍNAS ESTÃO REALÇADOS. (FONTE: BELTON ET AL., 2006)	29
FIGURA 5: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE DUAS VARIEDADES DE KAFIRINA γ COMPARADAS COM A SEQUÊNCIA DA ZEINA γ . OS CÍRCULOS APRESENTADOS NA FIGURA EM AZUL E ROSA INDICAM A REGIÃO DA SEQUÊNCIA DE PEPTÍDEOS REPETIDOS (SEQUÊNCIA REPETIDA PPPVHL). (FONTE: BELTON ET AL., 2006).....	30
FIGURA 6: ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DA KAFIRINA β E DA ZEINA β . (FONTE: BELTON ET AL., 2006).	30
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICA DA CELULOSE E DA QUITINA.	32
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA.	33
FIGURA 9: INTERAÇÃO DA QUITOSANA COM O TPP.	35
FIGURA 10: ESPECTROS DE RMN NO ESTADO SÓLIDO OBTIDOS COM A TÉCNICA DE CPMAS. O ESPECTRO A É DA HEMOGLOBINA E B: CONCAVALINA A.	40
FIGURA 11: ESQUEMA DOS MODOS DE OPERAÇÃO DO MFA. A) MODO CONTATO (REPULSÃO) E B) MODO NÃO CONTATO (ATRAÇÃO).	41
FIGURA 12: ÂNGULO DE CONTATO θ E MOLHABILIDADE.	42
FIGURA 13: PARÂMETROS DO SISTEMA DE CORES DA CIELAB.....	45
FIGURA 14: COMPONENTES BÁSICOS DO μ CT MOSTRANDO O TUBO DE RAIOS X, POSICIONAMENTO DA AMOSTRA EM UM SISTEMA DE ROTAÇÃO POSICIONADA DENTRO DA CÂMARA DE IRRADIAÇÃO, INTENSIFICADOR DE IMAGEM E CÂMERA UTILIZADA PARA COLETAR A PROJEÇÃO DA IMAGEM (ADAPTADO DE BELINI ET AL., 2011).	46
FIGURA 15: PRIMEIRO MÉTODO PROPOSTO DE EXTRAÇÃO DAS KAFIRINAS A PARTIR DO SORGO SACARINO BR 501 (BRANCO).	50
FIGURA 16: MÉTODO DE EXTRAÇÃO DAS KAFIRINAS MODIFICADO. PROCEDIMENTO REALIZADO COM AGENTE REDUTOR, BISSULFITO DE SÓDIO.	51

FIGURA 17: PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% DAS KAFIRINAS EXTRAÍDAS DO CULTIVAR BR 501 (BRANCO) SEM TANINOS. O POÇO 1 CONTÊM AS KAFIRINAS EXTRAÍDAS SEM AGENTE REDUTOR E NO POÇO 2 CONTÊM AS KAFIRINAS EXTRAÍDAS COM AGENTE REDUTOR.	60
FIGURA 18: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE KAFIRINAS ADQUIRIDAS PELO PRIMEIRO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PROPOSTO (SEM USO DE AGENTE REDUTOR).....	61
FIGURA 19: PROVÁVEIS SÍTIOS DE INTERAÇÃO DAS ZEÍNAS α COM ÁCIDOS GRAXOS. NA PARTE SUPERIOR, RESÍDUOS DE ARGININA CARREGADOS INTERAGINDO COM ÁCIDO GRAXO IONIZADO. NA PARTE INFERIOR, EXCESSO DE ÁCIDOS GRAXOS INTERAGINDO HIDROFOBICAMENTE COM AS CADEIAS LATERAIS APOLARES DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA. ADAPTADO DE FORATO, 2000.....	62
FIGURA 20: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE KAFIRINAS EXTRAÍDAS DO CULTIVAR BR501 COM AGENTE REDUTOR.	63
FIGURA 21: EXPANSÃO DOS ESPECTROS NO IV NA REGIÃO DA AMIDA I (1800 A 1600 cm^{-1}) DAS KAFIRINAS EXTRAÍDAS COM ETANOL 70% E SUA SEGUNDA DERIVADA (PARTE SUPERIOR). A) ESPECTRO SEM AGENTE REDUTOR E B) ESPECTRO COM AGENTE REDUTOR.	64
FIGURA 22: ESPECTROS EM ALTA RESOLUÇÃO POR RMN DE ^{13}C NO ESTADO SÓLIDO COM A TÉCNICA CPMAS DAS KAFIRINAS. A) KAFIRINAS EXTRAÍDAS SEM AGENTE REDUTOR E B) KAFIRINAS EXTRAÍDAS COM AGENTE REDUTOR.....	66
FIGURA 23: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C OBTIDO COM A TÉCNICA DE UM PULSO PARA AS KAFIRINAS SEM USO DE AGENTE REDUTOR, O MESMO RESULTADO FOI OBTIDO COM AGENTE REDUTOR.	68
FIGURA 24: EXPANSÃO DOS ESPECTROS DA FIGURA 5 NA REGIÃO DA CARBONILA (LINHA EM PRETO), O AJUSTE DO SINAL (LINHA PONTILHADA), AS ÁREAS INDIVIDUAIS DOS PICOS CALCULADAS (AZUL) E A SEGUNDA DERIVADA (ACIMA DO ESPECTRO EM VERMELHO). A) ESPECTRO DAS KAFIRINAS SEM AGENTE REDUTOR E B) ESPECTROS DAS KAFIRINAS OBTIDAS COM AGENTE REDUTOR.	69
FIGURA 25: GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DE PARTÍCULAS OBTIDAS DE QS COM TPP.	71
FIGURA 26: IMAGEM DE MFA DA TOPOGRAFIA DAS NPs DE QS-TPP. A) IMAGEM 3D E B) IMAGEM 2D.	72
FIGURA 27: GRÁFICO REPRESENTADO A ALTURA E DIÂMETRO DAS NPs DE QS ATRAVÉS DA IMAGEM TOPOGRÁFICA OBTIDA POR MFA.....	73
FIGURA 28: GRÁFICO DE PERDA DE MASSA PARA MAÇÃS COM E SEM REVESTIMENTO. A) SEM NPs DE QS E B) COM NPs DE QS.	74
FIGURA 29: GRÁFICO DE PERDA DE MASSA PARA AS PERAS COM E SEM REVESTIMENTO. A) SEM NPs DE QS E B) COM NPs DE QS.	75
FIGURA 30: FOTOS DAS MAÇÃS APÓS 14 DIAS DE EXPERIMENTO. A) MAÇÃS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA SEM NPs DE QS E B) MAÇÃS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO	

FILMOGÊNICA CONTENDO 0,1% DE NPs DE QS. A SEQUÊNCIA DAS FOTOS REPRESENTA: 1) CONTROLE (SEM REVESTIMENTO), 2) MAÇÃS REVESTIDAS COM 0,10% OC, 3) MAÇÃS REVESTIDAS COM 0,25% OC E 4) MAÇÃS REVESTIDAS COM 0,50% OC..... 77

FIGURA 31: FOTOS DAS PERAS APÓS 10 DIAS DE EXPERIMENTO. **A)** PERAS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA SEM NPs DE QS E **B)** PERAS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA CONTENDO 0,1% DE NPs DE QS. A SEQUÊNCIA DAS FOTOS REPRESENTA: 1) CONTROLE (SEM REVESTIMENTO), 2) PERAS REVESTIDAS COM 0,10% OC, 3) PERAS REVESTIDAS COM 0,25% OC E 4) PERAS REVESTIDAS COM 0,50% OC. 77

FIGURA 32: FOTOS DOS HALOS FORMADOS EM VOLTA DOS POÇOS APÓS 8 HORAS DE INCUBAÇÃO DOS MICRORGANISMOS. **A)** 0,1% DE NPs DE QS, **B)** SOLUÇÃO FILMOGÊNICA COM 2% DE KAFIRINAS CONTENDO 0,10% DE OC E 0,1% DE NPs DE QS, **C)** SOLUÇÃO FILMOGÊNICA COM 2% DE KAFIRINAS CONTENDO 0,25% DE OC E 0,1% DE NPs DE QS E **D)** **B)** SOLUÇÃO FILMOGÊNICA COM 2% DE KAFIRINAS CONTENDO 0, 50% DE OC E 0,1% DE NPs DE QS... 78

FIGURA 33: GRADIENTE DO ÂNGULO HUE PARA MAÇÃS. **A)** MAÇÃS REVESTIDAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS SEM NPs, **B)** MAÇÃS REVESTIDAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS CONTENDO 0,1% DE NPs DE QS. O ÂNGULO HUE PODE SER EXPRESSO POR UMA ESFERA CUJOS ÂNGULOS 0°, 90°, 180° E 270° REPRESENTAM RESPECTIVAMENTE AS CORES VERMELHO, AMARELO, VERDE E AZUL.. 79

FIGURA 34: GRADIENTE DO ÂNGULO HUE PARA PERAS. **A)** PERAS REVESTIDAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS SEM NPs, **B)** PERAS REVESTIDAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS CONTENDO 0,1% DE NPs DE QS. O ÂNGULO HUE PODE SER EXPRESSO POR UMA ESFERA CUJOS ÂNGULOS 0°, 90°, 180° E 270° REPRESENTAM AS CORES VERMELHO, AMARELO, VERDE E AZUL, RESPECTIVAMENTE. 80

FIGURA 35: GRADIENTE DOS ÍNDICES DE TENSÃO-COMPRESSÃO DO EPICARPO E POLPA DE MAÇÃS. O ENSAIO FOI REALIZADO DURANTE DOZE DIAS. AS FRUTAS FORAM REVESTIDAS COM SOLUÇÕES COM 2% DE KAFIRINAS VARIANDO AS CONCENTRAÇÕES DO PLASTIFICANTE OC EM: 0,25 E 0,50% COM E SEM NPs DE QS, ALÉM DO CONTROLE SEM REVESTIMENTO.. 83

FIGURA 36: GRADIENTE DOS ÍNDICES DE TENSÃO-COMPRESSÃO DO EPICARPO E POLPA DE PERAS. O ENSAIO FOI REALIZADO DURANTE QUINZE DIAS. AS FRUTAS FORAM REVESTIDAS COM SOLUÇÕES COM 2% DE KAFIRINAS E VARIADAS CONCENTRAÇÕES DO PLASTIFICANTE OC EM: 0,25 E 0,50% COM E SEM NPs DE QS, ALÉM DO CONTROLE SEM REVESTIMENTO. 83

FIGURA 37: GRÁFICOS DE ÂNGULO DE CONTATO REPRESENTANDO O VALOR MÉDIO OBTIDO DAS ANÁLISES EM MAÇÃS COM E SEM NPs E SEU DESVIO PADRÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO. **A)** MAÇÃS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA SEM NPs; **B)** MAÇÃS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA CONTENDO NPs. 85

FIGURA 38: GRÁFICOS DE ÂNGULO DE CONTATO REPRESENTANDO O VALOR MÉDIO OBTIDO DAS ANÁLISES EM PERAS COM E SEM NPs E SEU DESVIO PADRÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO. **A)** PERAS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA SEM NPs; **B)** PERAS REVESTIDAS COM SOLUÇÃO FILMOGÊNICA CONTENDO NPs. 86

FIGURA 39: IMAGENS DO ÂNGULO DE CONTATO FORMADO PELA GOTA DE ÁGUA DEPOSITADA NA SUPERFÍCIE DOS DIFERENTES REVESTIMENTOS APLICADOS NO EPICARPO DE MAÇÃS. 88

FIGURA 40: IMAGENS DO ÂNGULO DE CONTATO FORMADO PELA GOTA DE ÁGUA DEPOSITADA NA SUPERFÍCIE DOS DIFERENTES REVESTIMENTOS APLICADOS NO EPICARPO DE PERAS.	88
FIGURA 41: IMAGENS EM 2 E 3D DE MFA DO EPICARPO DE MAÇÃS. A) CONTROLE (SEM REVESTIMENTO), B) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA E 0,25% OC E C) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA E 0,50% OC.	91
FIGURA 42: IMAGENS EM 2 E 3D DE MFA DO EPICARPO DE PERAS. A) CONTROLE (SEM REVESTIMENTO), B) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA E 0,25% OC E C) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA E 0,50% OC.	92
FIGURA 43: IMAGENS DE MFA DO EPICARPO DE MAÇÃS. A) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA + 0,25% OC E 0,1% DE NPS DE QS E B) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA + 0,50% OC E 0,1% DE NPS DE QS.	93
FIGURA 44: IMAGENS DE MFA DO EPICARPO DE PERAS. A) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA + 0,25% OC E 0,1% DE NPS DE QS E B) EPICARPO REVESTIDO COM 2% DE KAFIRINA + 0,50% OC E 0,1% DE NPS DE QS.	94
FIGURA 45: GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA MASSA CORPORAL DOS GRUPOS CONTROLE (AZUL) E EXPERIMENTAL (VERMELHO).	97
FIGURA 46: CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO PELOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS, CONTROLE E EXPERIMENTAL, DURANTE O PERÍODO DE EXPERIMENTO. OS DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA DO ACUMULADO DE CADA SEMANA.	98
FIGURA 47: GRÁFICO DE CONSUMO HÍDRICO. MÉDIA E DP DO ACUMULADO DE CADA SEMANA DOS 2 GRUPOS EM ANÁLISE, CONTROLE (AZUL) E EXPERIMENTAL (VERMELHO).	99
FIGURA 48: EXCREÇÃO DE FEZES DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE (COLUNA AZUL) E EXPERIMENTAL (COLUNA VERMELHA). OS RESULTADOS ESTÃO REPRESENTADOS PELA MÉDIA OBTIDA DO ACUMULADO DE CADA SEMANA E SEU DP.	100
FIGURA 49: VOLUME DE URINA DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE (COLUNA AZUL) E EXPERIMENTAL (COLUNA VERMELHA). OS RESULTADOS ESTÃO REPRESENTADOS PELA MÉDIA OBTIDA DO ACUMULADO DE CADA SEMANA E SEU DP.	101
FIGURA 50: MASSA DOS ÓRGÃOS COLETADOS APÓS A EUTANÁSIA DOS ANIMAIS..	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VALORES, EM PORCENTAGEM, DAS ES DE KAFIRINAS EXTRAÍDAS COM E SEM AGENTE REDUTOR.	65
TABELA 2: MÉDIA DOS VALORES DO POTENCIAL ZETA PARA NPS DE QS-TPP OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA.	71
TABELA 3: MEDIDA DE RUGOSIDADE DOS REVESTIMENTOS COM E SEM NPS VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DO PLASTIFICANTE OC APLICADO NO EPICARPO DAS MAÇÃS E PERAS.	90
TABELA 4: ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SORO SANGUÍNEO DO GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL. OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MED \pm DP.	103
TABELA 5: VALORES DE CMO E DMO ENCONTRADOS NO FÊMUR E A TÍBIA DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL.	105
TABELA 6: RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA 3D DAS AMOSTRAS DA VÉRTEBRA L4 DO GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL.	105

LISTA DE ABREVIATURAS

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística

NPs – nanopartículas

NMs – nanomateriais

QS – quitosana

NPs de QS – nanopartículas de quitosana

TMQ – trimetilquitosana

CP – corpos proteicos

MR – massa relativa

ES – estrutura secundária

ESP – estrutura secundária de proteína

FTIR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier

RMN – ressonância magnética nuclear

MFA – microscopia de força atômica

DMO – densitometria óssea

OC – óleo de canola

AO – ácido oleico

AC – ângulo de contato

MC – massa corporal

DP – desvio padrão

MED – média

CMO - conteúdo mineral ósseo

DMO – densidade mineral óssea

TGO - transaminase glutâmica oxalacética

TGP - transaminase glutâmica pirúvica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações Iniciais	18
1.2 Revestimentos Comestíveis	19
1.2.1 Características desejáveis de um revestimento comestível	23
1.3 Sorgo Sacarino	24
1.3.1 Estrutura do grão de sorgo	26
1.3.2 As Kafirinas	28
1.4 Quitosana	31
1.4.1 As NPs de QS e TPP	34
1.5 Nanotoxicidade	35
1.6 Descrições das principais técnicas utilizadas na caracterização das kafirinas	37
1.6.1 A Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	37
1.6.2 Análise das estruturas de proteína por RMN no estado sólido	38
1.7 Técnicas para avaliação das NPs de QS -TPP	40
1.7.1 Potencial zeta	40
1.7.2 Microscopia de Força Atômica	41
1.8 Técnicas utilizadas para caracterização dos frutos revestidos	42
1.8.1 Ângulo de Contato (AC)	42
1.8.2 Texturômetro	43
1.8.3 Colorimetria	44
1.9 Testes toxicológicos realizados em cobaias	45
1.9.1 Densitometria óssea (DMO)	45
1.9.2 Microtomografia de Raios X (μ CT)	46
1.9.3 Ensaio Mecânico de Flexão a três pontos	47
2 OBJETIVO	48
2.1 Objetivos específicos	48
3 MATERIAIS e MÉTODOS	49
3.1 Procedimentos para obtenção das amostras	49
3.1.1 Métodos para a extração das kafirinas	49
3.1.2 Obtenção das nanopartículas de quitosana (NPs QS-TPP)	51
3.1.3 Preparação das soluções filmogênicas de Kafirinas com e sem NPs de QS e plastificante	52
3.1.4 Revestimento das frutas com as soluções filmogênicas	52
3.2 Técnicas utilizadas na caracterização das kafirinas	52
3.2.1 Caracterização das Kafirinas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE	52
3.2.2 Análise das kafirinas pela espectroscopia na região do infravermelho (IV) por transformada de Fourier (FTIR)	52

3.2.3	Calculo das Estruturas Secundárias (ES).....	53
3.2.4	Análises das Kafirinas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	53
3.3	Técnicas utilizadas na caracterização das NPs de QS-TPP.....	53
3.3.1	Análise das NPs de quitosana pelo potencial zeta.....	53
3.3.2	Microscopia de Força Atômica (MFA).....	54
3.4	Descrições das técnicas utilizadas para a caracterização dos revestimentos comestíveis.....	54
3.4.1	Perda de massa.....	54
3.4.2	Análise dos revestimentos por Ângulo de contato (AC).....	54
3.4.3	Microscopia de Força Atômica (MFA).....	55
3.4.4	Análise da textura da casca e polpa pelo texturômetro.....	55
3.4.5	Determinação da cor do epicarpo das frutas pelo método colorimétrico.....	55
3.5	Teste microbiano.....	56
3.6	Testes toxicológicos.....	56
3.6.1	Preparação da ração.....	56
3.6.2	Protocolo experimental para a realização dos testes toxicológicos.....	56
3.6.3	Densitometria óssea (DMO).....	57
3.6.4	Microtomografia de raios X (μ CT).....	58
3.6.5	Ensaio mecânico de flexão por três pontos.....	58
3.6.6	Análise Estatística.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1	Extração e Caracterização das Kafirinas.....	59
4.2	Análise das Kafirinas por Eletroforese.....	59
4.3	Análise das Proteínas pela Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	61
4.4	Estudos estruturais das Kafirinas pelas técnicas de IV e RMN.....	63
4.4.1	Quantificação das Estruturas Secundárias (ES) das kafirinas por IV.....	63
4.4.2	Quantificação das ES das kafirinas por RMN.....	66
4.5	Caracterização das Nanopartículas de Quitosana (NPs de QS).....	70
4.5.1	Tamanho Médio das Partículas.....	70
4.5.2	Análise das NPs de QS por Microscopia de Força Atômica (MFA).....	72
4.6	Caracterização dos Revestimentos Comestíveis nas Frutas.....	74
4.6.1	Análise da perda de Massa.....	74
4.6.2	Análise microbiana das soluções filmogênicas contendo NPs de QS.....	78
4.6.3	Análise por Calorimetria.....	79
4.6.4	Análise da textura.....	81
4.6.5	Análise por Ângulo de Contato (AC).....	84
4.6.6	Análise por MFA.....	90
4.7	Toxicidade.....	96
4.7.1	Massa Corporal (MC).....	96

4.7.2 Análise bioquímica sanguínea.....	102
4.7.3 Densitometria óssea.....	104
5 CONCLUSÕES.....	107
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	110
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8 ANEXO.....	102

1.1 Considerações Iniciais.

A produção mundial de frutas tem apresentado um crescimento contínuo. Em 1996 a produção ultrapassou 500 milhões de toneladas e, no ano de 2010, chegou a 728,4 milhões de toneladas (SEAB, 2012).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, ficando atrás da China e Índia, que juntos são responsáveis por 43,6%. Na última década, a produção brasileira de frutas foi ampliada em 22,3%. Em 2001 a colheita foi de 36,7 milhões de toneladas. Dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostraram que no ano de 2011, com um aumento de 6,8% na colheita em relação ao ano anterior, o resultado alcançado foi de quase 45 milhões de toneladas.

Dentre as principais frutas produzidas no país, a maçã (*Malus domestica*) se destaca em terceiro lugar sendo a fruta de clima temperado mais comercializada, *in natura*, nos mercados internacional e doméstico. Sua produção chegou a 1,3 milhão de toneladas no ano de 2012, sendo que 72,2 mil toneladas foram exportadas, 48% a mais que no ano de 2011.

A pera (*Pyrus communis*), outra fruta de clima temperado, tem sua exploração econômica no país ainda bastante reduzida, porém é uma das frutas mais consumidas. O Brasil importa de 80 a 90% das mais de 200 mil toneladas anuais de peras que o mercado doméstico consome contra 20 mil toneladas produzidas no país. O Rio Grande do Sul é o principal produtor, com 45,7% do total. Os principais países de importação são Argentina, EUA, Uruguai e Chile (POLL et al., 2013). As condições climáticas, manejo no pomar, condições de armazenamento, período entre a colheita e refrigeração são fatores que limitam a conservação pós-colheita de peras. Assim como a maçã, as peras são frutas climatéricas, nas quais, os processos vitais estão associados à respiração, uma fase de rápido aumento da atividade respiratória após a colheita, resultando em um curto tempo de prateleira.

Contudo, na contra mão desse contínuo processo de crescimento na produção e no consumo de frutas *in natura*, temos a maior taxa de perdas pós-colheita de frutas no mundo,

algo em torno de 35 a 40% da produção total de produtos colhidos e não consumidos; sendo que na Europa e no EUA esses valores estão em torno de 25% e 16%, respectivamente (FERREIRA, 2011). As causas das perdas durante o ano podem ser naturais, atribuídas aos fatores climáticos que podem afetar o sistema fisiológico como a respiração/transpiração levando ao amadurecimento precoce dos produtos e favorecendo o desenvolvimento de patógenos e/ou provocadas por procedimentos inadequados (perdas físicas) como: a utilização de embalagens impróprias, toque excessivo por parte dos consumidores, exposição inadequada, colisões provocadas geralmente pelo manuseio, armazenamento e transporte inadequados provocando cortes, perfurações e injúrias.

Os procedimentos de conservação pós-colheita usualmente empregados em frutas estão em quase sua totalidade, centrados na cadeia de refrigeração e em boas práticas de armazenamento que são, sem dúvidas, importantes e merecedores de estudos e aplicações (FERREIRA, 2011). Entretanto, um novo segmento tecnológico vem ganhando espaço nesta área. Hoje os revestimentos comestíveis, isolados ou associados às práticas convencionais de conservação, podem elevar significativamente a manutenção dos parâmetros de qualidade e de vida de prateleira dos frutos, beneficiando toda a cadeia produtiva e o consumidor.

Assim, nesta tese, foram desenvolvidos revestimentos comestíveis para prolongar a vida útil de peras e maçãs e avaliá-los quanto à sua toxicidade. A matéria-prima utilizada para a obtenção de tais revestimentos foi o sorgo sacarino que é um cereal utilizado para a produção de etanol, e tem como subproduto de tal processo, proteínas conhecidas como kafirinas, que são altamente hidrofóbicas e possuem capacidade filmogênica. Além destas proteínas, foram adicionadas nanopartículas (NPs) de quitosana (QS) nos revestimentos, que embora sejam hidrofílicas, podem fornecer propriedades mecânicas e bactericidas altamente desejáveis. Desta forma, buscou-se encontrar agregar valor às kafirinas, um subproduto da produção de etanol, obtidas a partir do sorgo sacarino.

1.2 Revestimentos Comestíveis.

Para a comercialização e o consumo de frutas *in natura*, diversos fatores são determinantes na escolha. Além da sua qualidade nutricional, os chamados “fatores sensoriais” como aparência, aroma e sabor bem como cor e textura são determinantes na hora da escolha (NASSU et al., 2001). Para manter estes fatores por maior tempo, uma alternativa consiste na utilização de filmes ou revestimentos comestíveis que agem como uma barreira em torno do alimento reduzindo a entrada e saída de gases, água, óleos, atuando como uma membrana contra a proliferação de agentes contaminantes como os fungos e bactérias (KROCTHA; MILLER, 1997).

Diferentemente dos filmes, descritos como sendo uma fina película formada separadamente do alimento e depois aplicada sobre ele, os revestimentos comestíveis podem ser definidos como uma simples camada, composta por materiais poliméricos, depositada diretamente sobre a superfície de um alimento que, após a secagem, forma uma fina película que pode ser consumida junto com o alimento (AZEREDO, 2003; AOuada, 2009; KROCHTA, 2009).

A primeira cobertura usada em frutas foi a cera de abelha. Entre os séculos XII e XIII, a cera foi utilizada na China para a conservação de frutas cítricas como a laranja e também o limão. Embora, nessa época, ainda não fosse compreendida a função de barreira dos revestimentos, que atuam na redução da troca gasosa entre o fruto e a atmosfera (respiração-transpiração), os chineses observaram que quando as frutas eram revestidas com a cera podiam ser estocadas por maior período de tempo e suas características iniciais eram preservadas quando comparadas com as frutas não revestidas (HANDENBERG, 1967). A partir dessa época, vários revestimentos foram surgindo como as gorduras de animais, a combinação de parafina com a cera de carnaúba, óleos vegetais e minerais e mais recentemente embalagens sintéticas produzidas a partir de diversos polímeros (MILLER, 1997).

Pesquisas neste campo têm-se intensificado, pois além da demanda por alimentos de boa qualidade por parte dos consumidores, as indústrias alimentícias buscam novas técnicas para melhorar a qualidade do produto e assim reduzir as perdas.

A questão ambiental também é levada em conta. Com os impactos ambientais causados pelos materiais sintéticos, pois apesar de garantirem uma proteção desejada para os alimentos, a desvantagem é por não serem biodegradáveis e de difícil reciclagem (GUILBERT et al., 1996), tornando-os responsáveis por grande parte de resíduos plásticos que se acumulam no ambiente.

A utilização de materiais biodegradáveis vem ganhando espaço, sendo cada vez mais estudados e avaliados como matéria-prima para a produção de filmes e revestimentos comestíveis. Estes filmes e revestimentos são produzidos a partir de formulações baseadas em produtos renováveis associados a ingredientes naturais que se degradam facilmente no ambiente (SOUZA, 2001).

Dentre os principais materiais de interesse estão algumas: proteínas, os polissacarídeos e lipídeos que, por serem considerados biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos, causam menor impacto ao meio ambiente e podem ser ingeridos com os produtos (ZHANG; MITTAL, 2010). Da classe dos polissacarídeos, o amido, o alginato, a celulose e a quitosana

são os que se destacam. As proteínas mais usadas sejam elas hidrofóbicas ou hidrofílicas são: as de origem animal como a caseína, o colágeno, a gelatina e as proteínas do soro do queijo e as de origem vegetal como as da soja, as do trigo e as zeínas do milho. O glicerol, triglicerídeos (óleos e gorduras), ácido láurico, ácido oleico, entre outros, compõem o grupo dos lipídeos mais utilizados para a utilização em revestimentos comestíveis (GENNADIOS et al., 1990; PETERSEN et al., 1999).

Além dos polímeros mencionados acima, existem outros componentes importantes que ajudam na formação e nas propriedades mecânicas dos revestimentos comestíveis como os plastificantes. Estes são substâncias não voláteis com alto ponto de fusão que, quando adicionados a outro material podem melhorar as propriedades mecânicas (VILLADIEGO et al., 2005). Tais substâncias atuam diretamente nas ligações de hidrogênio, reduzindo as forças intermoleculares ao longo das cadeias do polímero. Esta ação, em filmes e revestimentos comestíveis, ajuda a melhorar sua flexibilidade, força e resistência, dando ao revestimento melhor propriedade mecânica. Porém, os plastificantes podem influenciar na permeabilidade do vapor de água. Estudos realizados com sorbitol e glicerol indicaram que além de aumentar a flexibilidade os revestimentos apresentaram maior permeabilidade a vapor de água (McHUGH et al., 1994; McHUGH et al., 1994a; OH et al., 2004).

Os revestimentos formulados com polímeros de natureza hidrofílica, como a quitosana, geralmente exibem propriedades de barreira ao oxigênio (O_2), dióxido de carbono (CO_2) e lipídeos, além de propriedades mecânicas e antimicrobianas desejáveis. Isto acontece devido ao alto número de radicais polares, eles reduzem significativamente a permeação de gases apolares como o O_2 e também em certa quantidade o CO_2 estabelecendo um ambiente de atmosfera modificada, redução do O_2 e aumento do CO_2 , contribuindo para a redução do amadurecimento (BALDWIN, 1994). Mas por outro lado, não são eficientes como barreira ao vapor de água (FERREIRA, 2011).

Em contrapartida, revestimentos a base de proteínas hidrofóbicas, como as zeínas (prolaminas do milho) e as kafirinas (prolaminas do sorgo), devido à elevada concentração de aminoácidos apolares como leucina, alanina e prolina, apresentam excelentes propriedades de barreira à umidade e calor (BELTON et al., 2006; FERREIRA, 2011). No entanto, filmes a bases destas proteínas tendem a ser quebradiços e com baixa flexibilidade, havendo a necessidade de adição de plastificante ou de materiais que lhes confira flexibilidade como a nanopartículas.

De modo geral as formulações dos filmes e revestimentos comestíveis são constituídas pelos seguintes compostos: agente formador de filmes (chamado de matriz), plastificante,

solvente e em alguns casos, ajuste do pH. Outros materiais que podem ser incorporados são os antioxidantes, corantes, vitaminas e agentes antimicrobianos bem como as nanopartículas (NPs) (KROCHTA et al.; 1997).

Segundo Duncan (2011) num revestimento composto apenas por polímero as moléculas de vapor de água e oxigênio se difundem com maior facilidade enquanto no revestimento nanoestruturado esta permeabilidade é dificultada pelas nanopartículas presentes no filme, diminuindo ou até impedindo a difusão de gases e, conseqüentemente, aumentando o tempo de prateleira dos alimentos. Na figura 1 está ilustrado o mecanismo de ação protetora de um revestimento nanoestruturado.

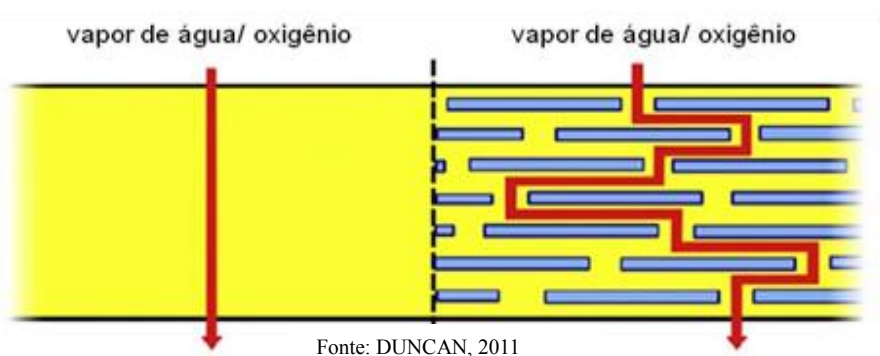


Figura 1: Ilustração da ação protetora de um revestimento comestível com e sem nanopartículas.

O uso de nanopartículas (NPs) na composição de filmes comestíveis é uma forma de melhorar suas propriedades de aumento de tempo de prateleira (FERREIRA, 2011). No caso das nanopartículas de quitosana (NPs de QS), polissacarídeo oriundo de resíduos da indústria pesqueira vem sendo estudado na aplicação de filmes comestíveis, pois a utilização destas NPs pode melhorar as propriedades mecânicas e de barreiras dos filmes (Moura et al., 2009). Além disso, estudos tem mostrado que NPs de QS e NPs de trimetilquitosana (TMQ) são estáveis e apresentam ação antimicrobiana (BLANCO, 2011), podendo evitar a proliferação de microrganismos na superfície dos alimentos. Este tipo de revestimento pode reduzir ou até mesmo inibir o desenvolvimento de bactérias e fungos no ou perto do produto alimentar mantendo a esterilidade dos alimentos evitando, assim, a contaminação.

O processo de formação dos revestimentos sobre a superfície das frutas envolve forças de coesão entre as cadeias do polímero utilizado como formador de revestimento e forças de adesão que atuam entre o revestimento (agregação do polímero) e a superfície em que está sendo depositado (CARVALHO, 1996).

Existem vários métodos de aplicação da solução formadora do revestimento sobre a superfície da fruta. A pulverização ou nebulização (“spraying”) e a imersão conhecido como

evaporação do solvente (“solvent casting”) são os dois principais métodos utilizados, seguidos de secagem em temperatura ambiente. Neste primeiro, gotículas da solução são atomizadas sobre a superfície da fruta formando, após a secagem, uma camada homogênea após a secagem. Pelo processo de imersão, em que a fruta é mergulhada na solução por alguns segundos e após a evaporação do solvente, o revestimento é formado em sua superfície (ASSIS et al., 2009).

Independente do material hidrofóbico ou hidrofílico ou a maneira que estão sendo depositados sobre a superfície dos alimentos, os revestimentos comestíveis tem que apresentar boas propriedades funcionais como as já descritas anteriormente. Se nestas condições as características iniciais do alimento forem preservadas após algum tempo, o revestimento comestível é considerado eficaz.

1.2.1 Características desejáveis de um revestimento comestível.

Para aplicações em frutas ou qualquer outro alimento, a principal característica almejada na obtenção de um revestimento comestível é a de estabelecer uma boa diferença de resistência à umidade (KESTER; FENNEMA, 1986). A perda de água excessiva, não só resulta em perda de massa, mas também em perda de qualidade na textura, devido ao murchamento e enrugamento (BARROS; GOES; MINAMI, 1994).

Uma importante característica das frutas é que elas respiram, absorvendo oxigênio (O_2) e liberando gás carbônico (CO_2), e transpiram, isto é, perdem água. Após a colheita, ao longo da estocagem, as frutas continuam a respirar, transpirar e a produzir hormônios de amadurecimento, resultando em alterações nas concentrações de O_2 , CO_2 , água e etileno. Uma vez colhido, ou seja, o fruto perde sua fonte de água, fotossintatos e minerais, suprimindo sua necessidade energética utilizando os materiais orgânicos armazenados nos tecidos, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos. Na respiração estas substâncias são quebradas e transformadas em energia química. Com a perda das reservas alimentares armazenadas durante a respiração e com o aumento da concentração de O_2 e proporcional perda de CO_2 , as células internas não são renovadas, aumentando a respiração e provocando uma queda metabólica resultando em: aceleração da senescência; redução do valor alimentar (energético); perda na intensidade de sabor (“flavor”), principalmente na doçura e perda de massa seca (desidratação) (BOAS, 2000).

Mantendo a atmosfera interna dos frutos controlada, pela modificação e controle dos gases, o período de vida pós-colheita do produto pode ser prolongado uma vez que o amadurecimento dos frutos climatéricos como as maçãs e peras está relacionado com a síntese de etileno sendo proporcional à concentração de O_2 . Ao reduzir a absorção de O_2

consequentemente é reduzida a concentração de etileno resultando em uma maturação mais lenta (BALDWIN et al., 1999). Portanto, a taxa da respiração é inversamente proporcional ao tempo de vida do fruto. Desta forma, a utilização de revestimentos comestíveis com boas propriedades de barreira ao oxigênio e a umidade, visa estender a vida de prateleira da fruta.

Um aspecto importante é a espessura e a homogeneidade do revestimento podendo interferir diretamente na estabilidade do produto revestido, pois o controle da taxa de permeação de vapor d'água, O₂, CO₂ entre outros é função da porosidade e da espessura do revestimento. Sendo assim, para a obtenção de um bom revestimento, deve-se levar em conta principalmente o tipo de solvente utilizado (PARK et al., 1994). Os considerados “solventes adequados” são aqueles que apresentam valores de solubilidade semelhantes aos do polímero utilizado. A seguir serão descritos os materiais de partida que foram utilizados neste projeto para obtenção dos revestimentos.

1.3 Sorgo Sacarino.

O sorgo é uma planta considerada nativa da África, encontrada principalmente na região da Etiópia por volta de 3000 a.C. Entretanto, há evidências que na Ásia, precisamente a Índia, seja a primeira região responsável pela domesticação e dispersão da planta no ano 1000 AC (NUNES, 2000).

Devido à domesticação desta planta por séculos, o sorgo hoje apresenta características diferenciadas que atendem às exigências e demandas do ser humano. Comparativamente aos outros cereais, o sorgo é mais resistente à seca, pragas, doenças e temperaturas elevadas, sendo uma planta mais adaptada às condições adversas do que outras culturas como o milho, trigo, centeio entre outras (DINIZ, 2010).

Classificado como sendo da família das *gramineae*, do gênero *sorghum* e da espécie *Sorghum bicolor* L. Moench, agronomicamente o sorgo pode ser classificado também em quatro grupos: granífero, forrageiro para silagem e/ou sacarino, forrageiro para pastejo/corte verde/fenação/cobertura morta e vassoura. O primeiro grupo inclui tipos de porte baixo que são adaptados à colheita mecânica. O segundo grupo inclui tipos de porte alto apropriados para silagem e/ou produção de açúcar e álcool. O terceiro grupo inclui sorgos utilizados para pastejo, corte verde e fenação. O quarto grupo inclui tipos cujas panículas são confeccionadas vassouras (EMBRAPA, 2009)¹.

Dos quatro grupos, o sorgo granífero é o que tem maior expressão econômica e está entre os cinco cereais mais cultivados no mundo, ficando atrás do arroz, trigo, milho e cevada (EMBRAPA, 2009). Entretanto, o sorgo sacarino vem se destacando como uma cultura

¹ <http://www.cnpms.embrapa.br>. Acessado em (13/10/2013).

bastante promissora para a produção de etanol, tanto do ponto de vista agrônomo quanto industrial, por apresentar colmos suculentos com altos teores de açúcares fermentáveis. Este vem sendo avaliado como uma alternativa à cana-de-açúcar para a produção de etanol, pois seu colmo é rico em sacarose, assim como na cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), permitindo que a mesma infra-estrutura da indústria canavieira seja utilizada a partir do sorgo sacarino para a produção de álcool. No início de 2011 a usina Cerradinho, em Catanduva (SP) produziu 1,4 milhões de litros de etanol a partir do sorgo sacarino. A companhia cultivou 1.200 hectares de uma variedade híbrida desenvolvida pela Cana Vialis/Monsanto². Neste mesmo ano, a usina Porto das Águas, da Empresa Cerradinhos Bio da cidade de Chapadão do Céu (GO), plantou 1.800 hectares produzindo 25 toneladas de biomassa/ha e a indústria gerou 35 litros de etanol por tonelada³.

Em 2012 grandes produtores de álcool como Raízen, ETH bioenergia, Bunge e Usina São Martinho também cultivaram o sorgo sacarino na tentativa de complementar a oferta de etanol na entressafra da cana-de-açúcar. A ETH bioenergia cultivou 1,5 mil/ha de sorgo sacarino, dos 120 mil hectares que tinham disponíveis para cultivo. As empresas Raízen, *joint venture* entre Cosan e Shell, também cultivaram mil hectares de sorgo sacarino⁴. Em uma pesquisa realizada pela Embrapa, foram identificadas de 30 a 50 usinas de etanol com grande interesse em utilizar o sorgo sacarino como complemento a cana-de-açúcar em períodos da entressafra (EMBRAPA, 2012a).

Vale ressaltar que, na safra de 2011/2012 (novembro-dezembro/março-abril) foram plantados no país cerca de 30 mil hectares de sorgo sacarino, com um rendimento variável de 20 a 64 toneladas de biomassa e rendimento de 2 a 3 mil litros de etanol/há, contra 7 mil litros de etanol obtidos pela cultura da cana. Espera-se que na safra de 2012/2013 a meta seja de 100 a 120 mil hectares de sorgo plantado (EMBRAPA, 2012).

O sorgo sacarino apresenta um ciclo de crescimento curto (cerca de 120 dias) possibilitando ter mais de uma safra por ano. Geralmente o sorgo sacarino é semeado na entressafra da cana-de-açúcar nos meses de outubro e novembro, para suprir a produção de etanol nos meses de dezembro a março, quando as usinas estão sem matéria-prima (cana-de-açúcar) para moagem, garantindo assim a produção de etanol durante todo o ano. Na figura 2 está a representação do calendário bioenergético (TEIXEIRA et al., 1997; SOUZA et. al., 2005; MARCOCCIA, 2007; EMBRAPA, 2012).

² <http://www.estadao.com.br/noticias/impreso,usina-produz-pela-primeira-vez-etanol-a-partir-de-sorgo,705475,0.htm>.

³ <http://jovensulnews.jusbrasil.com.br/politica/8244055/usina-da-cerradinho-bio-investe-na-producao-de-etanol-de-sorgo> (Acessados em 13/10/2013).

⁴ <http://www1.folha.uol.com.br/fsp/mercado/18014-usinas-testam-alcool-produzido-com-sorgo.shtml>.

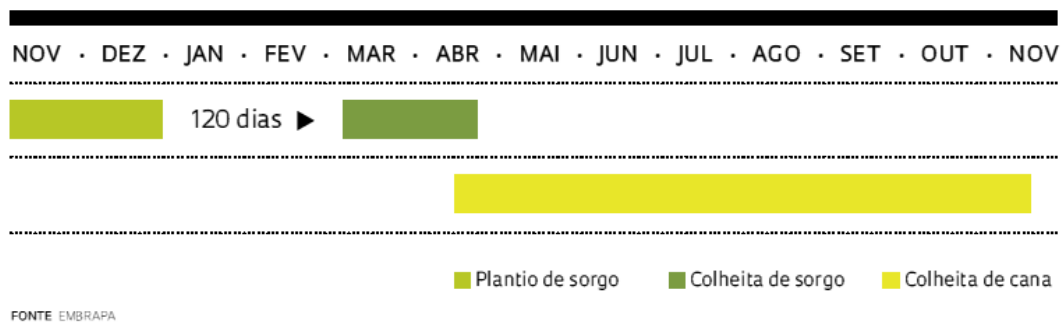
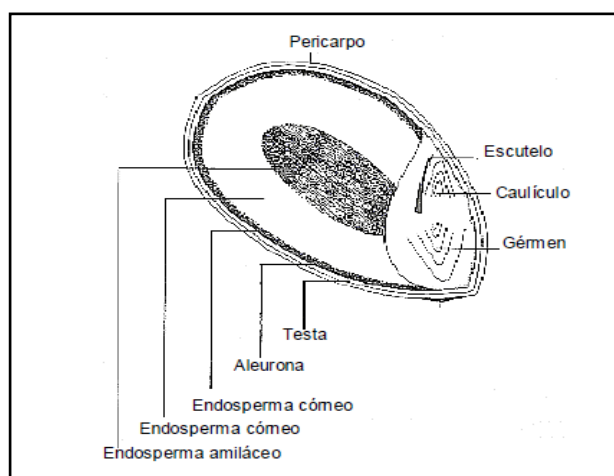


Figura 2: Calendário energético representando o plantio do sorgo sacarino, na entressafra da cana nos meses de novembro a abril.

Com a utilização do sorgo sacarino na produção de etanol, é gerada uma grande quantidade de subprodutos, considerados rejeitos, que podem ser empregados na geração de calor e energia elétrica via combustão e, futuramente, poderão constituir-se numa excelente opção para produção de etanol de celulose, quando as tecnologias de hidrólise da celulose se tornarem competitivas economicamente (TEIXEIRA et. al, 1997; SOUZA et. al., 2005; MARCOCCIA, 2007). Sendo assim, o processamento industrial do sorgo sacarino para a produção de etanol tem grande semelhança aos já utilizados nas usinas do país.

1.3.1 Estrutura do grão de sorgo.

Com a utilização do colmo do sorgo sacarino na produção de etanol, os grãos de sorgo são considerados resíduos e vêm sendo utilizados na alimentação animal por apresentar um alto valor energético. A estrutura básica do grão de sorgo, representada na figura 3, pode variar de acordo com a variedade. Seus elementos principais são: pericarpo, gérmen e endosperma.



Fonte: Nunes, 2000.

Figura 3: Esquema do grão de sorgo.

O pericarpo é o elemento mais externo e corresponde a 6% da massa média do grão. Este elemento é formado por três camadas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O sorgo é o único cereal que apresenta grânulos de amido depositados também no mesocarpo, esta seria a explicação pelo alto conteúdo de amido encontrado neste grão (NUNES, 2000).

Abaixo do pericarpo está localizada a testa, estrutura onde os taninos⁵ são encontrados. Estudos têm mostrado que os taninos apresentam uma elevada capacidade de se ligarem com proteínas, o que pode causar problemas na digestão. Devido ao fato dos cultivares de sorgo não apresentarem uma proteção para as sementes, como por exemplo, a palha no milho e as glumas do trigo, a presença destes compostos fenólicos no grão serve como uma defesa química contra o ataque de pássaros e patógenos. Existem duas classes de taninos: os hidrossolúveis e os condensados, sendo estes últimos os mais abundantes e responsáveis pela baixa digestibilidade do sorgo (MAGALHAES et al., 2001, DINIZ, 2010).

O gérmen é a estrutura que corresponde a 10% da massa do grão, sendo formado por dois tecidos, cálculo e escutelo, este contém altos teores de lipídeos, proteínas, enzimas e minerais. Entre os lipídeos presentes, os ácidos graxos poli-insaturados são os mais abundantes, assim como os presentes no grão de milho (FAO, 1995).

O endosperma é o elemento mais abundante no grão, correspondendo a 84% da massa total. Ele é formado por duas principais estruturas: o endosperma vítreo, formado pela uma textura amilácea e o endosperma opaco, formado por uma textura córnea. Assim como nos outros cereais, são nestas estruturas que 88% dos grânulos de amido presentes no grão do sorgo, são depositados. São encontrados no endosperma elevados teores de proteínas. As proteínas do sorgo são classificadas em: globulinas e albuminas (solúveis em água ou solução salina) e prolaminas e glutelinas (também conhecidas como proteínas de reserva). As prolaminas são proteínas insolúveis em água e solúveis apenas em solução alcoólica por serem altamente hidrofóbicas. Já as glutelinas, são proteínas insolúveis tanto em água quanto em álcool, somente após a redução das ligações de dissulfeto, elas tornam-se solúveis em álcool.

As prolaminas são proteínas encontradas em todos os cereais e dependendo do grão, elas recebem várias denominações. No grão de milho, as prolaminas são conhecidas como zeínas e no grão de sorgo como kafirinas. O principal interesse tecnológico por estas proteínas vem da capacidade de formar uma película protetora para incremento da vida de prateleira dos alimentos, protegendo tais produtos da umidade e oxigênio (BUCHNER et al., 2011.) Uma outra aplicação seria nas indústrias farmacêuticas para a produção de revestimentos para

⁵ Taninos: compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário dos vegetais.

medicamentos (WU et al., 1997; GAO et al., 2006). Assim, o sorgo tem potenciais aplicações bio-industriais como produção de etanol e filmes (BEAN et al., 2006).

Além disso, esse grão vem sendo estudado para uso na produção de pães que podem ser consumidos por portadores da doença celíaca, uma vez que o seu glúten não contém a sequência de aminoácidos responsável por estimular os indivíduos alérgicos (SCHOBER et al., 2007).

1.3.2 As Kafirinas.

As kafirinas (proteínas de reserva do sorgo) assim como as zeínas (proteínas de reserva do milho), são depositadas em organelas conhecidas como corpos proteicos (CP). Há evidências de que estas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático e, então, depositadas no endosperma onde se agregam formando os CP, os quais são degradados durante a maturação do grão (ORIA et al., 2000).

De acordo com a solubilidade, as kafirinas podem ser classificadas em frações proteicas denominadas de kafirinas α , γ , β e δ . Uma alta proporção da fração α é extraída em soluções água/álcool e representam de 66 a 84% das kafirinas totais (MESA-STONESTREET et al., 2010). Em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE), as kafirinas α apresentam bandas de massa relativa (M_r) de 23 a 25 KDa. Elas podem ser compreendidas pelas kafirinas α_2 de M_r de 24KDa e α_1 de M_r 25KDa. As M_r das kafirinas α_1 e α_2 não corresponderem à mesmas M_r s das zeínas α . A figura 4 mostra a similaridade entre as kafirinas α e as zeínas α . É possível observar que a quantidade de resíduos de aminoácidos apresentados para a kafirina α_2 é superior aos encontrados na zeína α Z19, 239 contra 214, respectivamente.

```

22k α-zein FIIIPQC SLAPSA . IIPQFLPPV TSMGF EHLAVQAYMLQQALAA SVLQQPI
22k α-kafirin VIIPQC SLAPNA . IISQFLPPLTPVGF EHPALQAYRLQQALANSILQQPF
19k α-zein TIFPQC SQAPIASLLPPYLS PAVSSVCENFILQP YRIQQAIAGIL . . PL
19k α-kafirin . . . . . CSQISIA AHPAYLPP . . . . . VCANPMLQPYGLQQAI AASIL . . QS

22k α-zein DQL . QQQLAHLTIQTIAT . . . . . QQQQFLPALSQLA . VVNPVA
22k α-kafirin AQL . QQSSAHLTVQTIAA . . . . . QQQQFLPALSQLA . LANPVA
19k α-zein SPLFLQQSSALL . . QQLPLVHLLAQNIRAQQLQLV . . . . . LANLAA
19k α-kafirin SPLFIQQPSALL . . QQLSLVNLLAQ SIRAQQLQLVLP SINQVTLANLAA

22k α-zein YLQQQLLASNPLALANVAAYQQQQQLQOFLPALSQLAMVNPAAYLQQQQ
22 k α-kafirin YLQQQLLASNPLALVNNAAY . QQQQLQQLPMISQVAMANPAAYLQQQQ .
19k α-zein YSQQQFLPFNQLAALNSASYLQQQLP . . . . . FSQLSAAYP . . . . .
19k α-kafirin YSQQQFIPFSQLAAVNPAAYLQLQQLQ . . . . . FSQAAA SFAAFWFPQQQL

22k α-zein LSSSPLAVVNAPTYLQQQMLEQIVPALTQLAVANPAAYL . Q . QLLPFNQL
22k α-kafirin LAYNPLVAANAAAYLRQQQLQQLPALSQALAVNPAAYL . HTQLLPFNQL
19k α-zein . . . . . QQFLP . FNQLTALNSPAYLQQQQLLPFSQL
19k α-kafirin LPPYPQGVANAATLLQ . . . . . LQQLP . FNQLAAVNPAAYLQLQLLQFSQL

22k α-zein TVSNSAAYLQQRQPL . LNFLEVANPLVAAFLQQQLLFYNQFSLMNPALS
22k α-kafirin AVTNTAAYLQQQLLRVNEVVAANPLCAAFQPRQLLFFNQISLMNPAFS
19k α-zein AGVSPATFLTQPQLLPPFYQHAAPN . . AGTLLQLQLLFFNQLALTNPATF
19k α-kafirin GAVSPATFWPQQQLLPPFYQGVAN . . AATLFQQQLLFFIQALANPATS

22k α-zein WQQPIVGGAI F - 245
22k α-kafirin WQQPIVGSATV - 246
19k α-zein YQQPIIGGALF - 214
19k α-kafirin CQQPFIIGGALF - 239*

```

Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos das α kafirinas e α zeínas. Os resíduos de aminoácidos conservados para ambas as proteínas estão realçados. (Fonte: BELTON et al., 2006)

Em geral, os aminoácidos são praticamente os mesmos, o que difere é que na kafirina α_2 , representada na figura 4 como 19KDa, existem três resíduos do aminoácido de cisteína contra dois nas Z19 das zeínas. Para os autores, isto poderia explicar a maior facilidade que as kafirinas apresentam em formar ligações de dissulfeto em relação às zeínas (BELTON et al., 2006). Assim como as zeínas, as kafirinas α são ricas em aminoácidos apolares e apresentam ausência de aminoácidos essenciais como lisina e triptofano.

As kafirinas γ , assim como as zeínas γ são solúveis em água após a redução de ligações de dissulfeto. Foram observadas duas bandas no gel de SDS/PAGE, uma de Mr 27 KDa e em muito casos outra de 49 KDa, a qual é atribuída a um dímero da primeira. Em grãos de sorgo com endosperma vítreo, a Kafirina γ representa de 9 a 12% das kafirinas totais e no endosperma opaco, representa de 19 a 21%. Devido ao alto conteúdo de prolina, cisteína e histidina, esta proteína apresenta uma forte capacidade de formar ligações de dissulfeto com outras proteínas e entre si (MESA-STONESTREET et al., 2010). Na figura 5, foi avaliada a sequência de duas kafirinas γ , e elas foram comparadas com uma sequência de zeína γ . Nota-se que entre as variedades de kafirinas γ , não existe diferença e quando comparadas com a zeína γ , há certa semelhança entre as sequências, exceto que na zeína γ existem apenas quatro

repetições dos resíduos de aminoácidos Pro-Pro-Pro-Val-His e na kafirina γ foram encontrados oito.

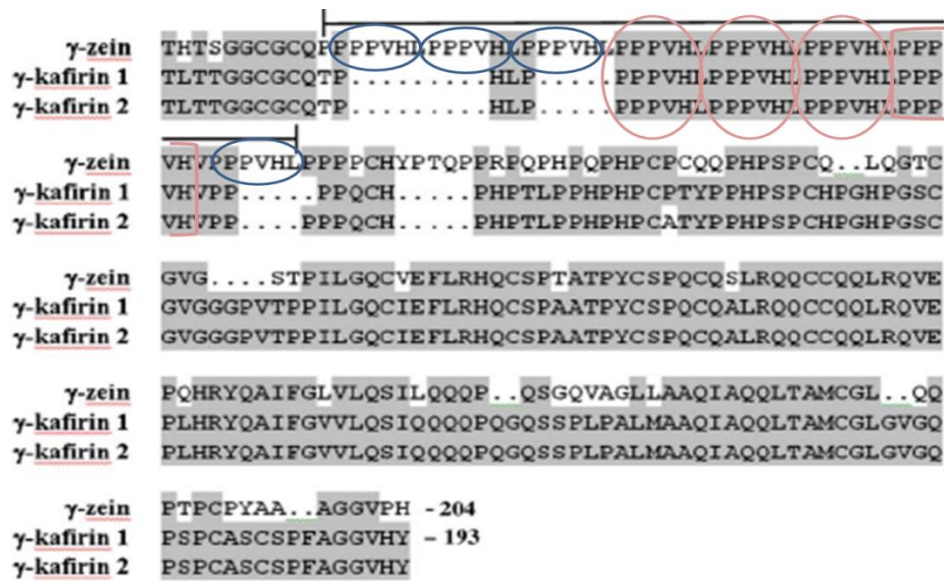


Figura 5: Alinhamento das sequências de aminoácidos de duas variedades de kafirina γ comparadas com a sequência da zeína γ . Os círculos apresentados na figura em azul e rosa indicam a região da sequência de peptídeos repetidos (sequência repetida PPPVHL). (Fonte: BELTON et al., 2006).

As kafirinas β representam de 7 a 8% das kafirinas totais no endosperma vítreo e de 10 a 13% no endosperma do grão opaco. Foram identificadas frações de Mr 15, 17 e 18 KDa, no entanto, há controvérsias sobre sua Mr. Recentemente outros autores identificaram apenas uma única banda em 19 KDa. Assim como as zeínas β são solúveis em soluções água-álcool após a redução das ligações de dissulfeto. Esta proteína é rica em resíduos de metionina (16 resíduos) e cisteína (10 resíduos) (BELTON et al., 2006; MESA-STONESTREET et al., 2010). A sequência de aminoácidos da kafirina β e da zeína β estão apresentadas na figura 6.



Figura 6: Alinhamento das sequências de aminoácidos da kafirina β e da zeína β . (Fonte: BELTON et al., 2006).

A sequência de ambas as β prolaminas mostra grande similaridade entre elas, principalmente na quantidade de resíduos de metionina encontrados. Contudo, a zeína β só tem sete resíduos de cisteína indicando que esta proteína é encontrada como polímero e oligômeros. Já a kafirina β , por apresentar uma quantidade maior de resíduos de cisteína, o que lhe permite estar presente em forma de monômero se as ligações de dissulfeto forem apenas intramoleculares e também em forma de oligômeros com ligações de dissulfeto intra e intermoleculares.

As kafirinas δ representam as frações de Mr em torno de 14KDa e 21KDa. Essas proteínas têm alta homologia com a zeína δ de Mr 14 KDa. No entanto, diferem da zeína correspondente devido à presença, nas kafirinas, de uma pequena região rica em resíduos de metionina (de 16 a 18%) (BELTON et al., 2006). Vale ressaltar que a zeína δ pode ser detectada por SDS-PAGE, a kafirina δ ainda não foi identificada no nível proteico do grão.

Estudos estruturais sobre as kafirinas são escassos e em geral elas têm sido comparadas às zeínas em sua conformação. Forato (2000) realizou um estudo sobre as estruturas secundárias (ES) pela espectroscopia na região do infravermelho (IV) das zeínas extraídas dos grãos e corpos proteicos de milho, no estado sólido, e estas apresentaram predominância em estruturas helicoidais com 43% de α hélices e 28% de folhas β . As pesquisas realizadas na década de 1970 indicaram um alto conteúdo de estruturas helicoidais, com 40% de sua estrutura α -hélices, para kafirinas em solução de t-butanol 60%, apresentando similaridade com as α -zeínas. Os estudos foram conduzidos pelas técnicas dicroísmo circular (DC) e IV (WU et al., 1971).

Duodu et al. (2001) analisaram por IV e ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C) no estado sólido, as proteínas do sorgo de cinco cultivares diferentes e do milho nos corpos proteicos, antes e após o cozimento. Os autores observaram de 50 a 60% de estruturas do tipo α -hélices nos corpos proteicos para amostras não cozidas de sorgo. Em um recente estudo, Gao et al. (2005) analisaram kafirinas extraídas em solução de água/t-butanol por IV, utilizando o acessório de reflexão atenuada total (ATR), e obtiveram uma razão de 1,39:1 de estruturas α -hélices/folhas β , respectivamente. Contudo, quando analisaram kafirinas extraídas com etanol/agente redutor (metabissulfito de sódio - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) a razão foi de 1:1 de estruturas α hélices e folhas β , respectivamente.

1.4 Quitosana.

Como nos revestimentos aqui obtidos foram utilizadas NPs de QS, será feita uma descrição deste material. A quitosana (QS) é um polissacarídeo obtido a partir da

desacetilação parcial da quitina. A quitina é um polissacarídeo natural extraído a partir do exoesqueleto de artrópodes, algas diatomáceas e paredes celulares de fungos e leveduras. Apesar de ser sintetizada por vários insetos e vegetais, as principais fontes comerciais de obtenção da quitina são os rejeitos da indústria pesqueira como a carapaça de caranguejo, camarão, lagosta e lula (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Formada por várias unidades repetitivas 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose unidas por uma ligação β (1-4), como mostra a figura 7, a quitina é a segunda substância orgânica mais abundante e sua estrutura é muito semelhante à da celulose, mas no caso da quitina o grupo hidroxila do carbono 2 é substituído por um grupo acetamido (BORATO, 2007).

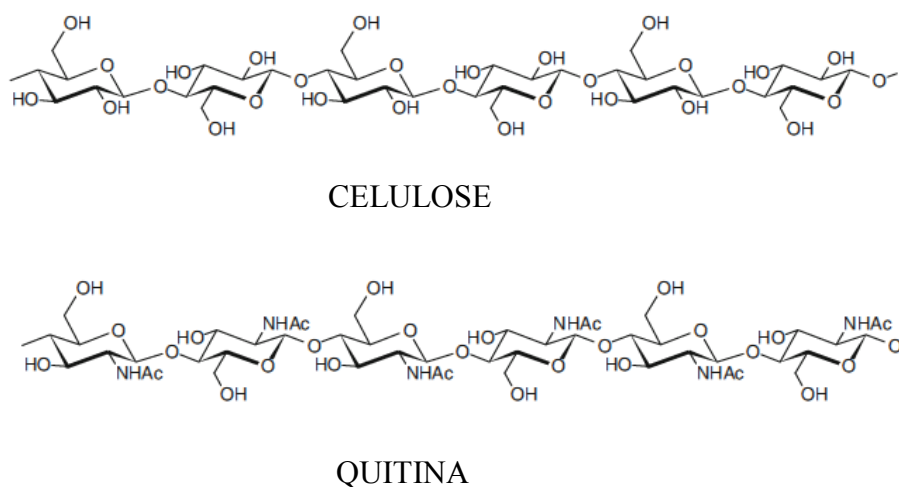


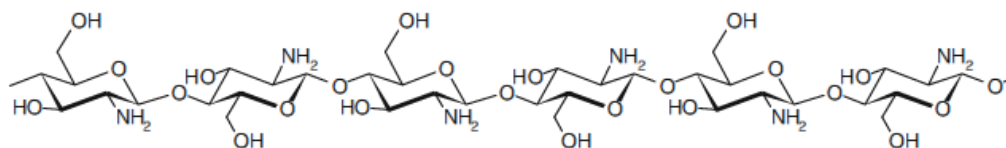
Figura 7: Representação das estruturas químicas da celulose e da quitina.

O processo de desacetilação da quitina ocorre em meio básico com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH). O tempo de agitação, a concentração do meio e a temperatura são fatores variáveis que interferem nas características da quitosana a ser obtida (AOUADA, 2009). Este processo envolve a remoção dos grupos acetil da cadeia da quitina, resultando em grupos amina livres (NH_2). Entretanto, a desacetilação da quitina para a obtenção da quitosana não ocorre de forma total, 100% desacetilada. O processo resulta no consumo excessivo de reagentes, além de favorecer a despolimerização das ligações glicosídicas. Assim, o biopolímero é considerado quitosana quando o grau de desacetilação for igual ou maior que 40% (BLANCO, 2011).

De acordo com Silva, 2012, o grau de desacetilação influencia na solubilidade da quitosana. Diferentemente da quitina, insolúvel em solução aquosa e também na maioria dos solventes orgânicos usuais (ANITHA et al., 2009), a quitosana é solúvel em soluções aquosas contendo ácidos, tais como o acético e o clorídrico graças à protonação do grupo amino ligado

ao carbono 2 da unidade 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. Essa solubilidade está diretamente relacionada com a ocorrência de cargas positivas devido à presença de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) que confere a solubilidade da quitosana nestes meios (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

A quitosana, como já mencionado, o principal derivado da quitina, é geralmente obtida pela hidrólise alcalina dos grupos acetamida da quitina e possui estrutura primária idêntica à da quitina, porém na quitosana predominam as unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligação glicosídica β (1-4), figura 8 (CAMPANA-FILHO et al., 2007).



QUITOSANA

Figura 8: Representação da estrutura química da quitosana.

A quitosana tem como características desejáveis a abundância, obtenção a partir de rejeitos da indústria pesqueira, tornando-a matéria-prima de baixo custo e possibilitando aplicações desse material em diversas áreas como médica, farmacêutica e na agricultura têm gerado um aumento na produção industrial da quitosana. Este polissacarídeo apresenta propriedades muito interessantes, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e alergenicidade, propriedades cicatrizantes, atividades antimicrobiana e antifúngica, capacidade de regeneração de tecidos e também facilidade de formação de filmes. Uma das mais importantes propriedades da quitosana é de agir como quelante. Ela pode se ligar seletivamente a substâncias como o colesterol, gorduras, íons metálicos e também a proteínas (PILLAI et al., 2009).

Neste âmbito de aplicações, o principal enfoque na utilização da quitosana na indústria alimentícia está relacionado às suas propriedades antifúngicas e antibacterianas além de atuarem como barreira a agentes externos prevenindo a proliferação de microrganismos na superfície dos alimentos. Esse polímero provoca a inibição do crescimento de vários microrganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, Coliforms, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris* (SILVA et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que para completa inativação dos microrganismos, como *S. aureus* (bactéria Gram-positiva), após dois dias de incubação, foram necessárias

concentrações maiores que 1-1,5%; porém existem na literatura resultados de inativação com valores maiores ou iguais a 0,005% para o mesmo microrganismo. Em *E. coli* (bactéria Gram-negativa), concentrações maiores que 0,1% são necessárias para inibir seu crescimento. Um dos fatores que influenciam na atividade antimicrobiana da quitosana, e de seus derivados, é a massa molar do polímero. Em bactérias Gram-positivas quanto maior a massa molar do polímero maior será a atividade antimicrobiana, enquanto que, em bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molar quitosana, maior a atividade antimicrobiana (WHANG, 1992; ZHENG; ZHU, 2003).

Segundo Aouada (2009) outro atrativo para a indústria alimentícia seria o fato de que como a quitosana se constitui de fibras não-digeríveis, ou seja não apresenta valor calórico independente da quantidade ingerida. Dentre as várias áreas onde a quitosana pode ser empregada como geis, filmes, microcápsulas e também NPs. As NPs podem ser produzidas pelo método de geleificação iônica, entre sítios positivos da quitosana e negativos tripolifosfato de sódio (TPP). A seguir, será apresentada uma breve descrição sobre as NPs de QS.

1.4.1 As NPs de QS e TPP.

As NPs poliméricas podem ser sintetizadas a partir de polímeros sintéticos, semi-sintéticos ou naturais. No caso dos polímeros naturais, as NPs de QS vêm sendo muito utilizadas. Em geral, são definidas como estruturas preparadas com uma dimensão máxima de 100 nm.

As NPs de QS vêm sendo estudadas na produção de filmes e revestimentos comestíveis, pois a utilização destas NPs pode melhorar as propriedades mecânicas destes, promovendo a preservação e garantindo a qualidade dos alimentos por meio de atmosfera controlada (MOURA et al., 2009). Além disso, estudos tem mostrado que NPs de QS são estáveis e apresentam ação antimicrobiana (BLANCO, 2011), evitando o ataque e a proliferação de microrganismos na superfície dos alimentos.

Ferreira (2011) afirma que o uso NPs na composição destes filmes e revestimentos comestíveis também é uma forma de agregar valor a esse material melhorando suas propriedades de aumento de tempo de prateleira beneficiando tanto os produtos, o comerciante e o consumidor.

Existem vários métodos de síntese de NPs de QS encontrados na literatura, porém, devido à habilidade da QS de gelatinizar em contato com poliânions específicos como o TPP, o método de gelificação iônica vem sendo descrito na literatura como um dos mais utilizados para obtenção de NPs de QS-TPP (QI et al., 2004; DU et al., 2008; DU et al., 2009). Essa

técnica envolve a adição de uma fase alcalina (pH 7-9) contendo o TPP em uma fase ácida (pH 4-6) contendo QS, em temperatura ambiente. A formação das NPs de QS-TPP ocorre imediatamente através das ligações inter e intramoleculares entre os grupos fosfatos do TPP e os grupos amino ionizados da QS, após a mistura das duas fases (AUOADA, 2009; BLANCO, 2011), conforme apresentado na figura 9.

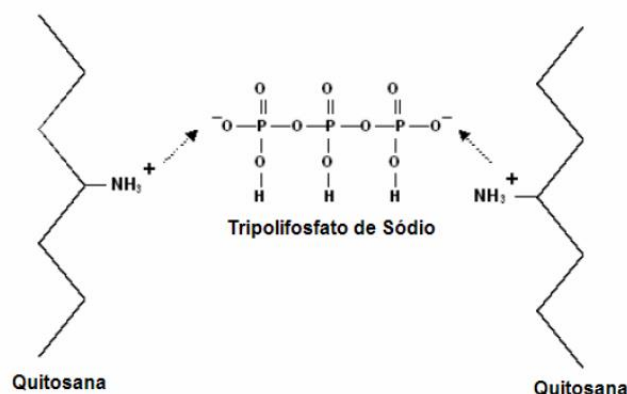


Figura 9: Interação da quitosana com o TPP.

As principais vantagens da obtenção das NPs de QS-TPP pelo método de gelificação iônica são alto rendimento e a facilidade de manipular alguns parâmetros como pH, concentração de QS, razão em massa de QS e TPP, temperatura e velocidade de agitação e assim variar o tamanho e o potencial zeta das NPs em obtenção (GAN et al., 2005; ALI et al., 2010).

1.5 Nanotoxicidade.

Como nos revestimentos aqui desenvolvidos foram utilizadas NPs foi necessário avaliar a nanotoxicidade dos mesmos. A nanotoxicidade é um estudo das possíveis interações entre os nanomateriais (NMs) e o sistema biológico. Como as NPs tem área superficial aumentada se comparadas com os materiais de mesma origem em escala maior, o seu comportamento provavelmente não será o mesmo do que em escala nano, uma vez que suas propriedades foram modificadas, podendo causar algum efeito prejudicial ao organismo quando ingeridos (SOZER; KOKINI, 2009).

Para estudos de nanotoxicidade, os principais parâmetros a serem considerados em um nanomaterial são as propriedades físico-químicas, o tamanho das partículas (e sua distribuição), a forma (incluindo proporções), composição química, a área superficial e a estrutura morfológica da substância. Outros parâmetros incluem carga de superfície e a presença de contaminantes provenientes da sua síntese. Além disso, é importante verificar,

quando são aplicados em alimentos, a solubilidade (FAO; WHO, 2010).

Na literatura, pode-se observar grande quantidade de trabalhos que utilizam NPs de QS. Os principais campos de aplicação são áreas de medicina e farmácia como a liberação controlada de fármacos e a agricultura com a conservação e o processamento de alimentos. O uso das NPs de QS em alimentos envolve o recobrimento dos alimentos preservando-os contra a deterioração microbiana (CAMPANA FILHO, 2007). É fato que a aplicação desses NMs em alimentos e embalagens está crescendo rapidamente, porém, o desconhecimento da ação no organismo humano e a realização de testes toxicológicos ainda são escassos.

Muitos trabalhos realizados sobre nanotoxicologia estão voltados para teste realizados em células *in vitro*, porém estes resultados podem não corresponder ou substituir os resultados obtidos em testes *in vivo*, tendo, então, a necessidade de se utilizar cobaias para a realização dos testes toxicológicos, pois, dependendo da forma em que as NPs são administradas (via oral ou respiratório), as NPs podem seguir em rotas diferentes no organismo (WANG, 2010).

Para Wang (2010) as NPs ingeridas por meio da alimentação, permite a absorção pelo trato gastrointestinal, podendo ser eliminada pelas fezes quando não absorvidas. Ao serem absorvidas, entram na circulação sanguínea onde são distribuídas para os diferentes órgãos, tais como coração, fígado, rim, baço, medula óssea e músculo. Após passarem pelo fígado, as NPs podem retornar ao trato gastrointestinal e serem eliminadas pelas fezes e ao passarem pelos rins, podem ser eliminadas na urina.

Hoet et al., (2004) verificaram as possíveis interações e os principais pontos de entrada das nanopartículas no corpo humano, através de testes realizados em cobaias. Os autores observaram que, de acordo com o tamanho e as propriedades de superfície das partículas, os pulmões e intestinos são considerados os pontos de maior acesso. Em contrapartida, os autores concluíram que cada nanomaterial deve ser tratado individualmente, não existindo NPs universais. O comportamento dos diferentes tipos de NPs requerem pesquisas detalhadas e sugere, ainda, a criação de uma base de dados descrevendo os riscos associados à saúde (por exemplo, os órgãos-alvo, tecidos ou células).

Como a QS é um material de origem animal, encontrada nas cascas dos crustáceos, consequentemente faz parte da alimentação humana. Porém, apesar da possibilidade das NPs de QS não serem tóxicas e não causarem nenhum tipo de dano no organismo humano, assim como a QS, é de extrema importância realizar testes toxicológicos deste material, uma vez que na literatura informações sobre sua ação são escassos.

1.6 Descrições das principais técnicas utilizadas na caracterização das kafirinas.

Neste trabalho, as kafirinas extraídas do sorgo sacarino foram primeiramente caracterizadas por dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS/PAGE) e os estudos das estruturas secundárias (ES) foram realizados pelas técnicas espectroscópicas como o infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C em alta resolução no estado sólido. A quantificação das ES foi realizada pelo uso de um método de reconhecimento de padrões aplicado nos espectros obtidos na região do IV. Até o momento, não existem estudos sobre as ES das kafirinas utilizando este método, somente com métodos de aumento de resolução como segunda derivada e ajuste do sinal (DUODU et al., 2001; GAO et al., 2005). A principal vantagem da utilização desta técnica é que o operador não interfere na escolha de parâmetros como posição e número de picos. Todos os cálculos são feitos por uma matriz de calibração.

A SDS/PAGE tem sido muito utilizada para a caracterização das kafirinas (EL NOUR et al., 1998; NUNES et al., 2005; EMMAMBUX; TAYLOR, 2009). A SDS/PAGE é uma técnica analítica que separa moléculas por carga e tamanho. Muito utilizada na caracterização de proteínas, esta técnica revela tanto a massa relativa (M_r) quanto a abundância relativa desses compostos.

A separação ocorre pela migração das moléculas de proteína pelo gel de poliacrilamida quando uma diferença de potencial (tensão elétrica ΔV) é aplicada. Na eletroforese de proteínas utiliza-se o gel de poliacrilamida, o qual é formado pela copolimerização de acrilamida (molécula linear) e bis-acrilamida (molécula em formato de T), constituindo-se em uma rede porosa, cujo diâmetro dos poros depende da concentração de acrilamida. Dependendo da concentração utilizada os poros podem ser demasiados grandes ou apertados, o que dificultaria a separação de polipeptídios de baixa massa molecular ou alta massa molecular, respectivamente. Sendo assim, a concentração ideal de acrilamida no gel para a separação das kafirinas foi de 15%.

Neste trabalho, as kafirinas foram caracterizadas pela SDS/PAGE e os estudos estruturais foram realizados pelas técnicas descritas no item seguinte.

1.6.1 A Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

A espectroscopia na região do IV com transformada de Fourier é uma técnica vibracional utilizada para identificar um grupo funcional. A regra de seleção para o IV é tal que as vibrações moleculares serão observáveis quando gerarem uma alteração no momento de dipolo da molécula. As vibrações podem ser classificadas em deformações axiais ou

estiramento e deformações angulares. A absorção ocorre com o acoplamento entre o campo elétrico oscilante da vibração molecular e o da radiação incidente. A intensidade das bandas de absorção é dada normalmente em transmitância ou absorbância e a faixa de maior interesse para a espectroscopia se encontra na região de 4000 a 400 cm^{-1} (IV médio).

Esta técnica tem sido muito utilizada, pois é capaz de fornecer informações sobre as ES de proteínas. As informações sobre as ES são obtidas, principalmente, pela análise da absorção da banda de amida I (vibrações de estiramento da ligação C=O dos grupos peptídicos), pois a posição dessa absorção (1700-1600 cm^{-1}) é influenciada pelas ligações de hidrogênio dos grupos peptídicos e pela geometria da cadeia da proteína, indicando qual ES é predominante (BYLER; SUSI, 1986, SARVER; KRUEGER, 1991, FORATO et al., 1998, FORATO et al., 2003; MANSTCH; CHAPMAN, 2005). Nos espectros a absorção de amida I de uma proteína rica em hélices α é simétrica e centrada em 1656 cm^{-1} , e de uma proteína rica em folhas β ocorre entre 1620 e 1640 cm^{-1} (FORATO, 1996, FORATO, 2000). Entretanto, como o sinal é largo e bastante complexo devido às sobreposições das absorções de diferentes tipos de ES, o processo de quantificação a partir dos espectros de IV envolve o uso de métodos matemáticos.

Existem duas classes de métodos usados para a quantificação das ES: os de aumento de resolução e os de reconhecimento de padrões (MANSTCH; CHAPMAN, 1995; FORATO et al., 1998). Os métodos de aumento de resolução serão descritos no próximo item, pois a quantificação das ES por estes métodos foram realizados nos espectros obtidos pela técnica de RMN.

O método de reconhecimento de padrões baseia-se na obtenção de uma matriz de calibração pela correlação entre uma matriz de espectros no Infravermelho e as respectivas concentrações (frações conformacionais) das ESP (estrutura secundária das proteínas), determinadas a partir de dados de raios X pelos algoritmos de Kabsch & Sander (KS) e Levitt & Greer (LG) (FORATO et al., 1998; SARVER; KRUEGER, 1991). Os valores das ES da proteína em análise são obtidos pela multiplicação do espectro da proteína em estudo pela matriz de calibração. Este método quantitativo fornece resultados rápidos e sem interferência do operador (MANTSCH; CHAPAM, 1995, FORATO et al., 1998).

1.6.2 Análise das estruturas de proteína por RMN no estado sólido.

A espectroscopia de RMN é uma técnica que se baseia na interação da rádio frequência com núcleos atômicos sob influência de um campo magnético. Os núcleos atômicos observados são os que possuem momento magnético nuclear ou spin $\neq 0$, como os núcleos ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , entre outros. Os parâmetros espectrais da RMN estão relacionados

com o deslocamento químico, a constante de acoplamento spin-spin, o efeito Overhauser nuclear (NOE), os tempos de relaxação entre outros. Por este motivo, a RMN é uma técnica com aplicações variadas (GIL, 1987).

Dentre as aplicações da RMN, espectroscópicas e tomográficas (imagens), em análises químicas a RMN é mais utilizada sob forma de espectroscopia em alta resolução (solução ou estado sólido) e em baixa resolução. Nos experimentos de alta resolução o campo magnético (B_0) do espectrômetro é alto (entre 5 a 20 Teslas), que seria o equivalente a uma frequência de ressonância de 200 a 900 MHz para os núcleos de ^1H , baseados em ímãs supercondutores. O sinal de RMN gerado com a técnica pulsada, o decaimento livre induzido (FID, do inglês, Free Induction Decay), é processado com a técnica de Transformada de Fourier (TR) gerando um espectro no domínio da frequência de onde se obtém os valores dos deslocamentos químicos (RIBEIRO, 2009).

A RMN em estado sólido de alta resolução é considerada uma técnica importante, principalmente no estudo de sistemas biológicos, dos quais é possível obter informações sobre a dinâmica de proteínas bem como determinar suas ES (FORATO et al., 2003; BICUDO, 2005; DUODU et al., 2001). A principal técnica usada é a técnica de CPMAS (do inglês: Cross Polarization and Magic Angle Spinning) que fornece espectros de alta resolução em amostras no estado sólido. No entanto, a resolução espectral é bem menor que a observada nos espectros obtidos de amostras em solução, o que limita seu uso na determinação de estruturas de proteínas, sendo necessária a utilização de outras técnicas de quantificação (OPELLA; MACDONELL, 1993).

Em geral a determinação das ES é feita pela observação dos deslocamentos químicos dos carbonos da carbonila e dos carbonos α da proteína que são as principais regiões que contem informações sobre tais estruturas (PFEFFER; GERASIMOWICZ, 1989; KRICHELDORF; MULLER, 1984).

Proteínas que têm estrutura predominante hélice α apresentam deslocamento químico para o sinal de carbonila em aproximadamente 176 ppm; proteínas com predominância do tipo folhas β em 172 ppm e estruturas desordenadas em 174 ppm. Este efeito pode ser visualizado pela figura 10, onde são apresentados os espectros obtidos com a técnica de CPMAS para a concanavalina A e para a hemoglobina (ambas obtidas da Sigma Chemical). Essas duas proteínas são altamente conhecidas e têm estrutura tridimensional determinada por raios X. A concanavalina têm 65% de ES do tipo folhas β , e, a hemoglobina 84% de ES do tipo hélices α (BYLER, 1986). O espectro B da figura 10 é o da concanavalina e tem o sinal

da carbonila centrado em 172 ppm, já a hemoglobina (figura 10A) apresenta tal sinal em 177 ppm.

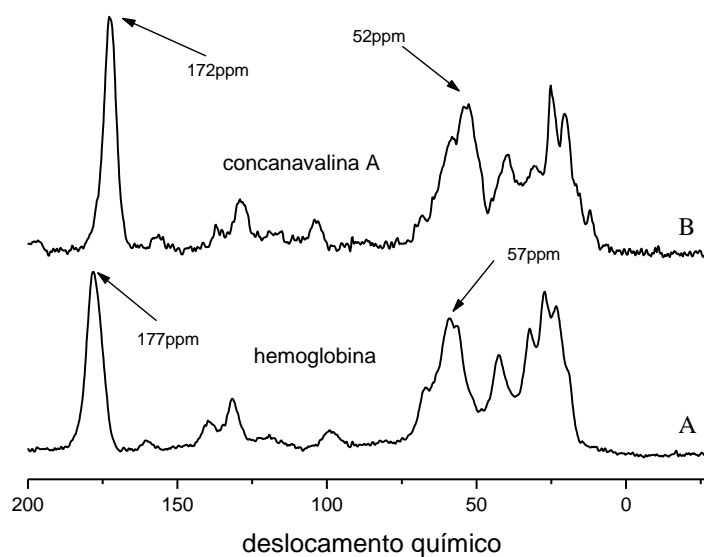


Figura 10: Espectros de RMN no estado sólido obtidos com a técnica de CPMAS. O espectro A é da hemoglobina e B: concanavalina A.

Além desta observação nos deslocamentos químicos da carbonila e do carbono α , indicando qual estrutura é predominante na proteína em estudo, neste trabalho foram utilizados, para quantificar as ES pela técnica de RMN, os métodos de aumento de resolução.

Os métodos de aumento de resolução consistem em determinar as proporções das ES através da separação dos picos que compõem a região da carbonila pelas técnicas de segunda derivada e ajuste do sinal, as áreas relativas de cada pico são calculadas nos fornecendo os valores que correspondem a cada ES (hélices α , folhas β e estruturas desordenadas).

A vantagem de se estudar as estruturas secundárias das proteínas por esta técnica é que não há necessidade de dissolver a proteína, podendo aproveitar a amostra depois da obtenção dos espectros.

1.7 Técnicas para avaliação das NPs de QS -TPP.

1.7.1 Potencial zeta.

Partículas coloidais em contato com um meio aquoso adquirem carga elétrica em sua superfície devido à adsorção e dessorção de íons. Com a presença dessas cargas de íons na superfície das partículas, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Essa dupla camada consiste numa região interna de contra-íons adsorvidos à

superfície e uma região mais externa denominada difusa onde os íons estão distribuídos aleatoriamente devido às forças eletrostáticas envolvidas.

Desta forma, os íons mais fortemente ligados a partícula se movem como uma unidade e o potencial do plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio líquido é chamado de potencial zeta. O potencial zeta pode ser usado para compreender e até mesmo controlar a estabilidade de suspensões coloidais.

1.7.2 Microscopia de Força Atômica (MFA).

Pertencente à família dos microscópios de varredura por sonda, a MFA permite gerar imagens topográficas das amostras em análise. O princípio básico de funcionamento da MFA é similar ao do microscópio de tunelamento (Scanning tunneling microscope – STM). As imagens são geradas através das forças de interação, atração ou repulsão, entre uma ponta ultrafina (chamada de sonda localizada na extremidade de uma haste flexível – o cantilever) e a superfície da amostra. Várias forças contribuem para a deflexão do cantilever, porém a força mais comumente associada à MFA são as forças eletrostáticas, para modo contato e van der Waals para modo de contato intermitente.

Durante a varredura, no modo contato intermitente, um feixe de laser é emitido sobre a superfície do cantilever onde existe uma parte espelhada que reflete a luz do laser incidente para uma lente transferindo-a para um detector de radiação formado por fotodiodos. O cantilever oscila com uma frequência próxima à frequência de ressonância. Em resposta à variação de força entre a sonda e a amostra, haverá uma mudança do valor da frequência de ressonância e a partir desta variação da frequência de vibração o microscópio de força atômica consegue gerar uma imagem topográfica da amostra, que pode ser observada em um computador.

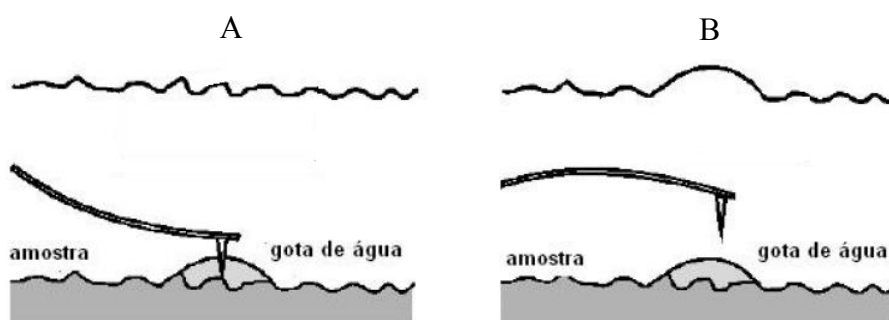


Figura 11: Esquema dos modos de operação do MFA. A) modo contato (repulsão) e B) modo não contato (atração).

No modo não contato, o cantilever vibra próximo a superfície da amostra e a sonda não entra em contato com amostra provocando uma interação atrativa. Entretanto, tal interação vai depender da distância existente entre a sonda e a superfície da amostra. A uma distância maior que 1 μm , a interação é quase nula. Neste sentido, para uma interação atrativa, a distância entre a sonda e a amostra tem que estar na ordem de 10 a 100 Å . Este modo é mais utilizado em amostras frágeis, porém também pode ser utilizado em amostras mais rígidas.

A técnica de MFA vem sendo muito utilizada em estudos de proteínas, DNA, bactérias, vírus, tecidos animais e vegetais e também em análise de materiais nanoparticulados. No caso de revestimentos comestíveis, esta técnica fornece informações sobre a topografia dos revestimentos diretamente aplicados na superfície dos alimentos. Através das imagens geradas por MFA, é possível saber se o revestimento é homogêneo ou rugoso e também visualizar a presença de poros em sua superfície. Estas informações são de extrema importância uma vez que a morfologia do revestimento aplicado na superfície do alimento influencia em sua preservação (BERNARDES-FILHO, 1998; HERRMANN, 1999; LAND et al., 1996; HALLET et al., 1996; SADAGOPAN et al., 2006).

1.8 Técnicas utilizadas para caracterização dos frutos revestidos.

1.8.1 Ângulo de Contato (AC).

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através da medida do chamado ângulo de contato θ . Este é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota de um determinado líquido depositada, como o auxílio de uma seringa, sobre a superfície de uma amostra, conforme esquematizado na figura 12.

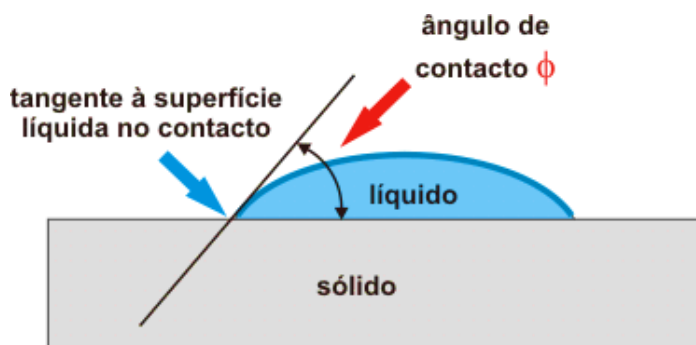


Figura 12: Ângulo de contato θ e molhabilidade.

A energia de interface sólido/líquido é resultado da interação entre a energia de superfície do sólido e a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor d'água existente entre eles. O conceito de energia de superfície pode ser mais facilmente compreendido usando um líquido como exemplo. Átomos e moléculas do líquido podem se mover livremente procurando ocupar uma posição de menor energia potencial. Ou seja, um lugar onde eles e as forças (atrativas e repulsivas) agindo em todas as direções estejam em equilíbrio. Por outro lado, as partículas na superfície do material experimentam apenas forças dirigidas para dentro do líquido. Devido a isto, as superfícies são sempre regiões de maior energia e é justamente a diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do material que se denomina energia de superfície ou tensão interfacial.

De acordo com o princípio da menor energia, a natureza tende sempre a um estado de mínima energia. É por esta razão, por exemplo, que uma gota de água tende à forma esférica, pois esta é a forma geométrica de mesmo volume com a menor área superficial. Da mesma forma, a adesão de um material sobre outro será tanto melhor quando maiores forem às energias de superfícies envolvidas.

O AC 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. O 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 (MUTHUSELVI; DHATHATHREYAN, 2006).

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. Inúmeras aplicações podem ser relatadas relativas à utilização do conhecimento e controle do ângulo de contato e, portanto, do molhamento de superfícies (TORRES et al., 2005).

1.8.2 Texturômetro.

A textura de um alimento é um parâmetro de qualidade importante na aceitabilidade do produto por parte do consumidor, pois, tal como a cor, encontra-se associado à boa qualidade do alimento. Durante o amadurecimento, a fruta perde a integridade da parede celular promovendo a diminuição da firmeza (amolecimento da poupa) pela degradação enzimática das moléculas constituintes da parede celular (GUEDES, 2007).

Para a avaliação da textura em frutas, o processo consiste em analisar características como a dureza (mole, firme ou duro) e gomosidade (viscosidade). Para Chitarra (1998) estas características estão definidas como um conjunto de propriedades do alimento, compostas por

características físicas perceptíveis pelo tato e que se relacionam com a deformação e desintegração do alimento quando aplicado uma força.

O texturômetro, trata-se de um equipamento de bancada constituído por um braço que se desloca na vertical (para cima e para baixo) em direção ao alimento. Acoplado a este braço está a sonda e junto a sonda o probe que dependendo do tipo de análise e de amostra, são encontrados em diferentes formas (cilíndrico, cônico, esférico, agulha).

O ensaio de textura permite mensurar as características mecânicas das frutas e garante que o experimento seja feito de maneira repetitiva e precisa, eliminando os aspectos subjetivos de análises sensoriais humanas. O texturômetro mede a força (N) de compressão ou estiramento de maneira constante, caracterizando a amostra através de um registro gráfico, gerado por um computador com o auxílio de um “software” que mostra a força empregada ao longo da análise.

1.8.3 Colorimetria.

A colorimetria tem sido muito utilizada para classifica a cor de diferentes pigmentos encontrados nos alimentos. Estudos tem demonstrados que a cor é um dos principais critérios de avaliação quanto à maturação das frutas, além de ser um fator decisivo para a escolha do produto na hora da compra (TREPTOW et al., 1995; LIMA et al., 2005).

As diferentes cores observadas podem ser descritas por três variáveis: Hue, Chroma (saturação). O ângulo de Hue (matiz) é o termo usado para distinguir a diferença entre cores isoladas, por exemplo, vermelho, verde, roxo, bege, etc. O número total de cores que podem ser distinguidos é muito grande, mas destes, apenas quatro são únicos. Trata-se de vermelho, amarelo, verde e azul. O Chroma é a segunda diferença entre duas cores de uma mesma matriz. Referente à saturação, é ele que revela a quantidade de tonalidades observada indicando se ela é mais intensa ou mais saturada. A terceira diferença é o brilho. A cor pode variar em muito claro ou muito brilhante.

Sendo assim, hoje é possível descrever numericamente a diferença das cores, através do sistema CIELAB ($L^*a^*b^*$) estabelecido pela CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) em 1976. Por este sistema, uma cor tem uma única localização específica numericamente em um espaço tridimensional esférico, definido por três eixos perpendiculares como ilustrado na figura 13.

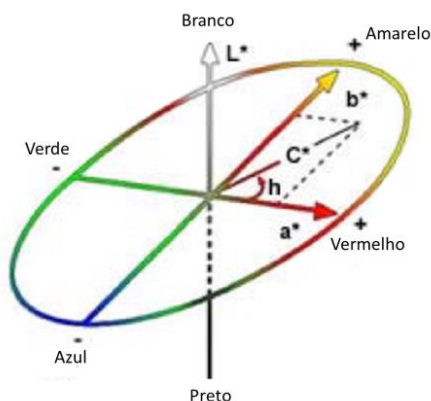


Figura 13: Parâmetros do sistema de cores da CIELAB⁶.

O eixo L* (luminosidade) varia do preto (0) ao branco (100); o eixo a*, do verde (-a) ao vermelho (+a) e o eixo b*, do azul (-b) ao amarelo (+b). Através de cálculos combinando estes três eixos, é possível verificar e avaliar a cor de uma fruta ao longo do tempo pós-colheita.

1.9 Testes toxicológicos realizados em cobaias.

Para avaliar os possíveis efeitos do revestimento comestível desenvolvido neste trabalho, após o tratamento de ratos alimentados com a ração revestida, alguns parâmetros foram analisados como: o consumo de água e ingestão de ração; excreção de fezes e urina; parâmetros biométricos (massa corporal e massa dos órgãos coletados após o sacrifício), parâmetros bioquímicos e parâmetros biomecânicos e biofísicos dos ossos. Para a coleta de dados dos parâmetros biomecânicos e biofísicos, as técnicas utilizadas foram: densitometria óssea; microtomografia de raios-X (μ CT) e ensaio mecânico de flexão a três pontos. A seguir será apresentada uma breve introdução sobre estas técnicas.

1.9.1 Densitometria óssea (DMO).

A DMO é um método muito utilizado para avaliar o conteúdo mineral ósseo (CMO) e a densidade mineral óssea (DMO) sem que o material (osso) seja destruído.

Esta técnica se baseia na propriedade física do osso em absorver fótons. Através de um tubo de raios X, são gerados dois feixes de radiação que ao ser projetado no osso, o feixe de menor energia penetra nos tecidos moles e o feixe de maior energia penetra tanto nos tecidos moles circundantes quanto no tecido ósseo. Os feixes de raios X são absorvidos parcialmente pelos tecidos, a quantidade de radiação absorvida é avaliada por um detector e um programa computacional segmenta a área para a quantificação dos valores obtidos.

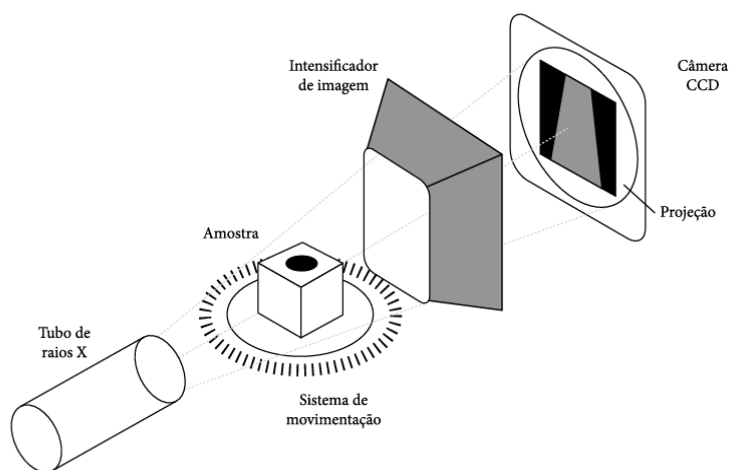
⁶ <http://www.athloneextrusions.ie/colour/observer.html>

O CMO é a quantidade de todos os minerais presentes no osso e unidade utilizada é grama (g). Já a DMO é obtido pela divisão do CMO pela área e sua unidade de medida é o (g/cm^2). Os valores obtidos de atenuação são comparados em massa mineral óssea através da comparação com os dados utilizados para a calibração do aparelho.

1.9.2 Microtomografia de Raios X (μCT).

A μCT é uma das mais avançadas técnicas de análise não destrutiva que possibilita a obtenção de imagens de alta resolução (na escala micrométrica) de centenas de seções transversais de um objeto, ou seja, divide virtualmente o objeto de estudo em fatias (tomos) nas quais são mapeados parâmetros físicos como densidade e a porosidade de cada região interna que são apresentadas na forma de imagens 2D e 3D (LASSO et al., 2008; MAYO et al., 2010). Mais que uma simples chapa radiográfica, a μCT baseia-se na propriedade dos materiais em absorverem radiação de forma diferenciada dependendo de sua composição química e densidade.

Esta técnica fundamenta-se na atenuação de feixes raios X que, ao atravessar um objeto em análise em diversos ângulos, possibilita a reconstrução da sua estrutura interna. No processamento da microtomográfica, representado na figura 14, os raios X emitidos pela fonte (tubo de raios X) atravessam a amostra, a radiação não atenuada é captada por um intensificador de imagens e, em seguida, por um detector (câmera CCD).



Fonte: Belini *et al.*.

Figura 14: Componentes básicos do μCT mostrando o tubo de raio X, posicionamento da amostra em um sistema de rotação posicionada dentro da câmara de irradiação, intensificador de imagem e câmera utilizada para coletar a projeção da imagem (adaptado de BELINI et al., 2011).

Para a obtenção da imagem, a radiação é produzida artificialmente por meio da aceleração de elétrons. Os feixes de raios X, ao passar pela amostra, são atenuados (redução de intensidade de um feixe conforme ele atravessa o material) em intensidades distintas e coletadas por um detector (câmera). Neste caso, pode ocorrer absorção da radiação pelo meio, ou dispersão do feixe. Com os dados adquiridos das projeções de raios X na amostra, é feita uma reconstrução matemática para produção de cortes transversais, perpendiculares à dimensão axial do material analisado, gerando informações de forma quantitativas e mais próximas do real. Com isso, a μ CT é considerada uma técnica com maior precisão quando comparada com a tomográfica denominada linear.

1.9.3 Ensaio Mecânico de Flexão a três pontos.

Esta técnica é muito utilizada para medir a resistência mecânica do osso. Para medidas em fêmur, suas extremidades ficam apoiadas em dois cilindros com diâmetro de 3,0mm, suportados por um apoio. A distância que separa os dois cilindros é de 21,7mm. Através de uma haste cilíndrica com o rolete de 3,0 mm fixada a uma extremidade, uma força é aplicada perpendicular ao eixo longitudinal do osso bem no meio entre dos apoios que compõem os roletes. A capacidade máxima de força aplicada por uma célula de carga chamada de Instron é de 1kN.

As informações obtidas por esta técnica são: força máxima, que corresponde a maior força suportada pela amostra durante o ensaio; deslocamento na carga máxima (deformação) é a distância percorrida pela haste durante o ensaio no equipamento; força de fratura corresponde à força aplicada no momento da fratura da amostra; deslocamento da fratura, resiliência representa a energia absorvida pelo tecido ósseo durante a fase elástica, ou seja, a energia que a amostra suporta sem sofrer deformação (dada em força x deformação), tenacidade é a energia necessária para promover a ruptura do material e a rigidez que representa a capacidade em resistir à deformação. A rigidez é determinada por meio da inclinação da reta (T) ajustada aos pontos da curva.

O objetivo desta tese foi desenvolver revestimentos comestíveis a base de kafirinas, contendo nanopartículas de quitosana e avaliá-los quanto à sua toxicidade. Ainda realizou-se a avaliação estrutural das kafirinas, visto que há poucos estudos sobre seu uso para obtenção de revestimentos e no caso de suas estruturas, a maioria dos trabalhos tem se baseado nos modelos das zeínas.

2.1 Objetivos específicos.

- ✓ 2.1.1 extrair e caracterizar as kafirinas por SDS/PAGE a partir do sorgo sacarino BR501 (branco livre de taninos);
- ✓ 2.1.2 analisar as estruturas secundárias das kafirinas extraídas por FTIR e RMN no estado sólido;
- ✓ 2.2 preparar soluções filmogênicas a base de kafirinas com adição de plastificante (óleo de canola);
- ✓ 2.2.1 incorporar aos revestimentos nanopartículas de quitosana;
- ✓ 2.2.2 revestir peras e maçãs com as soluções filmogênicas obtidas para verificar o possível aumento do tempo de prateleira das mesmas com as técnicas de perda de massa, colorimetria e textura.
- ✓ 2.2.2 avaliar o desempenho dos revestimentos quanto à sua molhabilidade pela técnica de ângulo de contato (AC) e caracterizá-los pelas imagens topográficas obtidas pela microscopia de força atômica (MFA) e cálculo de rugosidade das mesmas;
- ✓ 2.3 avaliar as propriedades toxicológicas dos filmes por ensaios “*in vivo*” em ratos machos da espécie Wistars.

3.1 Procedimentos para obtenção das amostras.

Para a extração das kafirinas, inicialmente utilizou-se a mesma metodologia usada para extrair as zeínas, proteínas de reserva do milho, já que as mesmas apresentam características semelhantes. Contudo, este procedimento teve que ser modificado devido ao baixo rendimento e co-extração de amido junto com a fração proteica. Os grãos de sorgo sacarino BR 501 (branco) sem taninos foram fornecidos pelo Dr. Jose Avelino Santos Rodrigues, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas. A seguir, serão apresentados os dois métodos de extração das kafirinas.

3.1.1 Métodos para a extração das kafirinas.

A metodologia utilizada inicialmente para a purificação das kafirinas foi baseada em um estudo semelhante ao realizado por Forato et al., (2000); Forato et al., (2003). O procedimento consistiu em primeiramente, após a moagem dos grãos de sorgo, extrair o óleo em extrator soxhlet, com hexano, por 48 horas. A seguir a farinha de sorgo foi agitada em solução aquosa com NaCl 1,25mol/L para remoção das albuminas e globulinas. Após 6 horas sob agitação, o conteúdo foi filtrado a vácuo e a massa residual foi agitada em solução de etanol 70% por 24 horas para a solubilização das kafirinas. O etanol foi rotaevaporado e o precipitado foi congelado e liofilizado. Na figura 15 está apresentado o primeiro esquema utilizado para a purificação das kafirinas.

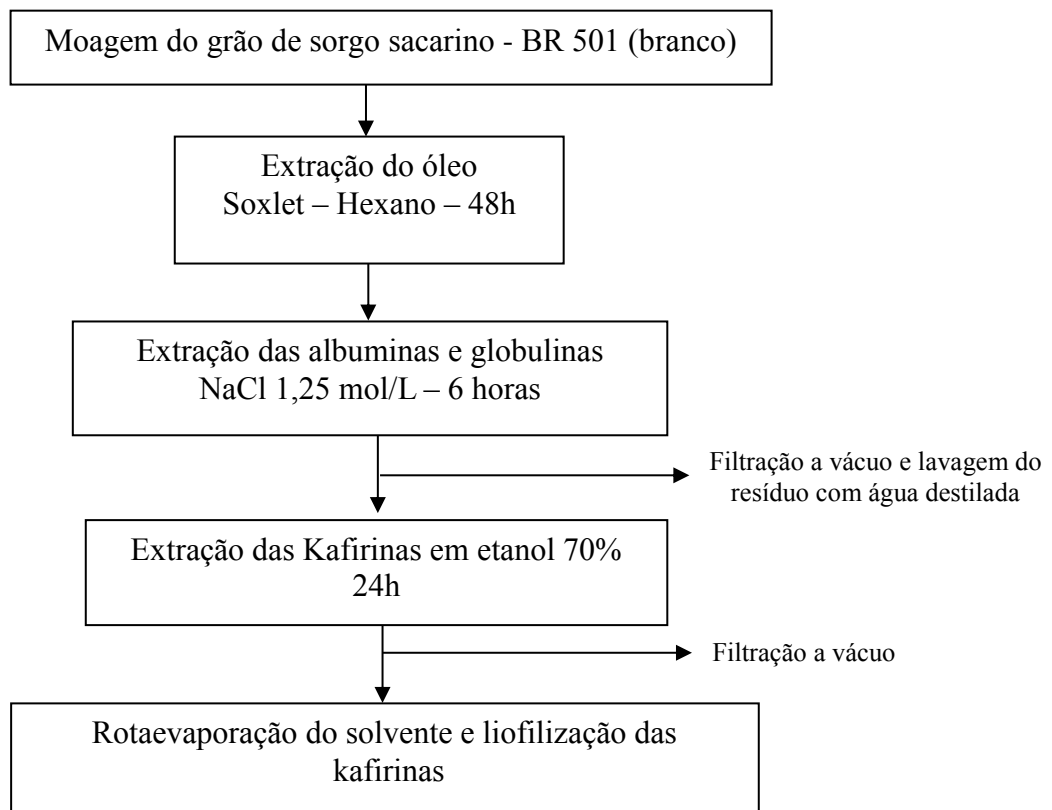


Figura 15: Primeiro método proposto de extração das Kafirinas a partir do sorgo sacarino BR 501 (branco).

Este procedimento foi modificado, pois além da co-extração do amido, as kafirinas tendem a formar aglomerados entre si por meio de ligações de dissulfeto e também através de ligações hidrofóbicas (NUNES, 2000). Na presença do agente redutor, as ligações de dissulfeto são quebradas e os monômeros liberados. Assim, foi necessária a adição de um agente redutor.

Além do agente redutor modificou-se o tempo de extração com solventes visto na literatura que este parâmetro não influencia diretamente na purificação das Kafirinas (PARK; BEAN, 2003). Assim, as melhores condições para a extração das proteínas do sorgo encontradas foram: 1, 25 mol/L de NaCl e 100 mMol/L de bissulfito de sódio, como mostra o esquema apresentado na figura 16.

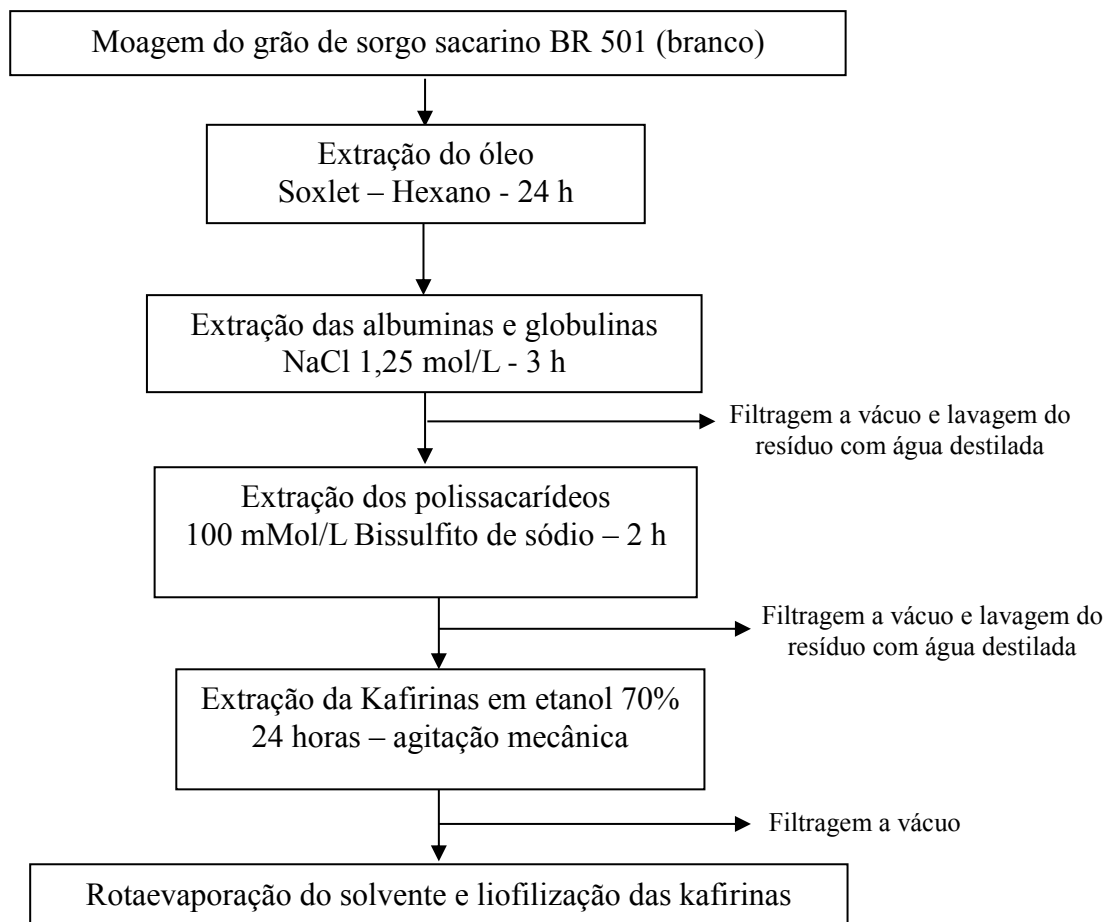


Figura 16: Método de extração das kafirinas modificado. Procedimento realizado com agente redutor, bissulfito de sódio.

Os ácidos graxos presentes nas amostras de kafirinas obtidas pelos dois métodos de extrações proposto foram extraídos também com clorofórmio. A extração foi realizada sob agitação da farinha de sorgo com clorofórmio, durante 2 horas, após a extração do óleo com hexano.

3.1.2 Obtenção das nanopartículas de quitosana (NPs QS-TPP).

As nanopartículas de quitosana foram obtidas pelo método de gelificação iônica de acordo com o procedimento proposto por Aouada, 2009. Na primeira etapa, solubilizou-se 420 mg de quitosana em solução de ácido acético 1% durante 8 horas. Após esse período, a solução foi colocada em um homogenizador sob agitação de 4500 rpm. Com o auxílio de uma seringa, a solução de tripolifosfato de sódio (TPP), 43 mL de água destilada com 67,2 mg de TPP, foi adicionada aos 107 mL de solução de quitosana sob agitação. A taxa de adição da solução de TPP foi de 1mL/min. A zona de suspensão que apareceu após a adição do TPP, foi atribuída as NPs formadas.

3.1.3 Preparação das soluções filmogênicas de Kafirinas com e sem NPs de QS e plastificante.

As kafirinas utilizadas para a preparação dos filmes foram extraídas com 100 mMol de bissulfito de sódio . As soluções filmogênicas de kafirinas foram preparadas com e sem NPs de QS. A concentração de kafirinas para todas as soluções foi de 2% (m/m) onde variou-se as concentrações de plastificante, o óleo de canola (OC) comercial da marca Liza em 0,10; 0,25 e 0,5% (m/m). Sob agitação magnética, em temperatura ambiente, as kafirinas foram dissolvidas em etanol 70% e então o plastificante foi adicionado. O mesmo procedimento foi realizado para soluções filmogênicas de Kafirinas contendo NPs de QS. A concentração das NPs utilizadas foi de 0,1% (m/m) também para todas as soluções.

3.1.4 Revestimento das frutas com as soluções filmogênicas.

As frutas revestidas neste trabalho foram maçãs do tipo Gala e peras Willians fornecidas pela CEAGESP (Centro de Abastecimento Geral de São Paulo) unidade de Araraquara – SP, onde frutas estavam armazenadas em caixas de papelão à 3°C. Primeiramente as frutas foram lavadas com água e sabão neutro. O processo de revestimento foi realizado por imersão das frutas na solução filmogênica por 5s. Após o revestimento, as frutas foram secas e armazenadas em bandejas em temperatura ambiente para a realização dos testes de perda de massa, colorimetria, texturômetro, ângulo de contato e obtenção das imagens topográficas do revestimento depositado no epicarpo por microscopia de força atômica.

3.2 Técnicas utilizadas na caracterização das kafirinas.

3.2.1 Caracterização das Kafirinas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE.

A eletroforese foi realizada de acordo com a descrição de Kellner et al., 1994, em gel de poliacrilamida a 15%. As amostras analisadas foram dissolvidas em etanol 70%, na concentração de 7,5 mg/mL. Em cada poço foram aplicados 3 µL de cada amostra. O gel foi corado com o corante *Comassie Blue*. O padrão de massa molecular utilizado foi o BenchMark Protein Ladder Cat. N°. 10747-012 da marca invitrogen.

3.2.2 Análise das kafirinas pela espectroscopia na região do infravermelho (IV) por transformada de Fourier (FTIR).

As amostras liofilizadas foram preparadas sob forma de pastilhas de KBr nas proporções de 1 mg de proteína para 100 mg de KBr. Para as análises por espectroscopia no

IV foi utilizado um espectrômetro de FTIR Perkin Elmer modelo Paragon 1000. Os espectros foram adquiridos na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.3 Cálculo das Estruturas Secundárias (ES).

As ES foram calculadas por um método de reconhecimento de padrões. (FORATO et al., 1998). Para isso, foi feita uma correção na linha de base do espectro na região de 2100-900 cm^{-1} e a normalização na região de 1800-1200 cm^{-1} . A normalização se dá pela divisão de cada ponto dos valores das absorvâncias pela somatória dos pontos de toda a região. O resultado final foi multiplicado por 100. Após estes ajustes, a região de 1800-1600 cm^{-1} , região que corresponde à banda de amida I, foi selecionada para ser multiplicada pela matriz de calibração. Os resultados das seguintes estruturas: α hélices, folhas β , voltas e outras estruturas foram expressas em porcentagem. A absorvância da amida I também foi analisada pelo método de aumento de resolução baseado na segunda derivada, onde foi possível observar as posições dos picos e relacioná-los com as ES das proteínas.

3.2.4 Análises das Kafirinas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

O espectrômetro de RMN utilizado foi um Varian, modelo Inova 400, campo de 9,4 T. Foram obtidos espectros de RMN ^{13}C em estado sólido com a técnica de polarização cruzada, rotação da amostra no ângulo mágico e desacoplamento de alta potência, conhecida como CPMAS. Usou-se um pulso de $\pi/2$ de 4 μs , tempo de contato de 1ms, 16384 pontos, tempo de repetição de 3s, desacoplador com banda de 60 KHz e janela espectral de 40 KHz. As amostras foram empacotadas em rotores de zircônia de 5 mm e submetidas a uma rotação no ângulo mágico de 10 KHz. Foram obtidos 2048 transientes e os espectros foram filtrados com função de decaimento exponencial ($lb = 20$).

3.3 Técnicas utilizadas na caracterização das NPS de QS-TPP.

3.3.1 Análise das NPs de quitosana pelo potencial zeta.

O tamanho das NPs de QS foi estimado pela utilização do equipamento de modelo Malvern Instruments – Zetasizer Nano ZS90. As análises foram realizadas diluindo-se (1/10 v/v) da suspensão de NPs em água Milli-Q a 25°C. O valor do potencial zeta em mV foi adquirido pelo mesmo equipamento descrito, sendo os resultados expressos como média de 10 leituras.

3.3.2 Microscopia de Força Atômica (MFA).

Para a obtenção de imagens de NPs de QS-TPP, a amostra foi preparada da seguinte maneira: emersão do substrato (mica) na suspensão contendo as NPs de QS-TPP; depois de duas horas a mica foi lavada com água destilada para retirar o excesso de NPs. Após a secagem em temperatura ambiente, as imagens de MFA foram realizadas.

A varredura do cantiléver sob a amostra foi realizada no modo contato intermitente (Tapping). As medidas foram realizadas pelo equipamento modelo Microscópio Veeco Dimension V. A ponta (cantiléver) utilizado foi da nanossensor modelo pppNCST com uma frequência de ressonância em torno de 140 kHz.

3.4 Descrições das técnicas utilizadas para a caracterização dos revestimentos comestíveis.

3.4.1 Perda de massa.

Para análise de perda de massa, foram utilizadas 24 peras e 24 maçãs sendo que as medidas foram realizadas em triplicata. As frutas foram pesadas diariamente durante o tempo de duração do experimento. Os valores das perdas de massa foram determinados em gramas com o auxílio de uma balança semi-analítica. Utilizou-se a média de três frutas de cada revestimento para a obtenção das médias por dia, onde os resultados foram expressos em porcentagem, considerando a diferença entre a massa inicial e a massa obtida em cada intervalo de tempo.

A porcentagem da perda de massa foi calculada por meio da seguinte equação matemática:

$$\%PM = [(MI-MF)/MI] \times 100$$

Onde:

%PM = porcentagem da perda de massa.

MI = massa inicial da amostra em um período, em gramas (g).

MF = massa final da amostra no período seguinte a MI, em gramas (g).

3.4.2 Análise dos revestimentos por Ângulo de contato (AC).

As medidas de AC foram realizadas pela deposição de uma gota de água deionizada (~3µL) com o auxílio de uma seringa sobre a superfície do epicarpo das frutas, maçãs e peras, revestido com as diferentes soluções filmogênicas preparadas. As imagens foram captadas por uma câmera eletrônica em 30, 60, 120 e 150 segundos e o ângulo θ formado na superfície foi

calculado pelo software FTA32 Image Software (First Ten Ångstroms) utilizando o equipamento CAN101 da KSV Instruments. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

3.4.3 Microscopia de Força Atômica (MFA).

A MFA foi utilizada para determinar a morfologia dos revestimentos depositados sobre a superfície das frutas. Esta técnica fornece dados da topografia da superfície dos revestimentos, indicando a presença de defeito, como rugosidade e a presença de poros. Para a obtenção das imagens, os filmes com e sem NPs foram depositados no pericarpo das frutas e após a secagem em temperatura ambiente, o procedimento realizado e o equipamento utilizado foi igual ao descrito no item 3.3.2, para a obtenção de imagens das NPs de QS-TPP.

3.4.4 Análise da textura da casca e polpa pelo texturômetro.

Para a realização dos testes mecânicos de resistência à perfuração nas maçãs e peras com e sem revestimento, as medidas foram realizadas com o auxílio do equipamento texturômetro de marca Stable Micro Systems (TA.TX Express). Para a calibração do equipamento foi utilizado uma célula de carga de 5 Kg. O corpo de prova utilizado foi uma sonda (probe) cilíndrica de aço inoxidável com diâmetro de 4 mm (modelo p/4). Esta sonda foi fixada a uma base e durante a realização dos ensaios o probe era movimentado, de cima para baixo, a uma velocidade de 1,0 mm/s. Foram realizadas 3 medidas de 10 mm de perfuração para casca e na polpa de cada fruta em análise.

3.4.5 Determinação da cor do epicarpo das frutas pelo método colorimétrico.

A cor do epicarpo das frutas em análise foi determinado de acordo com os parâmetros CIELab, onde os valores de L^* (luminosidade), a^* (intensidade de vermelho e verde) e b^* (intensidade de amarelo e azul) foram determinados pelo equipamento Chroma Meter CR-400/410 (Konica Minolta, japonês). Os valores de L^* , a^* e b^* matematicamente combinados permitem calcular as razões a^*/b^* e $(a^*/b^*)^2$. O ângulo Hue e Chroma foram calculados segundo as equações (ARIAS et al., 2000):

$$\text{hue} = \tan^{-1}(b^*/a^*), \text{ quando } a^* > 0 \text{ e } b^* = 0$$

$$\text{hue} = 180 + \tan^{-1}(b^*/a^*), \text{ quando } a^* < 0$$

Os parâmetros de cor foram quantificados durante o tempo de duração do experimento. Para peras as medidas foram realizadas todos os dias até o término do experimento, já para maçãs os dados foram coletados dia sim dia não. Para ambas as amostras, as análises foram realizadas em triplicata.

3.5 Teste Microbiano.

A atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas contendo NPs de QS foi testada pelo método de difusão em ágar, que se baseia na determinação dos halos de inibição do crescimento microbiano. Para a realização deste, os meios de cultura utilizados foram o Caldo Müller Hinton para a preparação do meio líquido e o Agar Müller Hinton para o meio sólido, ambos em composição padrão descrita no frasco. Estes foram aquecidos até a total homogeneização e posteriormente autoclavados. O meio líquido foi então inoculado com *E.coli* onde permaneceu sob agitação de 120 rpm à 37° C, over night e o meio sólido foi vertido nas placas de Petri já autoclavadas. A superfície de meio de cultura sólido contido nas placas foi previamente inoculada com o microrganismo e os poços foram preenchidos com as soluções filmogênicas. Após 8 horas de incubação, os halos formados foram medidos com o auxílio de um paquímetro.

3.6 Testes toxicológicos.

3.6.1 Preparação da ração.

A ração utilizada na alimentação dos ratos durante o período de experimento foi da marca Premier obtida no comércio local da cidade de São Carlos. Para o revestimento da ração, a mesma foi triturada por um moinho de três facas. O farelo da ração foi então revestido com a solução filmogênica contendo 2% de kafirinas solubilizadas em etanol 70% contendo 0,25% de óleo de canola (OC) e 0,1% de NPs de QS. Para cada 2 Kg de farelo de ração foram utilizados 500 mL de solução filmogênica.

3.6.2 Protocolo experimental para a realização dos testes toxicológicos.

As análises toxicológicas foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos no Departamento de Ciências Fisiológicas no laboratório de Neuroendocrinologia em colaboração com a Profa. Dra. Keico Okino Nonaka. Foram utilizados para a realização dos testes, 2 grupos (10 controle e 10 experimental) total de 20 animais (ratos) da variedade Wistar machos com 3 meses de idade, obtidos pelo Biotério Central da Universidade. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas no biotério deste laboratório

em um regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e em temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para quantificar o consumo de ração, ingestão hídrica bem como realizar a coleta das fezes e urina. As fezes foram pesadas e o volume de urina quantificado. O grupo controle foi alimentado com água natural e ração normal triturada. O grupo experimental foi alimentado com água natural e ração revestida com a solução filmogênica descrita no item 3.5.1. Uma vez por semana os ratos eram pesados para a obtenção dos valores referente à massa corporal.

Após os 30 dias de experimento, os animais foram sacrificados. No dia do sacrifício, foram coletados os órgãos (rins, baço, fígado, coração, testículos, próstatas e vesícula seminal) e os mesmo foram pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . Alguns ossos como vértebras (L3, L4 e L6), fêmur (direito e esquerdo) e tíbia (direita e esquerda) também foram coletados, dissecados e congelados à -20°C para a realização dos ensaios mecânicos, microtomografia e densitometria. A coleta do sangue foi realizada assim que os ratos foram sacrificados, o mesmo foi centrifugado para a obtenção do soro. Os parâmetros bioquímicos foram obtidos pelo laudo elaborado pelo laboratório Maricondi da cidade de São Carlos. Este protocolo experimental com cobaias foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de São Carlos. Protocolo nº 078/2012 (em anexo).

Os parâmetros analisados foram:

- ingestão hídrica e consumo de ração;
- excreção de fezes e urina;
- parâmetros biométricos (massa corporal e massa dos órgãos);
- parâmetros bioquímicos (triglicérides, glicose, colesterol, TGO e TGP, creatinina, fosfatase alcalina, Fósforo e Cálcio e bilirrubinas totais e frações).
- parâmetros biomecânicos dos ossos (ensaio mecânico de flexão a três pontos);
- parâmetros biofísicos (DMO e μCT);

As técnicas utilizadas para a obtenção dos dados biomecânicos e biofísicos serão descritas a seguir.

3.6.3 Densitometria óssea (DMO).

As análises de densitometria foram realizadas no laboratório da UNESP de Araçatuba em fêmures e tíbias. O equipamento utilizado foi da marca LUNAR modelo DPX ALPHA Software: Versão 4.7 específico para pequenos animais.

3.6.4 Microtomografia de raios X (μ CT).

Para a obtenção das microtomografias das vértebras (L3) foi utilizado um Microtomógrafo de raios-X, de fabricação da Skay Scan, modelo 1172, localizado no laboratório de técnicas nucleares da Embrapa Instrumentação. No processo de aquisição das imagens foram adotados os seguintes parâmetros: filtro de alumínio, resolução espacial (tamanho do coxel) de 12 μ m, passo de rotação de 0,4°, rotação de 180° e 8 quadros (frames) para processo de média (averaging). O processo de reconstrução de imagens dos cortes tomográficos foi realizado por meio do software NRecon da SkyScan no qual foram adotados os seguintes parâmetros: smoothing: 5, ring artifact: 5 e beam hardening correction: 60%.

3.6.5 Ensaio mecânico de flexão por três pontos.

Para o teste de flexão por três pontos realizado no fêmur direito, a metodologia utilizada foi à mesma relatada por Wand, 2010. Os ensaios foram realizados pelo equipamento Instron Series IX. A carga utilizada foi de 5N e a velocidade constante de haste cilíndrica foi de 5 mm/min até o momento de ruptura do osso.

3.6.6 Análise Estatística.

Os resultados de toxicidade foram comparados entre o grupo controle e experimental pela análise da variância ANOVA seguido do teste t de Student aplicados pelo software Oringin. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.1 Extração e Caracterização das Kafirinas.

Como já mencionado neste texto, as kafirinas são solúveis apenas em solução alcoólica e dependendo da fração é necessário o uso de agente redutor. A kafirina γ , por exemplo, assim como a zeína γ , é solúvel em água na presença de agentes redutores de ligações de dissulfeto, como o bissulfito de sódio.

Para a obtenção de todas as frações de kafirinas, α , β e γ , a variedade de sorgo utilizada nas extrações foi o sorgo sacarino BR 501 (branco) livre de taninos. As kafirinas foram então extraídas pelos dois métodos descritos no item 3.1.1 e após a extração foram caracterizadas. A seguir serão apresentados os resultados das análises realizadas para caracterizar as kafirinas.

4.2 Análise das Kafirinas por Eletroforese.

A composição proteica das kafirinas foi caracterizada por SDS/PAGE. Na figura 17 é apresentado o gel com os padrões eletroforéticos revelados com azul de Comassie das proteínas extraídas com etanol 70% com e sem agente redutor. Pelo cálculo de massa relativa (M_r) pode-se observar, no poço 1 (sem agente redutor), duas bandas principais, uma banda mais intensa em 17 KDa referente à Kafirina β e uma região que se estende de 25 a 26 KDa referente às Kafirinas $\alpha+\gamma$ com baixa resolução. Este mesmo resultado foi observado por El Nour et al., 1998, no qual os autores extraíram todas as frações das kafirinas sem uso de agente redutor. Segundo os autores, a presença da fração β kafirina, que embora possua resíduos de cisteína e deva formar ligações de dissulfeto, se deve por ela estar presente em sua forma monomérica e, portanto passível de extração sem o uso de agente redutor.

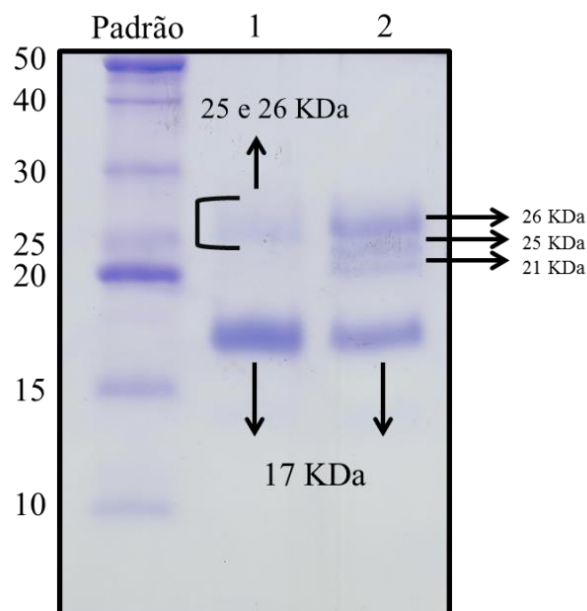


Figura 17: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% das Kafirinas extraídas do cultivar Br 501 (branco) sem taninos. O poço 1 contém as kafirinas extraídas sem agente redutor e no poço 2 contém as kafirinas extraídas com agente redutor.

No segundo poço (com agente redutor) foram reveladas 4 bandas principais. Novamente foi observado uma banda na região de 17 KDa, referente à Kafirina β . As outras 3 bandas em 21, 25 e 26 KDa correspondem às kafirinas α_2 , α_1 e γ , respectivamente. Este comportamento está de acordo com resultados encontrados na literatura. Segundo Belton et al. (2006) as Kafirinas α apresentam Mr de 23 e 25 KDa, a Kafirina β foi identificada com valores de Mr entre 15, 17 e 18 KDa e a Kafirina γ foi observada no gel de SDS/PAGE com Mr de 28 KDa. Entretanto, há controvérsias em relação à Mr das Kafirinas. Alguns autores como Byaruhanga et al. (2006) identificaram as kafirinas α_2 , α_1 e γ com Mr de 22, 24 e 26 KDa, respectivamente e de 18 KDa para as kafirinas β . Esta diferença entre as Mr encontradas dentro da classe das Kafirinas pode estar relacionada com o tipo de cultivar utilizado e também o modo de extração.

Com o surgimento das bandas de Kafirinas α_2 , α_1 e γ separadamente a banda que corresponde à Kafirina β apresentou uma diminuição na intensidade, o que indica uma menor proporção desta em relação às outras frações, como é esperado. Estes resultados indicam que o agente redutor age na despolimerização das proteínas (ruptura das ligações de dissulfeto S-S) liberando os seus monômeros. Isto ocorre, pois as kafirinas β e γ apresentam uma forte tendência a formarem ligações de dissulfeto com outras proteínas ou entre si devido à presença do resíduo de aminoácido cisteína em suas sequências, os quais possuem um grupo tiol (-SH) ligado a um átomo de carbono, responsável pela ligação de dissulfeto S-S. Dentre os 172 resíduos de aminoácidos, 10 são de cisteína na β -kafirina e 15 dentre os 193 resíduos

na γ -Kafirina (BELTON et al., 2006).

Embora outros autores tenham observado a presença de oligômeros em géis de SDS/PAGE de kafirinas, isto não foi observado neste trabalho. Segundo Nunes et al., (2005) a presença de oligômeros é altamente dependente da variedade do grão em estudo. Portanto, atribui-se a ausência de oligômeros no gel aqui apresentado ao cultivar BR 501 (branco).

4.3 Análise das Proteínas pela Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).

Os espectros das kafirinas extraídas do sorgo sacarino com etanol 70% do cultivar BR 501 (branco), foram adquiridos sob forma de pastilha de KBr. O espectro das kafirinas adquiridas pelo primeiro método de extração proposto, sem agente redutor, está apresentado na figura 18. Pode-se observar bandas típicas das ligações peptídicas de uma proteína como Amida A (estiramento da ligação N-H) em 3100 a 3300 cm^{-1} ; Amida I na região de 1650 cm^{-1} , que é devida à 80% de estiramento das ligações C=O com menores contribuições de estiramento de C-N e dobramento no plano de N-H; Amida II em 1550 cm^{-1} (estiramento de C-N e N-H dentro e fora do plano) e também bandas na região de 1150 a 1050 cm^{-1} aproximadamente, típicas de amido (estiramento CO do anel piranosídeo), além de ácidos graxos em 2845 a 3000 cm^{-1} (ligações de C-H) (LAVIALLE et al., 1982; BANDEKAR, 1992).

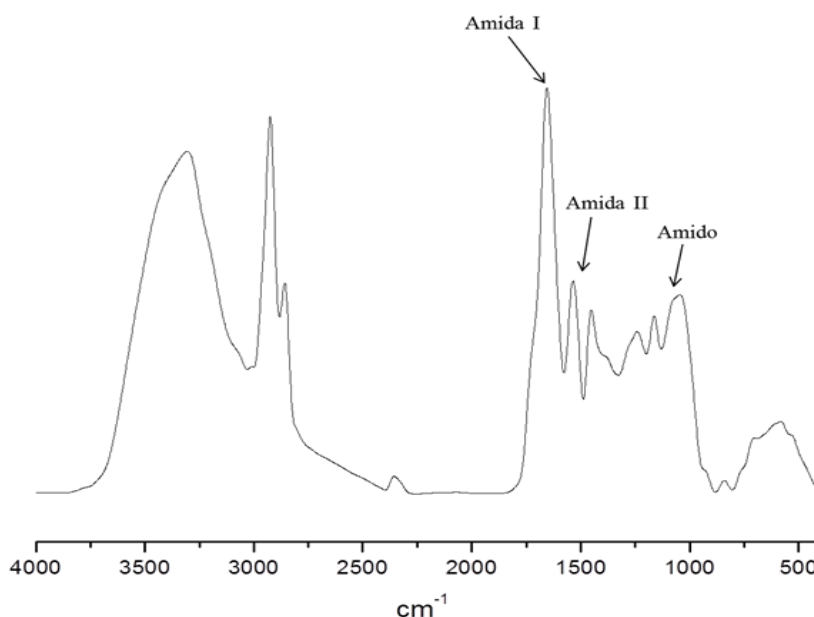


Figura 18: Espectro no Infravermelho de Kafirinas adquiridas pelo primeiro método de extração proposto (sem uso de agente redutor).

A presença dos ácidos graxos nas kafirinas, mesmo após a remoção com hexano e clorofórmio no início e final do processo de extração, respectivamente, pode ser comparado à mesma observação nas zeínas e não como uma co-purificação. Forato et al. (2000)

identificaram a presença de ácidos graxos livres ligados nas zeínas extraídas com etanol 70% e nos corpos proteicos do milho extraídos sem o uso de solventes orgânicos. Forato et al. (2004) analisaram a interação do ácido oleico com a fração de zeína α Z19 extraídas do milho BR 501 e com a penisetina extraída de grãos de milheto, que é semelhante à fração da zeína α Z22. Os autores concluíram que a Z19 possui interações eletrostáticas com o ácido oleico via resíduos de arginina, que são em números de 2 a 3 por sequência e tem sua posição conservada em várias sequências analisadas para a Z19. Os resíduos de arginina possuem o grupo guanidino carregado positivamente e que interage com o grupo carboxila carregado negativamente do ácido oleico. Já no caso da Z22 as interações são do tipo hidrofóbicas, onde as cadeias laterais dos aminoácidos apolares da proteína interagem com a cadeia carbônica do ácido graxo. Tais interações explicam a presença dos ácidos graxos nas zeínas, figura 19.

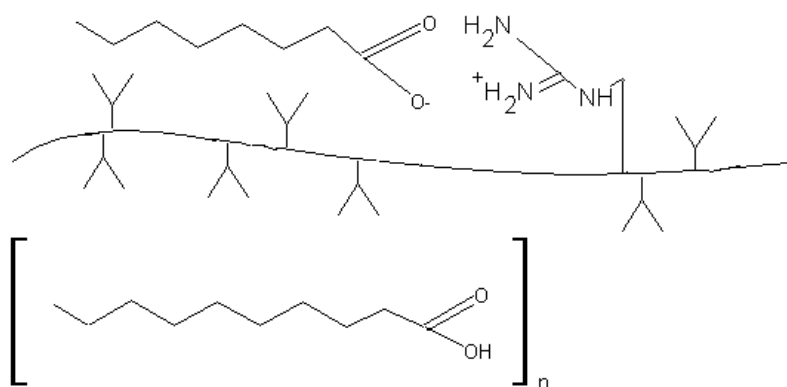


Figura 19: Prováveis sítios de interação das zeínas α com ácidos graxos. Na parte superior, resíduos de arginina carregados interagindo com ácido graxo ionizado. Na parte inferior, excesso de ácidos graxos interagindo hidrofobicamente com as cadeias laterais apolares dos aminoácidos da proteína. Adaptado de Forato, 2000.

Portanto, devido à similaridade entre estas proteínas, zeínas e kafirinas, é possível atribuir os sinais nas regiões de $2945\text{-}2845\text{ cm}^{-1}$ e um ombro em 1745 cm^{-1} aos grupos metileno e carboxila dos ácidos graxos livres que podem estar ligados às kafirinas.

Na figura 20, está o espectro de Kafirinas adquirido pelo segundo método de extração, com agente redutor. O espectro apresentou também bandas típicas de proteínas Amida A, I e II, bem como amida III em 1300 cm^{-1} (MIYAZAWA, 1960). Nota-se no espectro a diminuição expressiva da intensidade na banda de amido entre $1150\text{ a }1050\text{ cm}^{-1}$.

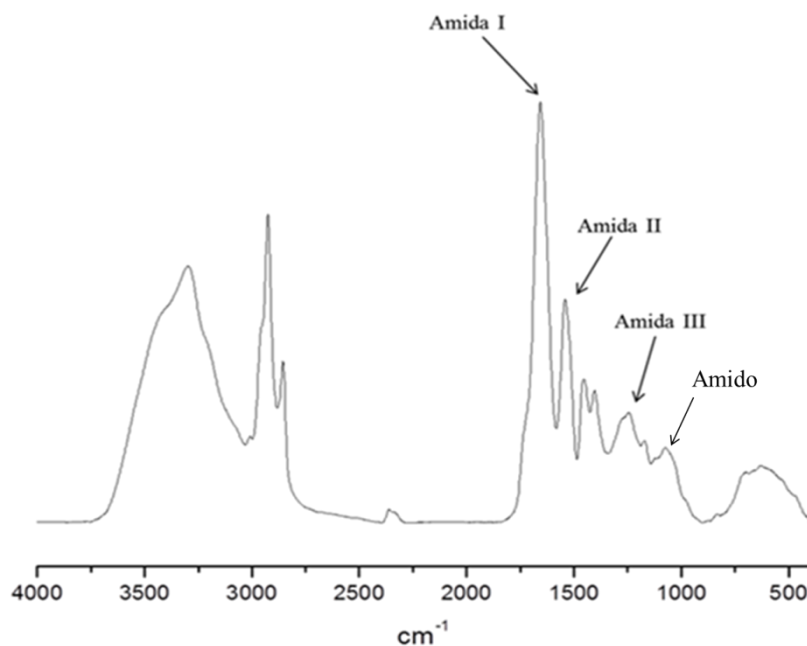


Figura 20: Espectro no Infravermelho de Kafirinas extraídas do cultivar Br501 com agente redutor.

Sendo assim, o segundo método proposto é o mais indicado para a extração das Kafirinas, pois a co-extração do amido aconteceu de forma reduzida.

4.4 Estudos estruturais das Kafirinas pelas técnicas de IV e RMN.

Nos itens a seguir, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos das kafirinas analisadas por técnicas espectroscópicas como IV e RMN de ^{13}C . Através destas técnicas foi possível analisar sua ES e quantificá-las.

4.4.1 Quantificação das Estruturas Secundárias (ES) das Kafirinas por IV.

Para a quantificação das ES das kafirinas por IV, foram utilizados os espectros das figuras 18 e 20. A região utilizada para realizar a quantificação foi de 1800 a 1600 cm^{-1} referente à carbonila (estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupo peptídico). Esta região é a que contém maior informação sobre as ES. Sendo assim, os sinais de amido na região de 1150-1020 cm^{-1} encontram-se fora da região utilizada no processo de quantificação dos teores das ES, e por isso não devem interferir nesta determinação.

A figura 21 apresenta uma expansão dos espectros de IV de ambas as kafirinas obtidas com e sem agente redutor e também é apresentada sua segunda derivada, pois por meio dela pode-se observar picos referentes às ES.

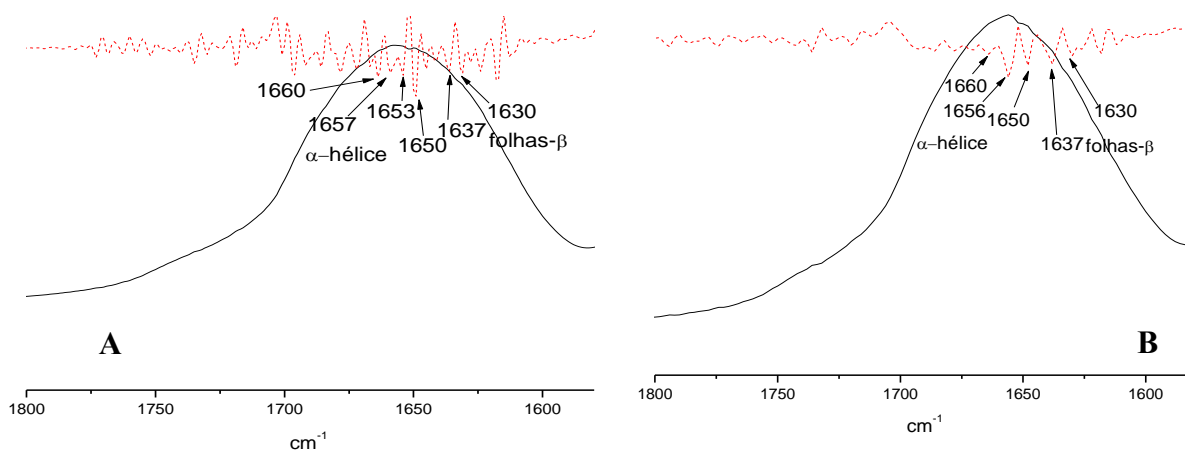


Figura 21: Expansão dos espectros no IV na região da amida I (1800 a 1600 cm^{-1}) das Kafirinas extraídas com etanol 70% e sua segunda derivada (parte superior). A) espectro sem agente redutor e B) espectro com agente redutor.

Os picos mais intensos nas regiões de 1650 a 1660 cm^{-1} mostrados pela segunda derivada são considerados estruturas hélice α , vistos em maior proporção na figura 21A para kafirinas extraídas com etanol 70% sem agente redutor e em menor proporção para kafirinas extraídas com agente redutor, figura 21B. Já os sinais abaixo de 1645 cm^{-1} são considerados estruturas do tipo folha β (JAKOBSEN et al., 1983; SUREWICZ et al., 1988; BANDEKAR, 1992).

Utilizando a espectroscopia no IV em estado sólido e o método de aumento de resolução, baseados nas segundas derivadas, nota-se que as kafirinas analisadas devem ser constituídas por maior quantidade de estruturas α -hélices, principalmente em kafirinas extraídas sem agente redutor. Para confirmar estes resultados qualitativos, foi realizada a quantificação das ES utilizando o método de reconhecimento de padrões.

Na tabela 1, estão descritos os resultados obtidos através da multiplicação do espectro sob análise (espectro das kafirinas com e sem agente redutor) pela matriz de calibração, onde os resultados foram expressos em porcentagem.

Tabela 1: Valores, em porcentagem, das ES de kafirinas extraídas com e sem agente redutor.

Estruturas	Kafirinas extraídas com etanol 70% sem agente redutor	Kafirinas extraídas com etanol 70% com agente redutor
α Hélice	43%	35%
Folha β	23%	28%
Voltas	21%	27%
Estruturas desordenadas	13%	10%

Em geral, as Kafirinas possuem estrutura secundária predominantemente helicoidal, sendo em média 43% de α hélices, 23% de folhas β , para kafirinas extraídas sem agente redutor. Para kafirinas extraídas com agente redutor os valores foram de 35% de α hélices, 28% de folhas β . Esta maior proporção de estruturas α hélices está de acordo com dados encontrados na literatura (DUODU et al., 2001; BELTON et al., 2006).

A diferença entre as ES observadas com e sem uso de agente redutor pode ser explicada nas bases do conteúdo de proteínas observado no gel de SDS/PAGE, onde sem o uso de bissulfito de sódio observou-se alta concentração de kafirinas β com concentrações mais baixas de kafirinas $\alpha 1$ e γ . Neste caso houve maior proporção de ES do tipo α hélices (43%) com menor proporção de folhas β . No gel contendo agente redutor, observa-se maiores concentrações das proteínas γ , $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e menor concentração da fração β . A proporção das ES neste caso indicou redução das estruturas do tipo α hélices (35%) e aumento de folhas β (28%). Tais observações são devidas às diferenças nos conteúdos proteicos nos dois géis, com e sem agente redutor, onde as proteínas em cada caso devem ter ES diferentes. No entanto isto só pode ser confirmado com o isolamento das frações.

Outro fator que deve ser levado em consideração é uma possível desnaturação das proteínas pelo uso do agente redutor, o que poderia ser responsável pela redução das ES do tipo hélices α . O efeito de diferentes extrações nas ES das kafirinas foi observado por Gao et al., (2005) onde o uso de agentes redutores e NaOH e diferentes processos de secagem levaram a desnaturação das proteínas.

4.4.2 Quantificação das ES das kafirinas por RMN.

As ES das Kafirinas também foram analisadas por RMN de ^{13}C no estado sólido. A figura 22 apresenta os espectros por RMN em alta resolução em estado sólido das kafirinas extraídas com e sem agente redutor. O sinal de 172 a 176 ppm correspondem ao deslocamento químico da carbonila de grupos peptídicos e cadeias laterais. Os sinais de 100 a 140 ppm são provenientes das cadeias laterais de aminoácidos aromáticos. Na região de 70 a 45 ppm encontram-se os sinais dos carbonos α enquanto que os sinais em 45 a 15 ppm são atribuídos às cadeias laterais dos aminoácidos alifáticos (SCHOFIELD; BAIANU 1982). Estes são picos específicos atribuídos à proteínas em estado sólido.

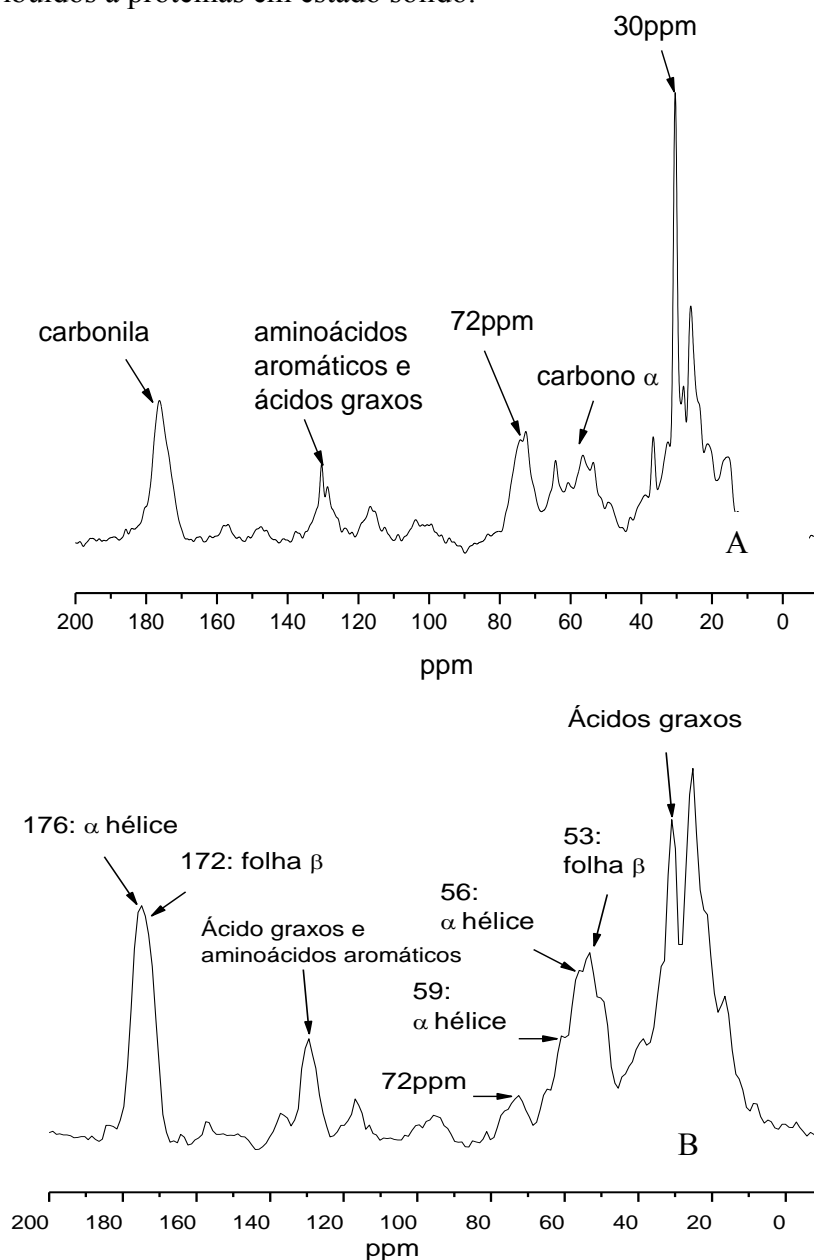


Figura 22: Espectros em alta resolução por RMN de ^{13}C no estado sólido com a técnica CPMAS das kafirinas. A) Kafirinas extraídas sem agente redutor e B) kafirinas extraídas com agente redutor.

Em ambos os espectros pode-se observar um sinal fino e intenso em 30 ppm e outro em 130 ppm, estes sinais por serem finos indicam alguma substância com mobilidade, que não deve ser relativos à proteína analisada no estado sólido. Para analisar tais sinais realizou-se a análise das mesmas amostras pela técnica de RMN de ^{13}C de um pulso, onde na amostra sólida, utiliza-se a potência para análise de líquido, ou seja, só serão vistos sinais de substâncias com alta mobilidade na amostra. O resultado desta análise está na figura 23, onde pode-se ver o espectro típico de um ácido graxo livre, com sinais das cadeias alifáticas na região de 14 a 30 ppm, o sinal dos carbonos insaturados em 120 ppm e da carboxila em 180 ppm, não foi observado sinal de triglicerídeos em 60 ppm.

Como observado nas zeínas por Forato et al., (2000) que também constataram a presença de ácidos graxos livres como os ácidos oleicos e linoleico em corpos proteicos de milho. Os autores observaram uma forte interação entre Z19 e o ácido oleico. Isto se dá consequentemente pela possível afinidade natural destes ácidos graxos pelas zeínas. Sendo assim, os sinais observados de ácidos graxos no espectro de RMN para as kafirinas seria um forte indício de que estas possuem, assim como as zeínas, afinidade com este tipo de substância, já que ambas são consideradas similares.

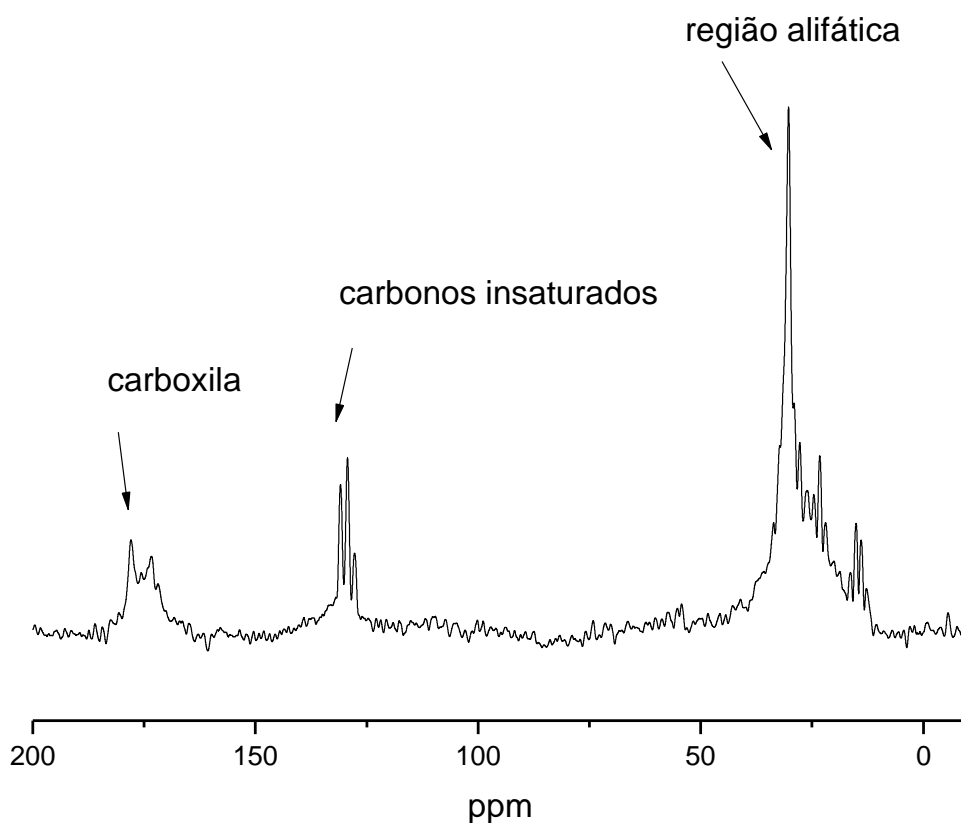


Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C obtido com a técnica de um pulso para as kafirinas sem uso de agente redutor, o mesmo resultado foi obtido com agente redutor.

A similaridade entre os espectros da figura 22 indica que ambos os métodos de extração propostos são eficientes, porém, nota-se uma diferença na intensidade do sinal em 72 ppm, referente à co-purificação do amido. Na amostra que foi extraída com agente redutor, figura 22B, a intensidade do sinal é reduzida quando comparada com a amostra extraída sem agente redutor, figura 22A. Este fato também pôde ser observado nos espectros na região do IV. Além do pico referente à co-purificação do amido houve também alterações nas formas e intensidades dos picos atribuídos à carbonila e ao carbono α . Estes picos fazem parte da ligação peptídica e, portanto, estão relacionadas às ES. Sendo assim, esta mudança, principalmente na carbonila, região utilizada para a quantificação, pode estar relacionada com a diferença encontrada entre as estruturas α hélices e folhas β . Então, para analisar as ES das kafirinas, a região espectral utilizada foi de 185 a 165 ppm.

Como o sinal da carbonila é largo, foi calculada sua segunda derivada e o ajuste do sinal (“band fitting”) para cada espectro apresentado na figura 24. A segunda derivada, por ser um método de aumento de resolução e dependente das larguras de linhas espectrais, foi utilizada para encontrar os picos existentes dentro de um sinal largo, uma vez que reduz a largura de linha em 2,7 vezes (FORATO et al., 1997). O ajuste dos sinais usando a curva lorentziana, foi realizado com a ajuda da segunda derivada para identificar os picos individuais que compõem o sinal largo da carbonila e a área individual de cada sinal foi atribuído às ES das kafirinas.

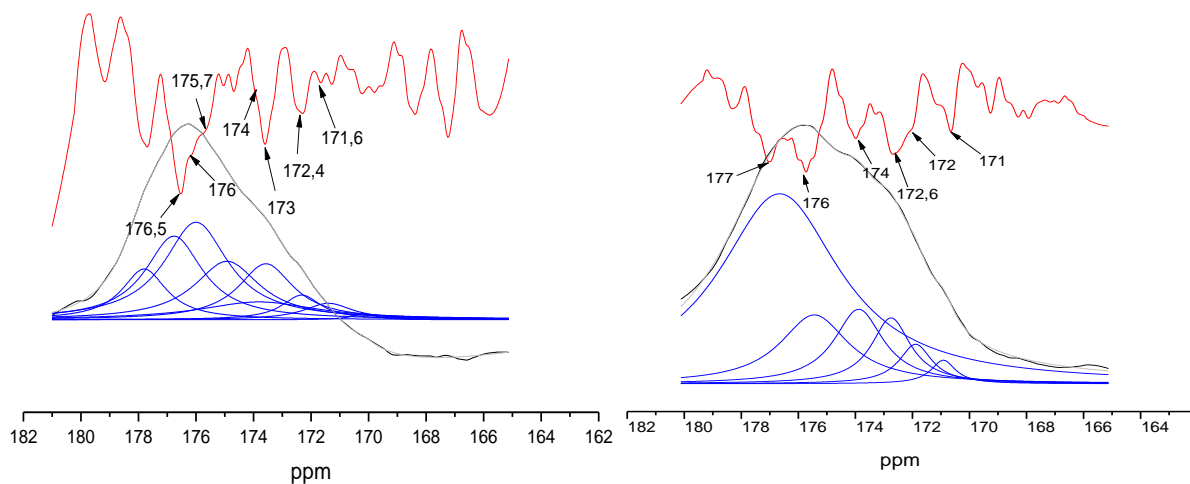


Figura 24: Expansão dos espectros da figura 5 na região da carbonila (linha em preto), o ajuste do sinal (linha pontilhada), as áreas individuais dos picos calculadas (azul) e a segunda derivada (acima do espectro em vermelho). A) espectro das kafirinas sem agente redutor e B) espectros das kafirinas obtidas com agente redutor.

A carbonila da figura 24A apresenta um sinal principal em 176 ppm e um ombro em 172 ppm, os quais são melhores observados pela segunda derivada. Estes picos são atribuídos à presença de estruturas α -hélices e folhas β , respectivamente; o sinal das estruturas desordenadas é atribuído ao deslocamento químico de 174 ppm (KRICHELDORF; MULLER, 1983; WISHART; SYKES, 1994). A área destes sinais, atribuídos pelas curvas, indicaram 66% de α hélices, 22% de folhas β e 12% de estruturas desordenadas para kafirinas extraídas sem agente redutor e 47% de α hélices, 24% de folhas β e 29% de estruturas desordenadas para kafirinas extraídas com agente redutor, figura 24B. Portanto há predominância de estruturas α hélices tanto para amostras de kafirinas extraídas com e sem agente redutor. Ainda assim, além do sinal da carbonila, a presença das estruturas do tipo α -hélice e folhas- β também são confirmadas pelos sinais do carbono- α , onde os sinais em 56 e 59 ppm são típicos de α -hélice e 53 ppm de folhas- β (KRICHELDORF; MULLER, 1983; WISHART; SYKES, 1994).

Estes dados estão consistentes com aqueles descritos no item 4.4.1 obtidos pelo método de reconhecimento de padrões aplicados aos dados de IV já que a predominância para as duas amostras, com e sem agente redutor, é de estruturas helicoidais, e que com uso de agente redutor há redução das estruturas helicoidais pela presença das diferentes frações proteicas indicadas nos géis com e sem agente redutor. A diferença entre a quantificação pelos métodos de IV e RMN se deve ao uso dos métodos de reconhecimento de padrões no primeiro e aumento de resolução no segundo. Forato et al., 1997, demonstraram que os métodos de aumento de resolução são altamente dependentes do operador e a análise do mesmo espectro pode fornecer resultados diferentes de acordo com o número de picos escolhidos, forma da linha usada no ajuste entre outros. No caso dos métodos de reconhecimento de padrões, são mais precisos, pois não dependem do operador, somente da matriz de calibração utilizada.

A predominância de estrutura α hélice nas kafirinas está de acordo com os resultados encontrados por Wu et al. (1971), Duodu et al., (2001) e Gao et al., (2005). Para estes autores, a compreensão das ES das kafirinas é relevante para se obter bons revestimentos para aplicações em alimentos, uma vez que uma maior proporção de estruturas folhas β podem induzir a aglomeração prejudicando sua solubilidade.

4.5 Caracterização das Nanopartículas de Quitosana (NPs de QS).

4.5.1 Tamanho Médio das Partículas.

A determinação do tamanho médio das partículas é uma medida importante para sistemas coloidais sendo possível estimar o tamanho das partículas contidas na suspensão. Na literatura existem muitas maneiras de obtenção das NPs de QS com diferentes tamanhos, muitos acima de 100 nm, usualmente na faixa de 175 à 600 nm. A concentração dos materiais formadores das NPs é um parâmetro importante, pois pode influenciar no tamanho das partículas a serem obtidas. Aouada, 2009 verificou que com o aumento na concentração de quitosana e TPP houve um aumento no tamanho das partículas devido ao aumento da viscosidade na solução de síntese, favorecendo então a formação de NPs maiores. Sendo assim, a concentração ideal para a formação de NPs menores de quitosana foi de 2,14 mg/mL de quitosana e 0,3 mg/mL de TPP, que foi utilizada neste trabalho. A distribuição de partículas da amostra obtida nestas condições está apresentada na figura 25. Os resultados mostraram que as partículas em solução apresentaram diâmetro médio de 58 nm.

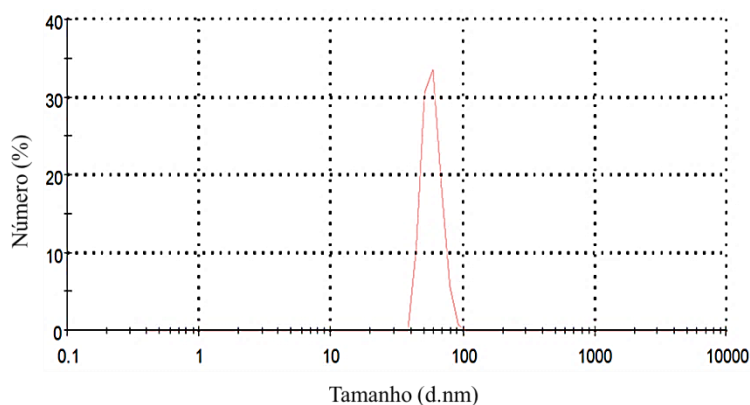


Figura 25: Gráfico da distribuição de partículas obtidas de QS com TPP.

Para verificar a estabilidade das NPs, o valor do potencial zeta foi determinado por se tratar de uma medida de magnitude de atração e repulsão entre as partículas e fornece informação da interação eletrostática entre as superfícies. Por esta técnica é possível verificar a carga total de uma partícula em um meio específico. A média dos valores do potencial zeta está apresentada na tabela 2.

Tabela 2: Média dos valores do potencial zeta para NPs de QS-TPP obtidas por gelificação iônica.

	pH	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)
NPs de QS-TPP	4,5	58	+77

Por esta análise verificou-se que as NPs têm carga superficial positiva. Isto está relacionado com o valor do pH (ácido) da solução, próximo a 4,5, sendo uma característica das NPs de QS. Com o tamanho médio de 58 nm, as NPs de QS-TPP apresentaram uma média dos valores de +77 mV para o potencial zeta. Em módulo, o valor de potencial zeta relativamente alto, acima 20 mV, é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de NPs adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2006).

O pH é um valor fundamental para a estabilidade das NPs. De acordo com dados encontrados na literatura, com o aumento do pH, o ponto isoelétrico próximo do pH 8,0, a solução de NPs de quitosana apresenta um decaimento nos valores do potencial zeta. Isto acontece, pois em meio alcalino (pH ~8,0) os íons de TPP competem com os íons de -OH^- para se ligarem com o grupo -NH_3^+ , ou seja, devido a uma drástica redução no grau de

protonação dos agrupamentos amina da QS pelos TPP, diminuindo a repulsão eletrostática entre elas, aumentando a probabilidade de aglomeração e consequentemente reduzindo o valor do potencial zeta (ALI et al., 2010).

Blanco (2011) acredita que quanto menor o tamanho das partículas, maior será o valor do potencial zeta. Isto está de acordo com estudos realizados por Moura et al., 2009, por este mesmo método de obtenção das NPs, gelificação iônica, obtiveram NPs de QS-TPP com tamanho médio de 85 nm e com um potencial zeta de +43 mV.

Uma das principais características da quitosana é sua atividade antimicrobiana e antifúngica. Du et al. (2009) realizaram um estudo no qual foram produzidas NPs de QS-TPP pelo método de gelificação iônica e através dos teste de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida utilizando microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*, as NPs de maior potencial zeta +88,69 mV e +86,65 mV, apresentaram uma atividade antimicrobiana maior do que as NPs com o potencial zeta entre +51,37 mV.

4.5.2 Análise das NPs de QS por Microscopia de Força Atômica (MFA).

A microscopia de força atômica é uma técnica que permite obter imagens tridimensionais da topografia das superfícies. Através de interações fracas entre a ponta da sonda e a amostra depositada a um substrato, foi possível mapear a superfície deste material e assim obter imagens da topografia das NPs de QS. A figura 26 mostra a imagem da topografia das NPs de QS-TPP obtidas pelo modo contato intermitente (Tapping).

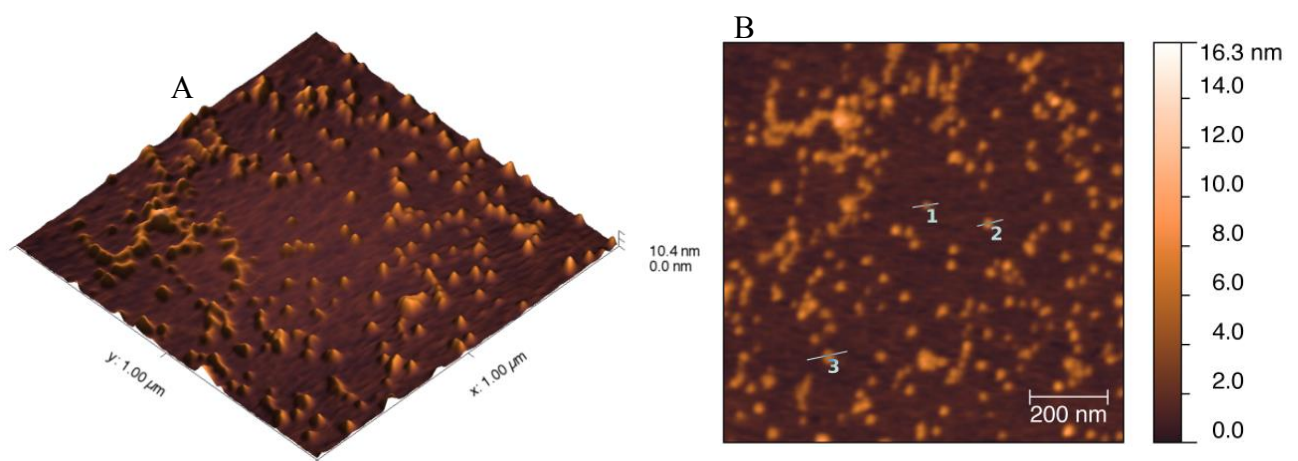


Figura 26: Imagem de MFA da topografia das NPs de QS-TPP. A) imagem 3D e B) imagem 2D.

Pelas imagens obtidas por MFA, podemos observar tanto a presença de agregados quanto de NPs isoladas. Por estas estarem mais isoladas, foi possível determinar a altura e o seu diâmetro. Os cálculos foram realizados utilizando a imagem 2D da figura acima. Na figura 27, está o gráfico onde o eixo y representa a altura e o eixo x o diâmetro das NPs.

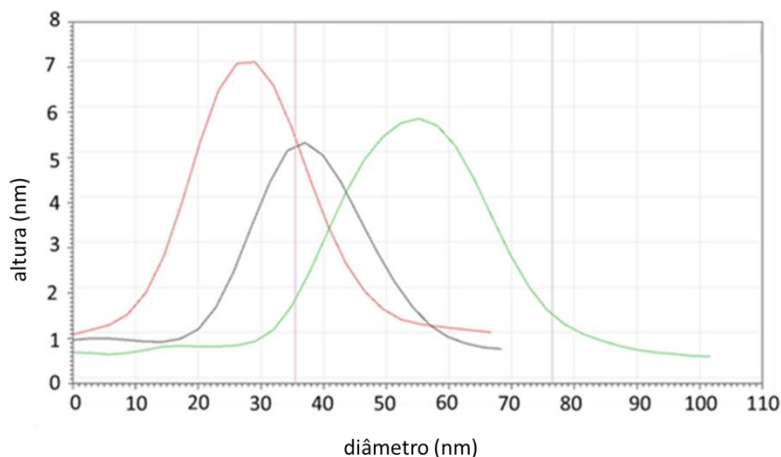


Figura 27: Gráfico representado a altura e diâmetro das NPs de QS através da imagem topográfica obtida por MFA.

O ponto 1 da figura 26B representa a curva de cor preta indicando NPs de QS com diâmetro de 33 nm com altura de 5 nm, o ponto 2 indicado pela curva de cor vermelha têm diâmetro de 34 nm e altura de 7 nm e o ponto 3, curva na cor verde, apresenta diâmetro de 41 nm e altura de 5,5 nm. Por estes dados pode-se dizer que as NPs de QS-TPP apresentam forma esférica, uniformidade na distribuição de tamanho e morfologia homogênea. Tais resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para NPs de QS com TPP e com PMAA – poli (ácido- metacrílico) (MOURA et al., 2008; LIMA et al., 2010).

A única peculiaridade é que, pelas análises de tamanho em solução, as NPs de QS-TPP apresentaram tamanho médio de 58 nm e pelas medidas realizadas em sistema seco, os valores de tamanho analisados foram menores, ou seja, os valores da amostra seca não equivalem aos obtidos em solução. Aoad, 2009 explica que tal diferença pode ser pelo fato de que, após a evaporação da água da suspensão na qual as NPs estavam imersas, estas passam por processo de murchamento, causando a diminuição de tamanho em relação ao tamanho normal dessas em suspensão. Contudo, pelos resultados aqui apresentados, a obtenção de NPs de QS-TPP por gelificação iônica foi satisfatória uma vez que foram produzidas NPs em escala nanométrica uniformes e com elevado potencial antimicrobiano.

Após a obtenção e caracterização das kafirinas bem como a obtenção e análise das NPs QS-TPP, os revestimentos comestíveis foram preparados e as frutas, maçãs e peras, foram revestidas e caracterizadas. A seguir serão apresentados os resultados obtidos.

4.6 Caracterização dos Revestimentos Comestíveis nas Frutas.

4.6.1 Análise da perda de Massa.

O processo da respiração está associado ao da transpiração, principal fator responsável pela perda de massa. As perdas de massa depreciam a aparência das frutas, pois a superfície se apresenta enrugada provocando alterações na firmeza, devido à plasmólise celular (BOAS, 2000). A perda preventiva de água em frutas pode ser obtida pela redução da respiração bem como da transpiração.

Considerando que os revestimentos comestíveis podem de certa forma promover uma modificação das trocas gasosas dos frutos e então reduzir a transpiração, foram analisadas maçãs e peras sem revestimento (chamadas de controle) e revestidas com soluções filmogênicas contendo: 2% de kafirinas (m/m) solubilizadas em etanol 70% variando-se as concentrações de plastificante, óleo de canola (OC) em 0,10; 0,25 e 0,50% (m/m) com e sem adição de NPs de QS, sendo que a concentração utilizada foi de 0,1%. Durante todo o experimento as frutas foram mantidas em temperatura ambiente. Na figura 28, estão os gráficos de perda de massa das maçãs revestidas com e sem NPs de QS.

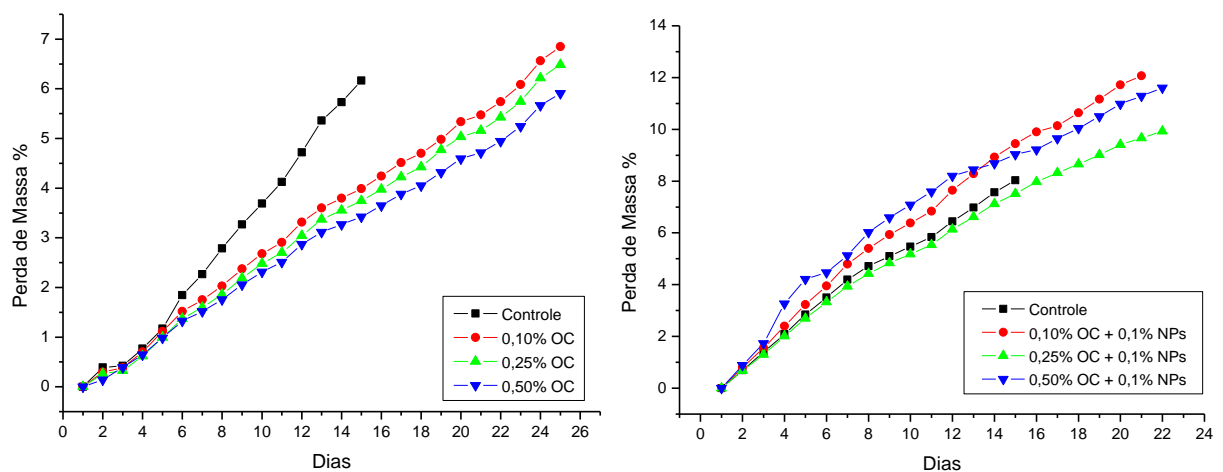


Figura 28: Gráfico de perda de massa para maçãs com e sem revestimento. A) sem NPs de QS e B) com NPs de QS.

Pode-se observar em ambos os gráficos que as frutas do controle (linha preta) duraram apenas 15 dias enquanto as frutas revestidas com e sem NPs duraram em torno de 25 dias. Todos os revestimentos com e sem NPs apresentaram-se eficientes quando aplicados em maçãs se comparados à frutas controle. Em peras, figura 29, este mesmo comportamento foi observado. Entretanto, o tempo de vida útil das peras é menor em relação às maçãs. Peras do

controle duraram no máximo 10 dias, enquanto peras revestidas com e sem NPs apresentaram um tempo maior, 17 dias.

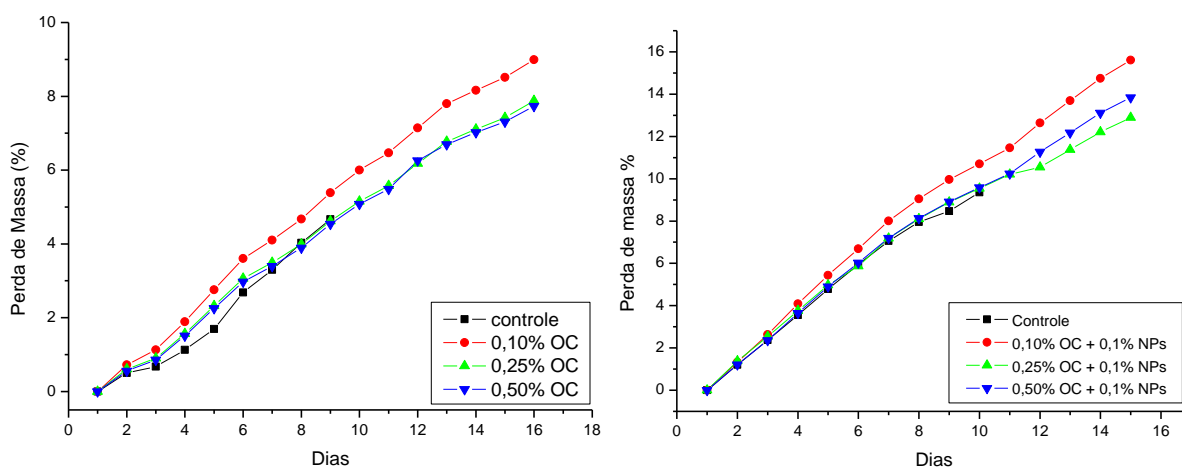


Figura 29: Gráfico de perda de massa para as peras com e sem revestimento. A) sem NPs de QS e B) com NPs de QS.

Contudo, fazendo uma comparação entre os revestimentos, pode-se observar em maçãs, figura 28, que, ao final do experimento a perda de massa foi de aproximadamente 6% para as revestidas sem a presença das NPs no revestimento e aproximadamente 12% para as revestidas com solução filmogênica contendo NPs de QS. Em peras, figura 29, os valores de perda de massa foram de aproximadamente 6 a 9% sem as NPs e de 13 a 15% para as frutas revestidas com NPs.

Segundo Chitarra; Chitarra, 2005, perdas da ordem de 3 a 6% são suficientes para causar um marcante declínio na qualidade tendo substancial importância na comercialização, mas em alguns casos, dependendo da fruta, são ainda comercializáveis com 10% de perda de massa de umidade. Frutas como maçãs e peras, quando armazenadas em temperatura a 24°C, após a 3ª semana, apresentaram perda de massa da ordem de 10,7% para as maçãs e as peras após 2ª semana apresentam 9,7%. Em ambas as frutas os sintomas são de enrugamento extremamente severo.

Nas frutas revestidas com solução filmogênica sem a adição das NPs, os valores das perdas de massa se apresentaram menores do que o padrão encontrado na literatura (6% obtido para maçãs contra 10,7% da literatura; e 6% obtido para pera contra 9,7% da literatura). Entretanto, para frutas revestidas com soluções contendo NPs de QS tiveram um aumento nesta percentagem. Este fato poderia ser atribuído à natureza hidrofílica da quitosana (Baldwin et al., 1996), no entanto, há registros na literatura de que a quitosana em sua forma nanométrica pode aumentar a hidrofobicidade de um material (MOURA et al., 2008;

MARTELLI et al., 2013). Como os revestimentos das maçãs e peras sem e com NPs foram feitos em meses diferentes, julho e setembro, respectivamente, acredita-se que as altas temperaturas do mês de setembro sejam as reais responsáveis pela maior transpiração dos frutos, e não o conteúdo de 0,1% de NPs. Na literatura encontra-se citação onde altas perdas de massa são atribuídas a altas temperaturas e não ao tipo de revestimento utilizado (MEDEIROS et al., 2011).

Scramin et al. (2011) realizaram um estudo onde avaliaram a aplicação de revestimentos comestíveis a base de zeínas aplicados em peras mantidas em temperatura ambiente. Os frutos revestidos duraram 12 dias e de acordo com os resultados observados pelos autores, o revestimento que apresentou menor perda de massa foi o que continha 4% de zeína com 0,25% ácido oleico (AO) com apenas 7,5% de perda de massa. Já os frutos revestidos com 4% de zeína e 0,5% de AO, apresentaram, após 12 dias de experimento, 10% de perda de massa. Estes resultados estão próximos aos aqui apresentados para peras sem a adição das NPs de QS.

Revestimentos comestíveis que agem como barreira ao vapor d'água, como já dito, são desejáveis para a conservação dos alimentos “*in natura*”, pois evitam a desidratação da superfície. Alguns estudos (EMMAMBUX et al., 2004; GILLGREN et al., 2008) tem demonstrado que as kafirinas, apesar de serem proteínas de origem hidrofóbica, não apresentam boas propriedades de barreira contra o vapor d'água. Buchner et al. (2011) revestiram peras com filmes de kafirinas usando concentrações altas de plastificante (1% de 1,2-propanodiol + 0,5% de glucono- δ -lactona) e notaram que as frutas revestidas apresentaram uma diferença significativa em relação as frutas não revestidas, ou seja, tiveram maior perda de massa durante os 24 dias de experimento, onde as frutas eram ainda mantidas em temperatura controlada, 20°C. Estes autores concluíram que, através destes resultados, os revestimentos a base de kafirinas não são eficazes contra a barreira à umidade por não reduzir a perda de umidade das frutas revestidas.

Embora estes autores tenham relatado que as kafirinas não apresentam boas propriedades de barreira ao vapor d'água, é fato que a presença do plastificante nestes revestimentos influencia e alteram tal característica. É notável que os revestimentos aqui estudados sejam eficientes na redução da transpiração, pois prolongaram a vida útil das frutas revestidas em comparação às frutas não revestidas. Sendo assim, os melhores revestimentos tanto para peras, quanto para maçãs são os que contem 2% de kafirinas nas concentrações de 0,25 e 0,50% de OC com e sem NPs de QS.

Tais resultados também foram visíveis pelas imagens fotográficas das maçãs ao longo do experimento. Na figura 30 estão as fotos das maçãs após 14 dias de experimento.



Figura 30: Fotos das maçãs após 14 dias de experimento. **A)** Maçãs revestidas com solução filmogênica sem NPs de QS e **B)** Maçãs revestidas com solução filmogênica contendo 0,1% de NPs de QS. A sequência das fotos representa: 1) controle (sem revestimento), 2) maçãs revestidas com 0,10% OC, 3) maçãs revestidas com 0,25% OC e 4) maçãs revestidas com 0,50% OC.

Pelas fotos, figura 30, observou-se que as maçãs sem revestimento, no 14º dia apresentaram sinais de degradação e senescência o que só aconteceu com todas as frutas revestidas no 24º sem NPs e no 22º dia com NPs. Em peras, após 10 dias, as frutas do controle já estavam impróprias para o consumo, apresentando danos nos tecidos, com acentuado aspecto de degradação e proliferação de microrganismos, ao passo que as demais frutas, revestidas, neste mesmo período, ainda estavam preservadas, como mostra a figura 31.

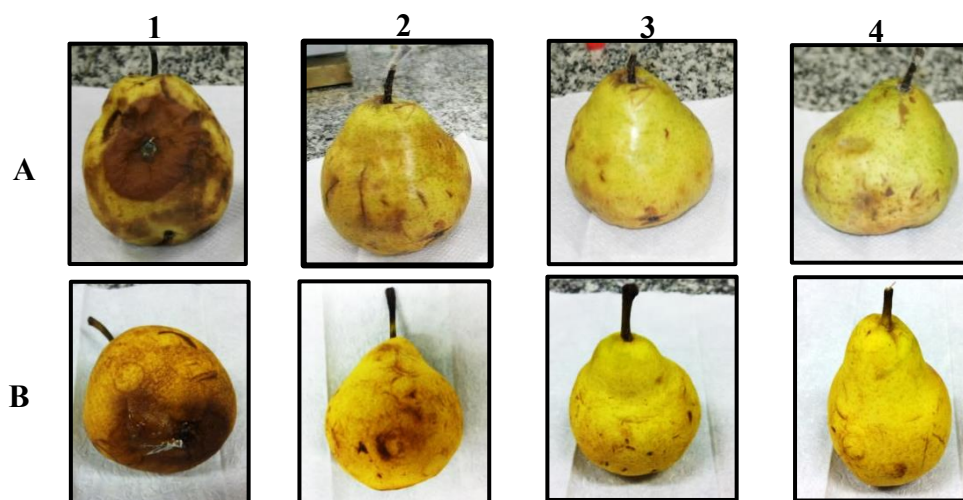


Figura 31: Fotos das peras após 10 dias de experimento. **A)** Peras revestidas com solução filmogênica sem NPs de QS e **B)** Peras revestidas com solução filmogênica contendo 0,1% de NPs de QS. A sequência das fotos representa: 1) controle (sem revestimento), 2) peras revestidas com 0,10% OC, 3) peras revestidas com 0,25% OC e 4) peras revestidas com 0,50% OC.

4.6.2 Análise microbiana das soluções filmogênicas contendo NPs de QS.

Durante a incubação gerando o crescimento do microrganismo teste, pode-se observar a ação antimicrobiana das NPs de QS na concentração de 0,1% das soluções filmogênicas contendo 2% de kafirinas variando-se a concentração de OC em 0,10, 0,25 e 0,50% e 0,1% de NPs de QS, figura 32. Foram observados halos (zona transparente) de inibição em volta dos poços, onde não cresceu colônias do microrganismo. A medida desse halo de inibição é proporcional à ação antimicrobiana.

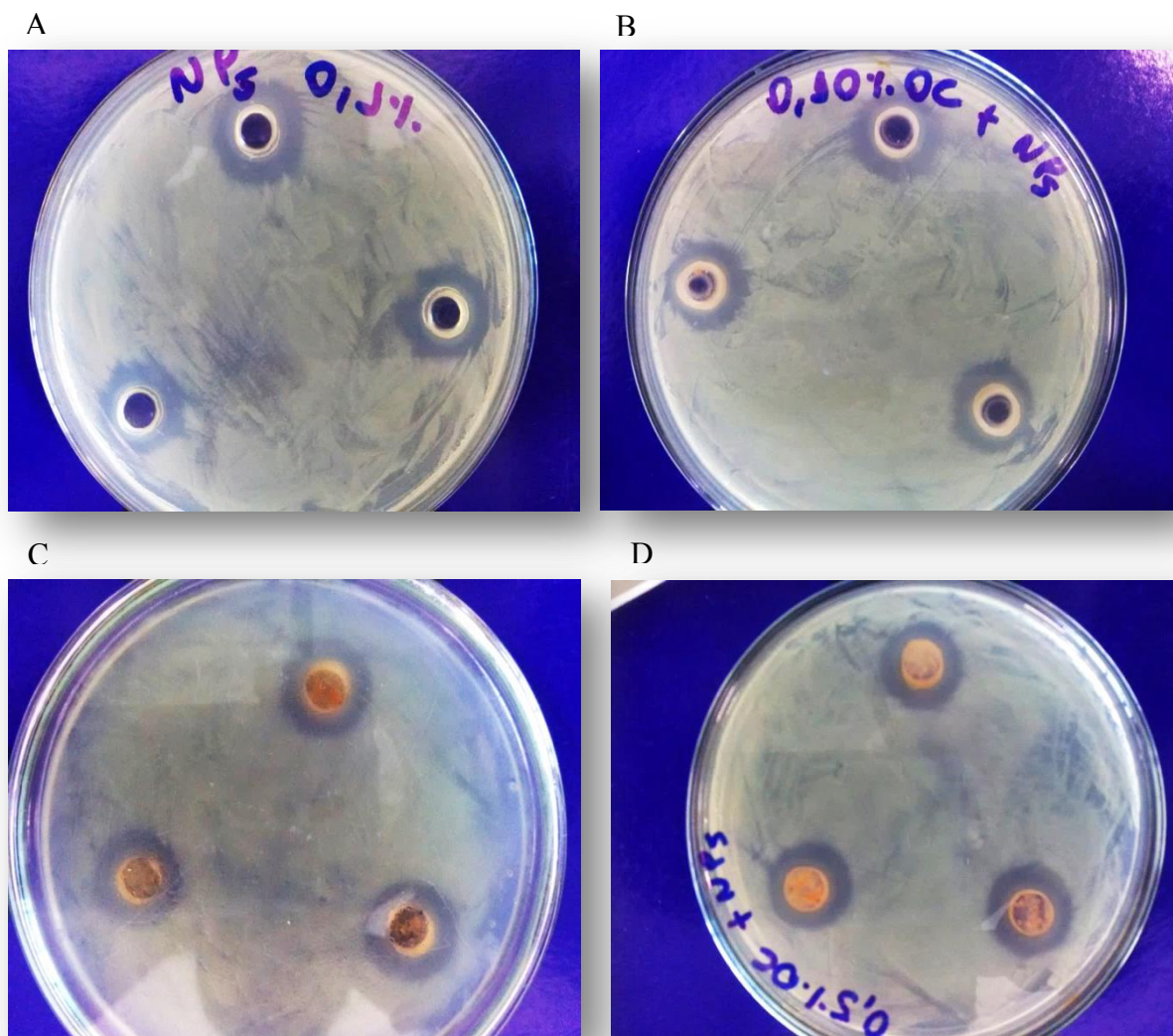


Figura 32: Fotos dos halos formados em volta dos poços após 8 horas de incubação dos microrganismos. A) 0,1% de NPs de QS, B) solução filmogênica com 2% de kafirinas contendo 0,10% de OC e 0,1% de NPs de QS, C) solução filmogênica com 2% de kafirinas contendo 0,25% de OC e 0,1% de NPs de QS e D) B) solução filmogênica com 2% de kafirinas contendo 0,50% de OC e 0,1% de NPs de QS.

O diâmetro do halo de inibição em volta de cada poço foi estimado com o auxílio de um paquímetro. Pode-se observar que diâmetro de aproximadamente 4,3 mm ($\pm 0,4$) para todas as amostras. Isso indica que, com a formação do halo, as NPs de QS na concentração de

0,1% puras e quando adicionadas as soluções filmogênicas apresentam ação antimicrobiana.

A seguir serão apresentados resultados com as soluções filmogênicas descritas neste item excluindo-se as soluções com e sem NPs contendo 0,10% de OC, uma vez que apresentaram os maiores valores de perda de massa, para peras e maçãs.

4.6.3 Análise por Colorimetria.

A aparência é o fator de qualidade de maior importância do ponto de vista da comercialização. Para determinar visualmente a qualidade das frutas atributos como tamanho, forma, textura e cor são fundamentais. A coloração é um dos atributos de maior atrativo na hora da compra para o consumidor, indicando qualidade ao produto. Os produtos de cor forte e brilhante são os preferidos, embora não contribua na qualidade comestível produto.

Para determinar a cor dos frutos ao longo do tempo, os resultados aqui apresentados foram expressos em CIE a^* e b^* , que permitiram calcular o ângulo de Hue, indicando a tonalidade da cor. De acordo com o sistema CIELAB se o ângulo estiver entre 0° e 90° , quanto mais tender a 90° indica que o fruto está mais amarelo e quanto mais próximo de zero mais vermelho é o mesmo. Acima de 90° indica cor verde.

De acordo com o gráfico da figura 33A, as maçãs (com e sem revestimento) partiram de um ângulo próximo a 85° , evidenciando a cor amarela. Neste caso, as maçãs foram revestidas, exceto o controle, com soluções filmogênicas sem a adição de NPs de QS. No entanto, maçãs sem revestimento e revestidas com solução filmogênica contendo NPs de quitosana, figura 33B, partiram de um ângulo inicial próximo a 40° indicando predominância na cor vermelha. Entre os revestimentos, o ângulo Hue das maçãs revestidas com Kafirinas + 0,25% OC com e sem NPs apresentaram menor variação colorimétrica.

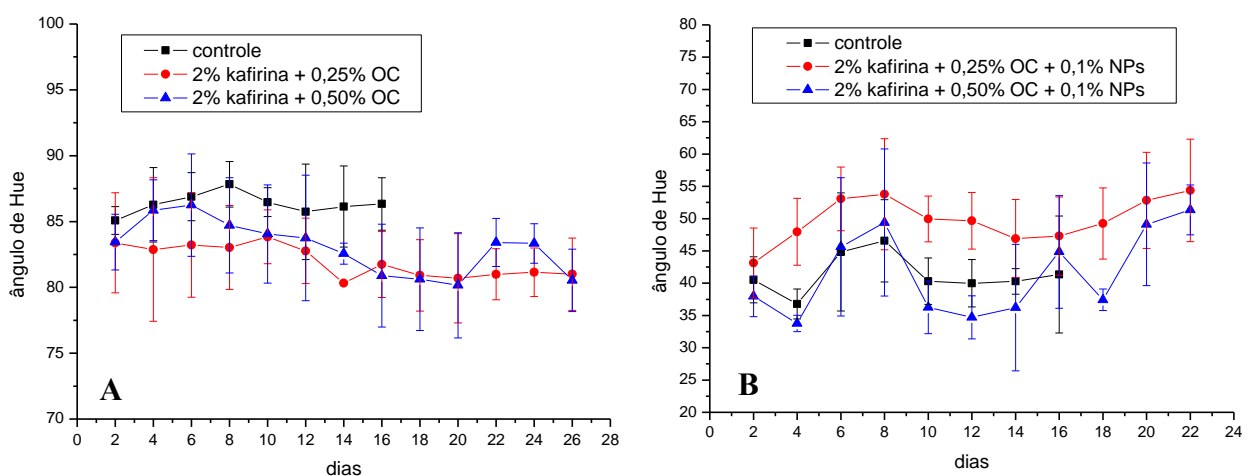


Figura 33: Gradiente do Ângulo Hue para maçãs. A) maçãs revestidas com diferentes soluções filmogênicas sem NPs, B) maçãs revestidas com diferentes soluções filmogênicas contendo 0,1% de NPs de QS. O ângulo Hue pode ser expresso por uma esfera cujos ângulos 0° , 90° , 180° e 270° representam respectivamente as cores vermelho, amarelo, verde e azul.

Em ambos os gráficos 33 A e B, não foi possível observar uma variação significativa na cor ao longo do tempo, indicando que não houve degradação dos principais pigmentos encontrados nas maçãs, como as antocianinas que são pigmentos fenólicos responsáveis pela cor avermelhada. A descoloração de tais substâncias ocorre pela ação de sistemas enzimáticos sendo também degradada pelo oxigênio levando ao escurecimento dos tecidos. As maçãs foram revestidas com soluções filmogênicas que tem por objetivo proteger as frutas atuando como uma barreira capaz de controlar as trocas gasosas do fruto, bem com diminuir a entrada de O_2 . Com a redução do O_2 , consequentemente reduziu a degradação destas substâncias preservando a coloração do tecido.

A predominância da cor amarela nas maçãs revestidas com soluções filmogênicas com NPs e da cor vermelha nas maçãs revestidas com soluções filmogênicas sem NPs de QS, não está relacionada com a aplicação do revestimento, pois as frutas controle, ou seja, não revestidas, também apresentaram tal predominância. As antocianinas como são pigmentos de cor forte, em geral ocultam os outros pigmentos como a clorofila e os carotenóides. Sendo assim, frutas que têm predominância na cor avermelhada, certamente apresentam muito mais antocianinas do que carotenóides que são pigmentos de cor amarela e laranja (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Em peras (com e sem revestimento), observou-se inicialmente, em ambos os gráficos, figura 34A e B, um ângulo de Hue próximo a 105° indicando predominância na cor verde.

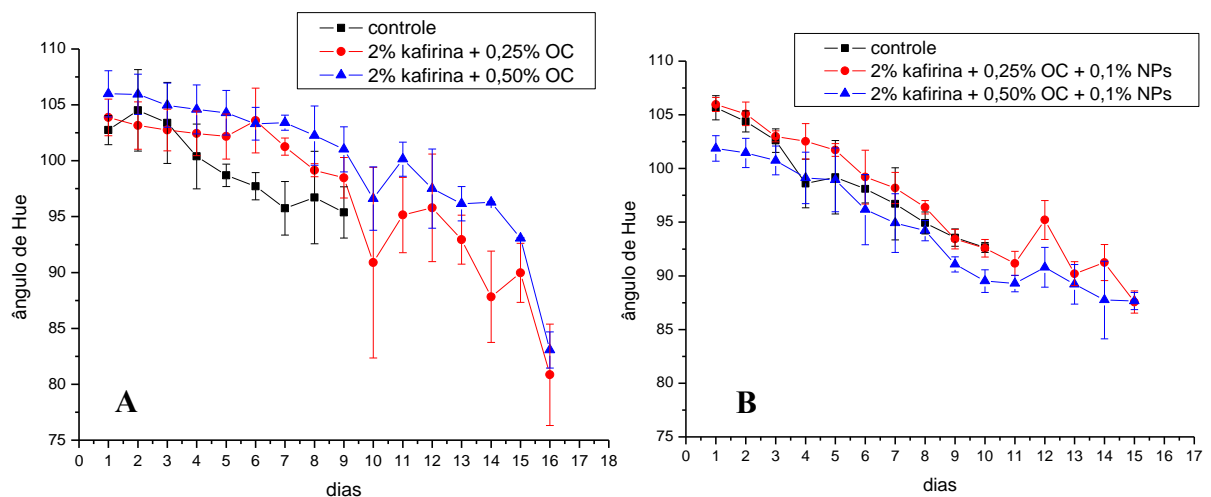


Figura 34: Gradiente do Ângulo Hue para peras. A) peras revestidas com diferentes soluções filmogênicas sem NPs, B) peras revestidas com diferentes soluções filmogênicas contendo 0,1% de NPs de QS. O ângulo Hue pode ser expresso por uma esfera cujos ângulos 0° , 90° , 180° e 270° representam as cores vermelho, amarelo, verde e azul, respectivamente.

Contudo, ao longo do tempo, nota-se que as peras que foram revestidas com soluções filmogênicas sem NPs de QS, no 16º dia o ângulo de Hue chegou próximo a 80º enquanto que peras revestidas com soluções filmogênicas contendo NPs de QS, o ângulo de Hue ficou próximo de 87º. Como visto, o ângulo de Hue próximo de 90º a fruta apresenta cor amarelada. A perda de cor verde e a mudança para a cor amarela é um indicativo de maturidade. Esta ação ocorre devido à decomposição estrutural da clorofila em decorrência de vários fatores como a presença de fatores oxidantes. Observou-se que não houve diferença de atuação entre os revestimentos na coloração das peras.

Pôde-se observar que tanto para as maçãs quanto para as peras, não houve interferência na sua cor quando os revestimentos foram aplicados.

4.6.4 Análise da textura.

As medidas realizadas para avaliar a textura das frutas com e sem revestimento foram realizadas com o auxílio do equipamento texturômetro de acordo com os parâmetros descritos no item 3.4.4. A medição da firmeza do epicarpo e da polpa permite obter dados relacionados com a consistência e a resistência dos tecidos. A ação protetora dos revestimentos foi inferida pela análise dos maiores picos de tensão-compressão dos gráficos obtidos pela medida de textura. Picos de maior intensidade estão relacionados com maior rigidez da amostra, indicando a necessidade de maior força para comprimir aquela área da fruta. Os resultados da leitura foram expressos em Newtons (N). Na figura 35, estão os gráficos representando os resultados obtidos pelas medidas realizadas tanto no epicarpo quanto na polpa de maçãs revestidas com e sem NPs de QS bem como o seu controle (maçãs sem revestimento) para possíveis comparações.

Os valores de resistência das maçãs apresentaram variações durante os 12 dias em que foram realizadas as medidas. Tal observação deve-se ao fato de que as frutas não se apresentavam no mesmo grau de maturação, uma vez que estas foram adquiridas pelo comércio e não diretamente do produtor após a colheita. Além disso, como essas medidas são destrutivas as frutas analisadas a cada dia são diferentes umas das outras. Assim, notou-se que o período de 12 dias foi insuficiente para diagnosticar alguma mudança na textura, pois não foram observadas, nos gráficos, mudanças significativas na firmeza tanto no epicarpo quanto na polpa.

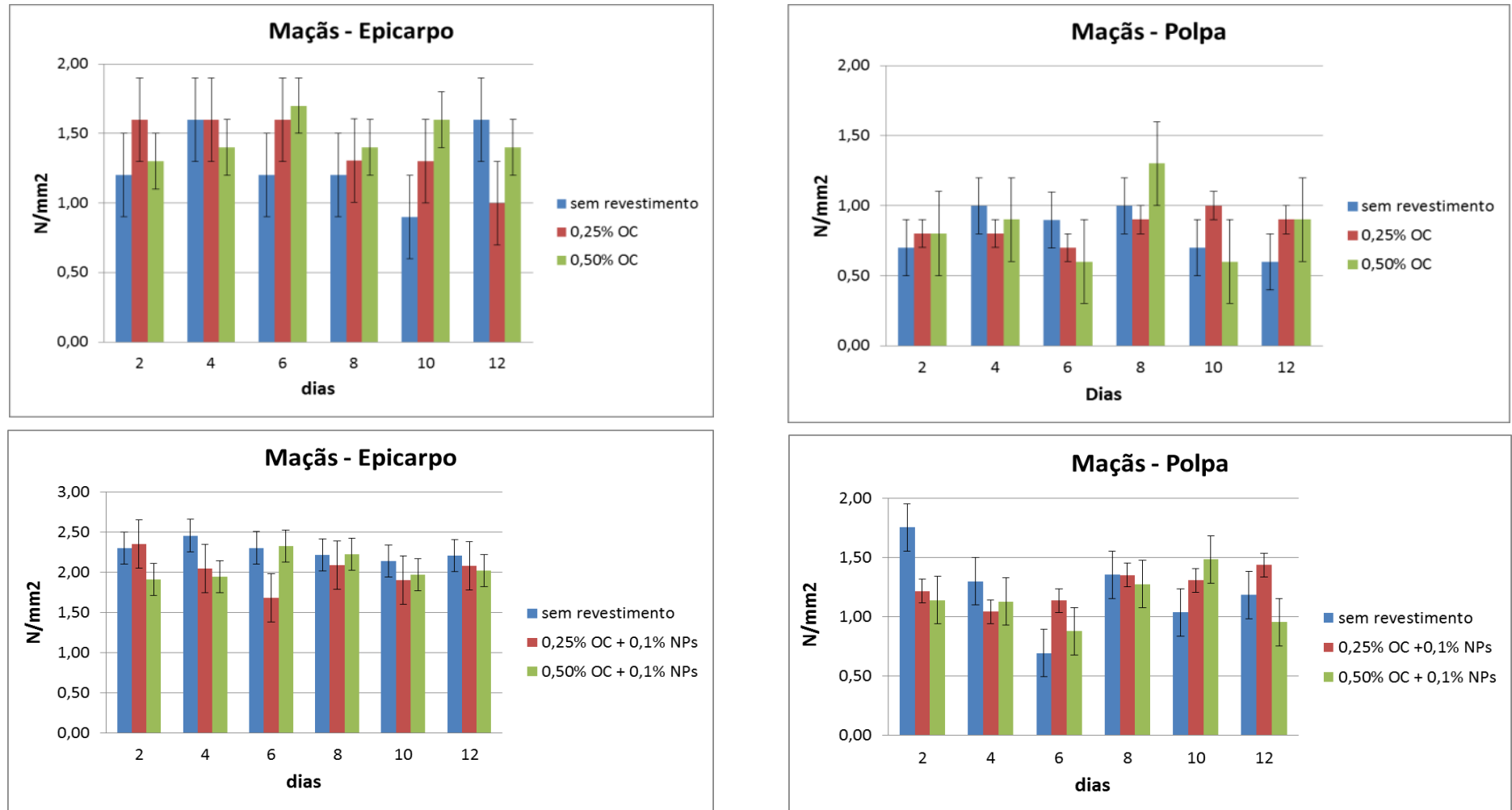


Figura 33: Gradiente dos índices de tensão-compressão do epicarpo e polpa de maçãs. O ensaio foi realizado durante doze dias. As frutas foram revestidas com soluções com 2% de kafirinas variando as concentrações do plastificante OC em: 0,25 e 0,50% com e sem NPs de QS, além do controle sem revestimento.

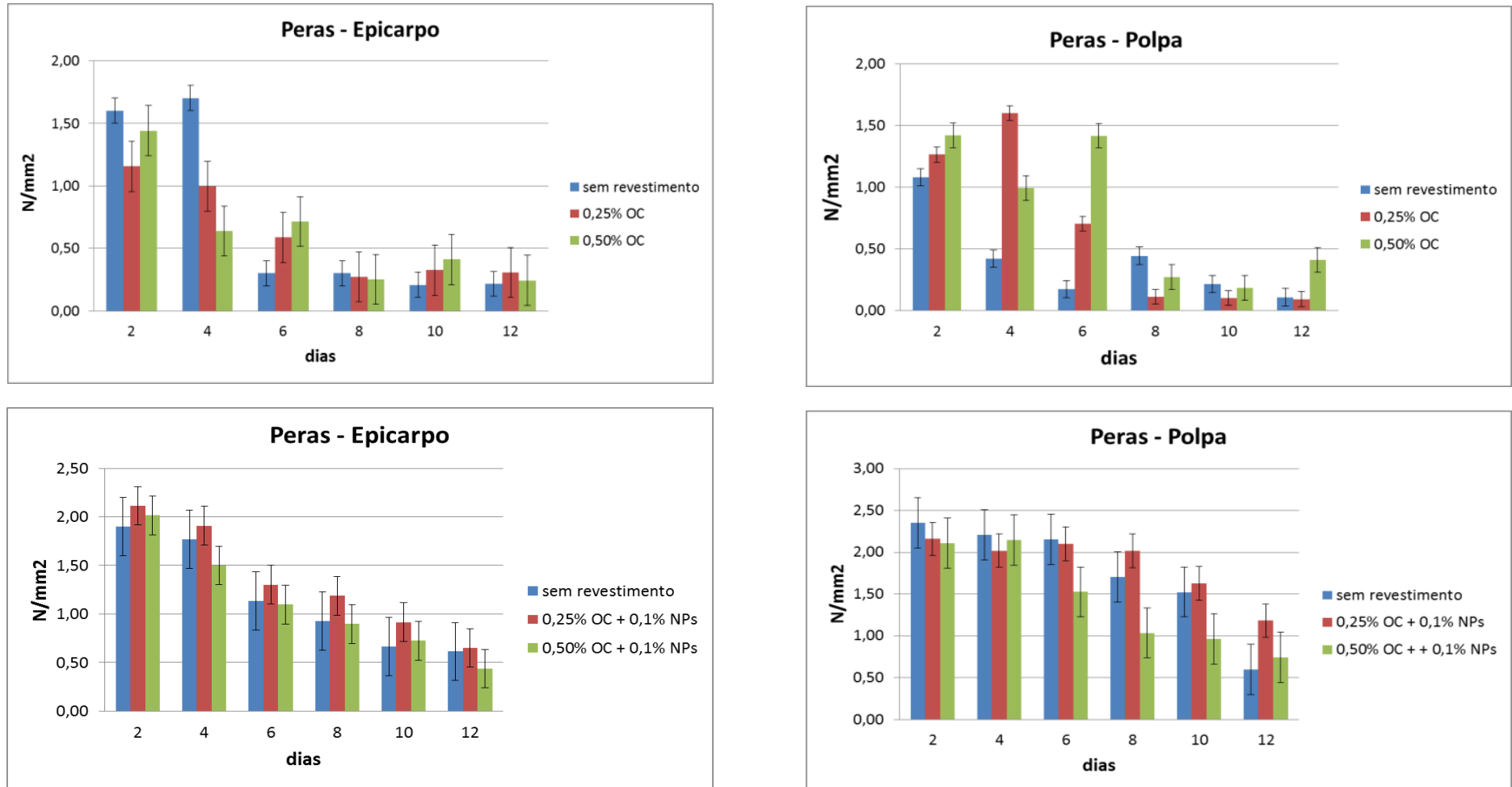


Figura 34: Gradiente dos índices de tensão-compressão do epicarpo e polpa de peras. O ensaio foi realizado durante quinze dias. As frutas foram revestidas com soluções com 2% de kafirinas e variadas concentrações do plastificante OC em: 0,25 e 0,50% com e sem NPs de QS, além do controle sem revestimento.

Em peras, com os resultados apresentados na figura 36, foi possível observar que não houve intensa variação na textura entre as frutas nos dias consecutivos como ocorreu com as maçãs. Isso pode ser devido as peras estarem num estágio de maturação semelhante ao longo do experimento. Observou-se neste caso que o período estabelecido para as análises foi suficiente para verificar uma modificação na textura, indicando que a firmeza tanto do epicarpo quanto da polpa decaiu ao longo do tempo, e isto é devido a uma característica das peras, que têm um menor tempo de vida do que as maçãs.

Pelas medidas realizadas no epicarpo, não observou-se diferenças entre o controle e as diferentes formulações. No entanto, ao se analisar os gráficos das polpas, observou-se que os melhores revestimentos foram aqueles contendo 2% de kafirinas e 0,5% de OC e 2% de kafirinas; 0,25% de OC e 0,1% de NP de QS, os quais também apresentaram menores taxas de perda de massa.

Para analisar os revestimentos comestíveis quanto à sua molhabilidade pela técnica de AC e obtenção das imagens topográficas por MFA, as frutas, maçãs e peras, foram revestidas de acordo com o método descrito no item 3.1.4. Após o revestimento, cortou-se uma fatia do pericarpo para serem analisados. A seguir, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos.

4.6.5 Análise por Ângulo de Contato (AC).

Na figura 37, estão os dados obtidos por AC dos revestimentos depositados na superfície do epicarpo das maçãs. Um revestimento para ser considerado hidrofóbico, o valor de AC (θ) tem que ser $\geq 90^\circ$. Neste sentido, como observado nos gráficos, os revestimentos contendo 2% de Kafirinas + 0,25% OC sem NPs (37A linha vermelha) e o revestimento com a mesma porcentagem de kafirinas e OC com a adição de 0,1% de NPs de QS (37B linha vermelha) apresentaram valores em torno de 95° , sendo considerados então hidrofóbicos.

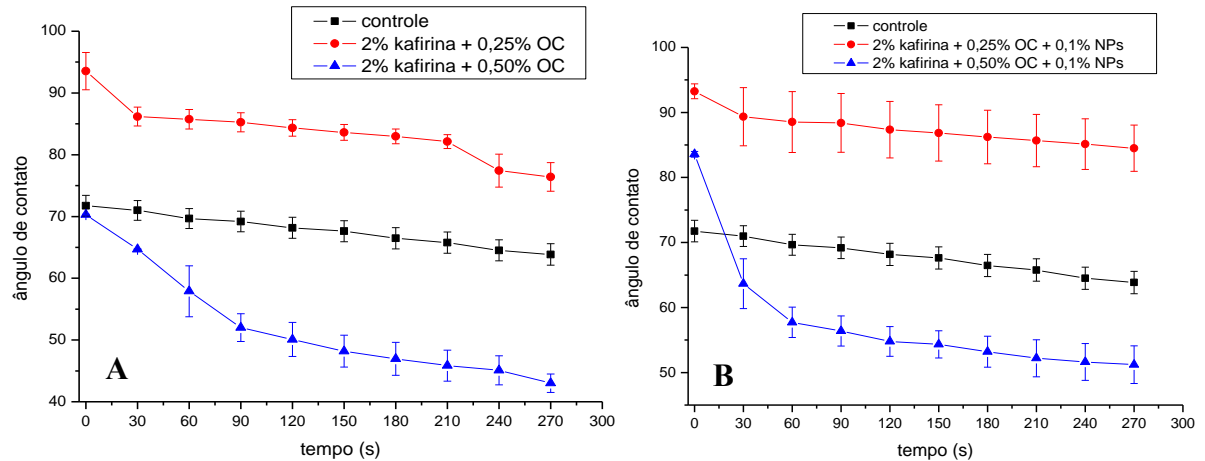


Figura 35: Gráficos de ângulo de contato representando o valor médio obtido das análises em maçãs com e sem NPs e seu desvio padrão em função do tempo. A) maçãs revestidas com solução filmogênica sem NPs; B) maçãs revestidas com solução filmogênica contendo NPs.

Os revestimentos com 2% de kafirinas + 0,50% de OC sem NPs (37A linha azul) e com NPs de QS (37B linha azul) apresentaram ângulo de contato abaixo de 90°, ficando em torno de 70° sem NPs e 85° com NPs. Observou-se um comportamento dependente do tempo para ambos os filmes em que o ângulo de contato diminuiu gradativamente para ambos os revestimentos. Este comportamento pode ser um indicativo que esses revestimentos possuem caráter predominantemente hidrofílico, e parece ter uma relação direta com o aumento da concentração de OC.

Em peras, pode-se observar que a deposição da gota na superfície das frutas controle, ou seja, sem revestimento, partiu de um ângulo inicial de aproximadamente 85° se mantendo estável durante todo o tempo de medida, mostrado na figura 38. Este resultado é superior ao AC formado na superfície das maçãs, AC de aproximadamente 70°, pertencentes ao grupo controle, apresentado na figura 37. Este fato pode ser explicado de tal forma que, a superfície das maçãs, ou seja, seu epicarpo é muito mais rugoso que o epicarpo das peras. Isto pode ser confirmado pelas imagens obtidas por MFA apresentadas no item 4.6.5 onde será melhor discutido.

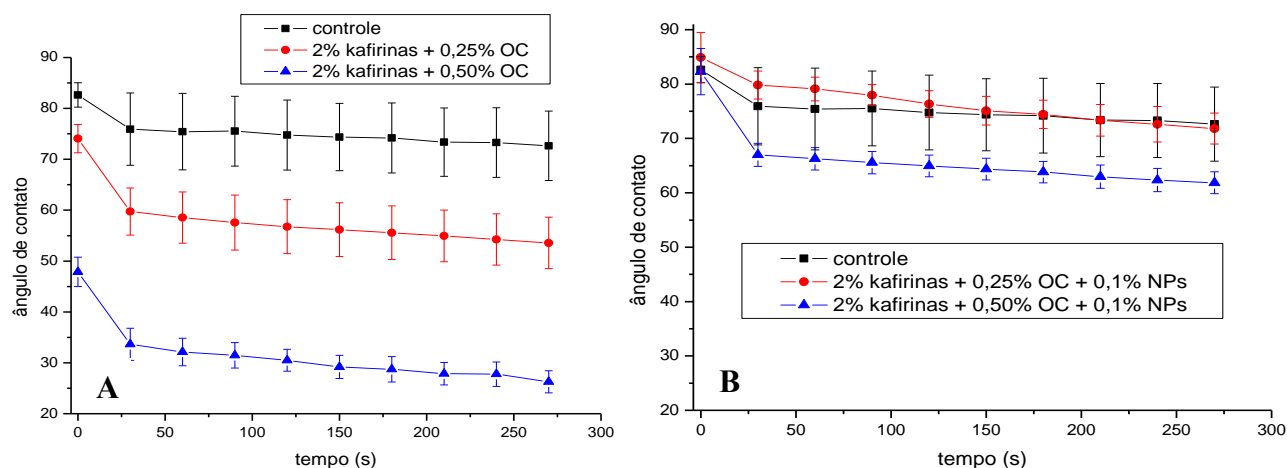


Figura 36: Gráficos de ângulo de contato representando o valor médio obtido das análises em peras com e sem NPs e seu desvio padrão em função do tempo. A) peras revestidas com solução filmogênica sem NPs; B) peras revestidas com solução filmogênica contendo NPs.

Tanto nas figuras 37 e 38, em peras e maçãs revestidas com e sem NPs de QS, o OC utilizado apresentou uma predominância no efeito mais hidrofílico, pois quando se aumentou a sua concentração nos revestimentos de 0,25% para 0,50% com e sem NPs, houve uma redução nos valores de AC. Este comportamento foi observado na literatura para revestimentos comestíveis contendo 4% de zeínas e AO, quando há um aumento deste último, o AC diminui gradativamente. Em tal estudo este efeito foi atribuído a uma reorientação das partes polares das moléculas tanto do AO quanto da proteína (SCRAMIN et al., 2011, MUTHUSELVI et al., 2006). No entanto, neste trabalho o plastificante utilizado foi um triglicerídeo, o OC, que é totalmente apolar, diferente do AO, desta forma o efeito de reorientação não deve ser o responsável pela maior hidrofiliicidade, mas sim como será discutido no próximo item (MFA), a uma maior rugosidade nos revestimentos que contém maior proporção de OC, o que segundo a literatura leva a um aumento da molhabilidade dos mesmos (CHOW, 1998).

Contudo, ao comparar os revestimentos depositados no epicarpo das frutas, aqueles com adição de NPs de QS apresentaram-se menos hidrofílicos tanto para a formulação contendo 0,25% de OC quanto para 0,50 do OC quando comparados com aquelas sem adição de NPs de QS. Este mesmo comportamento foi observado nos resultados apresentado para maçãs, como descrito acima.

Estudos recentes mostraram que a incorporação de NPs de QS em revestimentos comestíveis tem diminuído consideravelmente a permeabilidade ao vapor d'água. Esta diminuição está relacionada com a interação entre as NPs de QS e a matriz polimérica por diferentes tipos de ligações, tornando o revestimento mais compactado e assim dificultam a

difusão do vapor d'água. Moura et al., 2009, relata que quanto menor o tamanho das NPs, menor será a permeabilidade, pois as NPs de menor tamanho tem maior capacidade de se difundir pela matriz polimérica e ocupar os espaços vazios (poroso) presentes nos revestimentos. Estes mesmos autores produziram filmes de polpa de goiaba com adição de NPs de QS e observaram que, quando NPs de QS foram adicionadas nos filmes, os mesmos apresentaram propriedades mecânicas superiores e houve uma diminuição na hidrofobicidade destes filmes em questão (MOURA et al, 2008).

Martelli et al., (2013) também obtiveram filmes usando como matéria prima purê de bananas maduras com adição de pectina (0,5%), glicerol (usado como plastificante na concentração de 5% e 0,2 % (m/m) NPs de QS ($88,79 \pm 0,42$ nm de tamanho médio) incorporados em como material de reforço. A incorporação de NPs de QS também promoveu melhora das propriedades mecânicas e atuou na redução do taxa de permeação de vapor de água em 21% para os filmes processados com pectina e até 38% para filmes processados sem pectina, quando comparado com o controle (filmes purê sem pectina e nanopartículas).

No entanto, Rhim et al., (2006) analisaram nanocompósitos contendo NPs de QS e argila (ambas hidrofílicas) e observaram também uma redução a permeabilidade no vapor d'água. Porém, os autores não encontraram uma explicação para este efeito e afirmam que mais estudos devem ser realizados para explicar tal fenômeno.

Nas figuras 39 e 40, estão as imagens do ângulo de contato formado na superfície de cada revestimento.

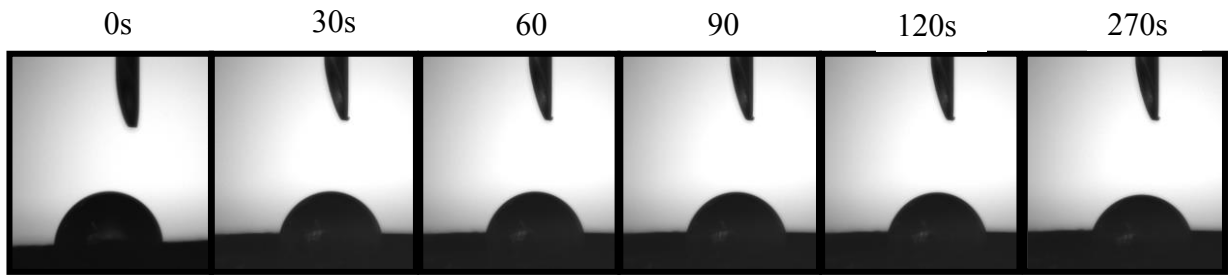
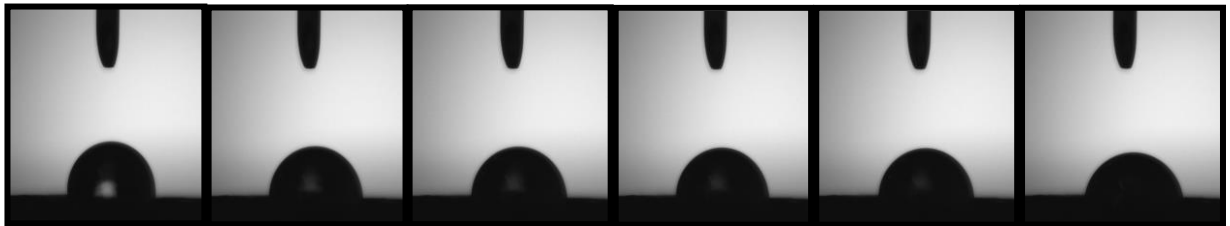
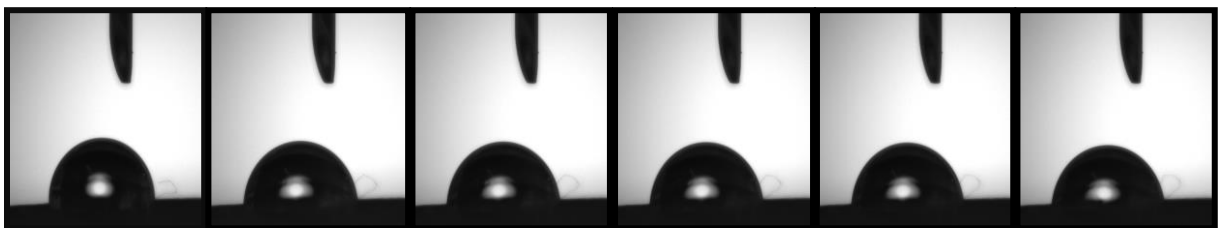
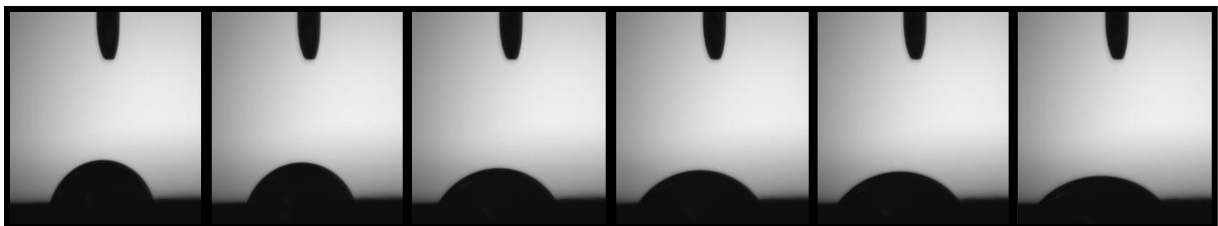
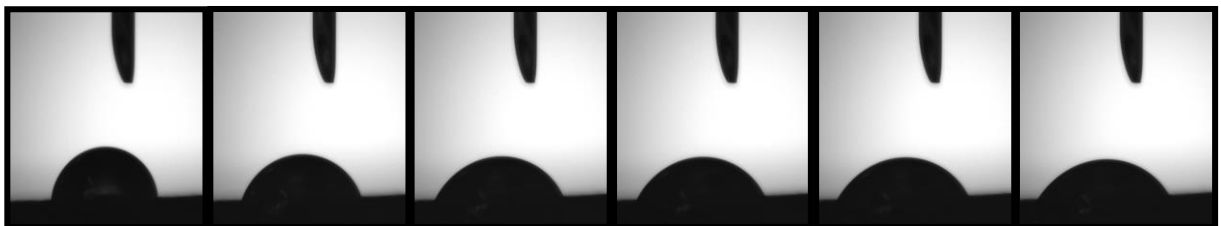
Controle**0,25% OC****0,25% OC + 0,1% NPs de QS****0,50% OC****0,50 OC + 0,1% NPs de QS**

Figura 379: Imagens do ângulo de contato formado pela gota de água depositada na superfície dos diferentes revestimentos aplicados no epicarpo de maçãs.

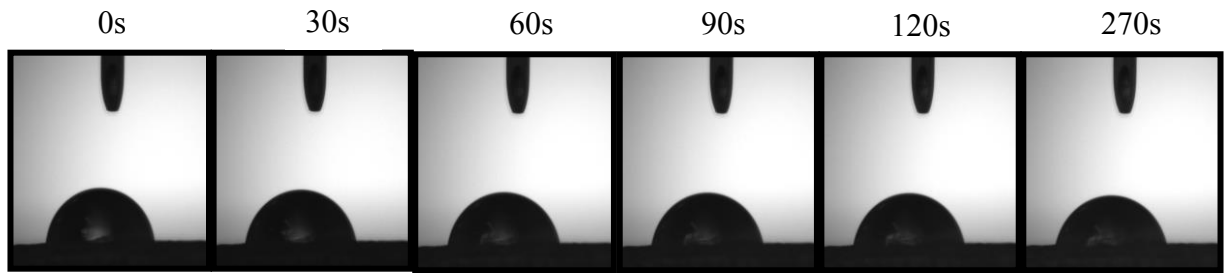
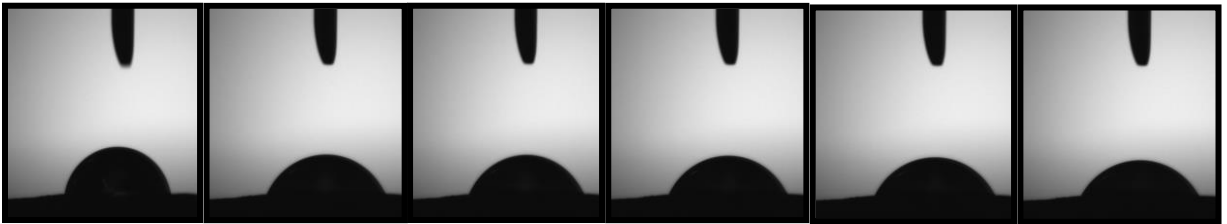
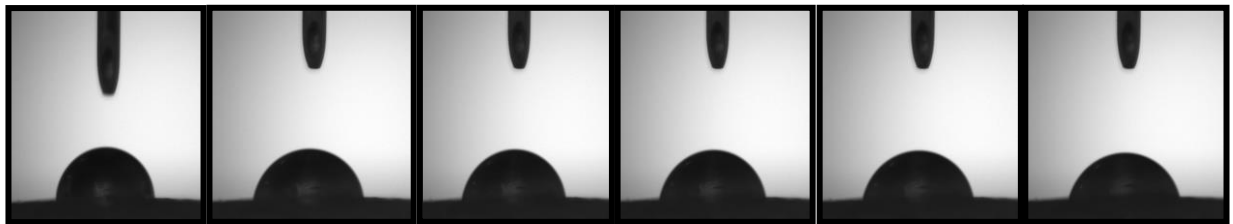
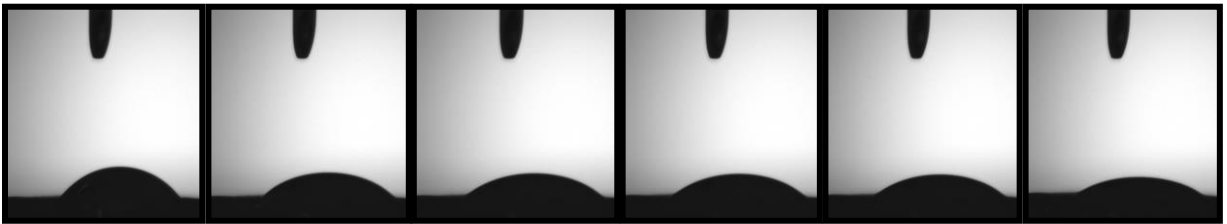
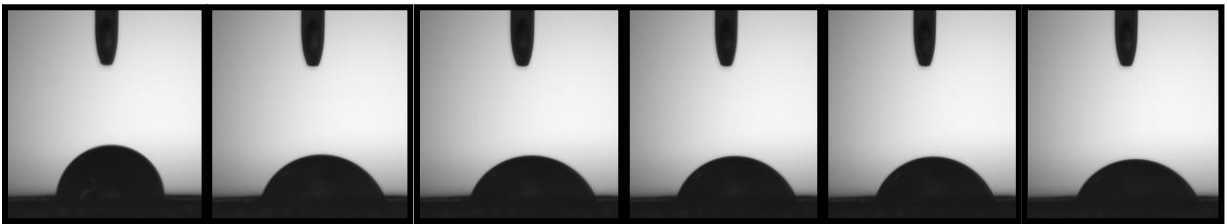
Controle**0,25% OC****0,25% OC + 0,1% NPs de QS****0,50% OC****0,50 + 0,1% NPs de QS**

Figura 40: Imagens do ângulo de contato formado pela gota de água depositada na superfície dos diferentes revestimentos aplicados no epicarpo de peras.

4.6.6 Análise por MFA.

Nas figuras 41 e 42 estão as imagens dos epicarpós de maçãs e peras e destes após a aplicação dos revestimentos sem NPs. Nas imagens com aplicação dos revestimentos observaram-se estruturas arredondadas. Isto pode ser atribuído à aglomeração das proteínas juntamente com o OC. Este mesmo padrão de imagem foi observado na literatura por Forato et al., 2001 para zeínas depositadas em filmes de mica, onde os autores atribuíram tal padrão de imagem a uma aglomeração de proteínas hidrofóbicas juntamente com seus lipídeos endógenos sobre uma superfície hidrofílica (mica).

Nas figuras 43 e 44, onde há adição de NPs de QS, tais aglomerados não são observados e isto pode ser atribuído à propriedade emulsificante da quitosana que torna o filme mais homogêneo. Segundo Pereda et al., 2012, a quitosana age como um estabilizante de hidrocolóides promovendo a formação de emulsão e estabilização interfacial. Assim, é frequentemente utilizada para emulsionar o óleo adicionado em soluções de formação de película. A quitosana tem sido utilizada para estabilizar emulsões contendo óleo de girassol (RODRIGUEZ et al., 2002), ácido oleico (VARGAS et al., 2009) e óleos essenciais como o óleo de bergamota (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010) sem a adição de surfactantes.

Esta ação da quitosana como emulsificante está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho através das medidas de rugosidade realizadas pelas imagens topográficas de MFA. Na tabela 3, estão apresentados os resultados obtidos referente a área total da imagem com dimensão de 5 μm x 5 μm .

Tabela 3: Medida de rugosidade dos revestimentos com e sem NPs variando a concentração do plastificante OC aplicado no epicarpo das maçãs e peras.

	Controle	Sem NPs de QS		Com NPs de QS	
		0,25% OC	0,50% OC	0,25%OC	0,50% OC
Maçãs	109,6 nm	114 nm	145 nm	39,8 nm	85,2 nm
Peras	20,7 nm	108,3 nm	330 nm	42,2 nm	49,9 nm

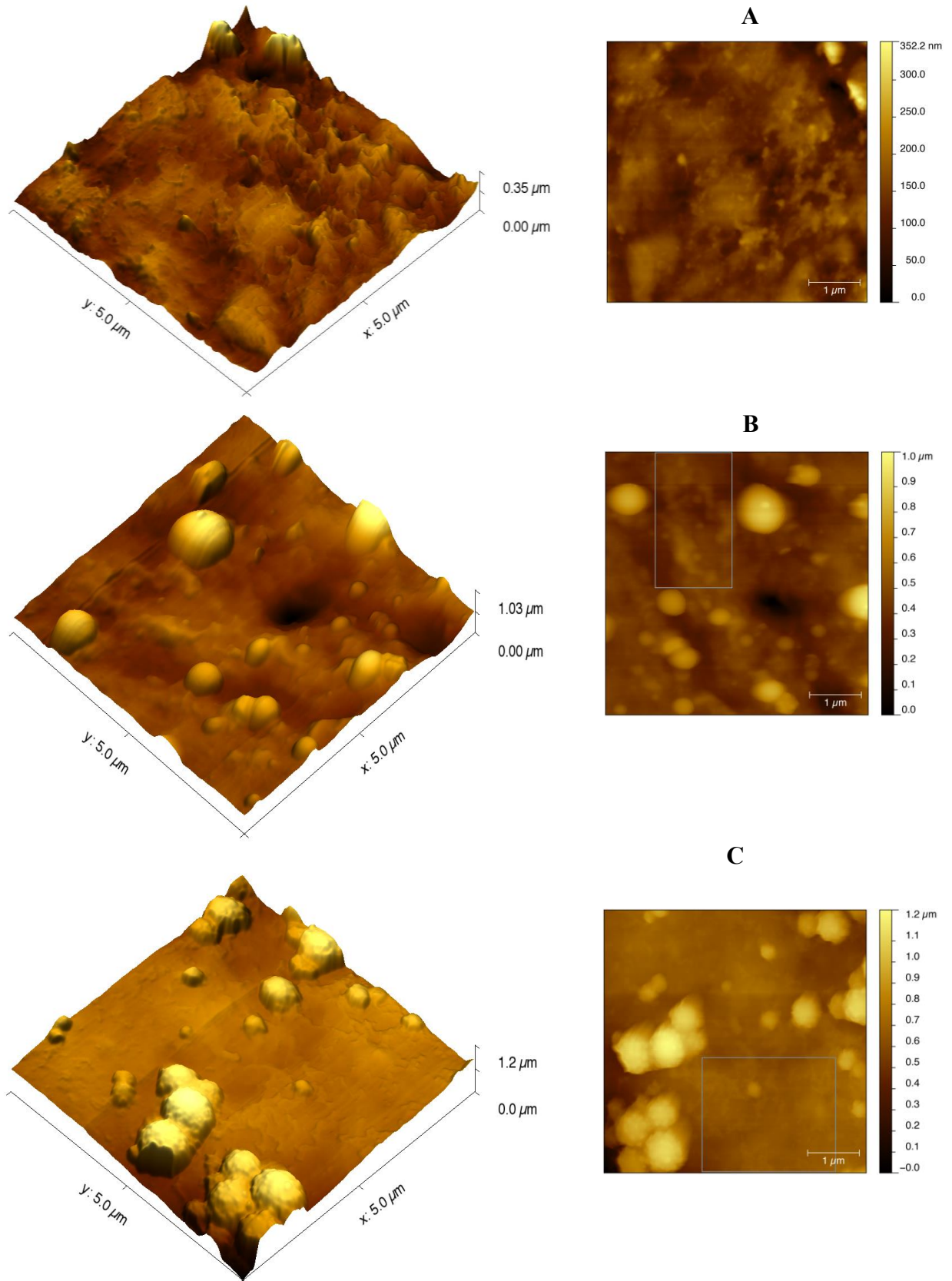


Figura 38: Imagens em 2 e 3D de MFA do epicarpo de maçãs. A) controle (sem revestimento), B) epicarpo revestido com 2% de kafirina e 0,25% OC e C) epicarpo revestido com 2% de kafirina e 0,50% OC.

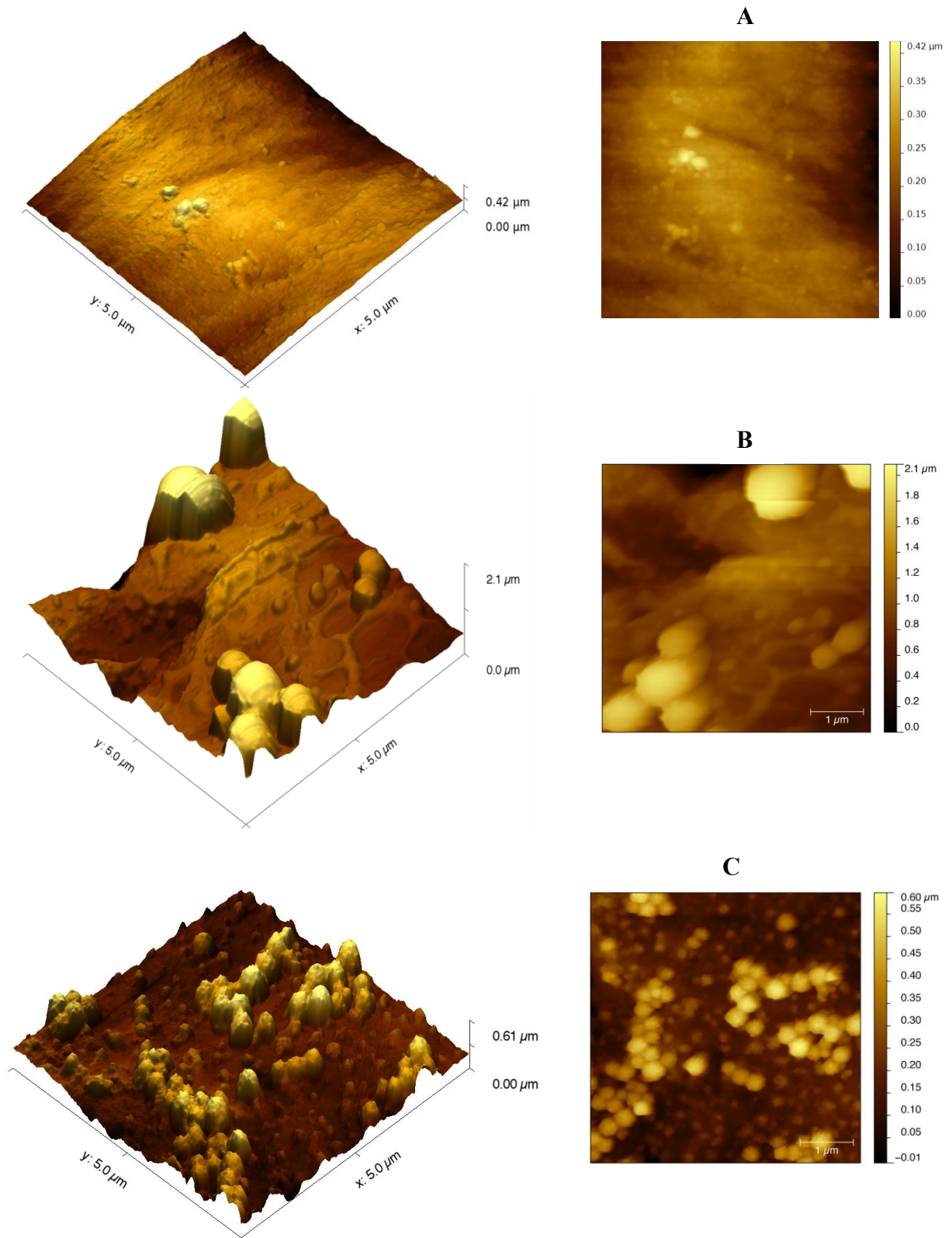


Figura 39: Imagens em 2 e 3D de MFA do epicarpo de peras. A) controle (sem revestimento), B) epicarpo revestido com 2% de kafirina e 0,25% OC e C) epicarpo revestido com 2% de kafirina e 0,50% OC.

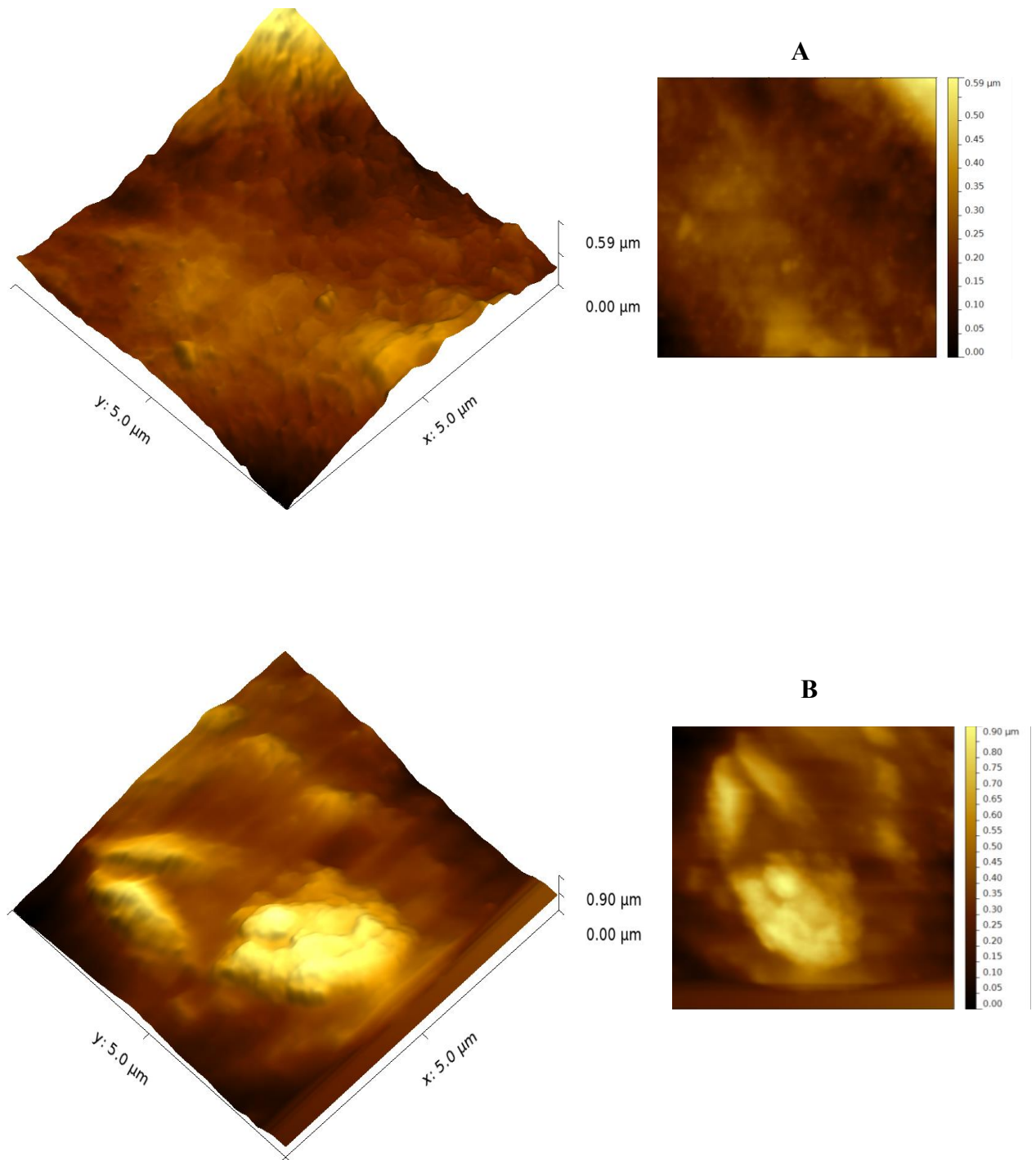


Figura 40: Imagens de MFA do epicarpo de maçãs. A) epicarpo revestido com 2% de kafirina + 0,25% OC e 0,1% de NPs de QS e B) epicarpo revestido com 2% de kafirina + 0,50% OC e 0,1% de NPs de QS.

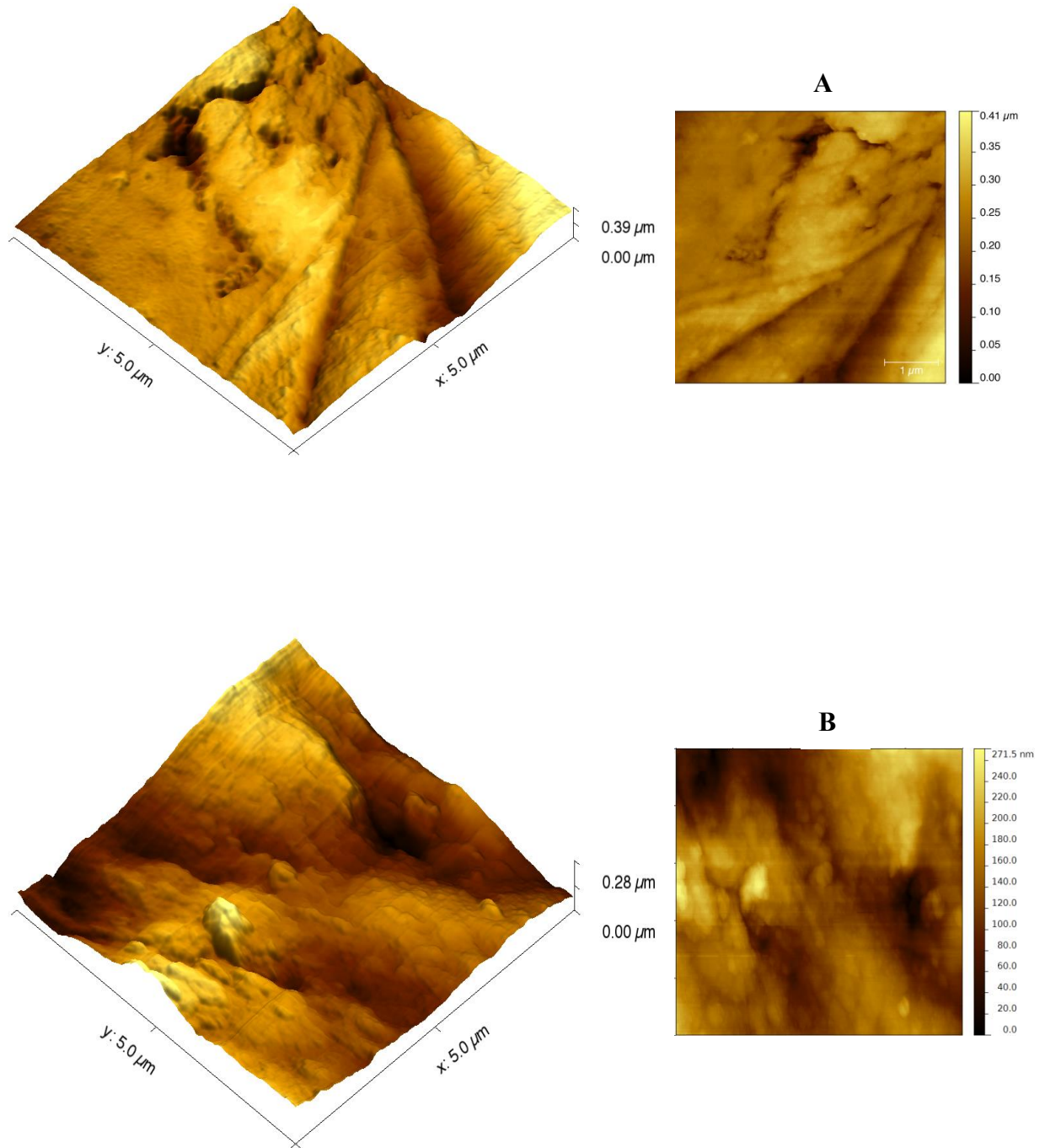


Figura 41: Imagens de MFA do epicarpo de peras. A) epicarpo revestido com 2% de kafirina + 0,25% OC e 0,1% de NPs de QS e B) epicarpo revestido com 2% de kafirina + 0,50% OC e 0,1% de NPs de QS.

Pode-se observar, pelos resultados de rugosidade, que a superfície dos revestimentos sem NPs de QS é mais rugosa em relação aos com NPs de QS. Fazendo uma comparação entre os revestimentos sem NPs, observou-se que ao aumentar a quantidade de plastificante, o OC, a rugosidade também aumenta. O revestimento contendo 2% de kafirina e 0,50% de OC possui rugosidade 145 nm enquanto que o revestimento com 2% de kafirina e 0,25% de OC apresentou rugosidade de 114 nm, ambos aplicados no epicarpo das maçãs. Em peras esse mesmo comportamento pode ser observado, porém com valores de 330 nm para o revestimento contendo 0,50% OC e 108,3 nm para o revestimento com 0,25% OC. Contudo, ao adicionar NPs, houve uma redução na rugosidade como já observado e então confirmado pelas medidas de rugosidade por MFA.

A rugosidade presente num revestimento pode aumentar a molhabilidade de sua superfície (JIANG et al., 2000). Chow (1998) relata que uma superfície rugosa reduz o ângulo de contato, pois aumenta a tensão superficial e alarga a linha de contato entre o sólido, no caso a superfície do revestimento, o líquido depositado em sua superfície e o vapor d'água presente em volta. Como foi possível observar pelas medidas de AC, ao aumentar a concentração de OC, os revestimentos ficavam mais hidrofílicos, isto com e sem adição de NPs de QS. Sendo assim, a rugosidade da superfície dos revestimentos está diretamente relacionada com as medidas de AC, pois quanto mais rugosa é a superfície devido à presença do OC, mais hidrofílico o revestimento tende a ficar, por isso os valores de AC para os revestimentos contendo 0,50% OC são mais hidrofílicos do que os com 0,25% de OC.

4.7 Toxicidade.

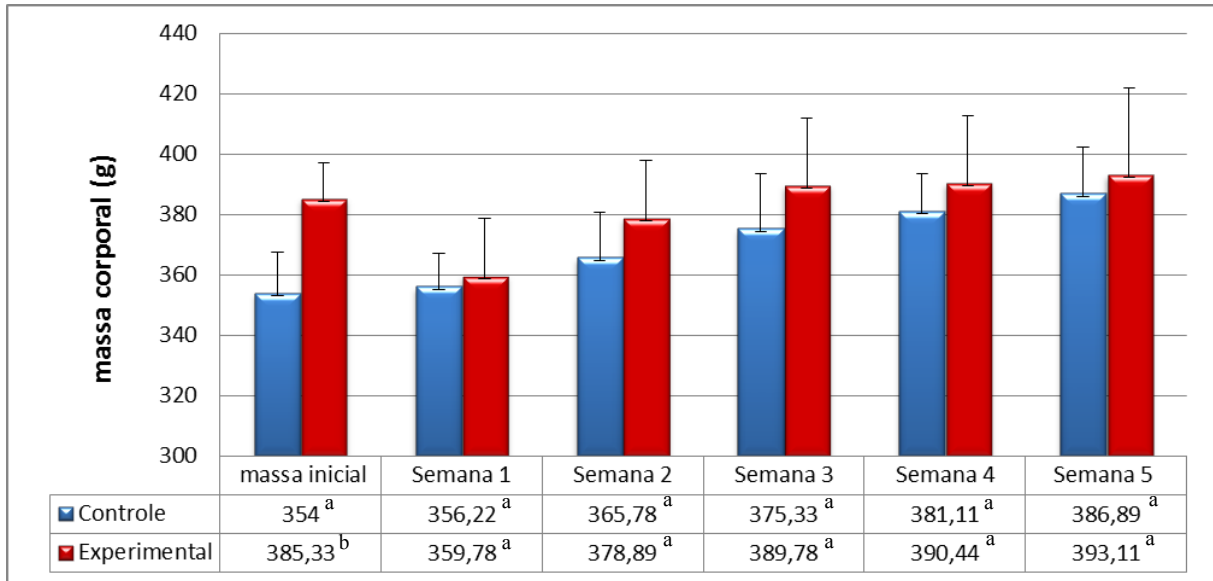
Para investigar a toxicidade do revestimento comestível a base de kafirinas e NPs de QS, testes toxicológicos foram realizados. Os parâmetros analisados foram: consumo de ração, ingestão hídrica e excreção de fezes e urina; massa corporal e massa dos órgãos; ensaios bioquímicos do soro sanguíneo e ensaios biomecânicos, densitometria e microtomografia óssea.

Para o cálculo das médias, foram utilizados como base apenas 9 ratos do grupo controle e o mesmo número para o grupo experimental. Durante todo o experimento, 10 ratos constituíam os dois grupos, porém o animal 2 do grupo controle e o animal 4 do grupo experimental apresentaram problemas desde o primeiro dia de experimento, podendo ser diagnosticado nos resultados obtidos para estes indivíduos. Sendo assim, para não influenciar na média final, optou-se pela retirada destes dois ratos.

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos referentes a estes parâmetros mencionados. Os resultados apresentados como média foram comparados entre os grupos controle e experimental pela análise de variância ANOVA seguido do teste t de Student aplicados pelo software Oringin™. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Vale ressaltar que para todas as análises aqui realizadas, nenhuma apresentou diferença significativa entre os grupos em análise, controle e experimental, exceto na massa corporal inicial dos ratos. Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos.

4.7.1 Massa Corporal (MC).

A pesagem dos animais é uma forma de verificar se os mesmos estão perdendo ou ganhando massa corporal. Na figura 45 está o gráfico representando a massa corporal dos grupos controle e experimental durante as cinco semanas de duração do experimento. Inicialmente os grupos apresentaram uma diferença significativa na MC, uma vez que os indivíduos não apresentam valores iniciais iguais. Após uma semana de experimento, o grupo controle não apresentou alteração significativa em sua MC enquanto que o grupo experimental apresentou diminuição de aproximadamente 6,7% no valor médio.



Médias seguidas letras diferentes apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 42: Gráficos representativos da massa corporal dos grupos controle (azul) e experimental (vermelho).

Sabendo que antes do início do experimento os animais eram mantidos em gaiolas comunitárias e a ração era em forma de "pellet", alterações na MC na primeira semana de experimento já era esperado, devido às mudanças de ambiente e da forma na qual os ratos eram alimentados. Porém é difícil afirmar que somente estas sejam as causas exatas da perda de MC do grupo experimental, pois o grupo controle não sofreu perda de MC durante este mesmo período. Entretanto, uma semana é considerada o tempo hábil para a readaptação destes animais. Nas semanas seguintes foi possível observar ganho de MC para ambos os grupos, como já esperado, indicando adaptação ao novo ambiente e crescimento de ambos os grupos.

Antes de se discutir as causas pelas quais o grupo experimental apresentou perda em sua MC na primeira semana, deve-se verificar como foi o consumo de ração ao longo do experimento. O consumo de ração dos animais de ambos os grupos, foi quantificado diariamente durante todo o experimento. Na figura 46 estão apresentados as médias do acumulado de cada semana do consumo de ração para o grupo controle (azul) e experimental (vermelho).

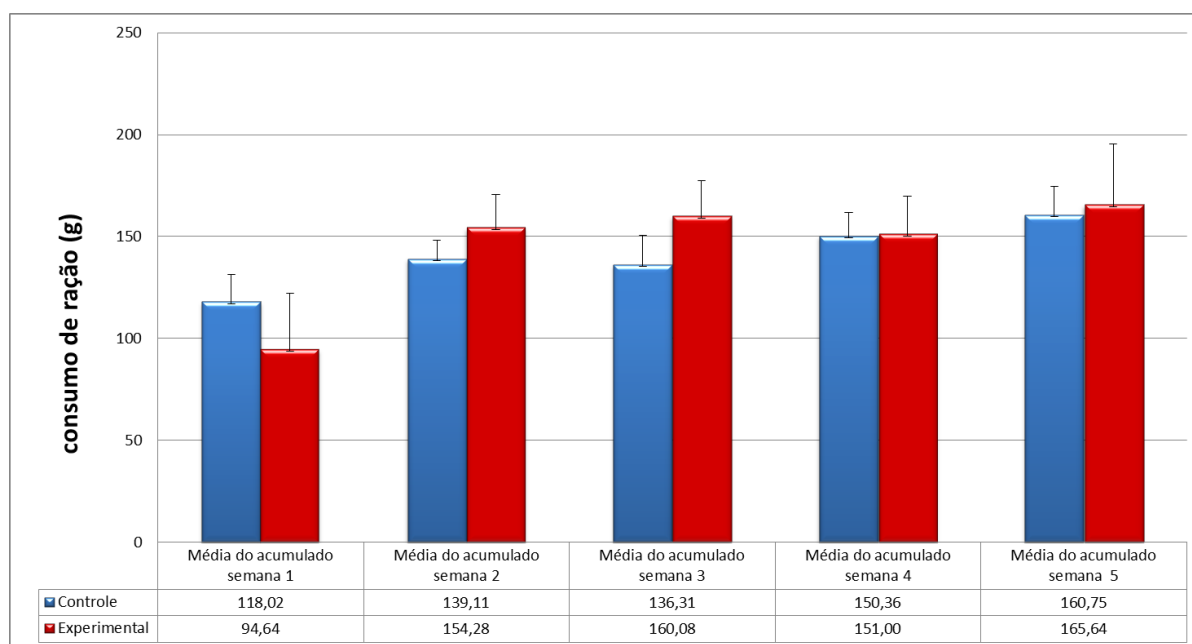


Figura 43: Consumo médio de ração pelos animais dos diferentes grupos, controle e experimental, durante o período de experimento. Os dados são apresentados como média do acumulado de cada semana.

Na primeira semana o grupo experimental teve um consumo de ração inferior de ração quando comparado com o grupo controle. Porém essa diferença, entre os grupos, não apresentou nenhuma significância. Ao analisarmos este parâmetro no decorrer das semanas, nota-se que o nível no consumo de ração aumentou sendo praticamente igual para ambos os grupos. Tais resultados estão compatíveis com os apresentados na figura 45 referente a perda de massa. Sendo assim, essa perda de MC observada no grupo experimental durante a primeira semana de experimento pode então ser atribuída ao cheiro da ração revestida e a até mesmo ao gosto, uma vez que estes animais apresentam fatores sensoriais como olfato e paladar extremamente sensíveis, sendo capaz de detectar no ar cheiro de determinadas substâncias (ANDRADE et al., 2002).

Segundo Neves et al. (2013) a mudança comportamental e principalmente a alteração na alimentação, são os principais parâmetros que influenciam diretamente no metabolismo dos ratos, ao passo que estes animais apreciam o convívio em grupo e por serem animais roedores, passam a maior parte do tempo forrageando, sendo uma forma de distração. Qualquer modificação nestes hábitos exige um esforço adicional para o restabelecimento no novo ambiente. Portanto, pela modificação nos hábitos convencionais e pela adição do revestimento na ração, fator este que mais influenciou nos resultados aqui apresentados, o

grupo experimental sofreu maior perda de MC na primeira semana do que o grupo controle devido ao baixo consumo de ração.

Outro parâmetro importante a ser analisado é o da ingestão hídrica. Freudenberg et al. (2013) constatou que, ao aumentar o nível de proteína na alimentação de ratos, significativamente aumentava a ingestão hídrica destes mesmos animais. Neste experimento, os autores compararam a ingestão hídrica entre dois grupos. O primeiro grupo, chamado de controle, teve em sua alimentação apenas 10% de conteúdo proteico, quantidade esta considerada adequada. O segundo grupo, teve uma dieta incrementada com 50% de conteúdo proteico. Após sete dias de experimento, o consumo total de água do grupo HP duplicou em relação ao grupo controle.

Corrêa (2013) também constatou que ao alimentar os animais (ratos da linhagem Wistar machos) com ração revestida contendo 4% de zeína com 0,1% de nanofibras de celulose e 0,5% de ácido oleico, aumentou significativamente em 14% na ingestão hídrica desses quando comparados com o grupo controle, alimentados com ração sem revestimento, devido ao aumento de 5% do conteúdo proteico.

Para investigar possíveis alterações na ingestão hídrica, o consumo de água dos animais de ambos os grupos, foi quantificado diariamente durante todo o experimento. Os resultados estão apresentados na figura 47.

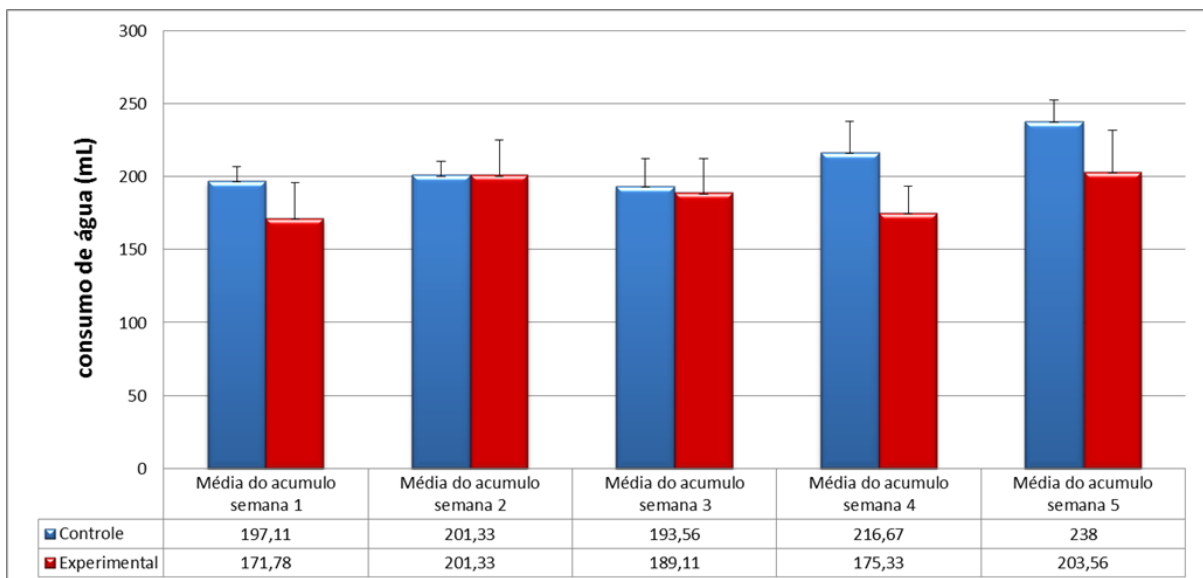


Figura 44: Gráfico de consumo hídrico. Média e DP do acumulado de cada semana dos 2 grupos em análise, controle (azul) e experimental (vermelho).

O volume de água consumido pelos animais de ambos os grupos manteve-se num padrão durante todo o experimento, como mostra a figura 47. Ao analisarmos o consumo médio de cada grupo, observamos que, apesar desta diferença não ser significativa pelo cálculo de Levene (teste t), na quarta semana o grupo experimental teve um declínio na ingestão hídrica. Tal variação pode estar associada a vários fatores e esta diminuição não pode ser considerável, pois na semana seguinte este mesmo grupo apresentou aumento no consumo hídrico.

Os animais deste estudo foram mantidos em gaiolas metabólicas para, além de quantificar a ingestão hídrica e o consumo de ração, quantificar também a excreção das fezes e urina. Ao coletar as fezes e obter o valor médio do acumulado de cada semana para ambos os grupos, controle e experimental, não foi observado nenhuma diferença significativa entre estes grupos em relação à quantidade de fezes excretada. Porém, na quarta semana, a quantidade de fezes excretada pelo grupo experimental está baixo do resultado observado pelo grupo controle, figura 48.

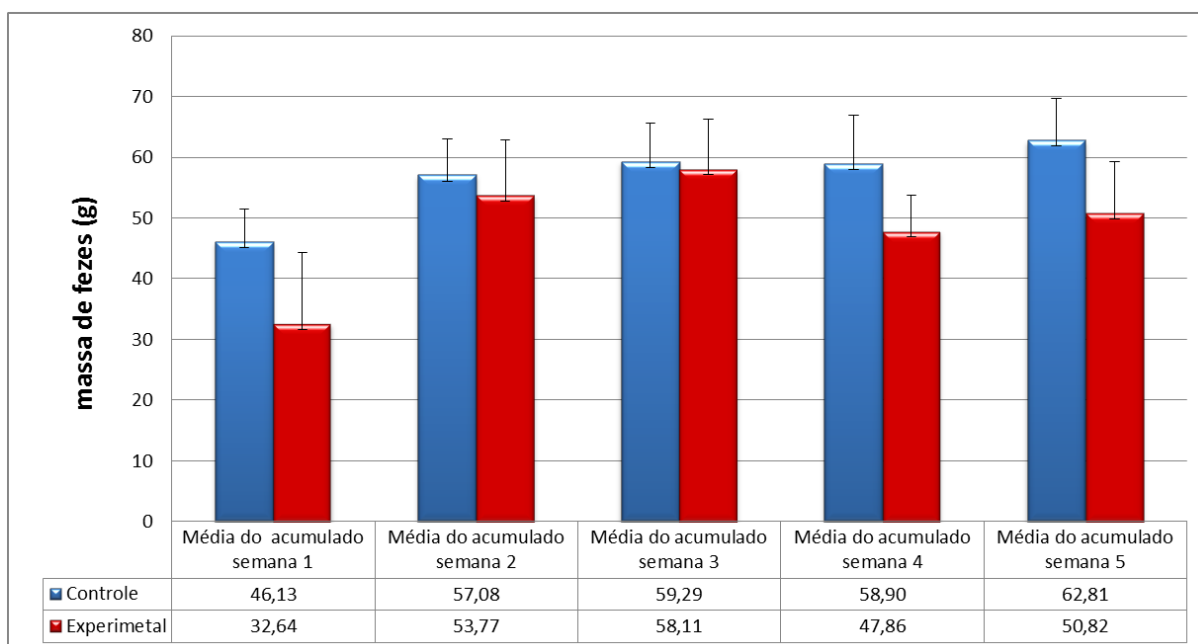


Figura 45: Excreção de fezes dos animais do grupo controle (coluna azul) e experimental (coluna vermelha). Os resultados estão representados pela média obtida do acumulado de cada semana e seu DP.

O bom funcionamento intestinal está associado à boa alimentação e também a quantidade de água que ingerida. A quitosana, como já mencionado, é constituída de fibras não digeríveis. Estas fibras ajudam a prevenir a constipação pelo aumento de peso do

conteúdo intestinal auxiliando na eliminação do bolo fecal. Tal atividade é melhorada se, em paralelo, o consumo de água for regular.

Como na quarta semana o grupo experimental ingeriu menos água, esta diminuição na ingestão hídrica alterou o bom funcionamento intestinal resultado na diminuição da excreção das fezes nesta mesma semana. Estes resultados indicam que o grupo experimental não apresentou quaisquer problemas relacionados com a digestão ou problemas gastrointestinais, uma vez que estes valores não apresentaram nenhum nível de significância entre os grupos, controle e experimental.

Os resultados apresentados na figura 49, referente ao volume da urina excretada, estão de acordo com os resultados obtidos pela ingestão hídrica apresentados na figura 46, pois com a diminuição na ingestão hídrica na quarta semana, houve também uma diminuição no volume de urina coletado neste mesmo período.

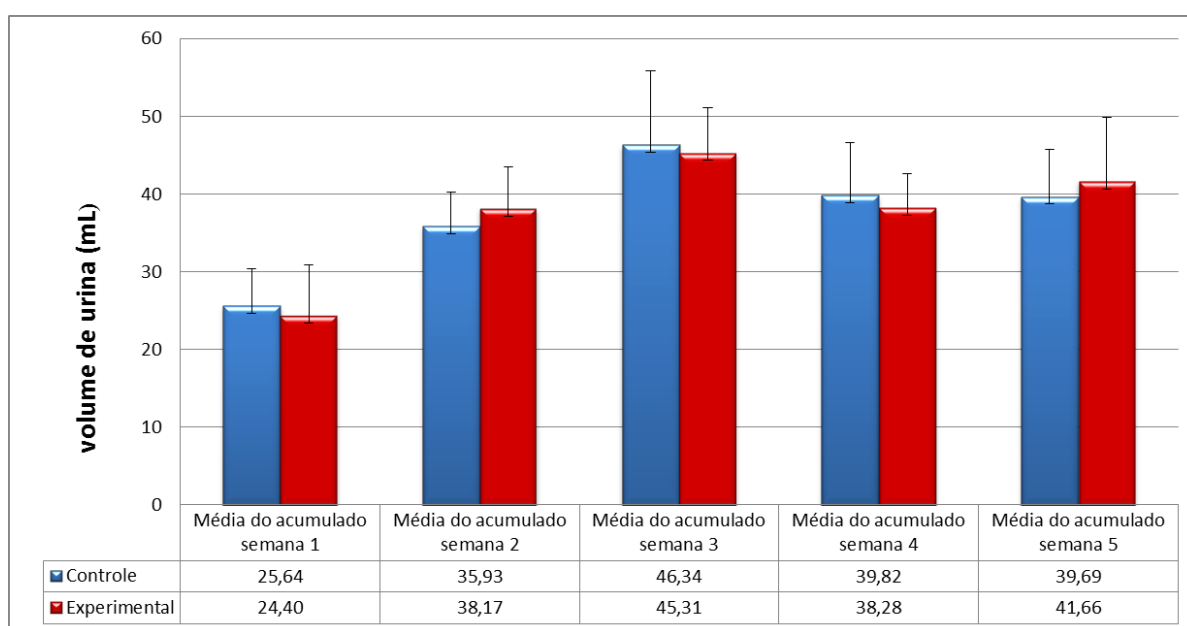


Figura 46: Volume de urina dos animais do grupo controle (coluna azul) e experimental (coluna vermelha). Os resultados estão representados pela média obtida do acumulado de cada semana e seu DP.

Após os 30 dias de experimento, tanto o grupo controle quanto o grupo experimental foram eutanasiados, por decapitação, e foram retirados os seguintes órgãos: rins, baço, fígado, coração, testículos, próstata e as vesículas seminais onde os mesmo foram pesados para a obtenção de suas massas. As vesículas seminais foram esvaziadas para a pesagem. A análise mostrou que não houve diferença de massa entre os órgãos do grupo controle com os do grupo experimental.

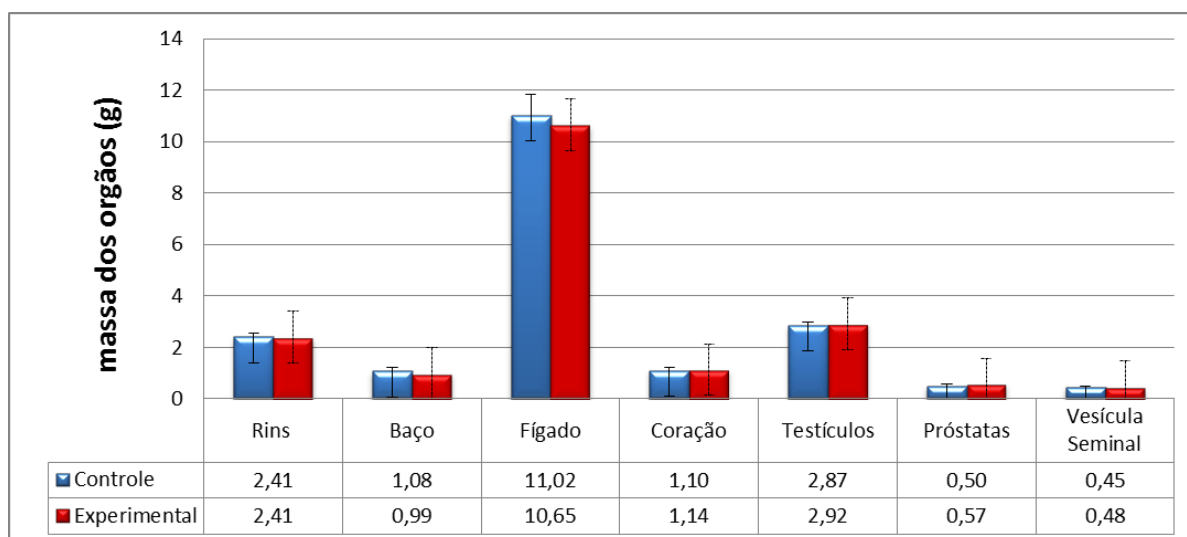


Figura 50: Massa dos órgãos coletados após a eutanásia dos animais.

Sendo assim, com base nos resultados apresentados, os ratos do grupo experimental apresentaram-se semelhantes, em relação ao grupo controle, em todos os parâmetros até aqui analisados. Pelo fato do grupo controle ter sido alimentado com ração sem revestimento e o grupo experimental com ração revestida, tal semelhança é um indicativo que a ração contendo o revestimento não apresenta nenhum efeito nocivo. Porém, outros testes, como análise bioquímica do soro sanguíneo, foram realizados e serão apresentados a seguir.

4.7.2 Análise bioquímica sanguínea.

Os testes bioquímicos do soro sanguíneo foram realizados na tentativa de diagnosticar possíveis alterações bioquímicas que poderiam ser provocadas pela ingestão do revestimento comestível contendo NPs de QS. Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos, controle e experimental e através dos cálculos estatísticos, no qual o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Este resultado se aplica para todas as concentrações séricas aqui estudadas.

Assim como o colesterol, os triglicérides são tipos de lipídeos (gorduras) e quando encontrados em excesso no organismo são prejudiciais podendo causar algumas doenças com as coronárias. Fazendo uma comparação entre os grupos, a concentração sérica do triglicérides e do colesterol total dos animais que compõem o grupo controle e experimental não apresentaram diferença significativa em relação aos níveis destas substâncias encontradas no soro sanguíneo, tabela 4. O mesmo pode ser observado na concentração sérica de glicose no qual o grupo controle apresentou 94 mg/dL e 95,89 mg/dL para o grupo experimental.

Em análises das concentrações séricas de ácido úrico e creatinina, substâncias estas que indicam o bom funcionamento dos rins, os resultados foram semelhantes entre os grupos controle e experimental. Para se analisar o estado do fígado, os níveis de AST (Aspartato Aminotransferase, antigo TGO – Transaminase Glutâmica Oxalacética) e ALT (Alanina Aminotransferase, antigo TGP – Transaminase Glutâmica Pirúvica) no soro sanguíneo foram investigados, pois são indicadores de lesões hepáticas. As concentrações séricas de AST e ALT estão representadas na tabela 4.

Tabela 4: Análise bioquímica do soro sanguíneo do grupo controle e experimental. Os dados estão apresentados como MED \pm DP.

	Unidade	Controle	Experimental
Triglicérides	mg/dL	64,44 \pm 27,08	78,89 \pm 27,57
Colesterol Total	mg/dL	62,78 \pm 6,61	69,44 \pm 7,60
Glicose	mg/dL	94 \pm 8,46	95,89 \pm 10,49
Ácido Úrico	mg/dL	1,41 \pm 0,46	1,31 \pm 0,32
Creatinina	mg/dL	0,58 \pm 0,07	0,51 \pm 0,03
AST	U/L	296,33 \pm 144,12	231,67 \pm 53,24
ALT	U/L	67,56 \pm 19,36	56,89 \pm 11,57
Fosfatase Alcalina	U/L	136,67 \pm 30,12	139,11 \pm 43,00
Fosforo	mg/dL	6,99 \pm 0,78	8,68 \pm 0,37
Cálcio	mg/dL	6,61 \pm 0,74	9,08 \pm 0,54
Bilirrubinas Totais	mg/dL	0,2	0,2

A fosfatase alcalina pertence a um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de vários fosfo-monoésteres em valores pH considerados alcalinos. Essa está amplamente distribuída por alguns órgãos como ossos, fígado, túbulos renais, baço, entre outros. Quando o nível de fosfatase alcalina no organismo está elevado, ocorre a hiperfosfatermia (nível anormal de fósforo no sangue). Esta ação é um indicativo de condições patológicas como hepatites virais, tumores nos ossos, fraturas ósseas, insuficiência renal, entre outras. Na tabela 4 estão as concentrações séricas de fosfatase alcalina encontradas no grupo controle, 136,67

U/L e experimental, 139,11 U/L. Nota-se uma semelhança nos resultados entre os grupos, não apresentando diferença significativa nos níveis de fosfatase alcalina encontrada. Como não houve anormalidade nos níveis de fosfatase alcalina, é possível observar que entre o grupo controle e experimental as concentrações séricas de fósforo encontrada são muito semelhantes. O mesmo pode ser observado nos níveis séricos de cálcio.

A bilirrubina é um pigmento de cor amarelada encontrada na bile, que normalmente circula no sangue sendo transportada até o fígado. A bilirrubina indireta, assim denominada quando está ligada à albumina plasmática, não é solúvel em água. No fígado, a bilirrubina se desliga da albumina e logo é conjugada com o ácido glicurônico, formando a bilirrubina direta ou conjugada. Esta se torna solúvel em água sendo excretada pela bile. Quantidade aumentada de bilirrubina (hiperbilirrubinemia) é indício de doenças hepáticas e se a concentração sérica for baixa, pode ser um pré- diagnóstico de anemia crônica. Sendo assim, através da obtenção das concentrações séricas de bilirrubinas no soro sanguíneo, tabela 4, observou-se que os valores obtidos para o grupo experimental foram iguais aos do grupo controle.

Através dos resultados aqui apresentados, pode-se observar que o grupo experimental, tratado com ração revestida contendo NPs de QS não apresentou alterações significativas nos níveis das substâncias aqui analisadas em relação ao grupo controle. Não foi observado efeito tóxico na ingestão de NPs de QS incorporadas no revestimento no fígado, pois os níveis de AST, ALT, fosfatase alcalina e bilirrubinas foram semelhantes aos dos animais do grupo controle. O mesmo ocorreu nos rins, devido a não alteração nas concentrações séricas de ácido úrico e creatinina.

No entanto, mesmo não apresentando anormalidade, não podemos afirmar se houve acúmulo destas NPs nos tecidos, uma vez que o diâmetro das NPs aqui estudadas foi inferior a 100 nm e tecidos como exemplo, o fígado, permitem a passagem de materiais com tamanho acima de 100 nm (GARBETT; KALLINTERI, 2006) e não foi possível analisar os tecidos dos órgãos coletados.

4.7.3 – Análise biofísica e biomecânica dos ossos.

Pela análise de densitometria óssea é possível verificar a quantidade de todos os minerais ósseos presentes numa área projetada no conteúdo mineral ósseo (CMO), e a densidade mineral óssea (DMO) é medida pela relação entre a massa e o volume presentes no tecido, dado pela unidade g/cm^2 . Na tabela 10, estão os valores de CMO e DMO encontrados no fêmur e na tíbia do grupo controle e experimental. Como visto, não existe diferença significativa nos valores encontrados quando comparados os dois grupos. Sabendo que o

grupo controle foi alimentado com ração sem revestimento e o grupo experimental com ração revestida, é possível pontuar que o revestimento aqui utilizado não apresenta nenhuma influência na perda ou no ganho excessivo de minerais presentes no osso.

Tabela 5: Valores de CMO e DMO encontrados no fêmur e a tíbia dos grupos controle e experimental.

g/cm ²	Fêmur Esquerdo			Tíbia Esquerda		
	CMO	Área	DMO	CMO	Área	DMO
Controle	0,361 ±0,02	1,744	0,188 ±0,01	0,262 ±0,01	1,57	0,151 ±0,01
Experimental	0,349 ±0,04	1,683	0,188 ±0,01	0,269 ±0,02	1,528	0,160 ±0,01

Fazendo uma comparação com os resultados da quantificação morfológica pela μ TC, apresentados na tabela 11, entre os grupos controle e experimental, nota-se que os valores para o volume do tecido ósseo, a espessura, o número e o espaçamento das trabéculas são semelhantes.

Tabela 6: Resultado da quantificação morfológica 3D das amostras da vértebra L4 do grupo controle e experimental.

	Controle		Experimental	
Volume do Tecido ósseo (mm³)	159,98	±36,97	162,34	±33,18
Volume do osso (mm³)	17,33	±2,65	20,02	±2,09
Volume do osso em porcentagem (%)	11,39	±3,09	12,75	±2,55
Espessura da Trabécula (mm³)	0,20	±0,03	0,21	±0,01
Número de Trabéculas (mm³)	0,57	±0,13	0,62	±0,11
Separação das Trabéculas (mm³)	1,70	±0,33	1,66	±0,28

Também é importante notar que a porcentagem do volume ósseo do grupo controle, $11,39 \pm 3,09$ e do grupo experimental, $12,75 \pm 2,55$ estão bem próximos. Caso o grupo experimental apresentasse uma porcentagem menor, isso seria um indicativo que o osso estaria mais poroso, isto é, mais fraco podendo apresentar algumas doenças como a osteoporose (SALES, 2010). Contudo, pela μ TC não foi possível verificar alguma diferença significativas entre os grupos, como também já visto pela análise de densitometria. Para confirmar tais resultados, foram realizados os testes biomecânicos.

Pelas análises realizadas no fêmur direito, os resultados mostraram que a força máxima, que corresponde à carga máxima suportada pelo osso, não apresentou diferença significativa entre o grupo controle, $137,7 \text{ N } (\pm 0,01)$, e o grupo experimental, $143 \text{ N } (\pm 0,01)$. O mesmo ocorreu com a rigidez (capacidade do osso em resistir a deformações), onde o grupo controle apresentou rigidez de $277,4 \text{ N/mm } (\pm 35)$ e o grupo experimental, $308 \text{ N/mm } (\pm 34)$. Sendo assim, pode-se se dizer que a qualidade do osso não foi alterada.

- ❖ Pelos resultados obtidos nas análises de SDS/PAGE pode-se observar que as kafirinas foram extraídas tanto na presença quanto na ausência de agente redutor, o bissulfito de sódio. Na ausência deste observou-se a presença da fração β em alta concentração e as frações α e γ em concentrações reduzidas, todas em suas formas monoméricas no grão. Com a adição do bissulfito observou-se a presença da fração β em menor concentração e maiores concentrações das frações α e γ , ou seja, polimerizadas no grão.
- ❖ Com as técnicas de IV e RMN de alta resolução no estado sólido foram obtidos os espectros, onde foi possível identificar sinais típicos de proteínas, indicando que a extração foi bem sucedida. Foi possível também identificar a presença de amido e de ácidos graxos livres nestas amostras. Ao adicionar bissulfito de sódio no processo de extração, observou-se uma redução significativa do amido. A presença de ácidos graxos livres, mesmo após a extração com solventes orgânicos, foi confirmada pelos espectros. Foi então levantada a hipótese de que as kafirinas, assim como as zeínas, podem estar interagindo com os ácidos graxos endógenos presentes nos grãos.
- ❖ Pela técnica de IV, as ES das kafirinas foram quantificadas, indicando que estas proteínas apresentam predominância em estruturas do tipo α hélices. Ao serem extraídas com etanol 70% sem agente redutor os valores encontrados foram de 43% de α hélices e 23% de folhas β . Kafirinas extraídas com agente redutor apresentaram 35% de estruturas do tipo α hélices e 28% de folhas β . Este aumento nas estruturas folhas β está relacionado com a diferença do conteúdo protéico indicado nos géis com e sem agente redutor, no entanto somente com as frações isoladas das kafirinas se pode afirmar qual a contribuição de cada fração nas ES totais.
- ❖ A avaliação das ES das kafirinas a partir dos seus espectros por RMN de ^{13}C (CPMAS) revelou 66% e 22% de estruturas α hélices e folhas β e 47% e 24% com e sem agente redutor, respectivamente. A maior proporção de hélices α , sem uso de agente redutor, está de acordo com os dados de IV, no entanto diferem um pouco da quantificação devido à

diferença dos métodos utilizados, pois para a quantificação por RMN utilizou-se métodos de aumento de resolução (segunda-derivada e ajuste do sinal) que dependem muito do operador e no caso do IV, utilizou-se um método de reconhecimento de padrões, que não apresenta esta limitação.

❖ Quanto ao aumento do tempo de prateleira dos frutos, observou-se que na presença dos revestimentos, com e sem NPs, as frutas amadureceram mais lentamente. No caso das maçãs, as frutas duraram 25 dias, 10 dias a mais que as frutas controles (sem revestimento) e as peras duraram 17 dias, 7 dias a mais que o controle. No entanto, foi observado que ao se adicionar NPs nos revestimentos, a perda de massa era maior. Isto foi atribuído ao fato de que os experimentos foram realizados em meses diferentes, e devido às altas temperaturas do mês de setembro, as frutas revestidas com NPs e analisadas neste período perderam mais massa do que as frutas revestidas sem NPs e analisadas no mês de julho.

❖ Pelos resultados de colorimetria, não foi possível observar mudanças significativas na cor das maçãs revestidas ao longo do tempo. Este comportamento indica que não houve degradação dos principais pigmentos, como as antocianinas e os carotenóides, presentes nesta fruta devido a barreira protetora formada pelos revestimentos protegendo a fruta e, assim, reduzindo a permeação de gases como O_2 , sendo este o responsável pela oxidação de tais pigmentos. Em peras, foi possível visualizar uma mudança na cor, de verde para amarelo ao longo do experimento. Porém, esta mudança de cor está relacionada com o amadurecimento natural das frutas, pois no 16º dia o ângulo de Hue para ambos os revestimentos, com e sem NPs, foi de 87º e 80º, respectivamente, indicando uma leve mudança na cor já que ângulo de Hue próximo de 90º a fruta é um indicativo de cor amarelada.

❖ As medidas de textura indicaram que, para maçãs, o período de 12 dias foi insuficiente para diagnosticar possíveis modificações tanto no epicarpo quanto na polpa, sendo necessário realizar mais medidas por um período maior. Para peras, com esse mesmo período de análise, foi possível diagnosticar mudanças na textura, principalmente na polpa indicando que os melhores revestimentos foram aqueles contendo 2% de kafirinas e 0,5% de OC e 2% de kafirinas; 0,25% de OC e 0,1% de NP de QS, os quais também apresentaram menores taxas de perda de massa.

❖ Com as imagens de MFA concluiu-se que as kafirinas tendem a formar aglomerados na presença do plastificante sem NPs. Ao adicionar as NPs de QS, foi observado o

desaparecimento dos aglomerados nos revestimentos. Este fato foi atribuído à ação de estabilizante e emulsificante que a quitosana apresenta, pois nos teste de rugosidade os valores obtidos para os revestimentos contendo NPs de QS foram menores que os sem NPs e isto para ambas as frutas analisadas, peras e maçãs.

❖ Os resultados obtidos pelos testes toxicológicos indicaram que não houve diferença significativa nos parâmetros analisados entre os grupos controle e experimental. Isto indica que, neste pré diagnóstico, o revestimento contendo NPs de QS, não é nocivos, porém outros tipos de teste, como análise dos tecidos dos órgãos deverão ser realizados.

PESPECTIVAS FUTURAS...

- ❖ Extrair e quantificar as ES de cada fração, α , β e γ de diferentes cultivares. Na literatura existem somente informações sobre as ES das kafirinas no geral e não de cada fração;
- ❖ Estudar as possíveis interações entre as kafirinas e os ácidos graxos endógenos presentes no grão de sorgo, uma vez que foi observado neste trabalho a presença deste nos espectros de IV e RMN obtidos mesmo após a sua extração;
- ❖ Desenvolver outros tipos de revestimentos usando as kafirinas como matriz, incorporar outros tipos de plastificantes bem como variar sua concentração e também utilizar outros tipos de NPs. Também seria interessante avaliar, nas mesmas condições de temperatura os revestimentos desenvolvidos, uma vez que este fator influencia diretamente na perda de massa;
- ❖ Aplicar estes revestimentos desenvolvidos em outros tipos de frutas e também em hortaliças, pois para cada tipo de fruta o revestimento apresenta uma ação diferente;
- ❖ Realizar ensaios mecânicos dos revestimentos;
- ❖ Dar continuidade aos testes toxicológicos, pois sabe-se os benefícios que estes tipos de revestimentos podem trazer, porém ainda são poucos os estudos realizados referente a esta questão.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S. W.; JOSHI, M.; REJENDRAN, S. Modulation of size, shape and surfasse change of chitosan nanoparticles with references to antimicrobial activity. **Advanced Science Letters**, v. 3, p. 452-460, 2010.
- ANDRADE, A., PINTO, SC., OLIVEIRA, RS., Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 388, 2002.
- ANITHA, A.; RANI, V. V. D.; KRISHNA, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, *O*-arboxymethyl and *N,O*-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, issue 4, p. 672-677, 2009.
- AOUADA, Marcia Regina de Moura. Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos. 2009. 119 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, de D.; FORATO, L. A. O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas *in natura* e minimamente processadas. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 29, 2009.
- AZEREDO, H. M. C. de. Películas Comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial da aplicação. **Boletim do CEPPA**. Curitiba, 21: 267, 2003.
- BALDWIN, E. A.; BURNS, J. K.; KAZONAS, W.; BRECHT, J.K; HAGENMAIER, R. D., BENDER, R. J. ; PESIS, E. Effect of two edible coatings with different permeability chacacterístics on mango (*Mangifera indica L.*) ripening during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 17, n. 3, 1999.
- BALDWIN, E. A. Edible Coating for Fresh Fruits and Vegetable: past, present, and future. In: KROTCHA, J. M.; BALDWIN, E. A.; CARRIERO-NISPEROS, M. **Edible Coating and Films to improve Food Quality**. New York: CRC- Press, v. 51, n. 2, p. 363-368, 1994.
- BALDWIN, E. A.; NISPEROS, M. O; CHEN, X.; HAGENMAIER, R.D. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 151-163, 1996.
- BANDEKAR, J. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta** 1120, p. 123–143, 1992.
- BARROS, J. C. S. M. de; GOES, A. de; MINAMI, K. Condições de conservação pós-colheita de frutos de pimentão (*Capsicum annum L.*). **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v. 51, n. 2, 1994.
- BEAN, S.R.; IOERGER, B.P.; PARK, S.H.; SINGH, H. Interaction between Sorghum Protein Extraction and Precipitation Conditions on Yeild, Purity, and Composition of Purified Protein Fractions. **Cereal Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 99-107, 2006.
- BELINI, U. L.; TOMAZELLO FILHO, M.; CASTRO, V. R. de, MUNIZ, G. I. B. de; LASSO, P. R. O.; VAZ, C. M. P. Microtomografia de Raios X (micro CT) Aplicada na

Caracterização Anatômica da Madeira de Folhosa e de Conífera. **Floresta e Ambiente**, v. 18, n. 1, p. 30-36, 2011.

BELTON, P. S.; DELGADILLO, I.; HALFORD, N.G.; SHEWRY, P.R. Kafirin structure and functionality. **Journal Cereal Sci.** v. 44, p. 272-286, 2006.

BERNARDES FILHO, R. Estudo de Proteínas do Glúten de Trigo por Técnicas Espectroscópicas e Microscópicas. 1998. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

BICUDO, Tatiana de Campos. Purificação e caracterização das zeínas γ em corpos proteicos de milho por técnicas espectroscópicas. 2005, 124 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

BLANCO, Michelli Abreu. Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™. 2011, 66 f. Dissertação de Mestrado (Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BOAS, E. V. B. V. Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 75 p.

BORATO, Carlos Eduardo. Desenvolvimento de sensores poliméricos para detecção de metais pesados e avaliação da qualidade de água. 2007. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

BUCHNER, S.; KINNEAR, M.; CROUCH, I. J.; TAYLOR, J.; MINNAAR, A. Effect of kafirin protein coating on sensory quality and shelf-life of ‘Packham’s Triumph’ pears during ripening. **Journal Sci Food Agric**, 91: 2814–2820, 2011.

BYARUHANGA, Y. B.; EMMAMBUX, M. N.; BELTON, P.S.; WELLNER, N.; NG, K. G.; TYLOR, J. R. N. *Journal Agric. Food Chem*, v. 54, 4198-4207, 2006.

BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvoluted FTIR Spectra. **Biopolymers**, v. 25, p. 69-487, 1986.

CAMPANA-FILHO, S. P. Propriedades e Aplicações de Quitosana. In: Propriedades e Aplicações de Quitosana: As de sistemas para a liberação controlada de fármacos. Goiânia: Revista Processos Químicos, v. 1, n. 2, p. 10-18, 2007.

CARVALHO, J. S. Caracterização de filmes de caseína e caseína acilada. 1996. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

CHITARRA, M. I. F; CHITARRA, A. B. Pós colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: Ed. UFLA, 2ed. p. 785, 2005.

CHITARRA, M. I. F. Fisiologia e qualidade de produtos vegetais. In: Armazenamento processamento de produtos agrícolas. Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 27. Poços de Caldas. p. 1-58, 1998.

CORRÊA, Tassiane Regina Alves. Desenvolvimento e avaliação toxicológica de filmes proteicos com adição de nanofibras de celulose para recobrimento de futas. 2013, 88 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

CHOW, T. S. Wetting of rough surfaces **Journal Phys. Condens. Matter**, v. 10, p. 445–451, 1998.

DINIZ, G. M. M. Produção de Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench Aspectos Gerais). Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 23, 2010.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, 363, p. 1–24, 2011.

DUODU, K. G.; TANG, H.; GRANT, A.; WELLNER, N.; BELTON, P. S.; TAYLOR, R. N. FTIR and Solid State ¹³C NMR Spectroscopy of Proteins of Wet Cooked and Popped Sorghum and Maize. **Journal. Cereal Sci.**, v. 33, p. 261-269, 2001.

DU, W.; NIU, S. S; XU, Y. L; XU, Z. R; FAN, C. L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohy Polymers**, v. 75, p. 385, 2009.

DU, W.; OLSEN, C. W.; AVENA-BUSTILLOS, R, J.; MCHUGH, T. H.; LEVIM, C. E.; FRIEDMAN, M. Antibacterial activity against *E. coli* 0157:H7, physical proprieties and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. *J. Food Sci*, 73: 378, 2008.

EL NOUR, I. N. A.; A. PERUFFO, D. B.; CURIONI, A. Characterisation of Sorghum Kafirins in Relation to their Cross-linking Behaviour. **Journal of Cereal Sci.**, v. 28, p. 197–207, 1998.

EMBRAPA MILHO E SORGO. Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – tecnologia Qualidade Embrapa. Documentos 139. Sete Lagoas, MG, 2012a.

EMBRAPA MILHO E SORGO. Sistema. Sistema Agroindustrial do Sorgo Sacarino no Brasil e a Participação Público- Privada: Oportunidades, Perspectivas e Desafios Documentos 138. Sete Lagoas, MG, 2012.

EMMAMBUX, M. N.; TAYLOR, J. R. N. Properties of heat-treated sorghum and maize meal and their prolamin proteins. **Journal of Agri. and Food Chem.**, v. 57, n. 3, p. 1045-1050, 2009.

EMMAMBUX, M. N.; STADING, M.; TAYLOR, J. R. N. Sorghum kafirin film property modification with hydrolysable and condensed tannins. **Journal Cereal Sci.**, v. 40, p. 127–135, 2004.

FAO. El sorgo y el mijo em la nutrición humana. Organizacion de las naciones unidas para la agricultura y la alimentetion, Roma, 1995.

FAO/WHO. Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and

agriculture sectors: potential food safety implications. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Rome, 2010.

FERREIRA, M. D. Tecnologias Pós Colheita em Frutas e Hortaliças. Embrapa Instrumentação, São Carlos-SP, 2011.

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 Acids**, v. 44, p. 519–528, 2013.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein Structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, n. 259, p. 136-141, 1998.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 20, n.5, p. 146-150, 1997.

FORATO, L. A.; BICUDO, T. C.; COLNAGO, L. A. Conformation of the alpha zeins in solid state by Fourier Transform IR. **Biopolymers**, v. 72, p. 421-426, 2003.

FORATO, L. A.; COLNAGO, L.A.; GARRATT, R. C.; LOPES, M. A. Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified alpha zeins by ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1543, p. 106-114, 2000.

FORATO, Lucimara Aparecida. Estudo das estruturas das zeínas por RMN, FTUR e MFA. 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Físico-química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHARANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, parties size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles ontended for gene delivery. **Colloids Surf.**, v. 44, p. 64, 2005.

GAO, C.; STADING, M.; WELLNER, N.; PARKER, M.; NOEL, T. R.; MILLS, E.N.C.; BELTON, P. S. Plasticization of a Protein-Based Film by Glycerol: A Spectroscopic, Mechanical and Thermal Study. **Journal Agr. Food Chem.**, v. 54, p. 4611-4616, 2006.

GAO, C.; TAYLOR, J.; WELLNER, N.; BYARUHUANGA, Y. B.; PARKER, M. L.; MILLS, E. N. C.; BELTON, P. S. Effect of Preparation Condtions on Protein Secondary Structure and Biofilm Formation of Kafirin. **Journal Agr. Food Chem.**, v. 53, p. 306-312, 2005.

GARNERT, M. C; KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. **Occup Med (Lond)**, v. 56, n. 5, p. 307-11, 2006.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações. **Fundação Calouste Gulbenkian**, Lisboa, 1987.

GILLGREN, T.; STADING, M. Mechanical and barrier properties of avenin, kafirin and zein films. **Food Biophys**, v. 3, p. 287–294, 2008.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, G. M. Prolongation of the Shelf-life of Perishable Fodd Prooduts using Biodegradable Films and Coating. **Lebensmittel-Wissenschaft und-**

Technologie, v. 29, n. 1-2, p. 10-7, 1996.

GUEDES, Pedro de Almeida. Utilização de Biofilmes na conservação pós-colheita de manga, cv. Rosa. 2007, 85 f. Dissertação de Mestrado (Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2007.

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

HANDENBERG, R. E. Wax and Related Coating for Horticultural Products. Agr. Res. Bul. 51-2. U. S. Dept. of Agric. Washington, D. C., 1967.

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

HOET, P. H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles - known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, n. 12, p. 1-15, 2004.

JAKOBSEN, R. J.; BROWN, L. L.; HUTSON, T. B.; FINK, D. J.; VEIS, A. Intermolecular interactions in collagen selfassembly as revealed by Fourier transform Infrared spectroscopy. **Science**, 220, p. 1288–1290, 1983.

JIANG, L.; WANG, R.; YANG, LI, B. T. J.; TRYK, D, A.; FUJISHIMA, A.; HASHIMOTO, K.; ZHU, D. B. Binary cooperative complementary nanoscale interfacial materials. **Pure Appl. Chem.**, v. 72, n. 1–2, p. 73–81, 2000.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edibles films and coatings: A review. **Food Technology**, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

KRICHELDORF, H. R.; MÜLLER, D. Secondary structure of peptides 16th. Characterization of proteins by means of ¹³C NMR CPMAS spectroscopy. **Colloid & Polymer Science**. v. 262, p. 856-861, 1984.

KROCHTA, J.; MILLER, K. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends Food Sci. Technol.** v. 8, p. 228-237, 1997.

KROCHTA, J. M. Proteins as raw materials for films and coatings: definition, current, status and opportunities. In: Protein-Based Films and Coatings. La Vergne, USA: Aristippos Gannadios, 2010.

LAND, T. A.; MALKIN, A. J.; KUTZNESOV, Y. G.; McPHERSON de YOREO, J. J. Mechanisms of protein and virus crystal growth: atomic force microscopy study of canavalin and STMV crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v. 166, n. 1-4, p. 893-899, 1996.

LASSO P. R. O.; VAZ C. M. P.; NAIME, J. M. Recomendações para utilização do microtomógrafo de raios-X Sky Scan 1172 em ciências agrárias e biológicas. Documentos 37, 2008.

LAVIALLE, F., ADAMS, R. G. AND LEVIN, I. W. Infrared spectroscopic study of the secondary structure of melittin in water, 2-chloroethanol and phospholipid bilayer dispersions. *Biochemistry* 21, 2305–2312, 1982.

LIMA, R.; FEITOSA, L.; PEREIRA, A. E. S.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; FRACETO, L. F. Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films. *J. Food Sci* 75(6):N89–96, 2010.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; PRAZERES, F. G.; MUSSER, R. S.; LIMA, D. E. S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chem.*, v. 90, p. 565- 568, 2005.

MAGALHÃES, P. C.; RODRIGUES, J. A. S. Fisiologia da produção do sorgo forrageiro. In: CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S.; FERREIRA, J. J. (Eds.). *Produção e utilização de silagem de milho e sorgo*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 227-241, 2001.

MANTSCH, H.H., CHAPMAN, D. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. New York: Wiley-Liss, 1995.

MARCOCCIA, R. A participação do etanol brasileiro em uma nova perspectiva na matriz energética mundial. 2007, 95 f.. Dissertação de Mestrado, PIPGE-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARTELLI, M. R.; BARROS, T. S. T.; MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C.; ASSIS, O. B. G. Effect of Chitosan Nanoparticles and Pectin Content on Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Banana Puree Films. **Journal of Food Science**. v. 78, n. 1, 2013.

MESA-STONESTREET, N. J. de; ALAVI, S.; BEAN, S. R. Sorghum proteins: The concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, 2010.

MAYO S, CHEN F, EVANS R. Micron-scale 3D imaging of wood and plant microstructure using high-resolution X-ray phase-contrast microtomography. **Journal of Structural Biology**, v. 171, n. 2, p. 182-188, 2010.

McHUGH, T. H; KROCHATA, J. M. Sorbital vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated Oxygen Permeability and Tensile Property Evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chem.**, v. 42, n.4, p. 841, 1994a.

McHUGH, T. H; AUJARD, J.F KROCHATA, J. M. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. **Journal of Food**, v. 59, p. 416-20, 1994.

MEDEIROS, Kelliane Almeida de. Desenvolvimento e testes *in vitro* de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais. 2011, 76 f. Dissertação (Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MIYAZAWA, T. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations. **The Journal of Chem. Physics**. v. 33, n.6, 1960.

MILLER, K.; KROCHTA, J. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends Food Sci. Technol.** v. 8, p. 228-237, 1997.

MUTHUSELVI, L.; DHATHATHREYAN, A. Contact Angle Hysteresis of Liquid Drops as Means to Measure Adhesive Energy of Zein on Solid Substrates. **PRAMANA-Journal of Physics.** v. 66, n.3, p. 563-574, 2006.

MOURA M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal Colloid Interf Sci,** v. 321, n. 2, p. 477–83, 2008.

MOURA, M. R. de; AOUADA, F. A.; ROBERTO J. AVENA-BUSTILLOS, TARA H. MCHUGH, JOHN M. KROCHTA, LUIZ H.C. MATTOSO. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. **Journal of Food Engineering.** v. 92, p. 448–453, 2009.

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; SOUZA-FILHO, M. S. M. Consumer's acceptance of fresh and combined methods processed melon, mango and cashew apple. **Revista brasileira de fruticultura,** Cruz das Almas, v. 23, p. 551-554, 2001.

NEVES, S. M. P.; ONG, F. de M. P.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A. dos; FONTES, R. S.; SANTANA, R. de O. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo, 2013.

NUNES, Carla Alexandra Pina da Cruz. Contribuição para a caracterização da fracção de prolaminas de duas variedades de sorgo. 2000. 134 f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Química dos Produtos Naturais e Alimentos). Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2000.

NUNES, A.; CORREIA, I.; BARROS, A. N.; DELGADILLO I. Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal. Agric. Food Chem.** v. 53, p 639-643, 2005.

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. Journal. Food Sci. Technol.** v. 39, p. 287-294, 2004.

ORIA, M. P.; HAMAKER, B. R.; AXTELL, J. D.; HUANG, C. P. A Highly digestible sorghum mutante cultivar exhibits a unique folder structure of endosperm protein bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Agricultural Sciences).** v. 97, n. 10, p. 5065-5070, 2000.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. S; SHEWFELT, R. L. Edible coating effects on storage life and quality of tomatoes. **Jornal of Food Science.** v. 59, n. 3, p. 568-570, 1994.

PARK, S. H.; BEAN, S. B. Investigation and optimization of the factors influencing sorghum protein extraction. **Journal. Agric. and Food Chem.,** v. 51, p. 7050-7054, 2003.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E.. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers,** v. 87, p. 1318 – 1325,

2012.

PETTERSEN, K.; NIELSEN, P. V.; BERTELSEN, G.; LAWThER, M.; OLSEN, M. B.; NILSSON, N. H.; MORTENSE, G. Potential of biobased materials for food packaging. **Food Science and Technology**. v. 10, p. 52-68, 1999.

PFEFFER, P. E.; GERASIMOWICZ, W. V. Nuclear Magnetic Resonance in Agriculture, CRC Press, 1989.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, issue 7, p. 641-678, 2009.

POLL, H.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E. dos; REETZ, E. R.; CARVALHO, C. de.; SILVEIRA, D. N. da. Anuário brasileiro da fruticultura, 2013.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antimicrobial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohyd Res.** 339(16), p. 2693–700, 2004.

RIBEIRO, Fayene Zeferino. Avaliação da qualidade de frutas por Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução. 2008, 85 f. Dissertação de Mestrado (Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

RHIM, J. W.; HONG, S. I.; PARK, H. M.; PERRY, K. W. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. **Journal Agric. Food Chem.** v. 54, p. 5814–5822, 2006.

RODRÍGUEZ, M. S.; ALBERTENGO, L. A.; AGULLO, E. Emulsification capacity of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 271–276, 2002.

SADAGOPAN, K.; SAWANT, S. N.; KULSHRESHTHA, S. K.; JARORI, G. K. Physical and chemical characterization of enolase immobilized polydiacetylene Langmuir-Blodgett film. **Sensors and Actuators B**. v. 115, p. 526-533, 2006.

SALES, E. S. Estudo da qualidade óssea através das técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios-X. Tese (Doutorado em Engenharia Nucler. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, CH. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 277–283, 2010.

SARVER JR., R. W.; KRUEGER, W. C. Protein secondary structure from Fourier Transform infrared spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 29, p. 61-67, 1991.

SCHOBER T.J., BEAN, S.R.; BOYLE, D.L. Gluten-Free Sorghum Bread Improved by Sourdough Fermentation: Biochemical, Rheological, and Microstructural Background. **Journal Agr. Food Chem.** v. 55, p. 5137-5146, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas de sistemas poliméricos

nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726, 2006.

SCHOFIELD, J. D.; BAIANU, I. C. Solid-state cross polarisation magic angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance and biochemical characterisation of wheat proteins. **Cereal Chemistry**. v. 59, p. 240–245, 1982.

SCRAMIN, J. A.; BRITTO, D. de; FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. Characterisation of zein-oleic acid and application in fruit coating. **International Journal of Food Science e Technology**. v. 46, p. 2145-2152, 2011.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento – DERAL – Departamento de Economia Rural. Fruticultura – Análise da Conjuntura Agropecuária, dezembro, 2012.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R. dos; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, Raimundo Lopes da. Sistema de liberação controlada de quitosana contendo antígeno capsular Vi de *Salmonella* Typhi. 2012, 97 f. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

SOUZA, C.C.; DANTAS, J.P.; SILVA, S.M.; SOUZA, V.C.; ALMEIDA, F.A.; SILVA, L.E. Produtividade do sorgo granífero cv. Sacarino e qualidade de produtos formulados isoladamente ou combinados ao caldo de cana de açúcar. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 25, n. 3, p. 512-517, 2005.

SOUZA, S. M. A. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares de origem bovina. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2001.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

SUREWICZ, W. K.; MANTSCH, H. H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 952, p. 115–130, 1988.

TEIXEIRA, C.G.; JARDINE, J.G.; BEISMAN, D.A. Utilização do sorgo sacarino como matéria-prima complementar à cana de açúcar para obtenção de etanol em micro-destilaria. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 17, n. 3, 1997.

TREPTOW, R. de O.; QUEIROZ, M. I.; ANTUNES, P. L. Caracterização físico-química e sensorial de quatro cultivares de maçãs (*Malus domestica* Borkh.). **Rev. Bras. de agrociência**. v. 1, n. 3, p. 179-184, 1995.

TORRES, G.B., SINÉZIO, C.C Tratamento Corona e Medidas de Ângulo de Contato em Embalagens Poliméricas Pós-Consumo. In: VI Congresso Brasileira de Engenharia Química em Iniciação Científica, UNICAMP, FEQ, 2005.

VARGAS, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, CH. Characterization of chitosan–oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**. v. 23, p. 536–547, 2009.

VILLADIEGO, A. M. D.; SOARES, N. de F. F.; ANDRADE, N. J. de.; PUSCHAMANN, R.; MINIM, V. P. R.; CRUZ, R. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v. 52 (300), p. 221-224, 2005.

WANG, Charles Chenwei. Efeito da administração crônica de nanopartículas de óxido de ferro magnético em ratos adultos jovens. 2010, 77 p. Tese (Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

WANG, G. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. **Journal Food Protection**. v. 55, p. 916-919, 1992.

WISHART, D. S.; SYKES, B. D. Chemical shifts as a tool for structure determination. **Methods in Enzymology**. v. 239, p. 363–392, 1994.

WU, S.; DELAND, J. M.; JOHNSON, L. A. Factors affecting yield and composition of zein extracted from commercial corn gluten meal. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 258-263, 1997.

WU, Y.V.; CLUSKEY, J.E.; JONES, R.W. Sorghum Prolamins: Their Optical Rotatory Dispersion, Circular Dichroism, and Infrared Spectra. **Journal Agr. Food Chem.** v. 19, n. 6, p. 1139-1143, 1971.

ZHANG, H.; MITTAL, G. Biodegradable Protein-Based films from Plant Resources. A Review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**. v. 29, n. 2, p. 203-220, 2010.

ZHENG, L. Y; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohy Polymers**, v. 55, p. 527-530, 2003.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO 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
n° 078/2012

Protocolo n°. 074/2012

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 comestíveis com incorporação de nanopartículas de quitosana*", submetido pela pesquisadora *Juliana Aparecida Scramin*.

São Carlos, 23 de novembro de 2012.

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais