



TALINE AMORIM SANTOS

**FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE QUITOSANA E
NANOFIBRAS DE CELULOSE
INCORPORADOS COM PAPAÍNA PARA A
APLICAÇÃO EM CARNES**

LAVRAS-MG

2018

TALINE AMORIM SANTOS

**FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE QUITOSANA E NANOFIBRAS
DE CELULOSE INCORPORADOS COM PAPAÍNA PARA A
APLICAÇÃO EM CARNES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Soraia Vilela Borges
Orientadora

Profa. Dra. Marali Vilela Dias
Coorientadora

LAVRAS-MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Taline Amorim.

Filmes biopoliméricos de quitosana e nanofibras de celulose
incorporados com papaína para a aplicação em carnes / Taline
Amorim Santos. - 2018.

135 p. : il.

Orientador(a): Soraia Vilela Borges.

Coorientador(a): Marali Vilela Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Embalagem biodegradável. 2. Embalagem ativa. 3. Enzima
proteolítica. I. Borges, Soraia Vilela. II. Dias, Marali Vilela. III.
Título.

TALINE AMORIM SANTOS

**FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE QUITOSANA E NANOFIBRAS
DE CELULOSE INCORPORADOS COM PAPAÍNA PARA A
APLICAÇÃO EM CARNES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de março de 2018.

Dra. Marali Vilela Dias	UFLA
Dra. Bruna de Souza Nascimento	UFLA
Dr. Eduardo Mendes Ramos	UFLA
Dr. Cassiano Rodrigues de Oliveira	UFV

Profa. Dra. Soraia Vilela Borges
Orientadora

LAVRAS-MG

2018

*À minha mãe Carmelina pelo apoio e incentivo e por ser meu maior
exemplo de vida
Ao meu noivo Marcos pelo companheirismo, carinho e apoio
incondicional ao longo destes anos.
À minha irmã Talita pela cumplicidade e incentivo.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque Ele é a luz, fortaleza, proteção e sabedoria que dá sentido à minha vida, por me dar saúde e permitir que eu concluísse este trabalho.

À minha mãe Carmelina por todo amor, incentivo e dedicação durante toda a minha vida, por não me deixar desanimar em meio às dificuldades.

Ao meu noivo Marcos por está comigo em todos os momentos bons e difíceis durante essa caminhada, por todo amor, carinho e compreensão e por ter feito café para mim nas manhãs que acordei após uma noite exausta de estudos.

À minha orientadora Soraia Vilela Borges, por me receber com tanto carinho, amor e dedicação, pela paciência, amizade, confiança e por sempre acreditar em mim.

À minha irmã Talita que sempre me apoiou e me incentivou em todos os momentos dessa caminhada.

À minhas amigas Ana e Simone que desde a graduação estão ao meu lado me ajudando a seguir em frente sem desanimar.

À professora Marali Vilela Dias pelo apoio, dedicação e incentivo.

Aos colegas do laboratório de embalagens que fizeram desses anos uma experiência agradável e cheia de novas descobertas.

Ao professor Eduardo Ramos pelos ensinamentos com as análises da carne.

Aos colegas do Laboratório de Carnes, em especial a Lorena por toda a ajuda a mim prestada.

Aos professores e colegas do departamento de Ciência dos alimentos.

À Universidade Federal de Lavras

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes de quitosana com nanofibra de celulose incorporada com papaína para melhorar a maciez da carne bovina. Os filmes foram desenvolvidos pela técnica de *casting* seguindo um delineamento fatorial completo 3x4 com 3 níveis de NFC (0, 4 e 8%) e 4 níveis de papaína (0, 2, 6 e 10%). Os filmes obtidos foram caracterizados com relação às propriedades mecânicas, térmicas, de barreira, ópticas, solubilidade em água, espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), difração de raio-X, microscopia eletrônica de varredura e atividade proteolítica. O estudo da difusão da papaína através dos filmes foi realizado nos filmes com 2% de papaína. Os filmes foram aplicados em bifes de carne bovina (*M. Longissimus Thoracis et Lumborum* – contra filé) por um período de 21 dias de armazenamento a 2 °C para avaliar o efeito amaciante da embalagem. As análises realizadas nas carnes foram: atividade proteolítica da carne, força de cisalhamento (WBSF), índice de fragmentação, cor, pH e perda por cozimento. Os resultados das análises de caracterização dos filmes indicaram que os filmes com até 6% de papaína e 4% de NFC apresentaram melhorias na maioria das propriedades estudadas. O estudo da liberação mostrou que a difusão da papaína nos filmes de quitosana seguem o mecanismo Fickiano e que a presença de NFC na matriz de quitosana atuou reduzindo a liberação da papaína em meio aquoso. Com os resultados obtidos na aplicação dos filmes na carne bovina, observou-se que os filmes com 6% de papaína foram suficiente para promover uma melhoria na maciez da carne bovina armazenada por 21 dias, quando comparados à carne embalada com uma embalagem comercial.

Palavras-chave: Embalagens biodegradáveis, Embalagem ativa, Enzima proteolítica.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this work was to develop and characterize chitosan films with cellulose nanofibers incorporated with papain to improve the softness of bovine meat. The films were developed by the casting technique following a 3x4 complete factorial design with 3 levels of NFC (0, 4 and 8%) and 4 levels of papain (0, 2, 6 and 10%). The obtained films were characterized with respect to the mechanical, thermal, barrier properties, optics, water solubility, infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction, scanning electron microscopy and proteolytic activity. The study of the papain diffusion through the films was performed in films with 2% papain. The films were applied to beef steaks (*M. Longissimus thoracis et lumborum* -) for a period of 21 days storage at 2 °C to evaluate the softening effect of the package. Meat analyzes were: meat proteolytic activity, shear force (WBsSF), myofibrillar fragmentation index, color, pH and cooking loss. The results of the characterization analysis of the films indicated that films with up to 6% of papain and 4% of NFC showed improvements in most of the studied properties. The release study showed that the diffusion of papain in the chitosan films follows the Fickian mechanism and that the presence of NFC in the chitosan matrix acted to reduce the release of papain in aqueous medium. With the results obtained in the application of the films in the beef, it was observed that the films with 6% of papain were sufficient to promote an improvement in the tenderness of the beef stored for 21 days, when compared to the meat packaged with a commercial packaging.

Keywords: Biodegradable packaging, Active packaging, Proteolytic enzyme.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Polímeros biodegradáveis	13
2.2	Quitosana	14
2.3	Nanocompósitos	16
2.4	Nanofibra de celulose	17
2.5	Embalagens Ativas	19
2.6	Maciez da carne bovina	20
2.7	Papaína	24
2.8	Difusão de compostos ativos em matrizes poliméricas	26
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	31
4	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	42
	ARTIGO 1 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE PAPAÍNA NAS PROPRIEDADES DE FILMES DE QUITOSANA REFORÇADOS COM NANOFIBRAS DE CELULOSE	42
	ARTIGO 2 – LIBERAÇÃO DE PAPAÍNA INCORPORADA EM FILMES DE QUITOSANA REFORÇADO COM NANOFIBRA DE CELULOSE	75
	ARTIGO 3 - APLICAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA/NANOFIBRA DE CELULOSE INCORPORADOS COM PAPAÍNA PARA MELHORAR A MACIEZ DA CARNE BOVINA	105

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os materiais plásticos são largamente utilizados na produção de embalagens para alimentos por apresentarem boas propriedades mecânicas, baixo custo, facilidade de selagem térmica e compatibilidade com uma ampla faixa de produtos alimentícios. Porém, os problemas ambientais que surgiram com os descartes inadequados das embalagens plásticas, causados pelo o acúmulo de resíduos não biodegradáveis e não recicláveis, tem impulsionado a produção de embalagens biodegradáveis obtidas de biopolímeros.

A quitosana é um biopolímero com grande potencial para a produção de embalagens biodegradáveis, pois apresenta propriedades como, excelente capacidade de formar filmes transparentes e flexíveis, renovável, biodegradável e baixo custo. A quitosana é um polissacarídeo obtido principalmente da desacetilação alcalina da quitina, um dos biopolímeros mais abundantes da natureza sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos.

O uso de biopolímeros na produção de embalagens biodegradáveis para aplicação em alimentos tem sido fortemente limitado por causa das suas propriedades de barreira precárias e propriedades mecânicas e térmicas fracas, quando comparadas aos polímeros tradicionais obtidos do petróleo. Uma alternativa para melhorar as propriedades dos polímeros biodegradáveis e torná-los competitivos com os polímeros sintéticos, é o uso de materiais de reforço em nanoescala. Por apresentarem alta relação de aspecto (área/volume), quando adicionados aos biopolímeros, os nanomateriais podem melhorar drasticamente as propriedades dos nanocompósitos resultantes, tais como aumento da resistência mecânica, elevadas propriedades de barreira e maior resistência térmica.

As nanofibras de celulose (NFC) têm sido amplamente empregadas na produção de nanocompósitos devido à sua alta resistência à tração, baixa densidade, biodegradabilidade e baixo custo, além de ser renovável. Muitas pesquisas relataram que as nanofibras de celulose apresentam um alto potencial para serem empregadas na produção de filmes transparentes e extremamente fortes, permitindo o desenvolvimento de embalagens compatíveis com o meio ambiente e de alto desempenho.

Contudo, tem se observado como tendência nas pesquisas, o desenvolvimento de embalagens que além de exercer as funções básicas como conter e proteger o alimento aos danos externos, as mesmas são capazes de interagir intencionalmente com o alimento embalado e de alguma forma melhorar a qualidade deste produto. A maioria das embalagens ativas tem a sua eficiência baseada na liberação do agente ativo, e o transporte de massa por difusão é quase sempre o que predomina no controle da liberação. O conhecimento do mecanismo de difusão desses compostos no interior do filme é um fator determinante no desenvolvimento de sistemas de embalagem que possuem o objetivo de aumentar a vida útil dos alimentos ou até mesmo melhorar alguma característica relacionando a qualidade dos mesmos através da migração do composto ativo para o produto embalado.

A incorporação de enzimas proteolíticas, em filmes poliméricos destinados à produção de embalagens para carnes, surge como uma tecnologia promissora para melhorar a qualidade da carne, pois apresenta a vantagem de permitir a migração da enzima para o produto embalado, promovendo o amaciamento de cortes cárneos, considerados “duros”, durante o período de armazenamento refrigerado e distribuição.

A maciez é considerada uma das características sensorial mais importante relacionada à qualidade da carne e que contribui para a aceitação dos consumidores. Diferentes tecnologias são utilizadas para melhorar a maciez da

carne bovina, como a maturação, a tenderização mecânica e a aplicação de amaciantes cárneos contendo enzimas proteolíticas. Dentre as enzimas proteolíticas empregadas como amaciante cárneo, a papaína se destaca devido à sua capacidade de desagregar proteínas miofibrilares e tecidos conectivos da carne. A papaína é uma enzima proteolítica proveniente do mamão (*Carica papaya*) e sua importância comercial deve-se a várias aplicações na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Até agora, os estudos realizados sobre a utilização de enzimas proteolíticas para amaciar a carne foi dirigido à sua aplicação diretamente na carne, no entanto, nenhuma pesquisa foi realizada utilizando embalagens biodegradáveis contendo enzimas proteolíticas para serem aplicadas em cortes cárneos com o intuito de promover a liberação dessas enzimas durante o período de armazenamento e distribuição, proporcionando uma melhoria na maciez da carne.

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes de quitosana com nanofibra de celulose incorporada com papaína e avaliar a utilização destes filmes para melhorar a maciez da carne bovina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Polímeros biodegradáveis

A embalagem tem um papel fundamental no armazenamento, transporte e manutenção da qualidade dos alimentos. Os plásticos são amplamente utilizados como embalagens, devido a boas propriedades mecânicas, baixo custo, baixa permeabilidade ao vapor de água e alta compatibilidade com diferentes alimentos. Os polímeros à base de petróleo são muito utilizados nas indústrias de embalagens para alimentos e bebidas, causando preocupações sobre questões ambientais como o acúmulo de resíduos não biodegradáveis e não recicláveis (ASSIS et al., 2017; AVELLA et al., 2013).

Diante disto, o aumento da preocupação mundial com o meio ambiente tem impulsionado a produção de polímeros biodegradáveis como uma alternativa para substituir ou minimizar o uso de embalagens não biodegradáveis, devido à maior preocupação com os impactos relacionados a esses materiais (BUCCI et al., 2005). Os polímeros biodegradáveis ao contrário dos sintéticos, derivados do petróleo, sofrem biodegradação com relativa facilidade, se desintegrando totalmente na natureza.

A biodegradação é um processo natural e complexo onde compostos orgânicos, por meio de mecanismos bioquímicos, são convertidos em compostos simples e, então, redistribuídos no meio ambiente, através do ciclo elementar do carbono, nitrogênio e enxofre (YAM, 2009). Os plásticos biodegradáveis são, portanto, materiais poliméricos em que pelo menos um passo do processo de degradação é por meio do metabolismo de organismos que ocorrem naturalmente. Em condições adequadas de umidade, temperatura, e disponibilidade de oxigênio, a biodegradação leva à fragmentação ou à desintegração dos plásticos com nenhum resíduo tóxico ou prejudicial para o meio ambiente (CHANDRA, 1998; SORRENTINO et al., 2007).

Os polímeros encontrados na natureza, chamados de biopolímeros ou bioplásticos, surgem como uma das principais alternativas utilizadas para a produção de embalagens biodegradáveis (LAYCOCK et al., 2017). Os biopolímeros podem ser obtidos a partir de fontes naturais renováveis como milho, celulose, batata, cana-de-açúcar, ou serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico ou o ácido valérico, dando origem ao polihidroxibutirato e ao polihidroxibutirato-co-valerato, respectivamente, ou até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitosana ou as proteínas do leite (MOHANTY et al., 2005; BELGACEM; GANDINI, 2008).

Vários estudos foram realizados propondo novos materiais de embalagens biodegradáveis obtidos a partir de fontes renováveis como: amido (NGUYEN VU; LUMDUBWONG, 2016; BONOMO et al., 2017) (BONOMO *et al.*, 2017; NGUYEN VU; LUMDUBWONG, 2016), quitosana (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; PEREDA et al., 2012) e proteínas do soro de leite (AZEVEDO et al., 2015; OYMACI; ALTINKAYA, 2016).

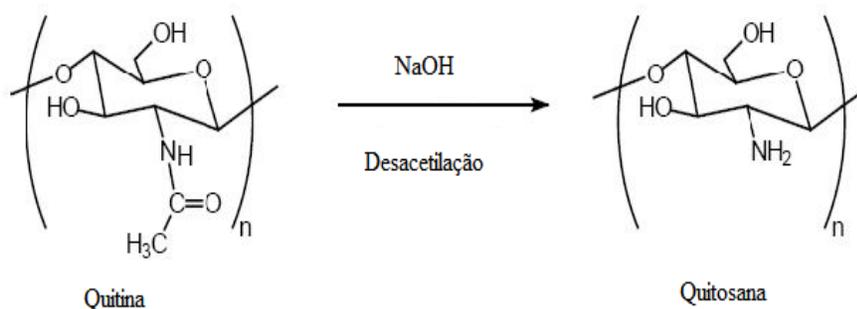
2.2 Quitosana

Em 1859, a quitosana foi descoberta por C. Rouget quando foi colocada em ebulição em uma solução de hidróxido de potássio com quitina, sendo produzida industrialmente pela primeira vez em 1971, no Japão. Porém as pesquisas sobre quitosana e suas aplicações só começaram a receber investimentos científicos e tecnológicos em torno de 1979, quando se começou a perceber o grande potencial de suas aplicações (CAMPOS-TAKAKI; MARIA, 2005).

A quitosana, poli[β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-dioxi-D-glicopiranas], é um polissacarídeo de cadeia linear sendo representada pela fórmula geral $[C_6H_{11}O_4N]_n$, onde “n” indica o grau de polimerização da quitosana. Apesar de ocorrer naturalmente nas paredes celulares de alguns poucos tipos de fungos,

tem a sua obtenção associada principalmente pela desacetilação alcalina da quitina (Figura 1), um dos biopolímeros mais abundantes da natureza sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos (KUBOTA et al., 2000; BORNET; TEISSEGRE, 2008).

Figura 1 - Conversão da quitina em quitosana através da desacetilação



Fonte: Battisti; Campana-Filho (2008)

A estrutura da quitosana é formada por duas unidades monoméricas distintas, 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (N-acetil-glicosamina) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (D-glicosamina), que correspondem às unidades acetiladas e desacetiladas, respectivamente. Na formação das cadeias poliméricas os dois tipos de monômeros, unidos através de ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), são distribuídos aleatoriamente sobre a estrutura (LI et al., 2005; HERNÁNDEZ et al., 2008). Portanto, a quitosana pode ser definida como um copolímero no qual o grau de desacetilação da quitina é geralmente superior a 60% (VARMA et al., 2004).

Por ser um produto de baixo custo, renovável e biodegradável, a quitosana é um polímero com grande potencial para produção de embalagens devido à sua excelente capacidade de formação de filmes e boas propriedades mecânicas (BANGYEKAN et al., 2006; MARTINS et al., 2012). Vários estudos têm relatado a elaboração de filmes biodegradáveis à base de quitosana para

aplicação em embalagens de alimentos (DIAS et al., 2014; BROEK et al., 2015; SOUZA et al., 2017; WANG; JING, 2017).

A quitosana é um composto antimicrobiano natural contra uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias e leveduras (VU et al., 2011; KANATT et al., 2013; ALNOMAN et al., 2017). Os filmes de quitosana foram utilizados com sucesso como materiais de embalagem para prolongar a vida útil de vários alimentos, como carnes e peixes (VÁSCONEZ et al., 2009; PARK et al., 2010; GÜNLÜ; KOYUN, 2013; DEHNAD et al., 2014; RAHMAN et al., 2017).

O uso de filmes biodegradáveis para embalagens de alimentos tem sido fortemente limitado por causa das propriedades de barreira precárias e propriedades mecânicas fracas quando comparados aos polímeros sintéticos. Uma alternativa para o aprimoramento dessas propriedades em polímeros biodegradáveis é o desenvolvimento de bionanocompósitos com a utilização de nanopartículas de reforços (ou nanocargas) que sejam também de fonte renovável e biodegradáveis (GUILBERT, 1997; PEREIRA et al., 2014).

2.3 Nanocompósitos

Os nanocompósitos são obtidos pela incorporação de materiais de enchimento com pelo menos uma dimensão em nanoescala (1-100 nm), os quais estão dispersos em toda a matriz polimérica (PETERSSON; OKSMAN, 2006). Os materiais de enchimento podem incluir argila de silicato, nanopartículas de sílica (SiO_2), nanocristais de amido, nanowhiskers e nanofibras de celulose, nanopartículas de quitina ou quitosana e outros inorgânicos (DUNCAN, 2011).

Devido às suas dimensões de tamanho nano, esses materiais possuem uma relação superfície-volume (relação de aspecto) elevada e grande área superficial. Quando adicionados a polímeros compatíveis, os nanomateriais podem melhorar drasticamente as propriedades dos nanocompósitos resultantes, tais como aumento da resistência mecânica, elevadas propriedades de barreira, maior

condutividade elétrica e melhor resistência térmica em comparação com os seus polímeros puros e compósitos convencionais (SORRENTINO et al., 2007; USKOKOVIĆ, 2007). A melhora nas propriedades do material ocorre devido ao fato de que as interações na interface entre matriz/reforço tendem a aumentar em escala manométrica e isto faz com que haja uma melhoria nas propriedades do material (NOGUEIRA et al., 2011).

Recentemente a tecnologia dos nanocompósitos demonstrou ser útil para melhorar as propriedades dos biopolímeros e vários exemplos podem ser encontrados na literatura. Em um estudo realizado por Kumar et al. (2010) a adição de 15% de montmorilonita (MMT) em filmes de isolado proteico de soja causou um aumento da resistência à tração dos filmes de 2,26 MPa para 15,6 MPa. Estes mesmos autores relataram que as nanoargilas reduziram em 22,1% a permeabilidade ao vapor de água quando se adicionou 5% de MMT.

Fortunati et al. (2013), desenvolveram filmes de Poli (ácido lático) (PLA) incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nanopartículas de prata (Ag) pelo método de casting. Os autores relataram que ao adicionar 1% de Ag houve uma redução de 22% na permeabilidade ao oxigênio dos bionanocompósitos quando comparado com o filme de PLA puro. Os bionanocompósitos contendo Ag(1%)/CNC(5%) apresentaram uma redução de 59% nos valores de permeabilidade ao vapor água.

2.4 Nanofibra de celulose

A celulose consiste em unidades de glicose unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas e suas fontes comerciais incluem principalmente madeira ou algodão. É um polímero semicristalino que compreende regiões cristalinas (ordenadas) e amorfas (desordenadas) (KHAN *et al.*, 2012). Por ser um material barato, renovável, biodegradável e não tóxico, os materiais provenientes deste biopolímero vêm sendo utilizados pela sociedade há centenas de anos (MOON et al., 2011; NECHYPORCHUK et al., 2016).

Entre os enchimentos de tamanho nanométrico, os materiais de celulose atraíram atenção e oferecem uma linha de pesquisa altamente contemporânea. Partículas de celulose com pelo menos uma dimensão em nanoescala (1-100 nm) são referidas como nanocelulose. Dependendo das condições de produção, que influenciam as dimensões, composição e propriedades, a nanocelulose pode ser dividida em duas categorias principais: (i) as obtidas pelo tratamento ácido, denominadas como nanocristais de celulose (CNC), e (ii) as produzidas principalmente por desintegração mecânica, denominada nanofibras de celulose (NFC). Tipicamente, as nanofibras de celulose têm um diâmetro de 5-50 nm e um comprimento de poucos micrômetros (NECHYPORCHUK et al., 2016).

Muitos estudos mostram que as nanofibras de celulose têm um alto potencial para serem empregadas na produção de filmes transparentes e extremamente fortes em muitas áreas diferentes, possibilitando o desenvolvimento de embalagens compatíveis com o meio ambiente e de alto desempenho (ABDUL KHALIL et al., 2012). O estudo das nanofibras celulósicas como material de reforço nos nanocompósitos começou há duas décadas. Desde então, uma grande quantidade de pesquisas tem relatado o uso de nanofibra de celulose como reforço em várias matrizes poliméricas, como o amido (SAVADEKAR; MHASKE, 2012; SLAVUTSKY; BERTUZZI, 2014), a quitosana (FERNANDES et al., 2009; AZEREDO et al., 2010; KHAN et al., 2012), e o PLA (BONDESON; OKSMAN, 2007; JONOBI et al., 2010).

Iwatake et al. (2008) estudaram o efeito das nanofibras de celulose como material de reforço em filmes de ácido poliláctico (PLA). Os autores observaram que a adição de nanofibras acarretou em um aumento de 40% no módulo de elasticidade e 25% na resistência à tração do PLA. Abdulkhani et al. (2014) também desenvolveram nanocompósitos compostos de NFC/PLA e observaram que o reforço com nanofibras de celulose provocou um aumento na temperatura de fusão e transição vítrea quando comparado com PLA puro.

Compósitos à base de quitosana e celulose têm atraído um interesse significativo devido à semelhança estrutural destes dois componentes (FERNANDES et al., 2009). Fernandes et al. (2010) propuseram que as propriedades mecânicas de filmes de quitosana de baixo e elevado peso molecular reforçada com NFC foi maior do que os filmes não reforçados de quitosana. Além disso, a adição de NFC aumentou a flexibilidade e estabilidade térmica dos nanocompósitos de quitosana/NFC.

Azeredo et al. (2010), avaliaram o efeito de diferentes concentrações de NFC e de plastificante (glicerol) em propriedades de tração, permeabilidade ao vapor de água de filmes de quitosana. Eles relataram que a incorporação de NFC resultou em filmes com melhores propriedades mecânicas e a propriedades de barreira dos filmes aumentou com o teor de NFC.

2.5 Embalagens Ativas

A embalagem passiva tem quatro funções principais, incluindo contenção, proteção, conveniência e comunicação, enquanto a embalagem ativa fornece proteção extra, liberando continuamente compostos ativos como, antioxidantes, antimicrobianos e enzimas para o alimento embalado. Nos últimos anos, o conceito de embalagem ativa recebeu muita atenção na indústria de alimentos, pois pode prolongar a vida útil dos produtos alimentícios e melhorar a qualidade dos alimentos (LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011).

A embalagem ativa é um sistema no qual a embalagem, o ambiente interno da embalagem e o alimento interagem positivamente para prolongar a vida útil do produto, melhorar a segurança ou até mesmo as suas propriedades sensoriais (AHMED et al., 2017). Devido à sua interação com o alimento e sua atmosfera, gera alimentos de maior vida de prateleira e menor uso de aditivos e conservantes em formulações de alimentos, mantendo a qualidade do produto (SINGH et al., 2011).

Os sistemas de embalagens ativas baseiam-se na incorporação de substâncias, em particular agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais, em materiais de embalagens de alimentos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; QUINTAVALLA; VICINI, 2002). Estes sistemas permitem a liberação controlada do agente ativo durante o tempo de armazenamento do produto, seguindo uma cinética que vai prosseguir até que o equilíbrio entre a embalagem e a matriz alimentar (LICCIARDELLO et al., 2015).

Com o objetivo de prolongar a vida útil, manter a qualidade e reduzir o uso de aditivos nos alimentos, muitos estudos têm sido realizados com a incorporação de agentes ativos como antioxidantes (GRANDA-RESTREPO et al., 2009; MARYAM ADILAH et al., 2018), antimicrobianos (CHANG et al., 2015; MANOHAR et al., 2015; VILELA et al., 2017) e enzimas (PARK et al., 2004; FABRA et al., 2014; BONOMO et al., 2017) em filmes biodegradáveis.

Uma vez que a eficiência da embalagem ativa é baseada na migração de substâncias ativas, o conhecimento da difusividade desses compostos no interior do filme é um fator determinante no desenvolvimento de sistemas de embalagem que possuem o objetivo de aumentar a vida útil dos alimentos ou até mesmo melhorar alguma característica relacionando a qualidade dos mesmos (TURBIANI; KIECKBUSCH, 2011).

2.6 Maciez da carne bovina

Dentre os atributos de qualidade da carne bovina, a maciez se destaca como o atributo mais desejável pelo consumidor. A maciez tem papel decisivo na sua aceitação e no retorno a compra, sendo a sua variação a causa mais comum da rejeição pelos consumidores (OUALI et al., 2006; MOELLER et al., 2010).

A maciez pode ser definida como a facilidade com que a carne se deixa mastigar, sendo mensurada através da força de cisalhamento. Tem sido relatado que a dureza da carne pode ser dividida em pelo menos dois componentes: i)

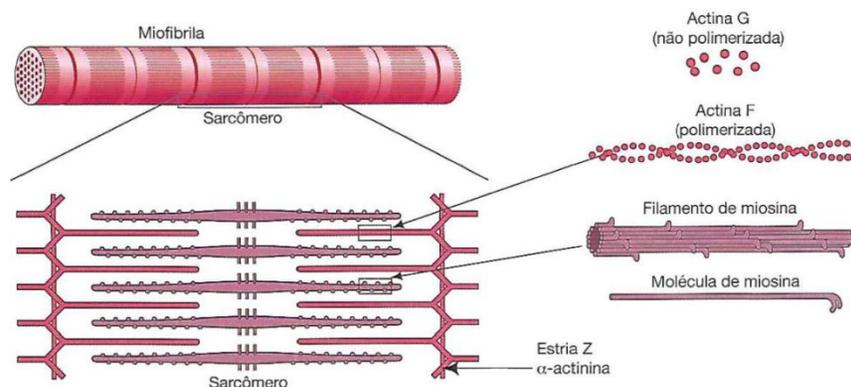
dureza residual, causada pelo tecido conjuntivo (colágeno, elastina) e outras proteínas do estroma; ii) dureza de actomiosina, causada pelas proteínas miofibrilares (SGARBIERI, 1996; ALVES; MANCIO, 2007). Alguns fatores afetam diretamente a maciez da carne, dentre os quais destacamos a dieta, genótipo, idade e peso de abate, condições de abate e armazenamento da carne (SILVA et al., 2008).

Uma alternativa tecnológica muito utilizada pela indústria para promover o amaciamento da carne é a maturação, que além de melhorar a maciez também causa alterações benéficas nas características sensoriais da carne como o sabor e a suculência (ANDRIGHETTO et al., 2006). A maturação consiste em manter a carne após o processo de *rigor mortis* sob-refrigeração (temperatura em torno de 0 °C), por um período de tempo após o abate que pode variar de 7 a 28 dias e, tem como objetivo melhorar as características sensoriais da carne, principalmente a maciez. Durante o processo há necessidade de embalar a carne a vácuo, o que retarda o crescimento de bactérias aeróbicas putrefativas e favorece o crescimento das bactérias lácticas, que, por sua vez, produzem substâncias antimicrobianas (PUGA et al., 1999).

O amaciamento da carne que ocorre durante a estocagem refrigerada, ou maturação, consiste na proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas (Figura 2). As enzimas proteolíticas atuam ocasionando algumas alterações no tecido muscular, como: (i) degradação e/ou enfraquecimento gradual da linha Z, que conduz à degradação das miofibrilas; (ii) desaparecimento da troponina T; (iii) degradação da desmina e nebulina e, provavelmente, da titina (proteínas estruturais do tecido muscular). Essas alterações causam diminuição da rigidez e aumento gradativo da maciez da carne. Uma importante observação é que as principais proteínas contráteis, actina e miosina, não são afetadas. Claramente, as alterações descritas acima são resultado de proteólise e, portanto, as

alterações responsáveis pelo amaciamento da carne são produzidas por proteinases endógenas (KOOHMARIE et al, 1992).

Figura 2 - Componentes das miofibrilas



Fonte: OVALLE; NAHIRNEY; NETTER, (2014)

O sistema enzimático das calpaínas é considerado o principal mecanismo relacionado com a proteólise que conduz ao amaciamento da carne. Este sistema é formado por duas calpaínas (proteínase ativada por concentração micromolar de cálcio ou μ -calpaína ou calpaína tipo I e proteínase ativada por concentração milimolar de cálcio ou m-calpaína ou calpaína tipo II) ativadas pelo cálcio livre (não retido no retículo sarcoplasmático ou nas mitocôndrias) e inibidas por outra enzima denominada calpastatina (KOOHMARIE et al, 1992).

A maciez da carne é correlacionada com a taxa de degradação das miofibrilas e das proteínas miofibrilares, sendo a degradação das miofibrilas mensurada pelo método do Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM) e a degradação das proteínas miofibrilares mensuradas por meio da eletroforese (KOOHMARIE et al., 2002; SAWDY et al., 2004). O IFM é um indicador útil da extensão da degradação da proteína miofibrilar. A estrutura das linhas Z é destruída durante a ação enzimática, o que leva ao encurtamento do comprimento da miofibrila e na redução do número de sarcômeros, resultando no aumento da fragmentação. O aumento da fragmentação das miofibrilas para a

carne se correlaciona com a melhoria na maciez da carne (OLSON; JR.; STROMER, 1976).

A avaliação da maciez da carne pode ser realizada de forma subjetiva utilizando-se testes sensoriais com avaliadores treinados, e de forma objetiva, com a utilização de equipamentos, como o texturômetro, que mede a força necessária para o cisalhamento de uma seção transversal de carne e, quanto maior a força dispensada, menor é a maciez apresentada pelo corte de carne (ALVES; MANCIO, 2007). O teste da força de cisalhamento Warner-Bratzler (WBSF) foi um dos primeiros métodos instrumentais desenvolvidos para medir a maciez da carne e, manteve-se o mais utilizado no mundo (WHEELER et al., 1996).

Além do processo de maturação que permite que a proteólise prossiga num ambiente anaeróbico, muitos métodos químicos têm sido utilizados para melhorar a maciez da carne como: estimulação elétrica de carcaças de carne vermelha para evitar o encurtamento por frio, aplicação de radiação ultrassônica e tratamentos com enzimas proteolíticas (GURSANSKY et al., 2010; CHANNON et al., 2016; BAREKAT; SOLTANIZADEH, 2017).

O tratamento com enzimas proteolíticas exógenas é um método muito utilizado para aumentar a maciez da carne. Muitas pesquisas sobre o uso de enzimas proteolíticas exógenas têm sido realizadas há mais de 60 anos e inúmeras enzimas de plantas, bactérias e fúngicas foram investigadas (EL-GHARBAWI; WHITAKER, 1963; KIM; TAUB, 1991; GERELT et al., 2000; ASHIE et al., 2002; CALKINS; SULLIVAN, 2007; SULLIVAN; CALKINS, 2010).

As enzimas exógenas adicionadas à carne para aumentar a maciez atuam de forma diferente nas proteínas miofibrilares e no tecido conjuntivo da carne. Atualmente, apenas cinco das muitas enzimas exógenas que foram estudadas foram classificadas como "Geralmente Reconhecidas como Seguras" (GRAS)

pelo Serviço de Inspeção de Segurança Alimentar do USDA (FSIS) e provêm de diferentes fontes de plantas, bactérias e fungos (Tabela 1) (CALKINS; SULLIVAN, 2007; ZHAO et al., 2012).

Tabela 1 Enzimas classificadas "Geralmente Reconhecidas como Seguras" (GRAS)

Enzima	Tipo	Fonte
Papaína	Vegetal	Mamão
Bromelina	Vegetal	Abacaxi
Ficina	Vegetal	Figo
Bacillus Protease	Bacteriana	Bacillus subtilis
Aspartic Protease	Fúngica	Aspergillus oryzae

Fonte: CALKINS; SULLIVAN, (2007)

As enzimas proteolíticas derivadas de plantas, como papaína, bromelina e ficina, foram amplamente utilizadas como amaciantes de carne, sendo a papaína a que apresenta maior capacidade de melhorar a maciez da carne bovina (GERELT et al., 2000; ASHIE et al., 2002; QIHE et al., 2006; CALKINS; SULLIVAN, 2007; SULLIVAN; CALKINS, 2010).

2.7 Papaína

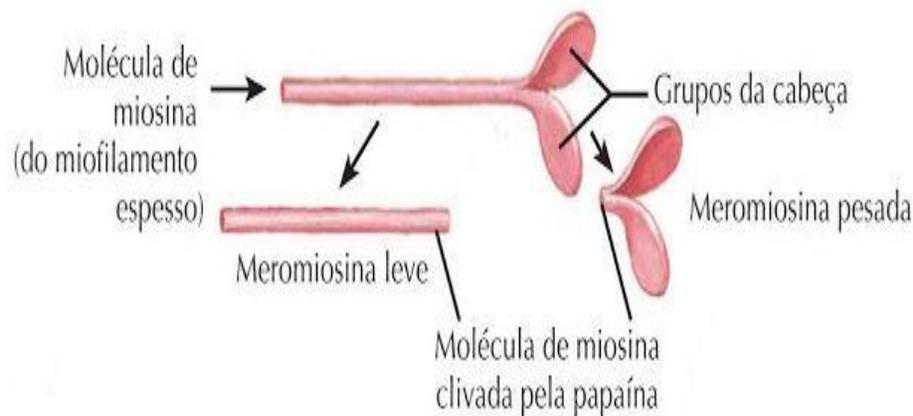
Extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*) a papaína (E.C. 3.4.22.2) é uma enzima proteolítica com massa molecular de 23,4 kDa, que possui uma cadeia de polipeptídios de 212 aminoácidos, tem atividade ótima em pH entre 4,0-6,0 e temperatura ótima entre 65-75 °C. A molécula da papaína contém sete resíduos de cisteína, sendo que 6 destes realizam 3 ligações dissulfeto, e a cisteína-25 está envolvida com o sítio catalítico (LOWE, 1976; CALKINS; SULLIVAN, 2007; THOMÁS et al., 2009).

Sua importância comercial deve-se aos variados usos nas indústrias têxteis, farmacêutica, cosmética e alimentícia (THOMÁS et al., 2009). Na indústria de alimentos a papaína possui vasta aplicação devido à sua forte ação proteolítica, tendo como principais aplicações o amaciamento de carnes, na

indústria de bebidas onde é usada para hidrolisar as proteínas de alto peso molecular e na clarificação da cerveja, evitando a turbidez deste produto durante seu armazenamento e refrigeração prolongada (WOLFGANG AEHLE, 2007).

A papaína é uma das enzimas vegetais mais comuns usadas para a tenderização artificial da carne devido à sua capacidade de desagregar proteínas miofibrilares e tecidos conectivos (ASHIE et al., 2002). Esta enzima degrada as proteínas da carne em fragmentos menores atacando principalmente o sistema miosina-actina. A papaína causa a clivagem da molécula de miosina em 2 peças num local próximo a sua cabeça como ilustrado na Figura 3 (REGGIANI et al., 2000; OVALLE et al., 2014).

Figura 3 - Ação da papaína na molécula da miosina



Fonte: OVALLE; NAHIRNEY; NETTER, (2014)

Alguns estudos têm relatado o efeito amaciante da papaína. Gerelt et al. (2000), avaliaram o amaciamento de cortes de carnes mergulhados em solução contendo 0,1% de papaína após serem submetidos à desidratação osmótica. Estes autores observaram um aumento na fragmentação das miofibrilas e uma diminuição acentuada na dureza de carnes tratadas com papaína. Os autores também relataram que a carne tratada com papaína recebeu maiores valores

sensoriais para o parâmetro de textura quando comparadas com as carnes sem o tratamento enzimático.

Sullivan e Calkins (2010) investigaram a aplicação (injeção das soluções nos músculos através de agulhas) de sete enzimas proteolíticas (papaína, ficina, bromelina, *B. subtilis protease*, *A. oryzae* concentrado, *A. oryzae* 400 e *Zingibain*) para amaciar carne e observaram que o tratamento com papaína foi o que apresentou maior redução na força de cisalhamento da Warner-Bratzler (WBSF). As amostras tratadas com papaína apresentaram a maior aceitação para o parâmetro de maciez na avaliação sensorial e foram significativamente melhores do que todos os tratamentos. Barekat e Soltanizadeh (2017) também relataram uma redução dos valores de WBSF e uma melhora da maciez da carne bovina após tratamentos com papaína.

2.8 Difusão de compostos ativos em matrizes poliméricas

A difusão através de uma matriz polimérica é definida como um processo de transferência de massa de moléculas individuais de uma substância, através de um movimento molecular randômico e associado a um gradiente de concentração (MARTIN et., 1984).

Entre os modelos empíricos para descrever a liberação de substâncias ativas a partir de sistemas poliméricos o mais utilizado é a equação de Peppas ou lei da potência (Equação 1) (PEPPAS, 1985).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = Kt^n \quad (1)$$

Sendo M_t e M_{∞} relativos a massa do agente ativo no tempo t e no equilíbrio, respectivamente, k é uma constante incorporando características estruturais e geométricas do sistema, e n representa o expoente de difusão, um indicativo do mecanismo de transporte.

Os comportamentos clássicos de difusão em matrizes poliméricas podem ser classificados como:

- **Caso I ou difusão Fickiana:** a velocidade de difusão é muito menor que a mobilidade do segmento da cadeia polimérica. Para $n = 0,5$, a equação refere-se a um mecanismo de libertação do agente ativo controlada por difusão, e, assim, a uma difusão Fickiana (PEPPAS, 1985).

- **Caso II:** a velocidade de difusão é muito maior que a mobilidade do segmento da cadeia polimérica e é dependente da cinética de inchamento. Quando o valor encontrado para n for 1, fica claro que a razão de liberação do agente ativo a partir da matriz é independente da concentração. Este caso corresponde a uma cinética de liberação de ordem zero (PEPPAS, 1985).

- **Difusão anômala, não Fickiana ou pseudo-Fickiana:** a velocidade de difusão e a mobilidade do segmento da cadeia polimérica são comparáveis. Neste caso, a equação que rege este sistema é a lei da potência onde o valor de n encontra-se entre 0,5 e 1, indicando uma sobreposição do fenômeno de difusão e de erosão conhecido como transporte anômalo ou não Fickiano. Este comportamento é comum em polímeros que apresentam intumescimento limitado, devido ao relaxamento das cadeias macromoleculares à medida que a frente de penetração do meio avança (PEPPAS, 1985; CUQ et al., 1997).

Caso o valor encontrado experimentalmente para n demonstrar valores $< 0,5$ pode ser um indicativo de que o principal mecanismo que rege a liberação do agente ativo é a associação de difusão parcial através de uma matriz intumescida e através de poros hidrofílicos (PEPPAS, 1985).

Valores de $n > 1$ definem o transporte do Super Caso II, no qual uma aceleração pronunciada na liberação de soluto por um filme ocorre em direção aos últimos estágios de experimentos de liberação, resultando em um transporte mais rápido controlado por relaxamento (JACQUES et al., 1974).

Na Tabela 2 temos o resumo das informações obtidas através da equação da lei de potência.

Tabela 2 Correlação entre os valores de n e o mecanismo de transporte

n	Mecanismo
0,5	Fickiano (Caso I)
$0,5 \leq n \leq 1$	Transporte Anômalo ou pseudo-Fickiano
≥ 1	Comportamento segue o caso II
> 1	Super caso II

Fonte: PEPPAS, (1985)

O processo de liberação é descrito pela cinética de difusão do agente ativo na matriz polimérica, sendo expressa pelo coeficiente de difusão aparente (D). A difusividade, ou coeficiente de difusão, representa a velocidade com que moléculas se movem através de uma matriz difusora, relacionando a proporção do composto ativo liberado em relação ao tempo de exposição ao filme. Segundo a composição e arranjo de sua matriz filmogênica, filmes ativos são responsáveis por liberar agentes ativos incorporados para o meio externo (OZDEMIR; FLOROS, 2003).

O coeficiente de difusão mede a taxa em que o processo de difusão ocorre, e muitas vezes é calculado a partir da equação diferencial fundamental para difusão (Equação 2), a partir da segunda lei de Fick, expressa em uma dimensão, com um coeficiente de difusão dependente do tempo (CRANK, 1975).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D(t) \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2)$$

Onde C é a concentração do soluto ativo no filme; $D(t)$ o coeficiente de difusividade do soluto ativo; e x a componente no sentido unidirecional da difusão.

Considerando-se as seguintes condições de contorno:

$$t = 0; C(x,0) = 0; 0 < x < L; C(0,t) = C_0; e t > 0 \rightarrow C(x,t) = 0$$

deduzidas a partir do raciocínio de que no tempo inicial, a distribuição do composto ativo pelo filme é uniforme (C_0), que na embalagem apenas a face em contato com o produto deve liberar o composto ativo e considerando ainda que a espessura do filme e o coeficiente de difusão mantém-se aproximadamente constantes, obtém-se uma função para a fração de composto liberado, representado na Equação 3 (CRANK, 1975):

$$c = \frac{4C_0}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)} \operatorname{sen} \left(\frac{2n+1}{L} \pi x \right) \exp \left[\frac{-(2n+1)^2 \pi^2 Dt}{L^2} \right] \quad (3)$$

Integrando a equação no tempo e espaço, a taxa da concentração total do composto ativo difundido no tempo t (M_t) e no equilíbrio (M_∞) é obtida pela Equação 4 (RITGER; PEPPAS, 1987).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp \left[\frac{-D(2n+1)^2 \pi^2 t}{L^2} \right] \quad (4)$$

Para tempos curtos ($M_t/M_\infty < 2/3$), ou seja, quando menos de 60% da massa do agente ativo é liberada, a Equação 4 pode ser simplificada para a Equação 5 (RITGER; PEPPAS, 1987).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad (5)$$

Em que M_t/M_∞ é a fração do composto ativo liberada, D é o coeficiente de difusão do agente ativo, L é a espessura inicial do filme e t é o tempo de liberação (CRANK, 1975).

O coeficiente de difusão ou a difusividade pode ser afetado pelo tamanho e forma das moléculas da substância ativa, pela estrutura do polímero (tamanho dos poros, flexibilidade da cadeia polimérica e densidade) e condições ambientais (pH, atividade de água e temperatura). Os parâmetros de composição do filme, tais como, concentração de polímero, tipo e concentração de plastificante e a presença de componentes como lipídios podem influenciar o processo de difusão (TURBIANI; KIECKBUSCH, 2011).

A difusão de agentes ativos em polímeros ocorre através das regiões amorfas, devido a maior mobilidade do polímero e, conseqüentemente ao seu maior volume livre em relação à fase cristalina. O volume livre depende, por exemplo, da relação entre a temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero e a temperatura em que o experimento de liberação está sendo realizado. Quando a T_g do polímero está acima da temperatura do experimento, o volume livre diminui e a difusividade decresce. Entretanto, quando a T_g do polímero está abaixo da temperatura do experimento, a difusividade aumenta (FLORENCE; ATTWOOD, 1998).

Vários métodos foram relatados como apropriados para medir a difusão de pequenas moléculas em um polímero (CRANK, 1975; GIANNAKOPOULOS; GUILBERT, 1986; LIM; TUNG, 1997). Redl, Gontard, & Guilbert, (1996) sugeriram um método relativamente rápido e conveniente para determinar a difusividade de filmes à base de glúten de trigo por imersão em simuladores de alimentos, como água destilada, solução tampão, isooctano, etanol, ácido acético e óleo de oliva.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolvimento de embalagens biodegradáveis produzidas a partir de biopolímeros surge como uma alternativa promissora para a substituição de embalagens plásticas, que são obtidas de fontes não renováveis, e ao serem descartadas na natureza acarreta em danos ambientais causados pelos seus resíduos não recicláveis. Com a tecnologia de embalagens ativas é possível aumentar a vida útil de produtos alimentícios e melhorar a qualidade dos produtos embalados, oferecendo aos consumidores alimentos mais seguros e com maior qualidade. O estudo sobre as interações que ocorrem entre os compostos ativos e os biopolímeros são de grande importância, uma vez que essas interações vão influenciar nas aplicações desses polímeros como materiais de embalagens.

Para alcançarmos os objetivos, o presente trabalho foi realizado em três etapas: desenvolvimento dos filmes de quitosana reforçados com nanofibras de celulose e incorporados com papaína e sua caracterização quanto à resistência à umidade, propriedades mecânicas, térmicas e de barreiras (Artigo 1); Estudo das propriedades óticas, estruturais e morfológicas de nanocompósitos de quitosana e nanofibras de celulose incorporados com papaína e sua liberação em meio aquoso (Artigo 2); Aplicação dos filmes desenvolvidos em carne bovina para promover uma melhoria na maciez dos cortes cárneos (Artigo 3).

4 REFERÊNCIAS

ABDUL KHALIL, H.P.S.; BHAT, A.H.; IREANA YUSRA, A.F. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 2, p. 963–979, Jan. 2012.

ABDULKHANI, Ali et al. Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. *Polymer Testing*, v. 35, p. 73–79, 2014.

AHMED, Ishfaq et al. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*, v. 82, p. 163–178, 2017.

ALNOMAN, Maryam; UDOMPIJITKUL, Pathima; SARKER, Mahfuzur R. Chitosan inhibits enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A in growth medium and chicken meat. *Food Microbiology*, v. 64, p. 15–22, 2017.

ALVES, Dorismar David; MANCIO, Antonio Bento. Maciez da carne bovina - Uma revisão. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, v. 14, p. 193–216, 2007.

ANDRIGHETTO, Cristiana et al. Maturação da carne bovina. *Veterinaria.org*® -Comunidad Virtual Veterinaria.org® -Veterinaria Organización S.L.® España. *Mensual. Disponible en*, v. 6, p. 1–6, 2006.

APPENDINI, Paola; HOTCHKISS, Joseph H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 3, n. 2, p. 113–126, 2002.

ASHIE, I.N.; SORENSEN, T.L.; NIELSEN, P.M. Effects of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins and Beef Tenderness. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 67, n. 6, p. 2138–2142, 2002.

ASSIS, Renato Queiroz et al. Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. *Industrial Crops and Products*, v. 109, n. September, p. 818–827, Dec. 2017.

AVELLA, Maurizio et al. Polymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Applications. *Bio-Nanotechnology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., p. 212–226. 2013.

AZEREDO, Henriette M. C. et al. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 1, p. 1–7, 2010.

AZEVEDO, Viviane Machado et al. Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 252–258, 2015.

BANGYEKAN, Cholwasa; AHT-ONG, Duangdao; SRIKULKIT, Kawee. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, n. 1, p. 61–71, 2006.

BAREKAT, Sorour; SOLTANIZADEH, Nafiseh. Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 39, p. 223–229, 2017.

BATTISTI, Marcos Valério; CAMPANA-FILHO, Sergio P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2008.

BELGACEM, Mohamed; GANDINI, Alessandro. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. [S.l: s.n.], 2008.

BONDESON, Daniel; OKSMAN, Kristiina. Polylactic acid/cellulose whisker nanocomposites modified by polyvinyl alcohol. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, v. 38, n. 12, p. 2486–2492, 2007.

BONOMO, Renata Cristina Ferreira et al. Effect of the Incorporation of Lysozyme on the Properties of Jackfruit Starch Films. *Journal of Polymers and the Environment*, 2017.

BORNET, A.; TEISSEDRE, P. L. Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*, v. 226, n. 4, p. 681–689, 21 Feb. 2008.

BROEK, Lambertus A M Van Den et al. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, v.116, p. 237–242, 2015.

BUCCI, D.Z.; TAVARES, L.B.B.; SELL, I. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, v. 24, n. 5, p. 564–571, Aug. 2005.

CALKINS, Chris R; SULLIVAN, G. Adding Enzymes to Improve Beef Tenderness. *National Cattlemen's Beef Association*, 2007.

CAMPOS-TAKAKI; Maria Galba. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P K (Ed.). *Chitin and Chitosan*:

Opportunities and Challenges. India: SSM International Publication, 2005. p. 69–94.

CHANDRA, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 23, n. 7, p. 1273–1335, 1998.

CHANG, Yuhua; MCLANDSBOROUGH, Lynne; MCCLEMENTS, David Julian. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food Chemistry*, v. 172, p. 298–304, 2015.

CHANNON, H.A. et al. Estimating the impact of various pathway parameters on tenderness, flavour and juiciness of pork using Monte Carlo simulation methods. *Meat Science*, v. 116, p. 58–66, Jun. 2016.

CRANK, J. *The Mathematics of Diffusion*: 2d Ed. 1975.

CUQ, Bernard et al. Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 622–626, 1997.

DEHNAD, Danial et al. Thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydrate Polymers*, v. 109, p. 148–154, 2014.

DIAS, Marali Vilela et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chemistry*, v. 165, p. 323–329, 15 Dec. 2014.

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

ELGHARBAWI, M.; WHITAKER, J. R. Factors Affecting Enzymatic Solubilization of Beef Proteins. *Journal of Food Science*, v. 28, n. 2, p. 168–172, Mar. 1963.

FABRA, María José; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Laura; CHIRALT, Amparo. Lysozyme release from isolate pea protein and starch based films and their antimicrobial properties. *LWT - Food Science and Technology*, v. 55, n. 1, p. 22–26, 2014.

FERNANDES, Susana C. M. et al. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chemistry*, v. 11, n. 12, p. 2023,

2009.

FERNANDES, Susana C M et al. Transparent chitosan films reinforced with a high content of nanofibrillated cellulose. *Carbohydrate Polymers*, v. 81, n. 2, p. 394–401, 2010.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Physicochemical principles of Pharmacy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 1998.

FORTUNATI, E. et al. Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nanobiocomposites. *Journal of Food Engineering*, v. 118, n. 1, p. 117–124, 2013.

GERELT, B; IKEUCHI, Y; SUZUKI, A. Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science*, v. 56, n. 3, p. 311–318, 2000.

GIANNAKOPOULOS, A.; GUILBERT, S. Sorbic acid diffusivity in relation to the composition of high and intermediate moisture model gels and foods. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 21, n. 4, p. 477–485, 28 Jun. 1986.

GRANDA-RESTREPO, Diana M. et al. Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*, v. 42, n. 10, p. 1396–1402, 2009.

GUILBERT, Stéphane; CUQ, Bernard; GONTARD, Nathalie. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, v. 14, n. 6–7, p. 741–751, Aug. 1997.

GÜNLÜ, Ali; KOYUN, Ebru. Effects of Vacuum Packaging and Wrapping with Chitosan-Based Edible Film on the Extension of the Shelf Life of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets in Cold Storage (4 °C). *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, n. 7, p. 1713–1719, 31 Jul. 2013.

GURSANSKY, B. et al. Tenderness enhancement of beef from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle following electrical stimulation. *Meat Science*, v. 86, n. 3, p. 635–641, Nov. 2010.

HERNÁNDEZ, Raúl B. et al. Coordination study of chitosan and Fe³⁺. *Journal of Molecular Structure*, v. 877, n. 1–3, p. 89–99, Apr. 2008.

IWATAKE, Atsuhiko; NOGI, Masaya; YANO, Hiroyuki. Cellulose nanofiber-reinforced polylactic acid. *Composites Science and Technology*, v. 68, n. 9, p. 2103–2106, 2008.

JACQUES, C H M; HOPFENBERG, H B; STANNETT, V. Super Case II Transport of Organic Vapors in Glassy Polymers. In: HOPFENBERG, HAROLD B (Ed.). . *Permeability of Plastic Films and Coatings: To Gases, Vapors, and Liquids*. Boston, MA: Springer US, 1974. p. 73–86.

JONOOBI, Mehdi et al. Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion. *Composites Science and Technology*, v. 70, n. 12, p. 1742–1747, Oct. 2010.

KANATT, Sweetie R. et al. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, v. 53, n. 1, p. 321–326, 2013.

KHAN, Avik et al. Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, v. 90, n. 4, p. 1601–1608, 2012.

KIM, Hie Joon; TAUB, Irwin A. Specific degradation of myosin in meat by bromelain. *Food Chemistry*, v. 40, n. 3, p. 337–343, 1991.

KOOHMARAIE, Mohammad et al. Meat tenderness and muscle growth: Is there any relationship? *Meat Science*, v. 62, n. 3, p. 345–352, 2002.

KOOHMARAIE, Mohammad. Role of the Neutral Proteinases in Postmortem Muscle Protein Degradation and Meat Tenderness. v. 45, p. 63–74, 1992.

KUBOTA, Naoji et al. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydrate Research*, v. 324, n. 4, p. 268–274, Mar. 2000.

KUMAR, P. et al. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. *Journal of Food Engineering*, v. 100, n. 3, p. 480–489, 2010.

LAYCOCK, Bronwyn et al. Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 71, p. 144–189, 1 Aug. 2017.

LI, Jin et al. Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability*, v. 87, n. 3, p. 441–448, Mar. 2005.

LICCIARDELLO, Fabio et al. Rapid assessment of the effectiveness of antioxidant active packaging—Study with grape pomace and olive leaf extracts. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 6, p. 1–6, 2015.

LIM, Loong-Tak; TUNG, Marvin A. Vapor Pressure of Allyl Isothiocyanate and Its Transport in PVDC/PVC Copolymer Packaging Film. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 5, p. 1061–1062, Sep. 1997.

LÓPEZ-RUBIO, Amparo; LAGARON, Jose M. Improved incorporation and stabilisation of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. *Food Chemistry*, v. 125, n. 3, p. 997–1004, Apr. 2011.

LOWE, G. The Cysteine proteinases. *Tetrahedron*, v. 32, n. 3, p. 291–302, Jan. 1976.

MANOHAR, Cynthia Maria *et al.* Design of a papain immobilized antimicrobial food package with curcumin as a crosslinker. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–17, 2015.

MARTIN, A.; SWARBRICK, J. CAMMARATA, A. Physical pharmacy. Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences. *General Pharmacology: The Vascular System*, v. 15, n. 4, p. 371, Jan. 1984.

5gMARTINS, Joana T.; CERQUEIRA, Miguel A.; VICENTE, António A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, v. 27, n. 1, p. 220–227, 2012.

MARYAM ADILAH, Z. A.; JAMILAH, B.; NUR HANANI, Z. A. Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. *Food Hydrocolloids*, v. 74, p. 207–218, 2018.

MOELLER, S. J. et al. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. *Meat Science*, v. 84, n. 1, p. 14–22, 2010.

MOHANTY, Amar; MISRA, Manjusri; DRZAL, Lawrence (Eds.). *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*. [S.l.]: CRC Press, 2005.

MOON, Robert J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, v. 40, n. 7, p. 3941, 2011.

NECHYPORCHUK, Oleksandr; BELGACEM, Mohamed Naceur; BRAS, Julien. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, v. 93, p. 2–25, 2016.

NGUYEN VU, Hoang Phuong; LUMDUBWONG, Namfone. Starch behaviors and mechanical properties of starch blend films with different plasticizers.

Carbohydrate Polymers, v. 154, p. 112–120, 10 Dec. 2016.

NOGUEIRA, Telma et al. Study of thermal and mechanical properties of PMMA/LDHs nanocomposites obtained by in situ bulk polymerization. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, v. 42, n. 8, p. 1025–1030, Aug. 2011.

OLSON, Dennis G.; JR., F. C. PARRISH; STROMER, M. H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. *Journal of Food Science*, v. 41, n. 5, p. 1036–1041, Sep. 1976.

OUALI, Ahmed *et al.* Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, v. 74, n. 1, p. 44–58, 2006.

OVALLE, William K.; NAHIRNEY, Patrick C.; NETTER, Frank Henry. *Netter bases da histologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2014.

OYMACI, Pelin; ALTINKAYA, Sacide Alsoy. Improvement of barrier and mechanical properties of whey protein isolate based food packaging films by incorporation of zein nanoparticles as a novel bionanocomposite. *Food Hydrocolloids*, v. 54, p. 1–9, 1 Mar. 2016.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Film Composition Effects on Diffusion of Potassium Sorbate Through Whey Protein Films. *Journal of Food Science*, v. 68, n. 2, p. 511–516, Mar. 2003.

PARK, S.I; DAESCHEL, M.A; ZHAO, Y. Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme – Chitosan Composite Films. *Journal of food science*, v. 69, n. 8, p. 215–221, 2004.

PARK, Su-il.; MARSH, Kenneth S.; DAWSON, Paul. Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. *Meat Science*, v. 85, n. 3, p. 493–499, 2010.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Journal Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 60, n. 4, p. Pages110-111, 1985.

PEREDA, Mariana; AMICA, Guillermina; MARCOVICH, Norma E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 2, p. 1318–1325, 2012.

PEREIRA, Fabiano Vargas et al. Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio

de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofição. *Quimica Nova*, v. 37, n. 7, p. 1209–1219, 2014.

PETERSSON, L.; OKSMAN, K. Biopolymer based nanocomposites: Comparing layered silicates and microcrystalline cellulose as nanoreinforcement. *Composites Science and Technology*, v. 66, n. 13, p. 2187–2196, Oct. 2006.

PUGA, Débora Maria Ubisses; CONTRERAS, Carmen Josefina Castillo; TURNBULL, Marcello Rodrigues. Avaliação do amaciamento de carne bovina de dianteiro (*Triceps brachii*) pelos métodos de maturação, estimulação elétrica, injeção de ácidos e tenderização mecânica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 1, p. 88–96, Jan. 1999.

QIHE, Chen *et al.* Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, v. 98, n. 4, p. 624–629, 2006.

QUINTAVALLA, Stefania; VICINI, Loredana. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, v. 62, n. 3, p. 373–380, 2002.

RAHMAN, P. Mujeeb; MUJEEB, V.M. Abdul; MURALEEDHARAN, K. Flexible chitosan-nano ZnO antimicrobial pouches as a new material for extending the shelf life of raw meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 97, p. 382–391, Apr. 2017.

REDL, A.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Determination of Sorbic Acid Diffusivity in Edible Wheat Gluten and Lipid Based Films. *Journal of Food Science*, v. 61, n. 1, p. 116–120, Jan. 1996.

REGGIANI, Carlo; BOTTINELLI, Roberto; STIENEN, Ger J. M. Sarcomeric Myosin Isoforms: Fine Tuning of a Molecular Motor. *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, v. 15, n. February, p. 26–33, 2000.

RITGER, Philip L.; PEPPAS, Nikolaos A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 1, p. 23–36, 1987.

SAVADEKAR, N. R.; MHASKE, S. T. Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, n. 1, p. 146–151, 2012.

SAWDY, J. C. et al. Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Science*, v. 67, n. 3, p. 421–426, 2004.

SGARBIERI, Valdemiro C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações. p. 517–517, 1996.

SILVA, Nelson Vieira Da et al. Características de carcaça e carne ovina: uma abordagem das variáveis metodológicas e fatores de influência. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 2, n. 4, p. 103–110, 2008.

SINGH, Preeti; ABAS WANI, Ali; SAENGERLAUB, Sven. Active packaging of food products: recent trends. *Nutrition & Food Science*, v. 41, n. 4, p. 249–260, 19 Jul. 2011.

SIRIPATRAWAN, Ubonrat; HARTE, Bruce R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, v. 24, n. 8, p. 770–775, 1 Nov. 2010.

SLAVUTSKY, Aníbal M; BERTUZZI, María a. Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. *Carbohydrate polymers*, v. 110, p. 53–61, 2014.

SORRENTINO, Andrea; GORRASI, Giuliana; VITTORIA, Vittoria. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, v. 18, n. 2, p. 84–95, 2007.

SOUZA, Victor Gomes Lauriano et al. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, v. 107, n. April, p. 565–572, 2017.

SULLIVAN, G. A.; CALKINS, C. R. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*, v. 85, n. 4, p. 730–734, 2010.

THOMÁS, Galindo Estrella et al. Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by-products. *Process Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 77–82, 2009.

TURBIANI, Franciele R B; KIECKBUSCH, Theo G. de Sódio Reticulados com Íons Cálcio Release of Calcium Benzoate from Films of Sodium Alginate Crosslinked with Calcium Ions. v. 21, p. 175–181, 2011.

USKOKOVIĆ, Vuk. Nanotechnologies: What we do not know. *Technology in*

Society, v. 29, n. 1, p. 43–61, Jan. 2007.

VARMA, A.J; DESHPANDE, S.V; KENNEDY, J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, n. 1, p. 77–93, Jan. 2004.

VÁSCONEZ, María B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, v. 42, n. 7, p. 762–769, 2009.

VILELA, Carla et al. Bioactive chitosan/ellagic acid films with UV-light protection for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, v. 73, p. 120–128, 2017.

VU, K.D. et al. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, v. 44, n. 1, p. 198–203, Jan. 2011.

WANG, Shanhui; JING, Yi. Study on the barrier properties of glycerol to chitosan coating layer. *Materials Letters*, v. 209, p. 345–348, 2017.

WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M. Sampling, Cooking, and Coring Effects on Warner-Bratzler Shear Force Values in Beef. *Journal of Animal Science*, v. 74, n. 7, p. 1553–1562, 1996.

WOLFGANG AEHLE. *Enzimas na Indústria: Produção e Aplicações*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2007.

YAM, Kit L. (Ed.). *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

ZHAO, Guo Yan et al. Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism. *Food Chemistry*, v. 134, n. 4

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE PAPAÍNA NAS PROPRIEDADES DE FILMES DE QUITOSANA REFORÇADOS COM NANOFIBRAS DE CELULOSE

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo redigido conforme as normas da revista Food Hydrocolloids

RESUMO

Atualmente, existe uma forte tendência para o uso de embalagens biodegradáveis produzidas a partir de biopolímeros contendo substâncias ativas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da incorporação de papaína nas propriedades estruturais, mecânicas e térmicas de filmes biodegradáveis a base de quitosana com nanofibras de celulose (NFC). O experimento foi conduzido utilizando um fatorial completo 3x4, com concentrações de nanofibras variando de 0-8% e papaína de 0-10%. Os filmes foram submetidos a análise de espessura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água (PVA), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), propriedades mecânicas (tração e perfuração) e análise termogravimétrica (TGA). A análise de FTIR confirmou a formação de ligações entre os constituintes dos filmes. A adição de NFC aumentou a solubilidade dos filmes de quitosana, e a incorporação de até 6% de papaína foi capaz de aumentar a resistência à água dos filmes de quitosana sem NFC. Os menores valores de PVA foram obtidos nos filmes com 4% de NFC e com concentrações de papaína até 6%. Os filmes de quitosana com nanofibras de celulose tornaram-se mais resistentes e rígidos, porém a incorporação de papaína reduziu a resistência à tração, o percentual de alongamento e a resistência à punctura dos filmes de quitosana com e sem NFC. A incorporação de papaína contribuiu para aumentar a estabilidade térmica dos nanocompósitos obtidos. Os melhores resultados foram obtidos para os filmes com 2% de papaína e 4% de NFC.

Palavras chaves: filmes biodegradáveis; nanocompósitos; propriedades mecânicas; estabilidade térmica.

1 INTRODUÇÃO

Em resposta à crescente demanda por um material de embalagem que seja compatível com o meio ambiente, muita atenção têm sido dada pelos pesquisadores ao desenvolvimento de embalagens biodegradáveis a partir de biopolímeros. Entre os polímeros naturais utilizados para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, a quitosana destaca-se devido à sua excelente capacidade de formação de filme e boas propriedades de barreira (Crizel et al., 2018). A quitosana é produzida industrialmente pela desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, é não tóxica, biodegradável, biocompatível, comercialmente disponível e tem sido muito utilizada na produção de filmes biodegradáveis para aplicação em embalagens de alimentos (Liu et al., 2017; Martins, Cerqueira, & Vicente, 2012; Perdonés, Chiralt, & Vargas, 2016; Prateepchanachai, Thakhiew, Devahastin, & Soponronnarit, 2017; Qiao, Ma, Zhang, & Yao, 2017).

Embora os filmes a base de quitosana apresentem um grande potencial na produção de embalagens biodegradáveis, eles possuem, como outros biopolímeros, fracas propriedades mecânicas e pouca resistência à água, quando comparados aos polímeros tradicionais obtidos do petróleo. Portanto, diversos estudos foram realizados com intuito de melhorar as propriedades desse biopolímero e torná-lo competitivo com os polímeros sintéticos. Por estas razões, os polímeros naturais foram misturados com enchimentos de reforço em escala nanométrica para criar os filmes nanocompósitos (Avella et al., 2005; Azevedo et al., 2015; Dehnad, Emam-Djomeh, Mirzaei, Jafari, & Dadashi, 2014; Dias et al., 2014).

Foi evidenciado que a presença de nanopartículas de celulose na matriz polimérica proporciona desempenhos superiores, tais como propriedades mecânicas e de barreira, levando à próxima geração de materiais biodegradáveis (Abdulkhani, Hosseinzadeh, Ashori, Dadashi, & Takzare, 2014; Fernandes et al.,

2010; Khan et al., 2012; Santos et al., 2014; Sung, Chang, & Han, 2017; Yu et al., 2017). As nanofibras de celulose (NFC) têm sido pesquisadas para seu uso em embalagens biodegradáveis devido à sua baixa densidade, biodegradabilidade e baixo custo, além de ser renovável. As NFCs possuem alta relação de aspecto e uma grande área de superfície. O diâmetro das NFCs situa-se tipicamente na faixa de 5-50 nm, enquanto o comprimento das fibras pode exceder 1 μm . A NFC possui um elevado módulo de elasticidade (~ 140 GPa) e uma alta resistência à tração (2-3 GPa). Todas estas características importantes da NFCs tornaram-na um candidato atraente nas pesquisas de nanocompósitos (Soni, Hassan, Schilling, & Mahmoud, 2016; Wu, Farnood, O'Kelly, & Chen, 2014).

Nos últimos anos, a incorporação de um agente ativo no material da embalagem recebeu muita atenção na indústria de alimentos, pois essa tecnologia permite prolongar a vida útil dos produtos embalados e melhorar a qualidade dos alimentos (Ahmed et al., 2017; Barbosa-Pereira et al., 2013; Maryam Adilah, Jamilah, & Nur Hanani, 2018; Yu et al., 2017). A papaína é uma enzima proteolítica que possui uma cadeia polipeptídica incluindo 212 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 23,4 kDa, ponto isoelétrico a 8,75, atividade ótima a pH 5-8 e apresenta um grande potencial no desenvolvimento de embalagens ativas, pois possui propriedades antibacterianas e antioxidantes (Alpay & Uygun, 2015; Cynthia, Prabhawathi, & Mukesh, 2014; Eshamah, Han, Naas, Acton, & Dawson, 2014; Manohar, Prabhawathi, Sivakumar, & Doble, 2015), além de ser comumente usada para amaciar a carne e seus derivados (Abdel-Naeem & Mohamed, 2016; Barekat & Soltanizadeh, 2017; Gerelt, Ikeuchi, & Suzuki, 2000), produzir hidrolisados de proteínas (Alpay & Uygun, 2015) e na clarificação de suco de frutas e na indústria de cerveja evitando a turbidez deste produto durante seu armazenamento e refrigeração prolongada (Andrade-Mahecha, Morales-Rodríguez, & Martínez-

Correa, 2011; Esti, Benucci, Lombardelli, Liburdi, & Garzillo, 2013; Mosafa, Moghadam, & Shahedi, 2013).

Há um número considerável de estudos que investigaram a adição de nanopartículas de celulose em filmes de quitosana. No entanto, nenhum até agora avaliou o efeito da incorporação de enzimas proteolíticas nas propriedades dos nanocompósitos de quitosana e nanocelulose. Diante disso o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito da incorporação de papaína nas propriedades estruturais, mecânicas e térmicas de filmes biodegradáveis à base de quitosana com nanofibras de celulose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

A quitosana (QUI) usada na preparação dos filmes foi adquirida da Polymar Ciência e Nutrição S/A (Fortaleza, Brasil), a qual possui peso molecular elevado (PM = 71,3 kDa) e um grau de desacetilação de 85,9%. A Papaína (EC 3.4.22.2) foi adquirida da Vetec (de *Carica papaya*, Papaína pura) e a Nanofibra de celulose (NFC) foi cedida pelo Departamento de Engenharia Florestal-UFLA com teor de sólidos de 1,88% (m/v).

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado utilizando um planejamento fatorial completo 3X4 com os seguintes fatores: concentração de NFC e concentração de papaína, de acordo com a Tabela 1. O experimento foi conduzido, usando um delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições.

Tabela 1 Composição dos filmes desenvolvidos

Filme	NFC (%)	Papaína (%)
1	0	0
2	4	0
3	8	0
4	0	2
5	0	6
6	0	10
7	4	2
8	4	6
9	4	10
10	8	2
11	8	6
12	8	10

2.3 Produção dos filmes

Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting* de acordo com a metodologia proposta por Zhong, Song & Li, (2011), com algumas modificações. A solução filmogênica foi preparada dissolvendo 2,0 g de QUI em 100 mL de solução de ácido acético 1,0 % (v/v) e então deixada em repouso por 12 horas para a hidratação do polissacarídeo. Após esse período a solução foi agitada (2000 rpm) por 15 minutos em agitador mecânico (Modelo 711711S, Fisaton) e depois o pH da solução filmogênica foi ajustado para 5,0 com solução de NaOH (0,1M) a fim de evitar a desnaturação da enzima. A solução foi centrifugada a 1950 g por 5 min, para retirada das impurezas, e então utilizada para a preparação dos filmes apresentados na Tabela 1.

Para obtenção do filme controle, a solução foi agitada em homogeneizador ultrassônico (Sonifier Cell Disruptor Branson – Modelo 450D, Manchester, UK) por 15 minutos com amplitude de 80% a 25 °C. Os filmes com NFC/QUI (filmes 2, 3) foram produzidos através da adição de NFC na solução filmogênica e posterior agitação (1000 rpm) por 5 min em agitador magnético e então submetidas homogeneização no ultrassom. Para os filmes com QUI/Papaína (filmes 4, 5 e 6), a enzima foi adicionada à solução filmogênica e submetida à

agitação magnética (1000 rpm) por 5 min e então homogeneizadas no ultrassom como no filme controle. Nos filmes contendo QUI/NFC/Papaína (filmes 7-12), a NFC foi adicionada após ser incorporada a papaína na solução filmogênica conforme a metodologia dos filmes 4, 5 e 6. As soluções obtidas (150 mL) foram vertidas em placas de acrílico (660 cm²) e então submetidas à secagem em câmara de temperatura e humidade controlada (30 °C ± 2 e 50% UR, modelo SL-206, SOLAB) durante 16 horas.

2.4 Espessura e acondicionamento dos filmes

Antes da caracterização, todos os filmes foram acondicionados em câmara incubadora (Modelo SP-500, SPLabor) durante pelo menos 48h. A espessura dos filmes foi determinada utilizando um micrômetro digital, através da medição de 10 pontos aleatórios em cada filme. As medições foram usadas nas análises de permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e punctura.

2.5 Solubilidade

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo a metodologia proposta por Gontard, Guilbert, & Cuq (1992), com modificações. Inicialmente, a massa seca (M_{inicial}) de amostras de filme (2 cm²) foi determinada em função de sua umidade em uma estufa de secagem mantida a 105 °C por 24 horas, após esse tempo as amostras foram resfriadas e pesadas. Em seguida as amostras foram colocadas em erlenmeyers contendo 50 mL de água (25 °C) e então mantidas sob agitação a 150 rpm durante 24 h, utilizando um banho-maria. Após esse período as amostras foram retiradas da água e a massa seca (M_{final}) foi determinada nas mesmas condições descritas inicialmente. A solubilidade em água foi expressa em porcentagem de material solubilizado, calculada a partir dos resultados em triplicata, conforme a Equação 1.

$$\text{Solubilidade(\%)} = \frac{\text{Massa Inicial} - \text{Massa Final}}{\text{Massa Inicial}} \times 100 \quad (1)$$

2.6 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A PVA foi determinada por gravimetria segundo método E96-00 (ASTM, 2002a). Os filmes, em forma de disco com 5 cm de diâmetro, foram fixados em cápsulas contendo sílica-gel em seu interior (UR = 0%; 0 Pa de pressão de vapor), formando uma membrana de modo a garantir que a difusão de umidade ocorra exclusivamente através dos filmes. A cápsula foi colocada dentro de um dessecador contendo água destilada (UR = 100%), em sala climatizada a 22 °C. A cápsula foi pesada em balança analítica, com precisão de 0,0001 g, a cada 24 h, durante 7 dias consecutivos. A análise foi realizada em triplicata e a PVA foi calculada por meio da Equação (2).

$$PVA = \frac{G \times \varepsilon}{A \times T (P1 - P2)} \quad (2)$$

Em que: PVA é a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$); G é o ganho de massa (g) da célula durante 24 h; ε é a espessura (m) média do filme; A é a área (m^2) de permeação do filme; T é o tempo (s) e P1-P2 é o gradiente de pressão (Pa) de vapor entre as superfícies do filme ($0,4297 \times 10^4 \text{ Pa}$).

2.7 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectrofotômetro FTS 3000 Excalibur Digilab (EUA), equipado com detector KBr, faixa espectral de análise de $4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$, número de *scans* de 64 e resolução de 4cm^{-1} para obtenção dos espectros.

2.8 Propriedades mecânicas

O teste de tração foi determinado utilizando um Analisador de Textura Stable Micro Systems (modelo TA-XT2, Inglaterra) com célula de carga de 1 kN, de acordo com o método padrão D882-02 (ASTM, 2002b). O experimento foi realizado com uma separação inicial entre as garras de 50 mm e os corpos de prova com dimensões de 10x1,5 cm foram tracionados a uma velocidade constante de 0,4 mm/s até sua ruptura. Para cada tratamento foram analisados 10

corpos de prova por repetição totalizando 3 repetições. A resistência à tração (TS) foi calculada usando a força máxima dividida pela área da seção transversal do filme, o módulo de elasticidade (ME) foi calculado pelo coeficiente angular da porção linear da curva de tensão/deformação e o alongamento (%) foi calculado como o alongamento final da amostra menos comprimento inicial, dividido pelo comprimento inicial da amostra e multiplicado por 100.

Para a análise de perfuração, as amostras foram cortadas em quadrados de 3x3 cm, e fixadas em um suporte metálico com orifício central (2,1 cm de diâmetro) para passagem da sonda de forma perpendicular. Os parâmetros utilizados durante o teste foram: sonda esférica de 5,0 mm de diâmetro (sonda A/TG), velocidade de deslocamento da sonda de 0,8 mm/s e distância percorrida por ela até a ruptura. Para cada tratamento foram analisados 10 corpos de prova. A resistência à perfuração (RP, N/mm) foi calculada por meio da divisão do valor da força máxima obtida no ponto de ruptura pela espessura do filme, com o objetivo de se eliminar o efeito da variação da espessura sobre os resultados. Já a deformação (mm) foi determinada por meio do ponto de ruptura dos corpos de prova.

2.9 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica e o perfil de degradação dos filmes foram determinados por termogravimetria (TGA) em aparelho DTG60H-SHIMADZU (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão). A análise foi realizada sob atmosfera de nitrogênio com taxa de fluxo de 50 mL/min, aquecimento de 40 a 600 °C, razão de aquecimento de 10 °C/min e peso da amostra de 4-6 mg (Jones, Mandal, & Sharma, 2015).

2.10 Análise Estatística

Os resultados de espessura, propriedades mecânica, permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade foram submetidos a análises estatísticas utilizando o Sistema de Análise Estatística (SAS), versão 9.2. Para análise destes

resultados foi feita uma análise de variância (ANOVA) e análise de regressão múltipla (PROC REG), os resultados foram considerados significativamente diferentes em $P < 0,05$. Os modelos ajustados foram escolhidos com base na significância dos parâmetros, na falta de ajuste e do coeficiente de regressão. Os resultados de Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e Termogravimetria (TGA) foram submetidos à análise descritiva.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espectroscopia na região do infravermelho - FTIR

A análise de FTIR foi utilizada para investigar as interações entre a NFC, a quitosana e a papaína. Na Figura 1 estão apresentados os espectros dos filmes estudados.

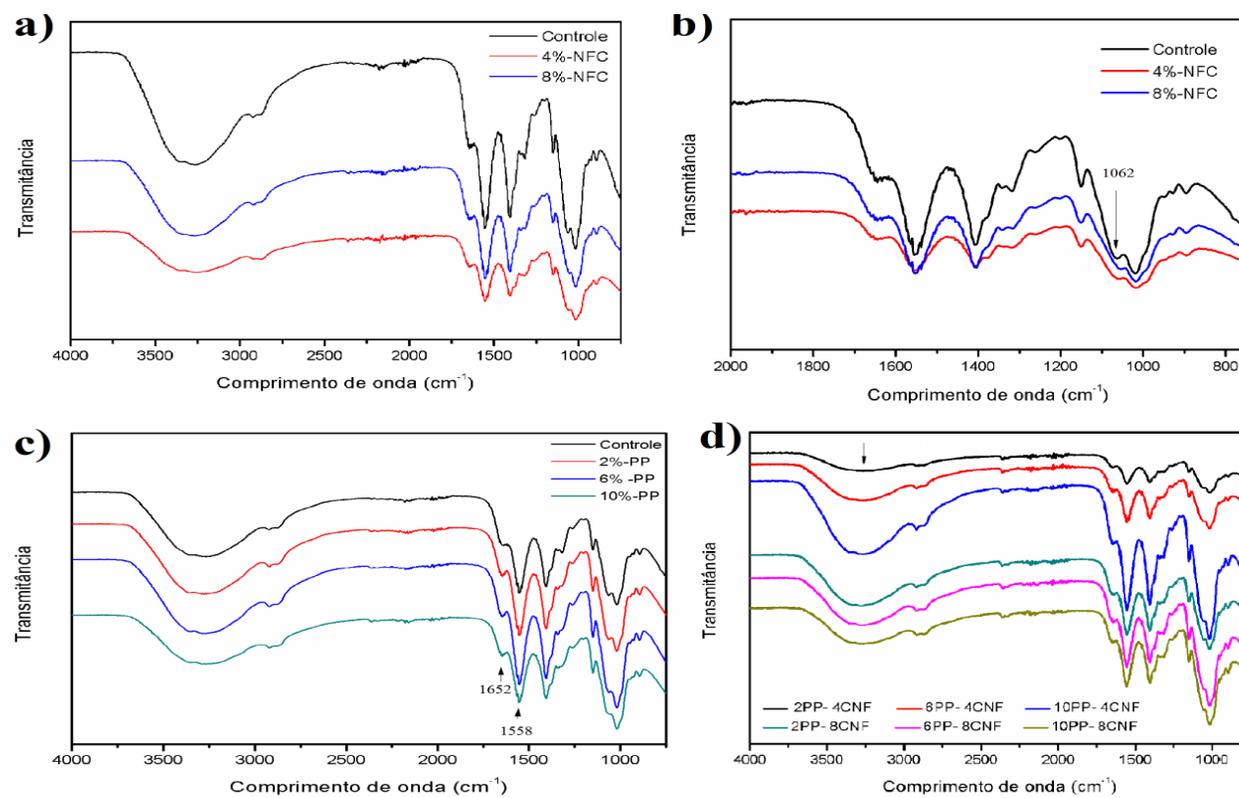


Figura 1. Espectros FTIR de filmes de quitosana com NFC e papaína: a e b) filme controle e filmes com NFC; c) filmes de quitosana com papaína; d) filmes de quitosana com papaína e NFC.

Para o filme puro de quitosana, existem quatro bandas de absorção características principais. A primeira é uma banda larga que varia de cerca de 3600-3100 cm^{-1} que é atribuída à vibração de alongamento O-H que sobrepõe a vibração de alongamento N-H na mesma região. A segunda é a banda larga entre 2800 e 3100 cm^{-1} que é atribuída à vibração de estiramento C-H. A terceira é a banda Amida-I localizada em 1652 cm^{-1} que é característica da deformação axial C=O. E a última é a banda a 1558 cm^{-1} devido à vibração de flexão N-H (amida II) (Battisti & Campana-Filho, 2008; Clayden, Greeves, & Warren, 2012; Liu, Adhikari, Guo, & Adhikari, 2013; Martins, Cerqueira, & Vicente, 2012; Prateepchanachai, Thakhiew, Devahastin, & Soponronnarit, 2017).

Nos espectros vibracionais dos filmes de quitosana com NFC (Figura 1.a), percebeu-se que as bandas características da quitosana se mantiveram, no entanto, foi possível observar uma diminuição das intensidades dos picos de acordo com a concentração de NFC adicionada aos filmes. Além disso, observou-se um pequeno deslocamento para números de onda inferiores à banda localizada em 1062 cm^{-1} (Figura 1.b), relacionada ao alongamento do grupo C-O no filme de quitosana puro, sugerindo uma interação por ligação de hidrogênio entre a quitosana e NFC (Corsello et al., 2017).

Os espectros dos filmes contendo papaína (Figura 1.c) mostram um aumento na intensidade dos picos à 1652 cm^{-1} (-CONH) e 1547 cm^{-1} (-NH), que são característicos da papaína, confirmando a incorporação da enzima na matriz de quitosana (Mosafa et al., 2013). Na Figura 1.d, na região do número de ondas 3600-3000 cm^{-1} , que está relacionada às vibrações de alongamento -OH e -NH, os picos de absorção tornaram-se mais intensos à medida que se aumenta a concentração de papaína o que pode corresponder às interações entre os grupos amino da papaína e as hidroxilas das NFCs (Liu et al., 2013; Tan et al., 2016).

3.2 Espessura, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A adição de papaína e de NFC e as interações entre estes fatores causaram uma variação significativa nos resultados de espessura, solubilidade e PVA dos filmes de quitosana. Os modelos ajustados estão apresentados na Tabela 2.

A Figura 2 mostra o efeito da adição de NFC e de papaína na espessura, solubilidade em água e PVA dos filmes de quitosana. As espessuras dos filmes obtidos variaram de 0,037 a 0,082 mm e esses valores aumentaram significativamente à medida que aumentou a concentração de NFC e de papaína na matriz (Figura 2.a). A variação da espessura dos filmes pode ser atribuída ao maior teor de sólidos secos presentes após a secagem dos filmes.

Tabela 2 Modelos ajustados para as propriedades mecânicas, solubilidade e PVA

Modelos ajustados	R ²	Prob>F	Falta de ajuste
RT = 13,25 - 2,37β ₁ + 0,51β ₂ + 0,16β ₁ ²	0,89	0,0084	0,4798
ME = 108,88 - 2,85β ₁ + 5,49β ₂ + 0,13β ₁ β ₂	0,88	0,0111	0,5567
AL = 33,42 - 6,95β ₁ + 0,48β ₂ - 0,23β ₂ ² +0,97β ₁ β ₂ - 0,07β ₁ β ₂	0,89	0,0290	0,6543
RP = 251,91- 39,50β ₁ -19,35β ₂ +2,36β ₁ ² +1,10β ₁ β ₂ +1,36β ₂ ²	0,89	0,0156	0,5432
DP = 6,33-0,50β ₁ - 0,34β ₂ + 0,02β ₁ ² + 0,03β ₁ β ₂	0,95	<0,0001	0,3132
E = 0,0386+0,0051β ₁ +0,0050β ₂ -0,0004β ₁ ² 0,0003β ₂ ²	0,92	0,0008	0,4823
PVA =2,18 - 0,03β ₁ - 0,06β ₂ + 0,00β ₁ ² + 0,004β ₁ β ₂ +0,01 β ₂	0,96	<0,0001	0,3945
SOL = 35,20 - 0,83β ₁ + 1,12 β ₂ + 0,11 β ₁ ² - 0,15 β ₁ β ₂	0,90	0,0023	0,5943

* β₁ = concentração de papaína (%) e β₂ = Concentração de NFC; TS=Resistencia à tração (MPa); ME= módulo de elasticidade (MPa); AL= percentual de alongamento (%); RP=resistência a punctura (N/mm); DP= deformação na punctura (mm); PVA= permeabilidade ao vapor de água (g.s⁻¹.m⁻¹.Pa⁻¹); SOL=solubilidade em água (%).

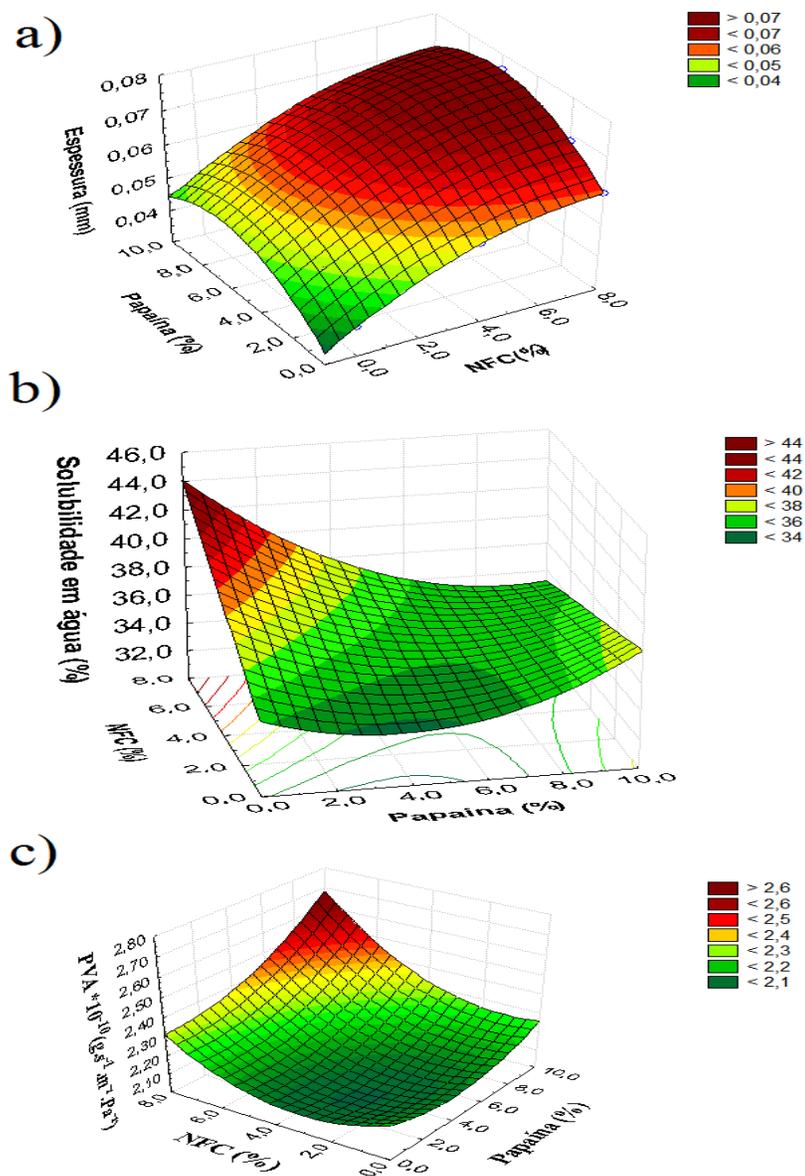


Figura 2. Espessura, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de quitosana adicionados de NFC e papaína.

Os filmes estudados apresentaram solubilidade variando de 31,88 a 43,28%. A solubilidade em água é uma importante propriedade, pois determina a aplicação dos filmes como embalagens de alimentos. Filmes com alta solubilidade não são indicados para contato com alimentos em que a a_w é elevada. Todos os filmes estudados, após as 24 horas submersos em água, permaneceram aparentemente íntegros quanto à forma, e ainda permaneceram com boa flexibilidade e fáceis de manusear.

Os filmes com 2 e 6% de papaína (sem NFC) apresentaram redução significativa na solubilidade em água (Figura 2.b), sugerindo que com a adição de até 6% de papaína na matriz é possível aumentar a resistência a água dos filmes de quitosana. A redução da solubilidade com a adição de baixas concentrações de papaína pode ser atribuído a uma redução da quantidade de grupos hidrofílicos (OH) na matriz devido à formação de ligações de hidrogênio formada entre a papaína e a quitosana.

A adição de NFC causou um aumento significativo na solubilidade dos filmes de quitosana, provavelmente devido ao caráter hidrofílico das NFCs. Porém, com incorporação de papaína houve uma redução da solubilidade em água dos nanocompósitos. No filme 10 (10% de papaína e 8% de NFC) observou-se uma redução de 17,3% na solubilidade deste nanocompósito quando comparado ao filme 3 (8% de NFC). Esse comportamento é indicativo da interação entre a papaína e as NFCs, o que também foi comprovado na análise de FTIR. As ligações formadas entre a papaína e a NFC dificultaram a interação da NFC com a molécula de água, resultando em uma redução da solubilidade dos nanocompósitos.

Como mostra a Figura 2.c, a adição de NFC e de papaína afetaram significativamente a PVA dos filmes de quitosana. Em altas concentrações de NFC e de papaína foi observado um aumento da PVA dos filmes de quitosana, que pode ser explicado pela natureza hidrofílica da enzima e das NFCs. Este

fenômeno excede a propriedade de barreira causada pela presença das nanofibras na matriz. Já nos filmes com pequenas quantidades de papaína (2 e 6%) e 4% de NFC notou-se uma redução significativa da PVA, sugerindo que os filmes com até 6% de papaína e 4% de NFC apresentam maior interação entre os seus constituintes. Os menores valores de PVA para os filmes adicionados de 4% NFC, podem ser devido à formação de uma rede de ligação de hidrogênio entre as cadeias de quitosana e de NFC. Esse arranjo forma um caminho mais tortuoso para a passagem das moléculas de água, diminuindo assim, sua difusão através do filme (Azeredo et al., 2009; Bras et al., 2010).

A permeabilidade ao vapor de água (WVP) é a habilidade do filme para dificultar a transferência de umidade entre os alimentos e sua atmosfera circundante. É uma das propriedades de aplicação mais importantes da embalagem de alimentos. Em geral, quanto menor a PVA dos materiais de embalagem, melhor será a capacidade do filme em reduzir a perda de umidade dos alimentos embalados (Zhou, Wang, & Gunasekaran, 2009).

3.3 Propriedades mecânicas

A adição de NFC e de papaína nos filmes de quitosana causou efeito significativo em todas as propriedades mecânicas estudadas e os modelos ajustados estão apresentados na Tabela 2. Observou-se que a adição de NFC causou um aumento da resistência à tração (Figura 3.a) e do módulo de elasticidade (Figura 3.b) tanto nos filmes de quitosana puro como nos filmes contendo papaína. Pelissari, et al. (2017) atribuíram esse efeito à interação da matriz com a NFC através de ligações de hidrogênio formando uma rede fibrilar dentro da matriz polimérica. Isso significa que a incorporação de NFC resultou em uma matriz mais resistente com fortes interações entre as nanofibras e a matriz de quitosana.

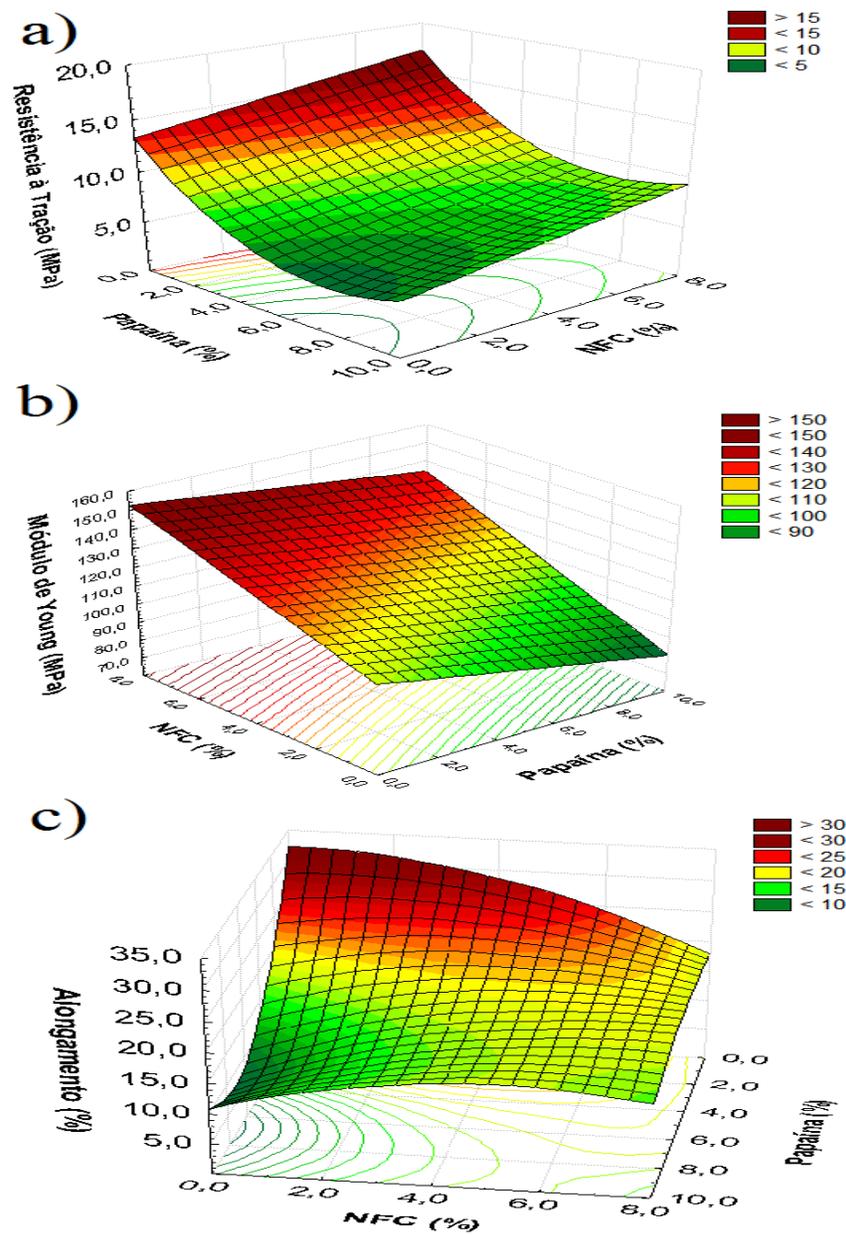


Figura 3. Propriedades de tração dos filmes de quitosana reforçados com NFC e incorporados com papaína.

Resultados semelhantes também foram encontrados por outros autores ao adicionarem NFC em filmes biodegradáveis. Azeredo et al. (2010) ao analisar a adição de NFC (0 a 20g/100g) e glicerol (0 a 30g/100g) na matriz de quitosana observaram que a NFC aumentou a resistência à tração e módulo de elasticidade dos filmes, mas diminuiu seu alongamento, sendo as concentrações ideais definidas como: concentração de glicerol, 18g/100g; e concentração de NFC, 15g/100g.

Jonoobi, Harun, Mathew, & Oksman, (2010) analisaram as propriedades mecânicas de nanocompósitos de PLA/NFC e relataram que o módulo de elasticidade do PLA aumentou de 2,9 GPa para 3,6 GPa com a adição de nanofibras de 5% em peso, o que corresponde a um aumento de 24%. Os autores também observaram um aumento de 21% na resistência à tração para compósitos de PLA/NFC em comparação com PLA puro.

A adição de papaína aos nanocompósitos causou uma redução nos valores de resistência à tração e módulo de elasticidade. Essa redução pode ser atribuída a um enfraquecimento das ligações formadas entre a quitosana e as NFCs causado pelas ligações formadas entre a papaína e as NFCs, como observado nos resultados de FTIR.

Em relação ao percentual de alongamento (Figura 3.c) observou-se que nos filmes sem papaína e nos filmes com 2% de enzima, houve uma redução significativa nesse parâmetro, conforme aumentou a concentração de NFC. Esses resultados sugerem que em baixas concentrações de papaína, as interações entre as NFC e a quitosana são favorecidas, resultando em uma matriz com menor mobilidade entre as cadeias poliméricas tornando os filmes menos flexíveis (Gontard & Guilbert, 1996).

Na análise de punctura (Figura 4), foi possível observar que os filmes de quitosana, com e sem NFC, foram consideravelmente menos resistentes à perfuração ($p < 0,05$) quando se adicionou a papaína. Os

filmes com baixas concentrações de papaína foram os que apresentaram maiores valores de resistência à punctura. Mais uma vez fica evidente que em baixas concentrações de papaína há uma maior interação entre os constituintes da matriz, o que resultou em filmes com maior resistência à perfuração. Os resultados obtidos na análise de PVA corroboram com essa discussão, pois em pequenas concentrações de papaína os filmes apresentaram menor PVA, caracterizando uma matriz com maior interação entre os seus componentes.

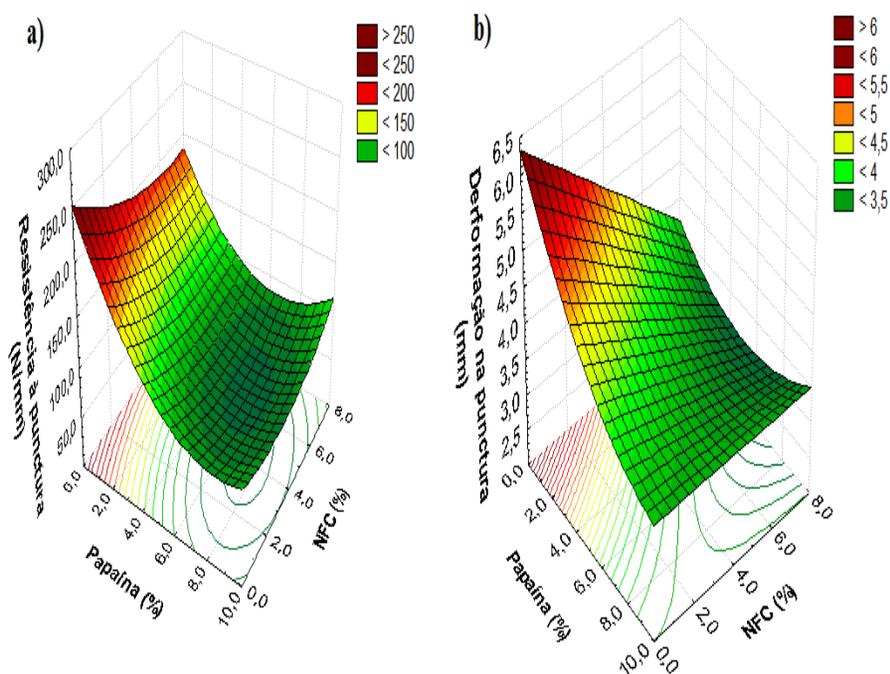


Figura 4. Resistência e deformação na punctura dos filmes de quitosana reforçados com NFC e incorporados com papaína.

A adição de papaína causou uma redução nas propriedades de tração e de resistência à punctura dos filmes de quitosana. Esse comportamento pode ser atribuído a uma possível hidrólise enzimática da quitosana causada pela papaína

e conseqüentemente uma redução do seu peso molecular (Pan, Zeng, Foua, Alain, & Li, 2016). Bof, Bordagaray, Locaso, & García, (2015) ao caracterizarem filmes de quitosana e amido de milho, analisaram a influência do peso molecular da quitosana no comportamento mecânico desses filmes. Os autores observaram que os filmes de quitosana com baixo peso molecular apresentaram resistência à tração menor do que os filmes de quitosana com alto peso molecular. Resultados semelhantes foram encontrados por Leceta, Guerrero, & De La Caba, (2013) ao estudar filmes à base de quitosana com diferentes pesos moleculares. Estes autores observaram um aumento na resistência à tração e no módulo de elasticidade dos filmes, conforme aumentou o peso molecular da quitosana, enquanto o alongamento na ruptura destes filmes diminuiu.

3.4 Análise termogravimétrica (TGA)

O perfil de estabilidade térmica dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de papaína e NFC foi avaliado por análise termogravimétrica e os termogramas obtidos em atmosfera de nitrogênio são exibidos nas Figuras 5 e 6.

O filme controle (Figura 5. a) mostra três estágios de degradação térmica. No primeiro estágio, compreendido entre 30 e 150 °C, a perda de massa esta relacionada à perda de moléculas de água que estariam ligadas aos grupamentos amino e hidroxila através de ligações de hidrogênio, portanto, tal evento está relacionado tanto com as interações polímero-água, quanto com a capacidade de o polímero reter água (Fráguas et al., 2015). O segundo estágio (pico a cerca de 260 °C) está relacionado a perda de massa atribuída ao complexo processo de decomposição que acontece principalmente por desidratação, desacetilação e despolimerização da quitosana (Zohuriaan & Shokrolahi, 2004). Já no terceiro estágio térmico (em temperaturas maiores que 400°C) é atribuído a degradações correspondentes aos resíduos finais do polímero (Britto & Campana-Filho, 2007).

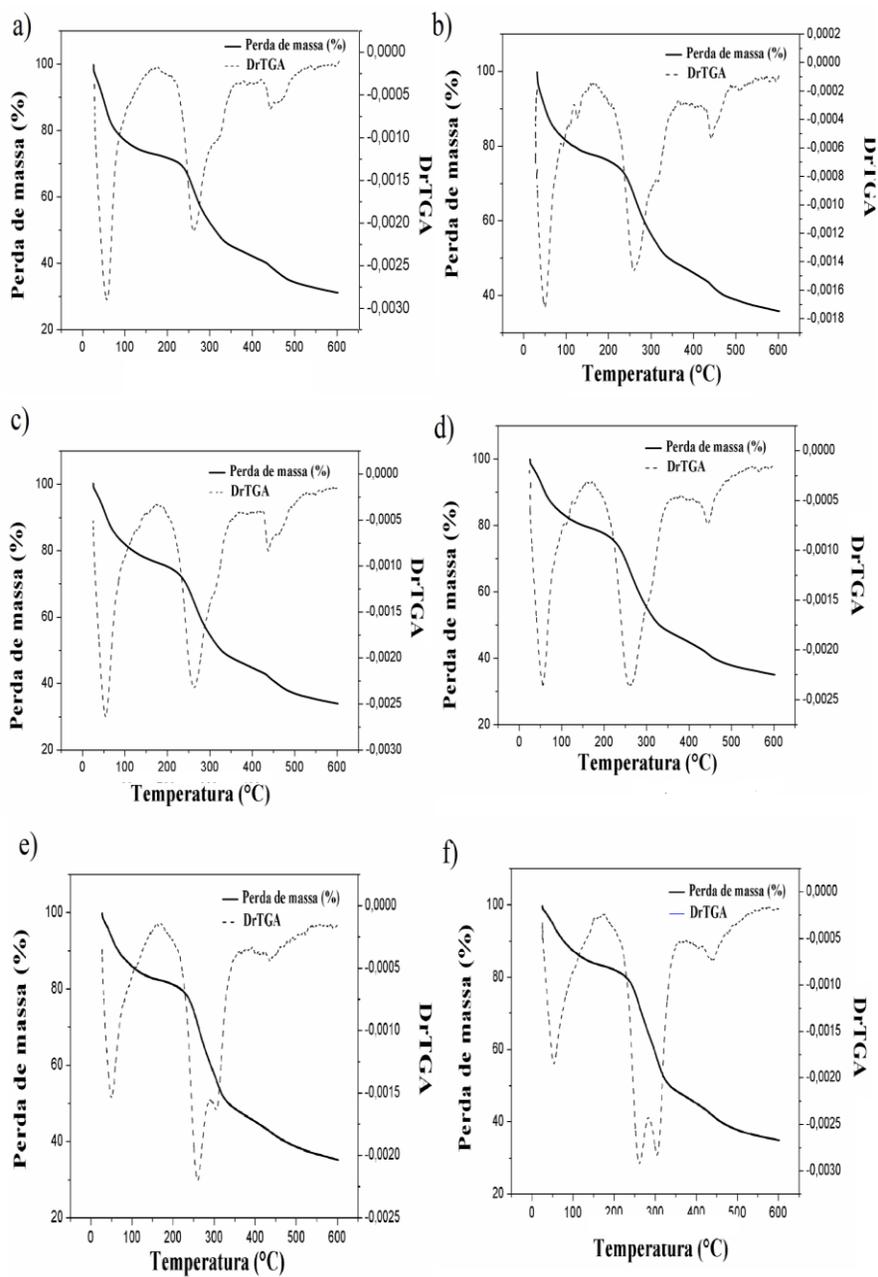


Figura 5. Curvas TGA e DrTGA dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de papaína e NFC: quitosana pura (a); 2%PP (b); 6%PP (c); 10%PP (d); 4%NFC (e); 8%NFC (f).

Os filmes contendo papaína (Figura 5. b-d) apresentaram comportamento térmico semelhante ao filme controle, com desidratação inicial seguido por processo intenso de decomposição. No entanto, a incorporação de papaína resultou em filmes mais estáveis, com temperatura inicial de decomposição entre 174,4 - 175,8 °C, sendo estes valores maiores do que a do filme controle (173,1 °C).

Para as amostras com NFC (Figura 5.e-f e Figura 6) foi possível observar uma contribuição clara do perfil de degradação térmica da nanofibra de celulose, pelo aparecimento de um pequeno estágio de degradação térmica a cerca de 310 °C. Esse quarto estágio é atribuído à despolimerização, desidratação, e decomposição das NFCs, resultando na formação de compostos voláteis e em seguida a carbonização (Cao, Habibi, & Lucia, 2009).

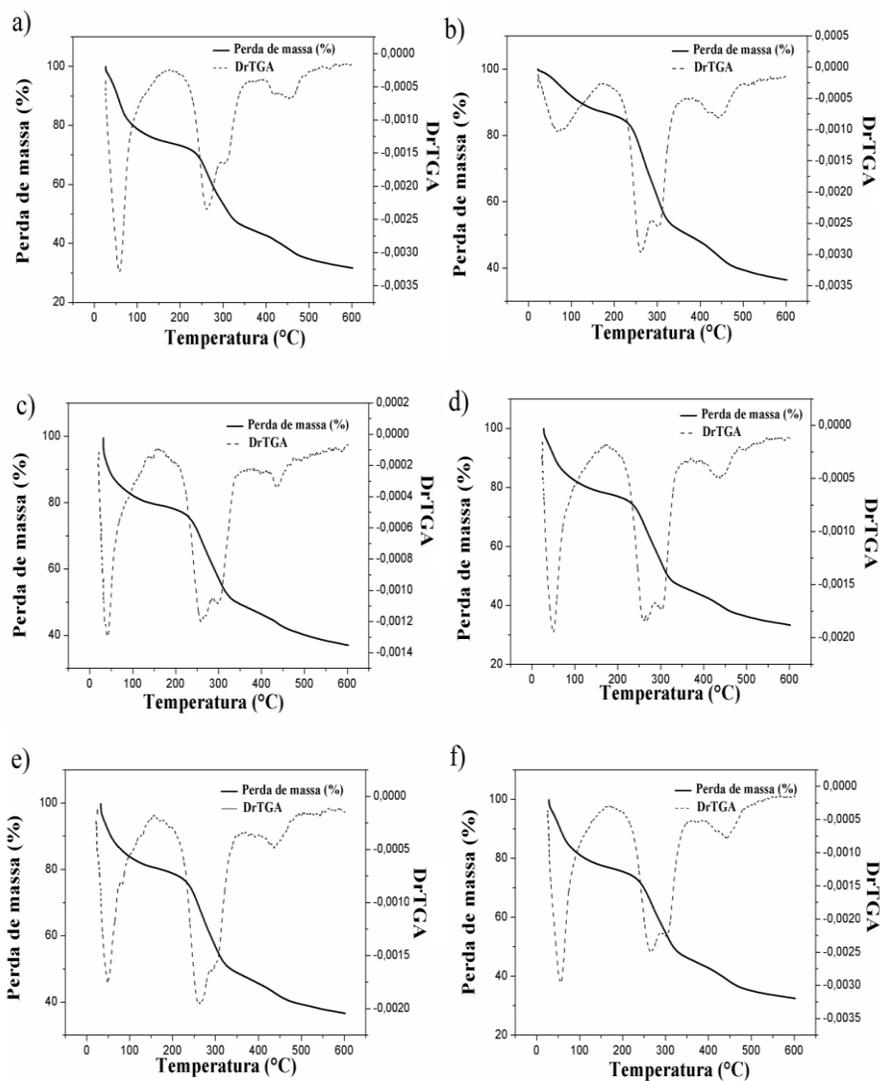


Figura 6. Curvas TGA e DrTGA dos nanocompósitos com diferentes concentrações de papaína e NFC: 2%PP-4%NFC (a); 2%PP-8%NFC (b); 6%PP-4%NFC (c); 6%PP-8%NFC (d); 10%PP-4%NFC (e); 10%PP-8%NFC.

A Tabela 3 mostra a temperatura dos picos e a correspondente perda de peso no estágio de decomposição para os filmes desenvolvidos.

Tabela 3 Comportamento térmico dos filmes de quitosana reforçados com NFC e incorporados com papaína (à 173-365 °C)

Filme	T _i (°C)	T _{pico} (°C)	T _f (°C)	PM ₂ (%)	(%) Res _{600°C}
Controle	173,1	259,7	356,2	24,7	21,1
4%NFC	173,9	259,4	356,1	34,9	13,5
8%NFC	179,8	259,4	357,8	36,3	13,3
2%PP	174,4	259,3	359,5	28,6	13,7
6%PP	174,8	259,7	361,7	31,0	14,4
10%PP	175,4	259,4	362,7	33,3	13,4
2%PP-4%NFC	182,8	262,7	357,6	31,0	12,7
6%PP-4%NFC	180,8	258,7	351,6	29,6	12,9
10%PP-4%NFC	182,0	263,8	261,4	31,9	13,2
2%PP-8%NFC	181,3	264,7	364,3	35,5	15,3
6%PP-8%NFC	181,8	264,7	363,1	33,7	13,6
10%PP-8%NFC	181,3	264,8	358,7	34,0	13,7

T_i: temperatura inicial de degradação; T_{pico}: temperatura máxima de degradação; e T_p: temperatura final de degradação; PM₁: perda de massa no primeiro estágio; PM₂: perda de massa na faixa de decomposição; Res_{600°C}: porcentagem de resíduo a 600°C.

A temperatura de decomposição dos filmes de quitosana teve um pequeno aumento com a adição de NFC na matriz. O filme com 8% de NFC teve um aumento de 6,7 °C em relação ao controle. Corsello et al. (2017) também observaram uma melhoria na estabilidade térmica dos filmes de quitosana devido à incorporação de altas concentrações de nanofibras de celulose.

O filme com 2% de papaína e 4% de NFC foi o que apresentou maior estabilidade térmica com um aumento na temperatura inicial de decomposição de 9,7 °C quando comparado ao controle. Observa-se que todos os filmes contendo NFC/papaína apresentaram temperatura inicial de decomposição maior do que os nanocompósitos sem a enzima, indicando que a incorporação da papaína na matriz contribuiu para aumentar a estabilidade térmica dos nanocompósitos obtidos.

4 CONCLUSÕES

A análise de FTIR confirmou a formação de ligações de hidrogênio entre a NFC, a quitosana e a papaína. Os filmes de quitosana tiveram as suas propriedades mecânicas melhoradas com a adição de nanofibras de celulose tornando se mais resistentes e rígidos, porém a incorporação de papaína reduziu a resistência à tração, o percentual de alongamento e resistência à punctura dos filmes com e sem NFC. A adição de 2% de papaína e 4% de NFC resultou em filmes com maior estabilidade térmica, menor solubilidade em água e maior barreira ao vapor de água.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- Abdel-Naeem, H. H. S., & Mohamed, H. M. H. (2016). Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. *Meat Science*, *118*, 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.021>
- Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Dadashi, S., & Takzare, Z. (2014). Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. *Polymer Testing*, *35*, 73–79. <http://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2014.03.002>
- Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A. L., Li, Z., Qazi, I. M., ... Lv, L. (2017). A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*, *82*, 163–178. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009>
- Alpay, P., & Uygun, D. A. (2015). Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *111*, 56–63. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.001>
- Andrade-Mahecha, M. M., Morales-Rodríguez, O., & Martínez-Correa, H. A. (2011). Estudo do processo de extração de papaína a partir do látex do fruto de mamão (*Carica papaya* L.) cv. Maradol. *Acta Agronômica*, *60*(3), 218–224.
- ASTM. (2002a). Standard test methods for water vapor transmission of materials. In *AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS* (p. ASTM E96-00.). Philadelphia.
- ASTM. (2002b). Standard teste method for tensile properties of thin plastic sheeting. In *AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS* (p. ASTM D882-02.). Philadelphia.
- Avella, M., De Vlieger, J. J., Errico, M. E., Fischer, S., Vacca, P., & Volpe, M. G. (2005). Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, *93*(3), 467–474. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.024>
- Azeredo, H. M. C., Mattoso, L. H. C., Avena-Bustillos, R. J., Filho, G. C., Munford, M. L., Wood, D., & McHugh, T. H. (2010). Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*, *75*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01386.x>

- Azeredo, H. M. C., Mattoso, L. H. C., Wood, D., Williams, T. G., Avena-Bustillos, R. J., & McHugh, T. H. (2009). Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *Journal of Food Science*, *74*(5), 31–35. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01186.x>
- Azevedo, V. M., Dias, M. V., Borges, S. V., Costa, A. L. R., Silva, E. K., Medeiros, É. A. A., & Soares, N. de F. F. (2015). Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, *48*, 179–188. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.014>
- Barbosa-Pereira, L., Cruz, J. M., Sendón, R., Rodríguez Bernaldo de Quirós, A., Ares, A., Castro-López, M., ... Paseiro-Losada, P. (2013). Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. *Food Control*, *31*(1), 236–243. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.036>
- Barekat, S., & Soltanizadeh, N. (2017). Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *39*, 223–229. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.009>
- Battisti, M. V., & Campana-Filho, S. P. (2008). OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -QUITINA E QUITOSANAS DE CASCAS DE *Macrobrachium rosenbergi*. *Quimica Nova*, *31*(8), 2014–2019. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800019>
- Bof, M. J., Bordagaray, V. C., Locaso, D. E., & García, M. A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocolloids*, *51*, 281–294. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.018>
- Bras, J., Hassan, M. L., Bruzesse, C., Hassan, E. A., El-Wakil, N. A., & Dufresne, A. (2010). Mechanical, barrier, and biodegradability properties of bagasse cellulose whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. *Industrial Crops and Products*, *32*(3), 627–633. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.018>
- Cao, X., Habibi, Y., & Lucia, L. A. (2009). One-pot polymerization, surface grafting, and processing of waterborne polyurethane-cellulose nanocrystal nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry*, *19*(38), 7137. <http://doi.org/10.1039/b910517d>
- Clayden, J., Greeves, N., & Warren, S. G. (2012). *Organic chemistry*. (O. U. Press, Ed.) (2nd ed.).

- Corsello, F. A., Bolla, P. A., Anbinder, P. S., Serradell, M. A., Amalvy, J. I., & Peruzzo, P. J. (2017). Morphology and properties of neutralized chitosan-cellulose nanocrystals biocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, *156*, 452–459. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.031>
- Crizel, T. de M., Rios, A. de O., Alves, V. D., Bandarra, N., Moldão-Martins, M., & Flores, S. H. (2018). Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocolloids*, *74*, 139–150. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.007>
- Cynthia, M., Prabhawathi, V., & Mukesh, D. (2014). Papain Immobilized Polyurethane Film as Antimicrobial Food Package, *8*(12), 1279–1282.
- de Britto, D., & Campana-Filho, S. P. (2007). Kinetics of the thermal degradation of chitosan. *Thermochimica Acta*, *465*(1–2), 73–82. <http://doi.org/10.1016/j.tca.2007.09.008>
- Dehnad, D., Emam-Djomeh, Z., Mirzaei, H., Jafari, S. M., & Dadashi, S. (2014). Optimization of physical and mechanical properties for chitosan-nanocellulose biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, *105*(1), 222–228. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.094>
- Dias, M. V., Machado Azevedo, V., Borges, S. V., Soares, N. D. F. F., De Barros Fernandes, R. V., Marques, J. J., & Medeiros, É. A. A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chemistry*, *165*, 323–329. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.120>
- Eshamah, H., Han, I., Naas, H., Acton, J., & Dawson, P. (2014). Antibacterial effects of natural tenderizing enzymes on different strains of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on beef. *Meat Science*, *96*(4), 1494–1500. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.12.010>
- Esti, M., Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K., & Garzillo, A. M. V. (2013). Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic-acidic buffer for wine application. *Food and Bioproducts Processing*, *91*(4), 595–598. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.02.003>
- Fernandes, S. C. M., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Gandini, A., Berglund, L. A., & Salmén, L. (2010). Transparent chitosan films reinforced with a high content of nanofibrillated cellulose. *Carbohydrate Polymers*, *81*(2), 394–401. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.037>

- Fráguas, R. M., Simão, A. A., Faria, P. V., Queiroz, E. de R., Oliveira Junior, Ê. N. de, & Abreu, C. M. P. de. (2015). Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. *Polímeros*, 25(spe), 48–53. <http://doi.org/10.1590/0104-1428.1656>
- Gerelt, B., Ikeuchi, Y., & Suzuki, a. (2000). Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science*, 56(3), 311–318. [http://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00060-7](http://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00060-7)
- Gontard, N., & Guilbert, S. (1996). Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *Boletim Da Sociedade Brasileira de Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 3–15.
- GONTARD, N., GUILBERT, S., & CUQ, J.-L. (1992). Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- Jones, A., Mandal, A., & Sharma, S. (2015). Protein-based bioplastics and their antibacterial potential. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(18), n/a-n/a. <http://doi.org/10.1002/app.41931>
- Jonoobi, M., Harun, J., Mathew, A. P., & Oksman, K. (2010). Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion. *Composites Science and Technology*, 70(12), 1742–1747. <http://doi.org/10.1016/j.compscitech.2010.07.005>
- Khan, A., Khan, R. A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., ... Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1601–1608. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.037>
- Leceta, I., Guerrero, P., & De La Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 339–346. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.031>
- Liu, H., Adhikari, R., Guo, Q., & Adhikari, B. (2013). Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch-chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 588–597. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.037>
- Liu, J., Liu, S., Wu, Q., Gu, Y., Kan, J., & Jin, C. (2017). Effect of protocatechuic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antioxidant properties of chitosan film. *Food Hydrocolloids*, 73, 90–

100. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.035>
- Manohar, C. M., Prabhawathi, V., Sivakumar, P. M., & Doble, M. (2015). Design of a papain immobilized antimicrobial food package with curcumin as a crosslinker. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0121665>
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 220–227. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>
- Maryam Adilah, Z. A., Jamilah, B., & Nur Hanani, Z. A. (2018). Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. *Food Hydrocolloids*, *74*, 207–218. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.017>
- Mosafa, L., Moghadam, M., & Shahedi, M. (2013). Papain enzyme supported on magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and application in the fruit juice clarification. *Chinese Journal of Catalysis*, *34*(10), 1897–1904. [http://doi.org/10.1016/S1872-2067\(12\)60663-9](http://doi.org/10.1016/S1872-2067(12)60663-9)
- Pan, A. D., Zeng, H. Y., Foua, G. B., Alain, C., & Li, Y. Q. (2016). Enzymolysis of chitosan by papain and its kinetics. *Carbohydrate Polymers*, *135*, 199–206. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.052>
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. do A., & Menegalli, F. C. (2017). Nanocomposites based on banana starch reinforced with cellulose nanofibers isolated from banana peels. *Journal of Colloid and Interface Science*, *505*, 154–167. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.05.106>
- Perdones, Á., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids*, *57*, 271–279. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.006>
- Prateepchanachai, S., Thakhiew, W., Devahastin, S., & Soponronnarit, S. (2017). Mechanical properties improvement of chitosan films via the use of plasticizer, charge modifying agent and film solution homogenization. *Carbohydrate Polymers*, *174*, 253–261. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.069>
- Qiao, C., Ma, X., Zhang, J., & Yao, J. (2017). Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chemistry*, *235*, 45–50.

<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.045>

- Santos, T. M., Souza Filho, M. de S. M., Caceres, C. A., Rosa, M. F., Morais, J. P. S., Pinto, A. M. B., & Azeredo, H. M. C. (2014). Fish gelatin films as affected by cellulose whiskers and sonication. *Food Hydrocolloids*, *41*, 113–118. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.001>
- Soni, B., Hassan, E. B., Schilling, M. W., & Mahmoud, B. (2016). Transparent bionanocomposite films based on chitosan and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers with enhanced mechanical and barrier properties. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 779–789. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.022>
- Sung, S. H., Chang, Y., & Han, J. (2017). Development of polylactic acid nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals derived from coffee silverskin. *Carbohydrate Polymers*, *169*, 495–503. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.037>
- Tan, D.-T., Cai, C., Zhang, Y., Wang, N., Pang, S.-F., & Zhang, Y.-H. (2016). Crystallization kinetics from mixture Na₂SO₄/glycerol droplets of Na₂SO₄ by FTIR-ATR. *Chemical Physics*, *475*, 131–135. <http://doi.org/10.1016/j.chemphys.2016.07.007>
- Wu, T., Farnood, R., O’Kelly, K., & Chen, B. (2014). Mechanical behavior of transparent nanofibrillar cellulose-chitosan nanocomposite films in dry and wet conditions. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *32*, 279–286. <http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.01.014>
- Yu, Z., Alsammaraie, F. K., Nayigiziki, F. X., Wang, W., Vardhanabhuti, B., Mustapha, A., & Lin, M. (2017). Effect and mechanism of cellulose nanofibrils on the active functions of biopolymer-based nanocomposite films. *Food Research International*, *99*(March), 166–172. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.009>
- Zhong, Y., Song, X., & Li, Y. (2011). Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 335–342. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.041>
- Zhou, J. J., Wang, S. Y., & Gunasekaran, S. (2009). Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO₂ nanoparticles. *Journal of Food Science*, *74*(7). <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01270.x>
- Zohuriaan, M. ., & Shokrolahi, F. (2004). Thermal studies on natural and

modified gums. *Polymer Testing*, 23(5), 575–579.
<http://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2003.11.001>

ARTIGO 2 – LIBERAÇÃO DE PAPAÍNA INCORPORADA EM FILMES DE QUITOSANA REFORÇADO COM NANOFIBRA DE CELULOSE

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo redigido conforme normas da revista Journal of Food Engineering

RESUMO

Nas últimas décadas, houve um rápido aumento em pesquisas sobre o desenvolvimento de filmes ativos para a produção de embalagens de alimentos. Esta pesquisa apresenta um exemplo de embalagem ativa biodegradável, em que a papaína foi incorporada em filmes de quitosana com nanofibras de celulose destinados à produção de embalagens para melhorar a maciez de cortes carnes. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades óticas, estruturais e morfológicas de nanocompósitos de quitosana e nanofibras de celulose incorporados com papaína e sua liberação em meio aquoso. Foi utilizado um planejamento fatorial completo com 3 níveis de NFC (0, 4 e 8%) e 4 níveis de papaína (0, 2, 6 e 10%). O coeficiente de difusão da papaína nos filmes foi determinado utilizando a equação de difusão da segunda lei de Fick. A incorporação de papaína causou aglomerações das nanofibras nos filmes com 8% de NFC, o que contribuiu para o aumento da sua atividade proteolítica em comparação com o filme com 4% de NFC. Os filmes desenvolvidos apresentaram boa transparência, porém com a adição de NFC e de papaína houve uma redução nos valores de transmitância dos filmes de quitosana. O grau de cristalinidade dos filmes foi determinado pela análise de raio-X e observou-se que tanto a adição de NFC como de papaína resultou no aumento da cristalinidade dos filmes de quitosana, sendo o filme contendo 6% de papaína com maior grau de cristalinidade com um aumento de 284% em relação ao filme controle. A cristalinidade dos filmes afetou a difusão da papaína na matriz de quitosana e a NFC controlou a liberação da enzima em meio aquoso. O coeficiente de difusão da papaína nos filme de quitosana variou de $5,69 \times 10^{-8}$ a $6,409 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Palavras chaves: embalagens ativas; difusão; grau de cristalinidade; atividade proteolítica.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um rápido aumento em pesquisas sobre o desenvolvimento de filmes ativos para a produção de embalagens de alimentos. A embalagem é designada ativa quando fornece funções além da proteção tradicional, liberando continuamente compostos ativos como, enzimas, antioxidantes, antimicrobianos e conservantes para o alimento, gerando produtos de maior vida de prateleira, maior proteção de sabor e menor uso de aditivos e conservantes em formulações de alimentos, mantendo a qualidade do produto (Ahmed et al., 2017; Atarés and Chiralt, 2016; Jamshidian et al., 2012; Maryam Adilah et al., 2018).

O desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos contendo enzimas tem sido estudado por diversos autores (Benucci et al., 2018; Bonomo et al., 2017; Kaewprachu et al., 2015; Zappino et al., 2015). A incorporação de enzimas proteolíticas, como a papaína, em filmes poliméricos destinados à produção de embalagens para carnes, apresenta a vantagem de permitir a migração da enzima para o produto embalado, promovendo o amaciamento de cortes cárneos durante o período de armazenamento refrigerado e distribuição.

A papaína é uma enzima proteolítica proveniente do mamão (*Carica papaya Linn*) que possui uma cadeia polipeptídica incluindo 212 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular de 23,4 kDa; ponto isoelétrico a 8,75; e atividade ótima a pH 5-7 (Thomás et al., 2009). A enzima é caracterizada pela sua capacidade de hidrolisar as proteínas grandes em peptídeos menores e aminoácidos (Llerena-Suster et al., 2011), além de apresentar propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes. (Emeruwa, 1982; Eshamah et al., 2014; Osato et al., 1993). Por ser uma enzima proteolítica, a papaína causa hidrólise geral de todos os componentes estruturais do músculo da carne bovina, sendo largamente utilizada no amaciamento de carnes (Ashie et al., 2002; Ha et al., 2012; Sun et al., 2018).

A embalagem de liberação controlada, que permite a liberação lenta e modulada de compostos ativos da embalagem para os alimentos, foi comprovada ser mais eficaz do que a adição dos compostos ativos diretamente aos alimentos (Cozzolino et al., 2013). Os materiais de embalagem ativa devem contatar com a superfície dos alimentos de modo que o composto ativo possa se difundir para o produto embalado (Ozdemir and Floros, 2001). Uma vez que a eficiência da maioria das embalagens ativas é baseada na liberação do agente ativo, e o transporte de massa por difusão é quase sempre envolvido no controle da liberação e é frequentemente considerado como o passo predominante, o conhecimento da cinética de difusão do composto ativo no interior do filme é um fator determinante no desenvolvimento de embalagem ativas. A segunda lei de Fick é geralmente considerada para representar este fenômeno e o coeficiente de difusão aparente ou difusividade representa, portanto, a capacidade do migrante se difundir através do material da embalagem (Crank, 1975; Lavoine et al., 2016).

Os filmes baseados em polímeros naturais têm recebido uma crescente atenção nos últimos anos devido às suas propriedades biodegradáveis (Imran et al., 2014). A quitosana é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina, presente em cascas de camarão, caranguejo e insetos (Li et al., 2010). É um material não tóxico, de baixo custo, biodegradável e em virtude dessas propriedades têm sido amplamente utilizada na produção de embalagem para a conservação da qualidade de uma variedade de alimentos (Benbettaïeb et al., 2014; Dias et al., 2014; Liu et al., 2017; Souza et al., 2017).

Apesar de serem materiais com um grande potencial para produção de embalagens biodegradáveis, os filmes de quitosana apresentam algumas desvantagens por apresentar propriedades mecânicas e de barreira precárias. Os materiais em escala nanométrica vêm sendo muito utilizados para melhorar as propriedades de filmes biodegradáveis, entres estes nanomateriais, as nanofibra

de celulose receberam muita atenção por causa de sua baixa densidade, baixo custo, falta de toxicidade e propriedades biodegradáveis, além de exibir grande relação superfície/volume, alta resistência à tração, rigidez e flexibilidade, e boas propriedades térmicas em comparação com outras fibras comerciais (Azizi Samir et al., 2005; Brinchi et al., 2013).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades ópticas, estruturais e morfológicas de nanocompósitos de quitosana e nanofibras de celulose incorporados com papaína e sua liberação em meio aquoso.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados estão descritos no Artigo 1.

2.2 Desenvolvimento dos filmes

A metodologia utilizada no desenvolvimento dos filmes bem como o delineamento experimental está descrito no Artigo 1.

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da morfologia dos filmes (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), da UFLA, em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP (Carl Zeiss), com voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras foram fixadas em *stubs* com uma fita adesiva dupla face de carbono, e revestidas com ouro (metalização). Foram obtidas imagens da superfície e do corte transversal dos filmes.

2.4 Propriedades ópticas

A transmissão de luz através das amostras foi medida em um espectrofotômetro de luz UV-VIS modelo Bel Spectro S-2000 (Monza, Itália). Esta técnica permite avaliar a porcentagem total de luz incidente que é transmitida através dos filmes. A varredura ocorreu de 200 a 800 nm e a

transmissão foi determinada de acordo com (Guimarães et al., 2015a). As amostras foram cortadas em retângulos (10 × 50 mm) e então aderidas à parede interna da cubeta de quartzo. O teste foi realizado à temperatura ambiente (25 °C) e foram realizadas três repetições para cada filme. Os resultados foram expressos como porcentagem de transmitância.

2.5 Difração de raio-X

A difração de raio-X foi conduzida em difratômetro de raio-X Shimadzu (modelo XRD-6000) usando a radiação Cu-Ka₁ com um comprimento de onda de 1.5406 Angstroms a 30 kV e 30 mA. As amostras foram fixadas em suporte de alumínio e analisadas a uma taxa de varredura de 0,02°s⁻¹, com 2θ variando de 4° – 50° a temperatura ambiente. As curvas foram tratadas com o software Origin 8.0 e o índice de cristalinidade relativa (IC) dos filmes foram calculados empregando o método de Hulleman, através da Equação 1 (Hulleman et al., 1999).

$$I_{cr} = \frac{H_c}{H_c + H_a} \quad (1)$$

Em que: I_{cr} é o índice de cristalinidade (%); H_c é a intensidade do pico cristalino; H_a é a intensidade da fase amorfa descontando a linha base.

2.6 Atividade proteolítica dos filmes

A atividade proteolítica dos filmes foi determinada segundo o método proposto por Vasconcellos et al. (2011). Primeiramente 100mg de filme foram colocadas em tubos de Falcon e então se adicionou 2 mL de tampão de fosfato de potássio (pH 7,4). Os tubos foram mantidos sob agitação a uma frequência de 120 rpm durante um período de 24 horas. A seguir foram adicionados aos tubos: 2 mL de EDTA (1 mM), 2 mL de cisteína (5 mM), 2 mL de caseína (1%) e 2 mL de tampão de fosfato de potássio (pH 7,4). A mistura foi então deixada em repouso durante 30 min a 37 °C, seguido pela adição de solução de ácido

tricloroacético (6 mL, 5% m/v) com o objetivo de parar a reação enzimática. Os tubos foram centrifugados (2000 g, 15min) e a absorvância do sobrenadante foi medida a 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U, $\mu\text{M}/\text{min}$) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de tirosina por minuto, nas condições de ensaio. A atividade proteolítica dos filmes foi expressa como unidades de enzima por g de filme.

2.7 Difusão da papaína a partir dos nanocompósitos de quitosana/nanofibra de celulose

O estudo da difusão foi realizado nos filmes contendo 2% de papaína e NFC (0, 4 e 8%). Para a realização do estudo de liberação da papaína, os filmes foram cortados e pesados (1g) e então colocados em tubo de Falcon contendo 40mL de tampão fosfato de potássio pH 5,8 (simulando pH da carne bovina). Os tubos foram mantidos em agitação (100 rpm), para minimizar a formação da camada limite em torno do filme, durante um período de 48 horas. Em intervalos de tempos pré-determinados, 1mL de amostra do sobrenadante foi retirada e armazenada em eppendorfs. A quantificação da papaína liberada foi realizada utilizando a metodologia proposta por Vasconcellos et al. (2011), descrita no item 2.6. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima (g) que hidrolisa a caseína para produzir absorvância equivalente a 1 μmol de tirosina/min, utilizando tirosina como padrão.

O mecanismo de liberação da papaína foi analisado considerando a equação da lei da potência (Equação 2).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2)$$

Em que n é o expoente de difusão característico do mecanismo de liberação e k é uma constante que caracteriza o sistema macromolecular.

O coeficiente de difusão da papaína nos filmes de quitosana com diferentes concentrações de NFC foi obtido pela Equação 3, que é uma solução

simplificada da 2ª Lei de Fick para uma aproximação de curto tempo sendo utilizada apenas para o ajuste dos pontos experimentais iniciais, quando menos de 60% da massa do composto ativo é liberada (Ritger and Peppas, 1987).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad (3)$$

Onde M_t/M_∞ é a fração de papaína liberada, D é o coeficiente de difusão da papaína, l é a espessura inicial do filme e t é o tempo de liberação.

2.8 Análise estatística

Os resultados de raio-X, microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram submetidos a análise descritiva. Para análise dos resultados de estudo da difusão utilizou-se o pacote SAS® System for Windows™, versão 9.0 (SAS Institute, Inc., EUA) para ajuste das equações, análise de variância (ANOVA) e teste de média. Os resultados foram considerados significativamente diferentes com $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias da superfície e da estrutura interna (obtidas por corte em nitrogênio líquido) dos filmes desenvolvidos podem ser observadas nas Figuras 1, 2 e 3. A análise de microscopia revelou que a estrutura do filme controle (Figura 1. a,b) era porosa. Ao se adiciona as NFC nos filmes de quitosana (Figura 1. c,e), observou-se que as NFCs atuaram como um material de enchimento na estrutura dos filmes, com boa dispersão na matriz mesmo com uma alta concentração de NFC (8%). As nanofibras foram bem incorporadas nos filmes como é observado nas micrografias da seção transversal (Figura 1.d,f). Esses resultados indicam uma excelente compatibilidade entre as NFC e a quitosana. Com o aumento da concentração de NFC adicionada na matriz, mais nanofibras foram observadas na superfície dos filmes (Figura 1c,e).

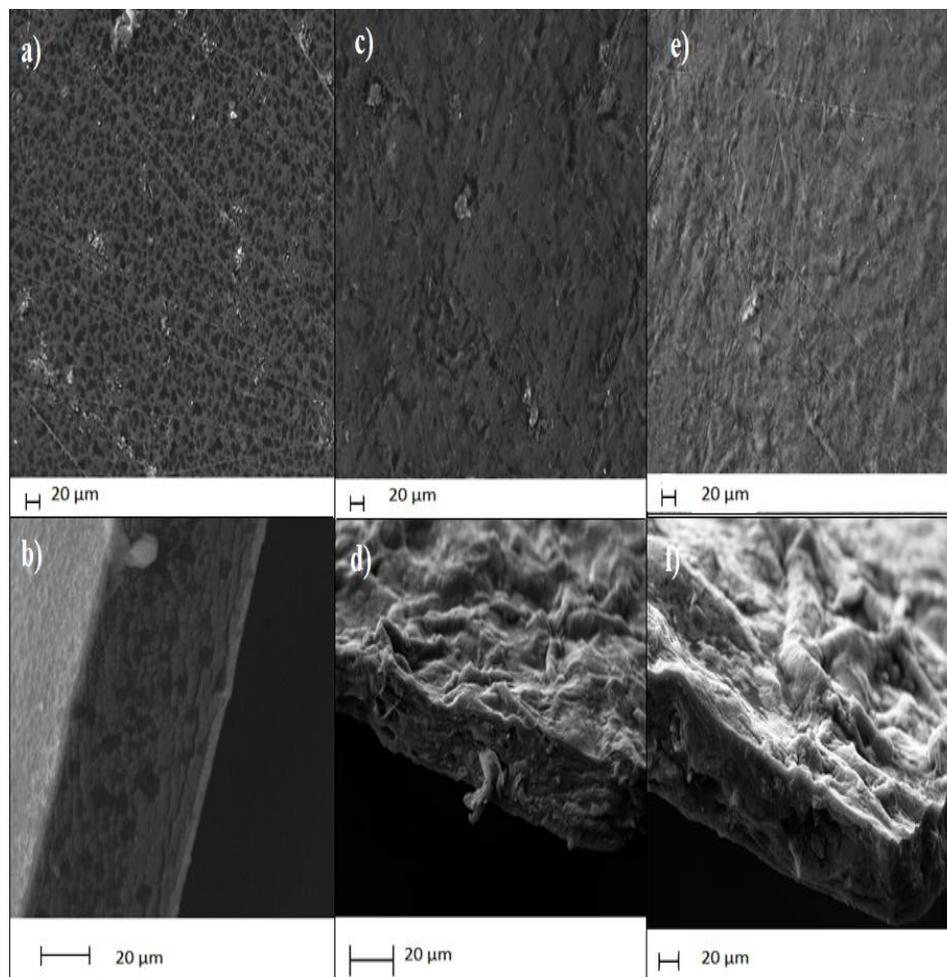


Figura 1. Micrografias SEM da superfície e da seção transversal dos filmes de quitosana puro (a, b), quitosana com 4% de NFC (c, d) e quitosana com 8% de NFC (e, f).

Na Figura 2.a, é possível observar que a adição de 2% de papaína nos filmes a base de quitosana diminuiu a quantidade de poros presentes no filme controle (Figura 1a) e resultou em uma estrutura mais compacta indicando uma boa dispersão da enzima na matriz polimérica. Já os filmes com concentrações acima de 2% (Figuras 2. c-f) apresentaram pontos de aglomeração da enzima.

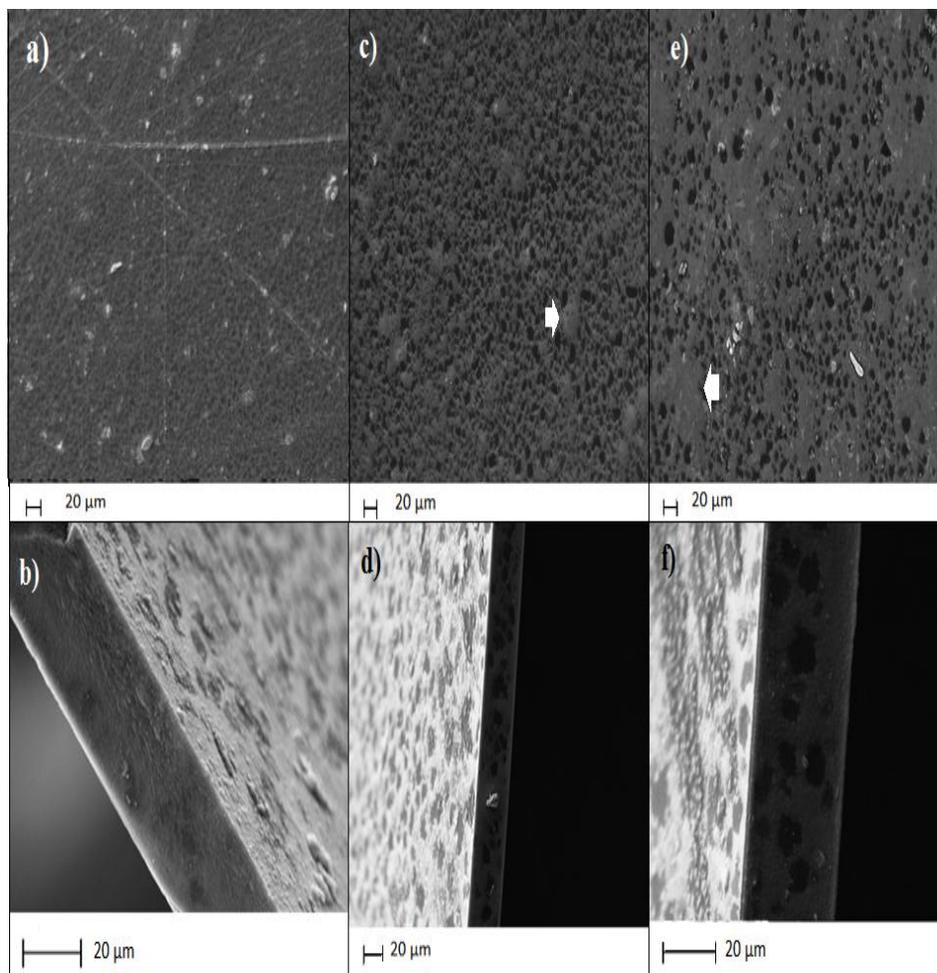


Figura 2. Micrografias das superfícies e das seções transversais dos filmes de quitosana com 2% de papaína (a,b), 6% de papaína (c,d) e 10% de papaína(e,f).

Na Figura 3 estão apresentadas as micrografias dos nanocompósitos contendo NFC/papaína. Com a adição de papaína nos filmes com 8% de NFC observou-se um acúmulo de material indicando uma baixa dispersão das NFCs, sugerindo que a papaína prejudicou a dispersão das nanofibras na matriz polimérica resultando em filmes com mais espaços vazios quando comparados aos nanocompósitos sem enzima. Já os filmes com 4% de NFC apresentaram superfície mais uniformes sem aglomerações.

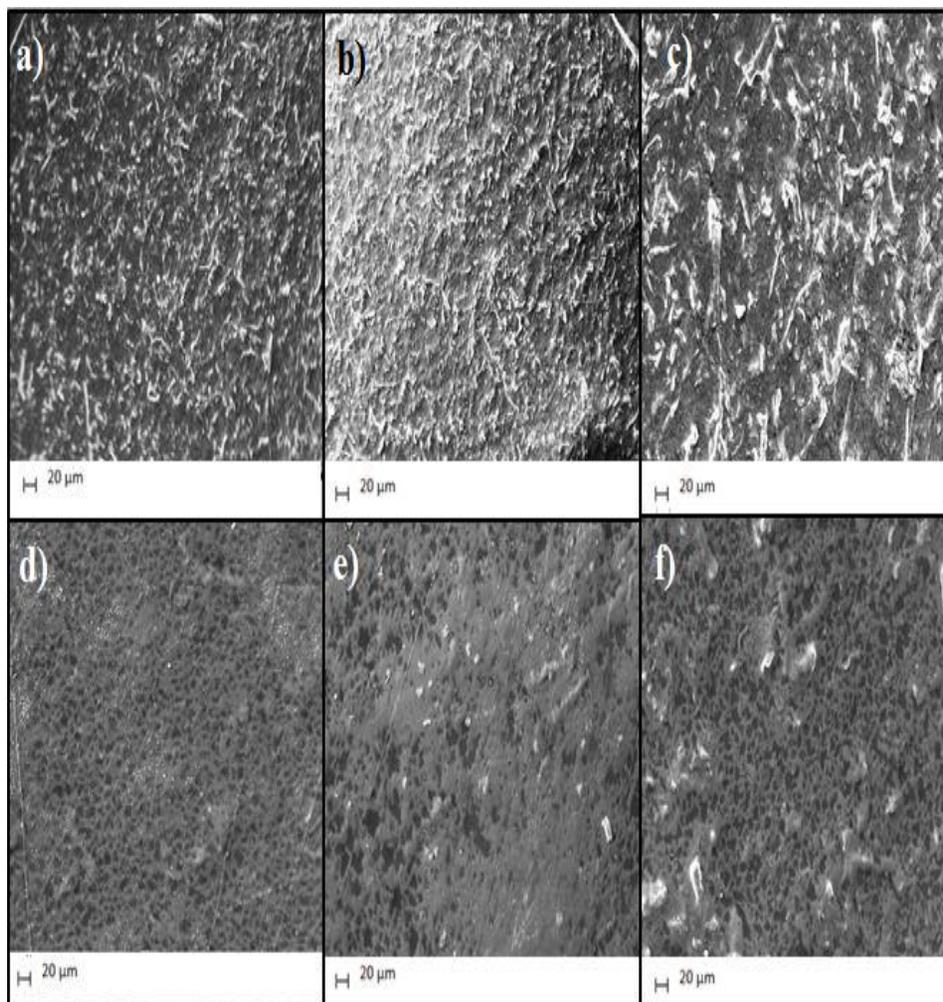


Figura 3. Micrografias SEM da superfície dos filmes de quitosana com NFC/papaína: 2%PP - 4%NFC (a); 6%PP - 4%NFC (b); 10%PP - 4%NFC (c); 2%PP - 8%NFC (d); 6%PP - 8%NFC (e); 10%PP - 8%NFC (f).

3.2 Propriedades óticas

A propriedade óptica é uma propriedade muito importante nos materiais para aplicações em embalagens de alimentos, pois, o filme é geralmente usado como revestimento de superfície, podendo afetar a aparência geral do produto e, portanto interferir na aceitação do consumidor (Souza et al., 2017). Muitas

vezes, uma embalagem transparente é desejável, pois, permite a visualização do produto embalado. O brilho e a transparência de alguns filmes plásticos constituem uma ferramenta para uma boa apresentação visual do produto, no entanto, é necessária uma proteção contra a incidência de luz, como no caso de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz (Sarantópoulos, et al., 2002).

O efeito da adição de NFC e de papaína sobre a capacidade de barreira contra a luz UV e visível dos filmes desenvolvidos é mostrado na Figura 4. No espectro UV-visível do filme controle foi possível observar que o mesmo é opticamente transparente com uma transmitância de 81,9 - 89% na faixa visível (500 - 800 nm), enquanto que na faixa ultravioleta (200 - 400 nm) os valores de transmitância variam entre 0 e 59,4%, sendo estes resultados semelhantes aos publicados anteriormente por outros autores (Fernandes et al., 2016; Vilela et al., 2017).

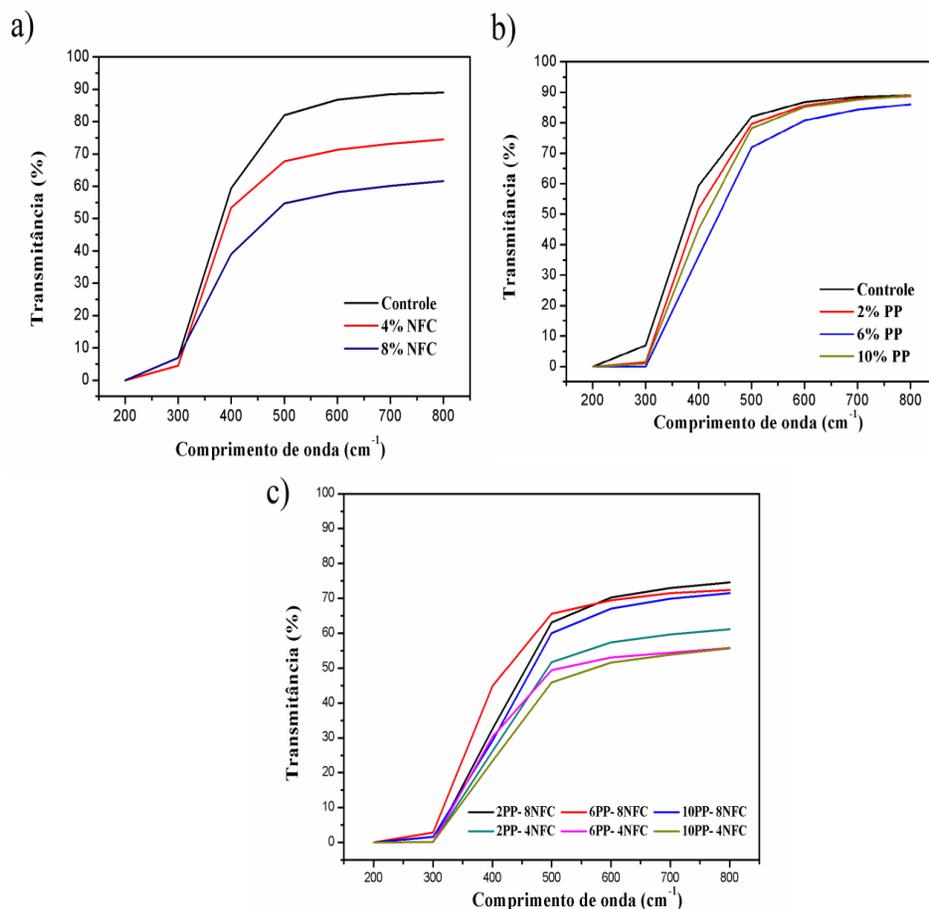


Figura 4. Efeito da NFC e da papaína na transmissão de luz UV-Vis dos filmes de: (a) quitosana/NFC; (b): quitosana/papaína; (c) quitosana/NFC/papaína.

Observou-se que a adição de NFC aumentou a capacidade de barreira à luz dos filmes de quitosana na região de luz UV e visível (Figura 4a) indicado pela diminuição da porcentagem de transmitância dos filmes de quitosana. Uma redução semelhante na capacidade de barreira à luz também foi observada por outros autores ao adicionar NFC em filmes biodegradáveis (Fernandes et al., 2010; Savadekar and Mhaske, 2012; Wu et al., 2014; Xiao et al., 2015; Yu et al., 2017).

No caso dos filmes incorporados com papaína (Figura 4b), foi possível observar que a presença da enzima causou redução dos valores de transmitância na região UV (200 - 400 nm) e também na região visível na faixa de 500-600nm. Na região de comprimento de onda de 700-800nm os filmes com 2 e 10% de papaína apresentaram valores de transmitância semelhantes ao filme controle, porém o filme com 6% de apresentou menor valor de transmitância. Portanto, o filme com 6% de papaína foi o que apresentou maior barreira a luz por todo espectro Uv-Vis.

Nos filmes contendo NFC (Figura 4.c), a papaína causou uma pequena redução na porcentagem de transmitância à luz, tanto na região UV como no visível. Os nanocompósitos com 4% de NFC apresentaram menores valores de transmitância do que os nanocompósitos com 8% de NFC, indicando que os filmes com 4% de NFC/papaína formaram uma matriz mais compacta proporcionando maior barreira à luz do que os filmes com 8% de NFC/papaína. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na análise de MEV (Figura 3.d-f), onde os filmes com 4% apresentaram uma matriz mais uniforme, sem aglomerações das NFCs. Guimarães et al., (2015b) relataram que a dispersão das nanofibras de bambu na matriz de amido/PVA foi reconhecida como uns dos principais fatores que afetam a transparência e a transmitância dos filmes.

A luz, especialmente a luz UV, desempenha um papel importante no processo de oxidação, pois catalisa as reações químicas que aceleram a deterioração dos alimentos (Tian et al., 2013). Quando os alimentos embalados são expostos à luz UV e visível, sua deterioração oxidativa será acelerada ocasionando perda de nutrientes, descoloração e alteração de sabor (Martins et al., 2012). Assim, uma das propriedades desejadas dos materiais de embalagem é a capacidade de bloquear a luz, principalmente a luz UV, uma vez que confere uma proteção extra contra o processo de oxidação, com possível extensão da vida útil do produto (Kanatt et al., 2012).

Apesar da adição de NFC e de papaína ter reduzido os valores de transmitância, os filmes obtidos ainda mostram boa transparência. As fotos dos filmes desenvolvidos (Figura 5) demonstram a alta transparência dos filmes, com o texto legível abaixo. A transparência dos filmes é uma propriedade importante para seu uso na indústria de embalagem para alimentos, pois pode influenciar a aparência dos produtos, sendo desejável uma embalagem transparente para permitir a visualização do produto embalado (Brawn, 1992).



Figura 5. Imagens dos filmes de quitosana obtidos com diferentes porcentagens de NFC e papaína

3.3 Difração de raio-X

Os padrões de difração de raio-X dos filmes desenvolvidos estão apresentados na Figura 6. O filme de quitosana puro (Figura 6.a) exibiu um

caráter semicristalino com quatro picos de difração, os quais estão exibidos na Tabela 1 e são muito semelhantes aos encontrados por outros autores em trabalhos anteriores (Liu et al., 2013; Prateepchanachai et al., 2017; Ren et al., 2017; Zhong et al., 2011).

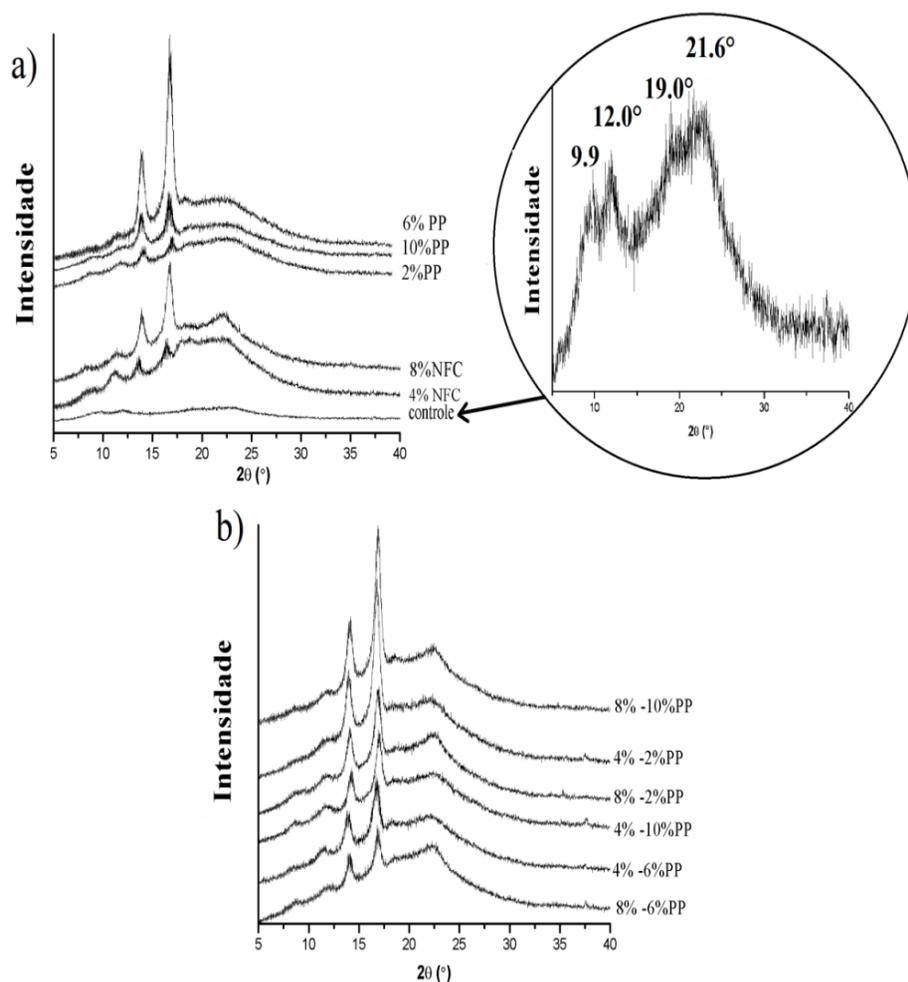


Figura 6. Padrões de raio-X para filmes de: (a) quitosana/NFC e quitosana/papaína; (b) quitosana/NFC/papaína.

Os picos de difração em 9,9° e 12,0° foram devido à estrutura cristalina hidratada, enquanto o pico largo em 21,6° refletiu a estrutura amorfa da quitosana

(Liu et al., 2017; Rubentheren et al., 2016). O filme controle era principalmente de natureza amorfa com fração cristalina muito pequena incorporada na matriz amorfa apresentando cristalinidade de 17,17% (Tabela 1). O baixo grau de cristalinidade pode ser devido às interações intramoleculares entre NH_3^+ e os grupos hidroxilas que limitaram o movimento molecular da cadeia de quitosana e reduziram a sua cristalização (Mathew et al., 2006).

Os filmes de quitosana contendo papaína mostraram um difratograma mais cristalino (Figura 6.a), com o aparecimento de picos de difração adicionais em torno de $2\theta = 14,0^\circ$ e $16,7^\circ$, em comparação com o filme controle. A presença do novo pico de difração sugere que as misturas de quitosana e papaína são miscíveis no nível molecular (Qiao et al., 2017). O filme com 6% de papaína foi que o exibiu maior grau de cristalinidade entre os filmes obtidos (Tabela 1), apresentando um aumento de 284% em relação ao filme controle.

Tabela 1. Picos de difração de raio-X e Índice de cristalinidade (I_{CR}) dos filmes desenvolvidos

Filme	Posição do pico ($^\circ$)					I_{CR} (%)	
	9,9	12,0	13,9	16,6	19,0		
Controle						17,17	
4%NFC	9,1	11,4	13,9	16,6	18,9	22,2	30,52
8%NFC	8,0	11,6	14,1	16,8	19,1	22,2	47,82
2%PP	8,4	11,6	13,9	16,7	19,1	22,3	20,55
6%PP		11,6	14,0	16,9	18,3	22,3	66,03
10%PP	9,0	11,6	13,9	16,7	19,0	22,3	36,20
2%PP-4%NFC		11,5	14,3	16,9	18,8	21,4	50,60
6%PP-4%NFC		11,7	14,2	16,9	18,4	21,9	45,79
10%PP-4%NFC	8,7	11,7	14,2	17,0	18,4	22,5	33,85
2%PP-8%NFC	8,8	11,8	14,3	17,1	19,0	22,4	40,43
6%PP-8%NFC	8,6	11,9	14,1	17,1	18,5	22,4	21,62
10%PP-8%NFC		11,9	14,3	17,0	18,6	22,4	42,33

Novos picos cristalinos em $2\theta = 13,9^\circ$ e $16,6^\circ$ foram observados nos filmes reforçados com NFC (Figura 6.a). Esses picos são atribuídos à estrutura

cristalina da celulose tipo I (Ma et al., 2011; Shin and Exarhos, 2007). A adição de NFC nos filmes de quitosana, também causou um aumento na intensidade do pico a $2\theta = 22,2^\circ$ o qual corresponde ao plano 110 também característicos da celulose tipo I (Bodin et al., 2007). Além disso, a intensidade dos picos cristalinos em $2\theta = 13,9^\circ$ e $16,6^\circ$ aumentou gradualmente com o aumento do conteúdo de NFC.

A presença da papaína alterou ligeiramente os padrões de difração dos filmes contendo NFC (Figura 6.b). Os picos em torno de $13,9^\circ$ e $16,6^\circ$ tornaram-se mais nítidos e com mais intensidade causando um aumento no grau de cristalinidade dos nanocompósitos com 4% de NFC (Tabela 1). O filme com 2% de papaína e 4% de NFC teve um aumento de 65,8% da cristalinidade quando comparado ao filme com 4% de NFC sem papaína. No entanto, quando o teor de NFC foi de 8%, observou-se uma redução na intensidade dos picos quando a papaína foi incorporada e conseqüentemente uma redução no grau de cristalinidade destes nanocompósitos quando comparado ao nanocompósitos com 8% de NFC sem papaína.

Os filmes com 4% de NCF/papaína apresentaram cristalinidade variando de 33,85-50,60% valores estes que são superiores aos obtidos para os filmes com 8% de NFC/papaína (21,62- 42,33%). Estes resultados corroboram com os obtidos na análise de transmitância onde os filmes com 4% de NFC apresentaram maior barreira à luz (Figura 4.c), uma vez que, quanto maior quanto maior o grau de cristalinidade do material polimérico menor será a sua transparência (Mano, 2003).

Observou-se que os picos cristalinos da celulose se deslocaram ligeiramente para graus mais altos quando a papaína foi adicionada aos nanocompósitos (Tabela 2). Isso pode ser considerado como uma evidência da formação de ligação de hidrogênio entre a NFC e a papaína (Liu et al., 2013). Além disso, o pico característico da quitosana em $9,9^\circ$ não apareceu em alguns

filmes contendo papaína. Tal fenômeno pode ser devido à formação de ligação de hidrogênio intermolecular entre a quitosana e a papaína que alterou a estrutura de quitosana (desaparecimento do pico de difração a $9,9^\circ$). Resultados semelhantes foram obtidos por Xu et al. (2005) que sugeriram que a incorporação de amido no filme de quitosana suprimiu o pico cristalino da quitosana devido à mudança na estrutura resultante da interação entre quitosana e amido.

3.4 Atividade proteolítica dos filmes

Na Figura 7 está apresentado o efeito da concentração de NFC na atividade proteolítica dos filmes contendo papaína. O teste de atividade enzimática da papaína foi realizado para verificar se houve degradação da mesma durante o processo de elaboração dos filmes. Como esperado, a atividade proteolítica dos filmes aumentou de acordo com a concentração de papaína incorporada na matriz.

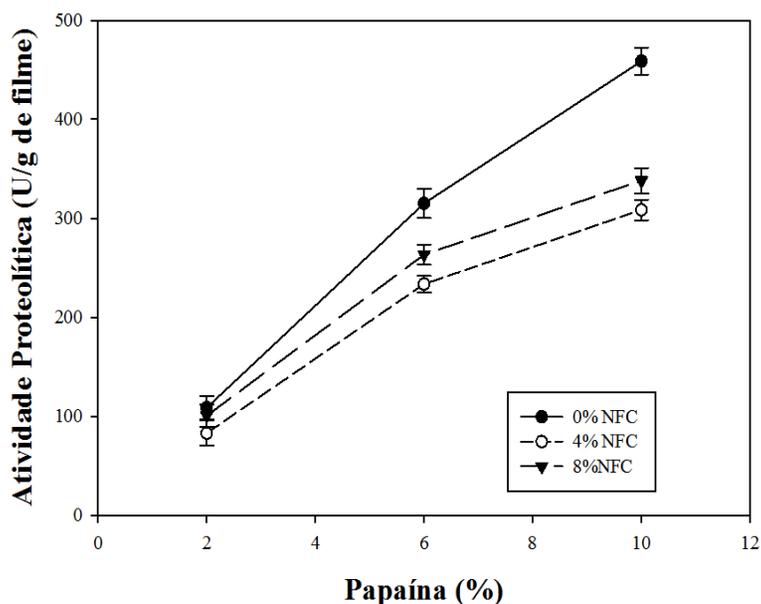


Figura 7. Atividade proteolítica dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de NFC incorporados com papaína.

Os filmes contendo NFC apresentaram atividade proteolítica reduzida quando comparados aos filmes sem NFC. A redução na atividade da enzima pode ser devido a mudanças causadas na estrutura nativa da molécula devido às interações formadas entre a papaína e as NFCs (Andrade-Mahecha et al., 2011). Os filmes contendo 8% de NFC apresentaram maior atividade proteolítica do que os filmes com 4% de NFC, esse comportamento pode está relacionada à presença de aglomerados na matriz e conseqüentemente mais espaços vazios (como observado na análise de MEV, Figura 3), o que facilitou o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

3.5 Difusão da papaína a partir dos nanocompósitos de quitosana/nanofibra de celulose

A cinética de liberação de papaína a partir de filmes de quitosana com diferentes concentrações de NFC foi estudada e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8. Analisando as curvas é possível observar que a quantidade de enzima liberada vai aumentando até que o sistema atinge o seu equilíbrio, apresentando uma alta taxa inicial de liberação.

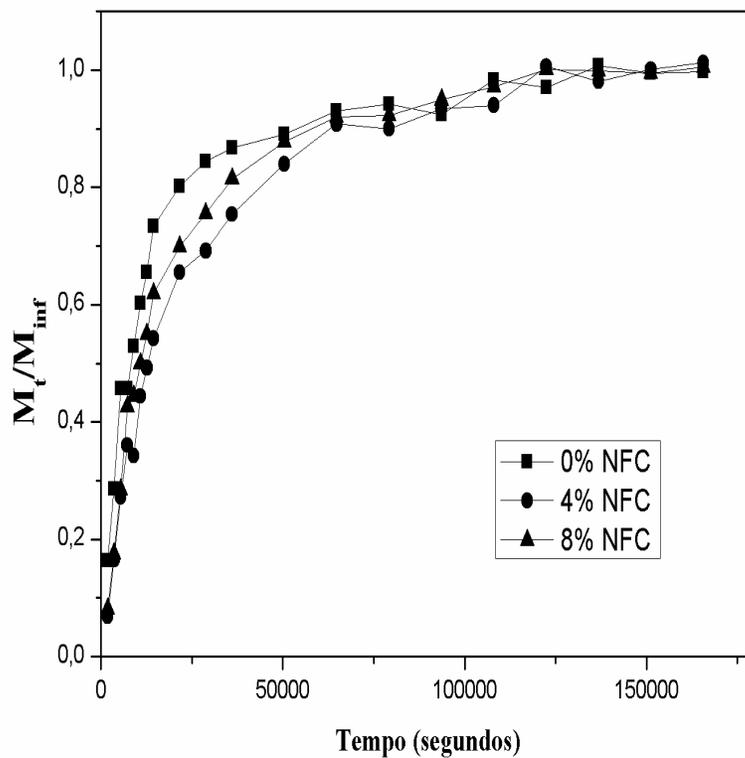


Figura 8. Liberação de papaína a partir de filmes de quitosana com e sem NFC em solução tampão (pH 5,8) à temperatura de 25 °C. M_t/M_{inf} é a massa de papaína difundida no tempo t, dividida pela massa de papaína difundida no equilíbrio.

O mecanismo envolvido no processo de difusão da lisozima foi investigado aplicando o modelo da Lei de Potência. A Tabela 2 mostra os parâmetros cinéticos determinados e o coeficiente de difusão da papaína nos filmes. O coeficiente de correlação (r^2) obtido nos gráficos de aplicação da lei de potência foi maior que 0,94 para os sistemas estudados.

Tabela 2. Valores de n , k e coeficientes de difusão (D) da papaína em filmes de quitosana reforçados com nanofibras de celulose.

Filme	n	k (s ⁻¹)	r^2	$D \times 10^{-8}$ (cm ² /s)
0%NFC	0,23 ^a ± 0,002	0,06 ^a ± 0,002	0,94	6,40 ^a ± 0,24
4%NFC	0,33 ^b ± 0,003	0,02 ^b ± 0,003	0,96	5,69 ^b ± 0,01
8%NFC	0,30 ^c ± 0,013	0,03 ^c ± 0,000	0,95	6,03 ^c ± 0,01

*Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

O mecanismo envolvido no processo de difusão da papaína através dos filmes de quitosana foi avaliado através do expoente (n). Para todos os filmes o valor de n se encontra dentro do limite de 0,5, caracterizando um mecanismo de transporte Fickiano. Valores experimentais de $n < 0,5$ é um indicativo de que o principal mecanismo que rege a liberação de uma substância ativa é a associação da difusão parcial através de uma matriz intumescida e através de poros hidrofílicos. Como o mecanismo de liberação da papaína segue o comportamento Fickiano, podemos dizer que a taxa de difusão da papaína é muito menor do que a taxa de relaxação da matriz polimérica. Portanto, a difusão da papaína é independente do intumescimento da matriz, que é muito rápido devido à sua característica hidrofílica (Peppas, 1985).

A análise dos coeficientes de difusão obtidos (Tabela 2) mostra que a NFC incorporada na matriz de quitosana atuou controlando a liberação da papaína, uma vez que, os valores de D diminuíram significativamente ($p < 0,05$) quando se adicionou NFC nos filmes. Esta diminuição do coeficiente de difusão pode está relacionada às ligações formadas entre a papaína e a NFC (como observado na análise de raio-X), o que limitou a mobilidade da enzima e, portanto, resultou numa alteração no mecanismo de liberação da papaína (Benbettaieb et al., 2016; Ramos et al., 2014). O maior valor do coeficiente de

difusão do filme com 8% de NFC em relação ao com 4%, pode ser devido a presença de espaços vazios na matriz como observado no MEV (Figura 3), o que facilitou a difusão da enzima dentro do filme.

Apesar do intumescimento, os filmes permaneceram intactos e nenhuma destruição da estrutura foi observada durante a cinética de liberação. No filme sem nanofibras de celulose, no qual o maior valor de D foi obtido ($6,40 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}^{-1}$), como a estrutura é menos densa, a água pode entrar mais facilmente na rede e favorecer a mobilidade da cadeia polimérica e, portanto, a difusão da papaína através deste filme foi maior.

A difusão de agentes ativos em polímeros ocorre através de pequenos vazios entre as cadeias poliméricas de uma região amorfa, devido a maior mobilidade do polímero e, conseqüentemente ao seu maior volume livre em relação à fase cristalina. Portanto, as taxas de difusão são maiores através de regiões amorfas em relação às regiões cristalinas (Florence and Attwood, 1998). O filme com 4% de NFC foi o que apresentou menor valor de D ($5,69 \times 10^{-8} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$). Este resultado corrobora com os obtidos na análise de raio-X, onde se observou que o filme com 4% de NFC obteve maior grau de cristalinidade (50,60%) do que o filme sem NFC (20,55%) e o filme com 8% de NFC (40,43%).

4 CONCLUSÃO

A incorporação de papaína influenciou na dispersão das nanofibras na matriz de quitosana. Os filmes com 8% de NFC e papaína apresentaram aglomerações das nanofibras, o que contribuiu para o aumento da sua atividade proteolítica. Apesar da adição de papaína e NFC ter aumentado a barreira à luz dos filmes de quitosana, os filmes ainda apresentaram boa transparência. A diferença no grau de cristalinidade observada com a adição de NFC influenciou no processo de liberação da papaína e os resultados mostraram que as NFCs agiram controlando a difusão da enzima através da matriz polimérica. Portanto os filmes de quitosana contendo NFC são mais adequados para aplicações de liberação controlada que requerem taxas de liberação lenta.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

6 REFERÊNCIA

- Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A.L., Li, Z., Qazi, I.M., Pavase, T.R., Lv, L., 2017. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control* 82, 163–178. doi:10.1016/j.foodcont.2017.06.009
- Andrade-Mahecha, M.M., Morales-Rodríguez, O., Martínez-Correa, H.A., 2011. Estudo do processo de extração de papaína a partir do látex do fruto de mamão (*Carica papaya* L.) cv. Maradol. *Acta Agronómica* 60, 218–224.
- Ashie, I.N. a., Sorensen, T.L., Nielsen, P.M., 2002. Effects of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins and Beef Tenderness. *Food Chem. Toxicol.* 67, 2138–2142. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09516.x
- Atarés, L., Chiralt, A., 2016. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 48, 51–62. doi:10.1016/j.tifs.2015.12.001
- Azizi Samir, M.A.S., Alloin, F., Dufresne, A., 2005. Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. *Biomacromolecules* 6, 612–626. doi:10.1021/bm0493685
- Benbettaïeb, N., Assifaoui, A., Karbowiak, T., Debeaufort, F., Chambin, O., 2014. Controlled release of tyrosol and ferulic acid encapsulated in chitosan-gelatin films after electron beam irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 118, 81–86. doi:10.1016/j.radphyschem.2015.01.035
- Benbettaïeb, N., Chambin, O., Assifaoui, A., Al-Assaf, S., Karbowiak, T., Debeaufort, F., 2016. Release of coumarin incorporated into chitosan-gelatin irradiated films. *Food Hydrocoll.* 56, 266–276. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.12.026
- Benucci, I., Liburdi, K., Cacciotti, I., Lombardelli, C., Zappino, M., Nanni, F., Esti, M., 2018. Chitosan/clay nanocomposite films as supports for enzyme immobilization: An innovative green approach for winemaking applications. *Food Hydrocoll.* 74, 124–131. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.08.005
- Bodin, A., Ahrenstedt, L., Fink, H., Brumer, H., Risberg, B., Gatenholm, P., 2007. Modification of Nanocellulose with a Xyloglucan – RGD Conjugate Enhances Adhesion and Proliferation of Endothelial Cells: Implications for Tissue Engineering Modification of Nanocellulose with a Xyloglucan –

- RGD Conjugate Enhances Adhesion and Proliferat. *Structure* 3697–3704. doi:10.1021/bm070343q
- Bonomo, R.C.F., Santos, T.A., Santos, L.S., da Costa Ilhéu Fontan, R., Rodrigues, L.B., dos Santos Pires, A.C., Veloso, C.M., Gandolfi, O.R.R., Bonomo, P., 2017. Effect of the Incorporation of Lysozyme on the Properties of Jackfruit Starch Films. *J. Polym. Environ.* doi:10.1007/s10924-016-0902-4
- Brawn, W.E., 1992. *Plastics in Food Packaging Properties, Design and Fabrication.* Marcel Dekker Inc., New York.
- Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., Kenny, J.M., 2013. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. *Carbohydr. Polym.* 94, 154–169. doi:10.1016/j.carbpol.2013.01.033
- Cozzolino, C.A., Nilsson, F., Iotti, M., Sacchi, B., Piga, A., Farris, S., 2013. Exploiting the nano-sized features of microfibrillated cellulose (MFC) for the development of controlled-release packaging. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 110, 208–216. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.04.046
- Crank, J., 1975. *The Mathematics of Diffusion: 2d Ed.* doi:10.1016/0306-4549(77)90072-X
- Dias, M.V., Machado Azevedo, V., Borges, S.V., Soares, N. de F.F., de Barros Fernandes, R.V., Marques, J.J., Medeiros, É.A.A., 2014. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chem.* 165, 323–329. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.120
- Emeruwa, A.C., 1982. Antibacterial Substance From *Carica papaya* Fruit Extract. *J. Nat. Prod.* 45, 123–127. doi:10.1021/np50020a002
- Eshamah, H., Han, I., Naas, H., Acton, J., Dawson, P., 2014. Antibacterial effects of natural tenderizing enzymes on different strains of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on beef. *Meat Sci.* 96, 1494–1500. doi:10.1016/j.meatsci.2013.12.010
- Fernandes, R.P.P., Trindade, M.A., Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., de Melo, M.P., 2016. Effects of oregano extract on oxidative, microbiological and sensory stability of sheep burgers packed in modified atmosphere. *Food Control* 63, 65–75. doi:10.1016/j.foodcont.2015.11.027
- Fernandes, S.C.M., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C., Gandini,

- A., Berglund, L.A., Salmén, L., 2010. Transparent chitosan films reinforced with a high content of nanofibrillated cellulose. *Carbohydr. Polym.* 81, 394–401. doi:10.1016/j.carbpol.2010.02.037
- Florence, A.T., Attwood, D., 1998. Physicochemical principles of Pharmacy. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Guimarães, M., Botaro, V.R., Novack, K.M., Teixeira, F.G., Tonoli, G.H.D., 2015a. High moisture strength of cassava starch/polyvinyl alcohol-compatible blends for the packaging and agricultural sectors. *J. Polym. Res.* 22, 192. doi:10.1007/s10965-015-0834-z
- Guimarães, M., Botaro, V.R., Novack, K.M., Teixeira, F.G., Tonoli, G.H.D., 2015b. Starch/PVA-based nanocomposites reinforced with bamboo nanofibrils. *Ind. Crops Prod.* 70, 72–83. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.014
- Ha, M., Bekhit, A.E.D.A., Carne, A., Hopkins, D.L., 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chem.* 134, 95–105. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.071
- Hulleman, S.H.D., Kalisvaart, M.G., Janssen, F.H.P., Feil, H., Vliegthart, J.F.G., 1999. Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticized, compression-moulded potato starches. *Carbohydr. Polym.* 39, 351–360. doi:10.1016/S0144-8617(99)00024-7
- Imran, M., Klouj, A., Revol-Junelles, A.M., Desobry, S., 2014. Controlled release of nisin from HPMC, sodium caseinate, poly-lactic acid and chitosan for active packaging applications. *J. Food Eng.* 143, 178–185. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.06.040
- Jamshidian, M., Tehrany, E.A., Desobry, S., 2012. Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. *Food Control* 28, 445–455. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.005
- Kaewprachu, P., Osako, K., Benjakul, S., Rawdkuen, S., 2015. Quality attributes of minced pork wrapped with catechin–lysozyme incorporated gelatin film. *Food Packag. Shelf Life* 3, 88–96. doi:10.1016/j.fpsl.2014.11.002
- Kanatt, S.R., Rao, M.S., Chawla, S.P., Sharma, A., 2012. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocoll.* 29, 290–297. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.03.005
- Lavoine, N., Guillard, V., Desloges, I., Gontard, N., Bras, J., 2016. Active bio-

- based food-packaging: Diffusion and release of active substances through and from cellulose nanofiber coating toward food-packaging design. *Carbohydr. Polym.* 149, 40–50. doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.048
- Li, Y., Guo, X., Lin, P., Fan, C., Song, Y., 2010. Preparation and functional properties of blend films of gliadins and chitosan. *Carbohydr. Polym.* 81, 484–490. doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.005
- Liu, H., Adhikari, R., Guo, Q., Adhikari, B., 2013. Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch-chitosan films. *J. Food Eng.* 116, 588–597. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.037
- Liu, J., Liu, S., Wu, Q., Gu, Y., Kan, J., Jin, C., 2017. Effect of protocatechuic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antioxidant properties of chitosan film. *Food Hydrocoll.* 73, 90–100. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.06.035
- Llerena-Suster, C.R., Priolo, N.S., Morcelle, S.R., 2011. Sodium tetrathionate effect on papain purification from different carica papaya latex crude extracts. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 41, 107–121. doi:10.1080/10826068.2011.544230
- Ma, H., Zhou, B., Li, H., Li, Y., Ou, S., 2011. Green composite films composed of nanocrystalline cellulose and a cellulose matrix regenerated from functionalized ionic liquid solution. *Carbohydr. Polym.* 84, 383–389. doi:10.1016/j.carbpol.2010.11.050
- Mano, E.B., 2003. *Polímeros Como Materiais de Engenharia*. São Paulo, SP.
- Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A., 2012. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocoll.* 27, 220–227. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.06.011
- Maryam Adilah, Z.A., Jamilah, B., Nur Hanani, Z.A., 2018. Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. *Food Hydrocoll.* 74, 207–218. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.08.017
- Mathew, S., Brahmakumar, M., Abraham, T.E., 2006. Microstructural Imaging and Characterization of the Mechanical, Chemical, Thermal, and Swelling Properties of Starch–Chitosan Blend Films. *Biopolymers* 82, 176–187. doi:10.1002/bip.20563
- Osato, J.A., Santiago, L.A., Remo, G.M., Cuadra, M.S., Mori, A., 1993.

- Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. *Life Sci.* 53, 1383–1389. doi:10.1016/0024-3205(93)90599-X
- Ozdemir, M., Floros, J.D., 2001. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein emulsions. *J. Food Eng.* 47.
- Peppas, N.A., 1985. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Journal Pharmaceutica Acta Helv.* 60, Pages 110–111.
- Prateepchanachai, S., Thakhiew, W., Devahastin, S., Soponronnarit, S., 2017. Mechanical properties improvement of chitosan films via the use of plasticizer, charge modifying agent and film solution homogenization. *Carbohydr. Polym.* 174, 253–261. doi:10.1016/j.carbpol.2017.06.069
- Qiao, C., Ma, X., Zhang, J., Yao, J., 2017. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chem.* 235, 45–50. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.045
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A.J.M., Garrigós, M. del C., 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Sci. Technol.* 58, 470–477. doi:10.1016/j.lwt.2014.04.019
- Ren, L., Yan, X., Zhou, J., Tong, J., Su, X., 2017. Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. *Int. J. Biol. Macromol.* 105, 1636–1643. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.008
- Ritger, P.L., Peppas, N.A., 1987. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* 5, 23–36. doi:10.1016/0168-3659(87)90034-4
- Rodionova, G., Saito, T., Lenes, M., Eriksen, Ø., Gregersen, Ø., Fukuzumi, H., Isogai, A., 2012. Mechanical and oxygen barrier properties of films prepared from fibrillated dispersions of TEMPO-oxidized Norway spruce and Eucalyptus pulps. *Cellulose* 19, 705–711. doi:10.1007/s10570-012-9664-x
- Rubenthaler, V., Ward, T.A., Chee, C.Y., Nair, P., Salami, E., Fearday, C., 2016. Effects of heat treatment on chitosan nanocomposite film reinforced with nanocrystalline cellulose and tannic acid. *Carbohydr. Polym.* 140, 202–208. doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.068

- Sarantópoulos, C. I. G. L., Oliveira, L. D., Padula, M., Coltro, L., Alves, R. V., & Garcia, E.E., 2002. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades., 1st ed. Campinas.
- Savadekar, N.R., Mhaske, S.T., 2012. Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydr. Polym.* 89, 146–151. doi:10.1016/j.carbpol.2012.02.063
- Shin, Y., Exarhos, G.J., 2007. Template synthesis of porous titania using cellulose nanocrystals. *Mater. Lett.* 61, 2594–2597. doi:10.1016/j.matlet.2006.10.005
- Souza, V.G.L., Fernando, A.L., Pires, J.R.A., Rodrigues, P.F., Lopes, A.A.S., Fernandes, F.M.B., 2017. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Ind. Crops Prod.* 107, 565–572. doi:10.1016/j.indcrop.2017.04.056
- Sun, Q., Chen, F., Geng, F., Luo, Y., Gong, S., Jiang, Z., 2018. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food Chem.* 245, 570–577. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.113
- Thomás, G.E., Rodolfo, H.G., Juan, M.D., Georgina, S.F., Luis, C.G., Ingrid, R.B., Santiago, G.T., 2009. Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by-products. *Process Biochem.* 44, 77–82. doi:10.1016/j.procbio.2008.09.013
- Tian, F., Decker, E.A., Goddard, J.M., 2013. Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food Funct.* 4, 669. doi:10.1039/c3fo30360h
- Vasconcellos, F.C., Goulart, G.A.S., Beppu, M.M., 2011. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. *Powder Technol.* 205, 65–70. doi:10.1016/j.powtec.2010.08.066
- Vilela, C., Pinto, R.J.B., Coelho, J., Domingues, M.R.M., Daina, S., Sadocco, P., Santos, S.A.O., Freire, C.S.R., 2017. Bioactive chitosan/ellagic acid films with UV-light protection for active food packaging. *Food Hydrocoll.* 73, 120–128. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.06.037
- Wu, T., Farnood, R., O’Kelly, K., Chen, B., 2014. Mechanical behavior of transparent nanofibrillar cellulose-chitosan nanocomposite films in dry and wet conditions. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 32, 279–286.

doi:10.1016/j.jmbbm.2014.01.014

- Xiao, S., Gao, R., Gao, L.K., Li, J., 2015. Poly(vinyl alcohol) films reinforced with nanofibrillated cellulose (NFC) isolated from corn husk by high intensity ultrasonication. *Carbohydr. Polym.* 136, 1027–1034. doi:10.1016/j.carbpol.2015.09.115
- Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A., Nag, D., 2005. Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization. *Ind. Crops Prod.* 21, 185–192. doi:10.1016/j.indcrop.2004.03.002
- Yu, Z., Alsammarraie, F.K., Nayigiziki, F.X., Wang, W., Vardhanabhuti, B., Mustapha, A., Lin, M., 2017. Effect and mechanism of cellulose nanofibrils on the active functions of biopolymer-based nanocomposite films. *Food Res. Int.* 99, 166–172. doi:10.1016/j.foodres.2017.05.009
- Zappino, M., Cacciotti, I., Benucci, I., Nanni, F., Liburdi, K., Valentini, F., Esti, M., 2015. Bromelain immobilization on microbial and animal source chitosan films, plasticized with glycerol, for application in wine-like medium: Microstructural, mechanical and catalytic characterisations. *Food Hydrocoll.* 45, 41–47. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.11.001
- Zhong, Y., Song, X., Li, Y., 2011. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydr. Polym.* 84, 335–342. doi:10.1016/j.carbpol.2010.11.041

**ARTIGO 3 - APLICAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA/NANOFIBRA
DE CELULOSE INCORPORADOS COM PAPAÍNA PARA MELHORAR
A MACIEZ DA CARNE BOVINA
(VERSÃO PRELIMINAR)**

Artigo redigido conforme normas da revista Meat Science

RESUMO

Entre as características relacionadas à qualidade da carne, a maciez é considerada a mais importante que contribui para a aceitação do consumidor. Filmes de quitosana, com e sem nanofibra de celulose (NFC), foram desenvolvidos com diferentes concentrações de papaína (6 e 10%) e utilizados para embalar bifés de contrafilés (*M. Longissimus Thoracis et Lumborum*). Os bifés foram maturados durante 0, 7, 14 e 21 dias e analisados quanto ao pH, atividade proteolítica, índice de fragmentação, força de cisalhamento, perda de peso por cozimento e cor. A migração da papaína da embalagem foi comprovada pelo o aumento da atividade proteolítica na carne e foi observado que os filmes com NFC controlaram a migração da papaína até o décimo quarto dia de maturação. O tratamento com 10% de papaína apresentou redução na força de cisalhamento de 13,9% em relação ao tratamento controle, não diferindo dos tratamentos com 6% de papaína. Houve um aumento significativo na fragmentação das miofibrilas a partir do sétimo dia armazenamento. As carnes embaladas com o filme de quitosana exibiram menor conteúdo de metamioglobina em relação ao controle. Estes resultados sugerem que os filmes de quitosana reforçados com nanofibra de celulose contendo papaína tem um grande potencial para aplicação em cortes cárneos onde se deseja melhorar a maciez.

Palavras chaves: embalagem ativa; força de cisalhamento; fragmentação miofibrilar e maturação.

1 INTRODUÇÃO

De todos os atributos relacionados à qualidade da carne, a textura é considerada a mais importante de todas as características sensoriais que contribuem para a qualidade da carne. O processo de amaciamento da carne é reconhecido como sendo de natureza enzimática e envolve sistemas proteolíticos endógenos da própria carne que são responsáveis pelo amaciamento durante o envelhecimento refrigerado (maturação). Contudo, quando se deseja aumentar a maciez, podem adicionar-se enzimas exógenas vegetais ou microbianas (Abdel-Naeem & Mohamed, 2016; Koohmaraie, 1992). As agências federais dos Estados Unidos (CFR, 2009, cap. 424; 1999, cap. 184) reconhecem cinco enzimas exógenas - papaína, ficina, bromelina, protease de *Aspergillus oryzae* e protease de *Bacillus subtilis* - como Geralmente Reconhecido Como Seguro (GRAS) para melhorar a maciez da carne.

Dentre as enzimas empregadas como amaciante cárneo, a papaína se destaca devido à sua capacidade de desagregar proteínas miofibrilares e tecidos conectivos, além de apresentar grande importância comercial sendo bastante utilizada nas indústrias têxteis, farmacêutica, cosméticas e alimentícia (Thomás et al., 2009). A papaína (EC 3.4.22.2) é uma enzima extraída do látex do mamão papaya com forte atividade proteolítica contra uma ampla gama de substratos proteicos (Ashie, Sorensen, & Nielsen, 2002). Alguns estudos têm relatado que o tratamento de carnes com papaína foi capaz de melhorar a maciez da carne (Abdel-Naeem & Mohamed, 2016; Barekat & Soltanizadeh, 2017; Gerelt, Ikeuchi, & Suzuki, 2000).

Atualmente existem três métodos para introduzir as enzimas proteolíticas em cortes de carne *post mortem*, como a imersão dos cortes cárneos em solução contendo enzimas proteolíticas, passando a solução pela superfície antes do cozimento e por injeção diretamente na carne. A maioria dos estudos anteriores sobre a utilização de enzimas proteolíticas para amaciar a carne foi dirigido à

aplicação destas enzimas diretamente na carne, no entanto, os métodos utilizados consomem tempo, além do método por injeção acarretar em danos ao tecido devido à utilização de agulhas (Jayasooriya, Torley, D'Arcy, & Bhandari, 2007).

Nas últimas décadas, as inovações nos sistemas de embalagem de alimentos evoluíram como resposta às mudanças nas tendências do mercado e nas preferências dos consumidores por alimentos seguros, saudáveis e de qualidade (Ahmed et al., 2017). Diante disso, surgiu a tecnologia de embalagens ativas, as quais possuem funções que vão além das propriedades de barreira, contenção e proteção. Estudos estão sendo realizados a fim de desenvolver embalagens que são capazes de interagir com o alimento embalado e de alguma forma melhorar a qualidade deste produto. Na indústria de carnes foram desenvolvidas tecnologias de embalagens ativas, em que substâncias ativas específicas são incorporadas no material da embalagem ou dentro da embalagem, a fim de afetar positivamente a qualidade e prolongar a vida útil dos produtos cárneos (Kuuliala et al., 2015; Lorenzo, Batlle, & Gómez, 2014; Wrona, Nerín, Alfonso, & Caballero, 2017).

Um polímero interessante que vem sendo utilizado para elaboração de embalagens ativas é a quitosana, um polissacarídeo proveniente da quitina, capaz de formar filmes transparentes e flexíveis. Por ser biodegradável, este tipo de polímero visa reduzir o uso de embalagens plásticas sintéticas, com a vantagem de diminuir os problemas ambientais causados pelos descartes de polímeros obtidos de fontes não renováveis como o petróleo (Crizel et al., 2018; Dehnad, Emam-Djomeh, Mirzaei, Jafari, & Dadashi, 2014; Dias et al., 2014; Leceta, Guerrero, & De La Caba, 2013).

Os filmes de quitosana têm pobres propriedades mecânicas que limitam suas aplicações. As nanofibras de celulose têm sido utilizadas como material de reforço em filmes de quitosana proporcionando melhoria nas suas propriedades mecânicas e de barreira. As nanofibras de celulose são nanomateriais muito interessantes para a produção de nanocompósitos baratos, leves e

biodegradáveis. As cadeias de celulose são sintetizadas para formar nanofibras, que são feixes alongados de moléculas estabilizadas através de ligação de hidrogênio (Azeredo et al., 2010; Dufresne, 2013).

No nosso melhor conhecimento, este é o primeiro trabalho a lidar com a incorporação de uma enzima proteolítica no material da embalagem com o intuito de promover o amaciamento de cortes cárneos. A inovação do presente estudo é, portanto, o desenvolvimento de uma embalagem biodegradável para aplicação em cortes cárneos a fim de melhorar a maciez durante o armazenamento refrigerado. Assim, o presente estudo foi conduzido para avaliar o efeito da utilização de um filme de quitosana e nanofibra de celulose contendo papaína na melhoria da maciez da carne bovina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados estão descritos no Artigo 1.

2.2 Produção dos filmes

A metodologia utilizada no desenvolvimento dos filmes estão descritos no Artigo 1.

2.3 Matéria prima e preparação das amostras

Peças de contrafilés (*M. Longissimus Thoracis et Lumborum*) bovino de três animais diferentes, com 48 horas *post mortem*, foram obtidos em um açougue local e levados ao Laboratório de Tecnologia de Carne e Derivados (LabCarnes), no Departamento de Ciência da Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Cada peça foi cortada em bifes com aproximadamente 2,5 cm de espessura. Em seguida, os bifes foram aleatorizados nos 6 tratamentos como mostra a Tabela 1. Em todos os tratamentos, as unidades experimentais de cada animal foram aleatoriamente distribuídas em função do tempo de maturação.

Tabela 1. Sistemas de embalagens utilizados no experimento.

Tratamento	Composição do filme	Sistema de embalagem
Co	-----	EC
FC	Quitosana	F + EC
6P	Quitosana / 6% papaína	F + EC
10P	Quitosana / 10% papaína	F + EC
6NF	Quitosana / 6% papaína / 4% NFC	F + EC
10NF	Quitosana / 10% papaína / 4% NFC	F + EC

F:filme; EC: embalagem comercial

Os bifes foram envolvidos separadamente com os filmes desenvolvidos e então embalados á vácuo em filme de poliamida/polietileno (Figura 1). Depois

de embalados, os bifes foram armazenados a 2 °C em câmara incubadora (Modelo SP-500, SPLabor) por 0, 7, 14 e 21 dias.



Figura 1. Filme desenvolvido e sistema de embalagem utilizado no experimento.

Em cada tempo de armazenamento, os bifes foram retirados da embalagem e analisados quanto a: cor, pH, atividade proteolítica, força de cisalhamento (WBsSF), perda de peso por cozimento e índice de fragmentação (IF). Para a determinação do IF e da WBsSF as amostras foram removidas e congeladas em freezer horizontal (-18 °C) para posterior análise.

2.4 Atividade proteolítica da carne

Para a determinação da atividade proteolítica da carne, primeiramente a carne foi pesada (2 g) e homogeneizada em tampão de fosfato de potássio (pH 7,4) utilizando um mixer. Em seguida o material foi centrifugado durante 10 min a 2000 g e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade

proteolítica segundo o método proposto por Vasconcellos et al. (2011). Em um tubo de Falcon adicionou-se 2 mL do sobrenadante, 2 mL de EDTA (1 mM), 2 mL de cisteína (5 mM), 2 mL de caseína (1%) e 2 mL de tampão de fosfato de potássio (pH 7,4). A mistura foi então deixada em repouso durante 30 min à 37°C, seguido pela adição de solução de ácido tricloroacético (6 mL, 5% m/v) com o objetivo de parar a reação enzimática. Os tubos foram centrifugados (2000 g, 15min) e a absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U, $\mu\text{M}/\text{min}$) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de tirosina por minuto, nas condições de ensaio. A atividade proteolítica da carne foi expressa como unidades de enzima por g de carne.

2.5 pH

Para a medição do valor de pH, 5 gramas de carne foram homogeneizadas com 20 mL de água destilada durante 30 segundos em Homogeneizador/Turrax (TE-102, Tecnal). O pH foi aferido utilizando um pHmetro de bancada (Mpa- Tecnoyon) onde foram obtidas três leituras para cada amostra e calculada a média (Kandeepan, Anjaneyulu, Kondaiah, Mendiratta, & Lakshmanan, 2009).

2.6 Perda de peso por cozimento e força de cisalhamento

Para a determinação da perda de peso por cozimento (PPC) as amostras foram cozidas em microondas segundo a metodologia proposta por Silva, (2015). Os bifes de 2,5 cm de espessura ainda congelados foram cortados em núcleos de 5,0 x 5,0 cm usando um guia de corte. As amostras foram colocadas em um recipiente de plástico forrado com uma toalha de papel, que foi usada para cobrir a carne para cozinhar em forno microondas (Electrolux, modelo MEF33, 2450 MHz, Manaus, AM) por 100 s em potência máxima (800 W). As amostras foram pesadas antes e depois do cozimento para determinar a PPC e

então utilizadas para análise da força de cisalhamento pelo método da Warner-Bratzler quadrado da força de cisalhamento (WBsSF) descrito por Silva et al., (2015). Cinco a seis núcleos retangulares (1,0 × 1,0 × 2,5 cm) foram obtidos a partir de cada amostra no sentido das fibras do músculo. Os núcleos retangulares foram cortados transversalmente em 200 mm/min por uma lâmina de Warner-Bratzler acoplado a um texturômetro TA.XTplus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, Reino Unido). A força máxima (N) foi medida, e o valor médio foi calculado para cada bife.

2.7 Índice de fragmentação

O índice de fragmentação (IF) foi determinado pelo protocolo descrito por (Davis, Dutson, Smith, & Carpenter, 1980), com pequenas modificações sugeridas por Ramos & Gomide (2007). Cinco gramas de amostra, ainda congelados, foram homogeneizados (Turrtec TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil), em 50 mL de solução refrigerada (4 °C) contendo KCl 2 mM e sacarose 0,25 M a 15.000 rpm durante 40s. O homogenato foi filtrado sob vácuo (modelo NOF650, New bomba, Brasil) usando uma tela de nylon com poros de 250 µm. A tela com o resíduo foi transferida para um papel filtro e o conjunto (tela + papel) foi pesado depois de 10 min à temperatura ambiente. O índice de fragmentação foi determinado pela equação 1. Valores de IF menores indicam maior proteólise da estrutura miofibrilar.

$$IF = \frac{Pa - Pf - Pc}{Pa} \times 100 \quad (1)$$

Em que: IF é o [índice de fragmentação, Pa é o peso da amostra, Pf é o peso do papel filtro e Pc é o peso do conjunto (resíduo + papel filtro + tela).

2.8 Medida instrumental da cor

Em cada tempo de armazenamento, os bifes foram removidos das embalagens e expostos ao ar ambiente (oxigenados) durante 30 min a 25 °C. As

medidas de cor foram realizadas de cinco pontos distintos da superfície de cada bife utilizando um colorímetro espectrofotométrico modelo CM-700 (Kônica Minolta, Japão) operando no sistema CIE (L^* , a^* , b^*) com porta de abertura de 8 mm, iluminante A, ângulo de 10° para o observador.

As proporções relativas da mioglobina, metamioglobina (MMb); oximioglobina (O_2 Mb); e deoximioglobina (DMb) foram calculadas a partir da curva de reflectância pelo método matemático descrito por Krzywicki, (1979), descrito por Ramos & Gomide, (2017). O instrumento mede a refletância entre 400 nm e 700 nm a intervalos de 10 nm. Os valores de refletância em comprimentos de onda não fornecidos pelo instrumento (473, 525 e 572 nm) foram calculados por interpolação linear.

2.9 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) usando o pacote SAS® System for Windows™, versão 9.0 (SAS Institute, Inc., EUA) para determinar o efeito da embalagem e o tempo de armazenamento em cada variável. Os efeitos que apresentaram significância ($p < 0,05$) foram submetidos à análise de comparação de médias pelo teste de Duncan.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade proteolítica da carne e Índice de fragmentação (IF)

Para a atividade proteolítica (Figura 2), tanto o tratamento como o tempo de armazenamento foi significativo assim como a interação entre esses fatores. A migração da papaína da embalagem para a carne foi atribuída ao aumento da atividade proteolítica nos bifes em relação ao tratamento controle (sem papaína).

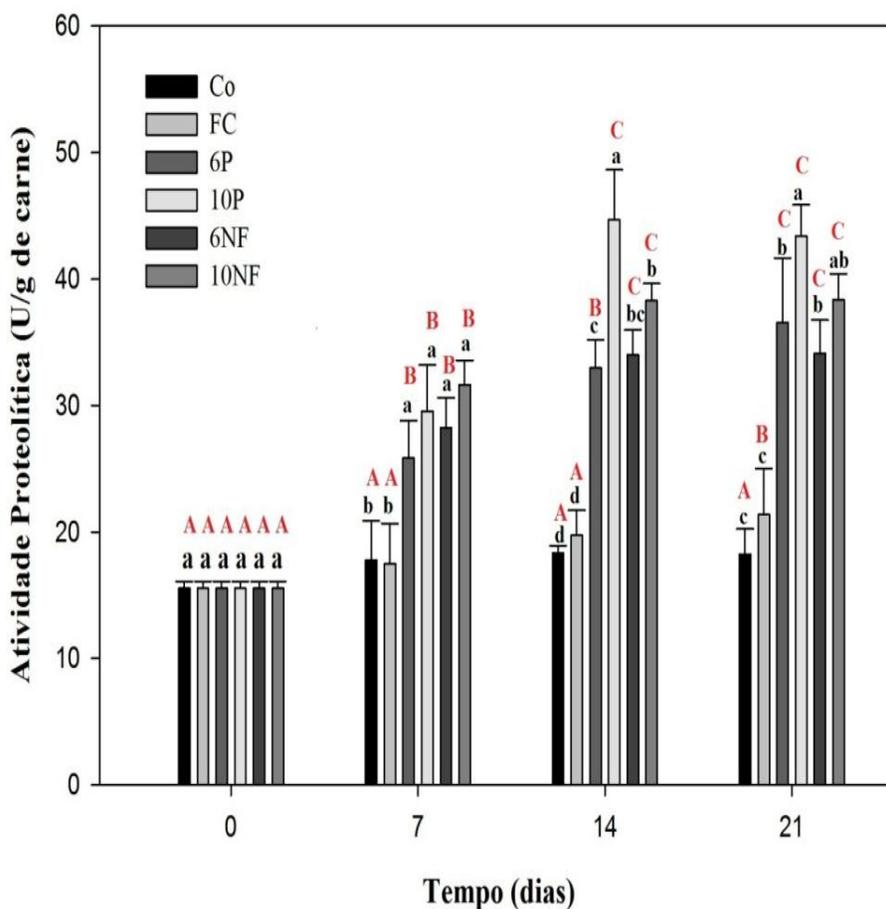


Figura 2. Atividade proteolítica dos bifes armazenados a 2°C com diferentes embalagens. Barras acompanhadas de letras minúsculas iguais para o mesmo tempo de armazenamento e barras acompanhadas de letras maiúsculas iguais para o mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Duncan.

A variação da atividade proteolítica para o tratamento controle (embalagem comercial) não foi significativa em função do tempo de maturação. Já o tratamento FC (filme sem papaína) teve um pequeno aumento na atividade proteolítica a partir do décimo quarto dia de armazenamento, porém se manteve menor em relação aos tratamentos com papaína assim como o tratamento controle. Todos os tratamentos contendo papaína aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade proteolítica em função do tempo. Este considerável

aumento na atividade proteolítica indica que houve a migração da enzima presente na embalagem para o produto embalado com o tempo de armazenamento.

No sétimo dia de armazenamento observou-se que não houve variação da atividade proteolítica entre os tratamentos com papaína. Já com 14 dias de armazenamento o tratamento com 10P foi superior a todos os outros tratamentos, até mesmo ao tratamento 10NF, o que indica que a NFC controlou a liberação da enzima até o décimo quarto dia de armazenamento. Porém, com 21 dias os tratamentos com e sem NFC não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) para uma mesma concentração de papaína.

O aumento da proteólise medida pelo IF das amostras analisadas está apresentado na Figura 3. Houve uma interação significativa entre o sistema de embalagem e o tempo de maturação.

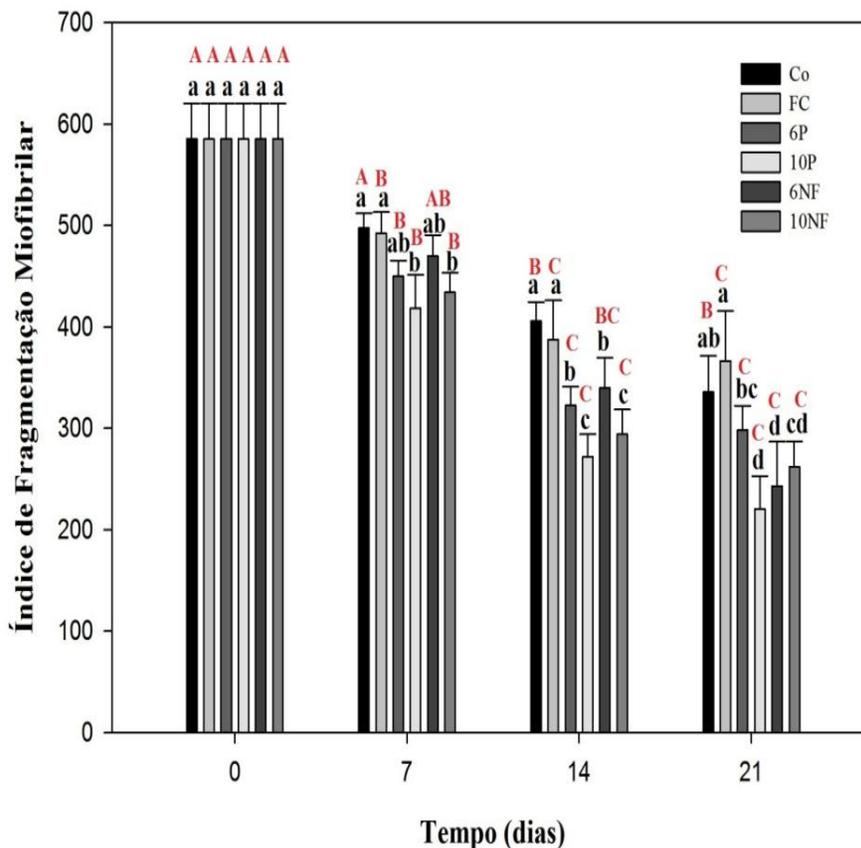


Figura 3. Índice de Fragmentação Miofibrilar dos bifes armazenados à 2°C com diferentes embalagens. Barras acompanhadas de letras minúsculas iguais para o mesmo tempo de armazenamento e barras acompanhadas de letras maiúsculas iguais para o mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Duncan.

Todas as amostras apresentaram redução do IF após 7 dias de maturação. O IF é uma medida indireta da atividade enzimática dos sistemas proteolíticos. Menores valores de IF durante a maturação indicam maior proteólise da estrutura miofibrilar, com conseqüente redução nos valores de força de cisalhamento e aumento da maciez da carne (Ramos & Gomide, 2017). Vários estudos reportaram o aumento da fragmentação miofibrilar durante o processo

de maturação da carne bovina (Aroeira et al., 2016; Hopkins, Martin, & Gilmour, 2004; Prado & de Felício, 2010).

Os tratamentos com 10% de papaína exibiram diferença significativa a partir de 7 dias de maturação em relação ao controle. Com 14 dias de maturação observou-se uma maior fragmentação das miofibrilas nos tratamentos com 10% de papaína em relação aos com 6%, contudo essa diferença não foi observada na força de cisalhamento. Provavelmente a maior fragmentação observada nos tratamentos com 10% de papaína não foi suficiente para causar uma variação significativa nos valores de WBsSF, porém, os tratamentos com maior concentração de papaína podem apresentar diferenças na maciez quando avaliadas através de testes sensoriais. Com 21 dias de maturação o tratamento 10P obteve uma redução do IF de 34,3% em relação ao tratamento Co, não diferindo estatisticamente do tratamento 10NF.

O aumento da fragmentação das miofibrilas, a partir do dia 7 para os tratamentos com papaína, demonstra que a alta atividade proteolítica, a qual foi confirmada nos resultados obtidos na análise de atividade proteolítica da carne. O aumento na fragmentação das miofibrilas devido à incorporação de papaína, também foi relatado por Qihe, Guoqing, Yingchun, & Hui, (2006), os quais observaram um aumento gradual da fragmentação miofibrilar das carnes tratadas com papaína após 72 horas de armazenamento.

3.2 pH, força de cisalhamento e perda de peso por cozimento

Como apresentado na Tabela 2, o efeito da interação entre os tratamentos e o tempo de armazenamento não foi significativa para os resultados de pH, força de cisalhamento e perda de peso por cozimento. Houve um aumento nos valores de pH para todos os tratamentos durante a maturação, e os valores encontrados neste trabalho variaram entre 5,60 e 5,81, os quais foram similares aos encontrados por outros autores para carne bovina maturada (Oliveira, Soares, & Antunes, 1998; Wyrwysz et al., 2016).

Tabela 2. Médias e desvio padrão para os parâmetros de pH, Força de cisalhamento e perda por cozimento de bifes armazenados até 21 dias à 2 °C em diferentes tipos de embalagem

Efeito		pH	WBsSF (N)	% Perda por cozimento
Tratamento (T)	C	5,68 ± 0,04	47,15 ± 18,88 ^a	34,6 ± 1,5
	FC	5,72 ± 0,03	47,80 ± 20,48 ^a	34,1 ± 0,6
	6P	5,74 ± 0,02	41,22 ± 18,57 ^b	33,4 ± 1,3
	10P	5,72 ± 0,03	37,93 ± 17,25 ^b	34,1 ± 1,7
	6NF	5,76 ± 0,02	39,41 ± 17,98 ^b	34,1 ± 0,9
	10NF	5,76 ± 0,02	40,59 ± 18,99 ^b	34,9 ± 1,4
Maturação/dias (M)	0	5,60 ± 0,01 ^a	53,22 ± 17,76 ^a	34,2 ± 0,5
	7	5,67 ± 0,02 ^a	43,28 ± 18,40 ^b	34,0 ± 1,2
	14	5,81 ± 0,03 ^b	38,87 ± 18,09 ^c	34,6 ± 1,5
	21	5,78 ± 0,02 ^c	34,01 ± 15,05 ^d	34,0 ± 1,6
Pr > F	T	0,1148	<0,0001	0,2493
	M	<0,0001	<0,0001	0,6823
	T x M	0,5300	0,1369	0,9342

C: controle; FC: filme controle; 6P: 6% de papaína; 10P: 10% de papaína; 6NF: 6% papaína com NFC; 10NF: 10% papaína com NFC Médias em uma mesma coluna com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Os sistema de embalagem não causaram alteração nos valores de pH, sendo os tratamentos com papaína iguais ao controle. Porém todos os tratamentos apresentaram um aumento significativo nos valores de pH a partir de 14 dias de armazenamento. O aumento do pH está relacionado ao processo de proteólise, que ocorre durante a maturação. O pH aumenta devido a uma alta concentração de produtos de degradação de proteínas (alcalino), que é causada pela atividade de enzimas endógenas (principalmente as calpaínas) e da papaína durante o processo de maturação (Lawrie & Ledward, 2006). Um aumento semelhante no valor de pH, em carne bovina maturada por 21 dias foi relatado por Wyrwicz et al., (2016).

As carnes embaladas nos filmes com papaína exibiram menor força de cisalhamento (WBsSF) quando comparados aos tratamentos controles (Co e

FC). A redução no valor de WBSF é um resultado da ação combinada das enzimas endógenas (responsáveis pelo amaciamento natural da carne) com o enfraquecimento estrutural proteico causado pela papaína. A papaína degrada as proteínas da carne em fragmentos menores atacando principalmente o sistema miosina-actina, resultando na redução da força de cisalhamento (Ovalle, Nahirney, & Netter, 2014). Não houve diferença significativa entre os tratamentos com 6% e 10% de papaína. Portanto, o tratamento com 6% de papaína já é suficiente para promover uma melhoria na maciez da carne após os 21 dias de maturação em relação ao tratamento controle. Observou-se também que as carnes embaladas com os filmes contendo NFC não diferiram estatisticamente dos filmes sem NFC. Esses resultados indicaram que a adição de NFC não afetou a ação amaciante da papaína.

O efeito amaciante da papaína também foi observado por Barekat & Soltanizadeh, (2017), esses autores verificaram que a imersão de carne bovina (músculo *Longissimus lumborum*) em solução de papaína teve um efeito considerável na redução dos valores de WBSF ($p \leq 0,05$), particularmente quando o tratamento com enzima foi acompanhado por radiação ultrassônica.

Considerando o limite de classificação da maciez da carne descrito por Destefanis, Brugiapaglia, Barge, & Dal Molin (2008) e a equação descrita por Silva et al., (2015) para conversão dos valores de WBSF para WBSF, podemos considerar os seguintes grupos de classificação: " muito macia" (WBSF <30 N); "macia" (30 N < WBSF < 36 N); "aceitavelmente macia" (36 N < WBSF < 42 N); "dura" (42 N < WBSF < 48 N) e "muito dura" (WBSF > 48N). Com base nessa classificação, as carnes sem papaína (Co e FC) foram classificadas como "duras", enquanto os bifés embalados nos filmes com papaína classificou-se como "aceitavelmente macia".

Uma diminuição significativa no valor de WBSF foi observado durante o armazenamento em todos os tratamentos. Os bifés apresentaram uma redução na

força de cisalhamento de 53,22 N para 34,01 N após 21 dias de armazenamento. O menor valor de WBsSF durante o tempo de armazenamento é resultado da proteólise pós-morte por proteases endógenas. As enzimas proteolíticas, em sua maioria as calpaínas, causam a degradação das proteínas do tecido muscular durante o processo de maturação, levando a mudanças na micro e ultraestrutura das fibras musculares, o que está correlacionado com a redução da dureza da carne (Kemp, Sensky, Bardsley, Buttery, & Parr, 2010).

As porcentagens de perdas no cozimento em média variaram entre 33,4 e 34,9%, e não houve efeito significativo do tempo de maturação e do tipo de embalagem utilizada. Em um estudo realizado por Boakye & Mittal (1993) no músculo *Longissimus dorsi*, a perda de peso por cozimento mostrou ser a mesma de 2 dias de maturação até 12 dias. Outros estudos também relataram nenhuma variação significativa na perda por cozimento durante o processo de maturação da carne (Komiya, Regina, Boaro, & Mendes, 2009; Vieira, Diaz, Martínez, & García-Cachán, 2009).

3.3 Proporções relativas da mioglobina

A intensidade de cor vermelha das carnes cruas está associada à proporção relativa de três formas químicas da mioglobina: mioglobina reduzida ou deoximioglobina (DMb), de coloração vermelho-púrpura; oximioglobina (O₂Mb), de coloração vermelho-brilhante e metamioglobina (MMb), de coloração marrom (Livingston & Brown, 1981).

A interação entre o tempo de armazenamento e o tipo de embalagem não foi significativa para os resultados obtidos para as proporções relativas da mioglobina. As alterações no conteúdo de MMb, DMb e O₂Mb durante o armazenamento são mostradas na Tabela 3. O tempo de armazenamento teve efeito significativo nas proporções relativas da mioglobina. Já para a embalagem apenas a variação no conteúdo de MMb foi significativa.

Tabela 3 Proporções relativas da mioglobina nas carnes maturadas

Efeito		%MMb	%DMb	%O ₂ Mb
Tratamento (T)	C	35,69 ^a ± 1,61	18,65 ± 1,59	45,67 ± 1,36
	FC	31,25 ^c ± 0,93	23,04 ± 2,31	45,71 ± 1,82
	6P	33,38 ^b ± 1,43	18,21 ± 2,30	48,40 ± 1,76
	10P	33,59 ^b ± 1,49	18,61 ± 2,14	47,80 ± 1,50
	6NF	34,12 ^b ± 1,61	20,42 ± 2,10	45,45 ± 1,33
	10NF	33,73 ^b ± 1,20	19,11 ± 1,99	47,16 ± 1,31
Maturação/dias (M)	0	28,50 ^a ± 0,23	22,02 ^a ± 1,41	49,47 ^a ± 1,25
	7	32,79 ^b ± 1,31	24,09 ^b ± 2,05	43,13 ^b ± 1,09
	14	36,56 ^c ± 0,90	18,05 ^c ± 1,23	45,39 ^c ± 0,94
	21	36,65 ^c ± 0,52	14,54 ^d ± 1,00	48,81 ^a ± 1,07
Pr > F	T	0,0232	0,0676	0,3024
	M	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T x M	0,6847	0,4766	0,5247

C: controle; FC: filme controle; 6P: 6% de papaína; 10P: 10% de papaína; 6NF: 6% papaína com NFC; 10NF: 10% papaína com NFC Médias em uma mesma coluna com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Todos os tratamentos com o filme de quitosana apresentaram redução significativa no conteúdo de MMb, quando comparado ao controle (embalagem comercial). Provavelmente o filme de quitosana atuou reduzindo a oxidação da mioglobina devido a um aumento da barreira ao oxigênio proporcionado pelo filme. Além disso, Darmadji & Izumimoto, (1994) relataram que a quitosana reduziu a oxidação de carnes bovina armazenadas a 4 °C durante 10 dias. Esses autores também observaram que a quitosana teve um bom efeito no desenvolvimento da cor vermelha da carne durante o armazenamento. Outros trabalhos também relataram a atividade antioxidante da quitosana (Chang, Wu, & Tsai, 2018; Chien, Sheu, Huang, & Su, 2007; Feng, Du, Li, Hu, & Kennedy, 2008; Kanatt, Rao, Chawla, & Sharma, 2013).

O teor de MMb aumentou com o tempo de armazenamento acompanhado da redução do conteúdo de DMb e O₂Mb (até o sétimo dia).

Embora o oxigênio tenha sido extraído das embalagens em ambos os tratamentos, pequenas quantidades de oxigênio permanecem nas fendas da embalagem que podem penetrar na superfície da carne e, em seguida, ser utilizadas rapidamente na autoxidação de DMb para MMb durante o armazenamento (Strydom & Hope-Jones, 2014). Lagerstedt, Lundström, & Lindahl (2011) e Lindahl (2011) também observaram que o conteúdo de MMb da carne bovina (*M. longissimus dorsi*) embalada a vácuo aumentou durante o armazenamento por 15 dias e 25 dias, respectivamente. Segundo Renerre & Labas (1987), quando armazenada sob-refrigeração por longos períodos, a cor da carne bovina perde estabilidade, levando ao surgimento de pigmentos escuros, comprometendo a aceitação da mesma.

A partir do sétimo dia observou-se um aumento na concentração de O₂Mb. Esse aumento pode ser explicado por uma redução na taxa de consumo de oxigênio (OCR), que está relacionada à respiração mitocondrial residual *pós mortem* (McKenna et al., 2005). Este sistema respiratório compete com a mioglobina pelo oxigênio atmosférico que se difunde na carne (Lanari & Cassens, 1991). Assim, a carne com 7 dias mostra uma OCR alta, o que resulta em uma menor penetração do oxigênio na carne, causando a formação de O₂Mb a uma profundidade rasa. Com o aumento do tempo de maturação, a OCR diminuiu devido à degradação das enzimas envolvidas na respiração mitocondrial, permitindo a penetração do oxigênio (Lanari & Cassens, 1991; Tang et al., 2005).

3.4 Cor Instrumental

Não foi registrada interação significativa entre o tempo de armazenamento e a embalagem para os parâmetros colorimétricos. Assim, os principais efeitos são apresentados na Tabela 4.

A luminosidade (L*) não foi afetada ($p \leq 0,05$) pela embalagem nem pelo tempo de armazenamento, permanecendo constante até o 21º dia. Outros

autores (Friedrich et al., 2008; Oliete et al., 2005) também observaram nenhuma variação significativa de L^* em carnes armazenadas durante 14 e 21 dias sob refrigeração.

O sistema de embalagem não causou efeito significativo para o parâmetro a^* , porém, o tempo de armazenamento causou uma redução ($p \leq 0,05$) para este parâmetro até o 7º dia de armazenamento, mantendo se constante até o 21º dia. Como todas as amostras apresentaram um aumento no teor da metamioglobina com o tempo de armazenamento, a redução do valor de a^* pode ser atribuída ao surgimento da cor marrom da MMB na superfície dos bifes. Luciano et al., (2009) relataram que a intensidade do vermelho foi reduzida em carne de cordeiro durante o período de maturação (1 a 14 dias), ao mesmo tempo, esses autores observaram reduções significativas na quantidade de pigmentos heme e aumento no percentual de metamioglobina.

Tabela 4. Parâmetros de cor carne sem embalagem

Efeito		L*	a*	b*	C*	h
Tratamento (T)	C	42,74 ± 6,10	18,54 ± 3,46	12,89 ^a ± 2,29	22,64 ± 3,65	35,02 ^a ± 5,89
	FC	41,15 ± 5,92	18,00 ± 3,34	11,32 ^b ± 2,63	21,30 ± 4,10	32,06 ^b ± 5,44
	6P	42,72 ± 6,07	17,52 ± 3,90	12,13 ^{ab} ± 2,51	21,34 ± 4,51	34,90 ^a ± 5,34
	10P	42,75 ± 6,07	17,10 ± 3,84	11,91 ^{ab} ± 2,32	20,87 ± 4,24	35,18 ^a ± 5,54
	6NF	41,97 ± 5,96	17,27 ± 3,70	11,63 ^b ± 2,24	20,84 ± 4,17	34,18 ^a ± 5,11
	10NF	43,62 ± 6,19	17,45 ± 3,48	12,17 ^{ab} ± 2,27	21,31 ± 4,07	35,12 ^a ± 5,69
Maturação/dias (M)	0	41,76 ± 1,15	22,55 ^a ± 1,61	13,79 ^a ± 1,37	26,44 ^a ± 2,09	31,33 ^c ± 0,86
	7	42,61 ± 1,60	16,07 ^b ± 1,77	10,68 ^c ± 1,38	19,34 ^b ± 2,09	33,55 ^b ± 2,81
	14	42,78 ± 1,73	15,58 ^b ± 1,12	11,33 ^c ± 1,19	19,30 ^b ± 1,20	35,98 ^a ± 2,84
	21	42,82 ± 1,68	16,37 ^b ± 1,19	12,24 ^b ± 0,94	20,45 ^b ± 1,50	36,76 ^a ± 1,39
Pr > F	T	0,4450	0,3258	0,0254	0,2037	0,0098
	M	0,1145	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T x M	0,1836	0,9759	0,7078	0,9611	0,4537

C: controle; FC: filme controle; 6P: 6% de papaína; 10P: 10% de papaína; 6NF: 6% papaína com NFC; 10NF: 10% papaína com NFC Médias em uma mesma coluna com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tanto o tempo de armazenamento quanto a embalagem causou variação ($p < 0,05$) no valor de b^* (indicativo de cor amarela) na superfície dos bifés. O valor do parâmetro b^* diminuiu com o tempo de armazenamento, provavelmente devido à auto-oxidação de DMb à MMb (Aroeira et al., 2016). O Chroma (C^*) representa a saturação da cor, e é um bom indicador da oxigenação da carne recentemente exposta ao ar (Ramos & Gomide, 2007). Os valores de C^* das amostras tiveram uma redução com o tempo de armazenamento. Segundo Beriain, Goñi, Indurain, Sarriés, & Insausti, (2009), a redução no valor de chroma está relacionada ao aparecimento de cor marrom na carne, sendo este efeito causado pela transformação da mioglobina em MMb. Estes resultados estão de acordo com o aumento da concentração de MMb observado nas carnes com o tempo de maturação. O ângulo de tonalidade (h) é a descrição da cor à medida que a comunicamos na linguagem vermelho, amarelo, verde, azul, etc... e, para a carne, o ângulo de tonalidade descreve o desenvolvimento da cor do vermelho para amarelo, ângulos maiores indicam menos vermelho (Ramos & Gomide, 2007). O menor valor de h no tratamento FC indica uma cor mais vermelha, o que confirma a menor concentração de metamioglobina obtida nesse tratamento. Já em relação ao tempo de armazenamento, observou-se que houve um aumento do valor de h o que provavelmente está relacionado ao aumento da formação de pigmentos escuros, como a metamioglobina.

3.5 Efeito da papaína na aparência da carne

Como podemos observar na Figura 4, os sistemas de embalagem contendo o filme de quitosana possuem boa transparência, permitindo a visualização do produto no interior da embalagem, como no tratamento controle (embalagem comercial). As carnes nas embalagens com o filme de quitosana apresentaram uma cor mais escura quando comparadas a carne da embalagem controle, esta variação na cor pode ser explicado pela cor amarelada do filme de quitosana.

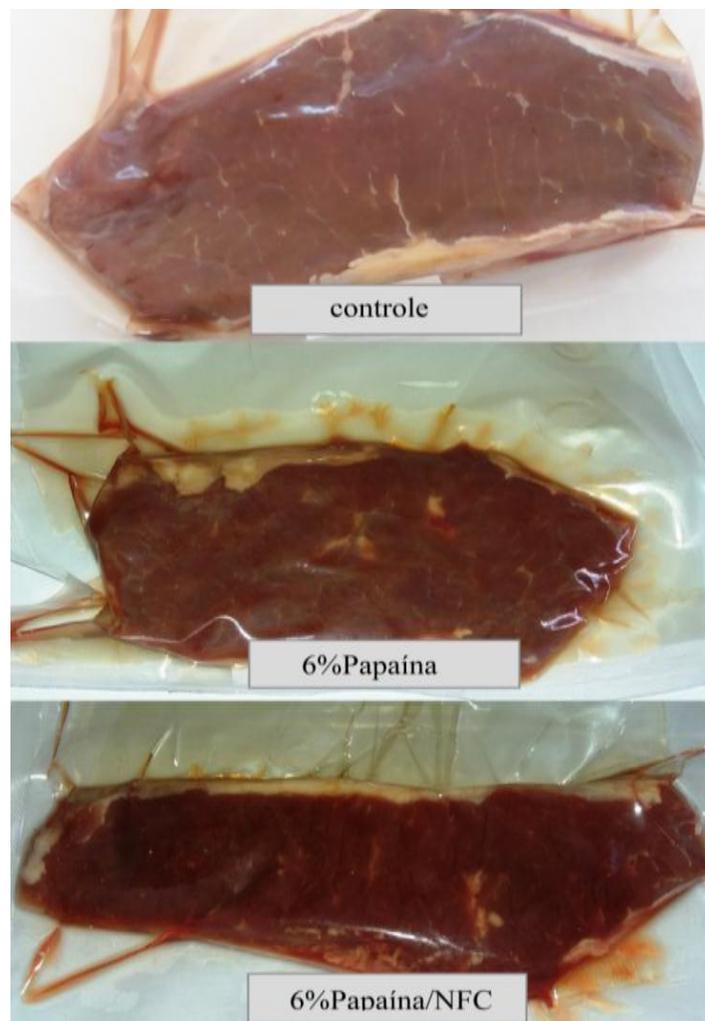


Figura 4. Carnes embaladas á vácuo e armazenadas por 21 dias à 2°C

Apesar das carnes com os filmes de quitosana exibirem coloração mais escura do que o tratamento controle, quando retiradas da embalagem, as carnes apresentaram coloração vermelho-brilhante devido à oxigenação da mioglobina, como observado na Figura 5.

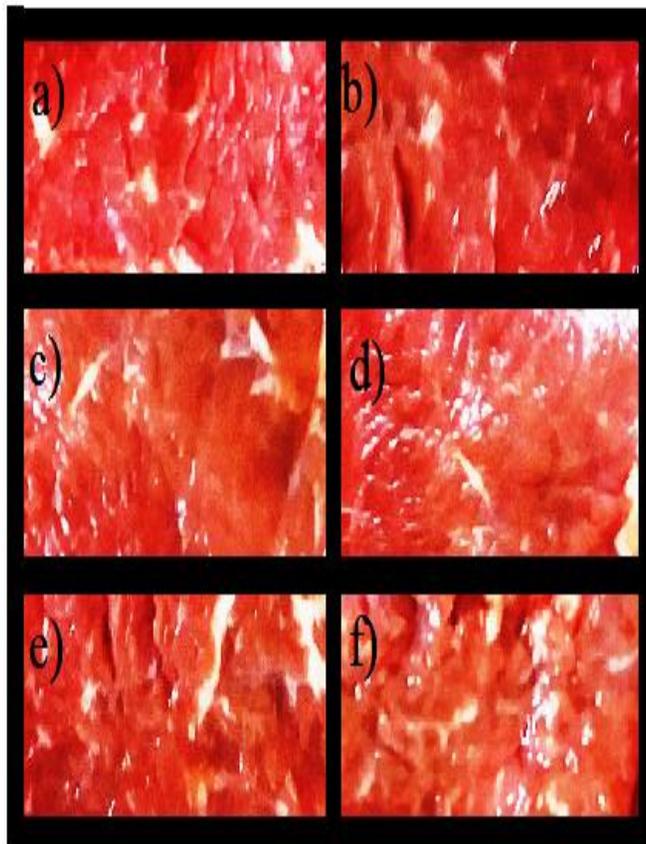


Figura 5. Aspectos das carnes tratadas com os diferentes tipos de embalagem após 21 dias de armazenamento e expostas ao oxigênio por 30 min.. (a) controle, (b) filme controle, (c) 6% de papaína, (d) 10% de papaína, (e) 6% papaína/NFC e (f) 10% papaína/NFC.

Todas as carnes apresentaram uma cor vermelho-purpura (DMb) que é rapidamente convertida a um vermelho vivo (O_2 Mb) quando a carne é retirada da embalagem. Esse é um fenômeno natural, que ocorre em carnes maturadas embaladas á vácuo. A mioglobina na ausência de oxigênio assume a coloração vermelha escura, no entanto, quando exposta ao oxigênio, ocorre à ligação mioglobina-oxigênio, fazendo com que a proteína assuma uma nova formação e passe a apresentar uma cor vermelho-vivo brilhante (Nassu, Verruma-bernardi, Tullio, Cruz, & Alencar, 2013).

4 CONCLUSÃO

A migração da papaína presente no filme para a carne foi confirmada através da análise de atividade proteolítica, na qual foi observado um aumento da atividade proteolítica da carne durante o tempo de maturação. Devido à migração da papaína na carne houve um aumento da fragmentação das miofibrilas e uma redução da força de cisalhamento, indicando uma melhoria na maciez da carne bovina. Os filmes com nanofibras de celulose apresentaram uma redução na taxa de migração da enzima nos primeiros dias de maturação, porém os tratamentos com NFC não diferiram dos tratamentos sem NFC, em relação à força de cisalhamento e fragmentação miofibrilar. Os filmes com concentração de papaína de 6% já foram suficiente para promover o amaciamento das carnes após 21 dias de armazenamento. Os tratamentos com o filme de quitosana apresentaram menores valores de metamioglobina quando comparadas a carne embalada com a embalagem comercial, e as embalagens utilizadas causaram variação significativa nos parâmetros de cor da carne bovina maturada.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

6 REFERENCIAS

- Abdel-Naeem, H. H. S., & Mohamed, H. M. H. (2016). Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. *Meat Science*, *118*, 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.021>
- Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A. L., Li, Z., Qazi, I. M., ... Lv, L. (2017). A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*, *82*, 163–178. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009>
- Aroeira, C. N., Torres Filho, R. A., Fontes, P. R., Gomide, L. A. M., Ramos, A. L. S., Ladeira, M. M., & Ramos, E. M. (2016). Freezing, thawing and aging effects on beef tenderness from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Meat Science*, *116*, 118–25. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.006>
- Ashie, I. N. a., Sorensen, T. L., & Nielsen, P. M. (2002). Effects of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins and Beef Tenderness. *Food Chemistry and Toxicology*, *67*(6), 2138–2142. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09516.x>
- Azeredo, H. M. C., Mattoso, L. H. C., Avena-Bustillos, R. J., Filho, G. C., Munford, M. L., Wood, D., & McHugh, T. H. (2010). Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*, *75*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01386.x>
- Barekat, S., & Soltanizadeh, N. (2017). Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *39*, 223–229. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.009>
- Beriain, M. J., Goñi, M. V., Indurain, G., Sarriés, M. V., & Insausti, K. (2009). Predicting Longissimus dorsi myoglobin oxidation in aged beef based on early post-mortem colour measurements on the carcass as a colour stability index. *Meat Science*, *81*(3), 439–445. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.09.009>
- Boakye, K., & Mittal, G. S. (1993). Changes in pH and water holding properties of Longissimus dorsi muscle during beef ageing. *Meat Science*, *34*(3), 335–349. [http://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90082-S](http://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90082-S)

- CFR (Code of Federal Regulations) (2009). Use of food ingredients and sources of radiation (No. 9, Section 21). Washington, DC: CFR. (n.d.).
- Chang, S. H., Wu, C. H., & Tsai, G. J. (2018). Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties. *Carbohydrate Polymers*, *181*(November 2017), 1026–1032. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.047>
- Chien, P. J., Sheu, F., Huang, W. T., & Su, M. S. (2007). Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. *Food Chemistry*, *102*(4), 1192–1198. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.007>
- Crizel, T. de M., Rios, A. de O., Alves, V. D., Bandarra, N., Moldão-Martins, M., & Flores, S. H. (2018). Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocolloids*, *74*, 139–150. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.007>
- Darmadji, P., & Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, *38*(2), 243–254. [http://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90114-7](http://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90114-7)
- DAVIS, G. W., DUTSON, T. R., SMITH, G. C., & CARPENTER, Z. L. (1980). FRAGMENTACIÓN PROCEDURE FOR BOVINE LONGISSIMUS MUSCLE AS AN INDEX OF COOKED STEAK TENDERNESS. *Journal of Food Science*, *45*(4), 880–884. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07470.x>
- Dehnad, D., Emam-Djomeh, Z., Mirzaei, H., Jafari, S. M., & Dadashi, S. (2014). Optimization of physical and mechanical properties for chitosan-nanocellulose biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, *105*(1), 222–228. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.094>
- Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Barge, M. T., & Dal Molin, E. (2008). Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner-Bratzler shear force. *Meat Science*, *78*(3), 153–156. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.031>
- Dias, M. V., Machado Azevedo, V., Borges, S. V., Soares, N. D. F. F., De Barros Fernandes, R. V., Marques, J. J., & Medeiros, É. A. A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chemistry*, *165*, 323–329.

<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.120>

- Dufresne, A. (2013). Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Materials Today*, 16(6), 220–227. <http://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>
- Feng, T., Du, Y., Li, J., Hu, Y., & Kennedy, J. F. (2008). Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126–132. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.003>
- Friedrich, L., Siró, I., Dalmadi, I., Horváth, K., Ágoston, R., & Balla, C. (2008). Influence of various preservatives on the quality of minced beef under modified atmosphere at chilled storage. *Meat Science*, 79(2), 332–343. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.012>
- Gerelt, B., Ikeuchi, Y., & Suzuki, a. (2000). Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science*, 56(3), 311–318. [http://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00060-7](http://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00060-7)
- Hopkins, D. ., Martin, L., & Gilmour, A. . (2004). The impact of homogenizer type and speed on the determination of myofibrillar fragmentation. *Meat Science*, 67(4), 705–710. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.011>
- Jayasooriya, S. D., Torley, P. J., D'Arcy, B. R., & Bhandari, B. R. (2007). Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine Semitendinosus and Longissimus muscles. *Meat Science*, 75(4), 628–639. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.09.010>
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2013). Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 321–326. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.019>
- Kandeepan, G., Anjaneyulu, A. S. R., Kondaiah, N., Mendiratta, S. K., & Lakshmanan, V. (2009). Effect of age and gender on the processing characteristics of buffalo meat. *Meat Science*, 83(1), 10–14. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.003>
- Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J., & Parr, T. (2010). Tenderness - An enzymatic view. *Meat Science*, 84(2), 248–256. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.008>
- Komiyama, C. M., Regina, M., Boaro, F., & Mendes, A. A. (2009). Avaliação

da técnica de maturação sobre a qualidade da carne e estrutura da fibra muscular do peito de matrizes pesadas de descarte de frangos de corte.

- Koohmaraie, M. (1992). Role of the Neutral Proteinases in Postmortem Muscle Protein Degradation and Meat Tenderness, *45*, 63–74.
- Krzywicki, K. (1979). Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Science*, *3*(1), 1–10. [http://doi.org/10.1016/0309-1740\(79\)90019-6](http://doi.org/10.1016/0309-1740(79)90019-6)
- Kuuliala, L., Pippuri, T., Hultman, J., Auvinen, S. M., Kolppo, K., Nieminen, T., ... Jääskeläinen, E. (2015). Preparation and antimicrobial characterization of silver-containing packaging materials for meat. *Food Packaging and Shelf Life*, *6*, 53–60. <http://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.09.004>
- Lagerstedt, Å., Lundström, K., & Lindahl, G. (2011). Influence of vacuum or high-oxygen modified atmosphere packaging on quality of beef *M. longissimus dorsi* steaks after different ageing times. *Meat Science*, *87*(2), 101–106. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.08.010>
- LANARI, M. C., & CASSENS, R. G. (1991). Mitochondrial Activity and Beef Muscle Color Stability. *Journal of Food Science*, *56*(6), 1476–1479. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08619.x>
- Lawrie, R. A., & Ledward, D. A. (2006). Summary for Policymakers. In Intergovernmental Panel on Climate Change (Ed.), *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (pp. 1–30). Cambridge: Cambridge University Press. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Leceta, I., Guerrero, P., & De La Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, *93*(1), 339–346. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.031>
- Lindahl, G. (2011). Colour stability of steaks from large beef cuts aged under vacuum or high oxygen modified atmosphere. *Meat Science*, *87*(4), 428–435. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.10.023>
- Livingston, D. J., & Brown, W. D. (1981). The chemistry of myoglobin and its reactions [Meat pigments, food quality indices]. *Food Technology (USA)*.
- Lorenzo, J. M., Batlle, R., & Gómez, M. (2014). Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *LWT - Food*

- Science and Technology*, 59(1), 181–188.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.061>
- Luciano, G., Monahan, F. J., Vasta, V., Pennisi, P., Bella, M., & Priolo, A. (2009). Lipid and colour stability of meat from lambs fed fresh herbage or concentrate. *Meat Science*, 82(2), 193–199.
<http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.01.010>
- McKenna, D. R., Mies, P. D., Baird, B. E., Pfeiffer, K. D., Ellebracht, J. W., & Savell, J. W. (2005). Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. *Meat Science*, 70(4), 665–682. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.02.016>
- Nassu, R. T., Verruma-bernardi, M. R., Tullio, R. R., Cruz, G. M. da, & Alencar, M. M. de. (2013). Qualidade e perfil sensorial descritivo da carne maturada proveniente de animais cruzados. *Atas de Saúde Ambiental*, 1(1).
- Oliete, B., Moreno, T., Carballo, J. A., Varela, A., Monserrat, L., & Sánchez, L. (2005). Influence of ageing time on the quality of yearling calf meat under vacuum. *European Food Research and Technology*, 220(5–6), 489–493.
<http://doi.org/10.1007/s00217-004-1071-6>
- Oliveira, L. B., Soares, G. J., & Antunes, P. L. (1998). Influência da maturação de carne bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. *Revista Brasileira de Agrociência*, 4(3), 166–171.
- OVALLE, W. K., NAHIRNEY, P. C., & NETTER, F. H. (2014). *Netter bases da histologia*. (Elsevier, Ed.) (2nd ed.). Rio de Janeiro.
- Prado, C. S., & de Felício, P. E. (2010). Effects of chilling rate and spray-chilling on weight loss and tenderness in beef strip loin steaks. *Meat Science*, 86(2), 430–435. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.029>
- Qihe, C., Guoqing, H., Yingchun, J., & Hui, N. (2006). Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 98(4), 624–629. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.043>
- Ramos, E. M., & Gomide, L. A. de M. (2017). *Avaliação da Qualidade de Carnes 2ª Edição - Fundamentos e Metodologias*. (E. UFV, Ed.) (2ª Edição). Viçosa, MG.
- RAMOS, E. M., & GOMIDE, L. A. M. (2007). *Avaliação da qualidade de*

carnes: fundamentos e metodologias (UFV). Viçosa, MG.

- Renner, M., & Labas, R. (1987). Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Science*, *19*(2), 151–165. [http://doi.org/10.1016/0309-1740\(87\)90020-9](http://doi.org/10.1016/0309-1740(87)90020-9)
- Silva, D. R. G. (2015). *USO DE MICRO-ONDAS COMO MÉTODO DE COZIMENTO NO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA MACIEZ DA CARNE BOVINA*. Universidade Federal de Lavras.
- Silva, D. R. G., Torres Filho, R. A., Cazedey, H. P., Fontes, P. R., Ramos, A. L. S., & Ramos, E. M. (2015). Comparison of Warner – Bratzler shear force values between round and square cross-section cores from cooked beef and pork Longissimus muscle. *Meat Science*, *103*, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.12.009>
- Strydom, P. E., & Hope-Jones, M. (2014). Evaluation of three vacuum packaging methods for retail beef loin cuts. *Meat Science*, *98*(4), 689–694. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.030>
- Tang, J., Faustman, C., Hoagland, T. A., Mancini, R. A., Seyfert, M., & Hunt, M. C. (2005). Postmortem Oxygen Consumption by Mitochondria and Its Effects on Myoglobin Form and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(4), 1223–1230. <http://doi.org/10.1021/jf048646o>
- Thomás, G. E., Rodolfo, H. G., Juan, M. D., Georgina, S. F., Luis, C. G., Ingrid, R. B., & Santiago, G. T. (2009). Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by-products. *Process Biochemistry*, *44*(1), 77–82. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.013>
- Vasconcellos, F. C., Goulart, G. A. S., & Beppu, M. M. (2011). Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. *Powder Technology*, *205*(1–3), 65–70. <http://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.08.066>
- Vieira, C., Diaz, M. T., Martínez, B., & García-Cachán, M. D. (2009). Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. *Meat Science*, *83*(3), 398–404. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.013>
- Wrona, M., Nerín, C., Alfonso, M. J., & Caballero, M. Á. (2017). Antioxidant

packaging with encapsulated green tea for fresh minced meat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41(November 2016), 307–313. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.001>

Wyrwisz, J., Moczowska, M., Kurek, M., Stelmasiak, A., Półtorak, A., & Wierzbicka, A. (2016). Influence of 21 days of vacuum-aging on color, bloom development, and WBSF of beef semimembranosus. *Meat Science*, 122, 48–54. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.018>