



JANYELLE SEVERINO ALVES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE
LACTOFERRAMPINA BOVINA NAS
PROPRIEDADES DE NANOCOMPÓSITOS
AMIDO DE MILHO/MONTMORILONITA E NA
CONSERVAÇÃO DE MANDIOQUINHA-SALSA**

LAVRAS – MG

2014

JANYELLE SEVERINO ALVES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE LACTOFERRAMPINA BOVINA
NAS PROPRIEDADES DE NANOCOMPÓSITOS AMIDO DE
MILHO/MONTMORILONITA E NA CONSERVAÇÃO DE
MANDIOQUINHA-SALSA**

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.

Orientadora

Dra. Joelma Pereira

Coorientadora

Dra. Kelen Cristina dos Reis

LAVRAS- MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Alves, Janyelle Severino.

Efeito da incorporação de lactoferrampina bovina nas propriedades de nanocompósitos amido de milho/montmorilonita e na conservação de mandioquinha-salsa / Janyelle Severino Alves. – Lavras : UFLA, 2014.

145 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Joelma Pereira.

Bibliografia.

1. Filme biodegradável. 2. Peptídeo antimicrobiano. 3. *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. 4. Qualidade pós-colheita. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.09

JANYELLE SEVERINO ALVES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE LACTOFERRAMPINA BOVINA
NAS PROPRIEDADES DE NANOCOMPÓSITOS AMIDO DE MILHO /
MONTMORILONITA E NA CONSERVAÇÃO DE MANDIOQUINHA-
SALSA**

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 25 de julho de 2014

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dra. Heloisa Helena de Siqueira Elias	UFLA
Dr. João de Deus Souza Carneiro	UFLA
Dra. Kelen Cristina dos Reis	UNILAVRAS

Dra. Joelma Pereira
Orientadora

LAVRAS – MG
2014

À minha estimada família, o meu “PORTO SEGURO”,
José Alves e Maria da Graça (queridos pais);
Josimeyre e Junior (queridos irmãos) e
Pedro José (querido sobrinho).
Muito obrigada por vocês serem o meu “ALICERCE”.
AMO MUITO VOCÊS!

DEDICO

À minha família

TUDO POSSO

Celina Borges

Posso tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória
Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir continuar a esperar e crer...
Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... Em Jesus!

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Neste momento, as palavras se tornam poucas para externar meus sentimentos.

A DEUS, pela força, fé, foco e consolo nas horas difíceis.

Aos meus queridos pais, José Alves e Maria da Graça; aos meus queridos irmãos, Josimeyre e Junior; ao meu querido sobrinho, Pedro José e ao meu querido cunhado, Elmis, pelo carinho, incentivo e confiança que todos em mim depositaram.

Aos meus familiares, que estiveram sempre comigo, torcendo e apoiando.

Aos meus amigos que torceram e me apoiaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e pelo recurso referente ao projeto no Programa de Nanotecnologia Rede NANOBIOTEC – Brasil.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos e à Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade da concretização desse sonho.

À professora Joelma Pereira, pela orientação, confiança, amizade e carinho.

À professora Kelen Cristina dos Reis, pela coorientação, amizade e carinho.

Ao professor Fabiano Vargas Pereira, pela amizade e coorientação.

Aos professores Eduardo Alves, João de Deus Souza Carneiro, Paulo Fernando Trugilho, Luís Roberto Batista, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Ricardo Magela de Souza, Roberta Hilsdorf Piccoli e Washington Azevêdo da Silva, pelos ensinamentos e auxílio na execução do meu experimento.

Aos membros da banca que aceitaram o desafio e, assim, propuseram melhorias para a finalização deste trabalho.

Aos professores, funcionários (em especial, Tina e Creuza) e alunos (em especial, Giula Bianchini, Heloisa Helena, Isabel Alves, Mário Guimarães, Nayane Dias, Nathasha Lira e Tatti Costa), do Departamento de Ciência dos Alimentos e do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras, que sempre me ajudaram quando precisei.

Aos alunos Eber Medeiros e Victor Lauriano, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, que me auxiliaram na realização da análise de infravermelho (FTIR-ATR).

A família e agregados do Laboratório de Grãos Raízes e Tubérculos (LGC) do Departamento de Ciência dos Alimentos de UFLA, meus sinceros agradecimentos, pois não hesitaram em me ajudar quando precisei – em especial a Lucinéia, Luan e Fausto, os quais estiveram sempre presentes.

Finalmente, a todas as pessoas que contribuíram com este trabalho, sejam elas professores e/ou colegas com quem convivi durante o curso.

Muito obrigada!!!

RESUMO

Compósitos de amido, por serem biodegradáveis, têm sido pesquisados no intuito de diminuir o impacto ambiental. A adição de plastificantes, de reforços (carga) e de agentes antimicrobianos melhora as propriedades mecânicas, físicas, microbiológicas e permeabilidade desses compósitos. Objetivou-se: elaborar e caracterizar nanocompósitos (amido + glicerol + montmorilonita (MMT) + lactoferrampina bovina (Lfampin)); avaliar a ação antifúngica e antibacteriana da Lfampin; e avaliar a vida útil pós-colheita de raízes de mandioquinha-salsa revestidas com os nanocompósitos obtidos. Foram elaborados três tratamentos, com três repetições, pelo processo *casting*: T1 – compósito amido + glicerol, T2 – nanocompósito amido + glicerol + MMT, T3 – nanocompósito amido+glicerol+MMT+Lfampin e neles foram realizados ensaios mecânicos, físicos, taxa de permeabilidade ao vapor de água, morfológicos e térmicos; e nas mandioquinhas-salsa revestidas com os três tipos de nanocompósitos, armazenadas à temperatura ambiente, foram realizadas análises microbiológicas (nos tempos zero e quatro dias) e físico-químicas (a cada dois dias até oito dias – sendo considerado DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado), com três repetições. Nas análises realizadas nos nanocompósitos foi observada a intercalação da MMT na matriz de amido. Esse fato foi atribuído principalmente à forte interação das camadas de silicato, presentes na MMT, com os grupos hidroxilas do amido. A intercalação da MMT na matriz (T2) melhora a taxa de permeabilidade ao vapor de água e as propriedades térmicas; diminuindo a permeabilidade e aumentando a estabilidade térmica. Em relação à adição da Lfampin (T3) não foi detectada nos nanocompósitos, porém, houve alteração em algumas análises realizadas. Nos compósitos adicionados de Lfampin, não há ação antimicrobiana para os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium roqueforti*, de acordo com as condições em que esse experimento foi conduzido. O melhor efeito antibacteriano da Lfampin em relação a CMI (Concentração Mínima Inibitória) é para a *Escherichia coli*, seguida pela *Pectobacterium carotovora* e por último a *Pectobacterium chrysanthemi*. Nas condições em que foi realizado esse experimento, a mandioquinha-salsa da cultivar Amarela de Senador Amaral, revestida com solução filmogênica amido de milho, glicerol, MMT e Lfampin armazenada em temperatura ambiente não apresentam melhora na qualidade pós-colheita quando comparada as mandioquinhas-salsa sem revestimento. A adição de MMT e Lfampin (T3 – mandioquinha-salsa revestida com solução filmogênica de amido de milho+glicerol+MMT e T4 – mandioquinha-salsa revestida com solução filmogênica amido de milho+glicerol+MMT+Lfampin) diminui o pH favorecendo o aumento da estabilidade das mandioquinhas revestidas.

Palavras-chave: Embalagem ativa. Peptídeo antimicrobiano. *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Qualidade pós-colheita.

ABSTRACT

Biodegradable starch composites have been researched in order to decreasing environmental impact. The addition of plasticizers, reinforcements (load) and antimicrobial agents improves the mechanical, physical, microbiological properties and permeability of the composites. This work aimed to: develop and characterize nanocomposites films (starch + glycerol + montmorillonite (MMT) + bovine lactoferrampin (Lfampin)); evaluate the antifungal and antibacterial action of Lfampin and evaluate the postharvest life of roots of Peruvian carrot coated with nanocomposites films. Three treatments were prepared with three repetitions, by *casting* process: T1 – starch + glycerol; T2 – starch + glycerol + MMT and T3 – starch + glycerol + MMT + Lfampin in them and mechanical, physical, rate of water vapor permeability, thermal and morphological tests were performed. Peruvian carrot coated with three types of nanocomposites and stored at room temperature was analyzed. The microbiological analyze were performed (at zero and four days) and physicochemical (every two days, up to eight days) in a completely randomized design with three repetitions. Analyzes showed the intercalation of MMT in the nanocomposites starch. This was mainly attributed to the strong interaction of silicate layers present in MMT with the starch hydroxyl groups. The MMT intercalation in starch matrix (T2) enhances the rate of water vapor permeability and thermal properties by decreasing permeability and increasing thermal stability. Regarding the addition of Lfampin (T3), no antimicrobial activity was observed for *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium roqueforti* fungi, according to the conditions under which this experiment was conducted. The best antibacterial effect of Lfampin compared to the minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained for *Escherichia coli*, followed by *Pectobacterium carotovora*, and finally, *Pectobacterium chrysanthemi*. Under the conditions which this experiment was conducted, the Peruvian carrot (Amarela de Senador Amaral), coated with filmogenic solution (corn starch, glycerol, MMT and Lfampin), stored at room temperature, no improvement in postharvest quality when compared to Peruvian carrot uncoated. The addition of MMT and Lfampin in the filmogenic solution (T3 – corn starch+glycerol+MMT and T4 – corn starch+glycerol+MMT+Lfampin) reduced the pH promoting the enhanced stability of Peruvian carrot coated.

Keywords: Active packaging. Antimicrobial peptide. *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Postharvest quality.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	46
	ARTIGO 1 Efeito da incorporação da lactoferrampina bovina e da montmorilonita nas propriedades de compósito de amido de milho plasticizados.....	47
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	ARTIGO 2 Efeito de nanocompósitos de amido de milho + glicerol + MMT + lactoferrampina bovina na qualidade microbiológica de mandioquinha-salsa.....	82
1	INTRODUÇÃO	84
2	MATERIAL E MÉTODOS	89
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS	109
	ARTIGO 3 Utilização de nanocompósito amido de milho/glicerol/MMT/Lfampin na conservação pós-colheita de raízes de mandioquinhas-salsa armazenadas à temperatura ambiente.....	112
1	INTRODUÇÃO	114
2	MATERIAL E MÉTODOS	118
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
4	CONCLUSÃO	139
	REFERÊNCIAS	140

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de materiais não degradáveis biologicamente e provenientes de fontes não renováveis, quando descartados, ocasiona grave poluição ambiental. Portanto, a utilização de materiais que causem menor impacto ambiental, que sejam biodegradáveis e provenientes de fontes renováveis vem sendo pesquisada.

Os compósitos à base de amido que são biodegradáveis estariam colaborando e muito para a preservação do ambiente. Porém, esses compósitos apresentam problemas relacionados à fragilidade mecânica e à permeabilidade. Para que ocorra melhoria em suas propriedades, torna-se necessária a adição de plastificantes e materiais de reforço (carga), como, por exemplo, a montmorilonita (MMT), que é uma argila que, quando dispersa, possibilita melhorias nas propriedades físicas, químicas e estruturais.

A MMT bem dispersa na matriz de amido reduz a permeabilidade a gases, pois as lamelas formam uma espécie de labirinto e dificulta, assim, a difusão dos gases através do polímero. Outros tipos de materiais também são adicionados nos compósitos de amido, com a finalidade de ampliar sua utilização. Os agentes antimicrobianos são incorporados no intuito de diminuir ou, até mesmo, inibir a ação de microrganismo, quando presente no alimento, proporcionando, portanto, aumento da sua vida útil pós-colheita. Existem, na literatura, vários trabalhos relatando a utilização de compósitos no revestimento de frutas e hortaliças.

Na produção de alimentos agrícolas, problemas relacionados a causas fisiológicas, microbiológicas, químicas, físicas e mecânicas acarretam perdas pós-colheita. De acordo com Almeida e Silva (2008), os quais avaliaram perdas na cadeia comercial de banana-nanica, banana-prata e tomate longa vida, a maior parte das perdas ocorre nas pontas da cadeia, ou seja, na produção e no

varejo. Na produção, problemas tecnológicos, de manejo e a falta de planejamento da produção contribuem mais para os índices de perdas. Ao final da cadeia, o uso de embalagens, o manuseio e o transporte inadequados, além de produtos com baixo padrão de classificação e baixa qualificação dos operadores, foram os principais responsáveis pelas perdas. Considerando os estratos lavoura, atacado, varejo e domicílio, foi possível obter os seguintes percentuais de perdas, respectivamente: banana-nanica, 3,25%, 1,97%, 5,99% e 23%; banana-prata, 10,48%, 0,20%, 4,71% e 7,15% e tomate, 6,50%, 0,00%, 6,85% e 5,50%.

A mandioquinha-salsa é uma raiz tuberosa originária da região andina da América do Sul que tem vida útil pós-colheita reduzida e valor comercial elevado, em comparação com as outras raízes. Diante desse fato, necessita-se, cada vez mais, de pesquisas relacionadas a estender a vida útil das mesmas.

Portanto, o trabalho foi realizado com o objetivo geral de elaborar, caracterizar e aplicar os compósitos e os nanocompósitos. Os objetivos específicos foram: incorporar a MMT e a lactoferrampina bovina (Lfampin) na matriz polimérica à base de amido; produzir nanocompósitos a partir dos sistemas antimicrobiano-MMT-matriz polimérica; medir as propriedades óticas, mecânicas, físicas, taxa de permeabilidade ao vapor de água, morfológicas e térmicas dos nanocompósitos produzidos; avaliar a ação antifúngica e antibacteriana da Lfampin e avaliar a vida útil pós-colheita de raízes de mandioquinha-salsa 'Amarela de Senador Amaral', à temperatura ambiente, revestidas com compósitos e nanocompósitos, por meio das análises microbiológicas, físicas e químicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nos últimos anos, os polímeros biodegradáveis têm atraído cada vez mais interesse devido à crescente preocupação ambiental e à diminuição dos recursos fósseis. Esta evolução motiva pesquisas acadêmicas e industriais para desenvolver novos materiais, rotulados como "ambientalmente amigável", ou seja, materiais produzidos a partir de recursos alternativos, com menor consumo de energia, biodegradável e não tóxico para o meio ambiente (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009).

A poluição do meio ambiente devido ao descarte de filmes plásticos de polímeros sintéticos sem nenhum controle é um grande problema mundial. Para minimizar este problema, existe a possibilidade da utilização de compósitos biodegradáveis e o amido é um dos materiais que podem participar da elaboração desse material, sendo degradado quando lançado no meio ambiente (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

Os compósitos podem receber várias designações, de acordo com as matérias-primas que os compõem, como, por exemplo, provenientes de amido e outros materiais de fontes renováveis podem ser chamados de biocompósitos, biofilme, filmes finos, embalagem biodegradável e filmes biodegradáveis. Compósitos adicionados de reforço (carga) na escala nano são também chamados de nanocompósitos, nanobiocompósitos.

2.1 Embalagem biodegradável para alimentos

Os compósitos biodegradáveis são, geralmente, produzidos com materiais biológicos, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e derivados. A obtenção dos mesmos, assim como a de coberturas biodegradáveis, está baseada na dispersão ou na solubilização dos biopolímeros em um solvente (água, etanol

ou ácidos orgânicos) e acréscimo de aditivos (plastificantes ou agentes de liga), obtendo-se uma solução ou dispersão filmogênica (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

Entre os materiais de embalagens à base de amido incluem-se os fabricados com amidos nativos ou modificados, isolados ou em conjunto com moléculas naturais ou sintéticas (BASTIOLI, 2000).

Os compósitos incorporados com minerais podem interagir quimicamente retendo gases e umidade, tanto interna quanto externamente. Geralmente, estes nanocompósitos são pouco transparentes e têm textura arenosa, dificultando sua utilização no varejo. Dentre os minerais que vêm sendo utilizados destacam-se a *oya stone*, a cristobalita, o carvão ativo e os zeólitos. Existem, ainda, alguns nanocompósitos com incorporação de zeólitos, que têm atividade bactericida, devido ao uso de metais, como prata, cobre, zinco ou platina (SARANTÓPOULOS; MORAES, 2009). Adicionalmente, a preparação de nanocompósitos de matriz polimérica permite, em muitos casos, encontrar um compromisso entre um baixo custo, devido à utilização de menor quantidade de carga, e um elevado nível de desempenho, que pode resultar da sinergia entre os componentes (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004).

2.2 Embalagem ativa

A especificação de sistemas de embalagem para produtos vivos, como as frutas e as hortaliças, é complexa. Diferentemente de outros alimentos, estes produtos continuam respirando após a colheita e durante o transporte e a comercialização. Além de proteção mecânica, as tecnologias envolvidas no desenvolvimento de uma embalagem para frutas e hortaliças visam retardar a respiração, o amadurecimento, a senescência e, conseqüentemente, todas as

alterações indesejáveis advindas destes processos fisiológicos (SARANTÓPOULOS; FERNANDES, 2001).

Em relação às embalagens passivas, as quais são limitadas a proteger os alimentos de condições externas, as embalagens ativas têm várias funções adicionais (SOARES et al., 2009) que permitem maior interação da embalagem e do produto (OLIVEIRA et al., 2008). Exemplos são as embalagens com ação de absorção de oxigênio, de etileno, de odores e de umidade (SARANTÓPOULOS; FERNANDES, 2001).

Um exemplo de embalagem ativa é o compósito incorporado com aditivos, como, por exemplo, os antimicrobianos e os conservantes, com o objetivo de prolongar a vida útil dos produtos. A liberação de aditivos por embalagens ativas aumenta a segurança do alimento, uma vez que esses compostos, em vez de serem diretamente adicionados ao alimento, são liberados controladamente para o produto através de difusão a partir do compósito (OLIVEIRA et al., 2008).

Compósitos antimicrobianos para embalagens podem fornecer um obstáculo a mais por meio de um cenário de liberação controlada. Há duas categorias gerais de compósitos antimicrobianos: aqueles em que o agente antimicrobiano migra do compósito e aqueles em que o agente permanece dentro do material do compósito. Devido à natureza do alimento, se o antimicrobiano não migra do compósito, pelo menos na superfície do alimento terá ação de forma limitada (DAWSPM et al., 2005).

2.3 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos são proteínas de baixo peso molecular, apresentando atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e fungos (LISBÔA, 2006).

A lactoferrina é uma proteína presente na ligação de ferro em fluidos biológicos de muitos mamíferos, como lágrima, saliva e leite, amplamente investigados devido às suas múltiplas funções. A atividade antimicrobiana direta da lactoferrina afetando a parede celular das bactérias ocorre devido a dois peptídeos antimicrobianos da parte N-terminal da cadeia de aminoácidos da proteína, chamados lactoferricina e lactoferrampina (PAWLIK; SENDER; KORWIN-KOSSAKOWSKA, 2009).

Jenssen, Hamill e Hancock (2006) citam alguns modos de ação para peptídeos antifúngicos que podem ser: permeabilização, lise celular, alvo da mitocôndria e alvo desconhecido com localização citoplasmática.

Os principais mecanismos de ação antibacteriana para os peptídeos, segundo Jenssen, Hamill e Hancock (2006), são os modelos agregados, toroidal, ripa-barril e carpete, mostrados na Figura 1, em que a membrana bacteriana é representada como a bicamada lipídica amarela com os peptídeos apresentados como cilindros, às regiões hidrofílicas estão representadas em vermelho e as regiões hidrofóbicas, em azul.

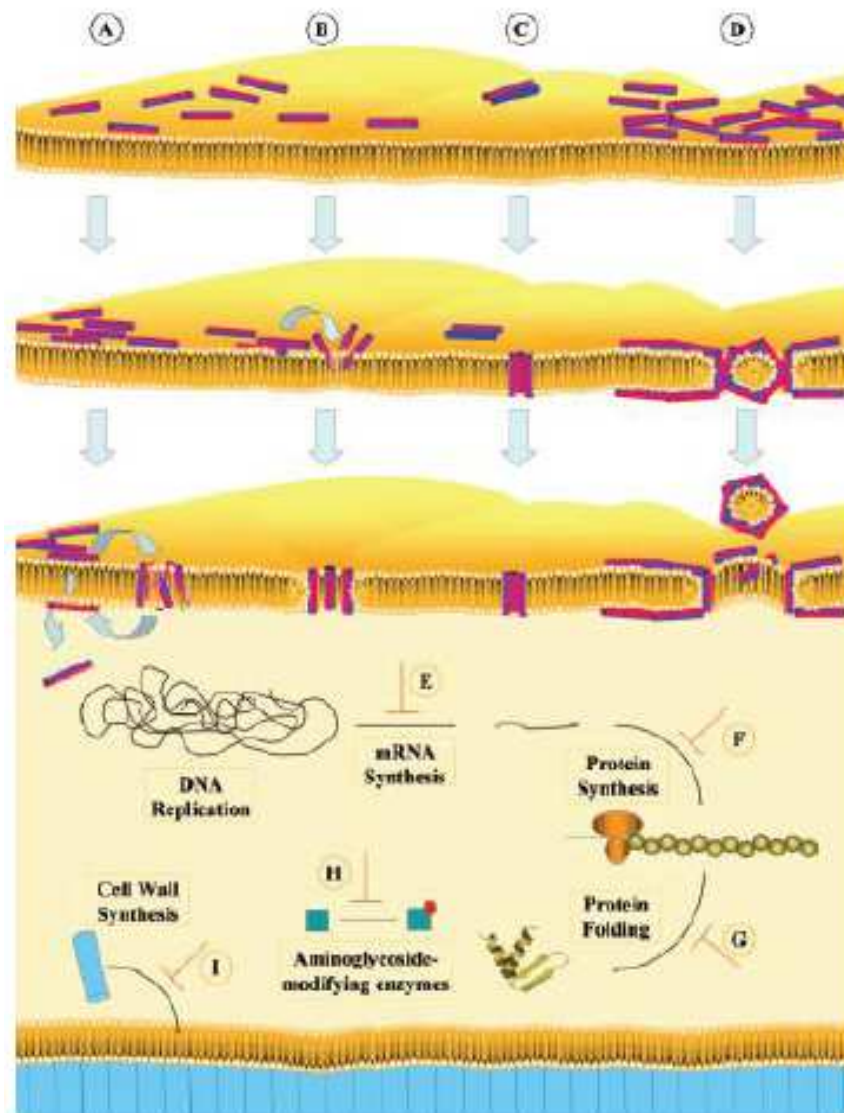


Figura 1 Mecanismos de ação antibacteriana para os peptídeos. A - D (ação direta na membrana – mecanismos de permeabilização); E – I (atua em alvos intracelulares – mecanismo de ação dos peptídeos que não agem por permeabilização da membrana bacteriana).

Fonte: Jenssen, Hamill e Hancock (2006)

Notavelmente, a lactoferrampina está localizada no domínio N1 em proximidade da lactoferricina, que desempenha papel crucial nas atividades de membrana mediana da lactoferrina. Sabe-se que a quantidade de aminoácidos, ou seja, a sequência deles, determina a ação do peptídeo em questão. Van Der Kraan et al. (2004) trabalharam com a lactoferrampina e verificaram ação antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas não contra as bactérias fermentadoras *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e *S. sanguis*. A localização da lactoferrampina bovina (LFampin, aminoácidos 268-284) está ilustrada na Figura 2.

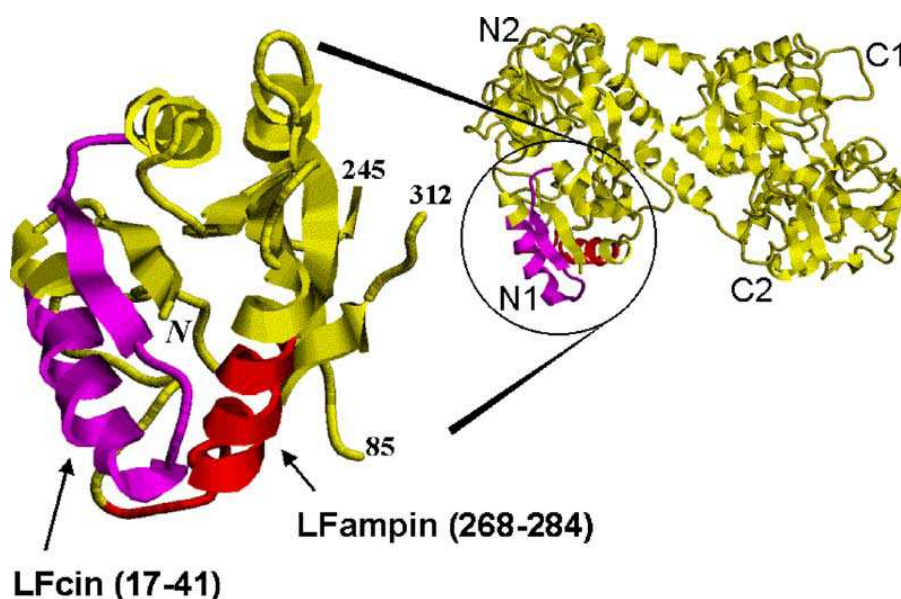


Figura 2 Localização da lactoferrampina bovina, dentro do domínio N1 da lactoferrina bovina.

Fonte: Van der Kraan et al. (2004)

A Lfampin (268-284) é composta por 17 resíduos de aminoácidos, de acordo com a seguinte sequência: triptofano – lisina – leucina – leucina – serina

– lisina – alanina – glutamina – glutamato – lisina – fenilalanina – glicina – lisina – asparina – lisina – serina – arginina (Figura 3), representada pelo código de letras WKLLSKAQEKFGKNKSR.

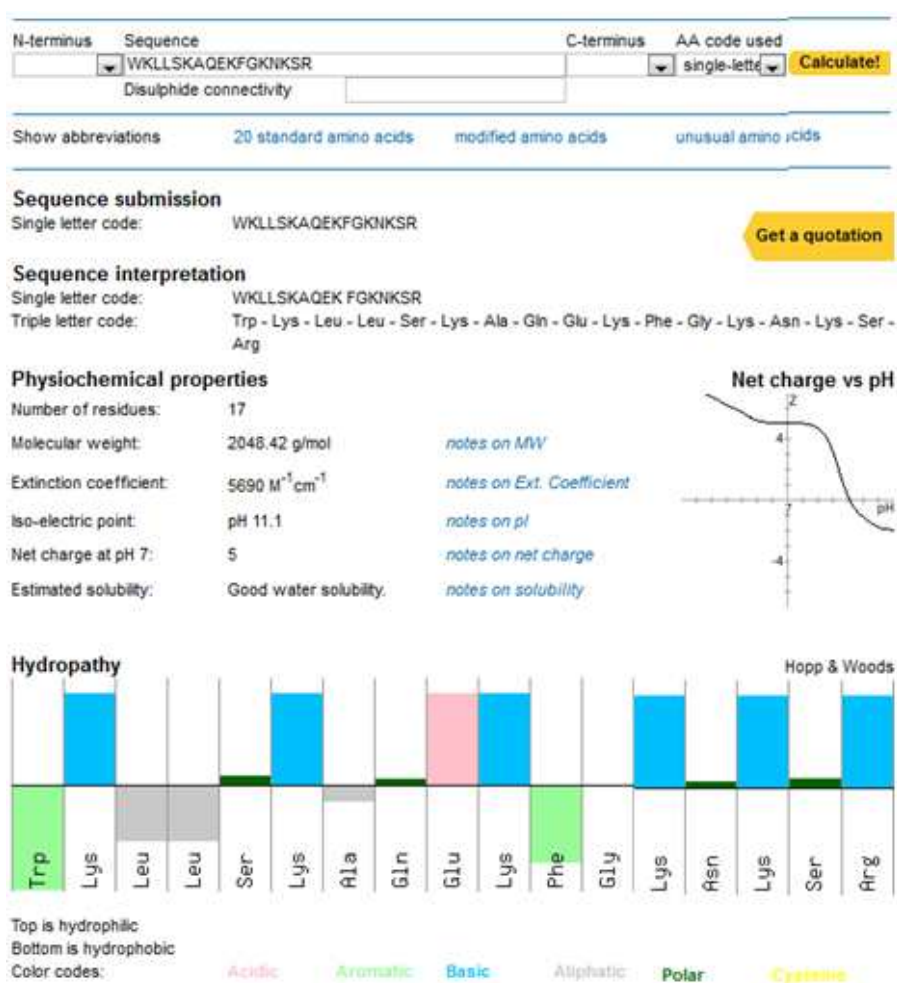


Figura 3 Sequência de aminoácidos e propriedades físico-químicas da Lfampin.
Fonte: Innovagen (2014)

Não foi encontrado, na literatura, relato sobre o efeito da incorporação desse peptídeo (Lfampin 268-284) na estrutura de uma matriz polimérica

(amido). Tendo em vista esse fato e diante de suas propriedades antimicrobianas, a utilização da Lfampin, no presente trabalho, foi almejada.

Na literatura encontram-se trabalhos com a lactoferrina (LF) e a lactoferricina bovina (LFcin). Por exemplo, a utilização de LF e LFcin, adicionadas em compósito de etileno/ácido acrílico pelo método plasma, no controle de *Pseudomonas* spp. na extensão da vida útil de queijos, resultou em novo método promissor para o controle do microrganismo em questão (QUINTIERI et al., 2013). O efeito da LF esterificada e da LF no mofo azul causado por *Penicillium expansum*, em maçãs armazenadas a 25 °C, proporcionou para ambos o controle eficaz e a forte inibição na germinação dos esporos (WANG et al., 2012). O efeito da LF, em caldo e microencapsulada, sobre *Escherichia coli* na fabricação de salsicha promoveu redução do microrganismo durante a fabricação, porém, a maior redução foi obtida com a LF em caldo (AL-NABULSI; HOLLEY, 2007). A inibição de *Penicillium commune* pelo compósito comestível de isolado proteico de soro incorporado com LF, LF hidrolisada e sistemas de lactoperoxidase ocorreu com concentrações ≥ 10 mg/mL em 1% de água peptonada, mas não em peptona caldo dextrose de batata (MIN; KROCHTA, 2005).

2.4 Nanocompósito: polímero/argila motmorilonita (MMT)

As principais pesquisas e aplicações comerciais de nanocompósitos têm sido na área automobilística e de embalagem. No primeiro caso, o enfoque é na melhoria de propriedades mecânicas dos polímeros utilizados nas peças dos carros, sem comprometimento do custo e permitindo a redução de peso do produto. Na área de embalagem, o principal motivo é a melhoria de propriedades de barreira a gases de nanocompósito ou de embalagens rígidas (GARCIA, 2003).

Silicatos como a MMT têm recebido grande atenção nas últimas décadas, como material de reforço para polímeros, devido à área superficial, à alta razão de aspecto (comprimento/espessura) característico deste material e à possibilidade de intercalação/esfoliação das camadas do silicato na matriz polimérica. A MMT tem uma camada estrutural, tipicamente com 1 nm de espessura, que, se propriamente esfoliada, pode levar à produção de uma matriz polimérica com grande número de partículas finamente dispersas (aproximadamente 1 μm de dimensões laterais) (RAY et al., 2005 citados por MAGALHÃES, 2008).

Os detalhes sobre a estrutura da MMT em camadas estão representados na Figura 4. Ela apresenta partículas de tamanhos que podem variar de 2 μm a bastante pequenos, como 0,1 μm em diâmetro. Essa argila pertence ao grupo estrutural dos filossilicatos 2:1, sendo composta por duas folhas tetraédricas de sílica e uma folha central octaédrica de alumina (MORAES, 2009).

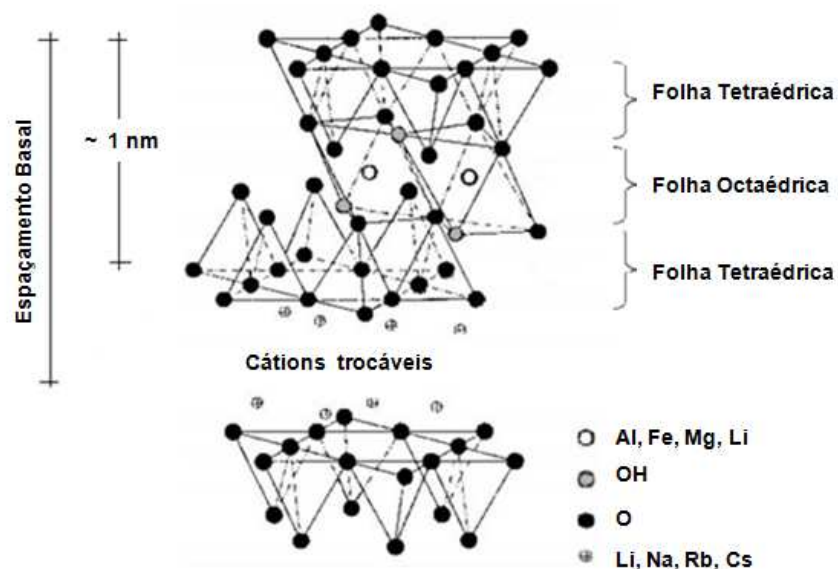


Figura 4 Representação esquemática da MMT.
Fonte: Hussain et al. (2006).

Desenvolvimento de nanocompósitos de polímeros/argila é uma das etapas revolucionárias da tecnologia de polímeros. Preparações de misturas ou nanocompósitos utilizando fibras inorgânicas ou naturais estão entre as rotas para melhorar algumas das propriedades dos polímeros biodegradáveis. Os nanocompósitos obtidos pela adição de baixos percentuais de argila em polímeros apresentaram melhora nas propriedades, como barreira térmica e oxidativa, quando comparados com os compósitos tradicionais. MMT é um dos mais comumente silicatos em camadas usado, pois é ambientalmente correto e disponível em grandes quantidades com custo relativamente baixo (CYRAS et al., 2008).

As propriedades de um nanocompósito são fortemente influenciadas pelo tamanho dos componentes de suas fases e o grau de mistura entre as duas fases, sendo dependente da natureza dos componentes usados (camadas de silicato ou de nanofibras, capacidade de troca catiônica e matriz polimérica) e do método de preparação. Quando o polímero é incapaz de intercalar (ou penetrar) entre as folhas da argila, uma composição de fase separada é obtida. Em uma estrutura intercalada ocorre uma morfologia bem ordenada com alternância de camadas poliméricas múltiplas e inorgânicas e uma estrutura esfoliada, quando as camadas da argila estão dispersas uniformemente em um polímero (HUSSAIN et al., 2006).

Cyras et al. (2008), em experimento referente às propriedades físicas e mecânicas do nanocompósito amido/argila (MMT) e glicerol, observaram melhora na resistência térmica do amido com a adição da argila, por meio de análise termogravimétrica. Este resultado indicou que a argila atua como barreira de calor, aumentando a estabilidade térmica global do sistema. Também, um incremento na distância interlamelar da argila no nanocompósito foi observado por difração de raios X, fornecendo prova de que a argila nanocamada forma uma estrutura intercalada sem chegar à esfoliação completa.

Magalhães (2008), em experimento com bioplásticos nanoestruturados de amido de milho e argilas, concluiu que a adição das argilas MMT Na⁺, MMT Ca²⁺ e Cloisite® 30B à matriz polimérica de amido contribui para o reforço do material, contudo, as argilas favoreceram a melhoria das propriedades mecânicas dos termoplásticos, quando bem dispersas na matriz polimérica e, quanto maior o teor de argila e menor o teor de glicerol, menos hidrofílicos ficam os nanocompósitos.

Slavutsky e Bertuzzi (2012), em estudo fenomenológico e termodinâmico do processo de permeação de água nos nanocompósitos de amido de milho/MMT, verificaram que a incorporação da nanoargila produziu diminuição de absorção de água em todas as temperaturas estudadas (5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C) e a análise do efeito da força e da atividade de água (*a_w*) nos valores de condução de cada lado do nanocompósito sobre a permeabilidade e os coeficientes de difusividade foi significativa apenas na faixa média e inferior da *a_w*, favorecendo o efeito da via tortuosa (caminho difusional de um penetrante através do nanocompósito) gerada pela incorporação da MMT.

Humairah et al. (2014), em experimento com caracterização de amido termoplástico (TPS) e amido de sagu reforçado com argila MMT, relataram que a preparação de nanocompósitos com carga inorgânica como MMT é um dos meios para melhorar algumas propriedades do biopolímero de amido. O grau de cristalinidade do TPS-MMT foi analisado por difração de raios X (DRX), que demonstraram que a estrutura cristalina TPS foi afetada pela integração MMT, enquanto ambos, DRX e infravermelho (FTIR), sugeriram a ocorrência de intercalação matriz-reforço.

Vários compósitos biodegradáveis têm sido explorados para desenvolver materiais ecológicos para embalagens de alimentos. No entanto, o uso de compósitos biodegradáveis tem sido limitado devido à sua propriedade de barreira mecânica ser, geralmente, pobre, a qual pode ser melhorada pela adição

de reforço (cargas), formando compostos. A utilização de cargas com pelo menos uma dimensão à escala nanométrica (nanopartículas) produz nanocompósitos. As nanopartículas têm área proporcionalmente maior do que suas contrapartes em microescala, o que favorece as interações carga-matriz e o desempenho do material resultante. As nanopartículas podem ter outras funções, quando adicionadas a um polímero, tal como atividade antimicrobiana, imobilização de enzimas e biossensoriamento, etc. (AZEREDO, 2009).

Os nanocompósitos são materiais inovadores com propriedades drasticamente melhoradas, devido à incorporação de pequenas quantidades (menos de 10% em peso) de cargas nanométricas em uma matriz polimérica. Nanopartículas podem ser classificadas de acordo com sua morfologia, como partículas (i) em camadas (por exemplo, argilas), (ii) esféricas (por exemplo, sílica) ou (iii) aciculares, ou bigodes (por exemplo, os nanotubos de carbono). O comportamento final pode ser melhorado por forte e extensa interação nanopartícula-polímero, bem como boa dispersão das partículas (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009).

2.5 Amido

O amido é um polímero biodegradável produzido em abundância e advém de recursos renováveis. Como consequência, é facilmente disponível e muito barato. A maior parte das pesquisas é focada em substituir os plásticos baseados em petróleo por materiais biodegradáveis com propriedades semelhantes, baixo custo e de maneira eficaz (CYRAS et al., 2008).

Devido ao baixo custo de produção e à excelente biodegradabilidade, o amido constitui matéria-prima promissora para a produção de compósitos biodegradáveis (THIRÉ et al., 2004). As principais fontes de amido são os cereais, as raízes, os tubérculos e as leguminosas.

O grânulo de amido natural é essencialmente constituído de dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina, que estão associadas entre si por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas, formando as áreas cristalinas radialmente orientadas.

A amilose é formada por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas α , 1-4, que lhe proporcionam a conformação helicoidal linear, e o teor de amilose, na maioria dos amidos, varia entre 20% a 30%. A amilopectina é um polímero de maior peso molecular, em que as moléculas de glicose estão unidas por ligações α , 1-4 e α , 1-6, proporcionando configuração espacial ramificada (CEREDA, 1996). A cristalinidade dos grânulos de amido é atribuída, principalmente, à amilopectina e não à amilose que, embora seja linear, apresenta uma conformação que dificulta sua associação regular com outras cadeias (BLANSHARD, 1987).

Nessas áreas cristalinas, existem regiões amorfas, nas quais as moléculas não têm orientação particular. Na região amorfa, as moléculas são menos fechadas, o que permite a entrada de água para a formação de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas livres das moléculas de amido. As áreas cristalinas mantêm a estrutura do grânulo e participam do comportamento do amido na água. Por esse motivo é que o grânulo de amido nativo exhibe capacidade limitada de absorção de água, embora seja constituído de polímeros solúveis ou parcialmente solúveis neste líquido (CIACCO; CRUZ, [1982]). Não existe demarcação específica entre as regiões cristalinas e amorfas (MAGALHÃES, 2008).

O princípio de obtenção dos compósitos e nanocompósitos baseiam-se em duas das principais características tecnológicas do amido: a gelatinização e a retrogradação.

Uma suspensão aquosa de amido é aquecida, até certa temperatura crítica, sendo denominada temperatura de gelatinização (importante

característica tecnológica do amido). Nesse processo, os grânulos incham e, simultaneamente, perdem suas características de polarização cruzada, ocasionando a perda da birrefringência (LEACH, 1965). Com a perda da birrefringência, o grânulo perde a organização molecular, pois ocorre a destruição das áreas cristalinas e a suspensão inicial fica viscosa (gel), dependente da concentração do amido.

A gelatinização também pode ser descrita como uma fusão dos cristais de amido, a qual pode ser demonstrada por análises termodinâmicas (KARAPANTSIONIS; SAKONIDOU; RAPHAELIDES, 2000).

A suspensão gelatinizada pode ser considerada como a mistura de grânulos inchados e seus fragmentos, juntamente com moléculas de amilose dispersa. Esses elementos exibem uma pronunciada tendência para se associar ou retrogradarem-se, quando a suspensão (gel) é resfriada. Muitos fatores influenciam a retrogradação, os três mais importantes são: a concentração de amilose, o comprimento das moléculas de amilose e o estado de dispersão das cadeias lineares (LEACH, 1965). A retrogradação tende a aumentar a viscosidade de gel (VILELA; FERREIRA, 1987). A retrogradação é outra importante característica tecnológica do amido.

A velocidade de retrogradação de pastas de amido depende de fatores inerentes ao grânulo ou seus componentes. Entre esses fatores destacam-se tipo de amido, peso molecular e linearidade (CIACCO; CRUZ, [1982]). Um esquema do que ocorre no grânulo de amido durante a gelatinização e a retrogradação pode ser observado na Figura 5.

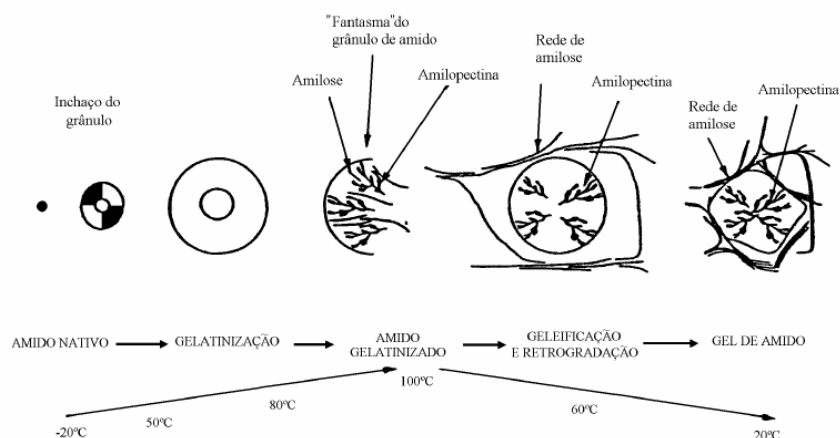


Figura 5 Influência do tratamento hidrotérmico com excesso de água sobre o estado do amido.

Fonte: Magalhães (2008 extraído de BORNET, 1991).

2.6 Glicerol

O glicerol é um subproduto e sua principal forma de aquisição é por meio da obtenção do biodiesel. O aproveitamento do glicerol é de grande importância econômica e ambiental (MOTA; PESTANA, 2011), sendo utilizado em diversos setores industriais.

O glicerol, também chamado de glicerina ou propanotriol, é um líquido viscoso, inodoro e incolor, de sabor levemente adocicado. É um triálcool com um grupo hidroxila em cada um dos três átomos de carbonos adjacentes e a sua fórmula é $\text{CH}_2\text{OH} - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$ (Figura 6) (UNDERKOFLE, 1954). Em sua forma pura anidra, o glicerol tem densidade de $1,261 \text{ mg mL}^{-1}$ ($20^\circ\text{C}/4^\circ\text{C}$), ponto de fusão de $18,2^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição de 290°C , acompanhado de decomposição (PATURAU, 1969).

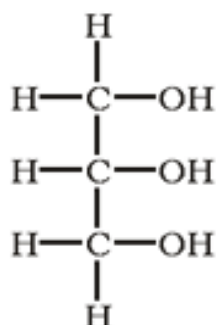


Figura 6 Estrutura química do glicerol.

Fonte: http://isite.lps.org/sputnam/Biology/U2Biochemistry/lipid_lab.htm.

Os plastificantes devem ser compatíveis com o compósito biodegradável e os mais estudados em combinação com os compósitos de amido são os polióis, como o glicerol e o sorbitol, materiais que interagem com as cadeias de amido, aumentando a mobilidade molecular e, conseqüentemente, a flexibilidade das cadeias poliméricas. Outro efeito é o aumento da hidroflicidade e permeabilidade ao vapor de água dos compósitos plastificados (MALI et al., 2004).

Plastificante é uma substância não volátil que, quando adicionada a um material, altera suas propriedades mecânicas e/ou físicas (ALLEONI; JACOMINO; ROSA, 2006). Dependendo da concentração do plastificante, a origem botânica do amido e as condições de armazenamento, materiais com diferentes propriedades mecânicas podem ser produzidos (MALI et al., 2006).

2.7 Caracterização dos compósitos e nanocompósitos

2.7.1 Propriedade ótica

As propriedades óticas dos compósitos influenciam, principalmente, a apresentação do produto embalado e estão relacionadas à cor, ao brilho e à transparência dos compósitos. Compósitos à base de amido, geralmente,

apresentam certa opacidade ou barreira à transmissão de luz (JENSEN; GROSSMAN; MALI, 2009).

Os compósitos poliméricos exibem boas propriedades óticas, além de apresentarem propriedades superiores às dos polímeros puros ou às dos compósitos convencionais (PINTO et al., 2005).

2.7.2 Propriedade mecânica

As propriedades mecânicas que determinam a resposta dos materiais às influências mecânicas externas são manifestadas pela capacidade desses materiais desenvolverem deformações reversíveis e irreversíveis e resistirem à fratura (CASARIN, 2004).

Algumas propriedades mecânicas de compósitos podem ser avaliadas por ensaios de tração que são úteis para a identificação e a caracterização de compósitos flexíveis, com aplicação no desenvolvimento, na especificação e na avaliação da qualidade desses materiais (MORAES, 2009).

Boonprasith, Wootthikanokkhan e Nimirsiriwat (2013) trabalharam com compósito de amido de mandioca termoplástico (TPS) e poli (succinato de butileno), em diferentes concentrações e tipos de argila (Cloisite Na e Cloisite 30B). Com 5% de argila e 75% de TPS, o módulo de elasticidade mudou significativamente.

No experimento de Faria, Vercelheze e Mali (2012), no qual trabalharam com compósito à base de amido de mandioca, álcool polivinílico (PVA) e MMT, houve aumento na resistência máxima à tração, quando adicionados PVA e MMT; aumento da alongação, quando se adicionou PVA e diminuição da alongação, quando a MMT foi adicionada.

2.7.3 Propriedade de barreira ao vapor de água

O conhecimento da permeabilidade ao vapor de água é imprescindível para se definir as possíveis aplicações dos compósitos em embalagens. A taxa de permeabilidade ao vapor de água é uma análise relevante no campo que abrange os materiais poliméricos. Segundo a norma ASTM E96-80, a permeabilidade é a taxa de propagação do vapor de água por unidade de área de um material plano de espessura unitária induzida por uma diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas, sob condições fixas de temperatura e umidade (MCHUGH; KROCHTA, 1994 citados por MORAES, 2009). Esse transporte de vapor de água através de compósitos poliméricos ocorre em quatro etapas: primeiro, acontece a adsorção do vapor de água na superfície do polímero; segundo, solubilização do vapor de água na matriz polimérica; terceiro, difusão do vapor de água através do polímero e quarto, dessorção do vapor de água na outra superfície do polímero (ROY et al., 2000, citados por MORAES, 2009).

A presença de partículas nanoestruturadas melhora as propriedades de barreira dos materiais. Essa melhoria revela-se na redução da permeabilidade a gases e no aumento da resistência a solventes, especialmente em embalagens. A justificativa para o decréscimo da permeabilidade em estruturas nanométricas sob forma lamelar seria a de que, quando elas estivessem dispersas no polímero, criariam uma espécie de labirinto, o que dificultaria a difusão de gases através do material polimérico. É muito provável que a fina dispersão de nanopartículas sob forma de placas aumente o percurso para o caminho da difusão do gás ou solvente (RAY et al., 2005 citado por MAGALHÃES, 2008). O modelo do caminho difusional de um penetrante através do nanocompósito está ilustrado na Figura 7.

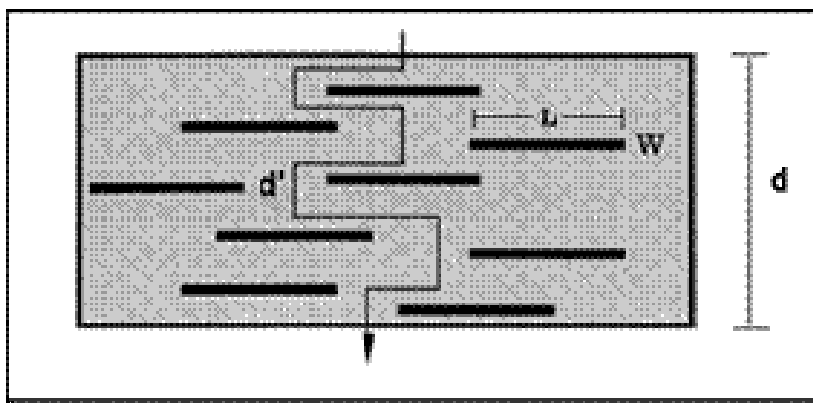


Figura 7 Modelo do caminho difusional de um penetrante através do nanocompósito.
Fonte: Alexandre e Dubois (2000).

Muller, Laurindo e Yamashita (2011) incorporaram nanoargila em compósitos à base de amido de mandioca e verificaram significativa diminuição da permeabilidade ao vapor de água, comportamento atribuído ao caminho tortuoso criado pelas lamelas da nanoargila.

Esse mesmo comportamento foi observado no trabalho de Faria, Vercelheze e Mali (2012), com compósitos biodegradáveis à base de amido de mandioca, PVA e MMT.

2.7.4 Caracterização morfológica por meio da microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica é a técnica indicada para o estudo das formas dos cristais individuais (ALBANEZ, 2008). A microscopia eletrônica de varredura (MEV), em especial, permite a visualização do formato e do tamanho dos grânulos, bem como das estruturas da superfície e da seção transversal dos

mesmos, possibilitando, assim, a investigação de possíveis imperfeições, porosidades e separações dos componentes que compõem os compósitos em estudo.

Humairah et al. (2014), em experimento com caracterização de amido termoplástico (TPS) e amido de sagu reforçado com argila MMT, verificaram, com a eletromicrografia de varredura fase contínua, boa aderência do nanocompósito TPS-MMT, com concentração inferior de argila.

Faria, Vercelheze e Mali (2012), com o uso da microscopia eletrônica de varredura, obtiveram eletromicrografias com características homogêneas, contínuas, sem rachadura ou poros nos compósitos biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico (PVA) e MMT.

De acordo com Melo et al. (2011), que realizaram experimento com nanocompósitos goma xantana-amido-argila, o MEV dos nanocompósitos obtidos por extrusão de amido-xantana mostrou superfície reticulada e interior liso, indicando que a goma foi, principalmente, concentrada na superfície dos nanocompósitos, enquanto os nanocompósitos de amido/xantana/nanoargilas mostraram superfície mais homogênea, o que sugere que a introdução de nanoargilas proporcionou melhor interação biopolimérica.

2.7.5 Propriedade físico-química

A espectroscopia no infravermelho é, certamente, uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente. A introdução de espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) melhorou drasticamente a qualidade dos espectros no infravermelho e minimizou o tempo necessário para a obtenção de dados. A radiação infravermelha (IR) corresponde, aproximadamente, à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e micro-ondas. A porção de maior utilidade na análise

e na identificação de materiais está situada entre 4.000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ e $25\text{ }\mu\text{m}$), o chamado infravermelho médio.

A espectroscopia no infravermelho é baseada nas vibrações dos átomos numa molécula. Um espectro no infravermelho é, comumente, obtido pela passagem de radiação infravermelha através de uma amostra e da determinação da fração da radiação incidente que é absorvida em cada frequência (energia) ou comprimento de onda. Ao absorverem radiação infravermelha, as moléculas são excitadas a estados de energia maiores. Esse processo é quantizado, ou seja, apenas certas frequências (energias) são absorvidas e essa absorção corresponde a variações de energia na ordem de 8 a 40 kJ/mol^2 (HAACK, 2010).

A difração de raios X (DRX) é uma técnica que fornece informações mais amplas, precisas e detalhadas quanto à qualificação, à caracterização e à quantificação dos constituintes de um material (ALBANEZ, 2008).

Os difratogramas obtidos da difração de raios X permitem determinar se ocorreu ou não intercalação das cadeias poliméricas por meio da determinação da distância interplanar. De acordo com a lei de Bragg, a intercalação deverá provocar mudança do pico de difração para um menor ângulo. No entanto, se o espaçamento entre as camadas se torna muito grande, esses picos desaparecem nos difratogramas, o que implica completa esfoliação das lamelas na matriz polimérica (MORAES, 2009), já que as camadas se encontram tão separadas entre si que não têm nenhuma organização cristalina entre elas (halo amorfo).

Cyras et al. (2008) elaboraram nanocompósitos amido/argila e glicerol como plastificantes, os quais foram preparados por suspensões aquosas pelo processo *casting*, a partir da fécula de batata e três cargas diferentes de MMT, para estudar o efeito da nanoargila nas propriedades do amido. Um incremento na distância interlamelar da argila nos nanocompósitos foi observada por difração de raios X, fornecendo evidências de que a nanoargila formou uma estrutura intercalada, sem chegar à esfoliação completa. Uma melhora na

resistência térmica do amido com a adição da argila foi observada por meio de análise termogravimétrica (TG).

2.7.6 Análises térmicas (DSC e TG)

Análise térmica é o termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (ALBANEZ, 2008).

Efeitos endotérmicos e exotérmicos correspondem a mudanças de energia térmica na amostra. Quando uma amostra se funde, energia em forma de calor é necessária para romper as interações que mantêm a amostra no estado sólido. A energia aplicada corresponde a um efeito endotérmico (fusão). Por outro lado, o congelamento é um processo exotérmico, pois energia térmica é liberada enquanto a substância se cristaliza (DODD; TONGE, 1987 citados por NASSU, 1994).

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) fornecem informações sobre os efeitos térmicos que são caracterizados por uma mudança na entalpia (máxima energia de um sistema termodinâmico), como a determinação das temperaturas de transições em polímeros (transição vítrea, temperatura de cristalização e temperatura de fusão) e as medidas quantitativas (calor específico, calor de fusão, calor de cristalização e calor de reação) (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

A investigação das propriedades térmicas de materiais à base de amido por meio de análise termogravimétrica (TG) é muito importante para a avaliação do comportamento e das transições térmicas do amido. Essa análise avalia a

estabilidade térmica dos compósitos e fornece dados sobre a temperatura de degradação térmica (MAGALHÃES, 2008).

No experimento de Boonprasith, Wootthikanokkhan e Nimitsiriwat (2013) com blenda de amido de mandioca termoplástico (TPS) e poli (succinato de butileno) (PBS) e diferentes concentrações e tipos de argila (Cloisite Na e Cloisite 30B), a estabilidade térmica do nanocompósito TPS/PBS/Cloisite Na foi maior, indicando que a argila Cloisite Na proporcionou tal aumento.

3 CONCLUSÃO

A intercalação da montmorilonita (MMT) na matriz (T2 – nanocompósito amido de milho + glicerol + MMT) diminui a taxa de permeabilidade ao vapor de água e aumenta a estabilidade térmica. Nas condições em que foi realizado o trabalho, a adição da lactoferrampina bovina (Lfampin) não foi detectada nos nanocompósitos (T3 – nanocompósito amido de milho + glicerol + MMT + Lfampin), porém, altera as propriedades óticas, morfológicas e térmicas, bem como a coloração do nanocompósito, com maior saturação de cor e menor tonalidade, além da morfologia com aspecto poroso, menor temperatura de pico da fusão e diminuição na estabilidade térmica. Nos nanocompósitos adicionados de Lfampin, não há ação antimicrobiana para os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium roqueforti*. O melhor efeito antibacteriano da Lfampin em relação à concentração mínima inibitória (CMI) é para a *Escherichia coli*, seguida pela *Pectobacterium carotovora* e, por último, a *Pectobacterium chrysanthemi*.

Neste trabalho, a ação antibacteriana da solução filmogênica incorporada com Lfampin no revestimento de mandioquinha-salsa, armazenada à temperatura ambiente, apresenta baixa eficiência. A adição de montomorilonita e Lfampin (T3 – mandioquinha-salsa revestida com nanocompósito amido de milho + glicerol + MMT e T4 – mandioquinha-salsa revestida com nanocompósito amido de milho + glicerol + Lfampin) diminui o pH, favorecendo o aumento da estabilidade das mandioquinhas-salsa revestidas. Apesar do aumento da perda de massa nos tratamentos T3 e T4 e do aparecimento de pontuações escuras ao longo do armazenamento, as mandioquinhas-salsa apresentam a mesma firmeza.

REFERÊNCIAS

ALBANEZ, N. E. F. K. **Preparação e caracterização de nanocompósitos preparados com argilas esmectitas (bentonita), amido e sacarose**. 2008. 91p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Mat Sci and Eng.**, v. 28, p. 1-63, 2000.

ALLEONI, A. C.; JACOMINO, A. P.; ROSA, A. S. Recobrimento de laranja 'Pêra' com filme de concentrado protéico de soro de leite associado a plastificantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1221-1226, 2006.

ALMEIDA, G. C. de; SILVA, T. **Avaliação de perdas na cadeia comercial de banana nanica, banana prata e tomate longa vida**. Belo Horizonte: CEASAMINAS: FAEMG: SEBRAE/MG, 2008. 50 p.

AL-NABULSI, A. A.; HOLLEY, R. A. Effects on Escherichia coli O157:H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin in broth and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters. **International Journal of Food Microbiology** v. 113, p. 84–91, 2007.

AZEREDO, H. M. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, p. 1240-1253, 2009.
doi: 10.1016/j.foodres.2009.03.019, 2009.

BASTIOLI, C. Global status of the production of biobased packaging materials. In: THE FOOD BIO-PACK CONFERENCE. Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: CPL, 2000, p. 2-7.

BLANSHARD, J.M.V. Starch granule structure and function: a physicochemical approach In: **Starch properties and potential: critical reports on applied chemistry**. London: Society of Chemical Industry, v. 13, p. 16–54, 1987.

BOONPRASITH, P.; WOOTTHIKANOKKHAN, J.; NIMITSIRIWAT, N. Mechanical, Thermal, and Barrier Properties of Nanocomposites Based on Poly(butylene succinate)/Thermoplastic Starch Blends Containing Different Types of Clay. **Journal of Applied Polymer Science**, 2013. doi: 10.1002/APP.39281

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 125-155, 2009. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.10.002

CASARIN, S. A. **Desenvolvimento e caracterização de blendas e de compostos empregando polímeros biodegradáveis**. 2004. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

CEREDA, M.P. Amidos modificados. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p.28-30, jan./jun. 1996.

CIACCO, C.F.; CRUZ, R. **Fabricação de amido e sua utilização**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, [1982]. 152p.

CYRAS, V. P., et al. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 55-63, 2008. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.11.014

DAWSPM, P. L., et al. Antimicrobial activity of nisin-adsorbed silica and corn starch powders. **Food Microbiology**, v. 22, p. 93-99, 2005. doi: 10.1016/j.fm.2004.04.001

- ESTEVEES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de Matriz Polimérica: Estratégias de Síntese de Materiais Híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.
- FARIA, F. de O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 487-492, 2012.
- GARCIA, E. E. C. Nanocompósitos: novas opções em materiais de embalagem. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens – ITAL**. v. 15, n.1, 6 p., 2003.
- HAACK, M. DE S. **Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2010, 49 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.
- HUMAIRAH, A. R. N., et al. Characterizations of thermoplastic starch and starch reinforced montmorillonite clay nanocomposite. **Advances in Environmental Biology**. p. 792, 2014.
- HUSSAIN, F., et al. Review article: polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: an overview. **Journal of Composite Materials**, v. 40, n. 17, 2006.
- INNOVAGEN, 2014. Disponível em: <<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>>. Acesso em: 29 maio 2014.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JENSEN, S.; GROSSMANN, M. V. E.; MALI, S. Microestrutura e estabilidade de filmes de amido de mandioca adicionados de emulsificantes com diferentes equilíbrios hidrofílico/lipofílico. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 97-105, abr./jun. 2009.

LEACH, H. W. **Starch: chemistry and technology**. New York ; London: Academic Press, 1965, v.1, 579 p.

MELO, C. de, et al. Properties of Extruded Xanthan Starch-Clay Nanocomposite Films. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54 n. 6: p. 1223-1333, nov./dec. 2011.

MIN, S.; KROCHTA, J. M.. Inhibition of *Penicillium commune* by Edible Whey Protein Films Incorporating Lactoferrin, Lactoferrin Hydrolysate, and Lactoperoxidase Systems. **Journal of Food Science**. v. 70, n. 2, 2005.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 416-425, 2011.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. **Industrial Crops and Products**, 33, p. 605–610, 2011.

QUINTIERI, L., et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin on plasma-deposited coating against spoilage *Pseudomonas* spp. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 20, p. 215–222, 2013.

KARAPANTSIOS, T. D.; SAKONIDOU, E. P.; RAPHAELIDES, S. N. Electrical conductance study of fluid motion and heat transport during starch gelatinization. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 65, n. 1, p. 144-150, 2000.

LISBÔA, M. P. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo**. 2006. 85 p.

Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2006.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros**: determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-Papers, 2001. 366p.

MAGALHÃES, N. F. **Bioplásticos nanoestruturados de amido de milho e argilas**. 2008. 212 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros), Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MALI, S., et al. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 56, n. 2, p.129-135, 2004.

MALI, S., et al. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 453-460, 2006. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.04.031

MORAES, J. O. de. **Propriedades de filmes de amido incorporados de nanoargilas e fibras de celulose**. 2009.75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

NASSU, R. T. **Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC)**. 1994. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

OLIVEIRA, T. M. de, et al. Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 117-128, jan./mar. 2008.

PATURAU, J.M. **By-products of cane sugar industry**: an introduction to their industrial utilization. New York: Elsevier, 1969. p. 169-188 e 215-219.

PAWLIK, A.; SENDER, G.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 27, n. 4, 263-271, 2009.

PINTO, M. R. O.; JÚNIOR, M. M. A.; SILVA, S. M. I.; CARVALHO, L. H. Influência da adição e da modificação química de uma carga mineral nanoparticulada nas propriedades mecânicas e no envelhecimento térmico de compósitos poliuretano/sisal. **Polímeros**, v.15, n.4, São Carlos, oct./nov. 2005.

THIRÉ, R. M., et al . Redução da Hidrofilicidade de Filmes Biodegradáveis à Base de Amido por meio de Polimerização por Plasma. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 1, p. 57-62, 2004.

UNDERKOFER, L.A. Glycerol. In: UNDERKOFER, L.A.; HICKEY, R.J. (Ed.). **Industrial fermentation**. New York: Chemical, 1954. Cap. 8, p. 252-270.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; FERNANDES, T. Embalagens ativas. **Cetea-Informativo** . 2001. Disponível em:
<<http://www.jorplast.com.br/jpout01/pag11.html>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; MORAES, B. B. Embalagens ativas e inteligentes para frutas e hortaliças. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens – ITAL**. v. 21, n.1, 2009. 7 p.

SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A. A phenomenological and thermodynamic study of the water permeation process in corn starch/MMT films. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 551– 557, 2012.

SOARES, N. de F. F., et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 370-378, 2009.

VAN DER KRAAN, M. I. A., et al. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. **Peptides**, v. 25, p. 177–183, 2004.

VILELA, E.R.; FERREIRA, M.E. Tecnologia de produção e utilização do amido de mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.145, p.69-73, jan. 1987.

WANG, J.; et al. Effects of Esterified Lactoferrin and Lactoferrin on Control of Postharvest Blue Mold of Apple Fruit and Their Possible Mechanisms of Action. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 60, p. 6432–6438, 2012.

SEGUNDA PARTE -ARTIGOS

ARTIGO 1

Efeito da incorporação da lactoferrampina bovina e da montmorilonita nas propriedades de compósito de amido de milho plasticizado

J.S. Alves ^a, L. Pereira ^a, K.C. dos Reis ^b, J. Pereira ^a

^a Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

^b Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

RESUMO

A adição de reforço na matriz polimérica tem sido estudada com a finalidade de melhorar as propriedades dos nanocompósitos. Este trabalho foi realizado com os objetivos de incorporar a MMT na matriz de amido, adicionar a Lfampin ao sistema criado e caracterizar algumas propriedades dos nanocompósitos elaborados. A partir de três diferentes tempos de sonicação, a incorporação da MMT à matriz de amido foi determinada por meio de ensaios mecânicos. Foram caracterizadas as propriedades óticas, mecânicas e físicas, a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) e as características morfológicas e térmicas, em três diferentes nanocompósitos (amido + glicerol, amido + glicerol + MMT, amido + glicerol + MMT + Lfampin). Os nanocompósitos amido + glicerol + MMT (T2) tiveram os melhores resultados para TPVA ($177,417 \text{ g água m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) e análise termogravimétrica, aumentando sua estabilidade térmica ($344,66 \text{ °C}$), do que para os nanocompósitos T1 ($293,696 \text{ g água m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e $341,73 \text{ °C}$) e T3 ($261,956 \text{ g água m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e $279,25 \text{ °C}$). Nas condições que foram realizadas as análises, a adição da Lfampin não foi detectada nos nanocompósitos (T3), porém, ela altera as propriedades óticas, morfológicas e térmicas, e também a coloração do nanocompósito, com maior saturação de cor e menor tonalidade, além de morfologia com aspecto poroso, menor T_p (temperatura de pico da fusão) e diminuição na estabilidade térmica.

Palavras-chave: Embalagem ativa. Propriedade mecânica. MEV. FTIR-ATR. difração de raios-X. Análises térmicas.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o impacto ambiental devido ao uso desordenado de materiais não biologicamente degradáveis impulsiona o surgimento de pesquisas com materiais que causem menor prejuízo ao ambiente, e que sejam de fontes renováveis e de baixo custo.

O amido vem sendo utilizado na forma dos denominados compósitos biodegradáveis, justamente por ser um material renovável, abundante e de baixo custo. Porém, os compósitos produzidos mostram certa fragilidade em relação à resistência e à permeabilidade.

Plastificantes, como, por exemplo, o glicerol, são adicionados nos compósitos de amido com a finalidade de melhorar a fragilidade e a flexibilidade dos mesmos.

O uso da nanotecnologia por meio da incorporação de pequenas quantidades de cargas nanométricas na matriz polimérica possibilita melhoras nas propriedades físicas, químicas e estruturais dos nanocompósitos biodegradáveis. Esse tipo de tecnologia baseia-se na incorporação de nanocomposto na matriz, buscando criar novos materiais e processos.

O nanocompósito formado a partir do amido, glicerol e montmorilonita (MMT, um tipo de argila que, quando bem dispersa no polímero, reduz a permeabilidade, formando lamelas que dificultam a difusão dos gases por meio da matriz polimérica) apresenta perspectivas bastante promissoras.

As propriedades de um nanocompósito são fortemente influenciadas pelo tamanho dos componentes de suas fases e o grau de mistura entre as duas fases, sendo dependentes da natureza dos componentes usados (camadas de silicato ou de nanofibras, capacidade de troca catiônica e matriz polimérica) e do método de preparação. Três estruturas que podem ocorrer após a mistura polímero-argila são mostradas na Figura 1. Quando o polímero é incapaz de

intercalar (ou penetrar) entre as folhas da argila, uma composição de fase separada é obtida. Em uma estrutura intercalada ocorre uma morfologia bem ordenada, com alternância de camadas poliméricas múltiplas e inorgânicas e uma estrutura esfoliada, quando as camadas da argila são dispersas e uniformes em um polímero (HUSSAIN et al., 2006). A MMT é uma argila que pertence ao grupo estrutural dos filossilicatos 2:1, sendo composta por duas folhas tetraédricas de sílica e uma folha central octaédrica de alumina (MORAES, 2009).

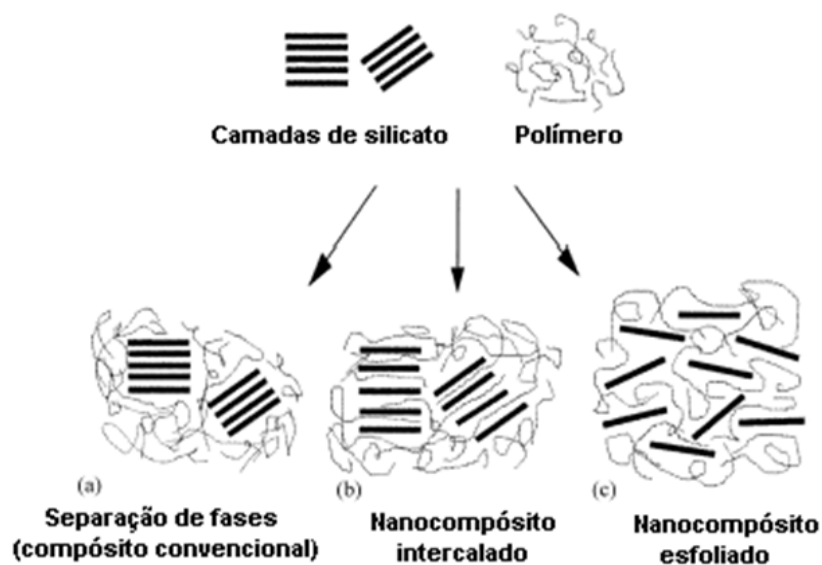


Figura 1 Estruturas que podem ocorrer após a mistura polímero-argila.
Fonte: Hussain et al. (2006).

A camada de silicato atua como reforço mecânico no amido, reduzindo a flexibilidade do polímero. A principal razão para essa melhoria nas propriedades mecânicas é a forte interação entre a matriz e a camada de silicato, devido à grande superfície exposta dessas camadas (CYRAS et al., 2008).

Devido à potencial resistência dos microrganismos aos antimicrobianos clássicos, os peptídeos antimicrobianos têm se mostrado uma ferramenta importante para diminuição dessa resistência.

A lactoferrampina bovina (Lfampin) é um peptídeo antimicrobiano que está localizado no domínio N1 da lactoferrina, em proximidade da lactoferricina, a qual desempenha papel crucial nas atividades de membrana mediana da lactoferrina (VAN DER KRAAN et al., 2004). Sabe-se que a quantidade de aminoácidos, ou seja, a sequência deles, é que determina a ação do peptídeo em questão.

De acordo com o fabricante (GenScript USA Inc. – Shangai, China), a Lfampin 268-284 apresenta a fórmula química $C_{93}H_{154}N_{28}O_{24}$ e tem sua estrutura demonstrada na Figura 2.

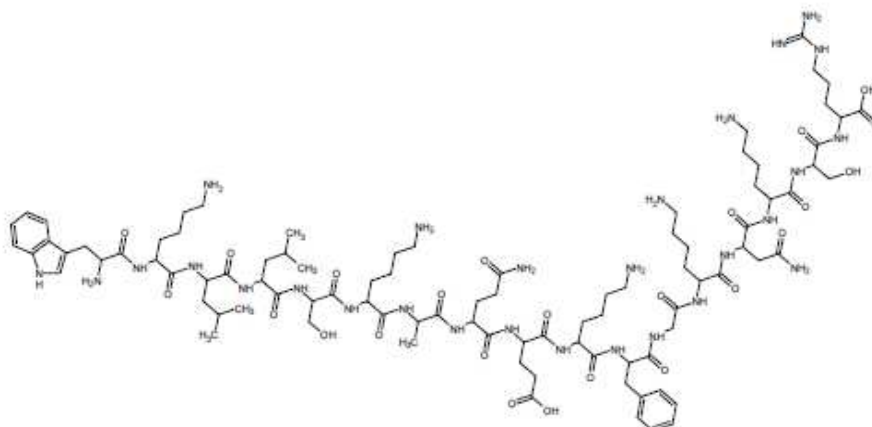


Figura 2 Estrutura química da Lfampin 268-284
Fonte: GenScript USA Inc. (Shangai, China).

Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a incorporação da MMT na matriz polimérica à base de amido, adicionar a Lfampin ao sistema matriz de amido + MMT e avaliar as propriedades óticas, mecânicas, físicas, morfológicas e térmicas, além da taxa de permeabilidade ao vapor de água dos compósitos e dos nanocompósitos produzidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

O amido de milho foi fornecido pela Corn Products Brazil S.A.; o glicerol foi obtido da Vetec Química Fina Ltda. (São Paulo, Brasil); a MMT (Cloisite[®] – nanofil 116) foi fornecida pela Southem Clay Products, Inc. (Gonzales, TX) e a Lfampin (aminoácidos 268-284, cuja sequência é WKLLSKAQEKFGKNKSR e pureza 95%) foi obtida na empresa GenScript USA Inc. (Shanghai, China). Água destilada foi utilizada como solvente.

2.2 Delineamento experimental

As concentrações de glicerol, MMT e Lfampin utilizadas nesse experimento foram determinadas mediante pré-teste, sendo estas calculadas em relação à matriz amido.

Foram elaborados três tratamentos, sendo eles:

Tratamento 1 (T1) – 3% de amido de milho (3 g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + água destilada (completou para 100mL).

Tratamento 2 (T2) – 3% de amido de milho (3 g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + 5% de MMT (0,15 g) + água destilada (completou para 100 mL).

Tratamento 3 (T3) – 3% de amido de milho (3 g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + 5% de MMT (0,15 g) + 10% de Lfampin (0,3 g) + água destilada (completou para 100 mL).

2.3 Determinações do melhor tempo de sonicação

Para possibilitar a esfoliação e/ou a intercalação da MMT (argilosilicato), foram elaborados compósitos (amido de milho + glicerol) incorporados com o argilosilicato em diferentes tempos de mistura (5, 10 e 15 minutos) por sonicação, com amplitude de 30%. O equipamento utilizado para sonicar foi um Sonicador (Branson Ultrasonics Co, Ltd. Modelo Digital Sonifier[®] 450, Shanghai, China).

Para determinar o tempo de sonicação a ser utilizado na elaboração dos nanocompósitos foram realizadas análises de propriedades mecânicas (força máxima, resistência à tração e alongamento na ruptura), nos quais foram testados os diferentes tempos de mistura.

2.4 Elaborações dos compósitos e nanocompósitos

Os compósitos e os nanocompósitos foram elaborados utilizando-se o processo “casting”, que consiste na desidratação de uma solução filmogênica (gel) aplicada sobre placa de Petri (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

Para a elaboração de compósitos e nanocompósitos foram utilizados amido de milho, glicerol, MMT, Lfampin e água destilada.

Foi feita uma solução por meio da dispersão da MMT na matriz amido de milho + glicerol + água destilada, conforme ensaio anterior, com diferentes tempos de sonicação. A solução foi mantida em agitação constante e aquecimento até 75 °C. O peptídeo (Lfampin) foi acrescentado após a formação do gel na temperatura entre 35 °C e 40 °C, permanecendo sob agitação constante por uma hora.

Para cada solução (T1, T2, T3) foi medido o pH por meio do potenciômetro TEC-3MP (Tecnal, Brasil). Posteriormente, o gel foi vertido em placas de poliestireno e acondicionado em estufa umidificadora com circulação de ar constante (model 435314, Hotpack, EUA), a 25 °C e 50% UR, para a perfeita secagem dos compósitos e nanocompósitos. Depois de secos, eles foram retirados das placas e acondicionados em dessecador contendo solução salina saturada (NaCl), a 75% de UR, para análises posteriores.

2.5 Análises estatísticas

Para determinar o melhor tempo de sonicação, os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e à análise de regressão para variável tempo, a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar, versão 5.3 Build 77 (FERREIRA, 2011). Os critérios adotados para ajuste da equação foram o R^2 ser maior que 70% e o coeficiente de regressão ser significativo.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) composto por três tratamentos (T1, T2, T3) e três repetições, porém, para as análises mecânicas foram utilizadas seis repetições.

Os dados experimentais obtidos foram submetidos ao teste de média (teste de Scott-Knott) para a variável tratamento, a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar, versão 5.3 Build 77 (FERREIRA, 2011).

2.6 Análises

2.6.1 Cor

A cor dos compósitos e dos nanocompósitos foi determinada com aparelho colorímetro Konica Minolta modelo CM-5 (Japão), trabalhando com

D_{65} (luz do dia), de acordo com Sobral (1999) e utilizando os padrões CIE Lab, em que L^* (corresponde à luminosidade) varia de 0 (preto) a 100 (branco), a^* varia do -60 (verde) ao +60 (vermelho) e b^* varia de -60 (azul) ao +60 (amarelo). Para calibração foi utilizada uma placa branca, cuja leitura foi $L = 92,40$, $a^* = 0,3162$ e $b^* = 0,3326$. Posteriormente, os valores de L^* , a^* e b^* foram mensurados nas amostras de compósitos e nanocompósitos. A partir dos valores, a^* e b^* , calcularam-se o índice Croma (cromaticidade – saturação de cor – C^*) (Equação (1)) e o ângulo Hue (tonalidade – h) (Equação (2)).

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

$$h = \arctan b^*/a^* \quad (2)$$

A percentagem de opacidade (Op) foi calculada a partir da Equação (3), em que L_{PP} é a luminosidade do compósito e do nanocompósito sobreposto no padrão preto e L_{PB} é a luminosidade do compósito e do nanocompósito sobreposto no padrão branco.

$$Op (\%) = (L_{PP} / L_{PB}) \times 100 \quad (3)$$

2.6.2 Taxa de permeabilidade ao vapor de água

A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) dos compósitos e dos nanocompósitos foi determinada utilizando-se um Permatran-W, modelo 1/50 G (USA), com sensor infravermelho, de acordo com o método padrão E398 – 03 da ATSM (ASTM, 2003). A amostra do compósito e do nanocompósito foi inserida entre duas máscaras de alumínio, com área interna de $12,6 \text{ cm}^2$ e colocada na célula de difusão do equipamento. Os parâmetros

utilizados na análise foram temperatura de 37,8 °C e umidade relativa controlada de 50% (permeante) e 10% (lado seco). O resultado foi expresso em g água/(m² dia).

2.6.3 Propriedades mecânicas

A força máxima, a resistência à tração (RT) e o alongamento na ruptura (AR) foram determinados utilizando-se texturômetro TA.XT2plus (Stable Micro System, UK – Reino Unido). O tamanho da célula de carga foi de 50 kg. Os corpos de prova para as análises foram cortados em formato de fita (80 mm de comprimento e 20 mm de largura). Os parâmetros de configuração da análise de todos os compósitos e nanocompósitos foram os seguintes: velocidade pré-teste 0,8 mm s⁻¹, velocidade de teste 0,8 mm s⁻¹ e velocidade pós-teste 10,00 mm s⁻¹. A probe utilizada foi a A/TG (Tensile Grips), com distância das garras de 50 mm. A resistência à tração foi calculada dividindo-se a força máxima pela área seccional do compósito e do nanocompósito (largura do compósito e nanocompósito x espessura inicial). Já o alongamento na ruptura foi calculado dividindo-se o diferencial de extensão pela separação inicial das garras. Para cada repetição foram utilizados seis corpos de prova.

2.6.4 Espessura

As medidas de espessura foram tomadas com um micrômetro externo digital (Instrutemp, Brasil), com resolução 0,001 mm e escala de 0 a 25 mm. Os resultados foram expressos em milímetros (mm).

2.6.5 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de compósitos e nanocompósitos foram obtidas de acordo com a metodologia proposta por Bengtsson, Koch e Gatenholm (2003), com algumas modificações. Para isso, compósitos e nanocompósitos foram congelados em nitrogênio líquido, quebrados em pedaços de ~2 mm e fixados na seção transversal, sob fita metálica adesiva de carbono dupla face em “stubs” e banhadas com ouro (metalizador SCD 050 – Balzers Union, Alemanha). Posteriormente, estes foram analisados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP (Electron Microscopy Ltda, Inglaterra), 20kV e 500x de aumento.

O amido de milho, a MMT e a Lfampin liofilizada também foram observados no MEV. As amostras em pó foram “salpicadas” em “stubs” sob fita de carbono dupla face, secas a 70 °C, por 24 horas e, em seguida, banhadas com ouro.

Para melhorar a visualização da Lfampin foi feita uma dispersão em água destilada. Uma gota da solução foi colocada em lâmina de vidro fixada sobre fita de carbono dupla face em “stubs”, seca em estufa, a 30 °C, por 48 horas, banhada com ouro e analisada em microscópio eletrônico de varredura.

2.6.6 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Foi utilizado o equipamento FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA) com 32 varreduras e 1 cm⁻¹ de resolução na faixa de comprimento de onda de 4.000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹, para a caracterização dos compósitos e nanocompósitos e amostras secas (amido, MMT e Lfampin) na região do infravermelho médio.

2.6.7 Raios X

Análises da estrutura cristalina de compósitos e nanocompósitos e das amostras (amido, MMT e Lfampin) foram determinadas em difratômetro de raios X da marca Panalytical (modelo X PERT PRO, Holanda), com variação angular de 10-80° (2 θ), radiação de CoK α ($\lambda=1.78897$ Å) e velocidade de exposição de 5 °C/min min⁻¹, sob tensão de 40 kV (MORAIS et al., 2013).

2.6.8 Calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica

A propriedade térmica de compósitos e nanocompósitos e da amostra seca (amido, MMT, Lfampin) foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Model DSC 60A, Shimadzu, Germany) e a análise térmica diferencial (DTA) para determinar a perda de massa foi realizada por meio da análise termogravimétrica (TG) (Model DTG – 60H, Shimadzu, Germany). Foram utilizados cerca de 5 mg de cada amostra para a realização das análises, sendo os compósitos e os nanocompósitos cortados em pedaços pequenos. As amostras foram colocadas em cadinho e a referência era o cadinho vazio. Ambas as análises utilizaram o fluxo de nitrogênio a 50 mL por minuto e uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹, de 30 °C a 300 °C, para o DSC e de 30 °C a 600 °C, para a TG.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinações do melhor tempo de sonicação

Foram realizadas análises mecânicas, com a finalidade de avaliar qual foi o melhor tempo efetivo de sonicação para a elaboração dos nanocompósitos. A análise de variância está representada na Tabela 1.

Tabela 1 Quadrados médios da ANOVA e respectivas significâncias para força máxima (FM), resistência à tração (RT) e alongamento da ruptura (AR), para os nanocompósitos elaborados com diferentes tempos de sonicação.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		FM (N)	RT (MPa)	AR (%)
Tempo	2	262,522*	130,577*	0,967 ^{ns}
Resíduo	15	25,279	24,327	0,336
CV (%)	17	22,40	19,02	19,89

* significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

^{ns} não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

FM = força máxima; RT = resistência à tração; AR = Alongamento na ruptura; CV = coeficiente de variação.

Para as variáveis FM e RT houve diferença significativa, porém, os dados não se ajustaram aos modelos matemáticos propostos (Figura 3A e 3B). Já a variável AR não apresentou diferença significativa entre os tempos estudados, sendo a média geral igual a 2,91%.

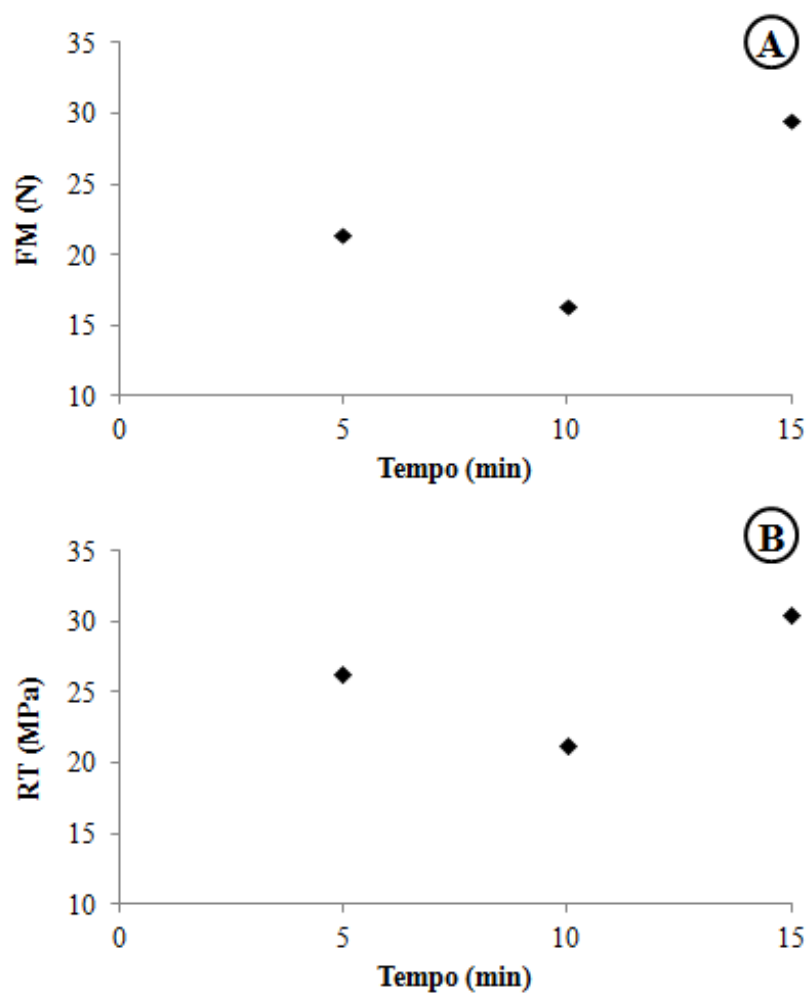


Figura 3 Tempos de sonicação para as variáveis: A) força máxima (FM) e B) resistência à tração (RT).

De acordo com as Figuras 3A e 3B, o tempo de sonicação que apresentou os maiores valores para as propriedades mecânicas (FM e RT) foi o de 15 minutos, tempo este adotado para a sonicação dos nanocompósitos. A sonicação foi utilizada no intuito de auxiliar a intercalação da MMT com a matriz de amido de milho.

3.2 Caracterizações da matéria prima

Observam-se, na Figura 4, as eletromicrografias de varredura da matéria-prima (amido de milho, da MMT, da Lfampin liofilizada e isolada) utilizada na elaboração dos compósitos e nanocompósitos, sendo possível a visualização do formato de cada material.

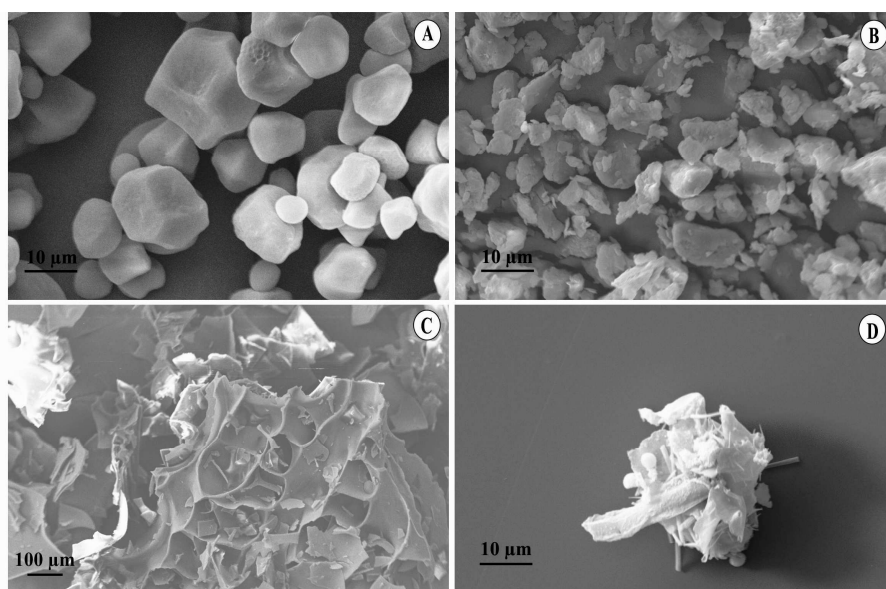


Figura 4 Eletromicrografias de varredura observadas por MEV: A – amido de milho, B – MMT, C – Lfampin liofilizada, D – Lfampin isolada.

3.3 Análises

Foram mensurados os valores de pH em cada solução filmogênica (gel), referente a cada tratamento. O valor encontrado para o tratamento 1 foi de 5,42; para o tratamento 2, de 8,83 e, para o tratamento 3, de 3,28.

A incorporação da Lfampin acidificou o gel, fato que sugere que ocorreu a precipitação dessa proteína (Lfampin). Esse tipo de comportamento é

verificado com a proteína do soro de leite, quando há acidificação do meio (SILVA; SILVA; FERREIRA, 2012).

Na Figura 5 estão representados os materiais utilizados na elaboração dos compósitos e nanocompósitos elaborados. Visualmente, pode-se notar que o tratamento 3 (T3) apresentou coloração mais pigmentada do que os demais tratamentos, pois a adição da Lfampin proporcionou coloração mais escura no nanocompósito, quando comparado aos tratamentos T1 e T2.

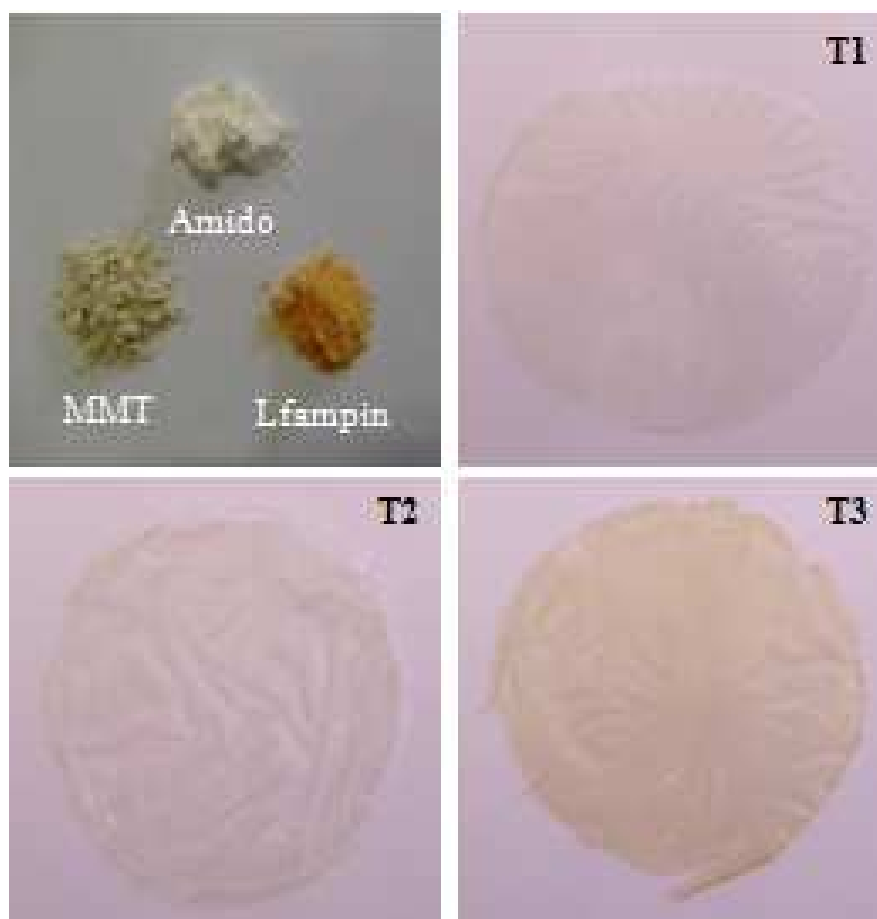


Figura 5 Fotos dos materiais utilizados na elaboração dos compósitos e nanocompósitos elaborados, T1 = amido + glicerol, T2 = amido + glicerol+MMT, T3 = amido + glicerol + MMT + Lfampin.

Os resultados da caracterização dos compósitos e nanocompósitos (T1, T2 e T3), cor e taxa de permeabilidade ao vapor de água se encontram nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 Quadrados médios da ANOVA e respectivas significâncias para índice croma (C*), ângulo hue (h), opacidade (Op) e taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios			
		C*	h	Op	TPVA (g água m ⁻² dia ⁻¹)
Tratamento	2	20,851*	5129,048*	1,584 ^{ns}	10837,556*
Resíduo	6	0,041	8,927	2,325	529,054
CV (%)	8	9,84	2,30	5,32	9,41

*significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

^{ns} não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

C* = índice croma; h = ângulo hue; Op = opacidade; TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água.

Tabela 3 Valores médios¹ para as variáveis índice croma (C*), ângulo hue (h), opacidade (Op) e taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA).

Tratamento	C*	h	Op	TPVA (g água m ⁻² dia ⁻¹)
T1	0,387 b	167,068 a	28,459 a	293,696 a
T2	0,668 b	137,277 b	28,098 a	177,417 b
T3	5,087 a	85,363 c	29,498 a	261,956 a

¹ Média de três observações. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

T1 = tratamento 1; T2 = tratamento 2; T3 = tratamento 3; C* = índice Croma; h = ângulo Hue; Op = opacidade; PVA = permeabilidade ao vapor de água.

Para as variáveis C*, h e TPVA houve diferença significativa ($p < 0,5$) entre os tratamentos. O T3 apresentou maior valor para C* e menor valor para h

e o T2 obteve o menor valor para TPVA. Já para a variável Op não houve diferença significativa ($p \geq 0,5$).

A adição da Lfampin (T3) alterou a cor dos nanocompósitos, resultando em maior saturação da cor (índice croma – C*) e menor tonalidade (ângulo hue – h). Este fato era esperado, uma vez que a Lfampin apresenta coloração alaranjada.

A taxa de permeabilidade ao vapor de água é a massa de vapor de água transmitida por meio de uma unidade de área em uma unidade de tempo sob condições específicas de temperatura e umidade relativa (KAMPEERAPPUN et al., 2007).

Kampeerappun et al. (2007); Müller, Laurindo e Yamashita (2011) e Ibrahim (2011), em seus trabalhos com nanocompósito de amido + MMT, assim como neste trabalho (T2), encontraram redução na permeabilidade quando adicionaram MMT ao compósito de amido. O último autor atribuiu esse fato à grande quantidade de camadas de silicato dispersas na matriz e ainda relatou que essa diminuição é importante para o uso em embalagens de alimentos, para revestimento e outras aplicações em que são necessárias barreiras poliméricas eficientes.

Assim como foi verificado neste trabalho, Faria, Vercelheze e Mali (2012); Slavutsky, Bertuzzi e Armada (2012) e Slavutsky et al. (2014) também observaram diminuição na permeabilidade dos compósitos, quando adicionados de MMT e mencionaram que as lamelas da argila podem criar caminhos tortuosos que dificultam a passagem dos vapores, diminuindo a permeabilidade ao vapor de água dos nanocompósitos obtidos.

Na Tabela 4 e 5 são apresentados os resultados da caracterização mecânica e espessura dos compósitos e dos nanocompósitos (T1, T2 e T3).

Tabela 4 Quadrados médios da ANOVA e respectivas significâncias para força máxima (FM), resistência à tração (RT), alongamento na ruptura (AR) e espessura (Es).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios			
		FM (N)	RT (MPa)	AR (%)	Es (μm)
Tratamento	2	32,244 ^{ns}	92,258 ^{ns}	3,525*	192,729 ^{ns}
Resíduo	6	20,435	35,822	0,539	176,511
CV (%)	8	29,83	29,96	33,28	38,69

* significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

^{ns} não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

FM = força máxima; RT = resistência à tração; AR = Alongamento na ruptura; Es = espessura.

Tabela 5 Valores médios¹, para as variáveis força máxima (FM), resistência à tração (RT), alongamento na ruptura (AR) e espessura (Es).

T	FM (N)	RT (MPa)	AR (%)	Es (μm)
T1	14,903 a	18,670 a	2,808 a	28,179 a
T2	17,590 a	24,381 a	2,467 a	35,500 a
T3	12,974 a	16,871 a	1,343 b	39,333 a

¹ Média de seis observações. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

T1 = tratamento 1; T2 = tratamento 2; T3 = tratamento 3; FM = força máxima; RT = resistência à tração; AR = Alongamento na ruptura; Es = espessura.

Isoladamente, os maiores valores para força máxima e resistência à tração foram para o T2, em que foi adicionado MMT nos compósitos de amido, porém, não houve diferença estatística ($p \geq 0,5$) entre os tratamentos. O aumento na resistência à tração com a adição de MMT foi observado no trabalho de Kampeerappun et al. (2007) (~19 MPa a 21,2MPa).

Cyras et al. (2008); Chung et al. (2010); Müller, Laurindo e Yamashita (2011); Faria, Vercelheze e Mali (2012) e Slavutsky et al. (2014) encontraram o mesmo comportamento para propriedade mecânica, ao adicionar MMT aos compósitos de amido. A resistência à tração aumentou e o alongamento na ruptura diminuiu. Os autores informaram que esse comportamento era esperado e o atribuíram à resistência da própria argila e à questão da intercalação das camadas de silicato com matriz, por meio das ligações de hidrogênio formadas entre as hidroxilas do amido e da MMT, denotando, assim, boa dispersão da MMT na matriz de amido, levando, portanto, a um reforço da matriz polimérica.

Faria, Vercelheze e Mali (2012), em experimento com compósitos biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e MMT, constataram que a MMT atua como agente de reforço para a matriz de amido e essa adição pode ter levado à formação de estruturas mais resistentes e rígidas.

Apenas foi encontrada diferença estatística ($p < 0,5$) para a variável alongamento na ruptura, para a qual T3 obteve o menor valor entre os demais tratamentos.

Não foi observada diferença nos valores de espessura com adição de MMT e Lfampin, nos compósitos de amido. O mesmo ocorreu no trabalho de Kampeerappun et al. (2007), no qual a espessura dos compósitos não apresentou diferença com a adição de diferentes quantidades de MMT na matriz de amido.

3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 6 observam-se as eletromicrografias de varredura das seções transversais de compósitos e nanocompósitos elaborados com amido de milho, glicerol, MMT e Lfampin (T1, T2 e T3).

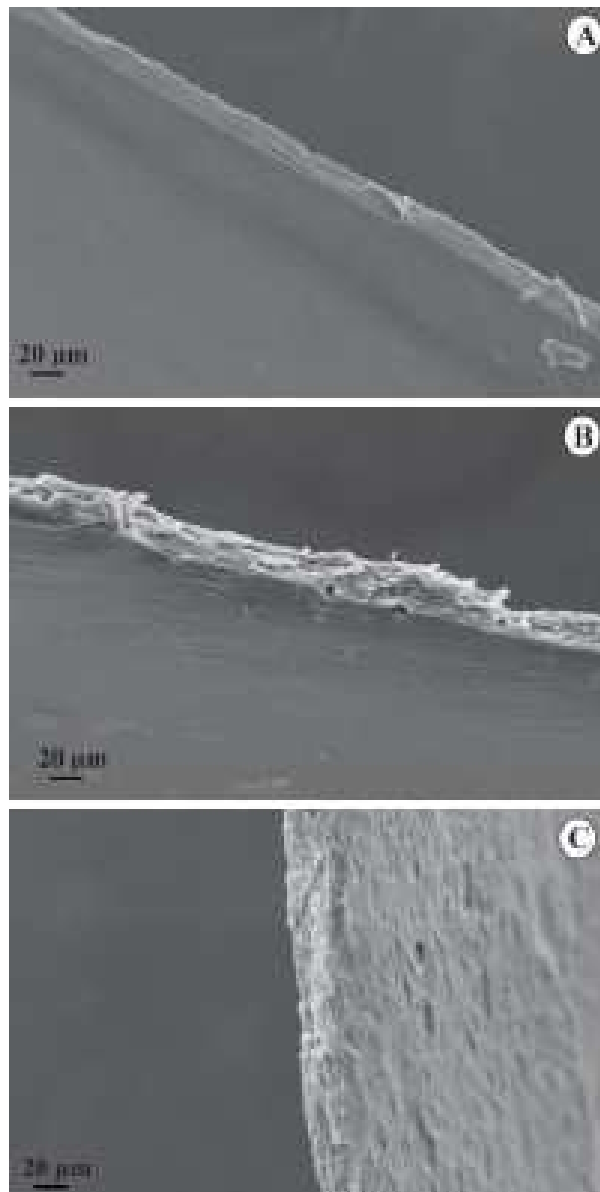


Figura 6 Eletromicrografia de varredura de seções transversais dos compósitos e nanocompósitos: T1 – amido + glicerol, T2 – amido + glicerol+MMT, T3 – amido + glicerol + MMT + Lfampin.

Nos compósitos e nos nanocompósitos não foi possível verificar a presença isolada de cada material. No geral, os compósitos e os nanocompósitos apresentaram aparência homogênea e não foi possível observar evidência de separação entre os componentes de compósitos e nanocompósitos.

De acordo com Mali et al. (2002), a matriz homogênea e compacta dos compósitos é um bom indicador da sua integridade estrutural e, conseqüentemente, boa propriedade mecânica seria esperada. O T3, entre os demais, foi o que se mostrou menos compacto, sugerindo uma estrutura mais frágil, com aspecto poroso, fato que corrobora os resultados das propriedades mecânicas (Tabela 5). Esse aspecto pode ser explicado por meio da possível precipitação ocorrida na formação desse nanocompósito, devido à acidificação do pH.

3.3.2 Espectroscopia de absorção no Infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi utilizada para a caracterização de compósitos e nanocompósitos e seus componentes (amido, MMT e Lfampin). De acordo com Lengowski (2012), uma alteração na organização cristalina faz com que o perfil espectral das amostras seja alterado por meio da redução ou do aumento da intensidade ou, mesmo, o desaparecimento e o surgimento de picos característicos das regiões cristalinas das amostras.

Como mostrado nas Figuras 7A, 7B e 7C, os tratamentos T1, T2 e T3 mostraram aumento na intensidade da banda extremamente larga do grupo hidroxila, relacionada às ligações de hidrogênio e à água remanescente do processo de secagem (SCHLEMMER, 2011), sendo de 3.342, 3.327 e 3.335 cm^{-1} , respectivamente, em comparação com o amido puro (3.321 cm^{-1}). Amostras amorfas apresentam bandas mais nítidas e com menor intensidade, em

comparação com as amostras com maior cristalinidade, que podem ser correlacionadas com a cisão de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (LENGOWSKI, 2012).

Na Figura 7A estão representados os espectros FTIR do T1, juntamente com um dos componentes do compósito, o amido, com a finalidade de verificar a modificação do espectro após a produção do compósito. A banda 2.928 cm^{-1} do T1 aumentou em relação ao amido (2.889 cm^{-1}). De acordo com Liu et al. (2012), os quais trabalharam com modificação na estrutura e na propriedade físico-química de amido de milho por meio de tratamentos de irradiação, essa banda é vinculada ao estiramento C-H dos átomos de hidrogênio do anel de metano; quanto maior a cristalinidade da amostra, menor é a intensidade da banda (LENGOWSKI, 2012). De acordo com Magalhães (2008), as bandas de forte intensidade na região $1.200\text{ a }1.000\text{ cm}^{-1}$, características do amido, são atribuídas a vibrações de deformação axial de C-O em alcoóis e a vibrações de deformação axial do sistema C-O-C. Essas bandas apareceram com maior intensidade nos tratamentos T1, T2 e T3, quando comparadas com o amido puro.

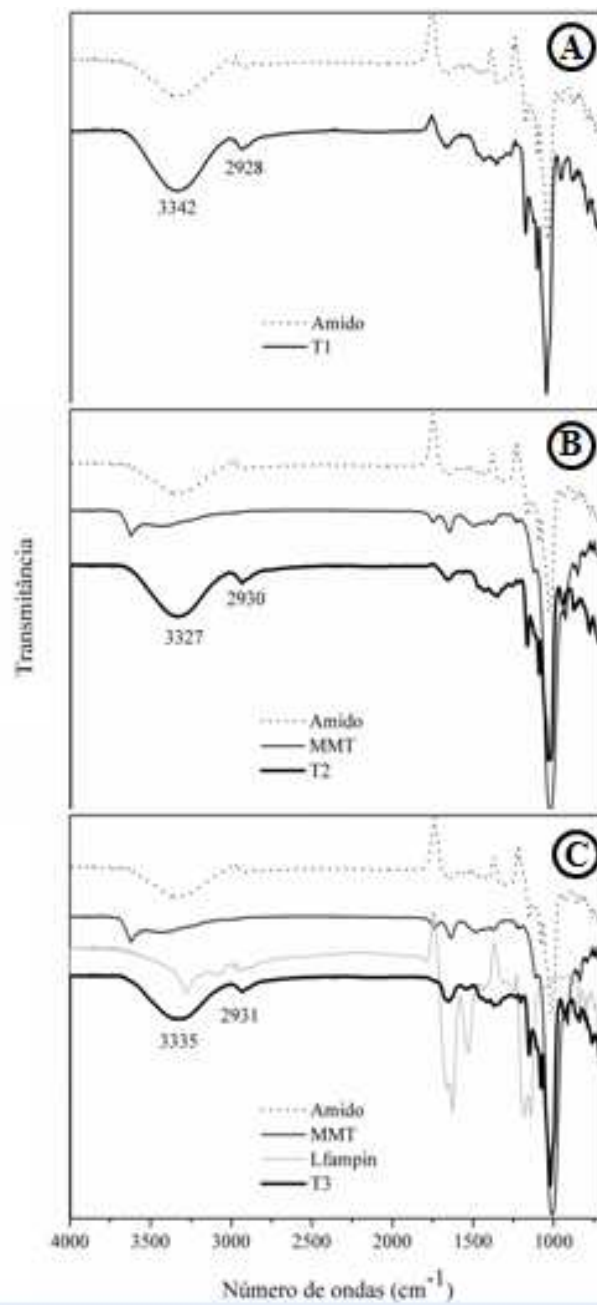


Figura 7 Espectro FTIR, sendo: A = tratamento T1 e amido de milho; B = tratamento T2, amido de milho e MMT; C = tratamento T3, amido de milho, MMT e Lfampin.

O espectro FTIR do tratamento T2 e os componentes do nanocompósito (amido e MMT) estão representados na Figura 7B. Assim como no experimento de Magalhães (2008), que trabalhou com bioplásticos nanoestruturados de amido de milho e argilas, pode ser observada a banda de 2.930 cm^{-1} , atribuída à deformação axial de ligações C-H. Na MMT, a banda de 3.618 cm^{-1} indica grupos O-H livres e a absorção máxima a 1.013 cm^{-1} é atribuída ao alongamento e à flexão da vibração Si-O-Si (SLAVUTSKY et al., 2014). O desaparecimento da banda em 3.618 cm^{-1} no espectro da MMT também foi observado por outros autores (SLAVUTSKY et al., 2014; LIU et al., 2011; CHAUDHARY; LIU, 2013), indicando a substituição de moléculas de água na camada intermédia da MMT e a formação de novas ligações de hidrogênio com o polímero, ou seja, interação entre o amido e a MMT.

Já a Figura 7C representa o espectro FTIR do tratamento T3 e componentes do nanocompósito (amido, MMT e Lfampin). De acordo com Lisbôa (2006), a presença do grupo carboxílico COOH e do grupo amina NH_2 indica a presença de aminoácidos, conseqüentemente a presença de proteínas. A Lfampin apresentou bandas de 3.276 , 2.960 , 1.627 e 1.529 cm^{-1} que, de acordo com o mesmo autor, são indicativas da função amina ($-\text{NH}_2$), do grupo funcional carboxílico ($-\text{COOH}$) e as últimas duas bandas (região entre 1.500 a 1.800 cm^{-1}) referem-se à banda de amida I e II (FABIAN et al., 1993). No espectro FTIR do tratamento T3 também apareceu a banda atribuída à deformação axial de ligações C-H (2931 cm^{-1}). Porém, nesse espectro de infravermelho fica evidente a interação apenas do amido e da MMT. Pela metodologia de análise não foi possível quantificar a presença da Lfampin incorporada no nanocompósito.

3.3.3 Raios X

A difração de raios X é uma ferramenta valiosa para determinar e estudar a forma de organização estrutural de um composto. Na Figura 8 estão representados os difractogramas de raios X das amostras em pó: amido, MMT e Lfampin e dos compósitos e nanocompósitos (T1, T2 e T3). Foi realizada a análise no amido, na MMT e na Lfampin, no intuito de comparar com os resultados dos raios X dos compósitos e nanocompósitos, e verificar qual a alteração dos compósitos e nanocompósitos causada pela adição dos materiais.

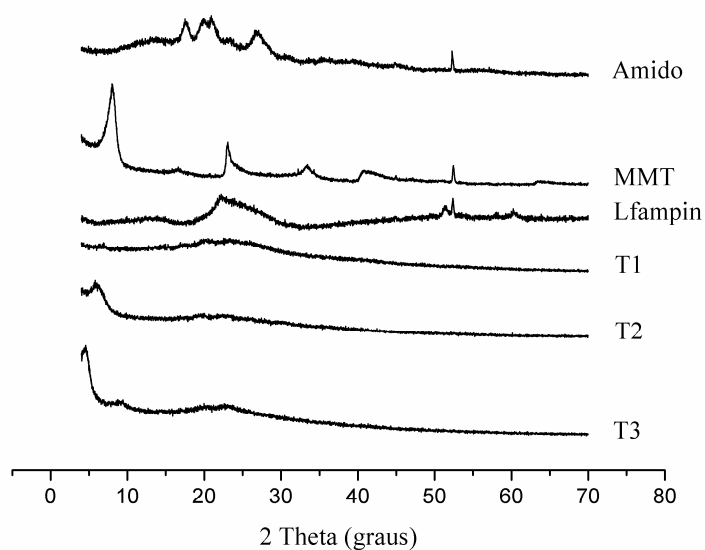


Figura 8 Difractograma de raios X das amostras (amido, MMT, Lfampin) e dos compósitos e nanocompósitos (T1, T2, T3).

Na Figura 8 observam-se os difractogramas de cada material. Para o amido de milho foram observados quatro picos correspondentes ao ângulo 2θ (17,5°; 19,9° e 20,9° – dublete; 26,7°). Para a MMT foram observados quatro

picos referente ao ângulo 2θ (8° ; $23,1^\circ$; $33,4^\circ$; $40,8^\circ$). Já para a Lfampin foram observados cinco picos para o ângulo 2θ ($13,9^\circ$; $22,2^\circ$; $51,3^\circ$; $52,4^\circ$; $60,2^\circ$). Para o T1 não foi observado nenhum pico, demonstrando, portanto, uma estrutura amorfa. Em T2 foi observado um pico correspondente ao ângulo 2θ ($5,8^\circ$) com d-espacamento igual a 1,77 nm, sendo este deslocado em relação ao pico principal da MMT ($2\theta = 8^\circ$ e d-espacamento = 1,28 nm). Em T3 foi observado um pico próximo de 2θ ($4,6^\circ$), d-espacamento igual a 2,25 nm e também deslocado em relação ao pico principal da MMT. Em comparação com a Lfampin, o T3 não apresentou nenhum pico que demonstrasse a interação com o peptídeo. Esse comportamento da Lfampin também foi observado na análise FTIR-ATR.

Ibrahim (2011) trabalhou com nanocompósito de amido + MMT e também verificou pico menor para os nanocompósitos, quando comparados somente com a MMT e sugeriu que, durante o processo de elaboração do nanocompósito, o amido seria capaz de penetrar entre as lamelas da argila, aumentando, assim, o espaçamento entre as lamelas (d-espacamento), denotando uma estrutura intercalada. Esse fato indica uma interação entre o amido e a MMT, assim como observado nas análises de permeabilidade ao vapor de água e de FTIR-ATR.

A diminuição do ângulo 2θ e o aumento do d-espacamento nos nanocompósitos de amido + MMT, quando comparados somente a MMT, também foram observados nos trabalhos de Slavutsky, Bertuzzi e Armada (2012) e Cyras et al. (2008). Estes últimos autores relataram que esse resultado deve indicar que o glicerol ou o amido, ou ambos, entraram nas camadas de silicato, formando um nanocompósito amido/MMT intercalado, sem atingir a completa esfoliação. De acordo com Park et al. (2002), esse fato pode ser devido às fortes interações polares entre o grupo hidroxila do amido e a camada de silicato da MMT.

3.3.4 Calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica

Na Tabela 6 podem ser visualizados os resultados das análises de DSC e TG, para os materiais (amido de milho, MMT e Lfampin) e para os compósitos e nanocompósitos (T1, T2 e T3). As amostras foram avaliadas no intuito de dar suporte aos resultados dos tratamentos elaborados.

Tabela 6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) – temperaturas de transição, mostrando as temperaturas de pico (T_p), temperatura inicial (T_o) e temperatura final (T_f); TG (análise termogravimétrica), mostrando as temperaturas iniciais de degradação (T_0), temperatura máxima de degradação (T_{max}) e a perda de massa (PM).

Amostra	DSC			TG					
	T_p	T_o	T_f	1º estágio			2º estágio		
				T_0	T_{max}	PM	T_0	T_{max}	PM
(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(%)	
Amido	97,52	28,30	150,33	40,65	63,08	10,606	311,52	336,22	77,872
MMT	103,89	26,06	148,93	46,27	56,62	14,960	---	---	---
Lfampin	92,00	33,12	129,90	222,67	312,68	87,755	---	---	---
T1	87,50	27,27	160,27	50,04	62,89	10,296	301,73	341,73	77,492
T2	85,42	32,74	128,61	48,61	80,74	10,735	291,43	344,66	73,882
T3	75,49	33,92	145,66	40,10	76,86	10,493	268,74	279,25	75,232

T1 = compósito de amido + glicerol; T2 = nanocompósito de amido + glicerol+MMT; T3 = nanocompósito de amido + glicerol + MMT + Lfampin; DSC = calorimetria diferencial de varredura; T_p = temperatura de pico da fusão; T_o = temperatura inicial da fusão; T_f = temperatura final da fusão; TG = análise termogravimétrica; T_0 = temperatura inicial de degradação; T_{max} = temperatura máxima de degradação; PM = perda de massa.

Em relação ao DSC, a adição da Lfampin diminuiu a temperatura do pico da fusão (gelatinização), para o T3. A T_f foi menor para o T2, com a adição da MMT ao compósito de amido. Liu et al. (2011) atribuíram essa diminuição à redução do tamanho dos cristais e à presença de imperfeições nos cristais,

devido à compatibilidade da MMT com o amido, a qual impediu a cristalinização, em que o silicato se opôs à reorganização das cadeias de amilose.

De acordo com Huang et al. (2004), a adição da MMT impediu a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas do amido, restringindo a cristalização.

A análise termogravimétrica foi utilizada para investigar a estabilidade térmica dos compósitos e dos nanocompósitos, fornecendo informações sobre a temperatura de degradação térmica. Foram considerados dois estágios para a TG, sendo o primeiro relacionado à perda de água e o segundo, à degradação (pirólise) dos materiais. A perda de massa dos compósitos e dos nanocompósitos, tanto para o 1º quanto para o 2º estágio, foi semelhante. A temperatura inicial (T_0) e máxima de degradação (T_{max}) do T3, para o 2º estágio, foi menor, em comparação aos outros tratamentos, ou seja, houve uma diminuição na resistência térmica dos nanocompósitos. Isso pode ter ocorrido devido à mudança que a Lfampin proporcionou nos nanocompósitos amido + MMT, como sugerido nos resultados de alongamento na ruptura e MEV.

No T2 foi detectada a maior temperatura de degradação nos dois estágios; dessa forma, a adição de MMT ao compósito de amido provocou aumento da estabilidade térmica. Esse comportamento também foi observado por Ibrahim (2011) e Schlemmer (2011), que trabalharam com nanocompósitos amido/MMT. No entanto, o primeiro autor relatou que esse aumento pode ser devido à MMT, que é um mineral inorgânico com alta estabilidade térmica e excelentes propriedades de barreira, podendo impedir que o calor transmita rapidamente e limite a contínua decomposição do nanocompósito. Já o último autor afirma que quanto maior o grau de delaminação, maior o aumento na resistência térmica. Esse fato corrobora a análise de raios X, em que foi detectado aumento no d-espacamento para os nanocompósitos de amido + MMT. De acordo com Slavutsky et al. (2014), o aumento da temperatura de pico em

todos os estágios da degradação nos nanocompósitos indica que a MMT apresenta dispersão homogênea na matriz.

Schlemmer (2011) sugere que o compósito que apresenta menor absorção de água e maior valor de estabilidade térmica indica um compósito com melhor interação polímero-argila, como verificado para o T2 no presente trabalho, conforme dados das Tabelas 3 e 6.

A adição de Lfampin em nanocompósitos amido + MMT (T3) proporcionou aumento na taxa de permeabilidade ao vapor de água e menor valor para alongamento na ruptura, quando comparado ao T2. Uma explicação para esse fato é que, mesmo a Lfampin não tendo sido detectada nas análises de FTIR-ATR e raios X, ela teria aumentado a hidrofiliabilidade na matriz, devido aos grupos hidroxilas presentes na estrutura da Lfampin (Figura 2), possibilitando a formação de uma estrutura frágil, menos compacta, com aspecto poroso, como observado no MEV, aumentando, assim, a permeabilidade.

Vale ressaltar que, apesar de a Lfampin não ter sido detectada em algumas caracterizações realizadas, devido à metodologia de análise utilizada é possível que tenha ocorrido interação, pois algumas propriedades avaliadas foram alteradas, sugerindo que esse peptídeo tenha participado das reações que envolvem a elaboração dos nanocompósitos.

4 CONCLUSÃO

Dentre os tempos avaliados, 15 minutos de sonicação é o melhor para promover a incorporação da MMT na matriz amido + glicerol. A intercalação da MMT na matriz (T2) melhora a taxa de permeabilidade ao vapor de água e as propriedades térmicas, diminuindo a permeabilidade e aumentando a estabilidade térmica. Nas condições que foi realizado o trabalho, a adição da Lfampin não foi detectada nos nanocompósitos (T3), porém, altera as propriedades óticas, morfológicas e térmicas, alterando a coloração do nanocompósito, com maior saturação de cor e menor tonalidade, morfologia com aspecto poroso, menor T_p (temperatura de pico da fusão) e diminuição na estabilidade térmica.

REFERÊNCIAS

AMERICAN STANDART TESTING AND MATERIAL - ASTM. Designation E 398 – 03: Standard Test Method for Water Vapor Transmission Rate of Sheet Materials Using Dynamic Relative Humidity Measurement. In **Annual Book of ASTM Standards**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2003.

BENGTSSON, M.; KOCH, K.; GATENHOLM, P. Surface octanoylation of high-amylose potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2003.

CHAUDHARY, D.; LIU, H. Ultrasonic treatment and synthesis of sugar alcohol modified Na⁺-montmorillonite Clay. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 63–68, 2013.

CHUNG, Y. L., et al. Preparation and properties of biodegradable starch–clay nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 391–396, 2010.

CYRAS, V. P., et al. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 55–63, 2008.

FABIAN, H., et al. Secondary structure and temperature-induced unfolding and refolding of ribonuclease T₁ in aqueous solution: A fourier transform infrared spectroscopic study. **Journal of Molecular Biology**, v. 232, n. 3, p. 967-981, 1993.

FARIA, F. de O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 487-492, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Universidade Federal de Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

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

HENRIQUE, C. M., CEREDA, M. P., E SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.

HUANG, M-F; YU, J-G; MA, X-F. Studies on the properties of Montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites. **Polymer**, 45, p. 7017–7023, 2004.

HUSSAIN, F., et al. Review article: polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: an overview. **Journal of Composite Materials**, v. 40, n. 17, 2006

IBRAHIM, S. M. Characterization, Mechanical, and Thermal Properties of Gamma Irradiated Starch Films Reinforced with Mineral Clay. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 685–692, 2011.

KAMPEERAPPUN, P., et al. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 155–163, 2007.

LENGOWSKI, E. C. **Caracterização e predição da cristalinidade de celulose por meio de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada**. 2012. 108p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LISBÔA, M. P. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo**. 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2006.

LIU, H., et al. Glycerol/starch/Na⁺-montmorillonite nanocomposites: A XRD, FTIR, DSC and ¹H NMR study. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1591–1597, 2011.

LIU, T., et al. Modifications of structure and physicochemical properties of maize starch by γ -irradiation treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 156-163, 2012.

MAGALHÃES, N. F. de. **Bioplásticos nanoestruturados de amido de milho e argilas**. 2008. 212p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MALI, S., et al. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 379–386, 2002.

MORAES, J. O. de. **Propriedades de filmes de amido incorporados de nanoargilas e fibras de celulose**. 2009.75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MORAIS, J. P. S., et al. Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton linter. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 229-235, 2013.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 605–610, 2011.

PARK, H. M., et al. Preparation and Properties of Biodegradable Thermoplastic Starch/Clay Hybrids. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 287, p. 553–558, 2002.

SILVA, G.; SILVA, A. M. A. D.; FERREIRA, M. P. DE B. **Processamento do leite**. Recife: EDUFRPE, 2012. 167 p.

SLAVUTSKY, A. M., et al. Preparation and characterization of montmorillonite/brea gum nanocomposites films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 270-278, 2014.

SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A.; ARMADA, M. Water barrier properties of starch-clay nanocomposite films. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 15, n. 3, p. 208-218, jul./set. 2012.

SCHLEMMER, D. **Estudo das propriedades de nanocompósitos amido/montmorilonita, utilizando óleos vegetais como plastificantes**. 2011. 160p. Tese (Doutorado em Química – Laboratório de Pesquisa em Polímeros). Universidade de Brasília – UNB, Brasília, 2011.

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência e Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

VAN DER KRAAN, M. I. A., et al. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. **Peptides**, v. 25, p. 177–183, 2004.

ARTIGO 2**Efeito de nanocompósitos de amido de milho + glicerol + MMT +
lactoferrampina bovina na qualidade microbiológica de
mandioquinha-salsa**

J.S. Alves ^{a,*}, N.A. Lira ^a, N.A.A. Dias ^a, K.C. Reis ^b, R.H. Piccoli ^a, L.R.
Batista ^a, J. Pereira ^a

^a Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

^b Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

RESUMO

A mandioquinha-salsa é uma raiz nobre com baixa vida útil pós-colheita. O revestimento dessa raiz com solução filmogênica (gel) a partir de polissacarídeos, proteínas, lipídeos e derivados, incorporados com agente antimicrobiano, pode proporcionar aumento na conservação pós-colheita. Os objetivos, neste trabalho, foram: incorporar a Lfampin nos compósitos e medir a ação antifúngica por meio do teste de halo; quantificar a concentração mínima inibitória (CMI) do peptídeo a bactérias e avaliar a ação antibacteriana nas mandioquinhas-salsa revestidas com o gel, armazenadas à temperatura ambiente. Para os fungos *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* e *Penicillium roqueforti* foi realizado o teste de difusão em ágar, nos compósitos de amido incorporados com Lfampin em diferentes concentrações ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$, $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, $174 \mu\text{g mL}^{-1}$, $348 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1.740 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3.480 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, para as bactérias, foi realizada a CMI de *Pectobacterium chrysanthemi* (halo de inibição com 10% de peptídeo, 7,6 mm de diâmetro), *P. caratovora* (halo de inibição com 10% de peptídeo, 7,5 mm de diâmetro e 5%, 7,1 mm de diâmetro) e *Escherichia coli* (halo de inibição com 10% de peptídeo, 8,1 mm de diâmetro; 5%, 7,4 mm de diâmetro e 2,5%, 7,2 mm de diâmetro) e verificada a ação antibacteriana da Lfampin nas mandioquinhas-salsa revestidas. Nas condições em que foi realizado este experimento, a Lfampin não apresentou ação antifúngica e apresentou baixa eficiência antibacteriana para os microrganismos estudados.

Palavras-chave: Batata-baroa. “Amarela de Senador Amaral”. Lfampin. Montmorilonita. Peptídeo antimicrobiano.

1 INTRODUÇÃO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) é conhecida por diversos nomes, como batata-baroa, batata-cenoura, cenoura-amarela e batata-fiúza, entre outros. No Brasil, a mandioquinha-salsa é cultivada e consumida, principalmente, nas regiões sudeste e sul.

As mandioquinhas-salsa são consideradas nobres, porém, são frágeis, sendo suscetíveis a doenças e a fermentos na pós-colheita. Com isso, cada vez mais estudos relacionados à extensão da sua vida útil tornam-se necessários.

A microbiota dos alimentos, em geral, é associada com os microrganismos presentes no alimento cru ou *in natura*, bem como aqueles contaminantes que ocorrem durante o manuseio, o processamento e dos sobreviventes aos tratamentos de preservação, os quais permanecem durante o armazenamento dos produtos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os microrganismos são considerados “deteriorantes” quando se desenvolvem no alimento, obtendo energia a partir dos componentes básicos desse alimento. São considerados “patogênicos” quando, sob determinadas condições, produzem substâncias tóxicas (toxinas) que causam danos ao vegetal ou à saúde do consumidor, por promoverem intoxicações (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Assim como outras hortaliças, a mandioquinha-salsa está sujeita às deteriorações provocadas por bactérias, fungos, nematoides e vírus (SOUSA, 2014).

De acordo com pesquisador Nuno Madeira, da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF), a cultura da mandioquinha-salsa apresenta potencial produtivo de 40 a 50 toneladas por hectare, mas a média brasileira situa-se em torno de 10 t ha⁻¹ a 12 t ha⁻¹ (MACEDO, 2012). A maior causa da alta perecibilidade desta

raiz está relacionada com a perda de massa fresca por transpiração e a deterioração causada por microrganismos (SOARES et al., 2007).

Henz, Reifschneider e Duarte (2006), em trabalho com bactéria pectolítica envolvida na “mela” da mandioquinha-salsa no Brasil, de 1998 a 2001, encontraram 227 isolados de *Erwinia* spp., tendo 89,9% deles sido identificados como *E. chrysanthemi*, 9,7% como *E. carotovora* e somente 0,5% como *E. carotovora* subsp. *atroseptica*.

De acordo com Mariano et al. (2005), as bactérias fitopatogênicas pectinolíticas são patógenos radiculares e induzem sintomas de murcha, podridão-mole, canela-preta, talo-oco e tombamento de plântulas. Os gêneros dessas bactérias são conhecidos como *Erwinia*, *Pectobacterium* e *Dickeya*. Em trabalho referente a bactérias fitopatogênicas pectinolíticas, os mesmos autores relatam a controversa taxonômica e de nomenclatura referentes a esses gêneros.

De acordo com Santos et al. (2000), o principal agente causal da podridão-mole são as bactérias do gênero *Erwinia*, principalmente na pós-colheita. Os sintomas iniciais da doença são depressões de aspecto encharcado nas raízes, causando posterior decomposição dos tecidos. São ditas podridão-mole, apresentando odor característico extremamente desagradável, não exatamente pelo ataque da *Erwinia*, mas pela ação de microrganismos decompositores associados ao seu ataque (MADEIRA; SOUZA, 2004).

Henz et al. (2005), em trabalho sobre danos causados pelo impacto de queda na qualidade pós-colheita de raízes de mandioquinhas-salsa, a maior incidência de deterioração naquelas que foram injuriadas mecanicamente era esperada, uma vez que muitos patógenos pós-colheita são dependentes de portas de entrada para iniciar a infecção, principalmente doenças causadas por fungos.

Compósitos antimicrobianos para embalagens podem fornecer um obstáculo a mais por meio de um cenário de liberação controlada. Há duas categorias gerais de compósitos antimicrobianos, aquela em que o agente

antimicrobiano migra do compósito e aquela em que o agente permanece dentro do material do compósito. Devido à natureza do alimento, se o antimicrobiano não migra do compósito, pelo menos na superfície do alimento, terá efeito limitado (DAWSPM et al., 2005).

Testes de suscetibilidade em microrganismo são utilizados para verificar a eficiência ou não de agente antimicrobiano. Difusão em ágar é um dos métodos que permitem quantificar a migração do antimicrobiano, por meio da formação do halo de inibição, que é a região onde o microrganismo não cresce.

No método da difusão em ágar, um disco de papel impregnado com uma quantidade conhecida de agente antimicrobiano é colocado na superfície de meio de cultura sólido apropriado contido numa placa de Petri e previamente inoculado com o microrganismo a testar. Durante a incubação da placa de Petri a uma temperatura adequada para o crescimento do microrganismo teste, o agente antimicrobiano é difundido do disco de papel para o meio sólido. A certa distância do disco, o valor de CMI é atingido. Um halo (zona transparente) de inibição é formado em volta do disco, onde não crescem colônias do microrganismo. Assim, após 24 a 48 horas de incubação, é medido o diâmetro do halo de inibição formado à volta do disco. O diâmetro do halo de inibição é proporcional à quantidade de agente antimicrobiano presente no disco, à solubilidade do agente, ao coeficiente de difusão no meio de cultura sólido e à eficácia global do agente antimicrobiano (QUANTIFICAÇÃO..., 2005).

A CMI é a concentração do agente antimicrobiano mais baixa que impede um determinado isolado bacteriano de se multiplicar e reproduzir. A concentração é determinada incubando-se uma quantidade conhecida de bactérias com diluições especificadas do agente antimicrobiano. Os testes de CMI podem ser realizados utilizando-se caldo ou ágar (STEPHEN et al., 2005).

A escala nefelométrica de MC Farland (NEFELOBAC) é um dos métodos utilizados para padronizar a quantidade de microrganismo utilizado nos

testes de suscetibilidade. De acordo com o fabricante (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.), essa escala é o padrão de turvação para determinar a intensidade da multiplicação bacteriana em meios de cultivo líquidos. Esta multiplicação se manifesta nos meios de cultivo líquidos por um aumento das partículas (bactérias) que se opõem à livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura. O NEFELOBAC é preparado de acordo com a fórmula nefelométrica de MC Farland, que consiste em uma série de 11 tubos numerados de 0.5 a 10, com diferentes quantidades de cloreto de bário e ácido sulfúrico, para se obter diferentes concentrações de sulfato de bário, que correspondem a diferentes contagens bacterianas. Assim, o tubo nº 0.5 corresponde a 150 milhões de bactérias por mL de meio e o tubo nº 10 corresponde a 3 bilhões por mL de meio.

Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos clássicos, muitos microrganismos adquiriram resistência ao longo do tempo. Portanto, a utilização de peptídeos antimicrobianos vem sendo estudada como ferramenta importante para a diminuição dessa resistência.

Estes peptídeos antimicrobianos consistem de cadeias curtas de aminoácidos hidrofóbicos e com carga positiva, permitindo-lhes alterar a bicamada lipídica dos microrganismos, devido à perda de íons e de substâncias metabólicas, o leva à morte celular (DAWSPM et al., 2005).

A lactoferrina é uma proteína presente na ligação de ferro em fluidos biológicos de muitos mamíferos, como lágrimas, saliva e leite, amplamente investigados devido às suas múltiplas atividades. A atividade antimicrobiana direta da lactoferrina afetando a parede celular das bactérias, ocorre devido a dois peptídeos antimicrobianos de uma parte N-terminal da cadeia de aminoácidos da proteína, chamada lactoferricina e lactoferrampina (PAWLIK et al., 2009).

Um aspecto importante ao determinar o modo de ação empregado por um peptídeo antimicrobiano é estudar a sua capacidade de interagir com as membranas (HANEY et al., 2007).

Os resultados encontrados por Haney et al. (2012) definem claramente as contribuições para o modo de ação antimicrobiano das lactoferrampinas. De acordo com os autores, o modelo proposto de atividade antimicrobiana para lactoferrampina bovina (Lfampin), em que os cátions da região C-terminal participam da atração eletrostática à superfície bacteriana carregando-a negativamente, seguida pela inserção N-terminal na bicamada, ainda é válido. Porém, as grandes cadeias laterais hidrofóbicas do Trp (triptofano) 268 e da Phe (fenilalanina) 278 são importantes porque ancoram o peptídeo na superfície de uma membrana. A Phe 278 contribui com uma parte significativa da força de interação entre o peptídeo e as membranas, carregando-as negativamente, e o Trp 268 é, em grande parte, responsável pela profundidade de penetração do peptídeo no núcleo hidrofóbico de uma bicamada. Os autores ressaltam que a flexibilidade na região C-terminal não é essencial para a atividade antimicrobiana da lactoferrampina bovina, mas esta flexibilidade pode contribuir para a diminuição da atividade hemolítica desse peptídeo.

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de desenvolver compósito ativo incorporado com Lfampin, medir a ação antifúngica dos compósitos por meio do teste de halo (teste de difusão em ágar), quantificar a concentração mínima inibitória (CMI) do agente antimicrobiano para as bactérias em estudo e, por último, avaliar a ação antibacteriana em mandioquinha-salsa cultivar Amarela de Senador Amaral revestidas com solução filmogênica, armazenada à temperatura ambiente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em quatro etapas que foram:

- 1^a) elaboração dos compósitos amido + glicerol + Lfampin (em diferentes concentrações);
- 2^a) estudo do efeito antimicrobiano dos compósitos amido + glicerol + Lfampin nos fungos avaliados;
- 3^a) avaliação da CMI da Lfampin em bactérias;
- 4^a) avaliação do efeito antibacteriano nas mandioquinhas-salsa revestidas com solução filmogênica contendo amido + glicerol e, ou MMT ou Lfampin.

2.1 Materiais

O amido de milho foi fornecido pela Corn Products Brazil S.A.; o glicerol foi obtido da Vetec Química Fina Ltda. (São Paulo, Brasil); a MMT (Cloisite[®] – nanofil 116) foi fornecida pela Southem Clay Products, Inc. (Gonzales, TX) e a Lfampin (aminoácidos 268-284, cuja sequência é WKLLSKAQEKFGKNKSR e pureza 95%), foi obtida na empresa GenScript USA Inc. (Shangai, China). Água destilada foi utilizada como solvente.

As mandioquinhas-salsa ‘Amarela de Senador Amaral’ foram adquiridas na Ceasa do município de Contagem, MG, um dia depois de colhidas. Em seguida, as mandioquinhas-salsa foram selecionadas (por tamanho e ausência de injúrias), lavadas em água corrente e sanitizadas com solução de 100 mg L⁻¹ de hipoclorito de sódio, por dez minutos. As mandioquinhas-salsa foram secas com auxílio de secador com jato de ar frio.

2.2 Elaboração dos compósitos

Foram elaborados compósitos com 3% de amido de milho (3g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + diferentes concentrações de Lfampin + água destilada (completou para 100 mL). As concentrações de Lfampin utilizadas foram: 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0,09% em relação à matriz – amido + glicerol); 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0,18% em relação à matriz – amido + glicerol); 174 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0,5% em relação à matriz – amido + glicerol); 348 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1,0% em relação à matriz – amido + glicerol); 1.740 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (5,0% em relação à matriz – amido + glicerol) e 3.480 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (10,0% em relação à matriz – amido + glicerol).

Foi feita uma solução por meio da dispersão matriz amido de milho + glicerol + água destilada. A solução foi mantida em agitação constante e aquecimento até 75 °C. O peptídeo (Lfampin) foi acrescentado após a formação do gel, na temperatura entre 35 °C e 40 °C, sob agitação constante, por uma hora.

Posteriormente, o gel (solução filmogênica) foi vertido em placas de poliestireno e acondicionado em estufa umidificadora com circulação de ar constante (model 435314, Hotpack, EUA), a 25 °C e 50% UR, para a perfeita secagem dos compósitos. Depois de secos, eles foram retirados das placas e acondicionados em dessecador contendo solução salina saturada (NaCl), a 75% de UR, para aplicações posteriores.

2.3 Estudo do efeito antimicrobiano dos compósitos nos fungos avaliados

Foram utilizados três fungos, sendo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, provenientes da Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) e *Penicillium roqueforti*, extraído de queijo comercial tipo gorgonzola.

Os fungos foram cultivados em meio de cultura ágar extrato de levedura Czapeck (CYA), por 7 dias, a 25 °C, em câmara de crescimento. Depois, o fungo do gênero *Penicillium* foi repicado em meio de cultura específico para identificação (malte extrato de ágar, MEA) e incubado por 7 dias, a 25 °C, em câmara de crescimento. Posteriormente, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas do fungo e, por meio da chave de identificação (PITT, 2000), foi confirmada a espécie.

Depois dos três fungos repicados, os isolados a serem testados foram transferidos para placas contendo o meio de cultura ágar Czapeck e incubados, a 25 °C, por 7 dias, em câmara de crescimento. A suspensão de esporos de cada fungo foi preparada em água destilada estéril contendo 0,1% de Tween 80. A câmara de Neubauer foi utilizada para a determinação da concentração final de esporos (10^6 a 10^9 esporos mL^{-1} valor aceitável). A concentração de esporos foi padronizada, sendo 10^7 esporos mL^{-1} para *Aspergillus flavus* e *A. ochraceus*, e 10^8 esporos mL^{-1} para *Penicillium roqueforti*.

As etapas da metodologia utilizada no experimento, para cada fungo, estão representadas na Figura 1.

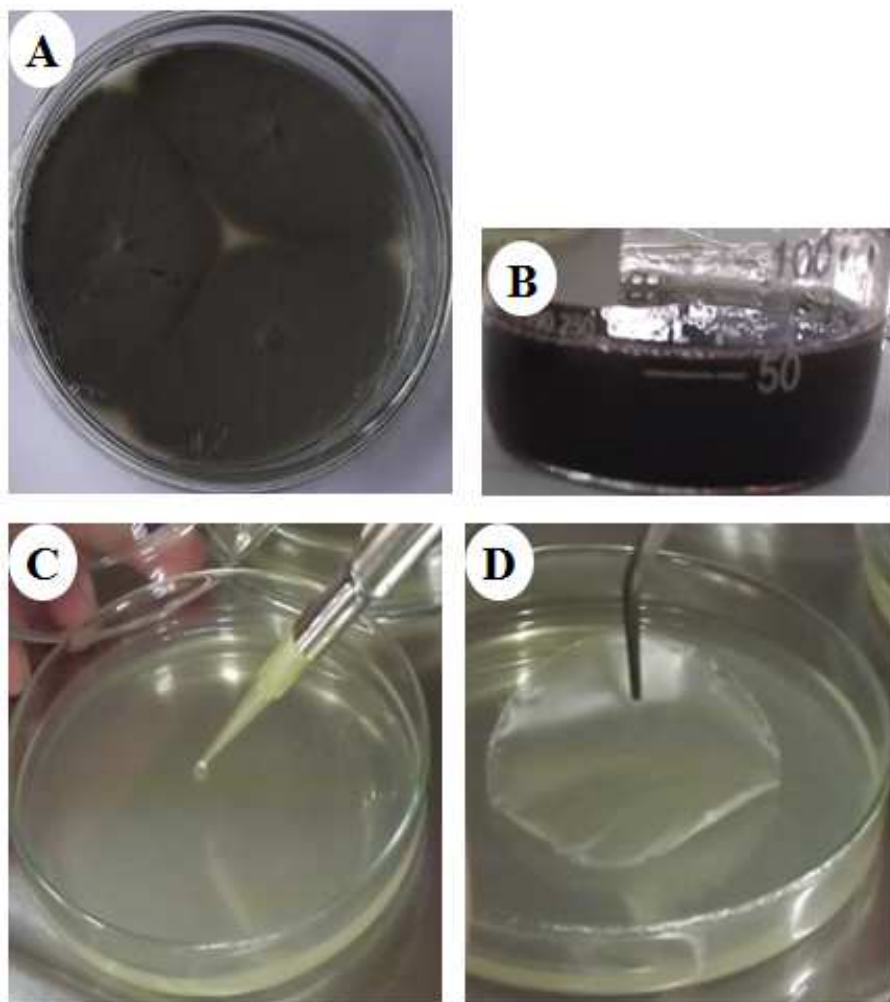


Figura 1 Fotografias das etapas dos ensaios de atividade antifúngica, sendo: A = placa com colônia de *Penicillium roqueforti*; B = suspensão de esporos fúngicos com 10^8 esporos/mL; C = deposição de $10 \mu\text{L}$ da suspensão de esporos fúngicos no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura Mueller Hinton Agar (M-H Agar); D = deposição de composto contendo peptídeo sendo colocado sobre os $10 \mu\text{L}$ da suspensão de esporos fúngicos.

Para cada fungo foram utilizados $10 \mu\text{L}$ da suspensão de esporos no centro da placa de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo o meio de cultura M-H Agar. Posteriormente, foi colocado, em cima da suspensão de esporos, o

compósito, com 4,5 cm de diâmetro. Foram testadas duas concentrações por vez e foi verificado, por meio do teste de halo, se o compósito foi ativo ou não. As análises foram realizadas em duplicata. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, por 7 dias, a 25 °C.

Além dos compósitos, foi testado o gel com 3.480 µg mL⁻¹ de peptídeo, ou seja, 10,0% em relação à matriz.

2.4 Avaliação da CMI da Lfampin em bactérias

Foram utilizadas três bactérias não enteropatogênicas: *Pectobacterium chrysanthemi* e *Pectobacterium carotovora*, ambas isoladas da mandioquinha-salsa e pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA, e a cepa *Escherichia coli* (ATCC 31619).

Primeiramente, foi realizada a cultura estoque por meio do ágar inclinado e meio de congelamento (15 mL de glicerol, 0,5 g de peptona bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 100 mL de água destilada). As cepas foram armazenadas a -18 °C. Para a realização do experimento foram realizadas repicagens para a manutenção das culturas viáveis.

A CMI foi realizada com 12 concentrações do peptídeo lactoferrampina bovina, sendo elas: 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,313%, 0,156%, 0,078%, 0,039%, 0,020%, 0,010% e 0,005%, mais uma concentração controle com o cloranfenicol (antibiótico), totalizando 13 concentrações. A metodologia utilizada para a CMI foi de acordo com Stephen et al. (2005).

Para realização do CMI foi feito o cultivo das bactérias por meio do caldo Brain Heart Infusion (BHI) para *E. coli* e caldo Meio 523 de Kado e Heskett (1970) sem ágar (sacarose (10 g), extrato de levedura (4,0 g), caseína ácida hidrolisada (8,0 g), K₂HPO₄ (anidro) (2,0 g), MgSO₄ (0,3 g), ágar (17,0 g)

e H₂O (.1000 mL)), para *Pectobacterium chrysanthemi* e *P. carotovora*. A *E. coli* foi incubada, a 37 °C, por 24 horas, em câmara de crescimento e as *Pectobacterium* foram incubadas, a 28 °C, por 24 horas, em câmara de crescimento. Após esse período, as bactérias foram repicadas em ágar inclinado, para *E. coli* ágar TSA (Tryptone Soya Agar) e, para *Pectobacterium*, o Meio 523 de Kado e Heskett (1970) e novamente incubadas em câmara de crescimento, a 37 °C e 28 °C, respectivamente, por 24 horas.

Para a padronização da concentração de bactéria foi utilizada a escala nefelométrica de MC Farland, padrão 4,0 (10⁹ UFC mL⁻¹) (Kit MC Farland 0,5 até 10 – Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.). Para cada bactéria, com o auxílio da alça de platina, foi retirado o inóculo do tubo inclinado e colocado em 40 mL de água peptonada estéril. Homogeneizou-se formando uma suspensão e esta foi ajustada até a sua turbidez coincidir com a da suspensão padrão. Dessa concentração retiraram-se 30 mL e acrescentaram-se em 300 mL de ágar fundido. Depois, homogeneizou-se e colocou-se em placas de Petri estéreis com diâmetro de 15 cm. Após solidificação do meio, foram colocados, em cada placa, 13 discos estéreis de papel filtro com 0,6 cm de diâmetro, aleatoriamente. Em cada papel filtro foram adicionados 100 µL de cada concentração da Lfampin, incluindo o antibiótico e as placas foram levadas para incubar em câmara de crescimento, nas temperaturas de acordo com cada bactéria, por 24 horas. O CMI foi realizado em triplicata. Do frasco contendo água peptonada mais o inóculo foi retirado 1 mL e acrescentado em tubo com 9 mL de água peptonada e foram feitas sucessivas diluições 10⁻¹ a 10⁻⁹. A partir da diluição 10⁻⁵ até 10⁻⁹ foram plaqueadas em duplicata. No intuito de confirmar a concentração do inóculo utilizado no CMI, incubou-se em câmara de crescimento nas temperaturas de acordo com cada bactéria, por 24 horas, e contabilizou-se a unidade formadora de colônia (UFC) em cada diluição, as quais foram transformadas em Log UFC g⁻¹. Após a incubação, os halos

formados para a CMI foram medidos com o auxílio de um paquímetro e aferiu-se o diâmetro (mm).

2.5 Avaliação do efeito antibacteriano nas mandioquinhas-salsa revestidas

Depois da determinação da CMI, foi realizada a inoculação de cada bactéria na superfície da mandioquinha-salsa sanitizada por meio da suspensão contendo inóculo e água peptonada estéril. Novamente, a turbidez foi ajustada com a escala de MC Farland, padrão 4,0. Dentro da câmara de fluxo laminar (Labconco Corporation, modelo 36212/36213 Tipo A/B3, EUA), as mandioquinhas-salsa foram imersas nesta suspensão, com o auxílio de um pegador universal estéril e, em seguida, transferidas para potes de polipropileno estéril. As mandioquinhas foram incubadas em câmara de crescimento, a 25 °C, por 24 horas.

De acordo com Henz et al. (2005), é provável que a bactéria responsável pela podridão-mole venha do campo e permaneça latente nas lenticelas das raízes, iniciando a doença sob condição favorável, como temperaturas acima de 20 °C e umidade relativa acima de 75%. Mesmo assim, foi realizada a inoculação das bactérias nas mandioquinhas-salsa.

Após as 24 horas, as mandioquinhas-salsa inoculadas foram revestidas com géis elaborados, utilizando-se os seguintes materiais: amido de milho, glicerol, MMT, Lfampin e água destilada.

As concentrações utilizadas neste experimento foram determinadas mediante pré-teste, sendo estas calculadas em relação à matriz amido.

Foram considerados cinco tratamentos, sendo eles:

Tratamento 1 (T1) – raiz sem revestimento

Tratamento 2 (T2) – raiz revestida com gel (3% de amido de milho (3 g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + água destilada (completou-se para 100 mL)).

Tratamento 3 (T3) – raiz revestida com gel (3% de amido de milho (3 g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + 5% de MMT (0,15 g) + água destilada (completou-se para 100 mL)).

Tratamento 4 (T 4) – raiz revestida com gel (3% de amido de milho (3 g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + 5% de MMT (0,15 g) + 10% de Lfampin (0,3 g) + água destilada (completou-se para 100 mL)).

Tratamento 5 (T5) – raiz não inoculada e revestida com gel (3% de amido de milho (3 g) + 20% de glicerol (0,48 mL) + 5% de MMT (0,15 g) + água destilada (completou-se para 100 mL)).

Os géis foram elaborados conforme item 2.2. O tratamento T5 foi utilizado apenas para comparação visual.

A seguir, as mandioquinhas-salsa revestidas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno estéril e armazenadas em uma sala higienizada e em condições ambientais. A temperatura e a umidade relativa no período do experimento variaram de 20,9 °C a 28,9 °C e de 49% a 77% U.R. O experimento foi avaliado por oito dias, sendo as análises realizadas de quatro em quatro dias (tempo zero, tempo 4 e tempo 8).

Em cada dia de análise foram pesados 10 g do produto e adicionados, em saco stomacher estéril, 90 mL de água peptonada estéril, colocando-se no homogeneizador digital tipo *Stomacher* (Metroterm, modelo 1204M, Brasil), por 5 minutos, a 490 golpes por minuto. Dessa suspensão retirou-se 1 mL, acrescentou-se em tubo de ensaio com 9 mL de água peptonada e foram realizadas sucessivas diluições 10^{-1} a 10^{-9} , as quais foram plaqueadas em duplicata, no intuito de contabilizar a concentração do inoculo. Incubou-se em câmara de crescimento, nas temperaturas de acordo com cada bactéria, por 24

horas, e contabilizou-se a UFC em cada diluição, transformando-as, posteriormente, em ciclos logarítmicos (Log UFC/g).

As avaliações microbiológicas foram realizadas de acordo com o Manual of Methods Analysis of Foods – Microbiological Testing (FSSAI, 2012).

2.6 Análise estatística

Para verificar a proximidade dos valores com a média entre eles, referente aos resultados Log UFC/g das mandioquinhas-salsa inoculadas e revestidas, foi utilizado o desvio padrão. Foram feitas três repetições para cada tratamento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a inoculação dos esporos de cada fungo no centro da placa de Petri, contendo o meio de cultura M-H Agar, adicionados dos compósitos e do gel incorporados com Lfampin, estão apresentados na Figura 2. Não foi observada nenhuma formação do halo de inibição nas concentrações estudadas. Como não houve efeito antimicrobiano para os fungos e os resultados foram semelhantes, na figura está representado o resultado apenas para *Penicillium*.

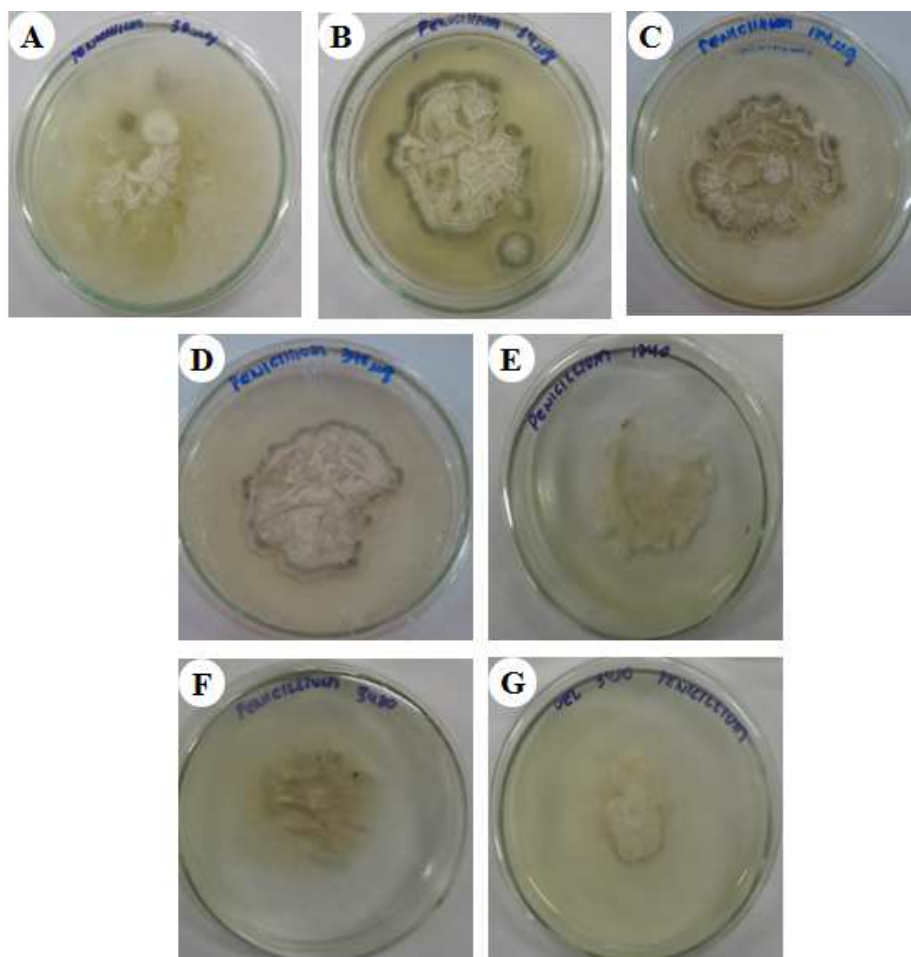


Figura 2 Fotografias dos resultados da atividade antifúngica do *Penicillium roqueforti*, sendo: A = compósito com $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo, ou seja, 0,09% em relação à matriz; B = compósito com $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo, ou seja, 0,18% em relação à matriz; C = compósito com $174 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo, ou seja, 0,5% em relação à matriz; D = compósito com $348 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo, ou seja, 1,0% em relação à matriz; E = compósito com $1740 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo, ou seja, 5,0% em relação à matriz; F = compósito com $3.480 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo, ou seja, 10,0% em relação à matriz; G = solução filmogênica com $3.480 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo, ou seja, 10,0% em relação à matriz.

Bellamy et al. (1994) verificaram as propriedades antifúngicas da lactoferricina B, um peptídeo derivado da região N-terminal da lactoferrina

bovina e as concentrações efetivas variaram entre $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, dependendo da estirpe e da cultura utilizada. Como exemplo para os fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* JCM 1917, *A. niger* JCM 5546, *Penicillium pinophilum* JCM 5593 e *P. vermiculatum* JCM 5595, os autores encontraram $45 \mu\text{g mL}^{-1}$, $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CMI, respectivamente.

Lactoferrampina bovina e lactoferricina bovina são dois peptídeos antimicrobianos localizados no domínio N1 da lactoferrina bovina. De acordo com Tang et al. (2012), a atividade bactericida do peptídeo em conjunto (lactoferrampina+lactoferricina bovina) é mais forte do que separado. Em seu trabalho com expressão, purificação e atividade antibacteriana, foram encontrados $158,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CMI, para o fungo *Candida albicans* CMCC98001 e $19,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CMI, para a bactéria gram-negativa *E. coli* 0149.

Guiga et al. (2010) trabalharam com compósitos incorporados com nisina e obtiveram atividade antibacteriana. Vale ressaltar que os compósitos com nisina foram colocados em contato com o ágar, por 4 horas a 4°C , antes da adição do inóculo (*Kocuria rhizophila*), com a finalidade de permitir o processo de migração da nisina para o meio. Esse fato pode ser uma das causas da não formação do halo de inibição com os três fungos estudados neste presente trabalho, já que não foi realizada a CMI.

Na avaliação dos resultados (CMI) da atividade antibacteriana por meio do teste de difusão com discos em meio sólido, a Lfampin e o cloranfenicol (antibiótico) apresentaram halo de inibição (Figura 3).

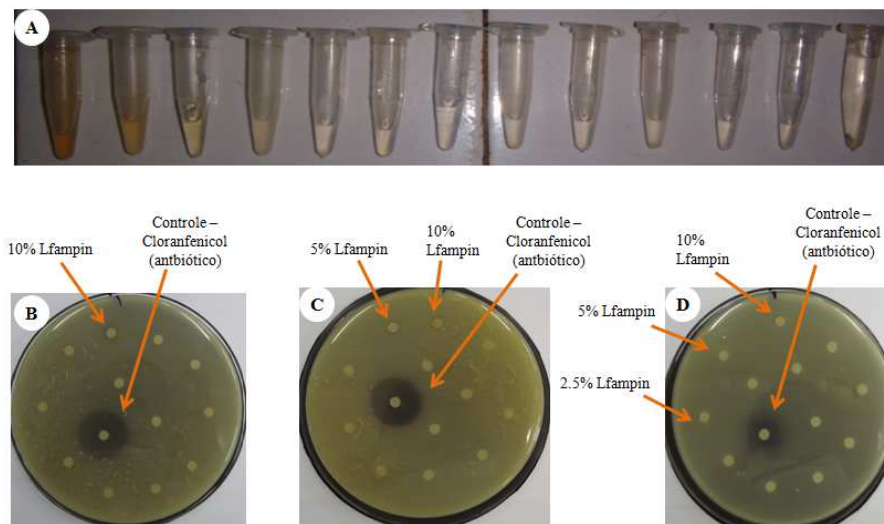


Figura 3 CMI do peptídeo (Lfampin bovina) em relação as bactérias, sendo: A = diferentes concentrações do peptídeo (da esquerda para direita) 10% ($3.480 \mu\text{g mL}^{-1}$), 5% ($1.740 \mu\text{g mL}^{-1}$), 2,5% ($870 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1,25% ($435 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,625% ($2.17,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,313% ($108,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,156% ($54,4 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,078% ($27,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,039% ($13,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,020% ($6,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,010% ($3,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 0,005% ($1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$), mais uma concentração controle com cloranfenicol (antibiótico), totalizando 13 concentrações, que foram calculadas em relação à matriz; B = halos de inibição da *Pectobacterium chrysanthemi*; C = halos de inibição da *Pectobacterium carotovora* e D = halos de inibição da *Escherichia coli*.

Na Figura 4 está representada a quantidade de bactérias, em ciclo logarítmico, utilizadas para a realização do CMI, em cada repetição.

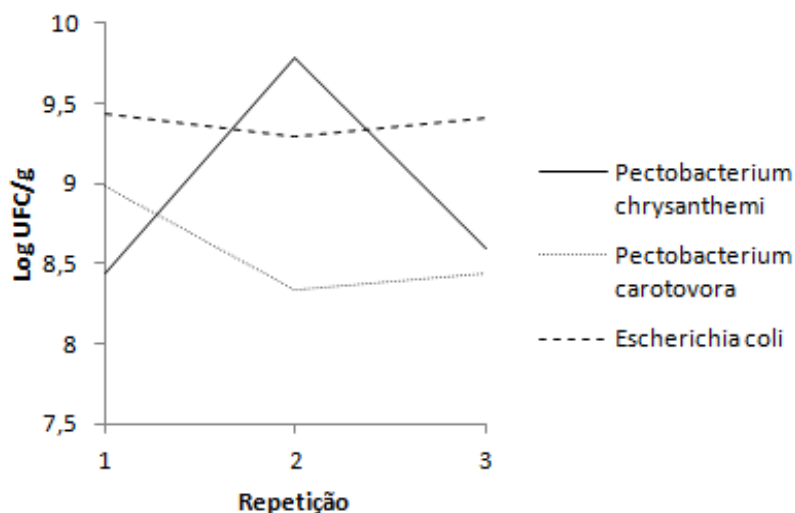


Figura 4 Quantidade (Log UFC/g) de bactérias que foram utilizadas na realização do CMI, para cada repetição.

Pela CMI (Tabela 1) pode-se verificar que o peptídeo teve maior eficácia contra a *Escherichia coli*, na concentração de 2,5% ($870 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo em solução), seguida por *Pectobacterium carotovora*, na concentração de 5% ($1.740 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo em solução) e, por último, *Pectobacterium chrysanthemi*, na concentração de 10% ($3.480 \mu\text{g mL}^{-1}$ de peptídeo em solução). O valor encontrado de CMI para *E.coli*, neste trabalho, é superior ao encontrado por Tang et al. (2012) ($19,8 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Para o revestimento das mandioquinhas-salsa com a solução filmogênica, foi considerada a menor concentração da Lfampin, que inibiu completamente o crescimento das três bactérias em conjunto, conforme Tabela 1.

Tabela 1 Concentração mínima inibitória (CMI) e valor médio* do halo de inibição para as bactérias utilizadas no experimento.

CMI	Halo de inibição (Ø, mm)		
	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	<i>Pectobacterium carotovora</i>	<i>Escherichia coli</i>
2,5%	---	---	7,2±0,06
5,0%	---	7,1±0,00	7,4±0,25
10,0%	7,6±0,25	7,5±0,06	8,1±0,44
Cloranfenicol (Controle)	29,4±0,85	28,8±0,21	20,9±0,44

*Média de 3 repetições.

As análises foram realizadas até o tempo de 4 dias, pois as raízes de mandioquinhas-salsa já se apresentavam impróprias para o consumo, com sinais de podridão e odor desagradável. Na Figura 5 estão representadas as fotografias do processo de sanitização e inoculação das bactérias nas mandioquinhas-salsa, além das mandioquinhas-salsa inoculadas e não inoculadas, revestidas com a solução filmogênica, conforme os tratamentos e armazenadas até o 4º dia de análise. A Figura 5 Ω representa a mandioquinha-salsa não inoculada no 4º dia de armazenamento. Visualmente, quando comparada com as demais mandioquinhas-salsa inoculadas e com o mesmo tempo de armazenamento, torna-se possível verificar que esta apresentou aspecto melhor, sem sinais de podridão e odor desagradável.

Henz et al. (2005), em experimento com danos físicos (quebras, rachaduras, rupturas, lesões superficiais) causados pelo impacto de queda na qualidade pós-colheita de raízes de mandioquinhas-salsa, tiveram sua conservação pós-colheita comprometida, com problemas de deterioração, a 24 °C, independente da incidência de injúrias mecânicas. As mandioquinhas-salsa lesionadas e as intactas, mantidas a 24 °C apresentaram deterioração após quatro dias, alcançando 66% nas mandioquinhas-salsa intactas e 84% nas mandioquinhas-salsa com ferimentos.

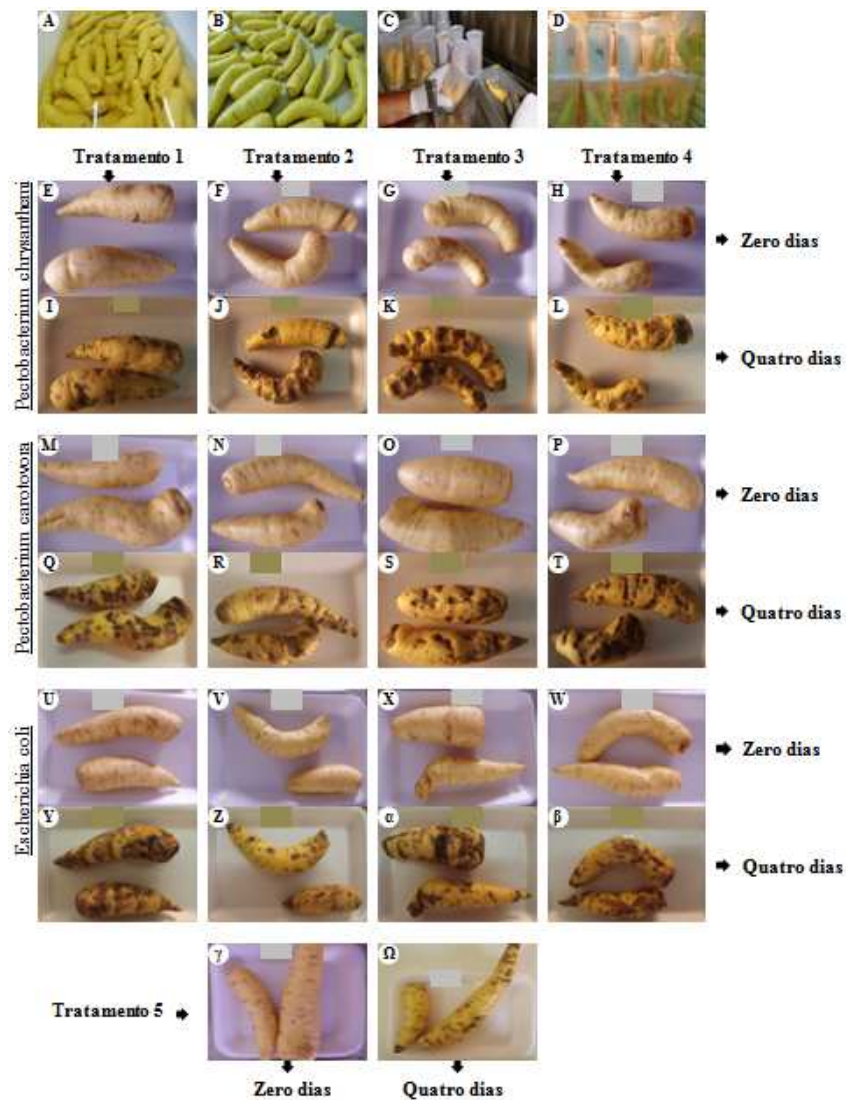


Figura 5 Fotografias do processo de sanitização e inoculação das bactérias nas mandioquinhas-salsa; e as mandioquinhas-salsa inoculadas, revestidas com a solução filmogênica, conforme os tratamentos e armazenadas até o 4º dia de análise, sendo: A = sanitização das mandioquinhas-salsa com solução de 100 mg L⁻¹ de hipoclorito de sódio; B = mandioquinhas-salsa depois de secas com auxílio de secador com jato de ar frio; C = mandioquinhas-salsa sendo inoculadas por meio da suspensão contendo inóculo e água peptonada estéril; D = mandioquinhas-salsa incubadas em câmara de crescimento, a 25 °C, por 24 horas; E até β = mandioquinhas-salsa inoculadas; γ e Ω = mandioquinhas-salsa não inoculadas; E até L = mandioquinhas-salsa inoculadas com

Pectobacterium chrysanthemi; M até T = mandioquinhas-salsa inoculadas com *Pectobacterium carotovora*; U até β = mandioquinhas-salsa inoculadas com *Escherichia coli*; E, I, M, Q, U, Y = mandioquinhas-salsa inoculadas e revestidas de acordo com o tratamento 1; F, J, N, R, V, Z = mandioquinhas-salsa inoculadas e revestidas de acordo com o tratamento 2; G, K, O, S, X, α = mandioquinhas-salsa inoculadas e revestidas de acordo com o tratamento 3; H, L, T, W, β = mandioquinhas-salsa inoculadas e revestidas de acordo com o tratamento 4; γ e Ω = mandioquinhas-salsa não inoculadas e revestidas de acordo com o tratamento 5; E até H, M até P, U até W, γ = tempo zero dia de armazenamento; I até L, Q até T, Y até β , Ω = tempo quatro dias de armazenamento.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados médios, em Log UFC/g, das bactérias que foram inoculadas nas mandioquinhas-salsa revestidas, em função do tempo de armazenamento. Pode-se observar que, para todas as bactérias, no tempo 4 dias houve aumento do ciclo. Esse aumento na contagem de bactérias sugere a baixa eficiência dos tratamentos durante o armazenamento dessas mandioquinhas-salsa, de acordo com a metodologia de inoculação utilizada. O peptídeo antimicrobiano demonstrou efeito em solução por meio da CMI, mas, ao ser incorporado na solução filmogênica, este efeito não ocorreu. Esse fato sugere que, nas soluções formadas por diferentes concentrações, o peptídeo estaria ativo, pois se encontrou livre para agir e, quando o peptídeo foi adicionado na solução filmogênica, estaria indisponível, pois teria participado das reações que fazem parte da elaboração dessas soluções, participando, assim, na formação da sua estrutura. Foi observado visualmente o crescimento das bactérias (Figura 5).

Tabela 2 Valores médios* das contagens (Log UFC/g) das bactérias que foram inoculadas nas mandioquinhas-salsa revestidas, ao longo do tempo de armazenamento (0 e 4 dias).

Tempo	Tratamentos	Log UFC/g		
		<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	<i>Pectobacterium caratovora</i>	<i>Escherichia coli</i>
Zero dia	1	5,52±0,59	5,97±0,11	6,25±0,49
	2	5,63±0,40	5,60±0,75	6,09±0,61
	3	5,86±0,28	5,57±0,40	6,31±0,45
	4	5,51±0,38	4,98±0,12	6,04±0,05
Quatro dias	1	7,91±1,53	10,00±2,11	10,86±0,27
	2	9,72±1,11	7,81±1,14	9,22±1,99
	3	10,32±0,60	7,89±1,52	10,44±0,06
	4	9,48±1,48	7,79±1,12	11,05±0,45

* Média de 3 repetições

O mesmo ocorreu com o experimento de Soares et al. (2007), no qual os autores trabalharam com revestimento contendo extrato de mostarda e sanitização na conservação de batata-baroa, inoculada com a bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*, armazenada à temperatura ambiente, por 6 dias. As contagens de fungos filamentosos e leveduras e mesófilos aumentaram durante o armazenamento na ordem de 1,5 e 5,5 ciclos logarítmicos, respectivamente.

A Figura 6 foi inserida com a finalidade de visualizar, graficamente, os resultados médios do ciclo logarítmico das bactérias que foram inoculadas nas mandioquinhas-salsa 'Amarela de Senador Amaral' revestidas, em função do tempo de armazenamento. Nessa figura ficou evidente que o tempo de armazenamento influenciou o aumento do ciclo logarítmico, para cada bactéria.

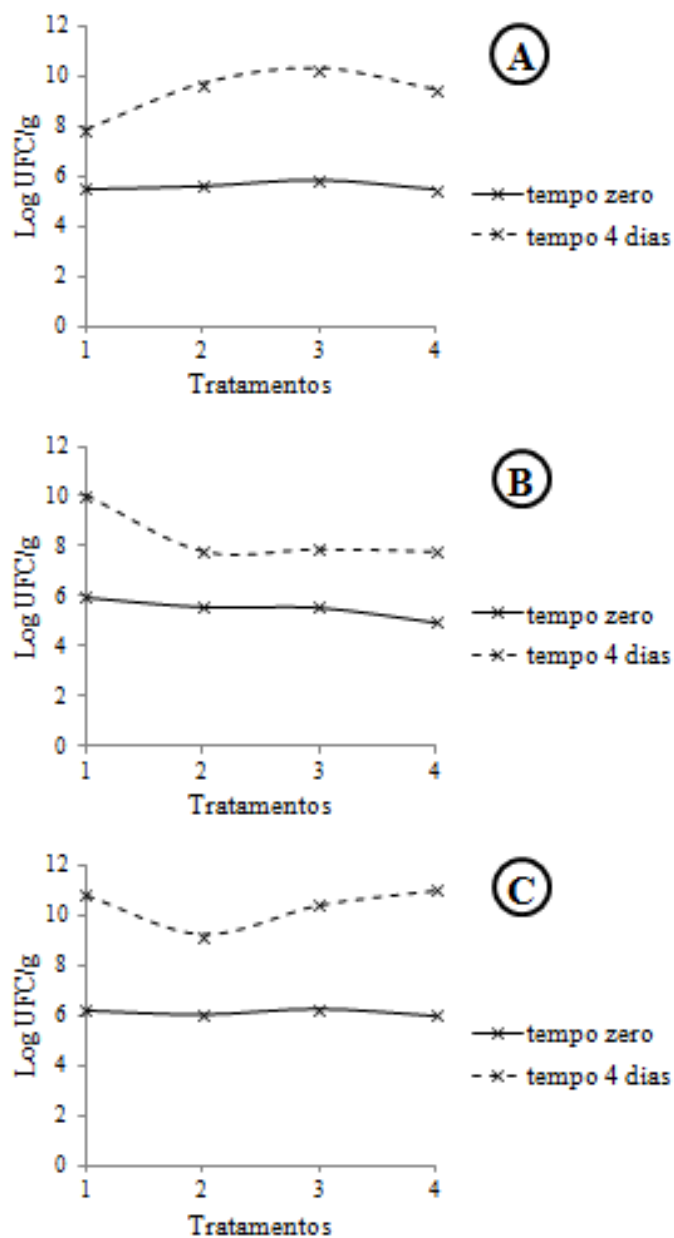


Figura 6 Gráfico representativo dos resultados para os ciclos logarítmicos das bactérias que foram inoculadas nas mandioquinhas-salsa revestidas, em função tempo de armazenamento, sendo: A = *Pectobacterium chrysanthemi*; B = *Pectobacterium caratovora* e C = *Escherichia coli*.

4 CONCLUSÃO

Em todas as concentrações do peptídeo avaliadas por meio do teste de halo (teste de difusão em ágar) nos compósitos incorporados com Lfampin, não há ação antimicrobiana para os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium roqueforti*.

O melhor efeito antibacteriano da Lfampin em relação à CMI é para *Escherichia coli*, seguida por *Pectobacterium carotovora* e, por último, *Pectobacterium chrysanthemi*.

Nas condições em que foi realizado este experimento, a ação antibacteriana da solução filmogênica incorporada com Lfampin no revestimento de mandioquinhas-salsa, armazenadas à temperatura ambiente, apresenta baixa eficiência.

REFERÊNCIAS

BELLAMY, W., et al. Antifungal properties of lactoferrincin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 230-233, 1994.

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

DAWSPM, P. L.; HARMON, L.; SOTTHIBANDHU, A.; HAN, I. Y. Antimicrobial activity of nisin-adsorbed silica and corn starch powders. **Food Microbiology**, v. 22, p. 93-99, 2005. doi: 10.1016/j.fm.2004.04.001

QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. Instituto Superior Técnico. 2005. Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?id=368>>. Acesso em: 27 maio 2014.

FOOD SAFETY AND STANDARDS AUTHORITY OF India - FSSAI. Manual of Methods of Analysis of Foods: Microbiological Testing. 2012. 102p.

GUIGA, W., et al. Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 352–360, 2010.

HANEY, E. F.; LAU, F.; VOGEL, H. J. Solution structures and model membrane interactions of lactoferrampina, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2355–2364, 2007.

HANEY, E. F., et al. Influence of specific amino acid side-chains on the antimicrobial activity and structure of bovie lactoferrampin. **Biochemistry and Cell Biology**. v. 90, p. 362-377, 2012.

HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; DUARTE, V. Notas Científicas - *Erwinia chrysanthemi*: pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p.1567-1571, out. 2006.

HENZ, G.P.; SOUZA, R.M.; PEIXOTO, J.R.; BLUMER, L. Danos causados pelo impacto de queda na qualidade pós-colheita de raízes de mandioquinhasalsa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n.4, p. 881-886, out./dez. 2005.

MACEDO, A. **Embrapa Hortaliças marca presença em evento sobre mandioquinha-salsa no Paraná**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças. 2012.

Disponível em:

<http://www.cnph.embrapa.br/paginas/imprensa/releases/150512_mandioquinha_salsa_parana.html>. Acesso em: 20 maio 2014.

MADEIRA, N. R. E SOUZA, R. J. **Mandioquinha-salsa: alternativa para o pequeno produtor**. Lavras: UFLA, 2004.

MARIANO, R. de L. R., et al. Bactérias Fitopatogênicas Pectinolíticas Dos Gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 2, p. 121-153, 2005.

PAWLIK, A.; SENDER, G.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 27, n. 4, p. 263-271. 2009. Disponível em: <<http://www.ighz.edu.pl/files/objects/2805/64/str263-272.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2014.

PITT, J. I. **A Laboratory Guide to Common Penicillium Species**. Food Science Australia. 2000, 196p.

SANTOS, F. F. dos, et al. **Mandioquinha-salsa no agronegócio do estado do Paraná**. Curitiba: [s.n.], 2000. 56p. (Informação Técnica, 51).

SOUSA, C. M. de. **Ocorrência de viroses em mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft) nas principais regiões produtoras do Brasil.** 2014. 42p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2014.

STEPHEN, J., et al. **Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing.** Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005, 236p.

SOARES, N. de F. F., et al. Avaliação de revestimento contendo extrato de mostarda e da sanitização na conservação de batata-baroa. **Revista Ceres.** V. 54, n. 314, p. 383-388, 2007.

TANG, X.-S., et al. Expression, Purification, and Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrampin–Lactoferricin in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 640–651, 2012.

ARTIGO 3

Utilização de nanocompósito amido de milho/glicerol/MMT/Lfampin na conservação pós-colheita de raízes de mandioquinhas-salsa armazenadas à temperatura ambiente

J.S. Alves ^{a,*}, L. Pereira ^a, K.C. dos Reis ^b, F.A. Lima Junior ^a, J. Pereira ^a

^a Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

^b Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

RESUMO

Mandioquinha-salsa é uma raiz muito perecível e considerada nobre, sendo seu valor comercial bastante elevado, em relação ao de outras raízes. Contudo, tornam-se necessários cada vez mais estudos relacionados à extensão da vida útil dessas mandioquinhas-salsa. Objetivou-se avaliar, física e quimicamente, a vida útil pós-colheita das mandioquinhas-salsa armazenadas à temperatura ambiente, por meio de análises de pH, acidez titulável, sólidos solúveis, relação SS/AT, perda de massa, cor e firmeza. Realizou-se um delineamento inteiramente casualizado fatorial composto por 4 tratamentos (T1, T2, T3, T4), 3 repetições e 5 épocas (0 dia, 2º dia, 4º dia, 6º dia e 8º dia). Ao final do armazenamento, todos os tratamentos tiveram redução da perda de massa, sendo 7,38% para T1, 18,37% para T2, 23,59% para T3 e 26,99% para T4. A adição de montmorilonita (MMT) e lactoferrampina bovina (Lfampin) diminuiu o pH (T3 – de 6,43 para 6,3 e T4 – de 6,18 a 6,07), favorecendo o aumento da estabilidade das mandioquinhas-salsa revestidas. Apesar da diminuição da perda de massa, as mandioquinhas-salsas mantêm a mesma firmeza (24,31 N).

Palavras-chave: *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft, ‘Amarela de Senador Amaral’. Qualidade pós-colheita. Montmorilonita. Lactoferrampina bovina. Peptídeo antimicrobiano.

1 INTRODUÇÃO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) também é conhecida como batata-baroa, batata-salsa, batata-fiúza, cenoura-amarela e outras denominações, de acordo com a região onde é cultivada. É uma hortaliça pertencente à família Apiaceae (Umbelliferae) e originária da região andina da América do Sul. Tem alto valor alimentício e nutricional, sendo rica em minerais e vitaminas do complexo B (CÂMARA, 1990). No Brasil, é cultivada e consumida, principalmente, nas regiões sudeste e sul.

A cultura da mandioquinha-salsa apresenta potencial produtivo de 40 a 50 t/ha, mas a média brasileira situa-se em torno de 10 a 12 t/ha (MACEDO, 2012).

No Brasil, a mandioquinha-salsa é, quase exclusivamente, consumida de forma não industrializada, com exceção da produção de purês desidratados utilizados na fabricação de sopas instantâneas (SANTOS, 2014). É um alimento considerado energético, sendo recomendado para dietas de crianças, pessoas idosas e convalescentes, principalmente pelo seu conteúdo de cálcio, fósforo e niacina. Porém, é uma espécie com vida pós-colheita bastante reduzida, o que, associado ao longo ciclo da cultura, promove elevação nos preços pagos pelos consumidores (PEREIRA; SANTOS, 1997).

Dependendo da região de produção, a mandioquinha-salsa tem coloração de raiz diferente, isto devido, em grande parte, à preferência do consumidor (SANTOS; BRUNE; GIORDANO, 1993). O Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura (2014) classifica a mandioquinha-salsa, batata-baroa ou batata-salsa em três grupos, de acordo com as seguintes características morfológicas: 1) amarelo comum – raiz de cor amarela intensa e formato cônico; 2) amarelo de senador amaral – raiz de cor amarela intensa e formato cilíndrico e

3) branco – raiz de cor amarelo-clara a branca, formato cônico, podendo apresentar comprimento maior que 18 cm.

As características de qualidade dos produtos hortícolas, de modo geral, podem ser expressas pela integridade, frescor, sabor, aroma e textura, características combinadas com outras propriedades físicas, químicas ou estéticas, visando relacionar a composição química com os atributos sensoriais e nutricionais (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

De acordo com Xu, Xu e Chen (2003), revestimento com compósito comestível é um método de armazenagem efetivo que pode inibir a troca gasosa, controlar a taxa de respiração, diminuir a perda de nutrientes, reduzir a evaporação da água e evitar o crescimento de microrganismo, mantendo a aparência fresca e a firmeza, aumentando, assim, o valor comercial de frutas e hortaliças.

Martins (2003) cita que os compósitos biodegradáveis podem ser produzidos a partir de polissacarídeos (celulose, carboidratos, gomas, etc.), proteínas (gelatina, glúten, etc.), lipídeos e derivados, cujas cadeias longas são capazes de produzir matrizes contínuas que dão estrutura ao compósito. O amido vem sendo utilizado na produção desses compósitos, por ser um material de fonte renovável, abundante e de custo reduzido.

Os compósitos biodegradáveis utilizados em alimentos podem ser de dois tipos: coberturas, quando são aplicados diretamente nas superfícies dos alimentos e compósitos, que são películas finas formadas sobre um suporte. Ambos podem ser definidos como uma fina camada contínua, formada ou depositada no alimento, preparada a partir de materiais biológicos que podem agir como barreira a elementos externos (umidade, óleos, gases), protegendo, aumentando sua vida útil e oferecendo integridade estrutural adicional aos alimentos (KROCHITA; MULDER-JOHNSTON, 1997). Sendo eles compósitos confeccionados a partir de polímeros que atuam como barreira a elementos

externos, podem proteger os produtos e aumentar a vida útil dos mesmos (WOLFF, 2003).

A utilização de materiais biodegradáveis a partir de vários biopolímeros na elaboração das embalagens de alimentos vem sendo pesquisada. No entanto, o uso de biopolímeros à base de amido tem sido limitado, devido às propriedades de barreira e mecânicas serem, geralmente, pobres, as quais podem ser melhoradas pela adição de plastificantes e de reforços (cargas), formando nanocompósitos.

Os compósitos são materiais inovadores com propriedades drasticamente melhoradas, devido à incorporação de pequenas quantidades (menos de 10% em peso) de cargas nanométricas em uma matriz polimérica. Nanopartículas podem ser classificadas de acordo com sua morfologia, como as partículas que são (i) em camadas (por exemplo, argilas), (ii) esféricas (por exemplo, sílica) ou (iii) aciculares, bigodes (por exemplo, os nanotubos de carbono). O comportamento final pode ser melhorado por forte e extensa interação nanopartícula de polímero, bem como a dispersão das partículas (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009).

A principal argila organofílica utilizada é a montmorilonita (MMT). Essa argila tem recebido grande atenção, nas últimas décadas, como material de reforço para polímeros, devido à alta razão de aspecto característico deste material e à possibilidade de intercalação/esfoliação das camadas do silicato na matriz polimérica. Magalhães (2008), em experimento com bioplásticos nanoestruturados de amido de milho e argilas, concluiu que a adição das argilas MMT Na⁺, MMT Ca²⁺ e Cloisite[®] 30B à matriz polimérica de amido contribuiu para o reforço do material. O mesmo aconteceu no trabalho de Faria, Vercelheze e Mali (2012), no qual a adição da MMT atuou como reforço na matriz de amido de mandioca e álcool polivinílico, formando estruturas mais resistentes e rígidas.

Além da adição de reforço (carga) à matriz biopolimérica, os compósitos podem ter outras propriedades melhoradas, como, por exemplo, a propriedade antimicrobiana, pelo acréscimo de peptídeo antimicrobiano.

Os peptídeos antimicrobianos são proteínas de baixo peso molecular, possuindo atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e fungos (LISBÔA, 2006).

A lactoferrampina bovina (Lfampin) é um peptídeo antimicrobiano derivado da lactoferrina, que é uma proteína presente na ligação de ferro em fluidos biológicos de muitos mamíferos, como lágrimas, saliva e leite (PAWLIK; SENDER; KORWIN-KOSSAKOWSKA, 2009). A lactoferrampina está localizado no domínio N1 em proximidade da lactoferricina, que desempenha um papel crucial nas atividades de membrana mediana da lactoferrina (VAN DER KRAAN et al., 2004)

Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar, física e quimicamente, a vida útil pós-colheita de raízes de mandioquinha-salsa, da cultivar Amarela de Senador Amaral, à temperatura ambiente, por meio do revestimento com compósito de amido de milho + glicerol + MMT + Lfampin.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

O amido de milho foi fornecido pela Corn Products Brazil S.A.; o glicerol foi obtido da Vetec Química Fina Ltda. (São Paulo, Brasil); a MMT (Cloisite[®] – nanofil 116) foi fornecida pela Southem Clay Products, Inc. (Gonzales, TX) e a Lfampin, aminoácidos 268-284, cuja sequência é WKLLSKAQEKFGKNKSR e pureza 95%), foi obtida na empresa GenScript USA Inc. (Shanghai, China). Água destilada foi utilizada como solvente.

As mandioquinhas-salsa ‘Amarela de Senador Amaral’ foram adquiridas na Ceasa do município de Contagem, MG, com um dia de colhidas. Em seguida, elas foram selecionadas (tamanho e ausência de injúrias), lavadas em água corrente e sanitizadas com solução de 100 mg L⁻¹ de hipoclorito de sódio, por dez minutos. As mandioquinhas-salsa foram secas ao ar e acondicionadas sobre papel filtro, em temperatura ambiente, por 12 horas, em sala higienizada.

2.2 Elaboração dos géis

As soluções filmogênicas (géis) foram elaboradas utilizando-se amido de milho, glicerol, MMT, Lfampin e água destilada.

Para o experimento utilizando soluções filmogênicas, ou compósitos e nanocompósitos, como revestimento da mandioquinha-salsa foram considerados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 (T1) – raiz sem revestimento

Tratamento 2 (T2) – raiz revestida com gel (3% de amido de milho + 20% de glicerol).

Tratamento 3 (T3) – raiz revestida com gel (3% de amido de milho + 20% de glicerol + 5% de MMT).

Tratamento 4 (T4) – raiz revestida com gel (3% de amido de milho + 20% de glicerol + 5% de MMT + 10% de Lfampin).

Na Figura 1 estão representados os fluxogramas da elaboração das soluções filmogênicas referentes aos tratamentos T2, T3 e T4, as quais foram utilizadas para revestir as mandioquinhas-salsa.

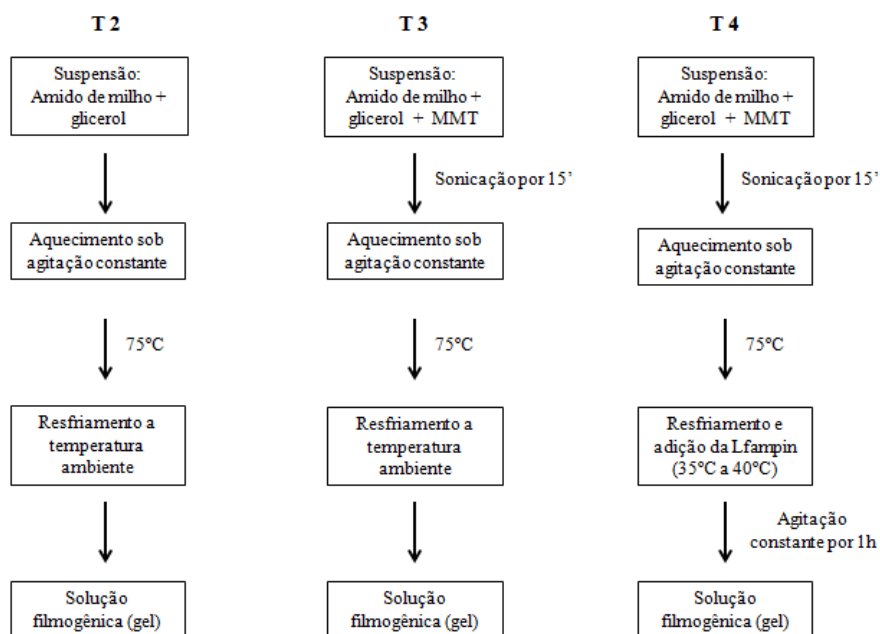


Figura 1 Fluxograma da elaboração das soluções filmogênicas (T2, T3 e T4) utilizadas para o revestimento das mandioquinhas-salsa.

2.3 Revestimento das mandioquinhas-salsa

Após seleção, sanitização e elaboração dos géis, as mandioquinhas-salsa foram submersas, por 5 minutos, em solução filmogênica e drenadas. Depois de revestidas, elas foram colocadas em bandeja de isopor, sendo devidamente

identificadas e armazenadas em uma sala higienizada e em condições ambientais. A temperatura e a umidade relativa no período do experimento variaram de 20,9 °C a 28,9 °C e 49% a 77% UR, respectivamente.

2.4 Análises nas mandioquinhas-salsa

2.4.1 pH

Foram pesados 10 g da raiz, os quais foram triturados em 100 mL de água destilada. A leitura do pH foi realizada com o auxílio de potenciômetro digital (Tecnal, modelo TEC-3MP, Brasil), de acordo com a técnica da AOAC (2012).

2.4.2 Acidez titulável

Foi feita uma suspensão por meio da trituração de 10 g da raiz em 100 mL de água destilada. A acidez titulável (AT) foi determinada por titulação com NaOH 0,01N, tendo como indicador a fenolftaleína. Os resultados foram expressos em mg de ácido málico 100 g^{-1} , de acordo com a técnica da AOAC (2012).

2.4.3 Sólidos solúveis

Para quantificar em °Brix o teor de sólidos solúveis (SS), 10 g de raiz foram triturados em 100 mL de água destilada. Duas gotas da solução foram colocadas no refratômetro digital (Atago, modelo PAL-1, Japão) e fez-se a leitura para cada amostra.

2.4.4 Relação SS/AT

Com os resultados de mg de ácido málico 100 g^{-1} e °Brix foi calculada a relação entre teor de sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT).

2.4.5 Perda de massa

A perda de massa (PM) da mandioquinha-salsa foi determinada utilizando-se uma balança semianalítica (Shimadzu, modelo BL3200H, Philippines) e calculada por meio da diferença do peso inicial da raiz e o peso obtido em cada tempo de armazenamento, dividido pelo peso inicial, sendo o valor expresso em % PM.

2.4.6 Firmeza

A firmeza foi determinada ao longo da raiz das mandioquinhas-salsa, utilizando-se texturômetro TA.XT2plus (Stable Micro System, UK), programa Exponent Lite Express versão 4,013,0 (2007), com cédula de carga de 50 kg. Os parâmetros de configuração da análise para as mandioquinhas-salsa foram os seguintes: velocidade pré-teste 0,8 mm/s, velocidade de teste 0,8 mm/s, velocidade pós-teste 10,00 mm/s, a probe utilizada foi a SMS P/3, com penetração de 5 mm. Os valores obtidos foram expressos em Newton (N).

2.4.7 Parâmetros de coloração

A cor das mandioquinhas-salsa foi determinada com aparelho colorímetro Konica Minolta modelo CM-5 (Japão), trabalhando com D_{65} (luz do dia), de acordo com Sobral (1999) e usando os padrões CIE Lab, em que L^*

(corresponde à luminosidade) varia de 0 (preto) a 100 (branco), a^* varia do -60 (verde) ao +60 (vermelho), b^* varia de -60 (azul) ao +60 (amarelo). Para calibração, foi utilizada uma placa branca, cuja leitura foi $L^* = 92,40$, $a^* = 0,3162$ e $b^* = 0,3326$. Posteriormente, os valores de L^* , a^* e b^* foram mensurados ao longo das raízes de mandioquinhas-salsa. A partir dos valores de L^* , a^* e b^* , calcularam-se o índice Croma (cromaticidade – saturação de cor – C^*), utilizando-se a fórmula $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$; o ângulo Hue (tonalidade – h), utilizando-se a fórmula $h = \arctan b^*/a^*$ e ΔE (diferença de cor), utilizando-se a fórmula $\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$, em relação ao tempo zero dia.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Realizou-se um delineamento inteiramente casualizado fatorial composto por 4 tratamentos (T1, T2, T3, T4), 3 repetições e 5 épocas (0 dia, 2º dia, 4º dia, 6º dia e 8º dia), totalizando 60 unidades amostrais, sendo 12 amostras/dia.

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância, à análise de regressão para a variável tempo e ao teste de média (teste de Scott-Knott) para a variável tratamento, a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar, versão 5.3 Build 77 (FERREIRA, 2011). Os critérios adotados para ajuste da equação foram o R^2 ser maior que 70% e o coeficiente de regressão ser significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para pH, percentagem de acidez titulável (AT), relação entre sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT) de mandioquinhas-salsa ‘Amarela de Senador Amaral’ revestidas com compósito amido de milho/glicerol/MMT/Lfampin (Tabela 1). Para a interação tratamento *versus* tempo foi realizado um desdobramento, em função do tempo de armazenamento.

Tabela 1 Quadrados médios da ANOVA e respectivas significâncias para pH, AT, SS, SS/AT, PM e Fi, para as mandioquinhas-salsa revestidas com compósito e nanocompósito.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios					
		pH	AT	SS	SS/AT	PM	Fi
T	3	0,076	0,055	0,600 ^{ns}	27,080	881,254 [*]	6,116 ^{ns}
Tempo	4	0,362	0,231	21,667 [*]	386,678	189,394 [*]	7,683 ^{ns}
T x Tempo	12	0,072 [*]	0,078 [*]	0,933 ^{ns}	44,605 [*]	20,055 ^{ns}	2,334 ^{ns}
Resíduo	40	0,032	0,008	0,733	15,664	39,012	6,165
CV (%)		2,76	18,99	15,57	28,13	40,05	10,22

^{*} significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

^{ns} não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

T = tratamento; CV = coeficiente de variação; GL = grau de liberdade; pH = potencial hidrogeniônico; AT = acidez titulável; SS = sólidos solúveis; SS/AT = relação entre sólidos solúveis e acidez titulável; PM = perda de massa; Fi = firmeza.

Para a variável pH (potencial hidrogeniônico), a interação dos tratamentos (T1, T3 e T4) *versus* tempo foi significativa ($p < 0,05$) e está representada pela Figura 2. Já para interação tratamento T2 *versus* tempo não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$), sendo seu valor médio de 6,5.

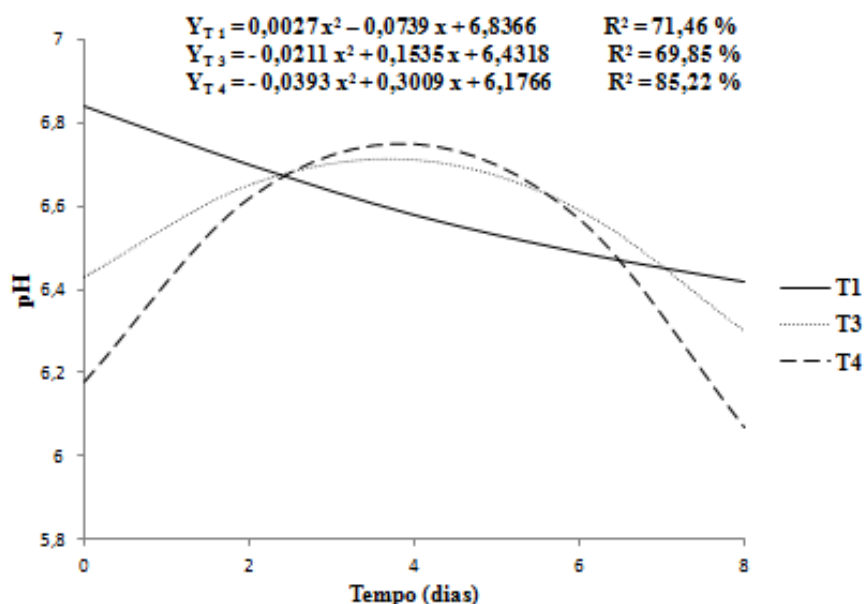


Figura 2 pH das mandioquinhas-salsa revestidas (T1, T3 e T4), em função do tempo de armazenamento (dias).

A medida de pH é importante, pois determina, entre outros fatores, a deterioração do alimento com crescimento de microrganismos e a escolha da embalagem (CECCHI, 2003). De acordo com Azeredo (2012), uma das formas mais comuns de aumentar a estabilidade de alimentos é por meio da redução do pH, reduzindo o crescimento microbiano.

Ao final do armazenamento, todos os tratamentos tiveram redução do pH, quando comparado com o início. O pH do tratamento T1 começou maior e terminou maior em relação a T3 e a T4. No trabalho de Carmo e Leonel (2012), com clones de mandioquinha-salsa, a cultivar Amarela de Senador Amaral apresentou pH de 6,92, valor próximo ao pH para o tempo zero dia, referente ao tratamento T1.

De acordo com Vanetti (2000 citado por FERNANDES, 2013), a faixa recomendada de pH para frutas e hortaliças frescas é de 5,5 a 7, e os valores obtidos nesse trabalho encontram-se dentro dessa faixa e não variaram muito ao longo do tempo de armazenamento, situando-se ente 5,96 a 6,83.

Lopes, Castilho e Clemente (2011) trabalharam com mandioquinha-salsa minimamente processada revestida com quitosana e óleo capim-limão e também observaram essa diminuição do pH no 3º, 6º e 9º dia de armazenamento, em relação à amostra não revestida. Souto et al. (2004) também encontraram valor reduzido para pH, durante o armazenamento de abacaxi 'Pérola', a 8 °C.

Prates e Ascheri (2011) trabalharam com morangos revestidos com amido de fruta-de-lobo e sorbitol e não verificaram influência das coberturas de amido no pH, mas observaram, no decorrer do tempo, redução no pH dos frutos em todos os tratamentos ao longo do armazenamento e sugeriram que essa redução pode estar relacionada aos altos valores de percentual de perda de massa das amostras. Dessa forma, a perda do conteúdo de água pode ter sido responsável pelo aumento na concentração de ácidos orgânicos, causando a queda nos valores de pH.

Os ácidos orgânicos presentes em alimentos influenciam o sabor, o odor, a cor, a estabilidade e a manutenção de qualidade, e a proporção relativa desses ácidos presentes em frutas e vegetais varia com o grau de maturação e as condições de crescimento (CECCHI, 2003).

Para a variável AT (acidez titulável), a interação do tratamento T1 *versus* tempo foi significativa ($p < 0,05$), sendo representada na Figura 3. A interação dos tratamentos T2, T3 e T4 também foi significativa, porém, não houve ajuste do modelo matemático, conforme critérios estabelecidos anteriormente, e os valores observados foram relacionados na mesma Figura.

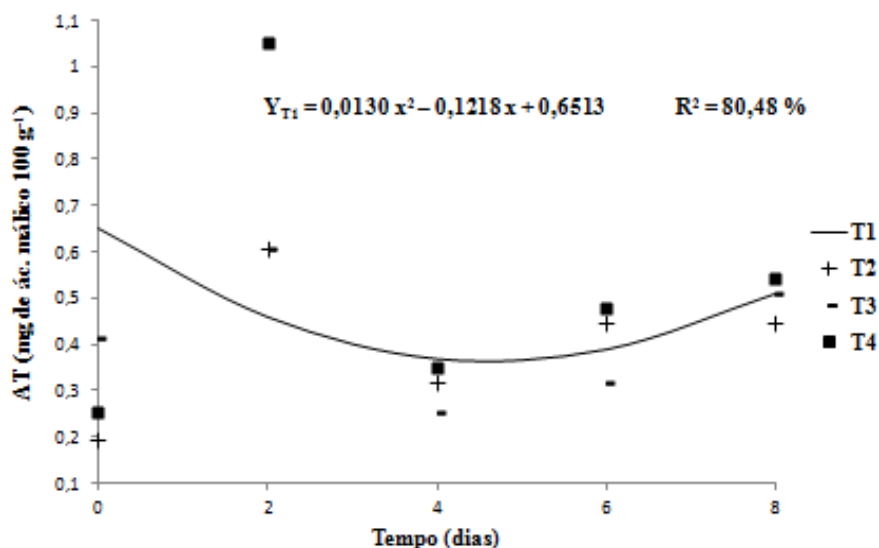


Figura 3 Acidez titulável (AT) das mandioquinhas-salsa, T1, e valores médios* observados (T2, T3, T4), em função do tempo de armazenamento (dias). *Média de 3 observações.

A acidez titulável apresentou variação nos valores durante o armazenamento. No tratamento T1, diminuiu até o 4º dia, com aumento no final do armazenamento. Para os demais tratamentos, T2, T3 e T4, o valor de AT oscilou durante o experimento, porém, o resultado ao final do armazenamento foi maior do que no início.

No experimento de Carmo e Leonel (2012), que trabalharam com clones de mandioquinha-salsa, a cultivar Amarela de Senador Amaral obteve, para AT, 1,29 mg de ácido málico 100 g⁻¹, valor maior do que a acidez do presente trabalho.

Prates e Ascheri (2011) também verificaram aumento nos teores de AT ao longo do período de armazenamento, em morangos cobertos com amido de fruta-de-lobo e sorbitol.

Brackmann (1991, citado por PRATES; ASCHERI, 2011), afirma que níveis mais elevados de acidez total titulável podem ser resultantes da redução

da taxa respiratória, pois os ácidos são as substâncias mais prontamente disponíveis para a obtenção de energia no ciclo de Krebs.

Houve efeito significativo somente para a variável independente tempo ($p < 0,05$), porém, não houve ajuste ao modelo matemático, sendo representados os valores médios observados de sólidos solúveis na Figura 4.

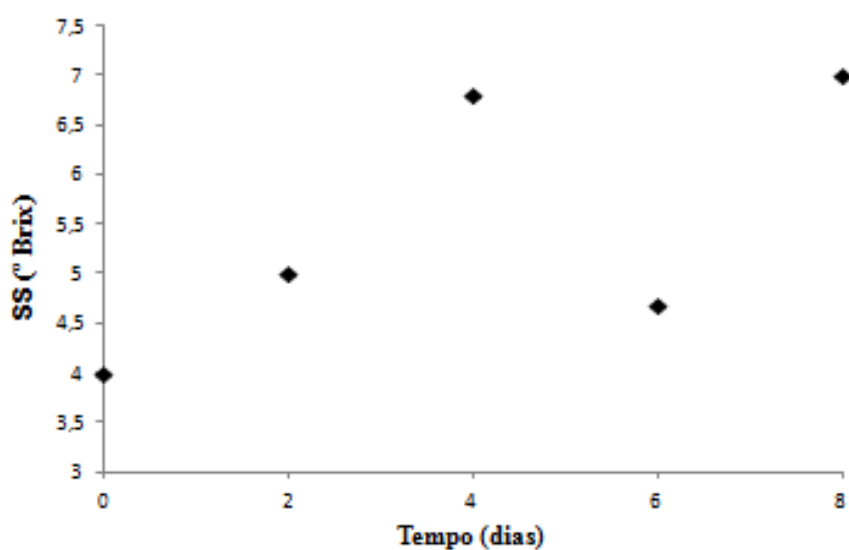


Figura 4 Valores médios* observados para sólidos solúveis (SS) das mandioquinhas-salsa revestidas, em função do tempo. *Média de três observações.

Mesmo sem um modelo matemático para representar o que aconteceu com o teor de SS nas mandioquinhas-salsa revestidas e armazenadas ao longo do tempo, pode ser observada, na Figura 4, tendência ao aumento do valor de SS, durante o armazenamento.

Os valores de SS encontrados por Botrel e Madeira (2012) (entre 4,25° Brix e 11,25° Brix), que trabalharam com diferentes condições de embalagem para comercialização de mandioquinha-salsa, estão de acordo com os resultados do presente trabalho.

Assim como no presente trabalho, os valores de SS observados por Lopes, Castilho e Clemente (2011) aumentaram durante o armazenamento de mandioquinha-salsa 'Amarela de Senador Amaral' minimamente processada refrigerada e revestida com quitosana e óleo essencial. Lemos et al. (2007) também observaram aumento no teor de sólidos solúveis no decorrer do período de armazenamento de pimentões revestidos com fécula de mandioca.

Esse aumento no teor de sólidos solúveis totais pode ser decorrente da transformação das reservas acumuladas durante a formação e o desenvolvimento desses sólidos em açúcares solúveis (JERONIMO; KANESIRO, 2000 citados por LOPES; CASTILHO; CLEMENTE, 2011)

Outra explicação para o aumento no valor de SS pode ser a perda de massa. Andreuccetti et al. (2007) trabalharam com qualidade pós-colheita de frutos de tomate, verificaram aumento no conteúdo de SS ao final do experimento e o relacionaram com a perda de massa.

A relação SS/AT é um importante indicador de sabor nos alimentos, principalmente aqueles destinados ao consumo *in natura* (SOARES et al., 2010).

Para a variável SS/AT (relação entre sólidos solúveis e acidez titulável), a interação do tratamento *versus* tempo foi significativa ($p < 0,05$), porém, não houve ajuste ao modelo matemático, sendo representados os valores médios observados na Figura 5.

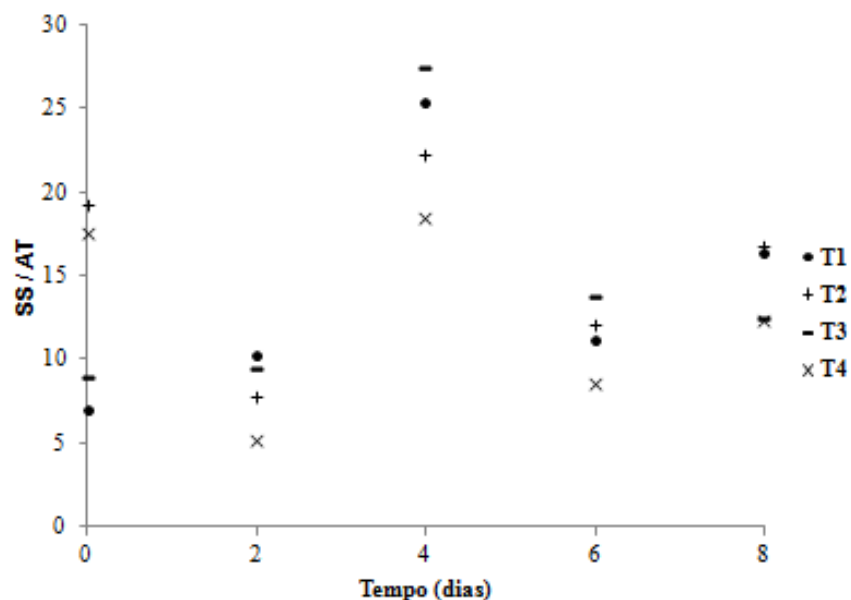


Figura 5 Valores médios* observados para relação SS/AT das mandioquinhas-salsa revestidas, em função do tempo e dos tratamentos: T1, T2, T3 e T4. *Média de 3 observações.

Mesmo na ausência de um modelo matemático, observou-se tendência em aumentar o valor da relação SS/AT para os tratamentos T1 e T3, uma vez que os valores encontrados para SS tenderam a aumentar, como verificado anteriormente.

Fernandes et al. (2010) trabalharam com raízes de cultivares de batata na safra de inverno e encontraram valores de SS/AT próximos (22,50-29,55) aos resultados do 4º dia de armazenamento deste trabalho.

Houve efeito significativo para PM somente para as variáveis independentes tempo e tratamento ($p < 0,05$). A Tabela 2 apresenta a variável independente tratamento. Já para a variável independente tempo não houve ajuste no modelo matemático, sendo representados os valores médios observados na Figura 6.

Tabela 2 Valores médios* para perda de massa (PM) das mandioquinhas-salsa revestidas, em função dos tratamentos.

Tratamentos	PM (%)
T1	7,38 a
T2	18,37 b
T3	23,59 c
T4	26,99 c

* média de três observações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

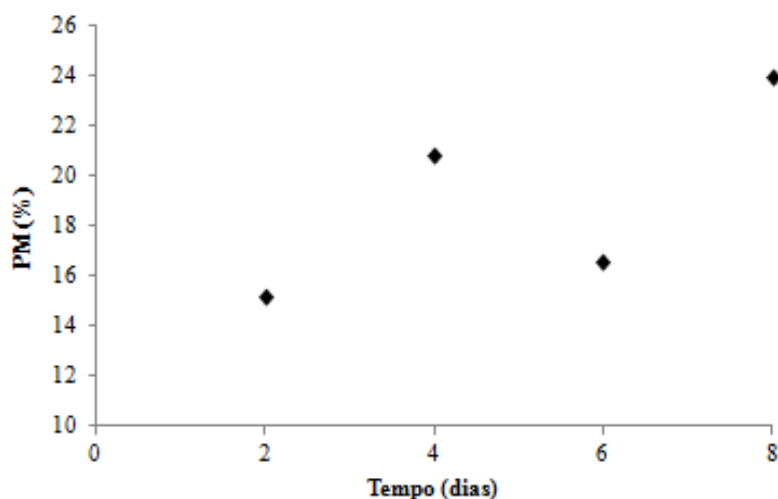


Figura 6 Valores médios* observados para a variável independente tempo, sob o valor de perda de massa (PM), das mandioquinhas-salsa revestidas. * Média de três observações.

As maiores perdas de massa foram observadas para os tratamentos T3 e T4, justamente os que tiveram os menores valores de pH, como discutido anteriormente.

Assim como no experimento de Nunes et al. (2004), com pêssegos 'Aurora 2' armazenados sob atmosfera modificada e refrigeração, por dez dias,

os frutos revestidos com fécula de mandioca a 3% apresentaram maior perda de massa do que os frutos sem revestimento. Os autores concluíram que a fécula de mandioca a 3% não foi eficiente em prolongar a vida pós-colheita dos pêssegos, permitindo a perda excessiva de massa, tornando os frutos impróprios para a comercialização a partir do oitavo dia de armazenamento, com aspecto enrugado. No presente trabalho, visualmente, as mandioquinhas-salsa tiveram sua aparência externa comprometida com a intensificação das pontuações escuras, a partir do quarto dia de armazenamento.

De acordo com Souza, Henz e Peixoto (2003), as lesões superficiais causadas pela abrasão não causam danos tão drásticos nas mandioquinhas-salsa quanto as quebras, rachaduras e rupturas, mas afetam diretamente o valor comercial da raiz porque a aparência fica comprometida. À medida que as mandioquinhas-salsa vão perdendo matéria fresca em ambientes de comercialização sem refrigeração, as lesões superficiais vão se tornando mais visíveis e diferenciadas do tecido intacto, podendo tornar-se escuras após sua ocorrência.

Foi observado aumento significativo da perda de massa das mandioquinhas-salsa em todos os tratamentos ao longo do período de armazenamento. Esse comportamento também foi observado no experimento de Santos et al. (2011), que avaliaram a influência de compósitos de fécula de mandioca e amido de milho na qualidade pós-colheita de mangas 'Tommy Atkins'. Os autores atribuíram esse comportamento ao fato de os compósitos de amido de milho e fécula de mandioca serem semipermeáveis e permitirem que os frutos continuem respirando e perdendo massa.

Damasceno et al. (2003) estudaram o efeito da aplicação de compósito de fécula de mandioca na conservação pós-colheita de tomate e concluíram que o uso do compósito não reduziu significativamente a perda de massa dos frutos. O mesmo aconteceu com o experimento de Prates e Ascheri (2011), que

avaliaram o efeito da cobertura de amido de fruta-de-lobo e sorbitol na conservação de morango e o resultado para perda de massa não variou significativamente entre os frutos sem revestimento e revestidos. Portanto, o uso das coberturas não foi efetivo no controle da perda de massa dos frutos de morango.

Tanada-Palmu (2003), em trabalho com revestimento de morango, também não verificou a influência da cobertura de glúten de trigo na perda de massa dos frutos e acrescentou que a adição de lipídeos às coberturas mostra um efeito benéfico sobre a redução da perda de massa dos morangos.

Assim como no experimento de Pinto (2012), desenvolvimento de compósitos e revestimentos biodegradáveis à base de amido, goma de cajueiro e MMT, a presença de MMT parece não ter aumentado o efeito de barreira dos revestimentos.

De acordo com Chitarra e Chitarra (2005), o teor de umidade tem relação direta com a textura do produto, pois é um dos fatores responsáveis pelo turgor e pela firmeza do tecido.

Mesmo com a significância para a variável perda de massa (Tabela 1), não houve efeito significativo ($p \geq 0,05$) entre tratamento e tempo, e nem sobre a interação sobre eles para a variável F_i (firmeza), obtendo-se, portanto, média geral de 24,31N.

Chiebao (2008) trabalhou com estudos de conservação de mandioquinha-salsa e encontrou 86,58 N a 199,05 N de firmeza, para a amostra controle armazenada a 25 °C, em caixas, valor superior ao obtido neste experimento.

Ribeiro et al. (2007) avaliaram a vida útil e o metabolismo de carboidratos em raízes de mandioquinha-salsa sob refrigeração e compósito de PVC. A perda de firmeza e a murcha aparente ocorreram quando a perda de massa acumulada alcançou valores superiores a 9%. No presente trabalho foram

detectados alguns pontos de murcha nas mandioquinhas-salsa na região onde existiam pontuações escuras, porém, não foi evidenciada a perda de firmeza.

De acordo com a análise de variância para L*(luminosidade – sistema CIELab), b* (sistema CIELab), C* (índice croma), h (ângulo hue) e ΔE (diferença de cor) de mandioquinhas-salsa ‘Amarela de Senador Amaral’ revestidas com compósito e nanocompósito amido/glicerol/MMT/Lfampin, pode-se observar que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) (Tabela 3). Portanto, foi analisada separadamente cada variável independente: tratamento e tempo.

Tabela 3 Quadrados médios da ANOVA e respectivas significâncias para L*, b*, C*, h e ΔE , para as mandioquinhas-salsa revestidas com compósito biodegradável.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios				
		L*	b*	C*	h	ΔE
T	3	8,399 ^{ns}	12,964 ^{ns}	6,921 ^{ns}	6,484 ^{ns}	18,444 ^{ns}
Tempo	4	24,320 ^{**}	370,514 ^{**}	344,051 ^{**}	20,592 ^{**}	8,893 ^{ns}
T x Tempo	12	12,038 ^{ns}	7,194 ^{ns}	5,968 ^{ns}	2,060 ^{ns}	6,065 ^{ns}
Resíduo	40	8,614	7,250	5,863	3,087	10,749
CV(%)		4,55	9,56	8,14	2,38	24,23

^{**} significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

^{ns} não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

T = tratamento; CV = coeficiente de variação; GL = graus de liberdade; L* = luminosidade – sistema CIELab; a* = sistema CIELab; b* = sistema CIELab; C* = índice Chroma; h = ângulo hue; ΔE = diferença de cor.

De acordo com Botrel e Madeira (2012), a cor é um dos grandes atrativos para o consumidor e, no caso da cor amarela, ela está associada à presença de pigmentos carotenoides que se acumulam em frutos e raízes de algumas espécies vegetais, incluindo a mandioquinha-salsa.

Para a variável L^* (luminosidade – sistema CIELab), somente a variável independente tempo foi significativa ($p < 0,05$), porém, os valores observados não se ajustaram aos modelos matemáticos propostos e estão apresentados na Figura 7.

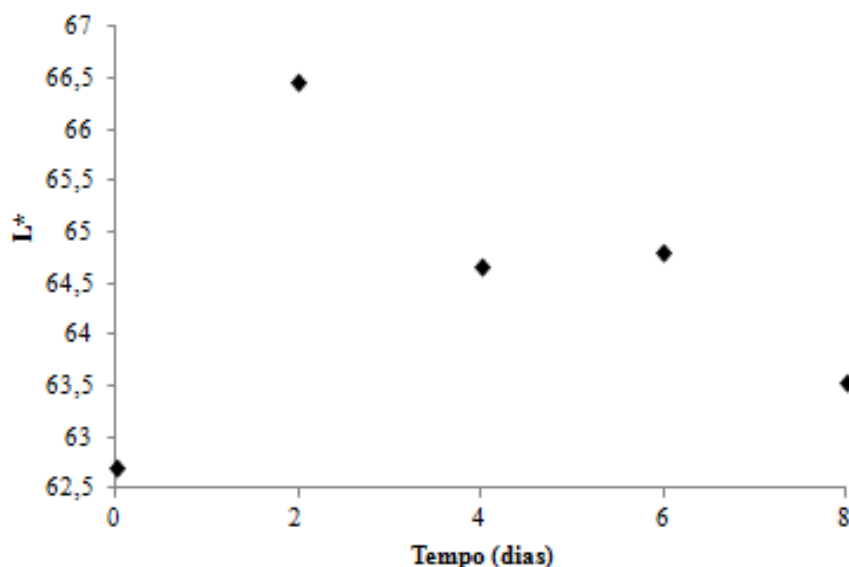


Figura 7 Valores médios* observados para a variável independente tempo, sob o valor de L^* (luminosidade – sistema CIELab), das mandioquinhas-salsa revestidas.
* Média de três observações.

Ribeiro (2005) trabalhou com estudo de estratégias para a valorização industrial do morango e, assim como no presente trabalho, a autora relatou que não se observaram diferenças significativas no parâmetro L^* entre os frutos com revestimento e sem revestimento.

Para as variáveis b^* (sistema CIELab), C^* (índice croma) e h (ângulo hue), somente a variável independente tempo foi significativa ($p < 0,05$) (Figura 8). Para essas variáveis houve decréscimo nos valores até o 6º dia, com aumento ao final do tempo de armazenamento.

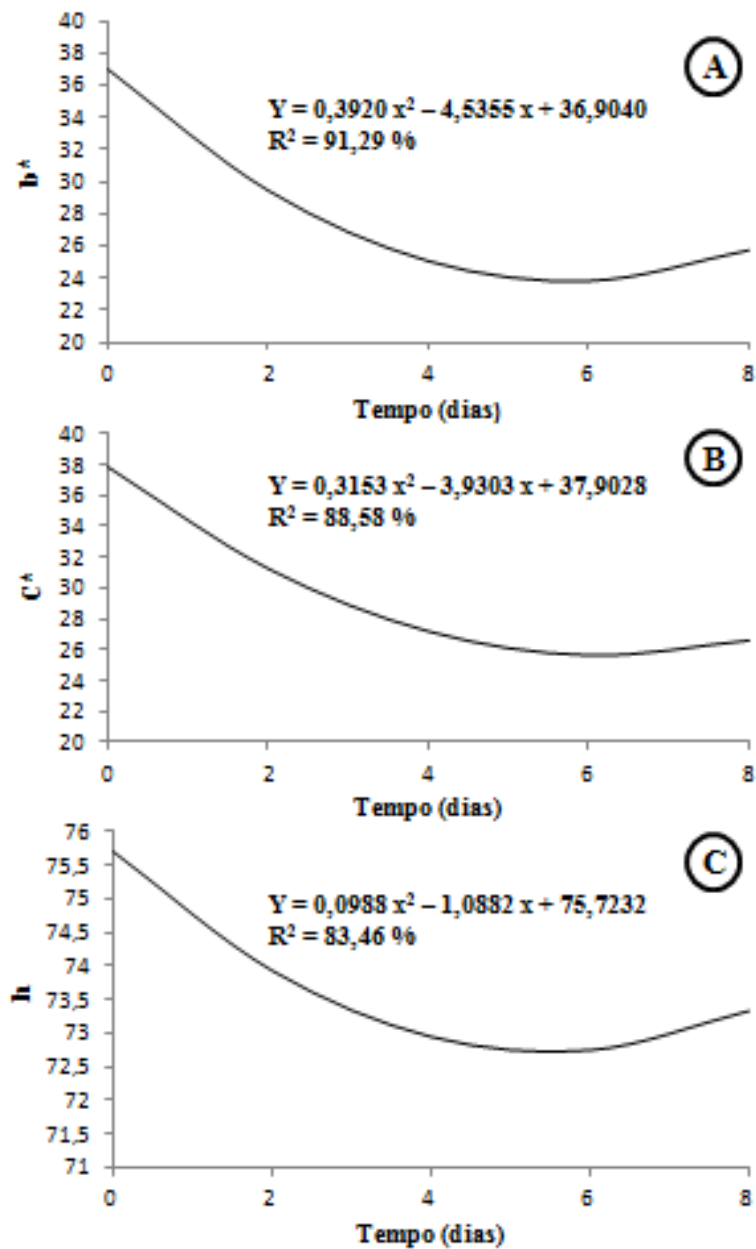


Figura 8 Efeito do tempo sob as variáveis, sendo $A = b^*$ (sistema CIELab), $B = C^*$ (índice croma) e $C = h$ (ângulo hue) nas mandioquinhas-salsa revestidas.

Botrel e Madeira (2012) trabalharam com diferentes condições de embalagem (bandejas de poliestireno sem PVC ambiente e bandejas de poliestireno com PVC ambiente) para comercialização de mandioquinha-salsa e encontraram os seguintes valores: L^* (70,25 e 74,75), b^* (32,00 e 31,50), C^* (32,00 e 31,50). Estes resultados são maiores para a coordenada L^* e semelhantes para as coordenadas b^* e C^* , quando comparados aos do presente trabalho (Figuras 7, 8A e 8B).

Carmo e Leonel (2012) trabalharam com clones de mandioquinha-salsa cultivar Amarela de Senador Amaral' e os valores encontrados para L^* e b^* foram de 91,36 e 54,45, respectivamente. Os valores de L^* e b^* são superiores aos do presente trabalho. De acordo com Nunes et al. (2010), a coloração mais amarela da mandioquinha-salsa faz com que sejam mais aceitas pelos consumidores.

Os valores encontrados para a variável cor, por Fernandes (2013), em batata-baroa minimamente processada, foram L^* (59,95 a 66,22), b^* (28,91 a 42,90), C^* (75,0 a 81,0) e h (28,0 a 44,0). Apenas os resultados do C^* e h foram superiores aos obtidos neste experimento; já para as outras variáveis, L^* e b^* , os valores foram parecidos.

O croma (C^*) define a intensidade de cor, ou seja, valores próximos a zero são indicativos de cores neutras (branco e/ou cinza) e valores ao redor de 60 indicam cores vívidas e/ou intensas (FERNANDES et al., 2010).

De acordo com Fernandes (2013), o decréscimo do índice colorimétrico croma ao longo do tempo de armazenamento é um indicador da diminuição de tonalidade ou matiz da coloração, em que menores valores levam a cores menos puras. Dessa forma, o decréscimo observado para este índice indica o aparecimento de outras tonalidades. Foi observada alteração na coloração das mandioquinhas-salsa devido ao surgimento das pontuações escuras a partir do segundo dia de armazenamento. Na Figura 9 estão representadas as

mandioquinhas-salsa revestidas e não revestidas que foram armazenadas à temperatura ambiente, por 8 dias.

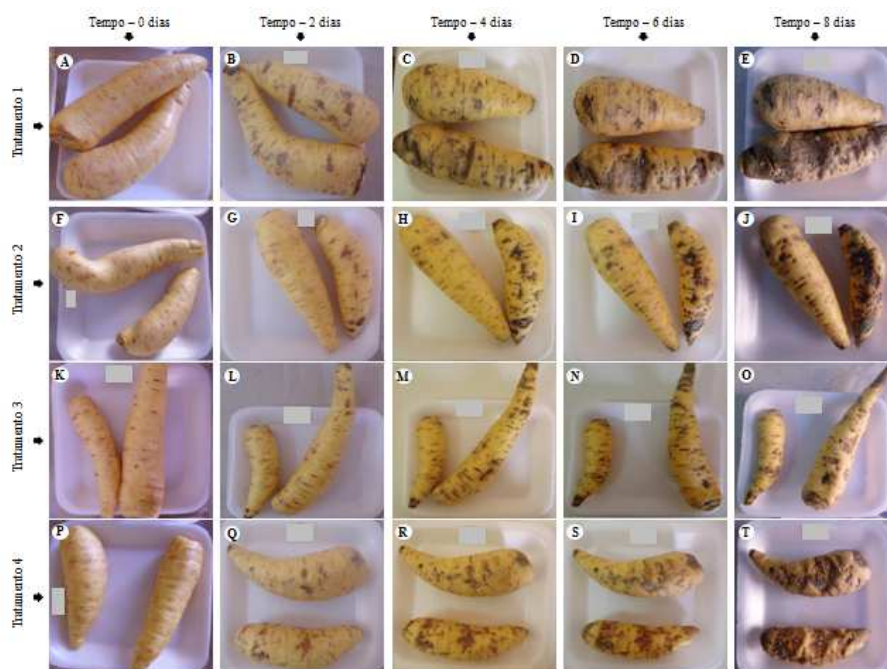


Figura 9 Mandioquinhas-salsa armazenadas à temperatura ambiente, por 8 dias, sendo: A até E = tratamento 1; F até J = tratamento 2; K até O = tratamento 3; P até T = tratamento 4; A, F, K, P = tempo zero dias; B, G, L, Q = tempo dois dias; C, H, M, R = tempo quatro dias; D, I, N, S = tempo seis dias; E, J, O, T = tempo oito dias.

A interação tratamento *versus* tempo para a variável ΔE (diferença de cor) não apresentou diferença significativa ($p \geq 0,05$), portanto, foi analisada separadamente cada variável independente, tratamento e tempo. Tanto o tratamento quanto o tempo não foram significativos ($p \geq 0,05$), apresentando, assim, média geral de 13,53. Esse valor de ΔE levou em consideração as condições iniciais de armazenamento do produto, no entanto, nem os tratamentos nem os tempos de armazenamento influenciaram a diferença de cor.

Damasceno et al. (2003) trabalharam com o efeito da aplicação de compósito de fécula de mandioca na conservação pós-colheita de tomate e observaram que a utilização de compósito de fécula de mandioca no recobrimento dos frutos não melhorou a conservação pós-colheita, mas também não foi prejudicial.

4 CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, as mandioquinhas-salsa da cultivar Amarela de Senador Amaral, revestidas com compósito amido de milho, glicerol, MMT e Lfampin, armazenadas à temperatura ambiente, não apresentam melhora na qualidade pós-colheita, quando comparadas às mandioquinhas-salsa sem revestimento. A adição de MMT e Lfampin nos tratamentos T3 e T4 diminui o pH, favorecendo o aumento da estabilidade das mandioquinhas-salsa revestidas. Apesar da maior perda de massa nos tratamentos T3 e T4 e do aparecimento de pontuações escuras ao longo do armazenamento, as mandioquinhas-salsas apresentam a mesma firmeza.

REFERÊNCIAS

ANDREUCETTI, C., et al. Qualidade pós-colheita de frutos de tomate cv. Andréa tratados com etileno. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 122-126, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. Official methods of analysis. 19. ed. Gaithersburg: [s.n.], 2012. 3000p.

AZEREDO, H. M. C. de **Fundamentos de estabilidade de alimentos** 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 326p.

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 125-155, 2009. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.10.002

BOTREL, N.; MADEIRA, N. R. Diferentes condições de embalagem para comercialização de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, 2012. (Suplemento - CD Rom), S7574-S7580.

CÂMARA, F.L.A. **Sintomatologia de carência de macronutrientes e boro em mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**. 1990. 66p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiróz (ESALQ), Piracicaba, 1990.

CARMO, E. L. do; LEONEL, M. Composição físico-química e cor de clones de mandioquinha-salsa. **Revista Energia na Agricultura**. Botucatu, v. 27, n.1, p.62-81, jan./mar. 2012.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas, SP: UNICAMP, 2003, 207p.

CHIEBAO, H. P. **Estudos de conservação de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft.): efeitos da embalagem, radiação gama e temperatura de armazenamento.** 2008. 123 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Área de Bromatologia). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo. 2008.

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

DAMASCENO, S., et. al. Efeito da aplicação de película de fécula de mandioca na conservação pós-colheita de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v. 23, n. 3, p. 377-380, 2003.

FARIA, F. de O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 487-492, 2012.

FERNANDES, A. M., et al. Qualidade físico-química e de fritura de raízes de cultivares de batata na safra de inverno. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 299-304, 2010.

FERNANDES, S. F. **Caracterização física, físico-química e bioquímica de batata baroa minimamente processada.** 2013. 83 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE QUALIDADE EM HORTICULTURA.
Normas de Classificação. **Regulamento técnico de identidade e qualidade da mandioquinha salsa, batata baroa ou batata salsa (*Arracacia xanthorrhiza*, Bancroft) para o “Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura”**. 2014. Disponível em:
<<http://www.hortibrasil.org.br/jnw/classificacao/mandioquinha/arquivos/norma.html>>. Acesso em : 25 jun. 2014.

KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 60-74, 1997.

LEMOS, O. L., et al. Utilização de biofilme comestível na conservação de pimentão ‘Magali R’ em duas condições de armazenamento. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 693-699, 2007.

LEONEL, M.; CARMO, E. L. do. Composição físico-química e cor de clones de mandioquinha-salsa. **Energia na Agricultura**. Botucatu, v. 27, n.1, p.62-81, jan./mar. 2012.

LISBÔA, M. P. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo**. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, 2006.

LOPES, E. S.; CASTILHO, L.; CLEMENTE, E. Influência do revestimento e da temperatura na qualidade de mandioquinha-salsa minimamente processada. **Revista Tecnológica**, Edição Especial V Simpósio de Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 49-56, 2011.

MACEDO, A. **Embrapa Hortaliças marca presença em evento sobre mandioquinha-salsa no Paraná**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2012. Disponível em:
<http://www.cnph.embrapa.br/paginas/imprensa/releases/150512_mandioquinha_salsa_parana.html>. Acesso em: 20 maio 2014.

MAGALHÃES, N. F. **Bioplásticos nanoestruturados de amido de milho e argilas**. 2008. 212 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros), Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MARTINS, J. Amigo da prensa. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.33, n.196, p.42-43, ago. 2003.

NUNES, E. E., et al. Efeito de diferentes temperaturas na qualidade de MANDIOQUINHA-salsa minimamente processada. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, jul./set. 2010.

NUNES, E. E., et al. Vida útil de pêssegos ‘Aurora 2’ armazenados sob atmosfera modificada e refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 26, n. 3, p. 438-440, 2004.

PAWLIK, A.; SENDER, G.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 27, n. 4, p. 263-271, 2009.

PEREIRA, A.S.; SANTOS, F.F. dos. **Processamento Industrial da mandioquinha-salsa**. Informe Agropecuário, v. 19, n. 190, p. 56-60, 1997.

PRATES, M. F. O.; ASCHERI, D. P. R. Efeito da cobertura de amido de fruta-de-lobo e sorbitol e do tempo de armazenamento na conservação pós-colheita de frutos de morango. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 21-32, jan./jun. 2011.

PINTO, A. M. B. **Desenvolvimento de filmes e revestimentos biodegradáveis à base de amido, goma de cajueiro e montmorilonita**. 2012. 87 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

RIBEIRO, C. M. C. P. **Estudo de Estratégias para a Valorização Industrial do Morango**. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado). Universidade do Minho, Braga – Portugal, 2005.

RIBEIRO, R. A., et al. Vida útil e metabolismo de carboidratos em raízes de mandioquinha-salsa sob refrigeração e filme de PVC. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 453-458, abr. 2007.

SANTOS, A. E. O. dos, et al. Influência de biofilmes de fécula de mandioca e amido de milho na qualidade pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 6, n. 3, p. 508-513, jul./set, 2011.

SANTOS, F. F. dos; BRUNE, S.; GIORDANO, L.B. Variabilidade observada em população de mandioquinha-salsa obtida por autofecundação de um clone de raiz branca. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 95, 1993. Resumo.

SANTOS, F. F. dos. **Produção de “chips de mandioquinha-salsa**. 2014. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/public/folders/chip.html>>. Acesso em: 20 abr. 2014.

SOARES, I. A. A., et al. Interferência das plantas daninhas sobre a produtividade e qualidade de cenoura. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 28, n. 2, p. 247-254, 2010.

SOUTO, R. F., et al. Conservação pós-colheita de abacaxi ‘pérola’ colhido no estádio de maturação “pintado” associando-se refrigeração e atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 1, p. 24-28, abr. 2004.

SOUZA, R.M.; HENZ, G.P.; PEIXOTO, J.R. Incidência de injúrias mecânicas em raízes de mandioquinha-salsa na cadeia de pós-colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 712-718, out./dez., 2003.

TANADA-PAMLU, P. S. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. 2003. 244 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003.

VAN DER KRAAN, M. I. A.; et al. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. **Peptides**, v. 25, p. 177–183, 2004.

XU, S.; XU, L. D.; CHEN, X. Determining optimum edible films for kiwifruits using an analytical hierarchy process. **Computers e Operations Research**, v. 30, p. 877–886, 2003.

WOLFF, M. T. **Os avanços na proteção da biotecnologia no Brasil**. 2003. Disponível em: <http://www.ids.org.br/files/20030930_mtw.ppt>. Acesso em: 20 mai. 2014.