



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Utilização de Xilanas no Fabrico de Filmes/Revestimentos Para o Setor Alimentar

Lúcia da Conceição Cardoso Queirós

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Ana Maria Matos Ramos

Coorientadora: Mestre Andreia Filipa Silvestre Duarte

Covilhã, outubro de 2015

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu pai, que vi partir quando ainda tinha tanto a aprender com ele.

À minha mãe, o pilar da minha família.

E aos meus irmãos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Ana Ramos, orientadora da tese, à qual expresso o meu agradecimento pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e total disponibilidade que teve para comigo. Agradeço, também, a oportunidade que me deu de integrar o seu grupo de investigação.

À Mestre Andreia Duarte, pela coorientação e dedicação e pelo tempo despendido para me ajudar.

À Professora Doutora Fernanda Domingues, Diretora do 2º Ciclo do Curso de Biotecnologia, por tornar possível parte deste trabalho.

Um especial agradecimento à Doutora Sónia Sousa pelos conhecimentos transmitidos e pela permanente ajuda prestada, em especial, na execução experimental deste trabalho.

À Doutora Paula Gomes, do Centro de Ótica (CO) e ao Professor Castro Gomes do Centre of Materials and Building Technologies (C-MADE), pelo tempo disponibilizado para a realização dos ensaios de SEM, DSC e TGA.

Aos meus colegas dos Centros de Investigação Fiber Materials and Environment Technologies (FibEnTech) e Ciências da Saúde (CICS).

Aos meus amigos, Ana M., Andreia A., António M., Alzira M., Cátia C., Catarina L., Cláudia B., Diogo L., Joaquim L., Marco M., Susana A., Eduardo L., Hugo M. e João C. que me apoiaram e auxiliaram nesta caminhada. Um especial agradecimento à Patrícia P., que apesar de estar a enfrentar uma fase difícil da sua vida, esteve sempre disponível nos momentos que eu precisava. Obrigada pela vossa amizade. E ainda, à Khrystyna Fedak, minha colega de quarto, pela alegria e motivação transmitida.

Aos meus avós maternos, ao Sr. Artur, já falecidos, e filhos do Sr. Artur por me ajudarem a concretizar este meu percurso.

Por último, à minha mãe dirijo um agradecimento muito especial, pela sua força e coragem, pelo seu amor e abraços fortes de saudade, sem ela este meu percurso académico não seria possível. Ao meu pai, que com muita tristeza minha, não pôde acompanhar o crescimento e formação dos seus filhos, obrigada por nos ter transmitido o seu espírito trabalhador. Aos meus irmãos, Norberto, Raúl, Pedro, Isabel e sobrinhos, pelo amor, alegria e partilha de saber. Espero que esta etapa possa de alguma forma, compensar o apoio que vocês me ofereceram.

“Um otimista nunca cai... Voa até ao chão”
“Tudo o que podes alcançar está à distância da tua coragem para arriscar”
Raul Minh ‘alma

Resumo

A procura de materiais naturais renováveis para produção de filmes comestíveis prende-se essencialmente com aspetos ambientais e de segurança alimentar. Nas últimas décadas tem sido objeto de estudo a tentativa de substituição dos produtos químicos derivados de petróleo por polímeros naturais. As xilanas e seus derivados estão entre os materiais naturais, que têm vindo a ganhar cada vez mais interesse, em aplicações, como filmes comestíveis. Este trabalho tem como objetivo desenvolver filmes de carboximetilxilana (CMX) com possível aplicação no setor alimentar. Numa primeira fase, estudou-se o melhoramento das propriedades mecânicas, hidrofóbicas e antimicrobianas dos filmes usando diversos aditivos, como agar (Ag), carbonato de amónio e zircónio (AZC), ácidos gordos, óleo vegetal, óleo essencial de coentros e glicerol. Posteriormente foram desenvolvidos quatro filmes, CMX:Ag, CMX:AZC, CMX:Ag:Líp (onde Líp é uma mistura de ácido linoleico e óleo vegetal), e CMX (controlo). As suas propriedades mecânicas, barreira, óticas e térmicas foram avaliadas e comparadas. A atividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas alimentares, tais como *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) foi também avaliada. Os filmes obtidos eram transparentes e de cor amarelada. A adição de agar, AZC e Ag:Líp melhorou a tensão de rutura do filme CMX de 4,79 para 27,67; 20,95 e 17,35 MPa respetivamente, sendo o filme CMX:Ag aquele que apresentou melhor tensão de rutura e o filme CMX:AZC melhor módulo de elasticidade. A permeabilidade ao vapor de água (WVP) e a permeabilidade ao oxigénio (OP) foram reduzidas após a incorporação dos aditivos à CMX. A análise térmica mostrou que os filmes CMX:Ag:Líp e CMX:AZC apresentaram melhor estabilidade térmica, comparativamente ao filme controlo. Adicionalmente, o ácido linoleico, incorporado no filme CMX:Ag:Líp revelou possuir boa atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas, *B. cereus* e *S. aureus*. Tendo em conta as características dos filmes desenvolvidos neste estudo, o filme com lípidos será o mais adequado para aplicações alimentares.

Palavras-chave

Filme de carboximetilxilana; propriedades mecânicas; propriedades térmicas, propriedades antimicrobianas.

Abstract

The demand for natural and renewable materials for the production of edible films is essentially associated to environmental issues and food safety. In recent decades, there has been a growing effort to replace chemicals derived from petroleum with natural polymers. The xylan and its derivatives are among the natural materials, which have been gaining more and more interest in applications such as edible films. The aim of this work was to develop carboxymethylxylan films (CMX) with possible application in the food industry. Initially, the improvement of mechanical, hydrophobic and antimicrobial properties of the films were studied by using various additives such as agar (Ag), ammonium zirconium carbonate (AZC), fatty acids, vegetable oil, coriander essential oil, and glycerol. Subsequently, four films were developed, CMX:Ag, CMX:AZC, CMX:Ag:Lip (where Lip is a mixture of linoleic and vegetable oil) and CMX (control). Its mechanical, barrier, optical and thermal properties were evaluated and compared. The antimicrobial activity against food pathogenic bacteria, such as *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) was also evaluated. The obtained films were transparent and yellowish. The addition of agar, AZC and Ag:Lip improved tensile strength of the CMX film from 4,79 to 27,67; 20,95 and 17,35 MPa respectively, with the CMX:Ag film providing the best tensile strength and the CMX:AZC film the best modulus of elasticity. The water vapor permeability (WVP) and the oxygen permeability (OP) decreased after the incorporation of additives to the CMX film. Thermal analysis showed that the CMX:AZC and CMX:Ag:Lip film had better thermal stability. Additionally, linoleic acid, incorporated in the CMX:Ag:Lip film revealed to have a good antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, *B. cereus* and *S. aureus*. This work showed that, taking into account the characteristics of developed films, the film with the lipid may be more suitable for food applications.

Keywords

Carboxymethylxylan films; mechanical properties, thermal properties, antimicrobial properties.

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract.....	xi
Índice	xiii
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Tabelas.....	xviii
Lista de Acrónimos e Abreviaturas.....	xx
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	3
2.1. Biomassa vegetal.....	3
2.2. Carboximetilação da xilana	5
2.3. Aplicação das xilanas e seus derivados.....	6
2.4. Filmes comestíveis e biodegradáveis	8
2.4.1. Propriedades e funções.....	9
2.5. Modificação das propriedades dos filmes	10
2.5.1. Propriedades mecânicas.....	10
2.5.2. Propriedades barreira.....	12
2.5.3. Propriedades antimicrobianas	14
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	15
3.1. Modificação química das xilanas - carboximetilação	15
3.2. Caracterização das xilanas comerciais e carboximetilxilana	15
3.3. Preparação dos filmes.....	15
3.4. Caracterização dos filmes	18
3.4.1. Espessura e gramagem.....	18
3.4.2. Propriedades mecânicas.....	18
3.4.3. Propriedades hidrofóbicas	19
3.4.4. Propriedades térmicas.....	19
3.4.5. Propriedades óticas	19

3.4.6. Microestrutura dos filmes	20
3.4.7. Permeabilidade ao vapor de água	20
3.4.8. Permeabilidade ao oxigênio	21
3.4.9. Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes	22
Capítulo 4 - Discussão e Resultados	23
4.1. Caracterização da carboximetilxilana por RMN.....	23
4.2. Melhoramento das propriedades do filme CMX	24
4.2.1. Análise da resistência mecânica dos filmes.....	24
4.2.2. Análise da hidrofobicidade da superfície dos filmes	26
4.2.3. Análise da atividade antimicrobiana	27
4.3. Caracterização do filme final e dos filmes com agentes de reticulação	30
4.3.1. Propriedades mecânicas.....	30
4.3.2. Propriedades hidrofóbicas	32
4.3.3. Permeabilidade ao vapor de água	33
4.3.4. Permeabilidade ao oxigênio	34
4.3.5. Microestrutura dos filmes	36
4.3.6. Propriedades óticas	38
4.3.7. Propriedades térmicas.....	39
4.3.8. Propriedades antimicrobianas.....	43
Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras	44
Capítulo 6 - Referências Bibliográficas	46
Anexos	56

Lista de Figuras

Figura 1 - Composição da biomassa vegetal, adaptado de Agbor et al. (2014).	3
Figura 2 - Principais monómeros das hemiceluloses, adaptado de Balat et al. (2009) e Walker (2007).	4
Figura 3 - Estrutura da glucuronoxilana (Heinze e Daus, 2011).	4
Figura 4 - Reação da carboximetilação da xilana em meio aquoso, adaptado de Petzold-Welcke et al. (2014).	6
Figura 5 - Estrutura do agar, n - unidades de repetição da agarose (Andrade e Rojas, 2012).	11
Figura 6 - A - estrutura química do AZC, B - cadeia AZC polimerizada em solução aquosa e em C e D - interação do AZC com polímeros (Song et al., 2009).	12
Figura 7 - Estrutura química do ácido linoleico (Byun et al., 2014).	13
Figura 8 - Processo de produção dos filmes, adaptado de Azeredo et al. (2014).	16
Figura 9 - Sistema utilizado (Regmed - modelo PVA/4) para a determinação da WVTR dos filmes.	21
Figura 10 - Espectro de ¹ H RMN da xilana comercial de faixa. Hx Xil corresponde aos prótons presentes nas unidades de D-xilose e Hx AMeGlc aos prótons do ácido 4-O-metilglucurônico. Ax e Eq correspondem às conformações dos prótons, axial e equatorial respectivamente.	23
Figura 11 - Espectro de ¹ H RMN da CMX.....	24
Figura 12 - Tensão de ruptura dos filmes CMX com Agar ou AZC.	25
Figura 13 - Ângulo de contacto dos filmes com as diferentes misturas de ácidos gordos e óleo essencial de coentros; e óleo vegetal com ácido esteárico.	27
Figura 14 - Gráfico típico da tensão vs deformação do filme CMX:AZC.	31
Figura 15 - Ângulo de contacto do filme final e dos filmes com agentes de reticulação finais.	32
Figura 16 - Imagens do SEM da superfície (a) e secção transversal (b) do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.....	37
Figura 17 - Aparência do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.	39
Figura 18 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do filme final e dos filmes com agentes de reticulação. A - TG e B - DTG.....	40
Figura 19 - Curvas DSC do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.	42

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de xilanas e as suas características, adaptado de Gírio et al. (2010) e Peng et al. (2012).	5
Tabela 2 - Compostos maioritários de alguns óleos vegetais, composição expressa em percentagem total de ácidos gordos adaptado de <i>Decreto-Lei no 106/2005 de 29 de Junho do Ministério da agricultura , do desenvolvimento rural e das pescas</i> , (2005).	14
Tabela 3 - Formulações relativas ao estudo das propriedades mecânicas, com 1% de sólidos totais.	16
Tabela 4 - Formulações usadas no estudo da hidrofobicidade dos filmes.	17
Tabela 5 - Formulações do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.	17
Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com AL. A mistura de lípidos está na proporção 1:1. A composição dos filmes está representada no anexo 1.	28
Tabela 7 - Gramagem, espessura e propriedades mecânicas do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.	30
Tabela 8 - Espessura, velocidade de transmissão de vapor de água (WVTR), permeabilidade ao vapor de água (WVP) do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.	33
Tabela 9 - Espessura, velocidade de transmissão de oxigénio (OTR), permeabilidade ao oxigénio (OP) do filme final, dos filmes com agentes de reticulação e de filmes sintéticos.	34
Tabela 10 - Transparência e cor do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.	38
Tabela 11 - Atividade antimicrobiana do filme final.	43

Lista de Acrónimos e Abreviaturas

AMeGlc	Ácido 4-O-metilglucurónico
Ag	Agar
AL	Ácido Linoleico
AO	Ácido Oleico
Ara	Arabinose
AS	Ácido Esteárico
AZC	<i>Ammonium Zirconium Carbonate</i>
CMX	Carboximetilxilana
CO ₂	Dióxido de Carbono
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
GS	Grau de substituição
HDPE	<i>High-Density Polyethylene</i>
HR	Humidade Relativa
LDPE	<i>Low-Density Polyethylene</i>
Líp	Mistura de lípidos (óleo vegetal e ácido linoleico)
SMCA	<i>Sodium Monochloroacetate</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OC	Óleo Essencial de Coentros
OTR	<i>Oxygen Transmission Rate</i>
OV	Óleo Vegetal
OP	<i>Oxygen Permeability</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
PVA	<i>Polyvinyl Alcohol</i>
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
WVP	<i>Water Vapor Permeability</i>
WVTR	<i>Water Vapor Transmission Rate</i>
Xil	Xilose

Capítulo 1 - Introdução

No início do século XX, o aparecimento de plásticos derivados de petróleo permitiu fornecer à indústria alimentar uma grande variedade de materiais sintéticos possíveis de serem usados como embalagens alimentares. Contudo, os combustíveis fósseis são limitados e não-renováveis. Os plásticos, uma vez descartados no meio ambiente, não são biodegradáveis (Azeredo et al., 2014). Segundo a Sociedade Ponto Verde, em Outubro de 2014 o plástico foi um dos recursos menos reciclado, sendo a sua reciclagem de 16% face aos 47% de papel e cartão e 25% de vidro (Sociedade Ponto Verde, 2014). A extensa e contínua eliminação de embalagens alimentares tem levantado preocupações consideráveis sobre os seus efeitos negativos no ambiente, até mesmo a sua incineração pode produzir compostos tóxicos (Azeredo et al., 2014).

Uma vez que as pessoas estão cada vez mais conscientes da natureza limitada dos combustíveis fósseis, torna-se necessário desenvolver e utilizar materiais de base biológica e ambientalmente inofensivos (Costa et al., 2015; Hansen e Plackett, 2008). Na área alimentar, uma das soluções é a utilização de embalagens comestíveis (filmes comestíveis) que podem substituir os materiais sintéticos de embalagem e em algumas situações diminuir a sua utilização. Os filmes podem atuar como uma barreira semipermeável ao vapor de água, oxigénio e dióxido de carbono, entre os alimentos e atmosfera circundante. Os filmes comestíveis podem ainda ser utilizados como veículos de agentes antimicrobianos, os quais irão melhorar a qualidade e a segurança dos alimentos (Costa et al., 2015; Sothornvit, 2014; Valencia-Chamorro et al., 2011).

As hemiceluloses são o segundo biopolímero mais abundante na terra, representando uma fonte de matéria-prima renovável promissora para o fabrico de produtos de alto valor acrescentado. As xilanas são o tipo de hemiceluloses mais abundantes, estando geralmente disponíveis em grandes quantidades nos subprodutos da floresta, agricultura, agroindústrias, madeira e indústrias de papel e celulose (Gírio et al., 2010).

A capacidade das xilanas formarem filme através da adição de plastificante ou modificação química e a sua biodegradabilidade torna-as numa alternativa interessante aos materiais à base de petróleo, atualmente utilizados como embalagens de alimentos (Mikkonen e Tenkanen, 2012).

O objetivo deste trabalho de investigação consiste na utilização de xilanas quimicamente modificadas em filmes com propriedades barreira e antimicrobianas, tendo em vista a sua potencial aplicação na área da embalagem alimentar. Para a concretização deste objetivo o trabalho experimental está dividido em três partes. A primeira parte diz respeito à modificação química das xilanas. A segunda parte, a mais extensa e complexa, diz respeito à seleção de

aditivos, tais como agentes de reticulação, lípidos, e agentes antimicrobianos, para produção dos filmes de xilanas. O uso de aditivos tem como objetivo encontrar um equilíbrio entre as principais propriedades dos mesmos, particularmente, mecânicas, hidrofóbicas e antimicrobianas. A última parte inclui a produção e caracterização alargada das propriedades do filme que incorpore os aditivos anteriormente estudados e que ofereceram os melhores resultados.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1. Biomassa vegetal

A biomassa vegetal é composta por três principais constituintes poliméricos: a celulose, a hemicelulose e a lenhina (Hansen e Plackett, 2008). Estes compostos químicos encontram-se na parede celular das plantas (Figura 1). Tipicamente, a maior parte da biomassa vegetal é constituída por cerca de 10-25% de lenhina, 20-30% de hemicelulose e 40-50% de celulose (Anwar et al., 2014).

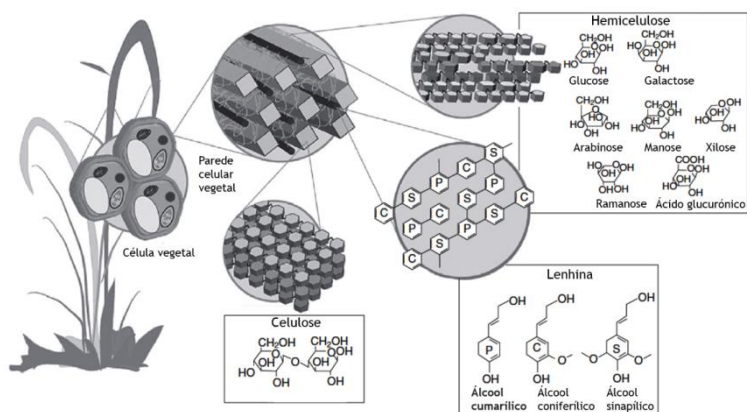


Figura 1 - Composição da biomassa vegetal, adaptado de Agbor et al. (2014).

A celulose é um polímero constituído por cadeias lineares de moléculas de D-glucose, ligadas entre si por ligações glicosídicas 1,4-B-D (Anwar et al., 2014; Rhim e Ng, 2007). A lenhina é a fração mais complexa da biomassa vegetal, é um polímero heterogêneo constituído essencialmente por unidades de fenil-propano ligadas por ligações éter (Anwar et al., 2014). As hemiceluloses são polímeros ramificados com baixo peso molecular e um grau de polimerização (GP) entre 80-200. As suas fórmulas químicas são $(C_5H_8O)_n$ e $(C_6H_{10}O_5)_n$ designadas de pentoses e hexoses, respetivamente (Ren e Sun, 2010). Dependendo da sua origem, as hemiceluloses podem conter uma grande variedade de monossacarídeos, nomeadamente, D-xilose, L-arabinose (pentoses), D-manose, D-glucose, D-galactose (hexoses) e/ou ácidos urónicos como o ácido D-glucurónico, 4-O-metilglucurónico e D-galacturónico, representados na Figura 2. Outros açúcares, como L-ramnose e L-fucose são igualmente encontrados em algumas hemiceluloses, embora em menor quantidade. Os grupos hidroxilo dos açúcares podem ainda ser parcialmente substituídos por grupos acetilo (Albertson e Edlund, 2011; Gírio et al., 2010; Ren e Sun, 2010).

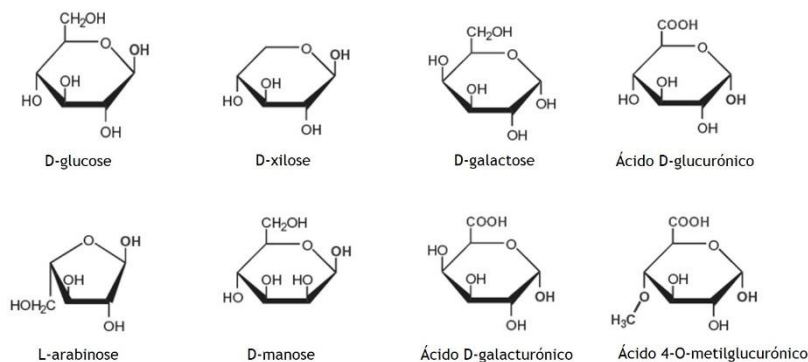


Figura 2 - Principais monómeros das hemiceluloses, adaptado de Balat et al. (2009) e Walker (2007).

As xilanas são o tipo de hemiceluloses mais comuns (Ebringerová e Heinze, 2000). Podem ser encontradas em madeiras de folhosas e resinosa, gramíneas e subprodutos agroindustriais como a palha dos cereais, bagaço da cana-de-açúcar, palha de milho (Deutschmann e Dekker, 2012) e como subproduto da indústria de celulose e papel (Alekhina et al., 2014; Heinze e Daus, 2011). As xilanas consistem numa cadeia principal formada por unidades de xilose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4). Estas unidades de xilose podem ser substituídas com grupos O-acetilo na posição O-2 e/ou O-3, ramificadas na posição C-2 e/ou C-3 com hidratos de carbono, que compreendem o ácido D-glucurónico ou o seu éter 4-O-metil, L-arabinose e/ou vários oligossacarídeos (D-xilose, L-arabinose, D- ou L-galactose e D-glucose) (Albertson e Edlund, 2011; Deutschmann e Dekker, 2012; Mikkonen e Tenkanen, 2012; Ren e Sun, 2010). Estas variações na estrutura das xilanas são influenciadas pela origem botânica e localização na planta. Por exemplo, nas dicotiledóneas, as xilanas são substituídas com resíduos de ácido D-glucurónico, que podem ou não ser 4-O-metilados, este tipo de xilanas, representadas na Figura 3, são designadas de glucuronoxilanas. Além disso, algumas glucuronoxilanas são O-acetiladas (Albertson e Edlund, 2011; Mikkonen e Tenkanen, 2012).

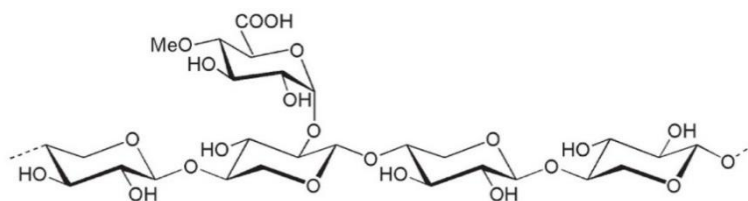


Figura 3 - Estrutura da glucuronoxilana (Heinze e Daus, 2011).

Enquanto nas monocotiledóneas, a L-arabinose ligada por (1 \rightarrow 2) e/ou (1 \rightarrow 3) são os principais substituintes das xilanas, sendo conhecidas como arabinoxilanas (Mikkonen e Tenkanen, 2012; Ren e Sun, 2010). A Tabela 1 apresenta os diferentes tipos de xilanas presentes na biomassa vegetal.

Tabela 1 - Tipos de xilanas e as suas características, adaptado de Gírio et al. (2010) e Peng et al. (2012).

Polissacarídeo	Origem Botânica	Quantidade ^a	Unidades			GP ^b
			Cadeia principal	Cadeias laterais	Ligações	
Glucuronoxilana	Folhosas	15 - 30	D-Xil	AMeGlc Acetilo	α -(1→2)	100-200
Arabinoxilana	Gramíneas	0,15 - 30	D-Xil	L-Ara	α -(1→2) α -(1→3)	
Arabinoglucuronoxilana	Gramíneas e Resinosas	5 - 10	D-Xil	AMeGlc α L-Ara	α -(1→2) α -(1→3)	50-185
Glucuronoarabinoxilana	Gramíneas e cereais	15 - 30	D-Xil	AMeGlc α -Ara Acetilo	α -(1→2) α -(1→3)	
Homoxilana	Algas		D-Xil ^c			

^a% em biomassa seca; ^bGrau de polimerização; ^cA cadeia principal também pode conter ligações β -(1→3)

2.2. Carboximetilação da xilana

As hemiceluloses possuem grupos hidroxilo livres distribuídos ao longo da sua cadeia principal e cadeias laterais, sendo, por conseguinte, ideais para a modificação química (Ren e Sun, 2010). A modificação química das hemiceluloses tem sido investigada com o objetivo de introduzir novos grupos funcionais e novas propriedades (Albertson e Edlund, 2011; Ren e Sun, 2010). A xilose, monómero da xilana, contém dois grupos hidroxilo facilmente acessíveis, oferecendo várias possibilidades de modificações químicas, por exemplo através de reações de esterificação e eterificação (metilação, quaternização, benzilação e carboximetilação) (Albertson e Edlund, 2011; Ren e Sun, 2010; Tanodekaew et al., 2006).

A carboximetilação é um dos procedimentos mais versáteis de funcionalização química, uma vez que, proporciona o acesso a materiais biológicos com propriedades valiosas, tais como o aumento ou melhoria da solubilidade dos polissacarídeos em água (Ebringerová, 2012; Ren e Sun, 2010), e ainda a capacidade de formar filme (Ren et al., 2008).

A carboximetilxilana (CMX) é um polímero aniônico solúvel em água, que pode ser obtido pela introdução de grupos carboximetil (Petzold et al., 2006; Petzold-Welcke et al., 2014). Este polímero resulta do tratamento da xilana com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), monocloroacetado de sódio (SMCA) e álcool como meio de precipitação, resultando na substituição dos grupos hidroxilo da xilose pelo grupo carboximetil de sódio (CH₂COO⁻ Na⁺) (Figura 4) (Petzold et al., 2006).

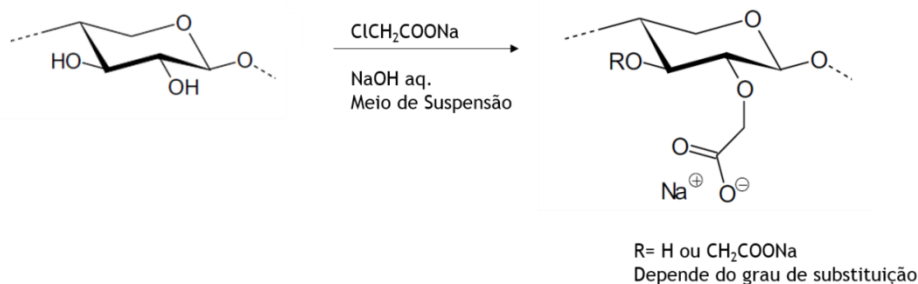


Figura 4 - Reação da carboximetilação da xilana em meio aquoso, adaptado de Petzold-Welcke et al. (2014).

2.3. Aplicação das xilanas e seus derivados

As hemiceluloses, em contraste com outros polissacarídeos de origem vegetal, não têm valor comercial comparável. Contudo, não deixam de ser menos importantes, isto porque as hemiceluloses e os seus derivados são importantes na indústria devido às suas propriedades químicas e atividade biológica (Sabater et al., 2013).

As xilanas e seus derivados tornam-se cada vez mais atrativos em aplicações alimentares e não alimentares. No que diz respeito às aplicações das xilanas nativas, a investigação está orientada para áreas como a nutrição, saúde e ainda para a resolução de problemas ambientais através da substituição das matérias-primas petroquímicas por biomassa vegetal. No que concerne à área da nutrição, as xilanas nativas são usadas como aditivos alimentares. Dependendo do tipo de xilana, esta pode apresentar propriedades funcionais, como gelificação, atividade antioxidante, fibra dietética e prebióticos. As xilanas podem ainda ser usadas como filmes e revestimentos comestíveis para embalagens alimentares (Ebringerová, 2012). Na saúde, as xilanas têm como aplicações, o transporte de drogas, auxílio no tratamento de feridas e suplementos para reforço imunológico. As xilanas têm também sido identificadas como excelente fonte para produção de xilooligosacarídeos (XO). Os XO exibem efeitos prebióticos devido à sua capacidade de modular a função intestinal, promovendo o crescimento das bifidobactérias. No entanto, a sua aplicação mais importante é como aditivo para alimentos funcionais (Ebringerová, 2012; Moure et al., 2006).

A investigação sobre modificação de xilanas para aplicações específicas aumentou significativamente nos últimos anos. As investigações incluem o uso de derivados de xilana para produção de hidrogéis, os quais podem ser usados em áreas, como a cosmética, farmacêutica e médica; micro e nanopartículas, as quais são atualmente empregues numa gama alargada de aplicações, tais como embalagem e sistemas de entrega de drogas; biossurfactantes (Ebringerová, 2012); agentes antimicrobianos; inibidores da coagulação do sangue (Petzold-Welcke et al., 2014); ou ainda como aditivos e flocculantes no fabrico do papel (Ebringerová, 2012; Petzold-Welcke et al., 2014). Nos últimos anos tem sido realizada alguma investigação,

no sentido de desenvolver e melhorar as propriedades dos filmes de xilanas e seus derivados para aplicação em embalagens alimentares. Gröndahl et al. (2004) avaliaram o uso de glucuronoxilanas, isoladas a partir de madeira de faia, como potencial aplicação para embalagens de alimentos. Neste estudo foi avaliado o efeito da incorporação de plastificantes, xilitol e sorbitol, na formação do filme de glucuronoxilana. Concluíram que a plastificação de glucuronoxilana com xilitol ou sorbitol permite a formação de um filme transparente, contínuo e flexível. Os filmes preparados apenas com glucuronoxilana apresentavam-se bastante quebradiços. Hansen et al. (2012) efetuaram o primeiro estudo sobre filmes compósitos de xilana da bétula e celulose nanofibrilar (CNF). O estudo consistiu na avaliação dos filmes compósitos com vários plastificantes: glicerol, sorbitol e metoxipolietilenoglicol (MPEG). Em relação às propriedades mecânicas, os filmes compósitos de xilana:CNF não plastificados mostraram um aumento da rigidez e resistência com o aumento do teor de CNF. A inclusão de qualquer um destes plastificantes diminuiu as propriedades mecânicas dos filmes. Quanto às propriedades barreira, a permeabilidade ao vapor de água (WVP - *Water vapor Permeability*) dos filmes compósitos de xilana:CNF aumentou com a adição de glicerol e MPEG. No entanto, uma diminuição foi observada com a adição de sorbitol. Na permeabilidade ao oxigénio (OP - *Oxygen Permeability*), a presença de glicerol e MPEG aumentou a OP dos filmes de forma significativa, enquanto a utilização de 10% de sorbitol reduziu a OP. Alekhina et al. (2014) investigaram o uso da CMX, com diferentes graus de substituição (GS), para a produção de filmes e revestimentos. Relativamente aos resultados obtidos, o filme com menor GS apresentava uma tensão de rutura e módulo de elasticidade superior ao filme com maior GS, apresentava ainda, menor WVP. Contrariamente, o filme com maior GS apresentou menor OP comparativamente ao filme com menor GS. Este trabalho mostrou que o GS afeta as propriedades mecânicas e barreira dos filmes de CMX. Segundo os investigadores, os filmes de CMX apresentavam propriedades barreira ao oxigénio adequadas para serem aplicados como embalagem ou revestimento de frutas e legumes. Gordobil et al. (2014) estudaram as propriedades mecânicas e térmicas de filmes compósitos de xilana e celulose, ambas acetiladas. Mostraram que a acetilação da xilana permite obter filmes com maior carácter hidrofóbico, estabilidade térmica elevada e melhores propriedades mecânicas comparativamente ao filme hidrofílico de xilana e celulose nativas. Um interessante pormenor deste estudo é a aparência dos filmes, o filme compósito de xilana e celulose, ambas acetiladas, mostrou uma aparência completamente transparente e sem cor amarelada em contraste com o filme compósito de xilana e celulose nativas que apresentou cor amarelada.

2.4. Filmes comestíveis e biodegradáveis

A crescente procura, por parte dos consumidores, de alimentos com elevada qualidade, o aumento da vida útil do produto alimentar, o aumento da sensibilização por questões ambientais, bem como, o esgotamento gradual das reservas de petróleo fez com que as indústrias de alimentos e embalagens tivessem a necessidade de determinar novas formas de proteção para os alimentos (Ghasemlou et al., 2011; Kowalczyk e Baraniak, 2014). Em resposta a estas questões, os materiais biodegradáveis têm sido propostos para uso em embalagens de alimentos. Alguns materiais biodegradáveis usados, tais como as proteínas e polissacarídeos, são também comestíveis, e podem ser utilizados para desenvolver embalagens comestíveis, designadas de filmes comestíveis (Azeredo et al., 2014).

Os filmes comestíveis são estruturas independentes preparadas separadamente dos alimentos, e posteriormente aplicadas sobre a superfície do alimento ou entre componentes alimentares, podendo também servir como bolsas comestíveis onde os alimentos poderão ser selados. (Azeredo et al., 2014). Uma das técnicas de produção do filme é através do método de evaporação do solvente (*solvent casting*). Este método consiste na solubilização do polímero, seguido de secagem por evaporação do solvente (Silva-Weiss et al., 2013). A fim de manter a comestibilidade são usados como solventes apenas água ou etanol (Han, 2014a). Os filmes comestíveis, normalmente, não são feitos para substituir completamente os materiais tradicionais de embalagem, mas sim, para proporcionar uma melhoria na eficiência das embalagens de alimentos. Estes filmes podem ser usados para prolongar a estabilidade dos alimentos através da redução das trocas de humidade, oxigénio, dióxido de carbono e ainda, migração de lípidos e de compostos responsáveis pelo sabor para o meio envolvente. Podem também ser usados como suportes de aditivos e nutrientes. Os filmes comestíveis podem igualmente reduzir o custo e a quantidade de materiais de embalagem convencionais (Azeredo et al., 2014; Campos et al., 2011; Janjarasskul e Krochta, 2010).

No que diz respeito aos materiais utilizados para produzir filmes comestíveis e biodegradáveis, estes dividem-se em duas categorias principais: uma matriz, que normalmente consiste numa macromolécula capaz de formar uma estrutura coesiva, e um plastificante. Adicionalmente, outros componentes podem ser incorporados para melhorar determinadas funcionalidades dos filmes (Azeredo et al., 2014; Fernández-Pan e Caballero, 2011).

Os materiais utilizados para formar a matriz estrutural tridimensional são biopolímeros e lípidos. Os biopolímeros normalmente utilizados são hidrocolóides que podem ser classificados em dois grupos: as proteínas e os polissacarídeos (Fernández-Pan e Caballero, 2011). Os polissacarídeos são abundantes na natureza, têm baixo custo e são biodegradáveis. Por conseguinte, vários polissacarídeos têm sido estudados como potenciais agentes formadores de filmes comestíveis. A celulose e seus derivados, extratos de algas marinhas (Sothornvit, 2014), e mais recentemente as xilanas e seus derivados, são exemplos de polissacarídeos usados como

materiais para a produção de filmes comestíveis (Alekhina et al., 2014; Costa et al., 2015; Escalante et al., 2012; Hansen et al., 2012; Kayserilioğlu et al., 2003). Os filmes de polissacarídeos são caracterizados por apresentarem uma boa barreira ao oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2). Contudo, devido à sua natureza hidrofílica, estes filmes apresentam uma fraca barreira ao vapor de água e elevada sensibilidade à humidade, o que poderá afetar significativamente as suas propriedades funcionais (Azeredo et al., 2014; Janjarasskul e Krochta, 2010). Na tentativa de ultrapassar este problema têm sido usados lípidos na preparação dos filmes para aumentar a sua hidrofobicidade (Sothornvit, 2014). Os lípidos, ao contrário dos polissacarídeos, não são biopolímeros e esta sua natureza não polimérica limita a sua capacidade de formar filmes coesivos (Fernández-Pan e Caballero, 2011; Janjarasskul e Krochta, 2010). Deste modo, os lípidos são usados como componentes de filmes composto por biopolímeros, por exemplo o uso de polissacarídeos proporcionará a integridade estrutural e os lípidos conferem o carácter hidrofóbico, melhorando assim a barreira ao vapor de água (Azeredo et al., 2014). A adição de lípidos tem como desvantagens um gosto e textura cerosa, superfície gordurosa e potencial rancidez (Janjarasskul e Krochta, 2010). Além disso, a concentração do lípido tem um efeito importante nas propriedades mecânicas do filme. A adição de lípidos a uma matriz polimérica reduz a tensão de rutura e módulo de elasticidade, resultando um filme pouco resistente e quebradiço (Pérez-Gago e Rhim, 2014). Quando os biopolímeros e lípidos são combinados os filmes produzidos designam-se por filmes compósitos, tal como os filmes com mistura de biopolímeros (Fernández-Pan e Caballero, 2011; Han, 2014b).

Os filmes de polissacarídeos são frequentemente rígidos e quebradiços devido às numerosas interações intermoleculares originadas. Assim, para ultrapassar este problema, recorre-se ao uso de plastificantes (Han, 2014a; Sothornvit, 2014). Os plastificantes são agentes hidrofílicos de baixo peso molecular e essenciais na produção de filmes. São incorporados nas formulações para diminuir as forças intermoleculares entre as cadeias dos polímeros, resultando numa maior flexibilidade e alongamento do filme (Janjarasskul e Krochta, 2010; Valencia-Chamorro et al., 2011). Comparativamente ao sorbitol e ao polietilenoglicol (PEG), o glicerol é o plastificante mais utilizado devido à sua melhor estabilidade e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas hidrofílicas (Campos et al., 2011).

2.4.1. Propriedades e funções

A qualidade de uma grande parte dos produtos alimentares deteriora-se devido a fenómenos de transferência de massa que ocorrem entre os alimentos e o ambiente, nomeadamente desidratação da superfície, adsorção de humidade, ganho ou perda de aromas e captação de oxigênio. A principal função dos filmes comestíveis é oferecer uma barreira de proteção contra estes fenómenos (Fernández-Pan e Caballero, 2011; Han, 2014a). As propriedades barreira mais comumente estudadas são a permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio (Valencia-Chamorro et al., 2011). A presença de água nos alimentos está envolvida em muitas reações biológicas e

químicas, tais como oxidação lipídica, crescimento microbiano e alterações na textura e cor. Quanto à presença de oxigênio, este está envolvido na oxidação dos componentes alimentares e no crescimento microbiano (Sothornvit, 2014).

Além das propriedades barreira, os filmes comestíveis também devem manter a integridade do alimento, fornecendo alguma proteção mecânica (Valencia-Chamorro et al., 2011). Normalmente, os filmes devem ser resistentes à quebra, para proteger a estrutura do alimento, e flexíveis, para que se possam adaptar à possível deformação do alimento sem que se rompam durante o seu transporte, manuseamento e exposição (Guilbert et al., 1996; Pavlath e Orts, 2009).

Uma importante característica dos filmes comestíveis é a capacidade de incorporarem aditivos alimentares com o propósito de melhorar a qualidade dos alimentos, estabilidade e segurança. Esses aditivos incluem, antioxidantes, agentes antimicrobianos, aromas e nutrientes (Fernández-Pan e Caballero, 2011; Zaritzky, 2011).

2.5. Modificação das propriedades dos filmes

Conforme já referido anteriormente, os filmes devem cumprir uma série de requisitos específicos (barreira ao vapor de água e gases, cor e aparência, características mecânicas e não apresentarem toxicidade). Estas propriedades estão dependentes do tipo de materiais usados, bem como do processo de produção do filme e parâmetros utilizados na produção dos mesmos (Guilbert et al., 1996). Muitos esforços têm sido feitos com o intuito de melhorar as propriedades dos filmes à base de polissacarídeos, nomeadamente, através da modificação química dos grupos hidroxilo presentes nos mesmos, reações de reticulação, e a adição de outros polissacarídeos e lípidos (Janjarasskul e Krochta, 2010; Rhim e Ng, 2007). No contexto deste trabalho de investigação, seguidamente serão abordados aspetos importantes ao nível do melhoramento das principais propriedades dos filmes.

2.5.1. Propriedades mecânicas

O melhoramento das propriedades mecânicas dos filmes à base de polissacarídeos pode ser alcançado através da mistura com outros polímeros naturais (Ebringerová, 2012). Os polissacarídeos têm a potencialidade de interagir quimicamente com outros polímeros para formar géis que podem ser, adequadamente, transformados em filmes (Venugopal, 2011).

O agar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas (Sousa et al., 2015). É composto por uma mistura de agarose e agarpectina. No entanto, o agar comercial é constituído maioritariamente por agarose uma vez que a maior parte da agarpectina é

removida durante o processamento (Nieto, 2009). A agarose é um polímero linear composto por unidades alternadas de D-galactose ligadas entre si por ligações 1,3 e unidades de 3,6-anidro-L-galactose ligadas entre si por ligações 1,4 (Figura 5) (Nieto, 2009). O agar é utilizado principalmente como agente de gelificação, espessamento ou estabilizador em diversas áreas, como alimentação, biotecnológica, biomédica e farmacêutica (Sousa et al., 2015). Devido à combinação das suas propriedades, tais como biodegradabilidade, renovabilidade, poder de gelificação e facilidade de extração, o agar tem sido considerado como um polímero promissor para utilização futura em plásticos biodegradáveis (Wu et al., 2009). Vários investigadores testaram com sucesso a capacidade do agar na formação de filmes, por exemplo, Wu et al. (2009) investigaram filmes compósitos de agar e de amido de batata. Concluíram que a adição de agar melhorou a resistência mecânica dos filmes compósitos comparativamente ao filme feito só com amido de batata.

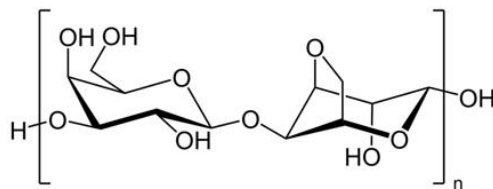


Figura 5 - Estrutura do agar, n - unidades de repetição da agarose (Andrade e Rojas, 2012).

Outra forma de melhorar a resistência mecânica é através da incorporação de agentes de reticulação na preparação do filme. Para além de melhorarem a resistência mecânica, podem também melhorar as propriedades barreira dos mesmos (Galiotta et al., 1998). Os agentes de reticulação são moléculas naturais ou sintéticas que possuem pelo menos dois grupos reativos que são capazes de formar ligações inter e/ou intramoleculares entre as cadeias poliméricas (Mikkonen et al., 2012). Estes agentes podem reagir com as hemiceluloses estabelecendo ligações entre elas ou reagir com eles próprios e reter fisicamente as hemiceluloses. Quando o agente de reticulação reage com as cadeias poliméricas das hemiceluloses, diferentes tipos de ligações químicas podem ser formadas, nomeadamente, iónicas, covalentes ou ligações de hidrogénio, sendo as ligações covalentes as mais estáveis (Gröndahl et al., 2013). Apresenta-se como exemplo de agentes de reticulação o glioxal e carbonato de amónio e zircónio (AZC) (Gröndahl et al., 2013).

O glioxal é o menor aldeído existente, forma ligações hemiacetais com grupos hidroxilo, muitos dos quais estão presentes nos polissacarídeos (Mikkonen et al., 2012). Mikkonen et al. (2012) investigaram um tipo de hemicelulose, galactoglucomanas, reticulada com glioxal. Os investigadores concluíram que a adição de glioxal melhorou as propriedades mecânicas dos filmes, nomeadamente a tensão de rutura e módulo de elasticidade, e ainda a WVP.

O AZC é um sal inorgânico solúvel em água, onde os átomos de zircônio estão polymerizados através de grupos hidroxilo. Os íons de amônio (NH_4^+), em soluções de AZC são libertados na água e podem formar pontes de hidrogénio, por exemplo com os grupos hidroxilo dos polissacarídeos, formando um polissacarídeo pseudo catiónico, que pode ligar íons carbonato de zircônio através de atrações iónicas (Figura 6 - C). Durante o aquecimento e posterior secagem e formação do filme, NH_3 e CO_2 são libertados, o que resulta na formação de uma rede de ligações de hidrogénio entre os polissacarídeos e AZC (Figura 6 - D) (Mikkonen, 2013; Wang et al., 2013). Mikkonen et al. (2013) investigaram o potencial uso do AZC em filmes de galactoglucomananas com o objetivo de melhorar a formação do filme, bem como as suas propriedades mecânicas, e sensibilidade à humidade. Os investigadores mostraram que o AZC pode ser utilizado com sucesso para aumentar as interações entre os componentes do filme, sugerindo que o mecanismo de reticulação é feito através de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo das galactoglucomananas com o AZC. Obtiveram filmes relativamente fortes e com redução da sensibilidade à humidade.

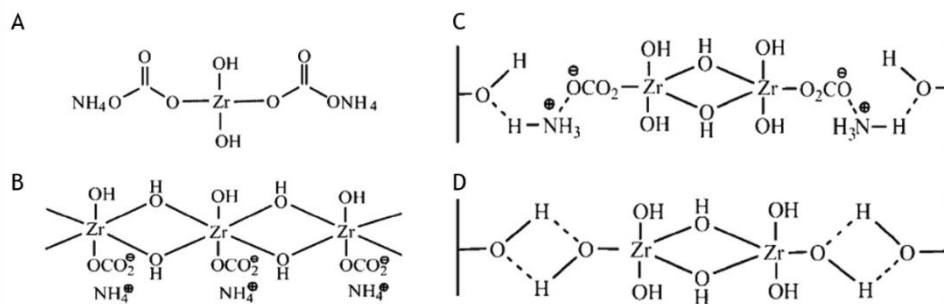


Figura 6 - A - estrutura química do AZC, B - cadeia AZC polymerizada em solução aquosa e em C e D - interação do AZC com polímeros (Song et al., 2009).

2.5.2. Propriedades barreira

A adição de lípidos tem sido uma das estratégias selecionada pela maioria dos investigadores, para reduzir a permeabilidade ao vapor de água. A modificação da estrutura do polímero através de uma reação de reticulação é outra possibilidade proposta por Campos et al. (2011).

Os lípidos são um grupo de substâncias quimicamente heterogéneas possuindo em comum a propriedade de insolubilidade em água (Gurr et al., 2002). Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos com cadeias alifáticas longas e estão entre os vários derivados lipídicos que podem potencialmente melhorar as propriedades barreira à humidade dos filmes hidrofílicos (Ghasemlou et al., 2011).

A incorporação dos lípidos nos filmes faz com que os mesmos tenham uma baixa afinidade pela água, a qual, é devida à sua baixa polaridade (Janjarasskul e Krochta, 2010; Morillon et al.,

2002). A polaridade dos lípidos depende da distribuição de grupos químicos, do comprimento das cadeias alifáticas, e da presença e grau de insaturações. Lípidos com cadeias mais longas e menor número de insaturações têm uma melhor barreira contra o vapor de água, o que está relacionada com a sua baixa polaridade. Por outro lado, lípidos com um caráter mais polar apresentam uma maior afinidade para os polissacarídeos quando estão em emulsões, produzindo filmes mais homogêneos e evitando a separação da fase lipídica. Em resumo, a adição de lípidos reduz o rácio entre o caráter hidrofóbico - hidrofílico dos filmes, o qual diminui a sua solubilidade em água e portanto a sua permeabilidade ao vapor de água (Azeredo et al., 2014). Concluindo, a eficiência dos materiais lipídicos nos filmes compósitos depende da sua estrutura, disposição química, hidrofobicidade, estado físico e das interações dos lípidos com os outros componentes dos filmes (Pérez-Gago e Rhim, 2014).

O ácido esteárico, palmítico, oleico e linoleico são alguns dos ácidos gordos mais usados em filmes comestíveis (Fernández-Pan e Caballero, 2011). Estes ácidos gordos apresentam um comprimento de cadeia entre 16 a 18 átomos de carbono, sendo que, o ácido oleico e o linoleico são ácidos gordos insaturados, ou seja, contêm ligações duplas (Pérez-Gago e Rhim, 2014). A Figura 7 apresenta um exemplo da estrutura química de um ácido gordo, o ácido linoleico.

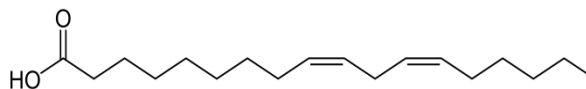


Figura 7 - Estrutura química do ácido linoleico (Byun et al., 2014).

Outro exemplo de derivados lipídicos é o uso de óleos vegetais (Pérez-Gago e Rhim, 2014). O óleo vegetal é uma gordura vegetal líquida à temperatura ambiente, obtida de frutos ou sementes (*Decreto-Lei no 106/2005 de 29 de Junho do Ministério da agricultura , do desenvolvimento rural e das pescas, 2005*). A Tabela 2 apresenta a composição de alguns óleos vegetais disponíveis no mercado. Cerqueira et al. (2012) no estudo sobre a influência do óleo de milho na permeabilidade ao vapor de água em filmes de galactomananas concluíram que a incorporação de óleo diminui a WVP do filme controle.

Tabela 2 - Compostos maioritários de alguns óleos vegetais, composição expressa em percentagem total de ácidos gordos adaptado de *Decreto-Lei no 106/2005 de 29 de Junho do Ministério da agricultura , do desenvolvimento rural e das pescas, (2005).*

Ácido gordo	Óleo de semente de girassol	Óleo de soja	Óleo de milho	Óleo de amendoim
Palmítico	5,0 - 7,6	8,0 - 13,5	8,6 - 16,5	8,0 - 14,0
Esteárico	2,7 - 6,5	2,0 - 5,4	ND - 3,3	1,0 - 4,5
Oleico	14,0 - 39,4	17,7 - 28,0	20,0 - 42,2	35,0 - 67,0
Linoleico	48,3 - 74,0	49,8 - 59,0	34,0 - 65,6	13,0 - 43,0

ND - não detetável, definida como $\leq 0,05\%$

2.5.3. Propriedades antimicrobianas

A contaminação microbiana ainda é uma preocupação em países desenvolvidos, uma vez que reduz a vida útil e segurança dos alimentos (Dashipour et al., 2015). Odores indesejáveis e alterações no aroma, cor e textura podem ser acelerados devido ao crescimento de microrganismos. Além disso, alguns microrganismos e as suas toxinas podem causar surtos alimentares graves (Corrales et al., 2014).

Em alimentos sólidos ou semissólidos, o crescimento microbiano ocorre principalmente na sua superfície. Como referenciado anteriormente, filmes comestíveis possuem a capacidade de incorporarem aditivos alimentares com o propósito de melhorar a qualidade dos alimentos, nomeadamente a incorporação de agentes antimicrobianos, que podem melhorar a função protetora dos filmes, através da prevenção e retardamento do crescimento microbiano (Campos et al., 2011; Corrales et al., 2014). A principal vantagem desta tecnologia reside na taxa de difusão do agente antimicrobiano, a qual pode ser retardada, mantendo desse modo as altas concentrações dos agentes antimicrobianos na superfície do produto por períodos de tempo prolongados (Sánchez-González et al., 2011).

Os óleos essenciais estão entre os vários compostos naturais utilizados como agentes antimicrobianos (Valencia-Chamorro et al., 2011). São compostos voláteis, com um odor forte produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários (Dashipour et al., 2015). O Coentro (*Coriandrum sativum L.*) é uma planta aromática bem conhecida amplamente usada como tempero nas indústrias de alimentos. O óleo de sementes de coentros é um dos 20 principais óleos essenciais no mercado mundial e é conhecido por exercer atividade antimicrobiana (Silva et al., 2011b). A sua atividade antimicrobiana já foi demonstrada contra diferentes bactérias Gram-positivas e negativas e fungos (Silva et al., 2011a, 2011b).

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Modificação química das xilanas - carboximetilação

Numa primeira fase deste trabalho de investigação realizou-se a modificação química da xilana nativa, para posteriormente produzir os filmes. A modificação da xilana nativa foi realizada de acordo com o método descrito por Petzold et al. (2006). Dissolveu-se 10 g de xilanas (Sigma) em 50 mL da solução aquosa de NaOH (Pronalab) a 25% (m/v). A dissolução foi feita à temperatura de 30°C durante 4 horas de forma a garantir a dissolução total das xilanas. Após este período, adicionou-se 70 mL de 2-propanol (Merck), sendo a mistura reacional vigorosamente agitada à mesma temperatura durante 30 minutos. Posteriormente adicionou-se 8,78 g de SMCA (Sigma-aldrich), tendo-se, de seguida, aumentado a temperatura para 65°C. A reação com o SMCA decorreu durante 70 min. A mistura reacional foi neutralizada com uma solução de ácido acético (Pronalab) 2 M. As xilanas modificadas, carboximetilxilanas, foram precipitadas com etanol e recuperadas por filtração sob vácuo. Na filtração, as carboximetilxilanas foram lavadas uma vez com 100 mL de etanol aquoso a 65% (v/v) e quatro vezes com 100 mL de etanol. O produto foi seco à temperatura ambiente. O procedimento descrito foi repetido várias vezes, de forma a obter uma quantidade suficiente de carboximetilxilanas para a preparação dos filmes. Posteriormente, fez-se a caracterização das carboximetilxilanas por RMN.

3.2. Caracterização das xilanas comerciais e carboximetilxilana

A estrutura química das xilanas comerciais e carboximetilxilanas foi caracterizada por ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de próton (¹H) foram registados num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz. As xilanas foram dissolvidas em água deuterada. Os desvios químicos (ppm) foram calibrados em relação aos sinais de TMSP, usado como padrão interno.

3.3. Preparação dos filmes

Na segunda fase deste trabalho estudou-se a incorporação de diferentes aditivos na formulação do filme de CMX com o objetivo de melhorar as suas propriedades mecânicas, hidrofóbicas e antimicrobianas. Esta secção encontra-se subdividida em 3 partes: a primeira parte compreende a análise das propriedades mecânicas, na qual se avaliou a incorporação de agentes de reticulação, nomeadamente AZC, glioxal e o polímero, agar. Na segunda parte avaliou-se a hidrofobicidade dos filmes após a incorporação de ácidos gordos e óleos na formulação. Por último, estudou-se a atividade antimicrobiana dos filmes após a incorporação de óleo essencial de coentros. Com o objetivo de preparar um filme que apresentasse uma

harmonia entre as propriedades previamente estudadas, na parte final do trabalho experimental elaborou-se uma formulação contendo o conjunto dos aditivos que apresentaram melhores resultados.

Os filmes de CMX com os respectivos aditivos foram preparados pelo método de evaporação do solvente. Foram realizadas várias formulações nas diferentes etapas deste estudo de acordo com o seguinte procedimento. Dissolveu-se a CMX em água destilada, à temperatura ambiente, de seguida, adiciona-se o glicerol (Merck), como plastificante. A mistura foi mantida sob agitação magnética durante 5 min. Posteriormente foi adicionado o aditivo para modificação das propriedades mecânicas. Nesta parte do procedimento a solução é aquecida e mantida sob agitação. Nas formulações com lípidos, estes são adicionados à solução anterior seguindo-se duas etapas de homogeneização (homogeneizador Ultra-Turrax T25 da marca IKA). Uma primeira etapa a 7600 rpm durante 2 min, e uma segunda etapa, mais intensa, a 12000 rpm durante 2 min. A mistura final foi vertida para uma caixa de Petri e colocada na estufa. No final da secagem, obteve-se o filme. Na Figura 8 está representado um esquema geral do procedimento para a produção dos filmes.

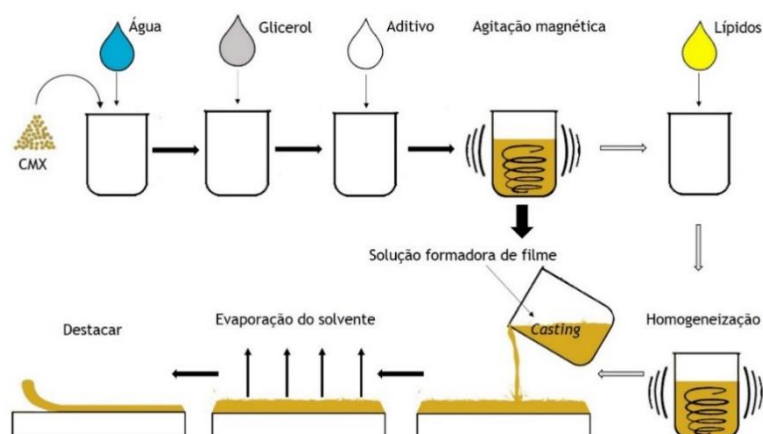


Figura 8 - Processo de produção dos filmes, adaptado de Azeredo et al. (2014).

Os aditivos usados para o estudo das propriedades mecânicas foram: AZC (Sigma-aldrich), glioxal (Merck) e o agar (SAFC). As formulações testadas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Formulações relativas ao estudo das propriedades mecânicas, com 1% de sólidos totais.

Polímero/Plastificante Aditivo	%CMX					%Glicerol
	0,45	0,47	0,5	0,54	0,52	
Glioxal			0,2			0,30
AZC		0,23	0,2	0,16		
Agar	0,25	0,23	0,2	0,16		
Agar			0,25		0,23	0,25
AZC					0,23	

A temperatura de secagem das formulações com agar, AZC e glioxal foi 70, 30 e 60°C, respetivamente.

Os lípidos usados no estudo da hidrofobicidade dos filmes de CMX foram os ácidos: esteárico (AS) (Merck), oleico (AO) (Merck), linoleico (AL) (TCI) e óleo vegetal (OV) (supermercado). No estudo da hidrofobicidade foram realizadas misturas de um ácido gordo com um óleo (óleo essencial de coentros (OC) (Sigma - Aldrich) ou OV) na proporção 1:2. A quantidade desta mistura, nas formulações, foi de 0,1% em relação aos sólidos totais. As formulações, com 1% de sólidos totais estão resumidas na Tabela 4. Os filmes produzidos nesta etapa foram usados para avaliar a atividade antimicrobiana.

Tabela 4 - Formulações usadas no estudo da hidrofobicidade dos filmes.

Formulação base	Mistura de óleos com ácidos gordos
0,47% CMX, 0,23% Agar, 0,2% Glicerol	OC + AS
	OC + AL
	OC + AO
	OV + AS

A temperatura de secagem das formulações foi de 30°C

Para a preparação do filme final usou-se o procedimento descrito anteriormente. Adicionalmente prepararam-se mais dois filmes, um reticulado com o AZC e outro com agar. É de salientar que em todos os filmes foram realizadas as duas etapas de homogeneização. As formulações do filme final e dos filmes com agentes de reticulação estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Formulações do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.

Formulações	%CMX	%Agar	%AZC	%Lípidos	%Glicerol
Controlo	0,50				0,25
CMX:Ag	0,50	0,25			0,25
CMX:AZC	0,50		0,25		0,30
CMX:Ag:Líp (Final)	0,50	0,25		0,70	0,20

Lípidos (mistura de ácido linoleico e óleo vegetal), na proporção de 1:1.

A temperatura de secagem das formulações foi de 30°C

3.4. Caracterização dos filmes

3.4.1. Espessura e gramagem

A espessura dos filmes foi determinada num micrómetro (Adamel Lhomargy model MI 20). As medições foram feitas em seis posições aleatórias do filme. A gramagem (G) dos filmes foi obtida através da razão entre a massa do filme e a área do mesmo, expressa em g/m².

3.4.2. Propriedades mecânicas

A avaliação das propriedades mecânicas dos filmes foi feita com base no ensaio de resistência à tração tendo por base a norma ISO 1924/2. Os filmes foram cortados em provetes com 80 mm de comprimento e 15 mm de largura. As propriedades de tração foram avaliadas em quatro provetes de dois filmes. O ensaio foi realizado no equipamento Thwing-Albert Instrument Co., à velocidade 10 mm/min e com uma distância inicial das garras de 50mm. As propriedades mecânicas (tensão de rutura, índice de tração e módulo de elasticidade) foram determinadas a partir do gráfico de tensão versus deformação.

A tensão de rutura (σ), expressa em MPa, é a força máxima (F) exercida por área da secção transversal do provete, equação 1.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (1)$$

O índice de tração (IT), expresso em Nm/g, é determinado pela razão entre a resistência à tração (S) e a gramagem do filme, equação 2. A resistência à tração é a razão entre a força máxima de rutura e a largura do provete.

$$IT = \frac{S}{G} \quad (2)$$

O módulo de elasticidade (E), expresso em MPa, é a razão entre a tensão de rutura e a deformação (ε), na região elástica da curva de tensão vs deformação, conforme a equação 3, onde L e L₀, são, respetivamente, os comprimentos final e inicial do provete.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \left(\frac{\frac{\sigma}{L - L_0}}{L_0} \right) \quad (3)$$

3.4.3. Propriedades hidrofóbicas

A hidrofobicidade da superfície dos filmes foi avaliada através da medição do ângulo de contacto com a água. O ângulo de contacto é definido como o ângulo formado entre a linha de base da gota e a tangente no ponto de contacto da gota de água com a superfície, o resultado é expresso em graus (Ojagh et al., 2010). A medição do ângulo de contacto foi realizada no instrumento OCAH 200 DataPhysics usando o método da gota séssil. O ensaio decorreu à temperatura de 22°C e a 50% HR. Foram efetuadas 6 medições em diferentes posições da superfície do filme. O valor médio foi calculado.

3.4.4. Propriedades térmicas

A análise diferencial de calorimetria (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) e a análise termogravimétrica (TGA - *Thermogravimetric Analysis*) foram realizadas para analisar o comportamento térmico dos filmes. As curvas de DSC foram obtidas no equipamento NETZSCH DSC 204. As amostras de filmes, aproximadamente 7 mg, foram cortadas em pedaços pequenos e colocadas num cadinho, que depois de selado foi furado. Um cadinho vazio foi usado como referência. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a uma velocidade de 10°C/min numa gama de temperatura entre 0 e 500°C para os filmes CMX:AZC e CMX:Ag:Líp e 0 até 300°C para os filmes controlo e CMX:Ag.

A análise termogravimétrica foi realizada usando um equipamento TGA Q50 (TA Instruments). Aproximadamente 3 g de amostra de filme foram colocados num cadinho de platina e aquecida entre 0 e 500°C usando uma velocidade de aquecimento de 5°C/min. O nitrogénio foi usado como gás de purga.

3.4.5. Propriedades óticas

A cor e transparência dos filmes foram avaliadas usando um espectrofotómetro Technidyne Color Touch 2 Model Iso. As medições foram realizadas em três posições aleatórias dos filmes usando o iluminante D65 e observador 10°. A cor dos filmes foi determinada de acordo com o sistema de cor CIE L*a*b*. Neste sistema, L indica a luminosidade, variando entre zero (preto) e 100 (branco), os eixos horizontais representados por a* e b* são as coordenadas cromáticas que variam entre -a* (verde) e +a* (vermelho) e -b* (azul) a +b* (amarelo) (Costa et al., 2015). A transparência é a propriedade de um material transmitir luz e pode ser determinada usando a equação 4 (Popson et al., 1996):

$$T = \sqrt{(R_w - R_0) - \left[\frac{10000}{R_{(w)}} - R_0 \right]} \quad (4)$$

Onde R_w é a refletância em % da amostra, quando posicionada sobre um fundo branco, R_0 é a refletância da amostra sobre um fundo preto e $R_{(w)}$ é a refletância do fundo branco usado.

3.4.6. Microestrutura dos filmes

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM - *Scanning Electron Microscopy*) foi utilizada para avaliar a microestrutura dos filmes. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico modelo Hitachi S-3400N. Para avaliar a secção transversal, os filmes foram fraturados com a ajuda de uma lâmina. Posteriormente as amostras de filme foram colocadas em suportes de alumínio com o auxílio de fita-cola adesiva de duas faces e pulverizadas com ouro usando um evaporador de metais (Quorum Q150R ES). Todas as amostras foram analisadas a uma voltagem de aceleração de 20 Kv. Antes de realizar o SEM, os filmes foram mantidos num exsicador durante aproximadamente três semanas.

3.4.7. Permeabilidade ao vapor de água

Para determinar a WVP é necessário calcular previamente a velocidade de transmissão de vapor de água (WVTR - *Water Vapor Transmission Rate*). A WVTR de um material em folha é a massa de vapor de água transmitido por unidade de tempo e por unidade de área de uma face do material para a outra sob determinadas condições. A WVTR dos filmes foi medida através do método gravimétrico, de acordo com a norma ASTM E96/E96M, usando o equipamento Regmed - modelo PVA/4, representado na Figura 9. Os filmes foram dispostos sobre uma caixa de alumínio, onde previamente foi colocado 15 g de cloreto de cálcio granulado (Sigma-aldrich) como dissecante. Os filmes ficaram sujeitos a uma atmosfera próxima de 0% de HR numa das faces e 50% de HR na outra, à temperatura de 22°C. Posteriormente os filmes foram selados com parafina, previamente fundida. A área exposta do filme foi de 50 cm². Por último, as caixas foram removidas e pesadas de duas em duas horas, durante 48 horas. As medições foram realizadas em duplicado e os valores foram usados para traçar o gráfico de variação da massa ao longo do tempo. A WVTR foi calculada de acordo com a equação 5.

$$WVTR = \frac{\frac{\Delta m}{\Delta t}}{A} \quad (5)$$

Onde $\Delta m/\Delta t$ é o declive da reta obtida de 11 pontos, expresso em g/dia e A é a área de teste em m².

A WVP foi calculada segundo a mesma norma usando a equação 6:

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta P} = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} \times e \quad (6)$$

Onde ΔP é a diferença da pressão de vapor entre as duas faces do filme, e é a espessura média do filme expressa em m, P é a pressão de saturação do vapor de água à temperatura de 22°C. A esta temperatura a pressão de saturação do vapor de água é de 2643,38 Pa (Perry et al., 1999), R_1 é a HR do laboratório e R_2 a HR no interior da caixa de alumínio.



Figura 9 - Sistema utilizado (Regmed - modelo PVA/4) para a determinação da WVTR dos filmes.

3.4.8. Permeabilidade ao oxigénio

A velocidade de transmissão de oxigénio (OTR - *Oxygen Transmission Rate*) foi determinada pela empresa AIMPLAS - *Instituto Tecnológico del Plástico*, a 23°C e 50% HR de acordo com a norma ASTM F1927-14. OTR é a quantidade de oxigénio transmitida por unidade de tempo e por unidade de área de uma face do filme para a outra. A área exposta do filme foi de 5 cm². As medições foram realizadas em duplicado e os valores da OTR foram usados para determinar a OP, sendo que os resultados finais da OTR e OP são expressos em média. A OP foi calculada multiplicando a OTR pela espessura média (e) do filme e dividindo pela diferença da pressão parcial do oxigénio (ΔPO_2) entre as duas faces do filme, conforme equação 7:

$$OP = \frac{OTR}{\Delta PO_2} \times e \quad (7)$$

3.4.9. Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes

A atividade antimicrobiana dos filmes contra as bactérias, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 foi determinada pelo método de difusão em agar, segundo a norma M2-A8 de *The National Committee for Clinical Laboratory Standards*, com algumas modificações.

Este método consiste na aplicação de uma amostra de filme sobre uma placa de agar previamente inoculada com o microrganismo teste e após a incubação em condições específicas, o diâmetro da zona em que não ocorreu crescimento de microrganismos é medido (Campos et al., 2011). Antes dos ensaios antimicrobianos, nomeadamente 24 h, cada bactéria foi inoculada em meio sólido Brain-Heart Infusion (Liofilchem) com agar (Pronadisa) para assegurar o crescimento ótimo dos microrganismos em estudo. A partir desta cultura *overnight* realizou-se uma suspensão em solução salina de 0,85% (m/v) (NaCl, Fisher Chemical) de modo a obter uma densidade ótica de 0,5 McFarland ($\approx 1 \times 10^8$ Unidades Formadoras de colónias/mL). De seguida procedeu-se à inoculação das estirpes em placas contendo meio Müller-Hinton Agar (MHA) (Merck Co.). A inoculação é feita mergulhando uma zaragatoa estéril na suspensão, antes de inocular, retira-se o excesso de líquido da zaragatoa, pressionando a mesma contra o tubo de falcon e espalha-se o inóculo contido na zaragatoa sobre o meio MHA, são feitos três espalhamentos, girando a placa num ângulo de 60° entre cada espalhamento, de forma a garantir um espalhamento uniforme do inóculo. Como passo final, passa-se com a zaragatoa na margem da placa de agar. Foram assepticamente cortadas amostras de cada filme em forma de disco com diâmetro de 10 mm. Os filmes cortados foram então colocados nas placas inoculadas de cada estirpe. Fez-se um controlo negativo, que consistiu na colocação da amostra de filme numa placa com meio MHA, sem inóculo, permitindo confirmar a não contaminação dos filmes. Por último, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. Posteriormente, o diâmetro dos halos de inibição foi medido. Foram realizados ensaios em triplicado de cada filme em diferentes dias.

Capítulo 4 - Discussão e Resultados

4.1. Caracterização da carboximetilxilana por RMN

Do ponto de vista estrutural, a análise espectroscópica de RMN pode fornecer informações úteis para a determinação da estrutura das xilanas (Barbat et al., 2008). O espectro de próton da xilana comercial, representado na Figura 10, apresenta dois grupos importantes de prótons: os prótons das unidades de D-xilose não substituída da cadeia principal e os prótons dos resíduos do ácido 4-O-metilglucurônico (Barbat et al., 2008). As unidades de D-xilose não substituídas são caracterizadas pelos sinais: $\delta_{H_2} = 3,3$; $\delta_{H_{5ax}} = 3,4$; $\delta_{H_3} = 3,6$; $\delta_{H_4} = 3,8$; $\delta_{H_{5eq}} = 4,1$ e $\delta_{H_1} = 4,5$ ppm (Barbat et al., 2008; Belmokaddem et al., 2011). Os desvios químicos $\delta = 5,3$ e $3,5$ ppm são atribuídos ao próton H^1 e aos prótons do grupo metoxilo característicos do ácido 4-O-metilglucurônico.

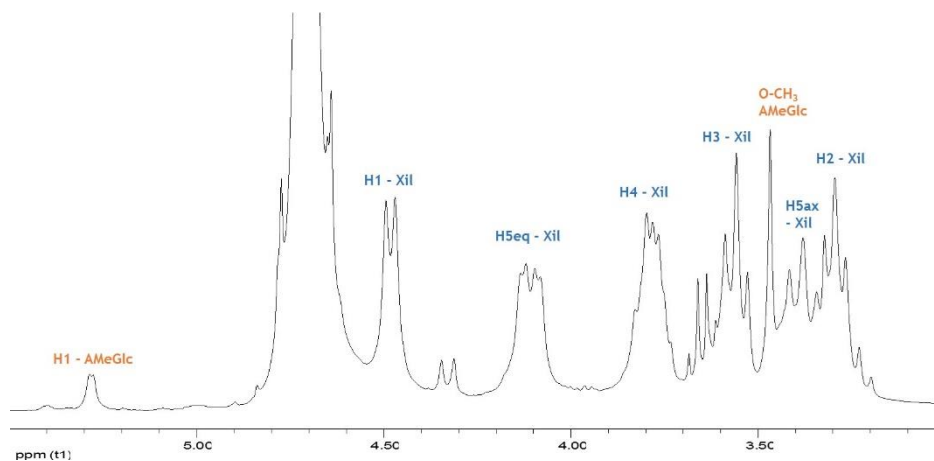


Figura 10 - Espectro de ^1H RMN da xilana comercial de faia. Hx Xil corresponde aos prótons presentes nas unidades de D-xilose e Hx AMeGlc aos prótons do ácido 4-O-metilglucurônico. Ax e Eq correspondem às conformações dos prótons, axial e equatorial respectivamente.

O ^1H RMN, apresentado na Figura 11, foi usado para determinar o grau de substituição das CMX. Comparando o espectro de próton da xilana comercial com o da CMX é possível observar o aparecimento de três novos sinais. Os desvios químicos $\delta = 4,58$, $4,54$ e $4,63$ ppm correspondem ao próton anomérico da D-xilose quando ocorre a introdução do grupo carboximetil na posição O-2, O-3 ou O-2 e O-3, respectivamente. A integração destes novos sinais face à integração dos sinais relativos aos prótons anoméricos D-xilose e do AMeGlc permite determinar o GS da CMX. O GS obtido foi de 0,3. É importante salientar que a caracterização das CMX por RMN foi realizada diretamente no polímero, sem efetuar previamente a despolimerização do polímero como é, geralmente, referido na literatura.

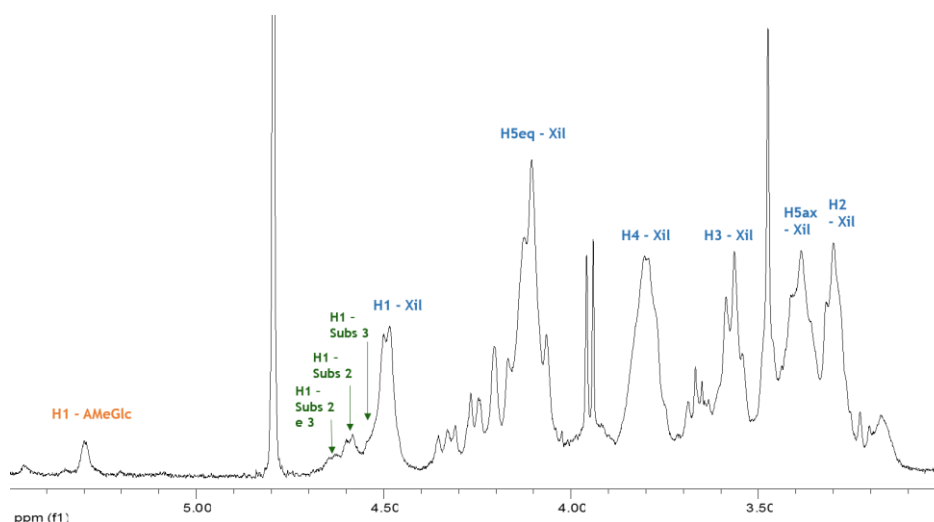


Figura 11 - Espectro de ¹H RMN da CMX.

4.2. Melhoramento das propriedades do filme CMX

4.2.1. Análise da resistência mecânica dos filmes

A resistência mecânica dos filmes é uma das propriedades mais importantes, uma vez que esta reflete a capacidade do filme para proteger o produto alimentar de danos mecânicos que possam ocorrer durante o seu processamento, transporte, armazenagem, comercialização e utilização final (Janjarasskul e Krochta, 2010; Mikkonen e Tenkanen, 2012). Além disso, a perda de integridade mecânica do filme devido às pobres propriedades mecânicas reduz a sua eficácia como barreira (Navarro-Tarazaga et al., 2008). As propriedades mecânicas mais comuns relatadas em estudos de filmes à base de polissacarídeos são obtidas a partir de testes de tração, nomeadamente, a tensão de rutura e módulo elasticidade e mais raramente o índice de tração. Nos ensaios preliminares apenas se usou como método de seleção a tensão de rutura.

Assim, inicialmente usou-se uma quantidade intermédia de aditivo (agente reticulante ou polímero), 0,2%, com o objetivo de decidir qual dos aditivos proporcionaria melhor resistência mecânica. Este estudo permitiu excluir de imediato o glicolal, uma vez que o filme com este aditivo apresentou uma tensão de rutura significativamente baixa comparativamente aos filmes com AZC, agar e controlo, (resultados não mostrados). Posteriormente fez-se um novo estudo, variando a quantidade de agar e AZC na formulação do filme de CMX. A tensão de rutura dos filmes CMX com as diferentes quantidades de aditivo e glicerol está representada na Figura 12.

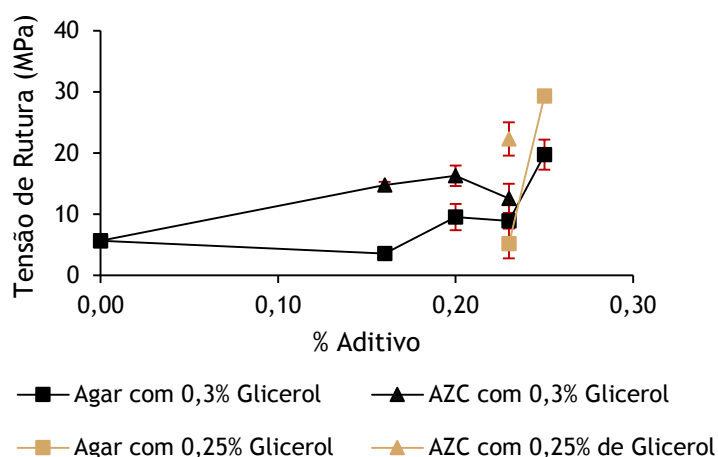


Figura 12 - Tensão de ruptura dos filmes CMX com Agar ou AZC.

De um modo geral, a incorporação de AZC ou agar melhora a resistência mecânica do filme de CMX (0% de aditivo), conforme pode ser confirmado na Figura 12. Os filmes reticulados com AZC apresentaram uma tensão de ruptura maior, comparativamente ao filme de CMX com agar, entre 0,16 a 0,23% de aditivo, tanto para os filmes com 0,25 como 0,3% de glicerol. Era esperado um aumento progressivo da resistência mecânica com o aumento da % de aditivo, em ambos os filmes. No entanto, verificaram-se algumas oscilações nos resultados obtidos.

No filme reticulado com AZC e com 0,3% de glicerol, a tensão de ruptura aumenta com o aumento da quantidade de AZC, entre 0,16 a 0,2% e decresce entre 0,2 a 0,23%. O aumento das propriedades mecânicas pode ser explicado pela formação de novas ligações, nomeadamente ligações de hidrogénio, como já referenciado na revisão bibliográfica (Figura 6). A formação destas novas ligações aumenta a coesão entre as cadeias poliméricas da CMX dificultando a sua separação e consequentemente aumenta a força máxima para quebrar o filme (Guilbert et al., 1996). Estas mudanças nas propriedades mecânicas, causadas pela adição de agentes reticulantes, nomeadamente o AZC foram previamente observadas para filmes de galactoglucomanas e filmes de PVA:xilana (Chen et al., 2015; Mikkonen et al., 2013). Quanto ao decréscimo da tensão de ruptura no filme com 0,23% de AZC e 0,3% de glicerol, um comportamento semelhante foi observado por Chen et al. (2015) num filme de PVA:xilana reticulado com AZC, porém, os autores não explicam o porque deste resultado. Provavelmente, o decréscimo da tensão de ruptura com o incremento de AZC poderá ser explicado, pelo aumento excessivo das interações intermoleculares originadas entre a CMX e o AZC, limitando a mobilidade das moléculas de CMX, tornando estes filmes mais rígidos e quebradiços. Este efeito foi observado por Reddy e Yang (2010) num filme de amido reticulado com ácido cítrico. O aumento da quantidade do ácido cítrico provocou uma diminuição da tensão de ruptura. Efetivamente, durante a execução experimental, foi observado que o filme com 0,25% AZC e 0,25% glicerol, apresentava-se quebradiço após a secagem, não sendo possível realizar o ensaio de tração. Comparando o filme com 0,23% de AZC e 0,3% glicerol com o filme que contém a

mesma quantidade de AZC, mas com 0,25% de glicerol, verifica-se um aumento da tensão de rutura com a diminuição da quantidade de glicerol. A tensão de rutura aumentou de $12,59 \pm 2,40$ para $22,31 \pm 2,74$ MPa. Este comportamento era expectável, uma vez que o aumento do plastificante diminui as interações moleculares entre as cadeias poliméricas, aumentando a sua mobilidade e tornando os filmes menos resistentes (Janjarasskul e Krochta, 2010).

Quanto aos filmes que contêm agar, estes apresentam mais oscilações nos resultados de tensão de rutura comparativamente aos filmes reticulados com AZC. Estas ligeiras oscilações deverão ao facto do agar não ter ficado totalmente homogéneo no filme. Apesar disso, os resultados obtidos estão de acordo com um estudo realizado onde a incorporação de agar melhorou a resistência mecânica de um filme de amido (Wu et al., 2009). A mistura de agar com a CMX melhora a resistência mecânica do filme comparativamente ao controlo, provavelmente, devido à formação de ligações de hidrogénio intermoleculares entre o CMX e o agar. De igual modo que o filme reticulado com AZC, a diminuição da quantidade de glicerol no filme com 0,25% de agar conduz a um aumento da tensão de rutura. A tensão de rutura aumentou de $19,74 \pm 2,46$ para $29,33 \pm 0,74$ MPa, após o decréscimo de 0,3% de glicerol para 0,25%.

Resumindo, os filmes que apresentaram melhor resistência foram aqueles em que se incorporou menor quantidade de glicerol, sendo o filme com 0,25% de agar aquele que exibiu maior resistência mecânica de entre todos os filmes estudados.

4.2.2. Análise da hidrofobicidade da superfície dos filmes

O ângulo de contacto (AC) com água é geralmente usado para prever a hidrofobicidade dos filmes comestíveis (Atef et al., 2014). Na teoria, o ângulo de contacto pode variar desde 0° até 180° , isso significa, respetivamente, que a gota de água pode-se espalhar completamente na superfície sólida ou opostamente não ocorre nenhum espalhamento. Na prática, um ângulo de contacto elevado representa uma superfície hidrofóbica, ao passo que um ângulo reduzido revela uma superfície hidrofílica. Em termos quantitativos, e para melhor distinguir uma superfície hidrofílica de uma hidrofóbica é atribuída, à primeira, um $AC < 65^\circ$ e à segunda um $AC > 65^\circ$ (Karbowski et al., 2006). Na Figura 13 estão representados os ângulos de contacto para os filmes produzidos. O filme controlo foi aquele que apresentou menor valor de ângulo de contacto. Assim, pode referir-se que este filme apresenta uma superfície hidrofílica. A sua natureza hidrofílica é atribuída aos grupos carboxilmetil e hidroxilo presentes na CMX (Alekhina et al., 2014). Os filmes enriquecidos com a mistura de OC+AL e OC+AO tiveram um aumento no valor do AC de 11% e 38%, respetivamente, face ao filme controlo. Os filmes com OC+AS e OV+AS não apresentaram diferenças significativas entre si. Contudo, o filme com a mistura de lípidos OV+AS exibiu o maior ângulo de contacto, $66,01^\circ \pm 1,4$ sendo o único filme com superfície hidrofóbica. O facto do filme com OV+AS apresentar o maior ângulo de contacto, poderá dever-

se ao OV, uma vez que este é uma mistura de diversos ácidos gordos. Os filmes enriquecidos com os ácidos gordos e óleo essencial de coentros, apesar de hidrofílicos, mostraram ter um caráter mais hidrofóbico do que o filme controlo. Como referenciado na revisão bibliográfica, a eficácia dos ácidos gordos na hidrofobicidade dos filmes depende da sua estrutura, nomeadamente, o comprimento da cadeia e grau de saturação. Segundo Pérez-Gago e Rhim (2014), geralmente a hidrofobicidade aumenta com o comprimento da cadeia e decresce com o número de ligações duplas. Todos os ácidos gordos utilizados neste trabalho possuem o mesmo comprimento de cadeia alifática, variando apenas no número de ligações duplas. O AS, AO, AL têm, respetivamente, zero, uma e duas ligações duplas. Os resultados obtidos estão de acordo com o que Pérez-Gago e Rhim (2014) concluíram no seu trabalho, isto é, que o aumento das ligações duplas induz a diminuição da hidrofobicidade dos filmes. De acordo com os resultados apresentados neste estudo, pode concluir-se que a mistura do óleo vegetal com um ácido gordo é a mais eficiente para aumentar a hidrofobicidade da superfície do filme CMX.

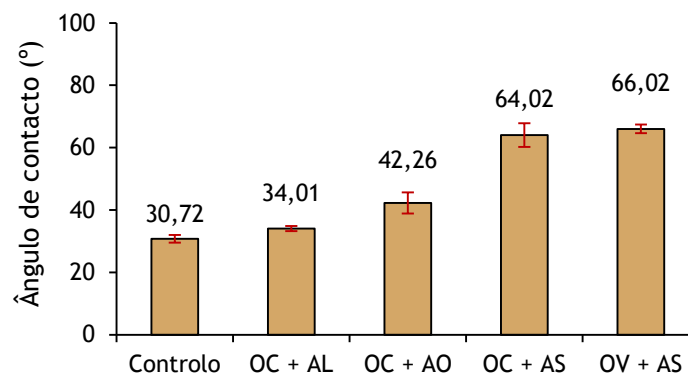


Figura 13 - Ângulo de contacto dos filmes com as diferentes misturas de ácidos gordos e óleo essencial de coentros; e óleo vegetal com ácido esteárico.

4.2.3. Análise da atividade antimicrobiana

A maioria das doenças de origem alimentar é causada pela ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou com os seus produtos metabólicos tóxicos. As bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* são consideradas importantes agentes patogénicos alimentares responsáveis por surtos alimentares em todo mundo. Estas bactérias podem estar presentes em alimentos como o leite e seus derivados, carne e produtos à base de carne, ovos, vegetais, alimentos prontos a comer, entre outros (Húngaro et al., 2014). Para o controlo destes microrganismos, a incorporação de agentes antimicrobianos de origem natural em filmes pode ser uma alternativa aos agentes antimicrobianos de origem sintética. Assim, neste trabalho estudou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial de coentros e do ácido linoleico incorporados em filmes CMX, contra as bactérias mencionadas anteriormente.

Neste estudo observamos que os filmes que continham óleo essencial de coentros não mostraram atividade antimicrobiana contra os microrganismos em estudo, com exceção do filme que continha AL (resultados não mostrados). No entanto, Silva et al. (2011b), num estudo onde se analisou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de coentros contra diversos microrganismos, demonstraram que o óleo exibia atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, até mesmo contra as bactérias testadas neste estudo. Contudo, quando o óleo essencial de coentros é incorporado nos filmes em estudo deixa de exibir atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas. Estes resultados podem, provavelmente, estar relacionados com a proporção de OC/polímero utilizado no filme e as possíveis interações entre o polímero e os compostos ativos do OC. De acordo com Sánchez-González et al. (2011) estes fatores desempenham um papel importante na atividade antimicrobiana do filme. Além disso, a espessura do filme pode influenciar a difusão e concentração do agente antimicrobiano na superfície do mesmo (Appendini e Hotchkiss, 2002). E contrariamente ao observado neste estudo, tem sido descrita a atividade antimicrobiana de filmes com óleos essenciais incorporados (Campos et al., 2011; Sánchez-González et al., 2011). Face aos resultados obtidos, decidiu-se estudar a atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com AL e mistura com outro lípido, nomeadamente OV, uma vez que a mistura de OV com um ácido gordo exibiu melhor desempenho em termos de hidrofobicidade da superfície do filme. Os resultados do diâmetro dos halos de inibição para os filmes com AL e com mistura de lípidos estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com AL. A mistura de lípidos está na proporção 1:1. A composição dos filmes está representada no anexo 1.

Tipo de filme	Diâmetro do halo de inibição, mm			
	<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. typhimurium</i> (ATCC 13311)
Controlo	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
0,35% AL	17 ± 0,71	21 ± 0,71	10 ^b ± 0,00	10 ^b ± 0,00
0,7% AL	16 ± 0,00	19 ± 0,71	10 ^b ± 0,00	10 ^b ± 0,00
0,7% (AL+OV)	14 ± 0,00	15 ± 1,16	10 ^c ± 0,00	10 ^c ± 0,00

Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

^aDissolveu-se no meio de cultura.

^bInibição por contacto.

^cCrescimento sob filme.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, verificou-se que o filme controlo, sem lípidos, não apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos em estudo. Este resultado era esperado, uma vez que, a maior parte das xilanas não exibem atividade antimicrobiana. No entanto, alguns resultados contraditórios são reportados por outros autores (Ebringerová, 2012; Ebringerová et al., 2005; Petzold-Welcke et al., 2014). É de salientar que o filme controlo dissolveu-se no meio de cultura, este comportamento foi devido à natureza

mais hidrofílica do filme controlo em relação aos filmes enriquecidos com lípidos. Relativamente aos restantes filmes, apresentados na Tabela 6, estes apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, para as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, apenas nos filmes com 0,35% e 0,7% de AL se observou atividade antimicrobiana por contacto. Em geral, a menor suscetibilidade dos microrganismos Gram-negativos à ação de agentes antimicrobianos pode ser explicada, pela presença de uma membrana exterior em torno da parede celular destes microrganismos, a qual limita a difusão dos compostos hidrofóbicos através do seu revestimento de lipopolissacarídeos (Burt, 2004). De acordo com a literatura, os ácidos gordos possuem a capacidade de inibir o crescimento de bactérias (Desbois e Smith, 2010). A atividade antibacteriana dos ácidos gordos é influenciada pela sua estrutura e forma, ou seja, em função do comprimento da cadeia alifática e número de ligações duplas. Ácidos gordos insaturados de cadeia longa, por exemplo o ácido linoleico, tendem a ser mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas. Porém, ainda não foi documentado na literatura como é que os ácidos gordos exercem a sua atividade sobre as bactérias (Desbois e Smith, 2010). No que diz respeito aos filmes com apenas ácido linoleico, observa-se que o aumento da quantidade do AL para o dobro não traz melhoria na atividade antimicrobiana contra as bactérias em estudo (Tabela 6). De acordo com Appendini e Hotchkiss (2002), a espessura do filme desempenha um papel importante na difusão e concentração do agente antimicrobiano, quando este se encontra aprisionado no filme, podendo explicar os nossos resultados. Como se pode observar no anexo 1, o filme com 0,7% de AL tem maior espessura do que o filme com 0,35% de AL, desta forma, o aumento da espessura provocou a diminuição do halo de inibição contra as bactérias Gram-positivas, o que poderá indicar aprisionamento do AL no filme. Contudo, o aumento da espessura não influenciou a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, em que a atividade antimicrobiana por contacto permaneceu inalterada. E não se observou halos de inibição. Quanto ao filme que contém mistura de lípidos, para as bactérias Gram-positivas, observou-se uma diminuição do halo de inibição, comparativamente ao filme com 0,35% AL. Esta diminuição pode dever-se ao aumento da espessura e à composição do OV. O OV é composto por diversos ácidos gordos, os quais, possivelmente, poderão interagir mais intensamente com os restantes componentes do filme, e de certa forma dificultar a difusão do AL até ao meio de cultura. O facto de não se ter observado atividade antimicrobiana por contacto nas bactérias Gram-negativas, evidencia o referido anteriormente acerca do OV. Entre as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* foi a bactéria mais suscetível à ação do AL, o que poderá estar relacionado com as diferenças na estrutura da parede celular, da forma e da capacidade que *B. cereus* possui para formar esporos (Muppalla et al., 2014).

Estes resultados permitem concluir que a incorporação do ácido linoleico nos filmes em estudo torna-o num agente antimicrobiano atrativo para aplicação na preservação alimentar, onde as bactérias em causa são prevalentes.

Com base nos resultados obtidos na resistência mecânica, hidrofobicidade e atividade antimicrobiana, pode concluir-se que o filme de CMX com 0,25% de agar e 0,25% de glicerol mostrou melhor resistência mecânica, a incorporação de uma mistura de óleo vegetal com ácido esteárico foi a experiência que apresentou melhores resultados em termos de hidrofobicidade. Por último, a presença de ácido linoleico proporcionou atividade antimicrobiana ao filme CMX. No seguimento deste estudo decidiu-se produzir um filme que incorporasse este conjunto de aditivos, surgindo assim, o filme final com a composição de 0,5% CMX, 0,25% de Agar, 0,7% de lípidos (ácido linoleico e óleo vegetal) e 0,2% de glicerol. Na mistura de lípidos substituiu-se o ácido esteárico pelo ácido linoleico, uma vez que este apresenta propriedades antimicrobianas e a diminuição da quantidade de glicerol foi compensada pelo carácter plastificante dos lípidos. Além deste filme foram ainda produzidos e caracterizados os filmes de CMX reticulados com AZC e com agar, uma vez que ambos proporcionaram uma melhoria na resistência mecânica do filme CMX.

4.3. Caracterização do filme final e dos filmes com agentes de reticulação

4.3.1. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (índice de tração, tensão de rutura e módulo de elasticidade) dos filmes controlo, CMX:Ag, CMX:AZC e CMX:Ag:Líp estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Gramagem, espessura e propriedades mecânicas do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.

Filme	Gramagem (g/m ²)	Espessura (µm)	Índice de tração (Nm/g)	Tensão de rutura (MPa)	Módulo de Elasticidade (MPa)
Controlo	74,81 ± 12,54	51,27 ± 15,38	3,25 ± 0,44	4,79 ± 1,10	188,43 ± 45,96
CMX:Ag	89,35 ± 3,93	56,42 ± 1,06	17,48 ± 0,73	27,67 ± 0,97	1043,12 ± 36,98
CMX:AZC	74,25 ± 9,43	47,00 ± 2,02	12,27 ± 1,57	20,95 ± 3,02	1164,64 ± 96,15
CMX:Ag:Líp (Final)	89,25 ± 2,08	73,67 ± 0,19	14,30 ± 0,89	17,35 ± 0,83	616,26 ± 29,89

A incorporação de aditivos melhora as propriedades mecânicas do filme controlo, filme que contém apenas CMX e glicerol, como se pode observar na Tabela 7, e como já verificando anteriormente em termos de tensão de rutura. Os filmes à base de polissacarídeos são conhecidos por exibir fracas propriedades mecânicas (Zhang et al., 2014). Por exemplo, no estudo de Alekhina et al. (2014), um filme CMX exibiu uma tensão de rutura de 12 MPa, valor superior, ao obtido neste estudo, para um filme do mesmo tipo, em que a tensão de rutura foi

apenas de 4,79 MPa. Esta diferença poderá dever-se ao GS da CMX usada e às condições/quantidades utilizadas na produção do filme. O filme produzido neste trabalho continha glicerol, enquanto o do estudo mencionado não. Também, o elevado conteúdo de água no filme poderá justificar as diferenças obtidas. A análise termogravimétrica mostrou que o filme controle foi o que apresentou maior teor de água, conforme poderemos verificar mais adiante.

Comparando os filmes CMX:Ag e CMX:AZC pode observar-se que o filme com agar apresenta maior tensão de ruptura e índice de tração comparativamente ao filme reticulado com AZC. Este resultado pode dever-se ao plastificante, em maior quantidade no filme com AZC. Apesar do filme reticulado com AZC ter menor resistência mecânica do que o filme CMX:Ag, este foi o que apresentou maior módulo de elasticidade. Aliás, foi o que exibiu maior módulo de elasticidade, de entre todos os filmes desta etapa. O módulo de elasticidade, como o próprio nome indica, traduz a elasticidade de um filme, a qual está relacionada com a sua rigidez (Valencia-Chamorro et al., 2011). Quanto maior o módulo de elasticidade menor será a deformação elástica do filme e maior a sua rigidez (Callister, 2001). Este resultado permite constatar que o AZC tem uma melhor capacidade para interagir com as cadeias poliméricas da CMX do que o agar, ou seja, é melhor agente reticulante que o agar. A Figura 14 apresenta, como exemplo, o gráfico tensão vs deformação obtido para o filme CMX:AZC.

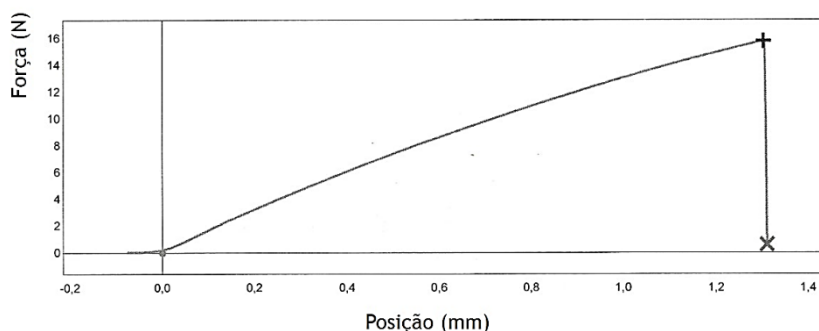


Figura 14 - Gráfico típico da tensão vs deformação do filme CMX:AZC.

Regressando ao filme CMX:Ag é de realçar que este filme, produzido nesta etapa, apresentou menor resistência mecânica comparativamente ao mesmo filme produzido previamente nos ensaios efetuados para o estudo da resistência mecânica. Esta diferença poderá ter resultado da necessidade de alterar o procedimento de preparação dos filmes produzidos na última etapa deste trabalho de investigação. De acordo com Guilbert et al. (1996) as propriedades mecânicas dependem não só da estrutura do polímero, mas também das condições de formação do filme.

Comparando o filme que contém lípidos com o filme CMX:Ag pode constatar-se que a incorporação de lípidos diminui de forma drástica as propriedades mecânicas. Tal tendência tem sido reportada por diversos autores, (Pérez-Gago e Rhim, 2014; Péroval et al., 2002). O efeito negativo dos lípidos nas propriedades mecânicas poderá ser explicado pela formação de

uma grande quantidade de espaços vazios ao longo de toda a espessura do filme, como se pode visualizar mais à frente nas imagens obtidas no SEM. Estas zonas dificultam a interação entre as cadeias dos polímeros, resultando num decréscimo das propriedades mecânicas.

Em resumo, tendo em conta os resultados obtidos, o filme com agar originou melhores propriedades mecânicas. Contudo, uma vez que o objetivo deste trabalho é produzir um filme que contenha igualmente propriedades antimicrobianas, o filme com lípidos, embora menos resistente, apresenta melhoria nas restantes propriedades.

4.3.2. Propriedades hidrofóbicas

Os valores experimentais do ângulo de contacto dos filmes em estudo estão apresentados na Figura 15. Observou-se que o filme controlo tem o menor ângulo de contacto, $37,32^\circ \pm 1,65$. Este valor é comparável com o obtido para um filme de carboximetilcelulose produzido no estudo de Oun e Rhim (2015) e ao filme de CMX sem plastificante produzido por Velkova et al. (2015). Em relação aos outros filmes em estudo, o ângulo de contacto aumentou quando se incorporou o agar, AZC e a mistura de lípidos (ácido linoleico e óleo vegetal), pela sequência apresentada. Apesar da presença destes compostos no filme aumentar o ângulo de contacto, apenas o filme com lípidos é considerado hidrofóbico, uma vez que apresenta um ângulo superior a 65° , mais concretamente $69,69^\circ \pm 2,48$. Os filmes CMX:Ag e CMX:AZC, com ângulo de contacto de $50,66^\circ \pm 1,10$ e $52,45^\circ \pm 3,79$, respetivamente, apresentam uma diferença de apenas $1,79^\circ$. O aumento da hidrofobicidade destes dois filmes poderá ser explicado pela diminuição dos grupos hidrofílicos (OH^-) disponíveis na CMX após a reação de reticulação entre os aditivos. Atualmente, não foram ainda documentados estudos de ângulos de contacto em filmes de CMX reticulados com AZC e com agar tornando-se difícil a confirmação destes resultados.

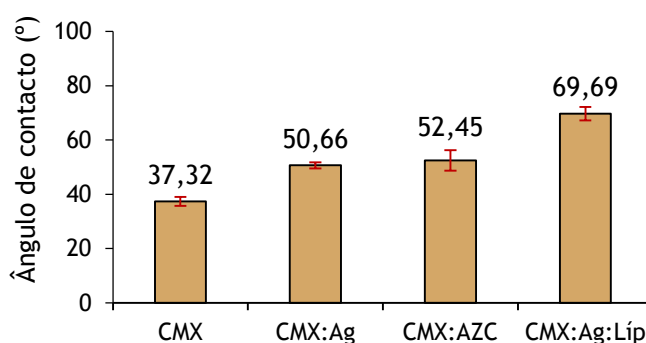


Figura 15 - Ângulo de contacto do filme final e dos filmes com agentes de reticulação finais.

4.3.3. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água é a propriedade mais extensamente estudada em filmes com aplicação na área alimentar. Conforme os resultados apresentados na Tabela 8, os lípidos, o AZC e o agar têm uma influência similar na WVP do filme de CMX comparativamente ao filme controlo.

Tabela 8 - Espessura, velocidade de transmissão de vapor de água (WVTR), permeabilidade ao vapor de água (WVP) do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.

Filme	Espessura (μm)	WVTR ($\text{g d}^{-1} \text{m}^{-2}$)	WVP ($\times 10^{-6} \text{g d}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)
Controlo	40,90 \pm 4,12	109,82 \pm 5,40	3,39 \pm 0,18
CMX:Ag	58,90 \pm 3,54	68,76 \pm 7,43	3,07 \pm 0,51
CMX:AZC	42,70 \pm 2,12	90,48 \pm 6,42	2,93 \pm 0,35
CMX:Ag:Líp (Final)	74,20 \pm 1,41	46,79 \pm 0,68	2,63 \pm 0,01

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos para a hidrofobicidade. A incorporação de agar ou AZC bem como a adição de lípidos na formulação dos filmes reduz WVTR e WVP possivelmente devido à formação de estruturas mais compactas e com maior tortuosidade, as quais dificultam a migração das moléculas de água através do filme. Também o aumento da hidrofobicidade, devido à diminuição dos grupos hidrofílicos, poderá igualmente contribuir para estes resultados (Azeredo et al., 2014; Benavides et al., 2012; Wu et al., 2002).

O filme constituído por CMX, agar e lípidos apresentou a menor WVP comparativamente aos filmes controlo, CMX:Ag e CMX:AZC. Como referenciado na revisão bibliográfica, a incorporação de lípidos reduz o rácio entre o carácter hidrofóbico e hidrofílico dos filmes, o qual diminui a sua solubilidade em água e portanto a sua permeabilidade ao vapor de água. Segundo Wu et al. (2002) a incorporação de lípidos aumenta a complexidade da matriz do filme, resultando no aumento da tortuosidade. As imagens de SEM obtidas, conforme documentado mais à frente, mostram uma grande quantidade de vazios no filme, os quais podem dificultar o percurso das moléculas de água através do mesmo. A melhoria da WVP foi já documentado em trabalhos anteriores, nos quais, ácidos gordos foram adicionados a uma matriz de xilana (Péroval et al., 2002) ou óleos vegetais foram adicionados a matrizes de xilana e a outras matrizes (Cerqueira et al., 2012; Péroval et al., 2002).

Comparando a WVP dos filmes de CMX com AZC e com agar, o filme CMX:AZC é ligeiramente melhor do que o filme CMX:Ag. Resultado similar foi obtido no estudo do ângulo de contacto, em que a superfície do filme com AZC é ligeiramente mais hidrofóbica do que a superfície do filme com agar, concordando assim com uma menor WVP. Esta ligeira diferença entre os filmes

poderá sugerir que o AZC tem uma melhor capacidade de reticulação que o agar, como já observado nas propriedades mecânicas. Ambos os filmes tiveram menor WVP comparativamente ao filme controlo. Em relação ao filme com AZC, Mikkonen et al. (2013) chegaram a resultados similares, no entanto em filmes de galactoglucomanas reticuladas com AZC.

É interessante observar que a WVTR foi maior no filme CMX:AZC do que no filme CMX:Ag ao contrário do que se observou na WVP. Permitindo, assim, sugerir que a espessura do filme influencia a transferência do vapor de água através do mesmo (Figura e Teixeira, 2007).

Face aos resultados obtidos pode afirmar-se que embora a adição de aditivos ao filme CMX tenha uma influência similar na WVP, o filme com lípidos revelou ser o mais eficiente na redução da WVP. E ainda, as propriedades barreira ao vapor de água dos filmes dependem, não só da composição dos mesmos, mas também da microestrutura dos filmes. Estes resultados foram igualmente documentados no trabalho levado a cabo por Kowalczyk e Baraniak (2014).

4.3.4. Permeabilidade ao oxigénio

A permeabilidade ao oxigénio (OP) é também uma das propriedades dos filmes comestíveis mais estudada (Miller e Krochta, 1997). A presença de oxigénio tem efeitos negativos na manutenção da qualidade dos produtos alimentares, uma vez que a sua presença está envolvida na oxidação dos componentes alimentares e no crescimento microbiano. A Tabela 9 apresenta os resultados relativos à velocidade de transmissão de oxigénio e permeabilidade ao oxigénio do filme controlo e dos filmes com AZC, agar e lípidos.

Tabela 9 - Espessura, velocidade de transmissão de oxigénio (OTR), permeabilidade ao oxigénio (OP) do filme final, dos filmes com agentes de reticulação e de filmes sintéticos.

Filme	Espessura (μm)	OTR ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	OP ($\text{cm}^3 \mu\text{m m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ KPa}^{-1}$)
Controlo	51,00 \pm 5,37	30,50 \pm 0,71	15,83 \pm 1,30
CMX:Ag	63,15 \pm 3,75	3,00 \pm 1,41	1,96 \pm 1,03
CMX:AZC	46,90 \pm 7,07	12,00 \pm 2,83	5,86 \pm 2,23
CMX:Ag:Líp (Final)	79,00 \pm 2,55	<0,01 ^a	-
HDPE	-	-	1870 ^b
LDPE	-	-	427 ^b

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

^aOs valores obtidos em ambas as amostras foram inferiores ao limite inferior da gama de medição do aparelho ($0,01 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$).

^bCondições de teste: 23°C e a 50%HR; dados retirados de Miller e Krochta (1997).

Os filmes à base de polissacarídeos são geralmente boas barreiras ao oxigénio devido às ligações de hidrogénio formadas entre os polímeros que o constituem, contribuindo para a formação de estruturas organizadas e compactas (Gröndahl et al., 2004; Martín-Belloso et al., 2009). O processo de difusão das moléculas de oxigénio através de uma matriz polimérica está associado ao volume livre (Müller et al., 2012). O volume livre é definido como o espaço vazio que não é ocupado pela microestrutura das moléculas do polímero (Wang et al., 2007). No presente estudo, a incorporação de aditivos à CMX, torna os filmes mais compactos, conforme poderemos verificar mais à frente, e conseqüentemente o volume livre entre as cadeias poliméricas é reduzido, diminuindo a OP (Müller et al., 2012; Wang et al., 2007). Além disso, os filmes apresentam uma maior rigidez (maior módulo de elasticidade) relativamente ao filme controlo, provocando uma menor mobilidade entre as cadeias poliméricas, ou seja, é mais difícil as cadeias poliméricas permitirem a passagem das moléculas de oxigénio (Miller e Krochta, 1997). Globalmente, todos os filmes em estudo apresentaram baixa OP comparativamente a alguns filmes sintéticos, como polietileno de alta e baixa densidade (HDPE e LDPE, respetivamente).

Quanto ao filme controlo, este apresentou melhor OP comparativamente ao filme de CMX produzido no estudo desenvolvido por Alekhina et al. (2014), no entanto, os valores de OP obtidos, no presente trabalho, não são tão baixos como os documentados para filmes de arabinoglucuronoxilanas (Escalante et al., 2012) e glucuronoxilanas (Gröndahl et al., 2004). De acordo com Krochta e De Mulder-Johnston citado por Mikkonen e Tenkanen (2012), filmes com OP inferiores a $10 \text{ cm}^3 \mu\text{m m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{KPa}^{-1}$, destinados a serem aplicados em alimentos, podem ser considerados boas barreiras ao oxigénio. Com base nesta informação, o filme controlo pode ser usado como barreira ao oxigénio, mesmo sem aditivos. Contudo, tem a desvantagem de apresentar baixas propriedades mecânicas e uma fraca barreira ao vapor de água.

Relativamente aos filmes CMX:Ag e CMX:AZC e contrariamente ao que se observou na WVP, o filme CMX:Ag apresenta melhor OP do que o filme CMX:AZC. Provavelmente os melhores resultados obtidos para o filme reticulado com agar, poderão dever-se ao aumento da espessura do mesmo. De acordo com Park e Chinnan, (1995) o aumento da espessura do filme provoca a diminuição da OP e a WVP aumenta à medida que a espessura do filme aumenta. A OP do filme de CMX com AZC é ligeiramente superior à do filme de galactoglucomanas com AZC produzido no trabalho levado a cabo por Mikkonen et al. (2013).

No filme com lípidos, o melhor em termos de WVP, não foi possível determinar a OP devido a este valor ser inferior ao limite mínimo de medição do aparelho. O que leva a concluir que a adição de substâncias hidrofóbicas a filmes de CMX e agar diminui a OP. Um comportamento semelhante foi observado em filmes de amido com a incorporação de óleo de girassol no trabalho desenvolvido por Garcia et al. (2000).

De acordo com os resultados obtidos na OP, pode concluir-se que os filmes produzidos nesta etapa do trabalho apresentam uma boa barreira ao oxigénio e são apropriados para revestimentos ou embalagens no setor alimentar, como revestimento de frutos frescos ou vegetais que necessitam de uma certa quantidade de oxigénio para a respiração (Alekhina et al., 2014).

4.3.5. Microestrutura dos filmes

A microestrutura dos filmes fornece informações relevantes sobre o arranjo dos componentes no filme (Ghasemlou et al., 2011) e foi investigada através de microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Os resultados encontram-se documentados na Figura 16. Observando as imagens, é possível verificar que a superfície de todos os filmes é lisa e uniforme, sem irregularidades, à exceção do filme que contém lípidos, o qual apresenta uma superfície rugosa. No entanto, na secção transversal observam-se algumas diferenças estruturais entre eles. No filme controlo, a estrutura da CMX é considerada heterogénea devido à sua secção transversal irregular (Phan The et al., 2009). Saxena e Ragauskas (2009) obtiveram resultados semelhantes em relação a um filme de xilana nativa, caracterizando a secção transversal como rugosa. O filme controlo parece ser menos compacto comparativamente aos restantes filmes.

Quanto ao filme CMX:Ag, este apresenta uma estrutura com duas camadas. A parte superior é uma estrutura compacta e que de acordo com Phan The et al. (2009), possivelmente, corresponde ao agar. Por outro lado, a parte inferior apresenta uma estrutura menos compacta e semelhante ao filme controlo. Morris (2006) sugere que quando dois polissacarídeos são misturados e gelificam, vários tipos de estruturas de gel podem ocorrer. Quando dois polímeros se associam de forma independente para formar redes separadas que se interlaçam, a estrutura formada é denominada de rede interpenetrante (Morris, 2006). Uma vez que o agar é um polissacarídeo com a capacidade de formar gel, poderá ocorrer a formação de uma rede interpenetrante entre a CMX e o agar quando a temperatura da formulação do filme decresce. No entanto, no decorrer da secagem do filme, a rede de agar retrai, diminuindo o espaço intersticial disponível para reter a CMX, conduzindo assim, a uma separação de fases na estrutura do filme. Um resultado similar foi reportado por Phan The et al. (2009), num filme de agar e amido. Os autores sugeriram que a separação de fases estaria relacionada com a elevada concentração de amido. Eventualmente poderão ainda ocorrer interações intermoleculares por pontes de hidrogénio entre o agar e a CMX, uma vez que ambos possuem grupos hidroxilo disponíveis. Este resultado corrobora com os observados no estudo das propriedades mecânicas.

No que diz respeito ao filme reticulado com AZC, este apresenta uma estrutura com três camadas, duas externas semelhantes e uma interior. É de realçar, que embora seja possível observar camadas no filme CMX:AZC, estas aparentam estar ligadas entre si, ou seja, a

separação não é tão evidente como no filme CMX:Ag. À medida que ocorre a secagem, presumivelmente, poderá ocorrer uma organização estrutural entre a CMX reticulada com o AZC e a CMX. Provavelmente, as camadas externas correspondem à CMX reticulada com AZC, devido à sua aparência mais compacta e a camada interior, corresponderá à CMX. Chen et al. (2015) trabalharam com um filme compósito de xilana e PVA reticulado com AZC, e através das imagens obtidas no SEM, concluíram que o aumento da quantidade de AZC melhora a compatibilidade entre os componentes utilizados, devido às ligações de hidrogénio formadas.

Por último, o filme que contém lípidos distingue-se dos restantes. A sua secção transversal revela uma estrutura heterogénea em que as partículas lipídicas estão retidas de forma descontínua na matriz polimérica, as quais formam uma grande quantidade de vazios, originando a rugosidade observada na superfície. Ao contrário do que se observou no filme CMX:Ag, no filme com lípidos não se visualizou separação de fases, o que poderá ser explicado pelo efeito plastificante dos lípidos. Como é sabido, os plastificantes aumentam a flexibilidade dos filmes através da redução das ligações de hidrogénio intermoleculares ao longo das cadeias poliméricas aumentando, conseqüentemente, o espaço intermolecular (Janjarasskul e Krochta, 2010). Assim, no decorrer da secagem do filme com lípidos, o espaço intersticial existente provavelmente será maior do que o espaço intersticial do filme CMX:Ag, desta forma, à medida que o agar retrai, o espaço intersticial é suficiente para reter a CMX, não provocando separação de fases.

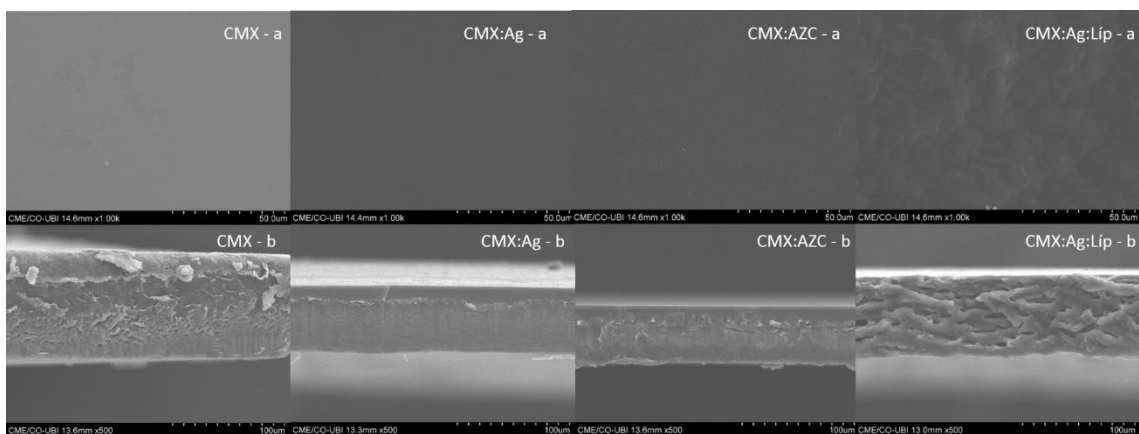


Figura 16 - Imagens do SEM da superfície (a) e secção transversal (b) do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.

4.3.6. Propriedades óticas

As propriedades óticas de filmes são um atributo importante que influencia a sua aparência, o seu valor comercial e a sua aplicabilidade, sendo igualmente um fator importante na aceitabilidade dos filmes por parte do consumidor (Ahmad et al., 2015; Dashipour et al., 2015). A transparência e a cor CIE L*a*b* são os parâmetros, habitualmente usados para descrever as propriedades óticas deste tipo de material. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Transparência e cor do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.

Filme	Transparência	L*	a*	b*
Controlo	93,25 ± 0,39	88,76 ± 0,63	0,52 ± 0,20	23,19 ± 2,27
CMX:Ag	94,14 ± 1,11	88,29 ± 0,11	0,45 ± 0,02	22,45 ± 0,05
CMX:AZC	95,38 ± 0,92	90,30 ± 0,62	-0,18 ± 0,06	16,51 ± 2,15
CMX:Ag:Líp (Final)	90,59 ± 0,34	89,82 ± 0,20	1,05 ± 0,03	17,23 ± 0,25

Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

No geral, pode afirmar-se que os filmes apresentam elevada transparência, conforme documentam as imagens da Figura 17 e os resultados apresentados na Tabela 10. Porém, a presença de lípidos levou a uma ligeira diminuição da transparência do filme. Este mesmo resultado foi documentado por Falguera et al. (2011). A diminuição da transparência pode estar associada ao comportamento da luz quando esta incide em superfícies com lípidos, uma parte da luz reflete-se na superfície e a outra penetra nos lípidos refratando-se, desta fração, uma parte reflete-se na superfície e outra refrata-se novamente e assim sucessivamente. Este fenómeno pode igualmente explicar a aparência de bandas claras e escuras, tipo ondas, na superfície dos filmes que contêm lípidos. Relativamente aos restantes filmes, o filme de CMX:AZC exibiu uma transparência próxima do filme CMX:Ag e ambos apresentaram uma transparência superior ao filme controlo. Provavelmente, a menor transparência do filme controlo poderá ser explicada por uma estrutura menos densa. Todos os filmes apresentam valores elevados de L* (luminosidade), o que significa que têm uma aparência clara e exibiram uma cor amarelada evidenciada pelos valores elevados do parâmetro b*. Os filmes controlo e CMX:Ag são consideravelmente mais amarelos que os filmes CMX:Ag:Líp e CMX:AZC. É de realçar que a adição de diferentes materiais ao filme controlo diminui a cor amarelada do mesmo, dependendo do tipo de material adicionado. As propriedades óticas fundamentam o já observado na prática.

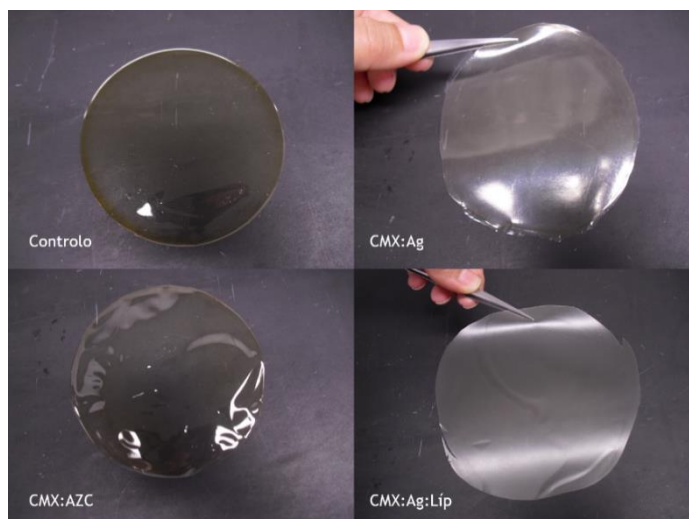


Figura 17 - Aparência do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.

4.3.7. Propriedades térmicas

Os resultados obtidos no ensaio TGA para os filmes produzidos são mostrados na Figura 18. As curvas termogravimétricas (TG) representam a perda de massa, em percentagem, em função da temperatura à qual a amostra é submetida, neste estudo escolheu-se a gama de temperatura entre 0 - 500°C. A curva DTG, derivada termogravimétrica, corresponde à derivada da variação da massa em relação à temperatura. Neste método são obtidas as curvas que correspondem à primeira derivada TG, estas curvas permitem identificar, com melhor exatidão, as temperaturas iniciais e finais de perda de massa (Ionashiro, 2004).

Analisando os resultados apresentados na Figura 18, verifica-se que todos os filmes exibem várias etapas de degradação térmica, sendo algumas delas semelhantes e outras diferentes. A primeira etapa de perda de massa é comum a todos os filmes, ocorre numa gama de temperaturas que varia aproximadamente entre 17 e 124°C dependendo do filme, e está relacionada com perda de água presente nos filmes, a qual pode estar ligada química e fisicamente aos constituintes do filme (Reddy e Rhim, 2014). Relativamente a esta etapa pode ainda salientar-se uma perda de água mais acentuada no filme controlo, cerca de 12% e uma menor perda no filme CMX:Ag:Líp, cerca de 5%. Estes resultados mostram o carácter mais hidrofílico do filme controlo em oposição ao carácter hidrofóbico do filme com lípidos.

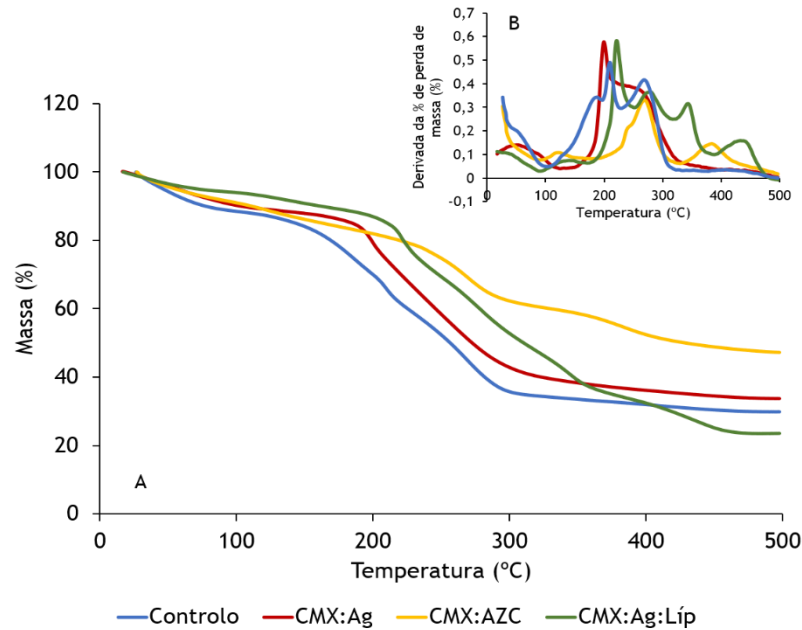


Figura 18 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do filme final e dos filmes com agentes de reticulação. A - TG e B - DTG.

A segunda etapa, também comum a todos os filmes (com exceção do filme CMX:AZC), inicia-se sensivelmente à temperatura de 180°C e termina sensivelmente aos 252°C, registando-se pequenas diferenças nestes dois valores de temperaturas entre os filmes. Esta etapa é normalmente atribuída à volatilização do glicerol (Reddy e Rhim, 2014). As etapas subsequentes apresentam algumas diferenças para os vários filmes. No caso do filme controlo, a última etapa de perda de massa é atribuída à degradação da CMX. A etapa ocorreu entre 228 e 313°C, com um pico máximo de degradação a 269°C, registando-se uma perda de massa de 22% nesta gama de temperatura, estes resultados estão de acordo com outros trabalhos publicados (Alekhina et al., 2014; Yang et al., 2007). No filme de CMX:Ag a terceira etapa de degradação térmica localiza-se entre os 214°C e 339°C, correspondendo provavelmente, à degradação térmica dos dois polímeros, CMX e Agar. Nesta etapa ocorreu uma perda de massa de 34%. El-Hefian et al. (2012) sugerem que a degradação térmica máxima do agar ocorre a uma temperatura cerca de 300°C, no entanto, no caso do filme CMX:Ag este valor não se apresenta tão bem definido, provavelmente, porque estamos perante uma mistura de dois polímeros. Quanto ao filme de CMX:AZC pode observar-se uma perda de massa menos acentuada em relação aos restantes filmes. A segunda etapa de degradação térmica ocorre entre 93 e 149°C com uma perda de massa de 5%, a qual poderá resultar da libertação de moléculas de água coordenadas ao zircónio (Sako e Sakai, 2013). De seguida, entre 194 a 312°C, regista-se uma nova perda de massa de aproximadamente 21%, associada à decomposição das xilanas e do glicerol. Posteriormente, entre as temperaturas 331 e 433°C, observa-se a última etapa de perda de massa, de aproximadamente 10%, a qual poderá reverter da cristalização do AZC (Sako e Sakai, 2013). É de realçar que este filme é o que apresenta maior quantidade de massa residual. Na curva

termogravimétrica do filme CMX:Ag:Líp, entre as temperaturas de 183 e 483°C, ocorrem sucessivas perdas de massa, registando-se quatro picos sucessivos. O primeiro pico à temperatura de 222°C corresponde, possivelmente, à volatilização do glicerol. O segundo pico a 279°C, presumivelmente estará associado à degradação térmica dos polímeros, CMX e agar. O terceiro pico à temperatura de 344°C, poderá corresponder à evaporação do ácido linoleico, e/ou produtos derivados da sua degradação, o que corrobora com os resultados obtidos por Kapusniak e Siemion (2007). O último pico a 473°C corresponde, possivelmente, à degradação térmica do óleo vegetal, mais concretamente, os ácidos gordos monoinsaturados (Santos et al., 2002). De registar que este filme é o que apresenta menor quantidade de massa residual. Após a degradação térmica, as percentagens residuais à temperatura de 500°C foram de 30, 34, 47 e 23%, respetivamente para os filmes controlo, CMX:Ag, CMX:AZC e CMX:Ag:Líp. A massa residual da CMX está em conformidade com outros trabalhos publicados (Alekhina et al., 2014). A elevada massa residual presente nos filmes controlo e CMX:Ag poderá estar associada à quantidade de sais presentes, os quais poderão ter origem no processo de modificação da xilana nativa ou ainda nos processos de extração e purificação da xilana nativa (Ren e Sun, 2010). Esta conclusão está em conformidade com os resultados obtidos na análise de cinzas da xilana nativa e da CMX, as quais foram, respetivamente 21 e 7%. A percentagem de massa residual no filme que contém lípidos, possivelmente, estará associada à degradação incompleta do óleo vegetal, nomeadamente, ácidos gordos saturados (Santos et al., 2002) e à formação de inorgânicos complexos. O filme CMX:AZC apresentou maior massa residual, provavelmente, devido à degradação incompleta e à formação de subprodutos resultantes da decomposição do AZC (Rubio et al., 2009).

O comportamento térmico dos filmes foi ainda analisado por DSC. Este método permite a monitorização de alterações nas propriedades físicas ou químicas dos materiais em função da temperatura, através da deteção de variações de calor associadas a tais processos. No DSC, o princípio de medição baseia-se na comparação entre a taxa de fluxo de calor da amostra e de um material inerte de referência, os quais são aquecidos ou arrefecidos à mesma taxa. As alterações na amostra associadas à absorção ou à libertação de calor causam uma alteração no fluxo de calor o qual é registado como um pico. A área sob o pico é diretamente proporcional à alteração de entalpia e a sua direção indica se o evento é endotérmico ou exotérmico (Biliaderis, 1983). Os dados obtidos em DSC devem ser analisados com cuidado, pois são o resultado de todas as reações que ocorrem na amostra durante o ensaio. É de salientar que as reações primárias poderão desencadear produtos intermediários e originar reações secundárias complexas. Por exemplo, a água produzida pela fase de desidratação pode favorecer a ocorrência de reações de hidrólise, inibir a volatilização e aumentar a formação de resíduo. A Figura 19 ilustra os resultados obtidos para os filmes em estudo, na gama de temperatura entre 0 e 300°C, no caso dos filmes controlo e CMX:Ag e entre 0 a 500°C para os filmes CMX:AZC e CMX:Ag:Líp.

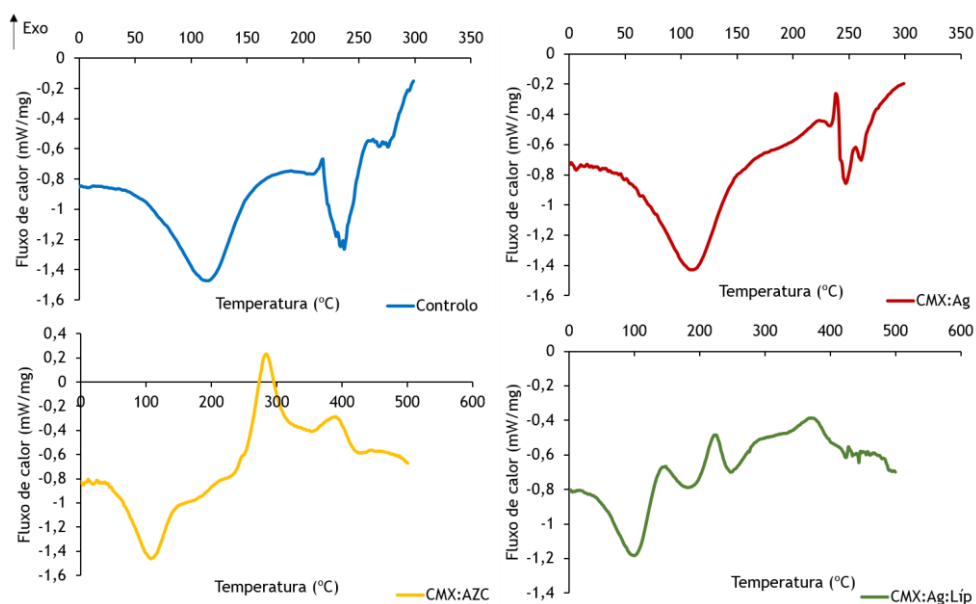


Figura 19 - Curvas DSC do filme final e dos filmes com agentes de reticulação.

Como se pode visualizar na Figura 19, em todos os filmes desenvolvidos neste estudo foi registado à temperatura de 100°C um pico endotérmico, característico da desidratação dos filmes, este resultado está de acordo com o obtido na análise TG. A partir da temperatura de 100°C o fluxo de calor é tendencialmente crescente correspondendo às reações exotérmicas resultantes da decomposição da CMX, Agar e AZC. Nesta etapa pode observar-se que no filme controlo surge um pico máximo, exotérmico, à temperatura de 215°C, enquanto nos filmes CMX:Ag e CMX:AZC, o correspondente pico, surge nas temperaturas de 237 e 283°C respetivamente. Este resultado sugere que o filme de CMX apresenta maior estabilidade térmica quando tem incorporado um agente reticulante, sendo o AZC aquele que oferece maior estabilidade. É de salientar que o filme CMX:AZC apresenta um pico exotérmico mais pronunciado do que os filmes controlo e CMX:Ag sugerindo maior entalpia neste estágio, confirmando a sua maior estabilidade térmica. Outro aspeto a salientar é o aparecimento de um pico endotérmico nos filmes controlo e CMX:Ag nas temperaturas de 235 e 247°C respetivamente e que não é visível no filme CMX:AZC. Este resultado poderá ser explicado pela ocorrência simultânea de reações de carbonização (exotérmicas) e volatilização (endotérmicas), sugerindo que nos filmes controlo e CMX:Ag, as reações de volatilização sobrepõem-se em termos energéticos às reações de carbonização, não se observando este resultado no filme de CMX:AZC, onde, possivelmente, as reações de carbonização são mais importantes nesta etapa. Ainda no filme CMX:AZC, a curva de DSC revela à temperatura de 388°C um novo pico também exotérmico que poderá ser o resultado da cristalização do AZC (Sako e Sakai, 2013). Por último, no filme com lípidos, observa-se um pico exotérmico à temperatura de 223°C, o qual poderá estar relacionado com a decomposição dos polímeros CMX e agar. Acima dos 340°C observa-se sucessivos picos exotérmicos, os quais, provavelmente, correspondem à polimerização do ácido linoleico e ácidos gordos presentes no óleo vegetal (Souza et al., 2004). Simultaneamente poderão ocorrer reações endotérmicas, nomeadamente



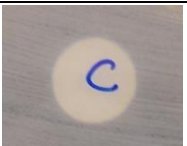

evaporação do ácido linoleico, e decomposição do ácido linoleico e ácidos gordos presentes no óleo vegetal (Kapusniak e Siemion, 2007; Souza et al., 2004). No entanto, em termos energéticos, as reações exotérmicas sobrepõem-se às reações endotérmicas.

Os resultados obtidos no TGA e DSC sugerem que a incorporação de aditivos nos filmes de CMX melhora a sua estabilidade térmica, sendo o filme reticulado com AZC mais estável termicamente.

4.3.8. Propriedades antimicrobianas

A Tabela 11 apresenta os resultados relativos à atividade antimicrobiana do filme final contra as bactérias *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*. No filme CMX:Ag:Líp verificou-se um halo de inibição maior comparativamente ao mesmo filme dos estudos preliminares, que anteriormente apresentou 14 e 15 mm de diâmetro, respetivamente para *B. cereus* e *S. aureus*. Este aumento do halo de inibição estará, provavelmente, relacionado com a diminuição da espessura do filme CMX:Ag:Líp, a qual, como já mencionado, desempenha um papel importante nas propriedades antimicrobianas dos filmes. No entanto, a diminuição da espessura não influenciou a atividade antimicrobiana nas bactérias Gram-negativas. Assim, pode concluir-se, que a interação dos lípidos com os restantes componentes do filme se sobrepõe à influência da espessura na atividade antimicrobiana.

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana do filme final.

Filme	Diâmetro do halo de inibição (mm)/imagens			
	<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. typhimurium</i> (ATCC 13311)
CMX:Ag:Líp	16 ± 0,71	20 ± 0,71	10 ± 0,00	10 ± 0,00
				

Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras

O melhoramento das propriedades de filmes comestíveis à base de carboximetilxilanas foi o principal objetivo deste estudo.

A primeira parte deste trabalho consistiu na modificação química das xilanas nativas, através da reação de carboximetilação. Com esta modificação química foi possível obter xilanas, nomeadamente carboximetilxilanas, solúveis em água. Esta característica é fundamental para a produção de filmes comestíveis.

Na segunda parte experimental deste trabalho estudou-se o melhoramento das propriedades mecânicas, hidrofóbicas e antimicrobianas dos filmes de CMX. Para levar a cabo este estudo foram incorporados nas formulações dos filmes diferentes aditivos, nomeadamente, AZC, agar, glioxal, ácidos gordos, óleo vegetal e óleo essencial de coentros. Usando diferentes técnicas de caracterização foi possível avaliar a qualidade dos filmes, os quais foram produzidos laboratorialmente através da técnica de evaporação do solvente. Esta segunda etapa permitiu fazer a seleção dos aditivos a usar na terceira parte experimental deste trabalho, na qual se produziu uma formulação para a obtenção de um filme que apresentasse o melhor compromisso entre as propriedades mecânicas, hidrofóbicas e antimicrobianas. Pode concluir-se que o agar, óleo vegetal e ácido linoleico foram os aditivos que proporcionaram melhores resultados nas propriedades mencionadas anteriormente e que deram, portanto origem ao filme final.

No que concerne à terceira parte experimental, para além do filme de CMX composto por agar e mistura de lípidos, produziram-se e caracterizaram-se dois filmes com apenas os agentes de reticulação, AZC e agar. Os filmes foram caracterizados em termos das propriedades mecânicas, hidrofóbicas, óticas, térmicas, microestrutura, permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio. Adicionalmente avaliou-se a atividade antimicrobiana do filme com lípidos.

Relativamente às propriedades mecânicas, os resultados obtidos permitiram concluir que o filme CMX:Ag foi aquele que apresentou melhores propriedades mecânicas. No entanto, dado que o objetivo deste trabalho foi também a produção de um filme que possuísse igualmente propriedades antimicrobianas, o filme com lípidos, embora menos resistente do que os outros filmes estudados nesta terceira parte do trabalho, apresentou melhor desempenho mecânico que o filme controlo.

As propriedades hidrofóbicas do filme CMX foram melhoradas através da incorporação dos lípidos, óleo vegetal e ácido linoleico na formulação. Esta conclusão foi alcançada com base

nos resultados obtidos através da avaliação do ângulo de contacto com água. O aumento da hidrofobicidade dos filmes reduziu a permeabilidade ao vapor de água, como era esperado.

Quanto à permeabilidade ao oxigénio, todos os filmes produzidos nesta parte experimental, em especial o filme com incorporação de lípidos, apresentaram baixa permeabilidade ao oxigénio, permitindo concluir que os filmes à base de CMX, com ou sem aditivos, são apropriados para embalagens destinadas ao setor alimentar, onde o oxigénio desempenha um papel importante.

A avaliação da microestrutura dos filmes, realizada através das imagens obtidas no SEM permitiu concluir que as mesmas são essenciais na compreensão das propriedades como a permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio, bem como a compatibilidade entre os componentes utilizados na produção dos filmes.

No que diz respeito às restantes propriedades, pode ainda concluir-se que, todos os filmes obtidos eram transparentes e de cor amarelada, sendo o filme com lípidos aquele que exibiu menor transparência e uma cor amarela menos intensa. Na análise termogravimétrica e na análise diferencial de calorimetria, os resultados obtidos sugeriram que a incorporação de aditivos nos filmes de CMX melhora a sua estabilidade térmica, sendo o filme com lípidos e o filme reticulado com AZC aqueles que apresentaram maior estabilidade.

Pode ainda concluir-se que a presença de ácido linoleico proporcionou uma boa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*). Estes resultados mostraram que o ácido linoleico presente em filmes de CMX pode atuar como agente antimicrobiano na preservação alimentar, onde as bactérias em causa são prevalentes.

Como trabalho futuro, em primeiro plano, seria interessante avaliar a aplicabilidade dos filmes, quer como revestimento quer como embalagem, em alimentos onde as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* possam estar presentes. O estudo de outros aditivos que pudessem proporcionar um ótimo compromisso entre as propriedades dos filmes, seria igualmente, um assunto interessante a desenvolver em trabalho futuro. O estudo da estabilidade dos filmes é igualmente um tema de interesse, dado que, os materiais de embalagem devem preservar as suas propriedades durante longos períodos de tempo. Por último, o estudo mais aprofundado da componente antimicrobiana seria igualmente um tema de interesse a desenvolver, nomeadamente, tentar encontrar um composto natural que tivesse uma ação mais ampla em termos de microrganismos.

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- Agbor, V., Carere, C., Cicek, N., Sparling, R., Levin, D., 2014. Biomass pretreatment for consolidated bioprocessing, em: Waldron, K. (Ed.), *Advances in Biorefineries - Biomass and Waste Supply Chain Exploitation*. Woodhead Publishing, pp. 234-258.
- Ahmad, M., Hani, N.M., Nirmal, N.P., Fazial, F.F., Mohtar, N.F., Romli, S.R., 2015. Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. *Progress in Organic Coatings* 84, 115-127.
- Albertson, A.C., Edlund, U., 2011. Synthesis, chemistry and properties of hemicelluloses, em: Plackett, D. (Ed.), *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 133-150.
- Alekhina, M., Mikkonen, K.S., Alén, R., Tenkanen, M., Sixta, H., 2014. Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films. *Carbohydrate polymers* 100, 89-96.
- Andrade, C.T., Rojas, E.G.A., 2012. Biopolymers, em: Telis, V.R.N. (Ed.), *Biopolymer Engineering in Food Processing*. CRC Press, pp. 17-68.
- Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M., 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7, 163-173.
- Appendini, P., Hotchkiss, J.H., 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3, 113-126.
- Atef, M., Rezaei, M., Behrooz, R., 2014. Preparation and characterization agar-based nanocomposite film reinforced by nanocrystalline cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules* 70, 537-544.
- Azeredo, H.M.C., Rosa, M.F., Souza Filho, M. de S.M., Waldron, K.W., 2014. The use of biomass for packaging films and coatings, em: Waldron, K. (Ed.), *Advances in Biorefineries - Biomass and Waste Supply Chain Exploitation*. Woodhead Publishing, pp. 819-874.
- Balat, M., Balat, M., Kirtay, E., Balat, H., 2009. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. *Energy Conversion and Management* 50, 3147-3157.

- Barbat, A., Gloaguen, V., Moine, C., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Ropartz, D., Krausz, P., 2008. Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-O-methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*. 2. Evidence of a structure - activity relationship. *Journal of Natural Products* 71, 1404-1409.
- Belmokaddem, F.Z., Pinel, C., Huber, P., Petit-Conil, M., Perez, D.S., 2011. Green synthesis of xylan hemicellulose esters. *Carbohydrate Research* 346, 2896-2904.
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J.E., 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering* 110, 232-239.
- Biliaderis, C.G., 1983. Differential scanning calorimetry in food research - A review. *Food Chemistry* 10, 239-265.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Byun, Y., Yachuan, Z., Geng, X., 2014. Plasticization and polymer morphology, em: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, pp. 87-108.
- Callister, W.D., 2001. *Fundamentals of Materials Science and Engineering - An Interactive*, Quinta. ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N., Flores, S.K., 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology* 4, 849-875.
- Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2012. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. *Food Hydrocolloids* 27, 175-184.
- Chen, X., Ren, J., Meng, L., 2015. Influence of ammonium zirconium carbonate on properties of poly (vinyl alcohol)/xylan composite films. *Journal of Nanomaterials* 2015, 1-8.
- Corrales, M., Fernández, A., Han, J.H., 2014. Antimicrobial packaging systems, em: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, pp. 133-170.
- Costa, M.J., Cerqueira, M.A., Ruiz, H.A., Fougnyes, C., Richel, A., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Aguedo, M., 2015. Use of wheat bran arabinoxylans in chitosan-based films: Effect on physicochemical properties. *Industrial Crops and Products* 66, 305-311.

- Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J.B., Ghanati, K., Khakpour, M., Khaksar, R., 2015. Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 606-613.
- Decreto-Lei no 106/2005 de 29 de Junho do Ministério da agricultura , do desenvolvimento rural e das pescas, 2005.
- Desbois, A.P., Smith, V.J., 2010. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1629-1642.
- Deutschmann, R., Dekker, R.F.H., 2012. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances* 30, 1627-1640.
- Ebringerová, A., 2012. The potential of xylans as biomaterial resources, em: Habibi, Y., Lucia, L.A. (Eds.), *Polysaccharide Buildings Blocks: Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 331-365.
- Ebringerová, A., Heinze, T., 2000. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21, 542-556.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T., 2005. Hemicellulose. *Advances in Polymer Science* 186, 1-67.
- El-Hefian, E.A., Nasef, M.M., Hamid, A., 2012. Preparation and characterization of chitosan/agar blended films: Part 1. Chemical structure and morphology. *E-Journal of Chemistry* 9, 510-516.
- Escalante, A., Gonçalves, A., Bodina, A., Stepana, A., Sandström, C., Toriza, G., Gatenholma, P., 2012. Flexible oxygen barrier films from spruce xylan. *Carbohydrate Polymers* 87, 2381-2387.
- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A., Ibarz, A., 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology* 22, 292-303.
- Fernández-Pan, I., Caballero, J.I.M., 2011. Biopolymers for edible films and coatings in food applications, em: Plackett, D. (Ed.), *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 233-254.

- Figura, L.O., Teixeira, A.A., 2007. Permeability, em: Figura, L.O., Teixeira, A.A. (Eds.), *Food Physics*. Springer, pp. 233-255.
- Galiotta, G., Di Gioia, L., Guilbert, S., Cuq, B., 1998. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science* 81, 3123-3130.
- García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., 2000. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science* 65, 941-947.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., Yarmand, M.S., 2011. Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on kefir and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 49, 378-384.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 101, 4775-4800.
- Gordobil, O., Egüés, I., Urruzola, I., Labidi, J., 2014. Xylan-cellulose films: Improvement of hydrophobicity, thermal and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers* 112, 56-62.
- Gröndahl, M., Bindgard, L., Gatenholm, P., Hjertberg, T., 2013. Polymeric film or coating comprising hemicellulose [WWW Document]. URL <http://www.google.com/patents/US8557033> (accedido 10.15.14).
- Gröndahl, M., Eriksson, L., Gatenholm, P., 2004. Material properties of plasticized hardwood xylans for potential application as oxygen barrier films. *Biomacromolecules* 5, 1528-1535.
- Guilbert, S., Gontard, N., Gorris, L.G.M., 1996. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT - Food Science and Technology* 29, 10-17.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N., 2002. Lipids: definition, isolation, separation and detection., em: Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N. (Eds.), *Lipid Biochemistry - An Introduction*. Blackwell Science, pp. 1-12.
- Han, J.H., 2014a. Edible films and coatings: A review, em: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, pp. 213-255.
- Han, J.H., 2014b. A review of food packaging technologies and innovations, em: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, pp. 3-12.

- Hansen, N.M.L., Blomfeldt, T.O.J., Hedenqvist, M.S., Plackett, D. V., 2012. Properties of plasticized composite films prepared from nanofibrillated cellulose and birch wood xylan. *Cellulose* 19, 2015-2031.
- Hansen, N.M.L., Plackett, D., 2008. Sustainable films and coatings from hemicelluloses: A review. *Biomacromolecules* 9, 1493-1505.
- Heinze, T., Daus, S., 2011. Xylan and xylans derivatives - basis of functional polymers for the future, em: Williams, P.A. (Ed.), *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials*, RSC Polymer Chemistry Series. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 88-129.
- Húngaro, H.M., Peña, W.E.L., Silva, N.B.M., Carvalho, R.V., Alvarenga, V.O., Sant'Ana, A.S., 2014. Food Microbiology, em: Alfen, N.K. Van (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Elsevier Science & Technology, pp. 213-231.
- Ionashiro, M., 2004. *Giolito: Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial*, Segunda. ed. Giz Editorial.
- Janjarasskul, T., Krochta, J.M., 2010. Edible packaging materials. *Annual Review of Food Science and Technology* 1, 415-448.
- Kapusniak, J., Siemion, P., 2007. Thermal reactions of starch with long-chain unsaturated fatty acids. Part 2. Linoleic acid. *Journal of Food Engineering* 78, 323-332.
- Karbowiak, T., Debeaufort, F., Champion, D., Voilley, A., 2006. Wetting properties at the surface of iota-carrageenan-based edible films. *Journal of Colloid and Interface Science* 294, 400-410.
- Kayserilioğlu, B.Ş., Bakir, U., Yilmaz, L., Akkaş, N., 2003. Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: Mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. *Bioresource Technology* 87, 239-246.
- Kowalczyk, D., Baraniak, B., 2014. Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films - A comparative study. *Food Hydrocolloids* 41, 195-209.
- Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., 2009. Delivery of flavor and active ingredients using edible films and coatings, em: M.E. Embuscado, Huber, K.C. (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer Science + Business Media, LLC, pp. 295-313.

- Mikkonen, K.S., 2013. Recent studies on hemicellulose-based blends, composites and nanocomposites, em: Thomas, S., Visakh, P.M., Mathew, A.P. (Eds.), *Advances in Natural Polymers -Composites and Nanocomposites*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 313-336.
- Mikkonen, K.S., Heikkilä, M.I., Willför, S.M., Tenkanen, M., 2012. Films from glyoxal-crosslinked spruce galactoglucomannans plasticized with sorbitol. *International Journal of Polymer Science* 2012, 1-8.
- Mikkonen, K.S., Schmidt, J., Vesterinen, A.-H., Tenkanen, M., 2013. Crosslinking with ammonium zirconium carbonate improves the formation and properties of spruce galactoglucomannan films. *Journal of Materials Science* 48, 4205-4213.
- Mikkonen, K.S., Tenkanen, M., 2012. Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. *Trends in Food Science & Technology* 28, 90-102.
- Miller, K.S., Krochta, J.M., 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology* 8, 228-237.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., Voilley, A., 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42, 67-89.
- Morris, V.J., 2006. Bacterial Polysaccharides, em: Stephen, A.M., Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), *Food Polysaccharides and Their Applications*. Taylor & Francis Group CRC Press, pp. 413-454.
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* 41, 1913-1923.
- Müller, C.M.O., Yamashita, F., Grossmann, M.V.E., Mali, S., 2012. Films and coatings produced from biopolymers and composites, em: Telis, V.R.N. (Ed.), *Biopolymer Engineering in Food Processing*. CRC Press, pp. 145-216.
- Muppalla, S.R., Kanatt, S.R., Chawla, S.P., Sharma, A., 2014. Carboxymethyl cellulose-polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. *Food Packaging and Shelf Life* 2, 51-58.
- Navarro-Tarazaga, M.L., Del Río, M.A., Krochta, J.M., Pérez-Gago, M.B., 2008. Fatty acid effect on hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible film properties and postharvest quality

- of coated «Ortanique» mandarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 10689-10696.
- Nieto, M., 2009. Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings, em: Embuscado, M.E., Huber, K.C. (Eds.), *Edible films and coatings for food applications*. Springer Science + Business Media, LLC, pp. 57-108.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H., 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry* 122, 161-166.
- Oun, A.A., Rhim, J.-W., 2015. Preparation and characterization of sodium carboxymethyl cellulose/cotton linter cellulose nanofibril composite films. *Carbohydrate Polymers* 127, 101-109.
- Park, H.J., Chinnan, M.S., 1995. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering* 25, 497-507.
- Pavlat, A.E., Orts, W., 2009. *Edible films and coatings: why, what, and how?*, em: Embuscado, M.E., Huber, K.C. (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer Science + Business Media, LLC, pp. 1-23.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R.-C., 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances* 30, 879-903.
- Pérez-Gago, M.B., Rhim, J.-W., 2014. Edible coating and film materials: Lipid bilayers and lipid emulsions, em: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, pp. 325-345.
- Péroval, C., Debeaufort, F., Despré, D., Voilley, A., 2002. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3977-3983.
- Perry, R., Green, D., Maloney, J., 1999. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, Sétima. ed.
- Petzold, K., Schwikal, K., Heinze, T., 2006. Carboxymethyl xylan—synthesis and detailed structure characterization. *Carbohydrate Polymers* 64, 292-298.
- Petzold-Welcke, K., Schwikal, K., Daus, S., Heinze, T., 2014. Xylan derivatives and their application potential - Mini-review of own results. *Carbohydrate polymers* 100, 80-88.

- Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A., Luu, D., 2009. Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering* 90, 548-558.
- Popson, S.J., Malthouse, D.D., Crawford, T.B., Popson, M.T., Crawford, P.M., 1996. Measurement and control of the optical properties of paper, Segunda. ed. Technidyne Corporation.
- Reddy, J.P., Rhim, J.-W., 2014. Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. *Carbohydrate Polymers* 110, 480-488.
- Reddy, N., Yang, Y., 2010. Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry* 118, 702-711.
- Ren, J.-L., Sun, R.-C., 2010. Hemicelluloses, em: Sun, R.-C. (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. Elsevier, pp. 73-130.
- Ren, J.-L., Sun, R.-C., Peng, F., 2008. Carboxymethylation of hemicelluloses isolated from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability* 93, 786-793.
- Rhim, J.-W., Ng, P.K.W., 2007. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47, 411-433.
- Rubio, E., Rodriguez-lugo, V., Rodriguez, R., 2009. Nano zirconia and sulfated zirconia from ammonia zirconium carbonate. *Reviews on Advanced Materials Science* 22, 67-73.
- Sabater, M.J., Ródenas, T., Heredia, A., 2013. Biopolymers from plants, em: Thomas, S., Durand, D., Chassenieux, C., Jyotishkumar, P. (Eds.), *Handbook of Biopolymer - Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*. Wiley-VCH, pp. 37-86.
- Sako, R., Sakai, J., 2013. Effect of curing temperature on coating structure and corrosion resistance of ammonium zirconium carbonate on galvanized steel surface. *Surface and Coatings Technology* 219, 42-49.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings: A review. *Food Engineering Reviews* 3, 1-16.
- Santos, J.C.O., Santos, I.M.G., De Souza, A.G., Prasad, S., Dos Santos, A.V., 2002. Thermal stability and kinetic study on thermal decomposition of commercial edible oils by thermogravimetry. *Journal of Food Science* 67, 1393-1398.

- Saxena, A., Ragauskas, A.J., 2009. Water transmission barrier properties of biodegradable films based on cellulosic whiskers and xylan. *Carbohydrate Polymers* 78, 357-360.
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D.I., Domingues, F.C., 2011a. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 19, 42-47.
- Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2011b. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology* 60, 1479-1486.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P.J.A., Gómez-Guillén, M.C., Bifani, V., 2013. Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. *Food Engineering Reviews* 5, 200-216.
- Sociedade Ponto Verde, 2014. Relatórios & Estatísticas [WWW Document]. URL <http://www.pontoverde.pt/numeros.php> (acedido 11.20.14).
- Song, D., Zhao, Y., Dong, C., Deng, Y., 2009. Surface modification of cellulose fibers by starch grafting with crosslinkers. *Journal of Applied Polymer Science* 113, 3019-3026.
- Sothornvit, R., 2014. Edible films and coatings for packaging applications, em: Alavi, S., Thomas, S., Sandeep, K.P., Kalarikkal, N., Varghese, J., Yaragalla, S. (Eds.), *Polymers for Packaging Applications*. Apple Academic Press, pp. 173-195.
- Sousa, A.M.M., Souza, H.K.S., Liu, L.S., Gonçalves, M.P., 2015. Alternative plasticizers for the production of thermo - compressed agar films. *International Journal of Biological Macromolecules* 76, 138-145.
- Souza, A.G. de, Oliveira Santos, J.C., Conceição, M.M., Dantas Silva, M.C., Prasad, S., 2004. A thermoanalytic and kinetic study of sunflower oil. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 21, 265-273.
- Tanodekaew, S., Channasanon, S., Uppanan, P., 2006. Xylan/polyvinyl alcohol blend and its performance as hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science* 100, 1914-1918.
- Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., Del Río, M.A., Pérez-Gago, M.B., 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 872-900.

- Velkova, N., Doliška, A., Zemljič, L.F., Vesel, A., Saake, B., Strnad, S., 2015. Influence of carboxymethylation on the surface physical-chemical properties of glucuronoxylan and arabinoxylan films. *Polymer Engineering and Science* 1-8.
- Venugopal, V., 2011. Edible films and carrier matrices from marine polysaccharides, em: Venugopal, V. (Ed.), *Marine Polysaccharides - Food Applications*. CRC Press, pp. 259-307.
- Walker, J., 2007. Basic wood chemistry and cell wall ultrastructure, em: Walker, J.C.F. (Ed.), *Primary Wood Processing - Principles and Practice*. Springer, pp. 23-67.
- Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J.F., Kerry, J.P., 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology* 42, 1128-1138.
- Wang, S., Zhang, F., Chen, F., Pang, Z., 2013. Preparation of a crosslinking cassava starch adhesive and its application in coating paper. *BioResources* 8, 3574-3589.
- Wu, Y., Geng, F., Chang, P.R., Yu, J., Ma, X., 2009. Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. *Carbohydrate Polymers* 76, 299-304.
- Wu, Y., Weller, C.L., Hamouz, F., Cuppett, S.L., Schnepf, M., 2002. Development and application of multicomponent edible coatings and films: A review. *Advances in Food and Nutrition Research* 44, 347-394.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C., 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* 86, 1781-1788.
- Zaritzky, N., 2011. Edible coatings to improve food quality and safety, em: Aguilera, J.M., Barbosa-Cánovas, G. V., Simpson, R., Bermúdez-Aguirre, D., Welti-Chanes, J. (Eds.), *Food Engineering Interfaces*. Springer, pp. 631-659.
- Zhang, Y., Rempel, C., McLaren, D., 2014. Edible coating and film materials: carbohydrates, em: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, pp. 305-321.

Anexos

Anexo 1 - Composição dos filmes com AL e mistura de lípidos (OL+AL) usados na análise da atividade antimicrobiana dos ensaios preliminares.

Formulações	%CMX	%Agar	%AL	%AS	%OV	%Glicerol	Espessura (µm)
0,35%AL	0,50	0,25	0,35			0,2	94 ± 2,35
0,7%AL	0,50	0,25	0,7			0,2	129 ± 9,28
0,7% (AL+OV)	0,50	0,25	0,35		0,35	0,2	129 ± 8,00