



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**OBTENÇÃO DE FILMES PELA RETICULAÇÃO DE QUITOSANA COM
TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA E WHEY PROTEIN**

Campina Grande – PB

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS**

**OBTENÇÃO DE FILMES PELA RETICULAÇÃO DE QUITOSANA COM
TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA E WHEY PROTEIN**

Hanndson Araújo Silva

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande.

ORIENTADOR:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Trindade Rocha

Campina Grande - PB

Mai de 2023

S586o Silva, Hanndson Araújo.
Obtenção de filmes pela reticulação de quitosana com transglutaminase microbiana e Whey Protein / Hanndson Araújo Silva. - Campina Grande, 2023.
65 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2023.
"Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Trindade Rocha."
Referências.

1. Quitosana. 2. Whey Protein. 3. Transglutaminase. 4. Metodologia de Superfície de Resposta (RSM). 5. Preservação de Morangos. I. Rocha, Ana Paula Trindade. II. Título.

CDU 677.473(043)

HANNDSON ARAÚJO SILVA

OBTENÇÃO DE FILMES PELA RETICULAÇÃO DE QUITOSANA COM
TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA E WHEY PROTEIN

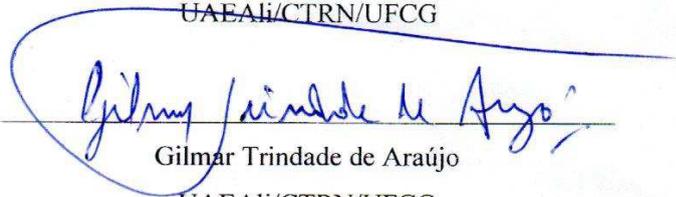
Projeto defendido e aprovado em 30 de Maio de 2023, pela banca examinadora
constituída pelos professores:



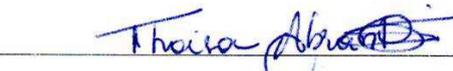
Ana Paula Trindade Rocha
UAEAl/CTRN/UFCG



Deyzi Santos Gouveia
UAEAl/CTRN/UFCG



Gilmar Trindade de Araújo
UAEAl/CTRN/UFCG



Thaisa Abrantes Souza Gusmão
UAEAl/CTRN/UFCG



Mércia Melo de Almeida Mota
UAEAl/CTRN/UFCG

Campina Grande, Maio de 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter dado condições para a realização deste ideal e coragem para enfrentar todos os obstáculos surgidos ao longo do meu caminho.

Aos meus familiares, especialmente a minha Mãe Paula, meu Pai Rostand, minha irmã Hellen, minha avó Maria, minha namorada Yalorisa, pelo incentivo e apoio a mim dedicados ao longo deste trabalho.

Aos professores, Profa. Dra. Ana Paula Trindade Rocha, Prof. Dr. Gilmar Trindade de Araujo e Prof. Dr. Hugo Miguel Lisboa, orientadores, pelo apoio e ensinamentos em prol desta tese.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições dadas para melhoria deste trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA) e a Unidade Acadêmica de Engenharia de Alimentos, em especial a Engenheira Renata Duarte e Técnica de Laboratório Leila, que possibilitaram a utilização das dependências do Laboratório de análises químicas e de bioquímica, para os experimentos.

À todos os colegas do mestrado, doutorado e graduação, em especial a Iara Bezerra de Oliveira e Armando Lauro Costa Neto, pela sincera amizade e companheirismo.

A todas as pessoas que, embora não citadas, me ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

A utilização de filmes e revestimentos biodegradáveis a base de proteína de soro de leite (Whey protein), quitosana, enzima transglutaminase e glicerol vai além da conservação de produtos vegetais, pois os filmes e revestimentos alteram a fisiologia destes produtos vegetais. Diante disto, os estudos devem ser direcionados para a avaliação das mudanças fisiológicas dos produtos recobertos ou embalados e aprofundar a discussão sobre as diversas matrizes poliméricas que podem ser utilizadas e quais as implicações tecnológicas para essa utilização. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar filmes biodegradáveis e comestíveis compostos por quitosana e whey protein reticulados por transglutaminase microbiana e avaliar seu potencial de barreira em morangos durante o armazenamento. Experimentos foram realizados para determinação das concentrações de quitosana, enzima transglutaminase e glicerol dos filmes e soluções de revestimento reticuladas. Os experimentos foram desenvolvidos referente aos artigos intitulados “Comportamento reológico do whey protein desnaturado reticulado por transglutaminase em diferentes quantidades e tempos de reação” e “Otimização da formulação de revestimento biodegradável obtido pela reticulação de whey protein com enzima transglutaminase e quitosana para melhorar a vida de prateleira de morangos.” foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Alimentos da Unidade Acadêmica de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Campina Grande. No presente trabalho foi avaliado a influência das concentrações da enzima transglutaminase, quitosana e glicerol nas propriedades físicas, mecânicas e de barreira dos filmes à base de proteína de soro de leite, com o objetivo de otimizar a formulação para aplicação em morangos usando a metodologia de superfície de resposta. Além disso, avaliamos o efeito do filme otimizado nos morangos por meio de análises físicas e físico-químicas durante o armazenamento, demonstrando que ele representa uma excelente barreira contra microrganismos, prolongando a vida útil dos frutos.

Palavras-chave: Whey protein; quitosana; transglutaminase; metodologia de superfície de resposta (RSM); preservação de morangos.

ABSTRACT

The use of biodegradable films and coatings based on whey protein (Whey protein), chitosan, transglutaminase enzyme and glycerol goes beyond the preservation of plant products, as films and coatings alter the physiology of these plant products. In view of this, studies should be directed towards the evaluation of the physiological changes of coated or packaged products and deepen the discussion on the various polymeric matrices that can be used and what are the technological implications for this use. Thus, the objective of this work was to develop and optimize biodegradable and edible films composed of chitosan and whey protein cross-linked by microbial transglutaminase and to evaluate their barrier potential in strawberries during storage. Experiments were carried out to determine the concentrations of chitosan, transglutaminase enzyme and glycerol in films and cross-linked coating solutions. The experiments were developed referring to the articles entitled “Rheological behavior of denatured whey protein cross-linked by transglutaminase in different amounts and reaction times” and “Optimization of the biodegradable coating formulation obtained by cross-linking whey protein with transglutaminase enzyme and chitosan to improve the life of strawberry shelf.” was developed at the Food Engineering Laboratory of the Food Engineering Academic Unit of the Federal University of Campina Grande. In the present work, the influence of the concentrations of the enzyme transglutaminase, chitosan and glycerol on the physical, mechanical and barrier properties of films based on whey protein was evaluated, with the objective of optimizing the formulation for application in strawberries using the methodology of response surface. In addition, we evaluated the effect of the optimized film on strawberries through physical and physicochemical analyzes during storage, demonstrating that it represents an excellent barrier against microorganisms, extending the shelf life of the fruits.

Keywords: Whey protein; chitosan; transglutaminase; response surface methodology (RSM); preservation of strawberries.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2. 1 Estrutura de quitina e quitosana.	12
Figura 2. 2 Principais propriedades funcionais de proteínas de interesse alimentar influenciadas por mTGase.	14

Artigo 1 - Comportamento reológico do whey protein desnaturado reticulado por transglutaminase em diferentes quantidades e tempos de reação.

Figura 1. Comportamento reológico das soluções tratadas com TG para reticulação com WPD adaptado à lei de Ostwald-Waelle nos tempos de reação de 8, 16 e 24 horas.	28
Figura 2. Comportamento de fluxo das soluções tratadas com transglutaminase microbiana nas proporções de 8 U/g (Fig. A), 14 U/g (Fig. B), 18 U/g (Fig. C), 22 U/g (Fig. D) e 26 U/g (Fig. E) e whey protein desnaturado ajustadas à lei de Ostwald-Waelle nos tempos de reação de 8, 16 e 24 horas.	29

Artigo 2 - Otimização da formulação de revestimento biodegradável obtido pela reticulação de whey protein com enzima transglutaminase e quitosana para melhorar a vida de prateleira de morangos.

Figura 1. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) na permeabilidade ao vapor de água (Y_1 ; g.mm/m ² .h.kPa) dos filmes obtidos.	46
Figura 2. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) na resistência à tração (MPa) dos filmes obtidos.	47
Figura 3. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) na extensibilidade (%) dos filmes obtidos.	47
Figura 4. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) no módulo de young (Mpa) dos filmes obtidos.	48

Figura 5. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X1; U/g), quitosana (X2; p/v) e glicerol (X3; p/v) na solubilidade (g/100g) dos filmes obtidos.....48

Figura 6. Efeito dos revestimentos otimizados à base de transglutaminase, quitosana, whey protein e glicerol na perda de peso, firmeza, pH, acidez, sólidos solúveis totais e índice de decadência fúngica dos morangos revestidos e não revestidos a 25°C e 5°C.....51

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Comportamento reológico do whey protein desnaturado reticulado por transglutaminase em diferentes quantidades e tempos de reação.

Tabela 1. Parâmetros dos dados ajustados pela lei de potência para os tratamentos de WPD+TG, com tempos de reação de 8, 16 e 24 horas.....31

Artigo 2 - Otimização da formulação de revestimento biodegradável obtido pela reticulação de whey protein com enzima transglutaminase e quitosana para melhorar a vida de prateleira de morangos.

Tabela 1. Fatores investigados e níveis de fator do planejamento experimental Box–Behnken.....35

Tabela 2. Arranjo de projeto de Box-Behnken e valores experimentais para cada resposta dos filmes obtidos a partir da reticulação do whey protein com a enzima transglutaminase e conjugado com quitosana.....36

Tabela 3. Valores de probabilidade associados (p - valores), erro de desajuste e regressão para cada resposta.....41

Tabela 4. Valores preditos e experimentais obtidos a partir da otimização da resposta do delineamento Box–Behnken.....49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVOS	9
1.1.1. OBJETIVO GERAL.....	9
1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Filmes Biodegradáveis.....	10
2.2. Quitosana	11
2.3. Transglutaminase	13
2.4. Utilização do whey protein em revestimentos	14
2.5. Propriedades funcionais de filmes biodegradáveis	16
2.6. Aplicação de filmes e revestimentos em frutas.....	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPITULO I: Comportamento reológico do whey protein desnaturado reticulado por transglutaminase em diferentes quantidades e tempos de reação.....	24
CAPITULO II: Otimização da formulação de revestimento biodegradável obtido pela reticulação de whey protein com enzima transglutaminase e quitosana para melhorar a vida de prateleira de morangos.....	35
CONCLUSÕES GERAIS.....	56

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda do consumidor por alimentos seguros, e com prazo de validade estendido de alta qualidade estimulou a busca por inovação na área de embalagens de alimentos. As empresas precisam se adaptar e encontrar maneiras de melhorar sua produtividade, levando também em consideração o impacto ambiental de suas novas soluções. A embalagem ativa é um dos novos sistemas de embalagem de alimentos que podem usar materiais biodegradáveis; importante, a embalagem interage com o produto alimentar, alterando suas condições, aumentando sua vida útil, segurança e qualidade ou melhorando suas características sensoriais (Cruz et al., 2018).

Uma tendência crescente é usar polímeros antimicrobianos sintéticos e naturais, para fornecer agentes de proteção não migratórios e não destruidores para aplicação em filmes, revestimentos e embalagens. Nas embalagens de alimentos, os efeitos antimicrobianos aumentam as propriedades de barreira dos materiais, aumentando a vida útil e a qualidade do produto (Broek et al., 2015).

Entre os materiais estudados para o desenvolvimento de filmes e revestimentos biodegradáveis para embalagens estão polissacarídeos como a quitosana, esses polissacarídeos são capazes de formar filmes e revestimentos com boas propriedades de barreira contra o transporte de gases como oxigênio e dióxido de carbono (Cazon et al., 2017).

O whey protein é um subproduto da fabricação de queijos. É produzido em grandes quantidades e, de fato, sua produção anual está aumentando ano a ano (Jiang et al., 2016). Este subproduto é amplamente utilizado na preparação de filmes biodegradáveis, devido às suas propriedades nutricionais e funcionais únicas (Ferreira et al., 2009).

Embora os filmes de proteínas normalmente possuam excelentes propriedades de barreira a gases, os filmes de whey protein apresentam baixa resistência à tração e alta permeabilidade ao vapor de água devido à alta proporção de aminoácidos hidrofílicos em suas estruturas (Fathi et al., 2018). Modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas, bem como a combinação com material hidrofóbico ou outros polímeros, podem melhorar a resistência mecânica dos filmes de proteínas e aumentar sua resistência ao vapor de água relativamente pobre (Coltelli et al., 2015).

As transglutaminases (TGase) são enzimas de reticulação disponíveis para catalisar a formação de ligações isopeptídicas covalentes entre moléculas de proteínas de diferentes origens (Sabbah et al., 2019). A TGase demonstrou seu potencial como agente catalisador na

preparação de filme composto comestível. Jiang et al., 2016 empregaram TGase para preparar filmes de carboximetilado de quitosana com proteínas de whey protein, obtendo ótimas barreiras ao oxigênio e dióxido de carbono.

A combinação dos polímeros e proteínas em revestimentos tem sido estudados para aplicação dos revestimentos em diversas frutas como por exemplo o morango, um fruto climatérico que possui um alto metabolismo pós-colheita, aumentando a velocidade de amadurecimento e susceptibilidade a microrganismos, resultando na diminuição da sua vida de prateleira, entretanto, até então, não há nenhum registro na literatura com relação a interação desses componentes (Transglutaminase, Quitosana e Glicerol), havendo portanto a necessidade de estudar o papel desses compostos poliméricos na formação e caracterização de revestimentos para utilização em frutas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar a produção de filmes a base de whey protein com diferentes teores de concentração da enzima transglutaminase, quitosana e glicerol a fim de avaliar a sua viabilidade de acordo com as propriedades físicas, mecânicas e de barreira dos filmes a base de whey protein, objetivando otimizar a formulação para aplicação em morangos por meio da metodologia de superfície de resposta.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e otimizar filmes biodegradáveis e comestíveis compostos por quitosana e whey protein reticulados por transglutaminase microbiana e avaliar seu potencial de barreira em morangos durante o armazenamento.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Avaliar as características reológicas de soluções reticuladas;
- b) Desenvolver filmes variando as quantidades de quitosana, transglutaminase microbiana e glicerol, com base em um planejamento experimental;
- c) Analisar as propriedades mecânicas e físicas dos filmes obtidos;
- d) Otimizar a formulação dos filmes obtidos no design experimental;
- e) Aplicar a solução otimizada em morangos;
- f) Analisar as características físicas e físico-químicas dos morangos revestidos ao longo do armazenamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Filmes Biodegradáveis

Atualmente, as indústrias e consumidores buscam reduzir os problemas ambientais associados às embalagens de alimentos e demandam materiais biodegradáveis. Os estudos têm se concentrado em materiais biopoliméricos como matéria-prima para embalagem e preservação de alimentos (Ansorena et al., 2018).

Filmes comestíveis e biodegradáveis podem ser uma alternativa aos materiais sintéticos de embalagem em várias aplicações, devido às suas capacidades para evitar perda de umidade, perda de aromas, transporte de solutos, absorção de água na matriz alimentar ou penetração de oxigênio (Cazon et al., 2017).

Por esse motivo há várias pesquisas no intuito da utilização de novos materiais para filmes comestíveis e biodegradáveis, abundantes na natureza. Em geral, esses materiais são baratos e muitos deles subprodutos (Han & Gennadios, 2006). Os materiais obtidos a partir de fontes naturais renováveis que foram utilizados para produzir filme comestível incluem principalmente proteínas, polissacarídeos, enzimas e todas as combinações possíveis entre eles e, às vezes, incorporação de aditivos com o objetivo de melhorar as propriedades do filme (Cazon et al., 2017).

As proteínas são materiais de formação de filme comumente usados. São macromoléculas com sequências específicas de aminoácidos e estruturas moleculares. As estruturas secundárias, terciárias e quaternárias de proteínas podem ser facilmente modificadas por desnaturação por calor, pressão, irradiação, tratamento mecânico, ácidos, álcalis, íons metálicos, sais, hidrólise química, tratamento enzimático e reticulação química. As características mais distintas das proteínas em comparação com outros materiais formadores de filme são desnaturação conformacional, cargas eletrostáticas e natureza anfifílica. Muitos fatores podem afetar a conformação de proteínas, como densidade de carga e equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico. Esses fatores podem finalmente controlar as propriedades físicas e mecânicas de filmes e revestimentos preparados (Han & Gennadios, 2006).

Polissacarídeos como derivados de celulose, quitosana, amidos e gomas têm grande potencial na formação de filmes e revestimentos comestíveis e podem ser usados como material de embalagem para conservação de alimentos (Ansorena et al., 2018). A sequência de polissacarídeos é simples comparada às proteínas, que possuem 20 aminoácidos comuns. No

entanto, a conformação das estruturas de polissacarídeos é mais complicada e imprevisível, resultando em pesos moleculares muito maiores que as proteínas. A maioria dos carboidratos é neutra, enquanto algumas gengivas são carregadas negativamente. Embora essa neutralidade eletrostática dos carboidratos possa não afetar significativamente as propriedades dos filmes e revestimentos formados, a ocorrência de um número relativamente grande de grupos hidroxila ou outras porções hidrofílicas na estrutura indica que as ligações de hidrogênio podem desempenhar papéis significativos na formação e nas características do filme (Han & Gennadios, 2006).

Filmes de quitosana possuem permeabilidade seletiva a gases (CO_2 e O_2) e boas propriedades mecânicas. No entanto, o fato de os filmes de quitosana serem altamente permeáveis ao vapor de água limita seu uso como uma desvantagem importante, pois um controle efetivo da transferência de umidade é uma propriedade desejável para a maioria dos alimentos, especialmente em ambientes úmidos. Uma maneira alternativa de melhorar as propriedades mecânicas e físicas desses biofilmes é combinar proteínas (por exemplo, proteínas do leite, proteína de soja, colágeno e gelatina) com polissacarídeos (por exemplo, amidos, alginatos, celulose e quitosana), além de enzimas como, por exemplo, a transglutaminase (Elsabee & Abdou, 2013).

Recentemente há alguns estudos no desenvolvimento de revestimentos utilizando a quitosana, transglutaminase microbiana e whey protein (Jiang et al., 2016; Di pierro et al, 2018; Saucedo et al., 2018; Jiang et al., 2019). Os autores reportaram que a utilização destes compostos para obtenção dos filmes proporcionou um efeito sinérgico, melhorando as propriedades de barreira e mecânicas dos filmes.

2.2. Quitosana

A quitina, precursora da quitosana, é um polímero linear composto principalmente por unidades de β - (1 \rightarrow 4) -2-acetamido-2-desoxi-d-glucopiranosose e baixas quantidades de β - (1 \rightarrow 4) -2-amino-2- desoxidresíduos -glucopyranose. O polímero é altamente acetilado e é insolúvel em água. É um dos materiais biológicos mais abundantes do mundo e está atrás da celulose e próximo da lignina, o polímero mais biossintetizado. Quando o grau de N-acetilação (DA) é menor que 50%, é denominado quitosano (Fig. 2.1). Normalmente, o DA da quitosana está entre 0,05 e 0,30 (Broek et al., 2015).

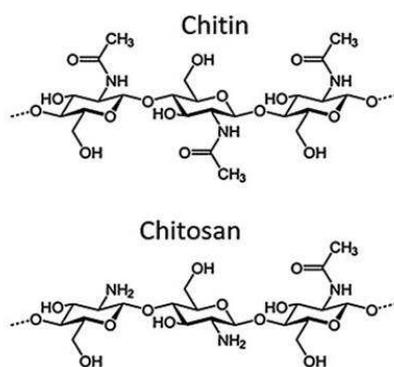


Figura 2. 1 Estrutura de quitina e quitosana. Fonte: Broek et al., (2015)

A quitina é isolada principalmente de resíduos de crustáceos (Alishahi & Aïder, 2012). Está fortemente ligada a complexos com outras substâncias, como proteínas e minerais. Em escala industrial, um tratamento ácido (descalcificação) seguido de um tratamento alcalino (desproteinação), ou apenas em ordem inversa, e uma etapa de descoloração são utilizados para obter quitina. Para preparar a quitosana, é realizado um tratamento alcalino adicional para desacetilar a quitina. Diferentes fatores, como concentração de álcalis, tempo de incubação, razão quitina para álcali, temperatura, atmosfera, tipo de fonte de quitina (incluindo tipo de polimorfo), tamanho de partícula, N heterogêneo / homogêneo desacetilação e processo único ou múltiplo desempenham um papel na desacetilação N alcalina de quitosana e, portanto, afetando as propriedades da quitosana (Broek et al., 2015).

A quitosana não é tóxica, biocompatível e biodegradável e é membro de um tipo de biopolímero chamado hidrocolóides, mas apresenta propriedades atípicas. Por exemplo, enquanto a maioria dos hidrocolóides são neutros ou carregados negativamente em valores biológicos de pH, a quitosana é carregada positivamente. Além disso, sua natureza catiônica em solução ácida significa que as moléculas de quitosana com carga positiva são atraídas para superfícies com carga negativa (Vargas et al., 2012).

Por possuir propriedade única de aumentar sua viscosidade após hidratação, além de sua habilidade em formar filmes resistentes, materiais à base de quitosana podem ser utilizados como películas ou revestimentos em alimentos (Mujtaba et al., 2019). Os compósitos à base de quitosana são filmes comestíveis úteis devido às suas características especiais, incluindo propriedades mecânicas adequadas, excelente capacidade de formação de filme e menor

transferência de gás. Portanto, eles podem ser usados na fabricação de filmes comestíveis para cobrir alimentos e projetar estruturas de embalagem (Mohammadi et al., 2018).

A quitosana possui a capacidade de interagir quimicamente com compostos, microrganismos ou patógenos, fazendo com que a sua bioatividade seja relacionada às propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antivirais, proporcionando contribuições importantes em diferentes aplicações (Montes & Muños, 2021). Os revestimentos de quitosana são mais comumente usados para pepinos, morangos, pimentões como revestimento antimicrobiano e em maçãs, pêssegos, peras e ameixas como barreira à gás. Algumas limitações da quitosana aplicada como um agente antioxidante e antifúngico também existem, como a identificação da concentração ótima de solução de revestimento de quitosana para retardar a oxidação e o crescimento de fungos sem efeitos indesejáveis nas propriedades sensoriais do produto final (Hassan et al., 2018).

2.3. Transglutaminase

As transglutaminases (TGase) são uma família de enzimas intra e extracelulares capazes de catalisar a modificação pós-tradução de proteínas através da introdução de ligações isopeptídicas, altamente resistentes à proteólise enzimática e ao estresse mecânico, entre as endoproteínas Lys ϵ grupos -amino (substrato aceitador de acila) e Gln γ -carboxamida (substrato doador de acila). Além disso, a TGase é capaz de catalisar a desamidação de Gln na ausência de aminas livres, com a água atuando como um aceitador de acil (Sabbah et al., 2019).

Portanto, todas as reações catalisadas por essa enzima resultam em alterações significativas, não apenas da estrutura, mas também das características físicas e químicas das proteínas que atuam como substratos, como viscosidade, estabilidade térmica e elasticidade (Kieliszek & Misiewicz, 2014). Em diversos estudos realizados pela indústria e no âmbito acadêmico, são utilizadas em grande parte duas formas da enzima, a transglutaminase (TGase) e a transglutaminase microbiana (mTGase), entretanto a forma molecular microbiana da enzima despertou o maior interesse nas diferentes aplicações (Sabbah et al., 2019)

De fato, a mTGase, considerada "geralmente como segura" para consumo humano, tem sido amplamente proposta como um auxiliar de processamento para modificar as propriedades funcionais de muitos produtos alimentares diferentes. Sendo as proteínas uma das principais classes de componentes alimentares, sua modificação estrutural por métodos químicos, físicos

ou enzimáticos é uma alternativa disponível para a melhoria e / ou desenvolvimento de novas propriedades funcionais de alimentos específicos à base de proteínas. Portanto, muitas tentativas foram realizadas com o objetivo de melhorar as propriedades físicas e biológicas das proteínas alimentares pela mTGase, pois várias delas demonstraram atuar como substratos eficazes doadores e / ou aceitadores de acil para a enzima (Mariniello & Porta, 2005; Bönisch et al., 2006; Mariniello et al., 2007; Porta et al., 2011; Giosafatto et al., 2012; Hong & Xiong, 2012; Sabbah et al., 2019).

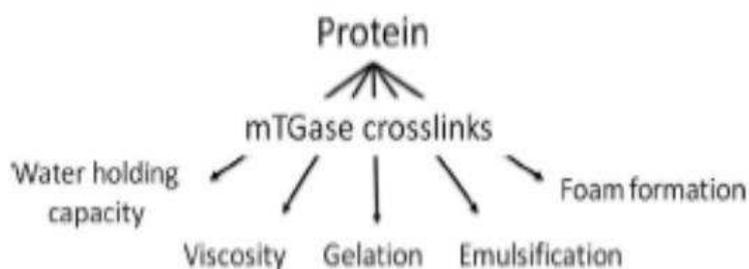


Figura 2. 2 Principais propriedades funcionais de proteínas de interesse alimentar influenciadas por mTGase. Fonte: Sabbah et al., (2019)

Os estudos Saucedo et al., 2018 reportaram a reticulação do whey protein por transglutaminase para aplicação no revestimento de ovos, os filmes obtidos apresentaram ótima redução da atividade microbiana, prolongando o tempo de prateleira, além disso, o revestimento apresentou barreira ao CO₂, reduzindo também a perda de peso dos ovos. Jiang et al., 2016 reportaram que a mTGase favoreceu a capacidade de barreira à água e a resistência mecânica, em filmes compostos por quitosana carboximetilada e whey protein. De acordo com Sorde & Amnathanarayan, 2019 as proteínas e polissacarídeos, sendo diferentes em sua estrutura molecular e natureza, exibem várias interações eletrostáticas, hidrofílicas e hidrofóbicas. Essas interações entre proteínas e polissacarídeos são importantes na alteração das propriedades de viscosidade e gelificação da solução.

2.4. Utilização do whey protein em revestimentos

É sabido que as indústrias de laticínios geram grandes volumes de resíduos líquidos como produto durante a coagulação do processo caseína. Este líquido, conhecido como leite ou whey protein, representa o resíduo que resta após a recuperação da coalhada obtida do ácido ou coagulação proteolítica do leite. O whey protein deriva de todos os tipos (vaca, cabra, ovelha e camelo) de leite, embora o whey protein bovino seja o mais produzido nos países ocidentais, compartilha cerca de 85% a 95% do volume de leite originário e contém cerca de 55% de todos nutrientes do leite (Yadav et al., 2015).

O whey protein é uma fonte de partida adequada para obtenção de filmes comestíveis (Khanzadi et al., 2015). Este detém de um excelente valor nutricional e as propriedades relatadas das proteínas do whey protein originárias do fluxo de resíduos da indústria de queijo, como a solubilidade em água e a capacidade de agir como emulsificantes, permitem a produção de filmes comestíveis transparentes, flexíveis, incolores e inodoros, com fraca barreira de água, e baixa permeabilidade de O₂. No entanto, esses filmes têm baixas propriedades mecânicas e alta permeabilidade ao vapor de água devido ao alto grau de aminoácidos hidrofílicos em sua estrutura. Para produzir filmes densos e fortes com boa resistência mecânica que constituam uma excelente barreira, é necessária a desnaturação da proteína física, química ou enzimática (Zhibiao et al., 2018).

Os filmes de whey protein são geralmente formados em soluções aquosas na presença de diferentes plastificantes. Suas propriedades demonstraram ser significativamente influenciada pela presença de lipídios, sais e mTGase (Hamman e Schmid, 2014). Em particular, a adição de mTGase aos filmes com whey protein induziram um aprimoramento da resistência mecânica do filme e uma redução em sua deformabilidade. Mesmo a eficiência da barreira em relação ao O₂ foi significativamente melhorada nos filmes reticulados, que também mostraram uma menor permeabilidade ao vapor de água (Di Pierro et al., 2006, 2013; Rossi Marquez et al., 2014).

Também foram realizados estudos por Jiang et al., 2016 os quais relataram que o mTGase foi eficaz na melhoria da barreira ao vapor de água e nas propriedades mecânicas dos filmes de quitosana carboximetilada e whey protein, enquanto Rossi Marquez et al., 2017 mostraram que os filmes de whey protein e pectina obtidos na presença de mTGase aumentaram significativamente o prazo de validade de maçãs, batatas e cenouras minimamente processadas, sem afetar suas propriedades sensoriais.

2.5. Propriedades funcionais de filmes biodegradáveis

As embalagens de alimentos têm a função de proteger o produto do ambiente circundante e seus efeitos de deterioração, mantendo assim a qualidade do produto alimentício ao longo de sua vida útil. Para as embalagens que entram em contato direto com o produto são desejáveis propriedades específicas para garantir a segurança do alimento. Nesse contexto, as principais propriedades são mecânicas, barreira, solubilidade e biodegradabilidade (Wihodo & Moraru, 2013; Martins et al., 2019).

As propriedades de barreira são caracterizadas como a capacidade do polímero de evitar trocas com o meio externo, resistindo a processos como absorção ou perda de umidade, trocas gasosas, entre outros. Dentre as principais propriedades de barreira a permeabilidade ao vapor de água (WPV) é uma das mais importantes. O conhecimento deste parâmetro é necessário para obtenção de dados que possibilitam compreender a resistência do filme à umidade, além de fornecer uma ideia sobre as possíveis formas de aplicação em diferentes produtos (Colinart & Glouannec, 2022).

A eficácia dos filmes biodegradáveis em atender às necessidades de barreira de um produto alimentício é fortemente influenciada por fatores como, a natureza e composição do filme, além de condições ambientais. Geralmente são adicionados compostos poliméricos que alteram a estrutura dos filmes, a fim de proporcionar melhores propriedades de barreira contra a umidade (Wihodo & Moraru, 2013).

O conhecimento e avaliação dos parâmetros mecânicos é de extrema importância nas embalagens dos alimentos, pois através do conhecimento dos mesmos é possível realizar processos de armazenamento e distribuição sem perdas significativas, permitindo a proteção adequada para cada tipo de alimento. Essas propriedades mecânicas geralmente estão associadas ao comportamento do material do filme. No geral, os principais requisitos para as propriedades mecânicas das embalagens são boa resistência à tração, alongamento adequado, flexibilidade e resistência à perfuração para promover uma barreira eficaz contra agentes externos (Martins et al., 2019).

A resistência à tração está relacionada com a resistência mecânica dos filmes quando associados às forças de coesão entre as cadeiras, sendo determinada pela deformação máxima do filme até o ponto de ruptura, levando em consideração a sua área de seção transversal. Já o

alongamento é caracterizado pelo aumento do comprimento do filme após a aplicação de forças opostas em sua superfície, sendo medida em porcentagem (Tavares et al., 2021; Martins et al., 2019).

A solubilidade de filmes é caracterizada como a resistência ou tolerância do mesmo à umidade ou água, sendo totalmente relacionada com a estrutura química e capacidade hidrofóbica da superfície do material. É um parâmetro de extrema importância em embalagens de alimentos, tendo em vista que menor solubilidade leva a maior estabilidade e menor interação com a umidade (Tavares et al., 2021; Martins et al., 2019).

2.6. Aplicação de filmes e revestimentos em frutas

O revestimento de frutas antes da comercialização é um importante tratamento pós-colheita comumente praticado para aumentar o brilho visual e prolongar a vida útil. Nos últimos anos, os filmes comestíveis biodegradáveis têm sido amplamente aplicados como uma alternativa eficaz na ciência de frutas. Em geral, os filmes e revestimentos comestíveis são feitos a partir de compostos naturais, biodegradáveis e poliméricos, a fim de satisfazer as preocupações ambientais e atender à demanda do consumidor (Thakur et al., 2019; Yan et al., 2019).

Os filmes e revestimentos comestíveis são tipicamente produzidos a partir de biopolímeros individuais ou combinados, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e outros agentes de aprimoramento, como as enzimas, plastificantes, gomas e ceras. Dentre os principais constituintes que são utilizados se destacam a quitosana, amido, pectina, proteínas do leite, gelatina, além do glicerol e enzima transglutaminase como agentes plastificantes e de reticulação, respectivamente (Abdollahzadeh et al., 2021).

A aplicação de filmes comestíveis em frutas tem sido eficaz nos últimos anos para prolongar a vida útil durante o armazenamento, reduzindo a perda de peso, as taxas de respiração e de reações oxidativas, além de reduzir ou evitar distúrbios fisiológicos em produtos frescos. Além disso, os filmes aplicados em frutas têm proporcionado melhorias nos atributos sensoriais, texturais e de cor, retardando a senescência e mantendo a firmeza e características visuais integras ao longo do armazenamento (Yan et al., 2019; Kocira et al., 2021).

Dentre os diversos estudos sobre a utilização de filmes e revestimentos comestíveis em frutas, temos por exemplo a extensão da vida útil pós-colheita de morangos revestidos com o

conjugado de quitosana e proteína do whey protein (Muley & Singhal, 2020). Neste estudo os autores relatam que o revestimento obtido pelo conjugado retardou o amadurecimento e senescência dos frutos, além de estender a vida útil dos morangos em 40 e 60%, nas temperaturas de 20 e 5°C, respectivamente. O estudo de Pavinatto et al., (2020) mostra o papel da quitosana e glicerol nos revestimentos de morangos, em que os autores relatam que os filmes protegeram os morangos do ataque de fungos, sendo a quitosana o principal componente a influenciar nessa característica. Os mesmos confirmam que os filmes à base de quitosana não alteram o sabor, aparência, aroma ou textura dos morangos, garantindo uma boa aceitação do fruto revestido.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHZADEH, E.; NEMATOLLAHI, A.; HOSSEINI, H. Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 291-303, 2021.

ALISHAHI, A.; AIDER, M. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, 817-830, 2012.

ASTM. Método de teste padrão ASTM D882-18 para propriedades de tração em folhas de plástico fino, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1520/D0882-18>.

ANSORENA, M. R.; PEREDA, M.; MARCOVICH, N. E. Edible Films. **Polymers for Food Applications**, cap. 2, 5-24, 2018.

BONISCH, M. P.; TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Inactivation of an indigenous transglutaminase inhibitor in milk serum by means of UHT-treatment and membrane separation techniques. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, 669-678, 2006.

BROEK, L. A. M. V. D.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, G. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, 237-242, 2015.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, 136-148, 2017.

COLINART, T.; GLOUANNEC, P. Accuracy of water vapor permeability of building materials reassessed by measuring cup's inner relative humidity. **Building and Environment**, v. 217, p. 1-11, 2022.

COTELLI, M. B.; WILD, F.; BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LINDNER, M.; SCHMID, M.; WECKEL, V.; MULLER, K.; RODRIGUEZ, P.; STAEBLER, A.; TURIENZO, L. R.; LAZZERI, A. State of the Art in the Development and Properties of Protein-Based Films and Coatings and Their Applicability to Cellulose Based Products: An Extensive Review. **Coatings**, v. 6, n. 1, 1-59, 2015.

CRUZ, R. M. S.; ALVES, V.; KHMELINSKII, I.; VIEIRA, M. C. New Food Packaging Systems. **Food Packaging and Preservation**, cap. 2, 63-85, 2018.

DI PIERRO, P.; CHICO, B.; VILLALONGA, R.; MARINELLO, L.; DAMIAO, A. E.; MASI, P.; PORTA, R. Chitosan–whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, 744-749, 2006.

DI PIERRO, P.; ROSSI MARQUEZ, G.; MARINIELLO, L.; SORRENTINO, A.; VILLALONGA, R.; PORTA, R. Effect of transglutaminase on the mechanical and barrier properties of whey protein/pectin films prepared at complexation pH. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 61, n. 19, 4593-4598, 2013.

DI PIERRO, P.; MARINELLO, L.; GIOSAFATTO, V. L.; ESPOSITO, M.; SABBAH, M.; PORTA, R. Dairy Whey Protein-Based Edible Films and Coatings for Food Preservation. **Food Packaging and Preservation**, cap. 13, 439-456, 2018.

ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: a review. **Materials Science and Engineering**, v. 33, n. 4, 1819-1841, 2013.

FATHI, N.; ALMASI, H.; PIROUZIFARD, M. K. Effect of ultraviolet radiation on morphological and physicochemical properties of sesame protein isolate based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 85, 136-146, 2018.

FERREIRA, O. F.; NUNES, C. A.; DELGADILLO, I.; SILVA, J. A. L da. **Food Research International**, v. 42, n. 2, 807-813, 2009.

GIOSAFATTO, C. V. L.; RIGBY, N. M.; WELLNER, N.; RIDOUT, M.; HUSBAND, F.; MACKIE, A. R. Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, 261-267, 2012.

HAMMANN, F.; SCHMID, M. Determination and quantification of molecular interactions in protein films: a review. **Materials**, v. 7, n. 12, 7975-7996, 2014.

HAN, J. H.; GENNADIOS, A. Edible films and coatings: a review. **Innovations in Food Packaging**, cap. 15, 239-262, 2006.

HASSAN, B.; CHATHA, S. A. S.; HUSSAIN, A. J.; ZIA, K. M.; AKHTAR, N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, n. 1, 1095-1107, 2018.

HONG, G. P.; XIONG, Y. L. Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins. **Meat Science**, v. 91, n. 1, 36-42, 2012.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, 1490-1495, 2013.

JIANG, S. J.; ZHANG, X.; MA, Y.; TUO, Y.; QIAN, F.; FU, W.; MU, G. Characterization of whey protein-carboxymethylated chitosan composite films with and without transglutaminase treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, 153-159, 2016.

JIANG, S. J.; ZHANG, T.; SONG, Y.; QIAN, F.; TUO, Y.; MU, G. Mechanical properties of whey protein concentrate based film improved by the coexistence of nanocrystalline cellulose and transglutaminase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, 12660-12721, 2019.

KHANZADI, M.; JAFARI, S. M.; MIRZAEI, H.; CHEGINI, F. K.; MAGHSOUDLOU, Y.; DEHNAD, D. Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate–pullulan by application of beeswax. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, 24-29, 2015.

- KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. a review. **Folia Microbiologica**, v. 59, 241-250, 2014.
- KOCIRA, A.; KOZLOWICZ, K.; PANASIEWICZ, K.; STANIAK, M.; KROK, E. S.; HORTYNSKA, P. Polysaccharides as Edible Films and Coatings: Characteristics and Influence on Fruit and Vegetable Quality—A Review. **Agronomy**, v. 11, 1-38, 2021.
- MARINELLO, L.; PORTA, R. Transglutaminases as Biotechnological Tools. **Karger**, v. 38, 174-191, 2005.
- MARINELLO, L.; GIOSAFATTO, C. V. L.; DI PIERRO, P.; SORRENTINO, A.; PORTA, R. Synthesis and Resistance to in Vitro Proteolysis of Transglutaminase Cross-Linked Phaseolin, the Major Storage Protein from *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, 4717-4721, 2007.
- MARTINS, V. G.; ROMANI, V. P.; MARTINS, P. C.; FILIPINI, G da. S. Production, Supply Chain, Food Waste and Food Consumption. **Saving Food**, cap. 6, 171-202, 2013.
- MERA, J. D. R.; SALDAÑA, E.; RAMÍREZ, Y.; AUQUIÑIVÍN, E. A.; ALVIM, I. D. Encapsulation optimization and pH- and temperature-stability of the complex coacervation between soy protein isolate and inulin entrapping fish oil. **Food Science and Technology – LWT**, v. 116, 1-7, 2019.
- MOHAMMADI, R.; MOHAMMADIFAR, M. A.; ROUHI, M.; KARIMINEJAD, M.; MORTAZAVIAN, A. M.; SADEGHI, E.; HASANVAND, S. Physico-mechanical and structural properties of eggshell membrane gelatin- chitosan blend edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, 406-412, 2018.
- MONTES, E. D.; MUÑOS, R. C. Trends in Chitosan as a Primary Biopolymer for Functional Films and Coatings Manufacture for Food and Natural Products. **Polymers**, v. 13, n. 5, 1-24, 2021.
- MUJTABA, M.; MORSI, R. E.; KERCH, G.; ELSABBE, M. Z.; KAYA, M.; LABIDI, J.; KHAWAR, K. M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, 889-904, 2019.
- MULEY, A. B.; SINGHAL, R. S. Extension of postharvest shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*) using a coating of chitosan-whey protein isolate conjugate. **Food Chemistry**, v. 329, p. 1-11, 2020.
- PAVINATTO, A.; MATTOS, A. V de. A.; MALPASS, A. C. G.; OKURA, M. H.; BALOGH, D. T.; SANFELICE, R. C. Coating with chitosan-based edible films for mechanical/biological protection of strawberries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1004-1011, 2020.

- PORTA, R.; GIOSAFATTO, C. V. L.; DI PIERRO, P.; SORRENTINO, A.; MARINELLO, L. Transglutaminase-mediated modification of ovomucoid: effects on its trypsin inhibitory activity and antigenic properties. **Aminoacids**, v. 44, n. 1, 285-292, 2011.
- ROSSI MARQUEZ, G.; DI PIERRO, P.; ESPOSITO, M.; MARINIELLO, L.; PORTA, R. Application of transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin films as water barrier coatings in fried and baked foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 2, 447-455, 2014.
- ROSSI MARQUEZ, G.; DI PIERRO, P.; MARINIELLO, L.; ESPOSITO, M.; GIOSAFATTO, C. V. L.; PORTA, R. Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. **Food Science and Technology – LWT**, v. 75, 124-130, 2017.
- SABBAH, M.; GIOSAFATTO, C. V. L.; ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P.; MARINELLO, L.; PORTA, R. Transglutaminase cross-linked edible films and coatings for food applications. **Enzymes in Food Biotechnology**, cap. 21, 369-388, 2019.
- SAUCEDO, C. A. D.; MARQUEZ, G. R.; GONZALEZ, C. R.; MACIAS, M. A.; DI PIERRO, P. Application of transglutaminase crosslinked whey protein–pectin coating improves egg quality and minimizes the breakage and porosity of eggshells. **Coatings**, v. 438, n. 8, 1-9, 2018.
- SORDE, K. L.; ANANTHANARAYAN, L. Effect of transglutaminase treatment on properties of coconut protein-guar gum composite film. **Food Science and Technology - LWT**, v. 115, 1-7, 2019.
- TAVARES, L.; SOUZA, H. K. S.; GONÇALVES, M. P.; ROCHA, C. M. R. Physicochemical and microstructural properties of composite edible film obtained by complex coacervation between chitosan and whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 1-12, 2021.
- THAKUR, R.; PRISTIJONO, P.; SCARLETT, C. J.; BOWYER, M.; SINGH, S. P.; VUONG, Q. V. Starch-based edible coating formulation: Optimization and its application to improve the postharvest quality of “Cripps pink” apple under different temperature regimes. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 1-10, 2019.
- VARGAS, M.; GONZALEZ, S.; CHIRALT, C. A.; MARTINEZ, C. G. Edible chitosan coatings for fresh and minimally processed foods. **Emerging Food Packaging Technologies**, cap. 5, 66-95, 2012.
- WIHODO, M.; MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, 292-302, 2013.
- YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, 756-744.

YAN, J.; LUO, Z.; BAN, Z.; LU, H.; LI, D.; YANG, D.; AGHDAM, M. S.; LI, L. The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 29-38, 2019.

ZAVAREZE, E da. R. Mechanical, Barrier and Morphological Properties of Biodegradable Films Based on Muscle and Waste Proteins from the Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, 1973-1981, 2013.

ZHIBIAO, F.; WU, G.; LIU, C.; LI, D.; JIANG, B.; ZHANG, X. Edible coating based on whey protein isolate nanofibrils for antioxidation and inhibition of product browning. **Food Hydrocolloids**, v. 79, 179-188, 2018.

CAPITULO I: Comportamento reológico do whey protein desnaturado reticulado por transglutaminase em diferentes quantidades e tempos de reação

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento reológico da reação de catalisação do whey protein desnaturado (WPD) com a enzima transglutaminase microbiana (TG), em função dos tempos de reação e quantidade de TG. O estudo reológico foi realizado em função das concentrações de 8, 14, 18, 22 e 26 U/g de TG e dos tempos de reação de 8, 16 e 24 horas, no qual o modelo de Ostwald-de-Waelle (Lei de potência) foi utilizado para o ajuste aos dados experimentais. O modelo apresentou ótimos ajustes com valores de coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,99. Observou-se que a adição de TG proporcionou uma diminuição na viscosidade e aumento nas taxas de deformação. O aumento das tensões de cisalhamento também foi observado e as soluções apresentaram índices de comportamento de fluxo (η_p) menores que 1, indicando que as soluções de WPD+TG apresentam comportamento de fluidos não newtonianos do tipo pseudoplástico. Verificou-se também que os tempos de reação têm influencia no aumento dos índices de comportamento e na viscosidade da solução. De acordo com os resultados encontrados é possível afirmar que os tempos de reação e as quantidades de TG são determinantes em processos de obtenção de filmes e géis de qualidade, o que pode render melhores produtos após a otimização destes fatores.

Palavras-chave: Biofilmes; Propriedades Reológicas; Transglutaminase; Whey protein desnaturado.

Abstract

This study aimed to evaluate the rheological behavior of catalyzing the reaction of denatured whey (WPD) with the microbial transglutaminase (TG) as a function of reaction time and amount of TG. The rheological study was performed according to concentrations of 8, 14, 18, 22, and 26 U / g enzyme microbial transglutaminase and reaction times of 8, 16 and 24 hours, in which the model of Ostwald-de-Waelle (Power law) was used to adjust the experimental data. The model showed excellent adjustment with determination coefficient values (R^2) greater than 0.99. It was observed that the addition of TG provided a decrease in viscosity and increased shear rates. The increase in shear stresses was also observed and the solutions presented flow behavior indices (η_p) less than 1, indicating that the solutions of WPD + TG present behavior of non-Newtonian fluids of the pseudoplastic type. It was also found that the reaction times

have influence on the increase in behavior index and viscosity of the solution. According to the results found, it is possible to affirm that the reaction times and the amounts of TG are decisive in the processes of obtaining quality films and gels, which can yield better products after the optimization of these factors.

Keywords: Biofilms; Rheological properties; Transglutaminase; Denatured whey protein.

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el comportamiento reológico de la reacción catalítica del suero desnaturalizado (WPD) con la enzima transglutaminasa microbiana (TG), en función de los tiempos de reacción y cantidad de TG. El estudio reológico se realizó según las concentraciones de 8, 14, 18, 22 y 26 U / g de enzima transglutaminasa microbiana y los tiempos de reacción de 8, 16 y 24 horas, en las que se utilizó el modelo de Ostwald-de-Waelle (ley de potencia) se utilizó para ajustar los datos experimentales. El modelo presentó excelentes ajustes con valores de coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,99. Se observó que la adición de TG proporcionó una disminución de la viscosidad y un aumento de las velocidades de deformación. El aumento de esfuerzos de corte también se observó y las soluciones presentadas índices de comportamiento de flujo (η_{pp}) inferior a 1, lo que indica que las soluciones de WPD + TG actual comportamiento de los fluidos no newtonianos de tipo pseudoplástico. También se encontró que los tiempos de reacción influyen en el aumento y disminución de los índices de comportamiento y en la viscosidad de la solución. De acuerdo con los resultados encontrados, es posible afirmar que los tiempos de reacción y las cantidades de TG son determinantes en los procesos de obtención de películas y geles de calidad, que pueden rendir mejores productos luego de la optimización de estos factores.

Palabras clave: Biopelículas; Propiedades reológicas; Transglutaminasa; proteína de suero desnaturalizada.

1. Introdução

Amplamente utilizada como um ingrediente funcional na indústria de alimentos, a proteína do soro do leite é responsável por 20% da proteína total do leite e é um subproduto do processamento de queijos. Seus principais componentes incluem α -lactalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulina e albumina sérica bovina (Jiang et al., 2020). Apresenta boas propriedades de emulsificação, espessamento, gelificação, retenção de água e formação de

estrutura, sendo também facilmente digerida e absorvida pelo corpo humano, possuindo alto poder antioxidante, antiviral e outras atividades biológicas (Liang et al., 2020). Apesar de sua ampla utilização na formação de biofilmes, hidrogéis, dentre outros produtos, suas propriedades de viscosidade, emulsificação e gelificação precisam ser melhoradas.

A transglutaminase (TG) é uma enzima que usa o grupo γ -hidroxiamida do ácido glutâmico como o doador de acila e o grupo ϵ -amino da lisina como o aceitador de acila para causar reticulação covalente entre proteínas (ou polipeptídeos), formando assim a polimerização covalente (Jiang et al., 2020). Estudos recentes têm demonstrado que a reticulação de TG pode melhorar propriedades funcionais de proteínas alimentares, como a capacidade de retenção de água do gel, estabilidade térmica, propriedades emulsificantes e de viscosidade, dentre outras (Wang et al., 2020; Jiang et al., 2020).

No entanto, é necessário provocar a desnaturação do whey protein, a fim de melhorar a acessibilidade da TG aos grupos de lisina e glutamina, proporcionando uma melhor reação de catalisação. De acordo com Cao et al., (2021) a proteína do soro do leite expõe mais resíduos de glutamina e lisina após o tratamento térmico (tipicamente maior que 65 °C), fornecendo resíduos de glutamina e lisina acessíveis o suficiente para que a TG catalisasse a reticulação.

Diante disso, o estudo do comportamento reológico por meio da análise dos parâmetros reológicos no decorrer do tempo e variação da taxa de cisalhamento são imprescindíveis para a observação e compreensão da polimerização entre a TG e o whey protein desnaturado (WPD), além de auxiliar em parâmetros de projeto futuros e controle das operações unitárias envolvidas no processo (Almeida et al., 2020). Neste contexto, o objetivo deste trabalho é realizar o estudo do comportamento reológico da reação de catalisação do whey protein desnaturado (WPD) com a enzima transglutaminase microbiana (TG), em função dos tempos de reação e quantidade de TG.

2. Metodologia

Foram utilizados como matéria-prima o whey protein em pó (Provon 292 IP) com 92% de proteína, obtido pela empresa Homem da Terra. A enzima transglutaminase utilizada foi obtida pela empresa Gastrô Brasil, com atividade enzimática de 80 U/g. A água destilada foi utilizada para a preparação das soluções.

A solução do whey protein desnaturado (WPD) foi preparada pesando 25g de whey protein e dissolvendo em 500 ml de água destilada, logo após a dissolução, a fim de promover o desdobramento da proteína, a solução foi aquecida a 70°C por 15 minutos e resfriada até 30°C. Logo após o resfriamento, a enzima transglutaminase (TG) foi adicionada nas proporções de 8, 14, 18, 22 e 26 U/g. Todas as soluções de WPD+TG foram colocadas para reagir nos tempos de 8, 16 e 24 horas, para avaliação das suas propriedades reológicas.

Para avaliação das propriedades reológicas foram mensurados os valores de viscosidade e torque das amostras de WPD+TG utilizando um viscosímetro Brookfield (modelo DV-II + PRO, Brookfield Engineering Laboratories Inc., MA, EUA) em temperatura ambiente (25 ± 1 ° C) usando velocidades de rotação (50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 135, 140, 150, 160, 180 e 200 rpm) de acordo com a metodologia proposta por (Lima et al., 2018). Todos os dados foram coletados após 30 s em cada velocidade de rotação, nos intervalos de tempo propostos (8, 16 e 24 horas). Os dados de torque, viscosidade e velocidade de rotação foram convertidos em taxas de deformação e tensão de cisalhamento usando o método proposto por (Mitschka, 1982).

O modelo reológico (Eq. 1) de Ostwald-de-Waele (Lei de potência) foi ajustado aos valores experimentais de tensão de cisalhamento e da taxa de deformação, no qual, foi aplicado à análise de regressão não linear, pelo método Quasi-Newton, a partir do software Statistica 12.0 (Statsoft, 2012), para a realização do ajuste do modelo matemático aos dados experimentais.

$$\tau = K \dot{\gamma}^{\eta_p} \quad (1)$$

Em que: τ é a tensão de cisalhamento (kPa); K e η_p é o índice de comportamento do fluido (adimensional) e $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (1/s).

O critério de avaliação utilizado para melhor ajuste do modelo aos dados experimentais foi o coeficiente de determinação (R^2), calculado pela (Equação 2):

$$R^2 = \frac{\sum (X_{obs} - X_{pre})^2}{\sum X_{obs}^2} \quad (2)$$

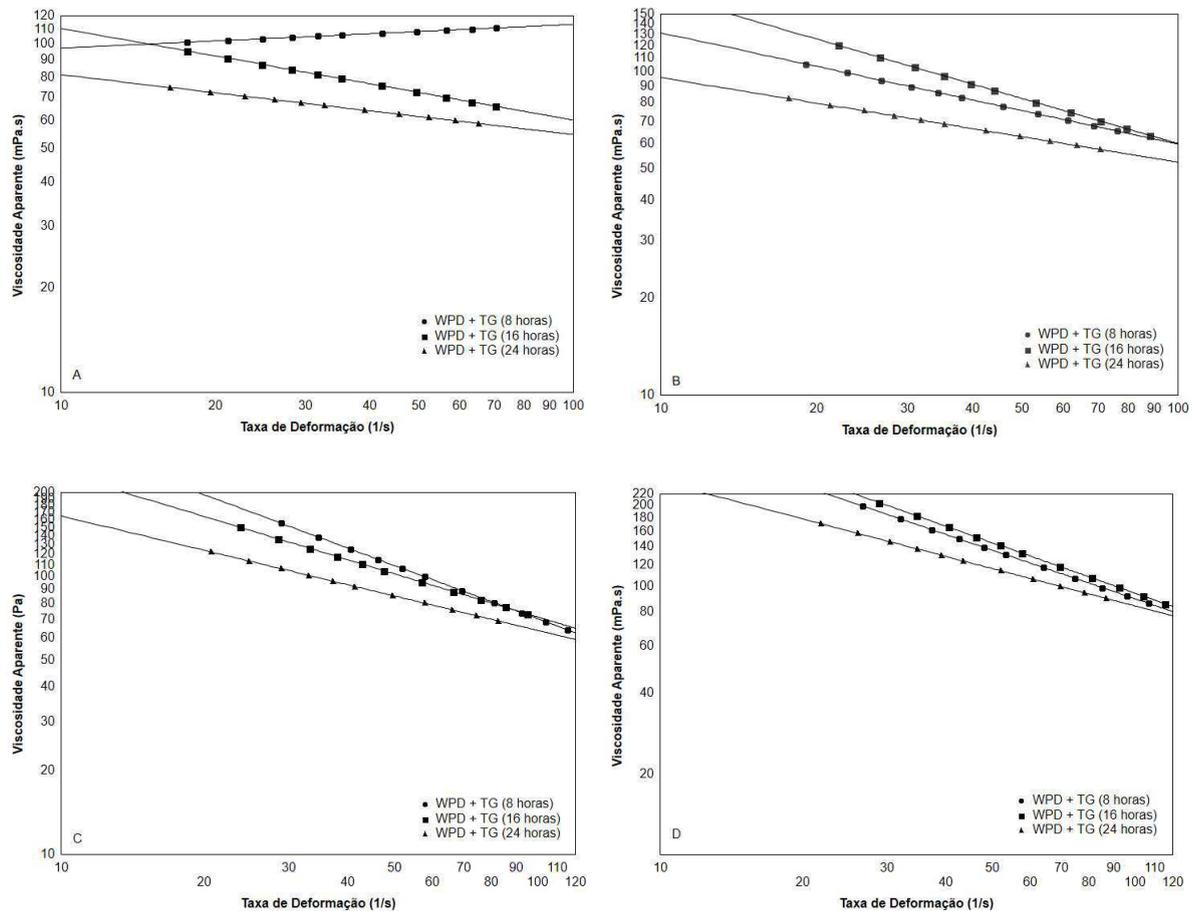
Em que: X_{obs} é o valor experimental; X_{pre} é o valor previsto pelo modelo.

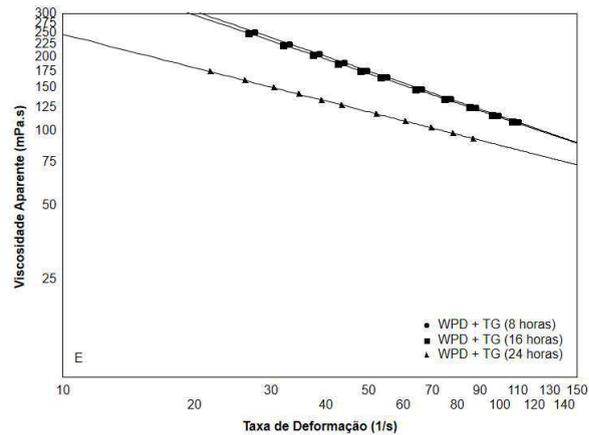
3. Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta a viscosidade dependente da taxa de deformação do whey protein desnaturado (WPD) com a adição de 8 U/g (Fig. A), 14 U/g (Fig. B), 18 U/g (Fig. C), 22 U/g

(Fig. D) e 26 U/g de enzima transglutaminase microbiana (TG) (Fig. E), avaliando o comportamento do WPD + TG após 8, 16 e 24 horas de reação. A análise da Figura 1A revela que os valores de viscosidade do WPD+TG nas primeiras 8 horas de reação aumentam progressivamente com a taxa de deformação, este fato indicia que as alterações nas estruturas das proteínas do leite ocasionadas pela desnaturação, levam a uma maior agregação e ligação intermolecular, resultando no aumento da viscosidade da solução. Jiang et al., (2019) afirmam que a desnaturação térmica do whey protein é caracterizada pela alteração de estruturas secundárias e terciárias, expondo os resíduos hidrofóbicos ao solvente, ocasionando um exposição e ativação de grupos sulfidril livres.

Figura 1. Comportamento reológico das soluções tratadas com TG para reticulação com WPD adaptado à lei de Ostwald-Waelle nos tempos de reação de 8, 16 e 24 horas.



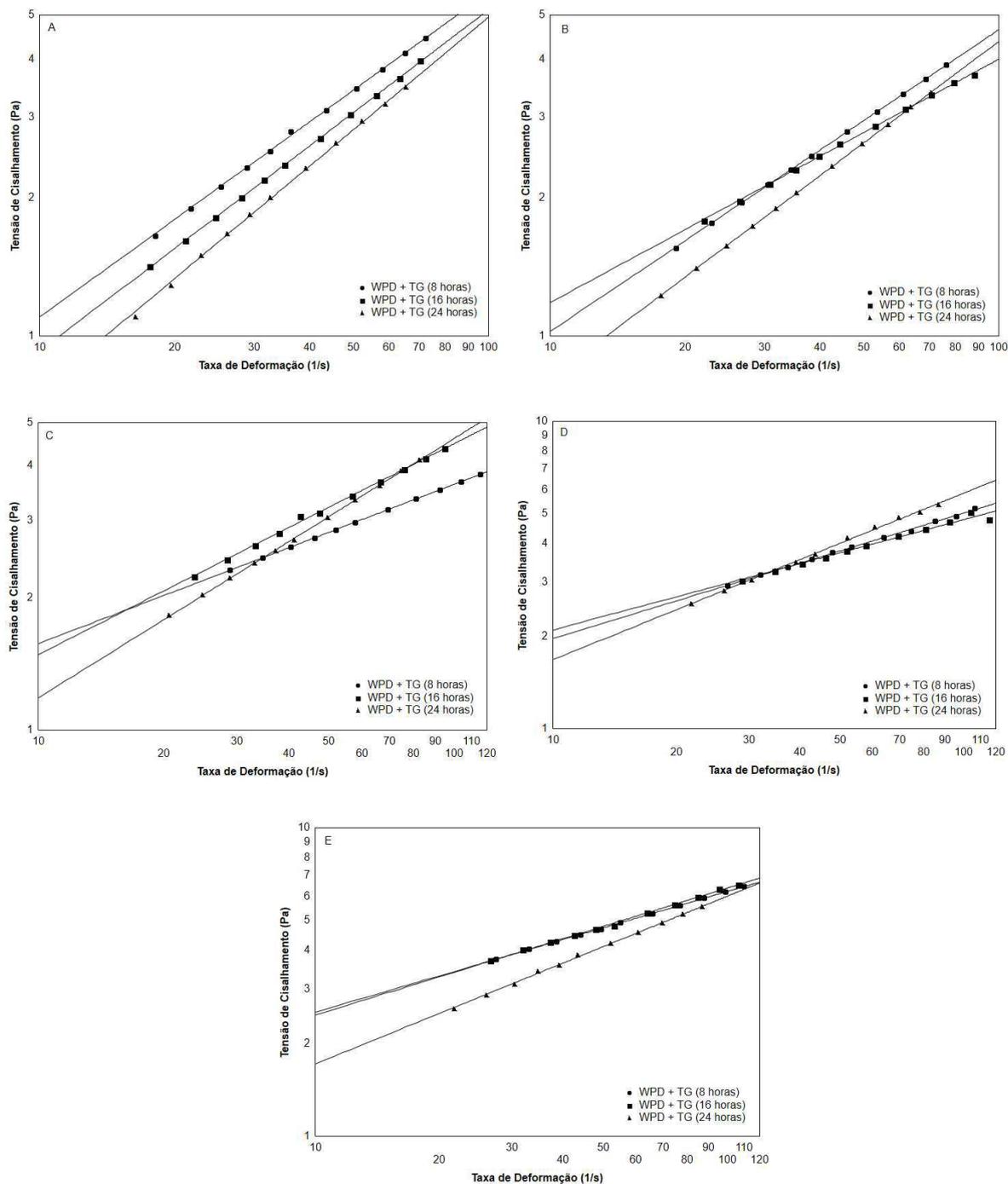


Fonte: Autores.

Entretanto após 16 horas de reação houve uma redução da viscosidade com o aumento da taxa de deformação nas demais amostras, caracterizando um comportamento pseudoplástico. Este comportamento geralmente é encontrado em soluções compostas por polímeros de alto peso molecular (Silva et al., 2020). Desta forma, sugere-se que com a adição da TG tenham sido formadas estruturas de alto peso molecular. Liang et al., (2020) afirma que o aumento da taxa de deformação pode levar a uma destruição parcial da rede de proteínas agregadas, reduzindo a resistência ao fluxo, diminuindo a viscosidade aparente.

As curvas de fluxo das soluções de WPD e TG são apresentadas na Figura 2, a equação de Oswald-Waelle (lei de potência) foi usada para ajustar os dados. As amostras apresentaram o comportamento característico de soluções não-newtonianas pseudoplásticas com aumentos progressivos na tensão de cisalhamento com a taxa de deformação.

Figura 2. Comportamento de fluxo das soluções tratadas com transglutaminase microbiana nas proporções de 8 U/g (Fig. A), 14 U/g (Fig. B), 18 U/g (Fig. C), 22 U/g (Fig. D) e 26 U/g (Fig. E) e whey protein desnaturado ajustadas à lei de Ostwald-Waelle nos tempos de reação de 8, 16 e 24 horas.



Fonte: Autores.

Uma tendência é notada nas primeiras 8 horas de reação, quando a TG é adicionada ao WPD nas Figuras 2A, 2B e 2C, ocorrendo uma diminuição da força de cisalhamento à medida que o TG é acrescentado, este fato provavelmente se deve ao tempo curto de reação, já que em tempos maiores ocorre uma estabilização da rede promovendo maiores forças de cisalhamento. Entretanto, as adições de 22 e 26 U/g de TG ilustradas nas Figuras 2D e 2E, promoveram maiores tensões e taxas de cisalhamento. É provável que a desnaturação proteica, provocou um

desdobramento da proteína, promovendo uma maior exposição dos grupos amina, auxiliando na reticulação da TG com o WPD exigindo, portanto, maiores forças de cisalhamento nas soluções (Djoullah et al., 2018; Jiang et al., 2019). Este fato corrobora com os estudos de Wang et al., (2020), no qual o aumento da concentração de TG e do tempo de reação, proporcionam géis mais fortes, sendo submetidos à maiores forças de cisalhamento.

A Tabela 1 apresenta os valores do índice de consistência (K) e o índice de comportamento (η_p), obtidos a partir dos ajustes das curvas de fluxo (Fig.2). Os resultados mostram que o modelo da lei de potência descreve com precisão o comportamento de fluxo dos tratamentos de WPD+TG, nos diferentes tempos de reação.

Tabela 1. Parâmetros dos dados ajustados pela lei de potência para os tratamentos de WPD+TG, com tempos de reação de 8, 16 e 24 horas.

TG	Tempo de reação	Parâmetros		R ²
		η_p	K	
8 U/ g de WP	8 horas	0,708	0,216	0,999
	16 horas	0,744	0,168	0,999
	24 horas	0,814	0,117	0,999
14 U/ g de WP	8 horas	0,657	0,225	0,999
	16 horas	0,531	0,348	0,999
	24 horas	0,733	0,149	0,999
18 U/ g de WP	8 horas	0,362	0,682	0,999
	16 horas	0,479	0,491	0,998
	24 horas	0,591	0,303	0,999
22 U/ g de WP	8 horas	0,409	0,767	0,997
	16 horas	0,358	0,917	0,977
	24 horas	0,542	0,482	0,997
26 U/ g de Wp	8 horas	0,391	1,02	0,999
	16 horas	0,411	0,957	0,998
	24 horas	0,543	0,491	0,999

Fonte: Autores.

A adição de TG proporcionou um aumento no índice de consistência do WPD reticulado por TG em todos os tempos de reação. Além disso, com o tempo de reação variando entre 8, 16 e 24 horas, o índice de consistência do reticulado WPD + TG diminuiu, enquanto o índice de comportamento de fluxo aumentou. Sugere-se que a reação catalisada pela TG ocasiona a formação de polímeros de alto peso molecular devido as ligações intra e intermoleculares entre as moléculas de proteína. Ahmadi et al., (2017) reportaram que as pontes de reticulação podem

levar a valores de k mais altos, sendo resultado da reticulação com TG. Além disso, os autores ressaltam que a adição da enzima em concentrações acima de 50 U/g não aumentará o valor de k , permanecendo constante.

De acordo com Gauche et al., (2008) o índice de comportamento de fluxo (η_p) reflete a proximidade do fluido a um comportamento newtoniano. Quando $\eta_p = 1$, o fluido é considerado newtoniano; na aproximação de $\eta_p = 0$, o fluido é considerado pseudoplástico. A diminuição do índice de comportamento do fluxo ocorre quando a TG é adicionada, provavelmente o desdobramento da proteína provocado pela desnaturação, diminuiu o número de espaços vazios no aglomerado formado através da reticulação com a mTgase, dificultando a capacidade de cisalhamento e comprometendo o fluxo das soluções devido aos emaranhados.

Entretanto, é possível observar que o η_p aumenta progressivamente com o tempo de reação, a explicação deste fato pode estar associada a um possível aumento de solubilidade da solução WPD + TG, levando a uma solução newtoniana, aproximando os valores de η_p a 1. Lima et al., 2018 reportaram que o aumento do movimento da corrente resulta em resistência semelhante ao fluxo em taxas de cisalhamento baixas ou altas.

4. Conclusão

A adição da enzima transglutaminase (TG) pode alterar as propriedades de viscosidade quando adicionada ao whey protein desnaturado (WPD) promovendo a reticulação e formação de géis com maior resistência às forças cisalhantes, entretanto, a eficiência da polimerização depende do tempo em que a solução do WPD+TG está reagindo. O modelo reológico de Ostwald-de-Waele apresentou bons ajustes aos dados experimentais com valores de R^2 acima de 0,99. Com valores de $\eta_p < 1$, as soluções de WPD+TG apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico, no qual ocorreram aumentos progressivos nas taxas de deformação e tensões de cisalhamento.

5. Referências

AHMADI, S., RAZAVI, S. M. A., VARIDI, M. Sequential ultrasound and transglutaminase treatments improve functional, rheological, and textural properties of whey protein concentrate. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 43, 207-215, 2017.

ALMEIDA, R. L. J., SANTOS, N. C., PEREIRA, T DOS. S., SILVA, V. M DE. A., RIBEIRO, V. H DE. A., SILVA, L. N., MUNIZ, C. E DE. S., SILVA, L. R. I DA., MOREIRA, F. I. N., MONTEIRO, Y. G. Estudo reológico da polpa de Jabuticaba com diferentes concentrações de goma arábica. **Research, Society and Development**. 9 (3), 1-13, 2020.

CAO, C., FENG, Y., KONG, B., SUN, F., YANG, L., LIU, Q. Transglutaminase crosslinking promotes physical and oxidative stability of filled hydrogel particles based on biopolymer phase separation. **International Journal of Biological Macromolecules**. 172, 429-438, 2021

DJOULLAH, A., HUSSON, F., SAUREL, R. Gelation behaviors of denaturated pea albumin and globulin fractions during transglutaminase treatment. **Food Hydrocolloids**. 77, 636-645, 2018.

GAUCHE, C., VIEIRA, J. T. C., OGLIARI, P. J., BORDIGNON-LUIZ, M. T. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. 43(7), 788-794, 2008.

JIANG, S., ZOU, L., HOU, Y., QIAN, F., TUO, Y., WU, X., ZHU, X., UM, G. The influence of the addition of transglutaminase at different phase on the film and film forming characteristics of whey protein concentrate-carboxymethyl chitosan composite films. **Food Packaging and Shelf Life**. 25(100456), 1-8, 2020

JIANG, Z., WHANG, C., LI, T., SUN, D., GAO, Z., MU, Z. Effect of ultrasound on the structure and functional properties of transglutaminase-crosslinked whey protein isolate exposed to prior heat treatment. **International Dairy Journal**. 88, 79–88, 2019.

LIANG, X., MA, C., YAN, X., ZENG, H., MCCLEMENTS, D. J., LIU, X., LIU, F. Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion gels: Effects of double cross-linking with transglutaminase and calcium ions. **Food Hydrocolloids**. 102(105569), 1-11, 2020.

LIMA, D. B., ALMEIDA, R. D., PASQUALI, M., BORGES, S. P., FOOK, M. L., LISBOA, H. M. Physical characterization and modeling of chitosan/peg blends for injectable scaffolds. **Carbohydrate Polymers**. 189, 238-249, 2018.

MITSCHKA, P (1982). Simple conversion of brookfield RVT: readings into viscosity functions

SILVA, H. A., PAIVA, E. G., LISBOA, H. M., DUARTE, M. E. M., MATA, M. C. M., GUSMÃO, T. A. S., GUSMÃO, R. P. S. Role of chitosan and transglutaminase on the

elaboration of gluten-free bread. **Journal of Food Science and Technology**. 57, 1877-1886, 2020.

STATSOFT (2012), Inc. Statistica for Windows (data analysis softwaresystem), version 12.0. Computer program manual. Tulsa: Statsoft, 2012.

WANG, C., LI, T., MA, L., LI, T., YU, H., HOU, J., JIANG, Z. Consequences of superfine grinding treatment on structure, physicochemical and rheological properties of transglutaminase-crosslinked whey protein isolate. **Food Chemistry**. 309(125757), 1-8, 2020.

CAPITULO II: Otimização da formulação de revestimento biodegradável obtido pela reticulação de whey protein com enzima transglutaminase e quitosana para melhorar a vida de prateleira de morangos.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos teores de concentração da enzima transglutaminase, quitosana e glicerol sobre as propriedades físicas, mecânicas e de barreira de filmes comestíveis utilizando a metodologia de superfície de resposta e desejabilidade, a fim de otimizar a formulação para aplicação em morangos. Os resultados obtidos mostraram que a formulação otimizada (13 (U/g) de enzima Transglutaminase, 3 (% w/v) de quitosana e 4,5 (g/100g) de glicerol) proporcionou aos filmes menores valores de permeabilidade ao vapor de água (WVP) e solubilidade (SOL) e maiores valores de resistência a tração (TS), alongamento (E) e módulo de Young (YM), revelando uma boa validação dos modelos com valores de R^2 acima de 0,998 e pequenos erros residuais. A formulação otimizada foi aplicada por imersão e utilizada no revestimento dos morangos avaliando as propriedades de perda de peso, firmeza, pH, acidez, sólidos solúveis totais (SST) e índice de decadência fúngica dos frutos. A formulação foi eficaz na redução da perda de peso e decadência fúngica dos frutos armazenados a temperaturas de 5 °C, não afetando significativamente os valores de pH, acidez, SST e firmeza, demonstrando ser uma barreira eficaz contra os microrganismos e injurias mecânicas.

Palavras-chave: Whey protein; quitosana; transglutaminase; metodologia de superfície de resposta (RSM); preservação de morangos.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of transglutaminase, chitosan and glycerol concentration levels on the physical, mechanical and barrier properties of edible films using the response surface and desirability methodology, in order to optimize the formulation for application in strawberries. The results obtained showed that the optimized formulation (13 (U/g) of Transglutaminase enzyme, 3 (% w/v) of chitosan and 4.5 (g/100g) of glycerol), provided the films with lower vapor permeability values of water (WVP) and solubility (SOL) and higher values of tensile strength (TS), elongation (E) and Young's modulus (YM), revealing good validation of the models with R^2 values above 0.998 and small residual errors. The optimized formulation was used in the coating of strawberries evaluating the properties of weight loss, firmness, pH, acidity, total soluble solids (TSS) and fungal decay index of the

fruits. The formulation was effective in reducing weight loss and fungal decay of fruits stored at temperatures of 5 °C, not significantly affecting pH, acidity, TSS and firmness, proving to be an effective barrier against microorganisms and mechanical injuries.

Keywords: Whey protein; chitosan; transglutaminase; response surface methodology (RSM); preservation of strawberries.

1. Introdução

Atualmente os revestimentos comestíveis representam uma alternativa aos derivados de petróleo por serem ambientalmente acessíveis, além de fornecer propriedades únicas agregadas a um período de biodegradabilidade menor. A embalagem de alimentos sempre foi referenciada pelo seu papel de barreira, protegendo os alimentos contra perigos externos e que causam contaminação, entretanto, essa proteção sempre se dá de maneira passiva. No entanto, o mercado atual busca novas alternativas de embalagens que forneçam além de proteção uma interação ativa com o produto a ser revestido, preservando a qualidade do produto e agregando valor com propriedades antioxidantes e antimicrobianas aumento o tempo de prateleira do alimento (Vera, Tapia & Abugoch, (2020); Hajji et al. (2018). Soluções inovadoras de revestimentos e embalagens para alimentos foram realizadas utilizando diversos biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos, carboidratos, lipídios, enzimas, entre outras biomacromoléculas disponíveis no ambiente (Martins et al. (2019).

Amplamente utilizado como um ingrediente funcional na indústria de alimentos, o whey protein (WP) representa 20% da proteína total do leite e é um subproduto do processamento de queijos. É composto principalmente por α -lactalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulina e albumina sérica bovina, apresentando boas propriedades de emulsificação, espessamento, gelificação, retenção de água e formação de estrutura, sendo também facilmente digerida e absorvida pelo corpo humano, possuindo alto poder antioxidante, antiviral e outras atividades biológicas. Apesar de sua ampla utilização na formação de biofilmes, hidrogéis, dentre outros produtos, suas propriedades de viscosidade, emulsificação e gelificação precisam ser melhoradas, pois essas propriedades proporcionam revestimentos com maior permeabilidade ao vapor de água, carecendo de agentes antimicrobianos. (Vazquez et al. 2022; Jiang et al., 2020; Liang et al. 2020).

A quitosana (CH) é um polissacarídeo constituído por unidades repetidas de glucomsaminas, sendo obtido pela desacetilação da quitina em altas temperaturas. Este polímero se destaca pela

sua capacidade antifúngica, além de sua biodegradabilidade e atoxicidade, sendo uma alternativa na formação de filmes e revestimentos comestíveis (Tavares et al., 2021; Silva et al., 2019). Filmes com quitosana em sua composição são caracterizados por ter uma variedade de propriedades mecânicas, barreira e antimicrobianas, entretanto, algumas enzimas e plastificantes tem sido utilizados para melhorar a resistência mecânica e propriedades de barreira dos filmes (Garcia et al., 2017).

A transglutaminase (TG) é uma enzima utilizada como agente reticulador que usa o grupo γ -hidroxiamida do ácido glutâmico como o doador de acila e o grupo ϵ -amino da lisina como o aceitador de acila para catalisar reações de reticulação covalente entre proteínas, formando uma polimerização (Jiang et al., 2020). Estudos recentes têm demonstrado que a reticulação de TG pode melhorar propriedades funcionais de proteínas alimentares, como a capacidade de retenção de água do gel, estabilidade térmica, propriedades emulsificantes e de viscosidade, dentre outras (Wang et al., 2020; Jiang et al., 2020; Jiang et al., 2022).

O glicerol (GLY) é um plastificante bastante utilizado em filmes e revestimentos comestíveis a fim de aumentar a flexibilidade e melhorar algumas propriedades mecânicas, além de aumentar a mobilidade das cadeias poliméricas, entretanto, esse composto pode afetar algumas propriedades de barreira dos filmes devido a sua hidrofilicidade (Chiumarelli & Hubinger, 2014).

A combinação dos polímeros e proteínas em revestimentos tem sido estudados para aplicação dos revestimentos em diversas frutas como por exemplo o morango, um fruto climatérico que possui um alto metabolismo pós-colheita, aumentando a velocidade de amadurecimento e susceptibilidade a microrganismos, resultando na diminuição da sua vida de prateleira, entretanto, até então, não há nenhum registro na literatura com relação a interação desses componentes (Transglutaminase, Quitosana e Glicerol), havendo portanto a necessidade de estudar o papel desses compostos poliméricos na formação e caracterização de revestimentos para utilização em frutas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos teores de concentração da enzima transglutaminase, quitosana e glicerol sobre as propriedades físicas, mecânicas e de barreira dos filmes a base de whey protein, objetivando otimizar a formulação para aplicação em morangos por meio da metodologia de superfície de resposta.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O Whey Protein (WP) em pó (Provon®292:Glanbia Nutritionals Inc., EUA) foi fornecido pela empresa Homem da Terra Ltda, com um teor de proteína de 94%. O pó de quitosana (CH) com peso molecular médio (aproximadamente 200.000 g/mol) e 80% de grau de desacetilação foi obtido na CERTBIO, Campina Grande, Brasil. A transglutaminase (TG) foi adquirida da Ajinomoto, Ltd. Sua atividade enzimática é de 80 U/g de acordo com a especificação do produto do fabricante. O plastificante utilizado foi o glicerol (NEON, glicerina PA com 99,5% de pureza). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico.

2.2 Preparação de filmes compostos reticulados

Os filmes foram preparados de acordo com a metodologia de Jiang et al. (2020) com adaptações. Diferentes concentrações de enzima transglutaminase (TG), quitosana (CH) e glicerol (GLY) foram utilizadas de acordo com o planejamento experimental Box-Benhken apresentado na Tabela 1. Primeiramente, a solução do WP foi preparada com uma fração de massa de proteína de 10% (p/v) utilizando água desionizada. A solução do WPC foi conduzida a um aquecimento a 70 °C por 15 min para desdobrar a proteína. Posteriormente, TG foi adicionado à solução de proteína desnaturada e a solução foi incubada a 50 °C por 2 h para catalisar a reação de reticulação. A fim de inativar a enzima transglutaminase, a solução WP–TG foi aquecida a 80° C por 10 min. Após o resfriamento, CH foi adicionado lentamente à solução na proporção de 20% do peso da proteína (WP), sendo agitada a 160 rpm por 2 h. Após obter a solução uniforme, o glicerol foi adicionado à solução formadora do filme, sob agitação constante. Em seguida, 5 ml de solução filmogênica foi adicionado aos moldes de silicone (6 cm de diâmetro x 3 cm de altura) e deixados secar a 30 °C por 12 h. Posteriormente, todas as amostras de filme foram armazenadas a 25 °C e 50% UR por 24 horas.

Tabela 1: Fatores investigados e níveis de fator do planejamento experimental Box–Behnken.

Fator	Níveis		
	Nível baixo (-1)	Nível intermediário (0)	Nível alto (+1)

	Concentração de enzima			
TG	transglutaminase (U/g)	10	12	14
	Concentração de quitosana			
CH	(% p/v)	1	2	3
	Concentração de glicerol			
GLY	(% p/v)	3	4,5	6

2.3 Design Box-Behnken

Uma metodologia de superfície de resposta (RSM) na forma de um desenho Box-Behnken (BBD) foi escolhida para otimizar estatisticamente os filmes obtidos a partir da reticulação do whey protein com enzima transglutaminase em conjugação com quitosana para três fatores experimentais (TG; CH ; GLY) em três níveis de fator (-1; 0; +1) (Tabela 2) com base nos principais efeitos de permeabilidade ao vapor de água (WVP), resistência à tração (TS), alongamento (E), módulo de Young (YM) e solubilidade (SOL). O software Statistica 12.0 foi usado para realizar o estudo e para análises estatísticas posteriores. Um total de 15 execuções em ordem aleatória foram projetadas pelo software com três repetições no ponto central para estimar o erro puro.

Tabela 2: Arranjo de projeto de Box-Behnken e valores experimentais para cada resposta dos filmes obtidos a partir da reticulação do whey protein com a enzima transglutaminase e conjugado com quitosana.

EXPERIMENTO	TG	CH	GLY	WVP	RT	E	YM	SOL
1	10	1	4,5	1,38	1,35	6,61	8,76	6,19
2	14	1	4,5	1,92	1,19	9,74	8,59	4,57
3	10	3	4,5	2,15	2,06	9,58	21,15	3,51
4	14	3	4,5	1,65	3,29	15,71	19,31	3,86
5	10	2	3	5,42	2,92	11,88	8,14	2,54
6	14	2	3	2,59	1,69	10,65	14,4	4,16
7	10	2	6	2,28	1,68	8,15	11,34	5,95
8	14	2	6	4,09	1,26	12,36	9,43	4,89
9	12	1	3	1,34	4,45	12,49	23,52	2,31
10	12	3	3	1,87	4,54	16,45	23,14	3,17
11	12	1	6	5,59	1,85	13,12	14,23	4,88
12	12	3	6	3,75	1,86	16,35	12,35	5,86
13	12	2	4,5	1,45	3,04	21,61	20,71	3,04
14	12	2	4,5	1,43	3,39	17,51	22,89	2,58

O procedimento de regressão de superfície de resposta foi usado para ajustar os resultados experimentais usando a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i X_i + \sum_{i=1}^K \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq K} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Onde: Y é a resposta prevista, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} representam os coeficientes de regressão de termos constantes, lineares, quadráticos e de interação, respectivamente, enquanto, X_i , X_j e X_k representam as variáveis independentes.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar a adequação do modelo polinomial de segunda ordem, expressa pela significância dos coeficientes de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e falta de ajuste para cada resposta estudada. Gráficos tridimensionais de superfície de resposta foram usados para representar a interação e a influência das variáveis nas respostas.

2.4 Determinação das condições ótimas

A formulação otimizada foi obtida por meio da análise dos gráficos de superfície de resposta e da função de desejabilidade visando menores valores de permeabilidade ao vapor de água (WPV) e solubilidade (SOL), e maiores valores de resistência a tração (TS), alongamento (E) e módulo de Young (YM). A capacidade preditiva do modelo foi avaliada pela comparação entre as respostas previstas e novos cinco experimentos independentes usando as condições ótimas das respostas estimadas no planejamento experimental (Fachel et al., 2018).

2.5 Caracterização das propriedades do filme

2.5.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada usando um micrômetro digital (Mitutoyo, Co., Código No. 293-240-30, Modelo IP-65, Japão) com uma precisão de 0,001 mm. Os valores de espessura foram medidos em pelo menos cinco localizações aleatórias para cada amostra de filme. A espessura média foi usada para calcular a permeabilidade ao vapor de água e as propriedades mecânicas.

2.5.2 Permeabilidade ao Vapor de Água

A permeabilidade ao vapor de água (WVP) dos filmes foi medida gravimetricamente de acordo com (Jiang et al., 2016) com algumas modificações. Tubos falcon com um diâmetro de 1,5 cm e uma profundidade de 10 cm foram preenchidos com água destilada (5 mL), para expor a face inferior do filme a uma alta UR. As amostras de filme foram montadas com a superfície superior voltada para a UR ($50 \pm 2\%$) da sala com ambiente controlado. O peso dos tubos foi medido em intervalos de 1 hora durante 10 horas para determinar a taxa de transferência de vapor de água através do filme. O WVP do filme foi calculado da seguinte forma:

$$WVP = \frac{\Delta W.FT}{S.\Delta p} \quad (2)$$

Em que:

ΔW representa a perda de peso do tubo por hora (g/h) (isto é, o declive do comportamento linear); FT é a espessura do filme (mm); S representa a área do filme exposta (m²) e Δp é a pressão de vapor diferencial no filme, $\Delta p = P.(UR_1-UR_2)$, sendo UR_1, UR_2 a diferença de UR em ambos os lados do filmes e P a pressão de saturação a 25°C (KPa).

2.5.3 Resistência à tração, Alongamento e Módulo de Young

As propriedades mecânicas das amostras de filme foram medidas usando um analisador de textura (TA-XT plus, Stable Micro Systems, UK) e incluíram a resistência à tração (TS) e o alongamento na ruptura (E) de acordo com o método proposto por (Jiang et al., 2016). Todas as amostras de filme foram cortadas em retângulos com comprimento de 40 mm e largura de 10 mm. A separação inicial da garra foi ajustada para 20 mm com uma velocidade de tração de 10 mm e uma separação efetiva de alongamento de 20 mm. Cada filme foi replicado quinze vezes. A resistência à tração (TS) foi calculada dividindo-se a força de carga máxima na ruptura pela área da seção transversal e expressa em MPa. O alongamento (E) foi calculado como uma razão entre o alongamento no ponto de ruptura da amostra e o comprimento inicial de uma amostra e expresso como uma porcentagem. O módulo de Young foi determinado a partir das curvas de tensão-deformação, sendo expresso em Mpa pela diferença de tensão e deformação.

$$TS = \frac{F}{L.X} \quad (3)$$

Em que:

F é a força de tração (N); L é a largura do filme (mm); X é a espessura do filme (mm).

$$E = \frac{L1-L0}{L0} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

L1 é o comprimento de fratura (mm); L0 é o comprimento inicial do filme (mm).

2.5.4 Solubilidade dos Filmes

A solubilidade do filme em água foi testada de acordo com um procedimento semelhante ao de (Jiang et al., 2016). Pequenos pedaços de filmes (0,5 - 1,0 g) e papéis de filtro foram secos a 100 °C por 3 horas e então pesados com precisão para determinar o peso seco inicial do filme e do papel de filtro. Cada amostra de filme foi incubada em 10 mL de água destilada a 25 °C por 24 horas, sendo então filtrado com o papel de filtro correspondente. O material não dissolvido juntamente com o papel de filtro foi seco a 100 °C durante 3 horas e depois pesados. A solubilidade foi calculada como a proporção em peso do material dissolvido em relação ao peso inicial da amostra. A solubilidade do filme em água foi calculada da seguinte forma:

$$SOL (\%) = \frac{dm1-dm2}{dm1} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

dm1 é o peso seco inicial; dm2 é o peso seco final.

2.6 Aplicação dos filmes comestíveis em frutos de morango

Os frutos de morangos frescos foram comprados no mercado local em Campina Grande, Paraíba, Brasil. A uniformidade e qualidade dos frutos estudados foi baseada na cor, maturidade e peso (20 ± 2 g) e não apresentavam danos mecânicos visíveis ou infecção fúngica.

Os frutos selecionados foram inicialmente higienizados por imersão em água desionizada esterilizada por 3 min. Posteriormente, os frutos foram divididos em quatro grupos (8 morangos por grupo) da seguinte forma: 1) frutos controle (sem revestimento) armazenados a 5 °C; 2) frutos controle (sem revestimento) armazenados a 25 °C; 3) frutos revestidos armazenados a 5 °C e 4) frutos revestidos armazenados a 25 °C. Para os grupos 1 e 2 os morangos foram submetidos apenas a higienização. Com relação aos grupos 3 e 4, os morangos foram imersos na solução de revestimento por 3 min a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), e em seguida removidos com pinça estéril e depois secos por 15 min em temperatura ambiente. Em todos os grupos os morangos foram colocados em caixas plásticas de polipropileno, sendo

armazenados nas temperaturas de 5 e 25 °C de acordo com a divisão dos grupos. As análises das amostras de cada grupo foram realizadas após 1, 3, 5 e 7 dias de armazenamento.

2.6.1 Perda de Peso dos Frutos

A perda de peso dos frutos foi determinada como a diferença entre o peso inicial e final do fruto ao longo dos dias de armazenamento, sendo os resultados expressos em porcentagem com relação ao peso inicial.

2.6.2 Determinação de pH, acidez e sólidos solúveis totais (SST)

Para determinação desses parâmetros os morangos foram espremidos manualmente e utilizou-se o suco obtido. O pH do suco foi medido com um medidor de pH digital. A acidez total titulável (% ácido cítrico) foi determinada utilizando 1 ml do suco de morango em 9 ml de água destilada e titulada com solução de NaOH (0,1 M) usando 2 gotas de fenolftaleína como indicador. O SST expresso em °Brix, foi medido a partir do suco obtido usando um refratômetro digital.

2.6.3 Índice de Decadência Fúngica

Ao longo do armazenamento, os morangos foram monitorados e considerados estragados ou com contaminação fúngica se fosse observada uma lesão visível, mostrando a presença de colônias brancas ou marrons escuras. A decadência dos morangos foi expressa em porcentagem com base nos frutos infectados.

2.6.4 Firmeza dos Frutos

A firmeza dos frutos foi medida nos dois lados do fruto com um testador de firmeza (Penetrômetro) equipado com uma sonda de 8 mm e distância da haste para o fruto de 5mm. Os resultados de firmeza foram expressos em N.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise estatística e ajuste do modelo do projeto Box-Behnken

A influência das concentrações de enzima transglutaminase (TG), quitosana (CH) e glicerol (GLY) nas propriedades mecânicas: (TS, E e YM), bem como as propriedades físicas (WVP e SOL) dos filmes preparados foram examinados com a metodologia de superfície de resposta usando o design Box-Behnken.

Os resultados para todos os experimentos obtidos durante a análise do BBD estão descritos na Tabela 2. Resumidamente, os valores de resposta obtidos para o WVP, TS, E, YM e SOL, variam de 1,34 a 5,59 (g.mm/m².h.kPa), 1,19 a 4,54 (MPa), 6,61 a 21,65 (%), 8,14 a 23,52 (MPa) e 2,31 a 6,19 (%), respectivamente.

Para demonstrar a relação entre as variáveis independentes e as respostas sobre as propriedades físicas e mecânicas dos filmes, foram obtidas as equações de regressão expressas em valores codificados da seguinte forma:

$$\text{WVP} = 2,835 - 0,1567\text{TG} - 0,051\text{CH} + 0,475\text{GLY} - 0,52\text{TG}*\text{CH} + 2,32\text{TG}*\text{GLY} - 1,18\text{CH}*\text{GLY} - 0,393\text{TG}^2 + 0,064\text{CH}^2 - 1,755\text{GLY}^2 \quad (6)$$

$$\text{TS} = 2,345 + 0,081\text{TG} + 0,953\text{CH} - 1,436\text{GLY} + 0,695\text{TG}*\text{CH} + 0,405\text{TG}*\text{GLY} - 0,040\text{CH}*\text{GLY} + 1,210\text{TG}^2 - 0,076\text{CH}^2 + 0,008\text{GLY}^2 \quad (7)$$

$$\text{E} = 11,92 + 3,583\text{TG} + 4,178\text{CH} - 0,585\text{GLY} + 1,50\text{TG}*\text{CH} + 2,72\text{TG}*\text{GLY} - 0,365\text{CH}*\text{GLY} + 6,844\text{TG}^2 + 3,00\text{CH}^2 + 2,652\text{GLY}^2 \quad (8)$$

$$\text{YM} = 15,53 + 0,055\text{TG} + 7,326\text{CH} - 3,936\text{GLY} - 0,835\text{TG}*\text{CH} - 4,085\text{TG}*\text{GLY} - 0,750\text{CH}*\text{GLY} + 7,643\text{TG}^2 + 0,160\text{CH}^2 + 3,785\text{GLY}^2 \quad (9)$$

$$\text{SOL} = 4,325 - 0,33\text{TG} - 0,823\text{CH} + 2,256\text{GLY} + 0,985\text{TG}*\text{CH} - 1,34\text{TG}*\text{GLY} + 0,060\text{CH}*\text{GLY} - 0,981\text{TG}^2 - 0,651\text{CH}^2 - 0,503\text{GLY}^2 \quad (10)$$

A adequação do BBD foi demonstrada pelos altos valores do coeficiente de determinação (R²) obtidos para todas as respostas (Tabela 3). Os modelos matemáticos mostraram-se adequados para análise de superfície de resposta com valores de desajustes baixos, além disso, valores de p<0,05, demonstram a confiabilidade do modelo, indicando um efeito mais significativo nas variáveis de resposta.

Tabela 3. Valores de probabilidade associados (*p* - valores), erro de desajuste e regressão para cada resposta.

	R ²	Lack of fit	<i>p</i> -value									
				Main effects			Quadratic effects			Interaction effects		
				TG	CH	GLY	TG ²	CH ²	GLY ²	TG*CH	TG*GLY	CH*GLY
WVP	0,999	0,0002	0,005*	0,045*	0,000*	0,000*	0,014*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	
TS	0,992	0,044	0,71	0,037*	0,017*	0,011*	0,623	0,955	0,113	0,255	0,89	
E	0,96	0,027	0,18	0,142	0,772	0,031*	0,136	0,165	0,592	0,371	0,892	
YM	0,993	0,043	0,961	0,018*	0,059	0,008*	0,839	0,032*	0,598	0,093	0,633	
SOL	0,993	0,045	0,252	0,057	0,008*	0,021*	0,045*	0,073	0,071	0,040*	0,849	

*Significativo $p < 0,05$; R²: Coeficiente de determinação.

3.2 Efeito das variáveis independentes nas respostas

3.2.1 Permeabilidade ao vapor de água

O WVP é uma das propriedades mais importantes em embalagens de alimentos, utilizada para determinar a capacidade de barreira a transferência de umidade entre os alimentos e a atmosfera circundante. Quanto menor o WVP dos filmes comestíveis, melhor a sua capacidade de impedir a transferência de umidade do alimento revestido (Jiang et al., 2016; Jiang et al., 2020; Tavares et al., 2021). A permeabilidade ao vapor de água foi influenciada significativamente pelas concentrações de enzima transglutaminase, quitosana e glicerol ($p < 0,05$). A Fig. 1, demonstra que as concentrações maiores de quitosana em conjugação com concentrações intermediárias de enzima transglutaminase e glicerol, proporcionam filmes com menores valores de WVP. Este comportamento pode estar associado a reticulação promovida pela TG e o whey protein, junto a incorporação da CH nos filmes, limitando a mobilidade das cadeias do filme e retardando a penetração das moléculas de água. No estudo de Jiang et al. (2016) os autores observaram que maiores concentrações de TG em filmes compostos por whey-CH, proporcionam menores valores de WVP. De acordo com Di Pierro et al. (2006) as ligações formadas entre lisina e glutamina sob a catalisação por TG, devem reduzir a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de whey protein e quitosana.

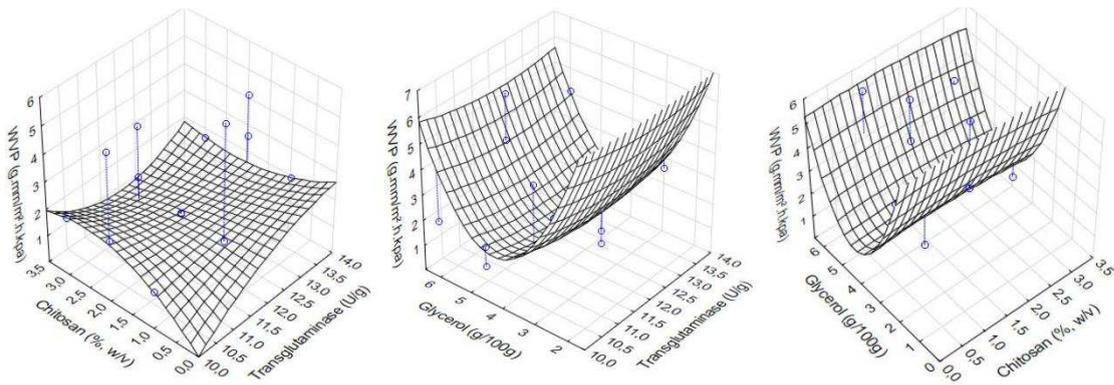


Figura 1. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) na permeabilidade ao vapor de água (Y_1 ; g.mm/m².h.kPa) dos filmes obtidos.

3.2.2 Resistência à tração, extensibilidade e módulo de Young.

As propriedades mecânicas são essenciais para a compreensão das interações internas dos biomateriais, os filmes devem apresentar características de resistência, tenacidade e elasticidade para garantir uma boa proteção dos alimentos durante seu transporte e armazenamento. Conforme mostrado na Fig. 2. a incorporação de transglutaminase, quitosana e glicerol afetam significativamente a resistência à tração dos filmes. As interações de TG e CH proporcionaram uma correlação positiva na resistência à tração dos filmes, esse comportamento sugere que a reticulação induzida pela TG facilitou uma forte polimerização intramolecular no composto de whey protein + quitosana, formando polímeros de alto peso molecular, facilitando o aumento da resistência à tração. Entretanto, o glicerol influenciou negativamente a resistência a tração, sugerindo a aplicação de quantidades inferiores ou intermediárias do plastificante. De acordo com Thakur et al. (2019) o glicerol tende a restringir algumas ligações de hidrogênio na cadeia polimérica, reduzindo a sua cristalinidade e provocando maior entropia, o que sugere a redução na tenacidade dos filmes.

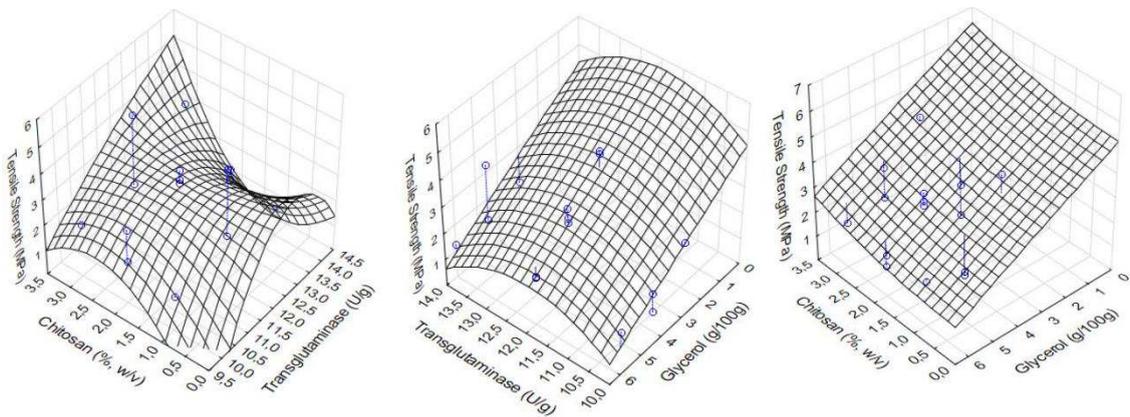


Figura 2. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) na resistência à tração (MPa) dos filmes obtidos.

As Figuras 3 e 4 demonstram a influência da TG, CH e GLY na extensibilidade e módulo de Young dos filmes obtidos. A extensibilidade dos filmes foi influenciada positivamente pela conjugação do whey protein com a reticulação de transglutaminase e quitosana. Os resultados sugerem que quantidades intermediárias de TG, CH e GLY, proporcionam filmes com propriedades de alongamento melhores, devido à sua forte interação intramolecular proporcionada pela reticulação. De acordo com Diaz et al. (2019) o grau de reticulação da TG em matrizes poliméricas proteicas, pode proporcionar filmes mais rígidos e com grandes variações em sua extensibilidade. A transglutaminase e quitosana provocaram um efeito positivo no módulo de Young dos filmes, os valores máximos do YM foram obtidos em níveis intermediários de quitosana e transglutaminase adicionados à formulação, o que sugere um forte efeito de interação, proporcionando filmes com maior extensibilidade e resistência à tração.

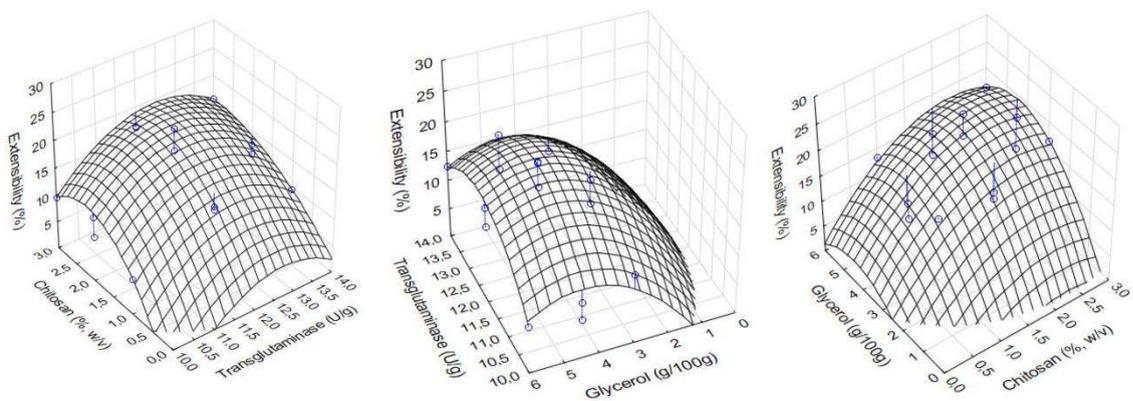


Figura 3. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) na extensibilidade (%) dos filmes obtidos.

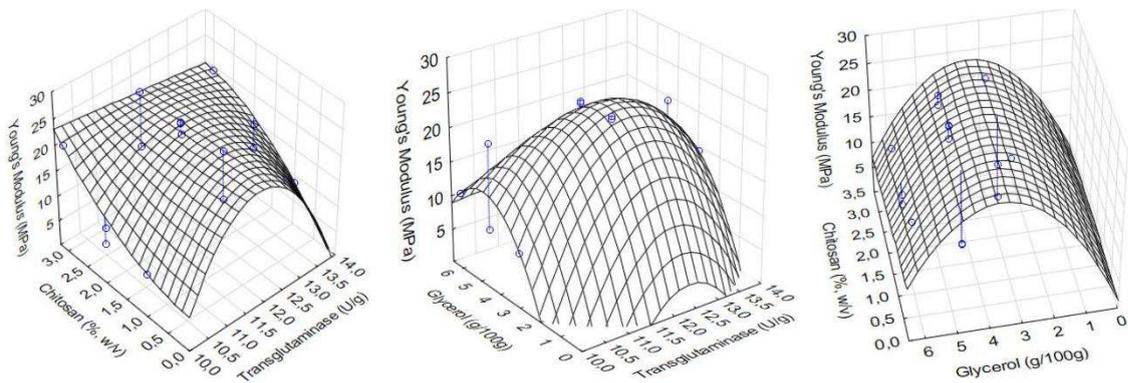


Figura 4. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) no módulo de young (Mpa) dos filmes obtidos.

A solubilidade é uma característica de extrema importância para revestimentos comestíveis, pois ela indica a biodegradabilidade dos filmes formados. Quando se há uma baixa solubilidade, os filmes formados são indicados para o revestimento de produtos com alta atividade de água. As interações de TG e GLY afetaram significativamente a solubilidade dos filmes, em que o aumento do GLY nos filmes proporcionou maior solubilidade, este comportamento ocorre provavelmente pela afinidade do glicerol com a água, entretanto, o aumento de TG e CH diminuiu a solubilidade dos filmes, isso se deve ao fato da reticulação entre o whey protein, TG e CH provocar uma redução dos espaços intermoleculares reduzindo a capacidade de difusão das moléculas de água (Garcia et al., 2019). Este mesmo comportamento foi observado por (Jiang, et al., 2022) a partir da adição de TG em filmes à base de whey protein, os autores relatam que a diminuição da solubilidade a partir da adição de TG pode ser atribuída à forte interação e formação de pontes dissulfeto intermoleculares.

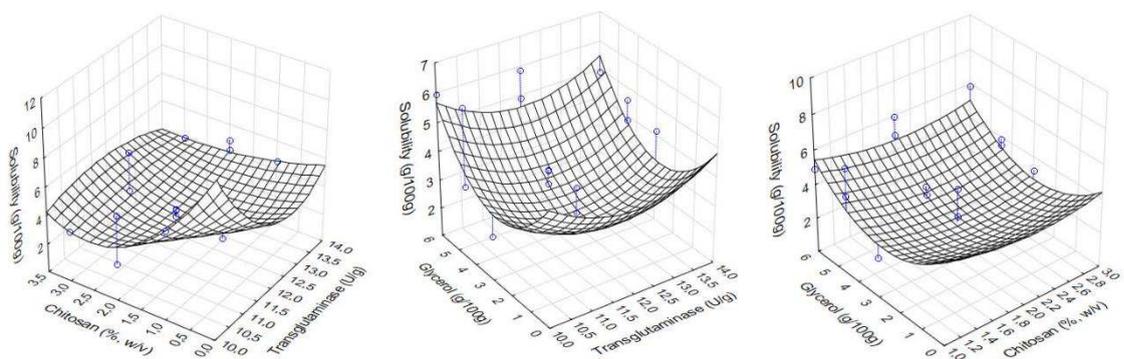


Figura 5. Gráficos de superfície de resposta mostrando o efeito da enzima transglutaminase (X_1 ; U/g), quitosana (X_2 ; p/v) e glicerol (X_3 ; p/v) na solubilidade (g/100g) dos filmes obtidos.

3.3 Otimização e validação do projeto Box – Benhken

Com o intuito de encontrar a melhor formulação, foram analisados os gráficos de resposta e a função de desejabilidade composta. As condições ótimas foram baseadas nos seguintes objetivos: menores valores de permeabilidade ao vapor de água (WPV) e solubilidade (SOL), e maiores valores de resistência a tração (TS), alongamento (E) e módulo de Young (YM).

Tabela 4. Valores preditos e experimentais obtidos a partir da otimização da resposta do delineamento Box–Behnken.

Respostas	Valor previsto	Valor Experimental
WVP (g.mm/m ² .h.kpa)	1,15	1,23 ± 0,14
TS (MPa)	3,382	3,41 ± 0,03
E (%)	18,98	19,47 ± 0,55
YM (%)	22,87	22,92 ± 0,06
SOL (%)	4,017	4,185 ± 0,18

Os níveis ótimos obtidos através da metodologia de superfície de resposta e desejabilidade foram 13 (U/g) de enzima Transglutaminase, 3 (% , w/v) de quitosana e 4,5 (g/100g) de glicerol. A validação do modelo foi realizada por meio de comparação dos resultados previstos com os resultados experimentais de dez réplicas do filme composto em condições otimizadas. Os resultados obtidos demonstram a boa capacidade preditiva dos modelos com R² de 0,998 e erros residuais variando entre 0,21 a 6,50%.

3.4 Aplicação do revestimento otimizado nos morangos

3.4.1 Perda de peso

A perda de peso dos morangos apresentou um aumento gradual durante os dias de armazenamento nos frutos com e sem revestimento. Os resultados apresentados na Figura 6 indicam que foi obtida uma menor perda de peso nos morangos revestidos e armazenados a temperatura de 5°C, entretanto observou-se que houve uma perda significativa a partir do dia 3 no peso dos frutos armazenados a 25°C com e sem revestimento. Ao final do armazenamento foi observado que os frutos armazenados a 5°C com e sem revestimento permaneceram com uma perda menor quando comparados aos frutos armazenados a 25°C, fato que se deve a alta perecibilidade e taxa de respiração do fruto. Este resultado indica que o revestimento foi eficaz na preservação do peso dos morangos quando armazenados a temperaturas de refrigeração. De acordo com Muley e Singhal (2020) a temperatura e UR desempenham um papel fundamental

nos processos de transpiração e respiração dos frutos, refletindo na perda de peso, além disso, os autores afirmam que os revestimentos com a quitosana em conjugação na matriz polimérica atuam como barreira eficaz na restrição da perda de umidade dos frutos, prevenindo também danos mecânicos.

3.4.2 Firmeza

A firmeza é uma importante característica de qualidade do fruto, pois quanto mais firme o fruto menos suscetível a deterioração ele se torna, indicando um bom padrão de qualidade para consumo do fruto (Thakur et al., 2019). As mudanças na firmeza dos morangos revestidos e não revestidos armazenados a 25 °C e 5 °C apresentadas na Figura 6, demonstram que houve uma diminuição gradual dos valores de firmeza ao longo do armazenamento com variações de 7,51 a 2,36 N (25 °C), 8,43 a 4,91 N (5 °C), 12,35 a 2,75 N (25 °C) e 14,91 a 7,06 N (5 °C) dos frutos não revestidos e revestidos, respectivamente. Entre os tratamentos analisados, os morangos revestidos e armazenados a 5 °C foram os mais firmes ao longo dos sete dias de armazenamento, entretanto, os frutos não revestidos a temperatura de 25 °C perderam quase 70 % da sua firmeza ao longo do armazenamento. De acordo com Nasrin et al. (2017) pelo fato de os morangos serem frutos climatéricos e colhidos em estágio de senescência elevado o seu tecido amolecido fica mais suscetível a danos, diminuindo sua firmeza e resultando em uma vida útil curta, dessa forma, pode-se observar que os filmes otimizados aplicados aos morangos armazenados a 5 °C, desempenharam bem o seu papel de preservar a firmeza dos frutos.

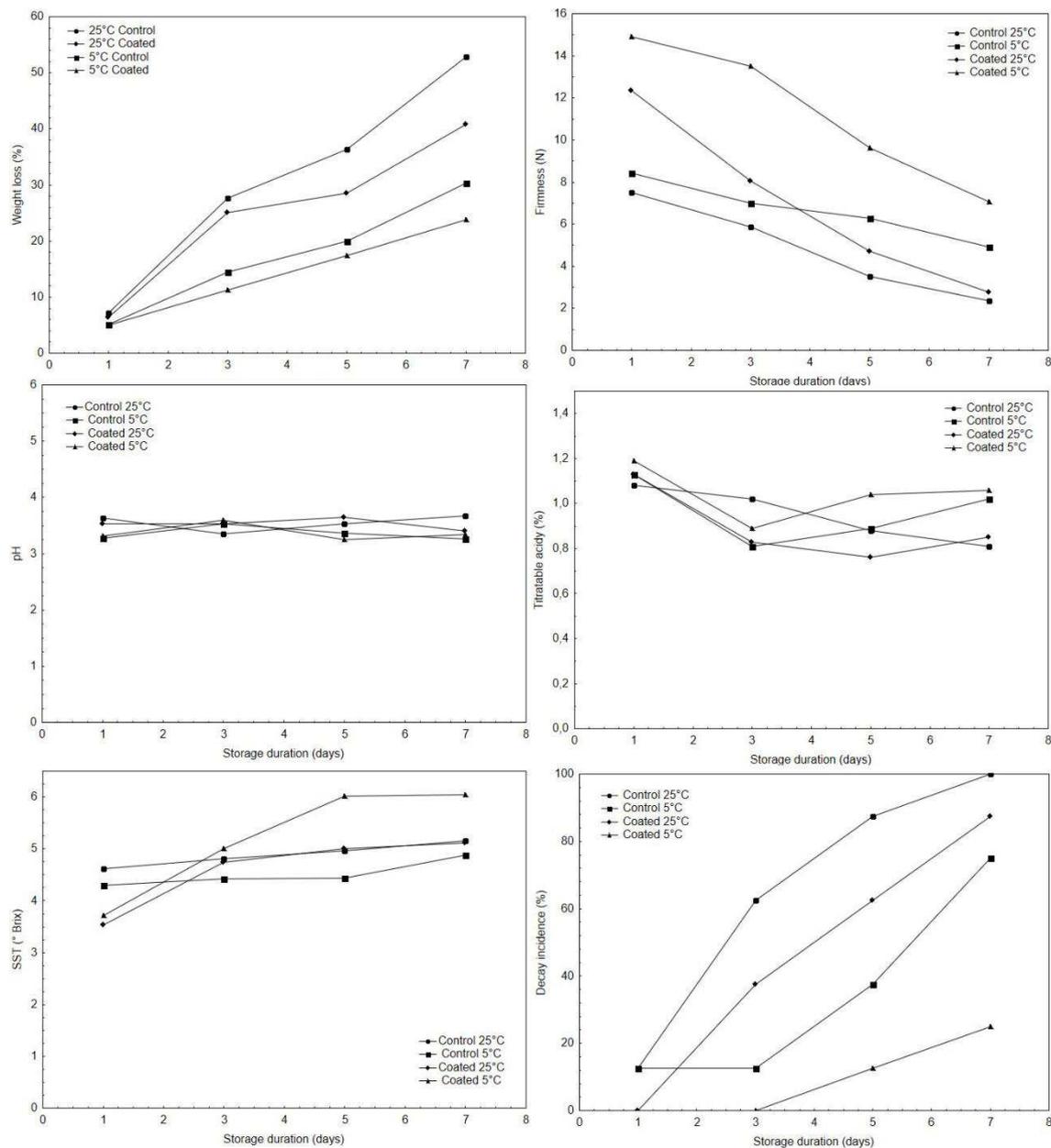


Figura 6. Efeito dos revestimentos otimizados à base de transglutaminase, quitosana, whey protein e glicerol na perda de peso, firmeza, pH, acidez, sólidos solúveis totais e índice de decadência fúngica dos morangos revestidos e não revestidos a 25°C e 5°C.

3.4.3 pH, acidez e sólidos solúveis totais (SST)

Os valores de pH não apresentaram grandes variações ao longo dos dias de armazenamento, entretanto observou-se uma pequena diminuição entre os dias 3 e 5, nos frutos revestidos armazenados a 5°C e 25°C, e nos frutos controle armazenados a 5°C. De acordo com Saleem et al. (2021) este comportamento pode ser explicado pela retenção do pH devido a proteção que os filmes proporcionam diminuindo as atividades metabólicas dos frutos e

reduzindo o processo respiratório. O teor de acidez dos frutos apresentou uma diminuição entre os dias armazenados nas amostras controle e revestidas armazenadas a 25°C, enquanto os frutos revestidos e não revestidos armazenados a 5°C permaneceram com valores de acidez estáveis ao longo do armazenamento. Este fato pode estar ligado a quantidade de ácidos orgânicos presentes nos frutos, em que de acordo com Bose et al. (2019) o grau de senescência dos frutos é determinante na desvalorização da acidez presente nos frutos, sendo mais proeminente em estádios avançados, ocasionando taxas de respiração maiores e perdas destes ácidos. Entretanto, observa-se que o filme cumpriu bem seu papel, proporcionando uma perda na taxa de diminuição da acidez dos frutos, provavelmente por desacelerar as atividades metabólicas.

Houve um aumento discreto no teor de sólidos solúveis totais (SST) dos frutos revestidos e armazenados a 5°C entre os dias 5 e 7, o que provavelmente se deve ao aumento de atividade metabólica e mudanças no ambiente interno dos frutos a partir da aplicação do filme, entretanto, os frutos revestidos e controle armazenados a 25°C e 5°C permaneceram com valores estáveis ao longo do armazenamento. Este comportamento também foi relatado por Yan et al. (2019), os autores observaram que as modificações provocadas internamente nos frutos após as aplicações dos filmes associados a quitosana podem provocar uma redução no O₂ interno dos frutos e elevação do CO₂, acelerando o estágio de senescência, entretanto a utilização dos filmes se torna eficaz na redução desses fenômenos.

3.4.4 Índice de decadência

O índice de decadência fúngica expresso em porcentagem das amostras infectadas aumentou ao longo do período de armazenamento, entretanto as amostras revestidas e armazenadas a 5°C obtiveram uma porcentagem de decaimento menor quando comparadas aos frutos controle. Hajji et al. (2018) relatam que os filmes produzidos com quitosana em sua matriz polimérica proporcionam uma melhor proteção dos frutos inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e fungos, atuando como uma barreira à danos mecânicos pelo fato da capacidade antimicrobiana presente na CH interferindo diretamente nos processos biológicos que propagam o crescimento microbiano. Portanto, o efeito sinérgico dos componentes da matriz do filme colabora substancialmente com a inibição da deterioração microbiana nos morangos colhidos após a colheita.

4. Conclusão

Os efeitos de interação e individuais da enzima transglutaminase, quitosana e glicerol sobre as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes compostos por whey protein foram estudados utilizando o design Box-Behnken que permitiu a otimização bem-sucedida da formulação ótima a partir dos filmes obtidos. De acordo com a desejabilidade e análise das superfícies de reposta, as condições ótimas continha as quantidades de 13 (U/g) de enzima Transglutaminase, 3 (% w/v) de quitosana e 4,5 (g/100g) de glicerol, pois apresentavam menor permeabilidade ao vapor de água e solubilidade e maior resistência à tração, alongamento e módulo de young. Essas propriedades são primordiais para alimentos com alta umidade, sendo o filme otimizado uma opção para este uso.

O revestimento otimizado obtido tem um efeito benéfico na qualidade de conservação de morangos, atuando como uma barreira contra microrganismos, melhorando a vida de prateleira e conservando as propriedades dos frutos revestidos e armazenados sob refrigeração, podendo ser uma alternativa ao uso em excesso de produtos químicos no beneficiamento pós-colheita dos morangos.

5. Referências

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 20-27, 2014.

DIAZ, K. C.; VALLE, M. E. F.; DIAZ, O.; CAMBERO, M. I. Characterization of edible films from whey proteins treated with heat, ultrasounds and/or transglutaminase. Application in cheese slices packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 1-9, 2019.

DI PIERRO, P.; CHICO, B.; VILLALONGA, R.; MARINELLO, L.; DAMIAO, A. E.; MASI, P.; PORTA, R. Chitosan–whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, 744-749, 2006.

GARCIA, M. E.; SANCHEZ, L. F. D.; ROMO, R. A. R.; ALMENDAREZ, B. E. G.; DOMINGUEZ, G. C.; MENDEZ, J. V. M.; REYES, A. A.; DI PIERRO, P.; GONZALEZ, C. R. Effect of Transglutaminase Cross-Linking in Protein Isolates from a Mixture of Two Quinoa

Varieties with Chitosan on the Physicochemical Properties of Edible Films. **Coatings**, v. 9, p. 1-18, 2019.

HAJJI, S.; YOUNES, I.; AFFES, S.; BOUFI, S.; NASRI. Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 375-392, 2018.

JIANG, S. J.; ZHANG, X.; MA, Y.; TUO, Y.; QIAN, F.; FU, W.; UM, G. Characterization of whey protein-carboxymethylated chitosan composite films with and without transglutaminase treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, 153-159, 2016.

JIANG, S. J.; ZHANG, T.; SONG, Y.; QIAN, F.; TUO, Y.; MU, G. Mechanical properties of whey protein concentrate based film improved by the coexistence of nanocrystalline cellulose and transglutaminase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, 12660-12721, 2019.

JIANG, S., ZOU, L., HOU, Y., QIAN, F., TUO, Y., WU, X., ZHU, X., UM, G. The influence of the addition of transglutaminase at different phase on the film and film forming characteristics of whey protein concentrate-carboxymethyl chitosan composite films. **Food Packaging and Shelf Life**. 25(100456), 1-8, 2020.

JIANG, S.; ZHANG, M.; JIANG, S.; TUO, Y.; QIAN, F.; MU, G. Transglutaminase and hydroxypropyl methyl cellulose enhance mechanical properties of whey protein concentrate film. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 5472-5478, 2022.

LIANG, X., MA, C., YAN, X., ZENG, H., MCCLEMENTS, D. J., LIU, X., LIU, F. Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion gels: Effects of double cross-linking with transglutaminase and calcium ions. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p.1-11, 2020.

MARTINS, V. G.; ROMANI, V. P.; MARTINS, P. C.; FILIPINI, G da. S. Innovative packaging that saves food. **Saving Food**, cap. 6, p. 171-202, 2019.

MULEY, A. B.; SINGHAL, R. S. Extension of postharvest shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*) using a coating of chitosan-whey protein isolate conjugate. **Food Chemistry**, v. 329, p. 1-11, 2020.

NASRIN, T. A. A.; RAHMAN, M. A.; HOSSAIN, M. A.; ISLAM, M. N.; ARFIN, M. S. Postharvest quality response of strawberries with aloe vera coating during refrigerated storage. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 92, p. 598-605, 2017.

SILVA, H. A.; PAIVA, E. G.; LISBOA, H. M.; DUARTE, E.; MATA, M. C.; GUSMÃO T.; GUSMÃO R de. Role of chitosan and transglutaminase on the elaboration of gluten-free bread. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 1877-1886, 2020.

TAVARES, L.; SOUZA, H. K. S.; GONÇALVES, M. P.; ROCHA, C. MR. Physicochemical and microstructural properties of composite edible film obtained by complex coacervation between chitosan and whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 1-12, 2021.

THAKUR, R.; PRISTIJONO, P.; SCARLETT, C. J.; BOWYER, M.; SINGH, S. P.; VUONG, Q. V. Starch-based edible coating formulation: Optimization and its application to improve the postharvest quality of “Cripps pink” apple under different temperature regimes. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 1-10, 2019.

VERA, A.; TAPIA, C.; ABUGOCH, L. Effect of high-intensity ultrasound treatment in combination with transglutaminase and nanoparticles on structural, mechanical, and physicochemical properties of quinoa proteins/chitosan edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 536-546, 2020.

CONCLUSÕES GERAIS

O aumento da procura por pesquisas relacionadas a filmes e revestimentos comestíveis biodegradáveis está impulsionando estudos que visam aproveitar matérias-primas que possuam alto teor de polissacarídeos utilizáveis em aplicações tecnológicas. Nesse contexto, a combinação de whey protein, enzima transglutaminase reticulada com quitosana e glicerol demonstra um grande potencial de uso para esse propósito.

No entanto, a compreensão aprofundada da interação desses componentes (Transglutaminase, Quitosana e Glicerol) ainda é limitada, o que justifica a necessidade de investigar o papel desses compostos poliméricos na formação e caracterização de revestimentos para frutas. Neste estudo, examinamos a influência das concentrações da enzima transglutaminase, quitosana e glicerol nas propriedades físicas, mecânicas e de barreira dos filmes à base de proteína de soro de leite, com o objetivo de otimizar a formulação para aplicação em morangos usando a metodologia de superfície de resposta. Além disso, avaliamos o efeito do filme otimizado nos morangos por meio de análises físicas e físico-químicas durante o armazenamento, demonstrando que ele representa uma excelente barreira contra microrganismos, prolongando a vida útil dos frutos.

Diante do exposto, fica evidente a relevância de pesquisas que aprofundem os seguintes aspectos: a interação entre a enzima transglutaminase, quitosana e glicerol, em relação à base de proteína do soro de leite; a formação e aplicação dos revestimentos e filmes em frutas; e o impacto dessas características na fisiologia e na qualidade dos produtos vegetais.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Testes e experimentos para as formulações dos filmes.

Figura A1: Testes iniciais para obtenção de filmes.



Figura A2: Testes intermediários para obtenção de filmes.

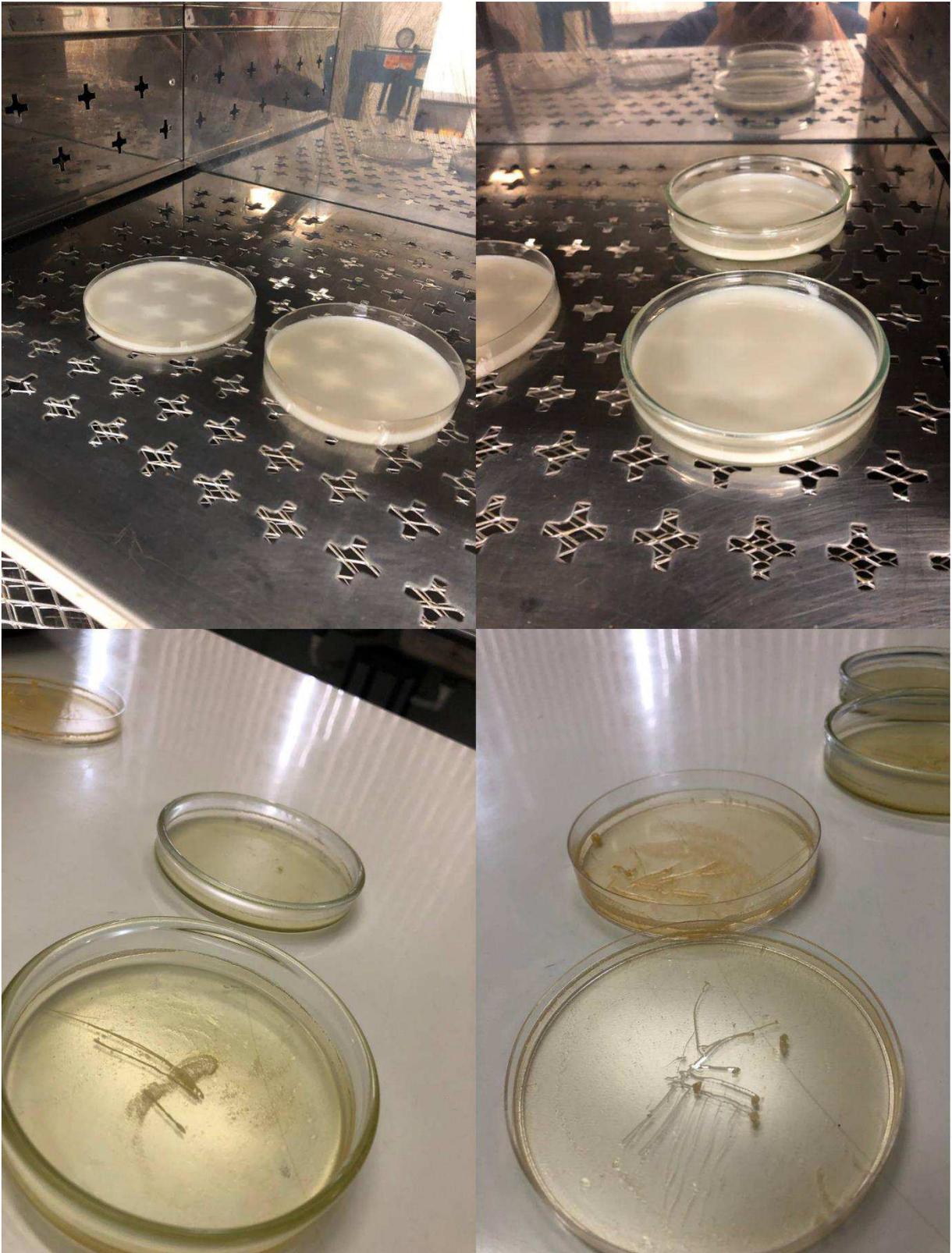


Figura A3: Testes finais para obtenção de filmes.



APÊNDICE B – Aplicação do filme otimizado em morangos.

Figura B1: Armazenamento dos morangos revestidos (coated) e controle (control).

