

Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Teresa Alexandra Lopes de Matos

**Novos sistemas de embalagens
antimicrobianas para alimentos
utilizando bacteriófagos**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho Efetuado sob a orientação da

Doutora Sanna Sillankorva

e do

Doutor Miguel Cerqueira

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, Doutora Sanna Sillankorva e Doutor Miguel Cerqueira por toda atenção e apoio prestados ao longo do meu estágio curricular, bem como da dissertação. A eles, o meu sincero obrigada pela partilha de conhecimentos, tempo e dedicação demonstrados.

A toda a gente que conheci nos laboratórios e que com muita simpatia me ajudaram em tudo o que precisei. Um especial agradecimento ao Luís Melo e à Graça Pinto, que muita paciência tiveram para comigo, com quem aprendi muito no laboratório e que tão prestáveis foram comigo.

À Carla Couto que com muito carinho e dedicação contribuiu para a conclusão desta etapa.

Às minhas amigas, Marta Arantes, Joana Gomes, Paula Queirós e Sílvia Bonjardim, que me acompanharam ao longo destes 5 anos, que sempre me apoiaram. Um muito obrigada pelos momentos de distração, carinho, atenção e paciência que tiveram para comigo.

À Ana Carolina Costa, Diana Carvalho, Joana Pereira, Liliana Amaral, Marina Andrade e Maria Inês Machado, pelos momentos de distração, pelas conversas e por toda a atenção e motivação, ao longo dos últimos anos, com principal destaque para esta reta final.

À Matilde Magalhães que sempre teve as palavras certas para me dirigir.

À minha afilhada, Ana João, pela excelente pessoa que é. Obrigada por todo o carinho, por todos os conselhos e por toda a disponibilidade demonstrada.

Ao meu namorado, João Carlos Fernandes, que sempre esteve lá para mim, com todo o carinho, amor, palavras de conforto e que nunca me deixou desanimar.

Por último um agradecimento aos meus pais e irmãos por todo o apoio ao longo destes anos académicos, à muita paciência que tiveram para comigo nesta última etapa do meu percurso académico, que foi muito importante. Um agradecimento muito especial ao meu Pai, ao meu Herói, que infelizmente não está presente, mas que foi um grande suporte na minha vida académica e, certamente, ficaria muito orgulhoso por ver-me aqui chegar. A ele dedico todo o meu esforço e, a ele, um grande obrigada por tudo.

Sumário

Apesar dos esforços para diminuir os níveis de patogénicos presentes nos alimentos, estes persistem causando graves problemas na saúde humana e um grande impacto na economia. Paralelamente várias questões ambientais são levantadas como, por exemplo, a não biodegradabilidade das embalagens sintéticas e a impossibilidade de reciclar algumas das embalagens usadas atualmente. Nesse sentido os revestimentos e filmes ativos tendo por base biopolímeros e aditivos tem sido sugeridos como uma das soluções para a indústria alimentar.

Neste trabalho, foram desenvolvidos sistemas de embalagens ativas utilizando bacteriófagos, ou fagos, (vírus que infetam especificamente bactérias, sendo estes inofensivos aos seres humanos, animais e plantas), com o objetivo de efetuar uma libertação controlada de fagos, e assim possibilitar o aumento do tempo de prateleira de produtos alimentares. As estratégias antimicrobianas para combater os patogénicos alimentares com recurso a fagos têm tido resultados promissores em vários estudos realizados em animais e alimentos. Uma das grandes vantagens da sua utilização é sua eficácia antimicrobiana para patogénicos resistentes a antibióticos.

Concretamente, foi estudada a possibilidade de incorporação de fagos em duas matrizes, sendo a primeira constituída por 1,5% de alginato e 0,5% de glicerol e, a segunda por 1,5% de quitosano e 0,5% de glicerol preparado em uma solução de 1% de ácido láctico. O processo tinha em vista a aplicação dos revestimentos e filmes numa película absorvente comumente utilizada em embalagens cárneas, uma vez o fago escolhido, PF7A, é específico para *Pseudomonas fluorescens*, bactérias que estão associadas à deterioração de carnes. Após a realização dos testes de viabilidade do processo, verificou-se que o processo proposto é possível quando se incorpora o fago em matrizes alginato, enquanto para o quitosano o processo não apresenta viabilidade. O resultado negativo é justificado pelo baixo pH da solução de quitosano obtida e pelas interações electroestáticas do polímero carregado positivamente com as cargas negativas da cápside do fago.

Após o estudo da viabilidade do processo, os revestimentos e filmes com e sem fago obtidos foram avaliados em diversos parâmetros de modo a perceber se a presença de fago influenciava de alguma maneira os mesmos. Para revestimentos foi avaliada a viscosidade e a tensão superficial bem como os coeficientes de adesão, coesão e espalhamento dos revestimentos

na superfície. Para os filmes foi determinada a espessura, os parâmetros de cor e opacidade, hidrofobicidade, as propriedades mecânica e de transporte, assim como, a espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier. Assim, foi possível concluir, que além do processo ser possível para a matriz de alginato, o fago não influenciou nenhum dos parâmetros estudados.

Abstract

In spite of the efforts made to decrease the levels of pathogens existent in food, these continue to cause severe damages to human health and therefore have a huge economic impact. Sideways, there are several environmental questions such as the synthetic non-biodegradable packaging and the inability to recycle some of the packing used. In order to resolve these problems, the active coatings and films based on polymers and additives have been suggested as one of solutions for the food industry.

In this study, active packaging systems using bacteriophages, or phages, (viruses which specifically infect bacteria but are harmless to humans, animals and plants) have been developed with the aim of achieving a controlled release of phage, and so enable increased shelf-food products. The antimicrobial strategies for combating food pathogens using phages have had promising results in several studies performed in animals and food. One of the great advantages of using it is their antimicrobial effectiveness for antibiotic-resistant pathogens.

During this study, it has been investigated the possibility of phage incorporation was studied in two arrays, the first being composed of 1.5% alginate and 0.5% glycerol and the second for 1.5% chitosan and 0.5% glycerol prepared in a 1% solution of lactic acid. The process had for the application of coatings and films in an absorbing film commonly used in meat packaging, since the chosen phage, PF7A, is specific to *Pseudomonas fluorescens* bacteria that are associated with the deterioration of meat. After completion of the feasibility tests, it was found that the proposed process is possible when the phage is incorporated in alginate matrices, while for chitosan process has no viability. This negative result is justified by the low pH of the chitosan solution obtained and the electrostatic interactions of the positively charged polymer with negative charges of the phage capsid.

After the process of the feasibility study, the coatings and films with and without phage obtained were evaluated on various parameters so as to realize the presence of phage in some way influenced the same. For coatings viscosity and surface tension as well as the membership coefficient, cohesion and spread on the surface of the coatings was evaluated. For films were determined thickness, the color and opacity parameters, hydrophobicity, the mechanical and transport properties, as well as infrared spectroscopy with Fourier transform. Thus, it was concluded that besides the process is possible for the alginate matrix, the phage did not influence any of the studied parameters.

Índice

Agradecimentos	V
Sumário	VII
Abstract	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tabelas.....	XV
Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.....	XVI
Capítulo 1. Enquadramento da tese	- 1 -
1.1. Objetivos e relevância do tema	- 3 -
1.1. Empresa/ descrição do local de realização do projeto	- 3 -
1.2. Organização da dissertação.....	- 4 -
Capítulo 2. Revisão do estado da arte	- 5 -
2.1. Revestimentos e filmes	- 7 -
2.1.1. Definição e importância de revestimentos e filmes	- 7 -
2.1.2. Função e requisitos dos revestimentos e filmes	- 8 -
2.1.3. Biopolímeros utilizados em revestimentos e filmes	- 9 -
2.1.4. Alginato.....	- 10 -
2.1.5. Quitosano.....	- 13 -
2.1.6. Glicerol.....	- 16 -
2.1.7. Ácido láctico.....	- 18 -
2.2. Bacteriófagos	- 21 -
2.2.1. Descoberta e caracterização	- 21 -
2.2.2. Aplicabilidade dos fagos.....	- 23 -
2.2.3. Fago PF7A.....	- 24 -
2.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	- 25 -
Capítulo 3. Materiais e métodos	- 27 -
3.1. Propagação, purificação e quantificação do fago de <i>P. fluorescens</i> (PF7A)	- 29 -
3.1.1. Propagação do fago de <i>P. fluorescens</i> (PF7A).....	- 29 -
3.1.2. Purificação do fago de <i>P. fluorescens</i> (PF7A).....	- 29 -
3.1.3. Quantificação do fago de <i>P. fluorescens</i> (PF7A)	- 30 -
3.2. Produção de revestimentos e filmes.....	- 30 -
3.2.1. Produção de revestimentos com e sem fago.....	- 30 -

3.2.2.	Produção de filmes com e sem fago	- 30 -
3.3.	Estudo da viabilidade do fago em revestimentos e filmes	- 31 -
3.3.1.	Teste da gota	- 31 -
3.3.2.	Quantificação do título de fago em revestimentos e filmes	- 31 -
3.3.3.	Avaliação da presença de fago	- 31 -
3.4.	Caracterização dos revestimentos e filmes com e sem fago	- 32 -
3.4.1.	Em revestimentos	- 32 -
3.4.2.	Em filmes	- 33 -
3.5.	Análise estatística	- 36 -
Capítulo 4.	Resultados e discussão	- 39 -
4.1.	Quantificação do fago de <i>P. fluorescens</i> (PF7A)	- 41 -
4.2.	Estudo da viabilidade do fago em revestimentos e filmes	- 41 -
4.2.1.	Teste da gota	- 41 -
4.2.2.	Quantificação do título de fago em revestimentos e filmes	- 42 -
4.2.3.	Avaliação da presença de fago	- 45 -
4.3.	Caracterização dos revestimentos e filmes com e sem fago	- 46 -
4.3.1.	Revestimentos	- 46 -
4.3.2.	Filmes	- 49 -
Capítulo 5.	Conclusões gerais e recomendações futuras	- 55 -
Bibliografia		- 59 -
Anexos		- 65 -
Anexo A.	Caracterização de revestimentos	- 67 -
Anexo B.	Caracterização de filmes	- 68 -

Lista de figuras

Figura 1. (A) Revestimentos de quitosano e alginato, respetivamente e em (B) filme de quitosano.-	
8 -	
Figura 2. Esquema representativo das funções de um revestimento/filme (adaptado de [6])...	9 -
Figura 3. Principais biopolímeros usados na produção revestimentos e filme [4].....	10 -
Figura 4. Estrutura química dos monómeros constituintes do alginato (ácido manurónico (A) e	
ácido gulurónico (B)) e um segmento da cadeia de alginato contendo ambos os monómeros (C)	
[8].....	11 -
Figura 5. Representação esquemática da estrutura química do quitosano [12].	13 -
Figura 6. Estruturas químicas da quitina, quitosano e quitano [12].....	14 -
Figura 7. Representação da estrutura química do glicerol [17].....	16 -
Figura 8. Estrutura química do ácido láctico [20].	18 -
Figura 9. Estrutura química dos estereoisómeros D- e L-lático [20].	19 -
Figura 10. Representação da estrutura de um fago T4 (adaptado de [26]).....	21 -
Figura 11. Esquema representativo dos maiores grupos fágico (adaptado de [29]).	22 -
Figura 12. <i>Pseudomonas fluorescens</i> [34].	25 -
Figura 13. Película absorvente de embalagens de carne.....	32 -
Figura 14. Sistema laboratorial para a determinação do valor de permeabilidade ao vapor de	
água.....	34 -
Figura 15. Placas de petri com diferentes diluições de fago. A) placa de petri onde se plaqueou	
uma concentração elevada de fago e que resultou na lise completa do hospedeiro, B) placa de	
petri com relvado bacteriano em que são visíveis placas fágicas, C) placa de petri em que a	
diluição de fago plaqueada já não continha fago.....	41 -
Figura 16. Teste da gota para revestimento de alginato (A) e para revestimento de quitosano (B).-	
41 -	
Figura 17. Controlo do teste da gota. (A) Lise bacteriana provocada pela gota de fago; (B)	
ausência de lise bacteriana provocada pelo revestimento de alginato e (C) ausência de lise	
bacteriana provocada pelo revestimento de quitosano.	42 -
Figura 18. Quantificação de fago em revestimento de (A) alginato, (B) quitosano e numa (C)	
solução de ácido láctico a 1% com uma concentração inicial de fagos de 2×10^7 PFU/mL.	43 -

Figura 19. Controlo do teste de quantificação de fagos em revestimento de alginato (A), de quitosano (B) e em solução de ácido láctico a 1% (C) em soluções sem fago.....	43 -
Figura 20. Quantificação de fago em filmes de quitosano (A) e alginato (B) com uma concentração inicial de fagos de 2×10^7 PFU/mL.	44 -
Figura 21. Controlo do teste de quantificação de fagos em filmes de quitosano (A) e de alginato (B) sem fago.....	44 -
Figura 22. Halos de inibição criados pelos filmes de alginato com fago (A) e sem fago (B). ...	45 -
Figura 23. Halos de inibição criados pelas gotas de filmes de alginato ressuspensionado em tampão SM (B), com fago (A) e sem fago (B).	45 -
Figura 24. Presença de fago no halo de inibição criado pelo filme de alginato (A) e no halo de inibição criado pela gota de filme de alginato ressuspensionado em tampão SM (B).....	46 -
Figura 25. Viscosidade (mPa.s) em função do shear rate (s^{-1}) para filmes com e sem fago....	47 -
Figura 26. Zisman plot para a película absorvente.....	49 -
Figura 27. Exemplo de cor para filmes com e sem fago, obtidos pelo Color Hex.	51 -
Figura 28. Logótipo CEB (<i>Centre of Biological Engineering</i>) sem filme (A); filme sem fago sobreposto ao logótipo CEB (B) e filme com fago sobreposto ao logótipo CEB.....	51 -
Figura 29. Espectros obtidos para filmes com e sem fago.	54 -
Figura B.B3.1. Gráfico da perda de massa dos copos com filmes (com e sem fago) ao longo do tempo).	70 -
Figura B.B6.1. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 1 de filmes sem fago.	72 -
Figura B.B6.2. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 2 de filmes sem fago.	72 -
Figura B.B6.3. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 3 de filmes sem fago.	73 -
Figura B.B6.4. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 1 de filmes com fago.	73 -
Figura B.B6.5. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 2 de filmes com fago.	74 -
Figura B.B6.6. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 3 de filmes com fago.	74 -

Lista de tabelas

Tabela 1. Coeficientes de espalhamento, adesão e coesão para revestimentos com e sem fago na película absorvente.	48 -
Tabela 2. Valores teóricos das componentes de tensão superficial de γ_L , γ_L^d e γ_L^p para água, bromonaftaleno e formamida (adaptado de [35]).	49 -
Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de cor (desvio padrão corresponde a 9 réplicas; teste Tukey HSD, $p < 0.05$).	50 -
Tabela 4. Código RGB e Color Hex para filmes com e sem fago.	50 -
Tabela 5. Valores médios dos parâmetros das propriedades mecânicas (desvio padrão corresponde a 9 réplicas; teste Tukey HSD, $p < 0.05$).	53 -
Tabela A. A1.1. Valores de viscosidade (mPa.s) obtidos em função da velocidade de rotação (rpm) e valores de shear rate obtidos para o spindle 6.	67 -
Tabela A. A2.1. Valores de ângulos de contacto entre soluções padrão (água ultra-pura, bromonaftaleno e formamida), os revestimentos (com e sem fago) e uma película absorvente.	67 -
Tabela B.B1.1. Valores de espessura obtidos para filmes com e sem fago.	68 -
Tabela B.B2.1. Parâmetros de cor para filmes com e sem fago.	69 -
Tabela B.B3.1. Valores obtidos das massas dos copos com filme (com e sem fago) e do copo com alumínio, ao longo do tempo.	69 -
Tabela B.B3.2. Valores obtidos da taxa de perda de massa dos copos com filmes (com e sem fago); valores padronizados com o controlo de alumínio.	70 -
Tabela B.B3.3. Equações das linhas de tendência de cada curva representada na figura B.B3 e, respetivos R^2	70 -
Tabela B.B3.4. Determinação dos valores dos fatores de permeabilidade ao vapor de água. .	71 -
Tabela B.B4.1. Valores obtidos de peso seco de filmes com e sem fago.	71 -
Tabela B.B5.1. Valores de ângulos de contacto obtidos entre uma solução de água ultra-pura e os filmes, com e sem fago.	71 -

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

Lista de abreviaturas	
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
CEB	Centro de Engenharia Biológica
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
O ₂	Oxigénio
spp	Espécies de
PLA	Ácido polilático
ICTV	Comité Internacional de Taxonomia de Vírus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
PF7A	Fago de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
NaCl	Cloreto de sódio
PEG	Polietilenoglicol
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
HR	Humidade relativa
WVP	Permeabilidade ao vapor de água
WVTR	Taxa de permeabilidade ao vapor de água

Lista de símbolos	
M	Unidades de ácido β -D-manurónico
G	Unidades de ácido α -L-gulurónico
vol/vol	Volume por volume
γ_{Li}	Tensão superficial do revestimento
W_{ei}	Coeficiente de espalhamento
W_{ai}	Coeficiente de adesão
W_{ci}	Coeficiente de coesão
θ	Ângulo de contacto
γ_L^p	Contribuição polar de uma solução
γ_L^d	Contribuição de dispersão de uma solução
γ_s^p	Contribuição polar de uma superfície
γ_s^d	Contribuição de dispersão de uma superfície
γ_s	Tensão superficial da película absorvente
X_{filme}	Espessura do filme
A_{transf}	Área de transferência

Lista de Unidades	
μL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
g	Grama
mm	Milímetro
cm	Centímetro
m	Metro
mPa	Milipascal
Pa	Pascal
MPa	Megapascal
mN	Milínewton
N	Newton
kN	Quilonewton
s	Segundo
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Fator gravitacional
rpm	Rotação por minuto
$\%$	Porcentagem

Capítulo 1. Enquadramento da tese

1.1. Objetivos e relevância do tema

Doenças e surtos transmitidos por agentes patogénicos alimentares acarretam perdas económicas avultadas. Apesar dos esforços para diminuir os níveis de patogénicos presentes nos alimentos, estes persistem causando grandes impactos na economia e na área da saúde.

As estratégias antimicrobianas para combater os patogénicos alimentares com recurso a bacteriófagos (fagos) têm tido resultados promissores em vários estudos realizados em animais e alimentos. A vantagem é, em grande parte, devido à sua eficácia antimicrobiana para patogénicos resistentes a antibióticos. Atualmente a FDA (*Food and Drug Administration*) e a USDA (*United States Department of Agriculture*) têm aprovados alguns produtos baseados em bacteriófagos para uso em alimentos, no entanto, muitos estudos apontam para benefícios limitados quando os fagos são adicionados diretamente no alimento.

Assim, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de sistemas de embalagens de alimentos ativos utilizando de bacteriófagos para uma libertação antimicrobiana controlada de fagos de forma para preservar a qualidade e aumentar o tempo de prateleira de produtos alimentares.

1.1. Empresa/ descrição do local de realização do projeto

A *Improveat* é uma empresa situada em Guimarães, Portugal, que tem como objetivo o desenvolvimento de produtos face às necessidades de cada cliente, de forma a maximizar a sua funcionalidade e desempenho. Para a empresa, a investigação e desenvolvimento associam-se à inovação (I&D+i), considerando-se uma forte ponte de ligação entre a I&D+i e a indústria, favorecendo o crescimento dos seus clientes com segurança e sustentabilidade. A *Improveat* surgiu do interesse da indústria alimentar em melhorar a qualidade e segurança dos seus produtos.

A *Improveat* em parceria com a Universidade do Minho, permitiram a realização deste projeto, no Centro de Engenharia Biológica (CEB), *campus* de Gualtar, sendo este orientado pela Doutora Sanna Silankorva e pelo Doutor Miguel Cerqueira.

1.2. Organização da dissertação

A presente dissertação intitulada **Novos sistemas de embalagens antimicrobianas para alimentos utilizando bacteriófagos**, para obtenção do Mestrado Integrado em Engenharia Biológica encontra-se dividida em cinco capítulos.

No capítulo 1, **Enquadramento da tese**, é apresentado o objetivo e enquadramento do referido tema bem como, a empresa/local de realização do projeto proposto e a forma como a tese se encontra organizada.

No capítulo 2, **Revisão do estado da arte**, apresenta-se a revisão bibliográfica sobre revestimentos e filmes, focando-se nas matérias-primas que comumente são utilizadas para a sua obtenção e as suas principais propriedades. Apresenta-se, também, a revisão bibliográfica relativas aos bacteriófagos (ou fagos) e à bactéria *Pseudomonas fluorescens* onde são abordados os aspetos que caracterizam este dois microrganismos.

No capítulo 3, **Materiais e métodos**, faz-se a caracterização da etapa laboratorial da presente dissertação, nomeadamente, propagação, purificação e quantificação de fago; a produção de revestimentos e filmes com e sem fago e, a caracterização dos revestimentos e filmes obtidos.

No capítulo 4, **Resultados e discussão**, são apresentados os resultados obtidos laboratorialmente bem como, o respetivo tratamento. Neste capítulo pode verificar-se a possibilidade do processo proposto e a respetiva caracterização.

Por último, no capítulo 5, **Conclusões gerais e recomendações futuras**, são apresentadas as considerações finais sobre o trabalho realizado e sugestões para trabalhos futuros relacionados com o tema em questão.

Capítulo 2. Revisão do estado da arte

2.1. Revestimentos e filmes

2.1.1. Definição e importância de revestimentos e filmes

Anualmente, milhões de pessoas adoecem e em alguns casos morrem devido a agentes patogénicos que são transmitidos através de alimentos. Estes patogénicos podem ser protozoários, bactérias, vírus e fungos. Mesmo com tecnologias modernas, boas práticas de higiene de produção e controlo de qualidade existem bactérias que são encontradas em alimentos e em superfícies em contacto com estes. A contaminação microbiana afeta tanto os alimentos crus, como frutas, verduras e carnes, bem como alimentos processados ou preparados, tais como biscoitos e bolachas [1,2].

A contaminação microbiana pode acontecer em qualquer momento ao longo da cadeia alimentar propagando-se até ao consumidor final. Além disso os microrganismos patogénicos têm a capacidade de se fixar em superfícies vivas ou inertes, vivendo em comunidades altamente tolerantes a diferentes agentes antimicrobianos. Deste modo. É potenciada a sua prevalência em alimentos e superfícies em contactos com alimentos. Assim, para aumentar a segurança do consumidor, novas técnicas de conservação de alimentos têm sido continuamente desenvolvidas de modo a controlar os patogénicos resultantes e o seu impacto à escala global [1].

Paralelamente várias questões ambientais são levantadas como, por exemplo, a não biodegradabilidade das embalagens sintéticas e a impossibilidade de reciclar algumas das embalagens usadas atualmente. Assim, o recurso a biopolímeros tem sido uma alternativa estudada por forma a minimizar estes impactos. Um dos problemas associados ao uso destes biopolímeros passa pelo seu elevado custo e o facto de as suas propriedades não serem ainda comparáveis aos polímeros sintéticos que habitualmente são utilizados [3].

O uso de revestimentos e filmes tendo por base biopolímeros e aditivos reconhecidos como seguros (estatuto GRAS – *Generally Recognized As Safe*) têm aumentado na indústria alimentar. Define-se o filme como uma película formada pela secagem do biopolímero preparada separadamente do alimento onde, posteriormente, é aplicado. O revestimento pode ser uma suspensão ou uma emulsão aplicada diretamente na superfície do alimento que, após secagem, leva à formação de um filme [3]. Na Figura 1, é possível visualizar um exemplo de revestimentos (A) e de um filme (B).

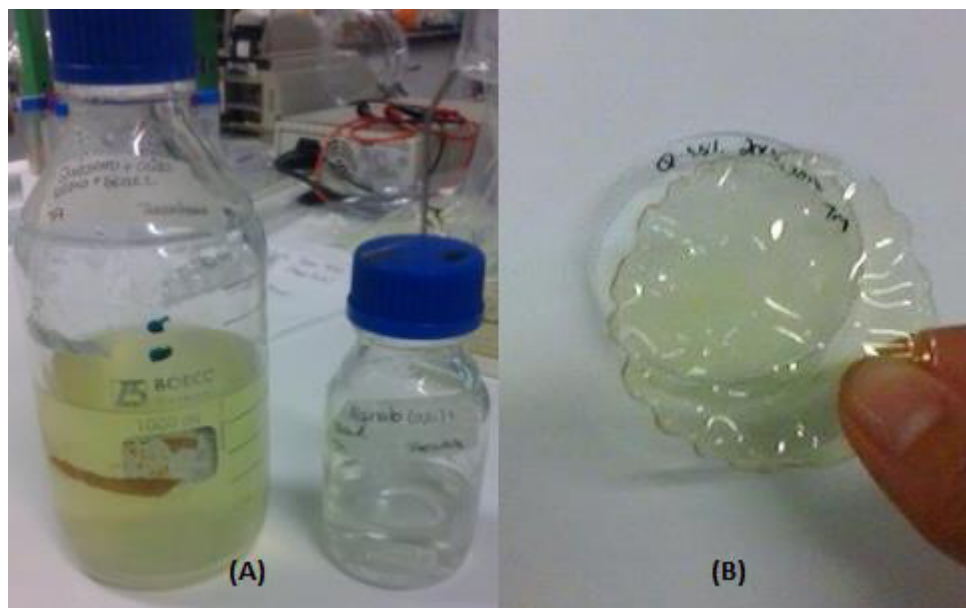


Figura 1. (A) Revestimentos de quitosano e alginato, respetivamente e em (B) filme de quitosano.

2.1.2. Função e requisitos dos revestimentos e filmes

Os revestimentos e filmes criam uma barreira semipermeável que têm como objetivo o aumento do tempo de prateleira dos alimentos. Para um revestimento e filme ser considerado viável e aplicável tem que apresentar várias funções tais como: 1) não apresentarem componentes tóxicos, alérgenos ou não-digestíveis; 2) possuírem uma estabilidade estrutural de forma a evitar danos mecânicos durante as várias etapas de processo; 3) terem um bom coeficiente de adesão ao alimentos-alvo, uniforme ao longo de toda a superfície; 4) controlarem a migração de água tanto para o interior como para o exterior dos alimentos, mantendo o conteúdo de hidratação desejado; 5) capacidade de equilibrar internamente os gases envolvidos na respiração aeróbia e anaeróbia, de modo a retardar a deterioração dos alimentos; 6) evitarem a perda de propriedades sensoriais e organoléticas tais como o aroma; 7) a possibilidade de incorporação de aditivos; 8) ter capacidade antimicrobiana e antioxidante; 9) terem facilidade na produção; 10) ter baixo custo nos componentes e na tecnologia usada na sua produção e 10) estarem aprovados na legislação vigente. [4]. Em Portugal o Decreto-Lei n°62/2008, de 31 de Março, define os polímeros como aditivos, apresentando uma lista daqueles que são autorizados bem como as suas restrições [5]. A figura 2, apresenta um esquema representativo das funções de um revestimento/filme.

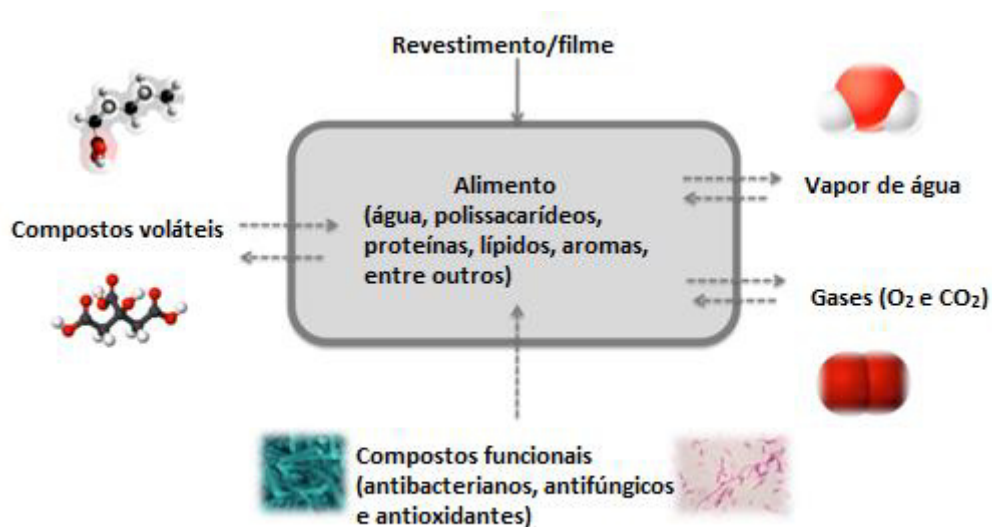


Figura 2. Esquema representativo das funções de um revestimento/filme (adaptado de [6]).

2.1.3. Biopolímeros utilizados em revestimentos e filmes

São vários os materiais que são utilizados como base das embalagens que nos são apresentadas diariamente. Estes podem ser de origem renovável (polímeros naturais) ou de origem não renovável (derivados do petróleo) [7].

Os revestimentos e filmes podem ser produzidos com base em vários polímeros biodegradáveis, nomeadamente, proteínas, polissacarídeos e lípidos). Estes podem ser utilizados isoladamente ou, então, serem combinados entre si ou com outros compostos. A funcionalidade dos filmes é influenciada pelas características físicas e químicas dos biopolímeros e, assim, há uma necessidade de seleccionar o biopolímero de acordo com as propriedades e exigências do alimento. Estes biopolímeros são escolhidos com base em certos parâmetros, como a solubilidade em água, natureza hidrofílica e hidrofóbica, capacidade de formar de filme e as suas propriedades sensoriais. Na figura 3 apresentam-se alguns dos biopolímeros mais utilizados [3,4].

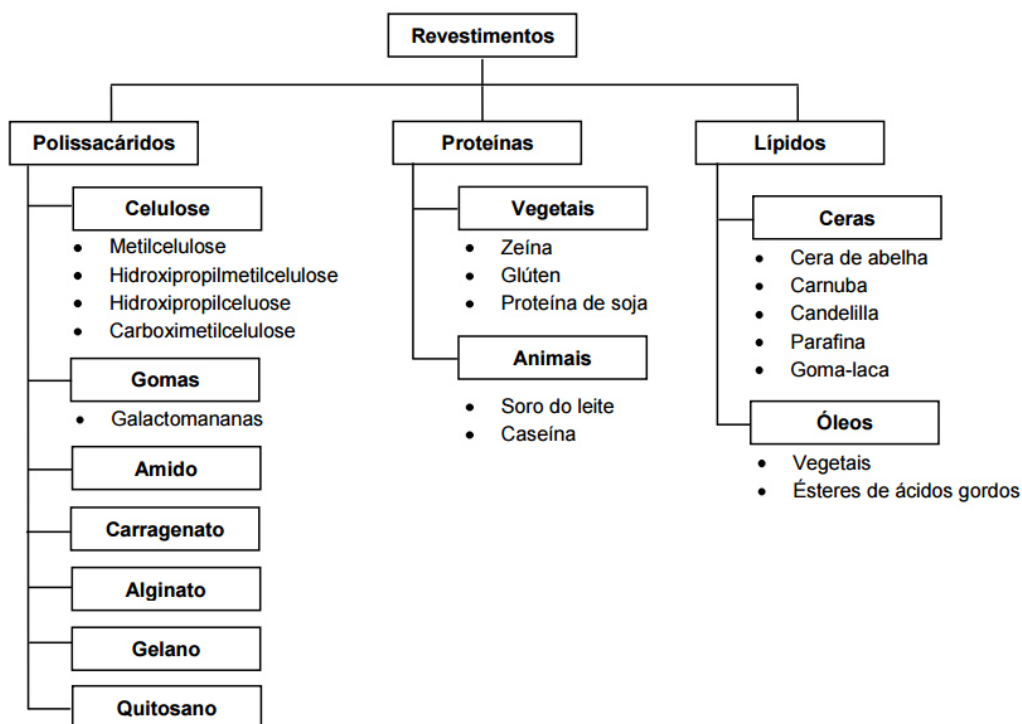


Figura 3. Principais biopolímeros usados na produção revestimentos e filme [4].

2.1.4. Alginato

2.1.4.1. O Obtenção e propriedades do alginato

O alginato é um polissacarídeo que é extraído de várias espécies de algas castanhas *Phaeopyceae* (encontram-se na parede celular e nos espaços intercelulares), podendo constituir até 40% da massa seca destas algas. Trata-se de um co-polímero não ramificado de unidades de ácido β -D-manurónico (M) e ácido α -L-gulurónico (G) através de ligações glicosídicas entre os carbonos 1-4. Na figura 4, apresenta-se a estrutura química dos monómeros constituintes do alginato e um segmento da cadeia de alginato contendo ambos os monómeros [8, 9, 10,11].

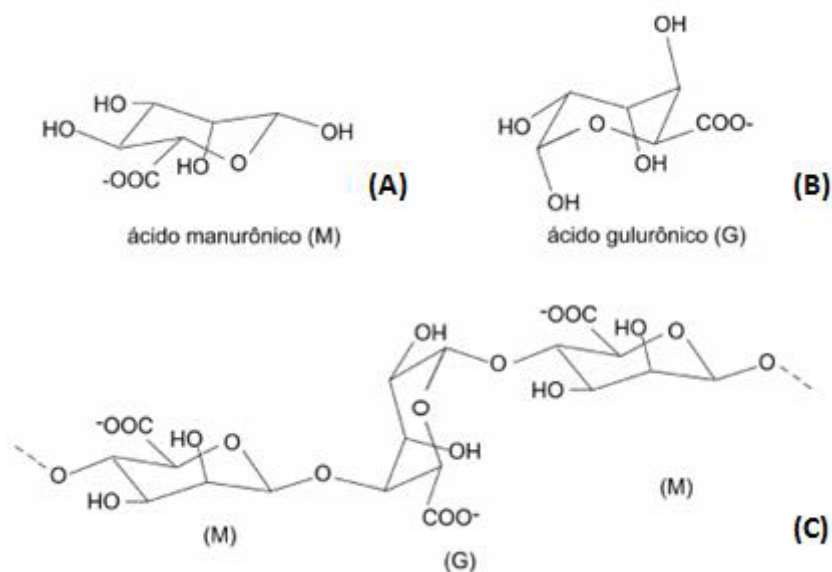


Figura 4. Estrutura química dos monómeros constituintes do alginato (ácido manurónico (A) e ácido gulurónico (B)) e um segmento da cadeia de alginato contendo ambos os monómeros (C) [8].

Como já referido, este polissacarídeo é atualmente extraído de algas, mas pode também ser produzido por microrganismos permitindo, assim, uma exploração controlada das fontes renováveis. A produção por microrganismos é realizada sob condições controladas permitindo, assim, a utilização constante de substratos de qualidade obtendo matérias específicas com características uniformes [10].

Efetuada uma comparação entre o produto (alginato) obtido por microrganismos e por extração das algas pode concluir-se que estes são semelhantes, podendo, ambos, ser utilizados como biomaterial em função da sua biocompatibilidade [10].

O alginato bacteriano pode substituir o alginato extraído das algas uma vez que em áreas delicadas como a área médica e farmacêutica é exigido materiais que apresentem elevados valores de pureza aliado a materiais que apresentem estruturas poliméricas específicas. No alginato encontram-se presentes os monómeros manurónico como o gulurónico. O primeiro monómero referido pode ligar-se a grupos acetil (carbono 2/3) tornando-o parcialmente acetilado. No caso do alginato produzido por *Pseudomonas* spp., há uma carência dos monómeros gulurónicos [10].

O facto de estrutura dos monómeros influenciar significativamente as propriedades reológicas do polímero, leva a que este quando produzido por bactérias seja influenciado pelo grau

de polimerização, pelas interações de iões, pela sequência de monómeros e pelo grau de acetilação. [10].

2.1.4.2. Aplicabilidade do alginato

Atualmente a maior parte do alginato comercializado destina-se a aplicações nas áreas alimentar, têxtil, médica e indústria do papel [10].

A indústria alimentar requer o alginato em diferentes áreas, por exemplo, em produtos lácteos, pastelaria, e em bebidas. Nesta última, pode-se destacar a indústria cervejeira em que o alginato é usado para estabilizar a espuma e, na produção de sumos, em que é utilizado como estabilizante com o objetivo de manter os constituintes da mistura em suspensão. [10].

Na indústria têxtil, o alginato é empregue para melhorar o desempenho das tintas, na medida em que melhora a adesão desta sobre tecidos. [10].

Por fim, na área médica, existem vários produtos que são imobilizados em alginato. Alguns exemplos de produtos como curativos inteligentes e formulações para prevenção de refluxo gástrico. Dado que o alginato apresenta características favoráveis para a formação de nanocápsulas, têm vindo a ser feitos estudos na medida em que nanopartículas inaláveis de alginato podem ser promissoras no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças respiratórias. [10].

2.1.4.3. Propriedades do alginato em revestimentos e filmes

O alginato é um polissacarídeo bastante requerido como polímero na formação de revestimentos e filmes. O facto de possuir a capacidade de formar barreira ao oxigénio leva a atrasar a oxidação dos alimentos, melhorando o sabor e a textura do bem alimentício [11].

São vários os estudos que têm vindo a ser feitos com a utilização de revestimentos e filmes à base de alginato para revestir polpas de fruta, vegetais e carnes. Um exemplo disso é a formação de um revestimento de alginato para aplicação em maçãs “Gala” minimamente processadas em que se concluiu que o revestimento preserva e melhora o alimento sem causar respiração anaeróbia com o facto de diminuir as perdas de água [11].

2.1.5. Quitosano

2.1.5.1. Obtenção e propriedades do quitosano

O quitosano (ou poli(1,4)-2amido-2-desoxi- β -D-glucose) é um polissacarídeo catiónico linear que tem origem natural, composto por unidades de glucosamina ligadas (ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$) a unidades de acetilglucosamina. O quitosano é essencialmente obtido industrialmente por um processo de desacetilação da alcalina da quitina, uma vez que a sua estrutura raramente se apresenta na natureza [12, 13]. Na figura 5, apresenta-se uma representação esquemática da estrutura química do quitosano.

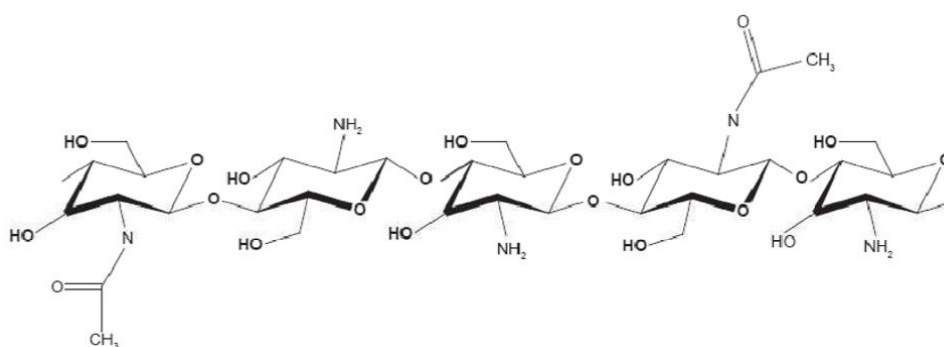


Figura 5. Representação esquemática da estrutura química do quitosano [12].

A quitina é um polissacarídeo formado por longas cadeias de de N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. Precedida da celulose, é o polímero mais abundante na natureza sendo, sintetizada por um elevado número de organismos. Esta pode ser encontrada em crustáceos (por exemplo: camarão, lagosta, caranguejo, entre outros), nas paredes celulares de fungos e leveduras e, ainda, em células de plantas de baixo porte [12, 13, 14, 15].

A estrutura cristalina da quitina pode apresentar-se sob duas formas polimórficas na natureza, a α e a β -quitina, sendo a primeira mais a mais abundante. Esta diferença justifica-se pelas diferentes fontes de obtenção do polissacarídeo em questão. Há, ainda, referência a uma terceira morfologia, a γ -quitina, mas foi concluído, através de várias análises, que esta pertence à α -quitina. A α -quitina tem a particularidade de apresentar uma elevada cristalinidade bem como uma elevada pureza, não apresentando, assim, pigmentos, proteínas ou cálcio [12,14]

Industrialmente, a quitina obtém-se através de tratamentos ácidos que têm por objetivos a dissolução do carbonato de cálcio, sendo este processo procedido de uma extração alcalina que

visa a solubilização das proteínas. De modo a obter um produto incolor, é aplicado uma descoloração para conseguir remover a pigmentação existente [12,14].

Como já referido anteriormente, a quitina é uma precursora do quitosano, sendo este obtido através de uma desacetilação da primeira. Este processo pode ocorrer de três diferentes formas: 1) desacetilação alcalina homogênea; 2) desacetilação heterogênea e 3) por meios enzimáticos. O processo de desacetilação pode, também, ser realizado recorrendo a um meio ácido, no entanto como as ligações glicosídicas são suscetíveis à hidrólise ácida, sérios problemas são levantados [12].

A desacetilação alcalina não tem como objetivo a obtenção de todos os grupos amino, uma vez que para o conseguir as condições da reação (altas temperaturas e concentrações de base elevadas) e os tempos de reação elevados provocam uma degradação das cadeias e obtenção de produtos de baixa massa molecular. Por fim, comparando o produto final, quitosano, obtido por desacetilação heterogênea e por desacetilação alcalina homogênea tem-se como principal diferença a não solubilidade em água do quitosano obtido pelo primeiro método [12].

A classificação do produto obtido após a desacetilação da quitina depende da quantidade de grupos acetamida presentes. Para uma remoção superior a 50% desses grupos considera-se que o produto da desacetilação da quitina é o quitosano. Por sua vez, denomina-se quitano se a conversão atingiu os 100% [12, 14, 16]. Na figura 6, apresenta-se as estruturas químicas destes três polímeros (quitina, quitosano e quitano).

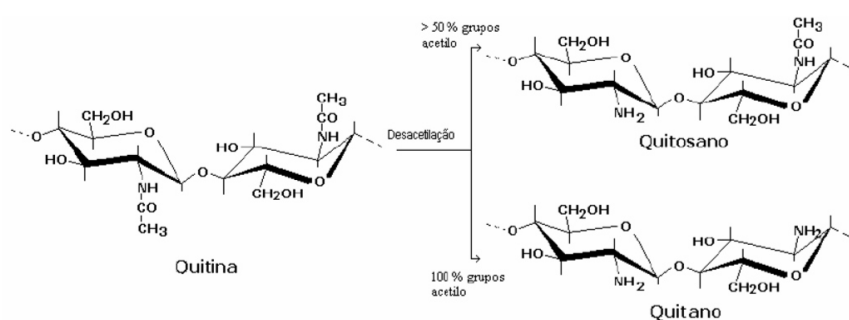


Figura 6. Estruturas químicas da quitina, quitosano e quitano [12].

O quitosano, no estado sólido, apresenta-se como semi-cristalino e, os padrões que principalmente o caracterizam, são sua solubilidade, o grau de desacetilação, a distribuição dos grupos acetamida, o peso molecular e comprimento das cadeias. Este, apresenta diversas propriedades que são essenciais e que despertam interesse para a sua utilização em

revestimentos e filmes, como a atividade microbiana (especialmente contra agentes patogénicos), biodegradabilidade, não-toxicidade, função barreira, entre outros [12,14].

2.1.5.2. Aplicabilidade do quitosano

A aplicabilidade do quitosano pode atingir várias áreas nomeadamente, a alimentar, biomédica, farmacêutica e têxtil. O largo espectro de aplicações deste polímero deve-se às suas inúmeras propriedades, tal como referido anteriormente [12,13].

O facto de apresentar propriedades antimicrobianas faz com que haja um largo interesse na área alimentar. Assim, foram estudados métodos de aplicação do quitosano em diversos alimentos como, por exemplo, o pão, frutos, entre outros. De uma forma resumida, concluiu-se que a aplicação do polímero no pão retarda o seu endurecimento e degradação uma vez que reduz a sua perda de peso. Relativamente às perdas em frutos pós-colheita por infeções fúngicas, a aplicação do quitosano é pertinente uma vez que este cria uma barreira seletiva, permeável ao dióxido de carbono e ao oxigénio, alterando a atmosfera diretamente sobre a superfície, bem como as propriedades antiestáticas relativas aos fungos, permitindo, portanto, um aumento da vida útil dos frutos [12,13].

Relativamente às outras áreas acima citadas, o quitosano tem a capacidade de ser anticoagulante, antibacteriano e antifúngico. Estas propriedades associadas ao seu poder cicatrizante em cirurgia levantou interesse por parte das áreas biomédica e farmacêutica. O quitosano tem vindo a ser estudado para o tratamento de águas resultantes da indústria têxtil uma vez que este apresenta elevada afinidade com tintas, metais e alguns emulsionantes. A sua utilização em biossensores, advém da sua utilização como suporte para a imobilização de enzimas e, posteriormente a utilização destes biossensores em aplicações nas áreas alimentar, farmacêutica, médica ou agrícola, onde o material de suporte deve ser biocompatível e não tóxico [12, 13].

2.1.5.3. Propriedades do quitosano em revestimentos e filmes

As propriedades do quitosano, quer em revestimentos, quer em filmes dependem diretamente das características da própria molécula, nomeadamente, o grau de acetilação, o peso molecular, o tamanho das partículas, a viscosidade e a densidade. Paralelamente os restantes

materiais que compõem a solução (tipo e concentração de ácido, entre outros) e as condições do ambiente envolvente (temperatura e humidade relativa) podem, também influenciar os revestimentos e os filmes obtidos tendo por base o quitosano [12]

O quitosano apresenta interesse para a formação de revestimentos e filmes uma vez que apresenta uma boa capacidade de formação de película, boas propriedades mecânicas e a capacidade de formar películas transparentes [13].

Por fim, a flexibilidade e a espessura do filme são diretamente proporcionais ao peso molecular do ácido escolhido como solvente, enquanto, a resistência do filme é diretamente proporcional ao peso molecular do quitosano [15].

2.1.6. Glicerol

2.1.6.1. *Obtenção e propriedades do glicerol*

O glicerol trata-se de uma molécula orgânica, sendo o termo geral do composto puro 1,2,3 propanoltriol. A sua estrutura química foi, em 1855, pelo Würtz, caracterizada como um conjunto de três átomos de carbono e três grupos hidroxilo (triálcool). Na figura 7, apresenta-se uma representação química da molécula de glicerol [17, 18], 19.

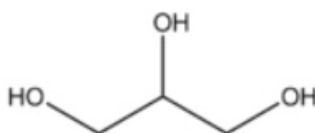


Figura 7. Representação da estrutura química do glicerol [17].

Compostos comerciais que contenham quantidade iguais ou superiores a 95% de glicerol são denominados de glicerina [17].

São vários os parâmetros que definem este composto oleoso, nomeadamente, o sabor doce; a sua elevada viscosidade; incolor e inodoro; higroscópico (capacidade de absorver água); a capacidade de ser solúvel em água e em álcool (em qualquer proporção) mas não é solúvel em hidrocarbonetos; não tóxico (sendo permitido como aditivo alimentar) [17, 19]

Este composto orgânico está presente em vegetais, tais como soja, girassol, como, entre outros e em animais mas, em resultado da combinação da glicerina e ácidos gordos. Dentro do

sistema metabólico de microrganismos, o glicerol funciona como regulador de alguns mecanismos bioquímicos intracelulares bem como é precursor de bastantes compostos dos respetivos microrganismos. [18]

O glicerol pode ser obtido através de processos químicos ou fermentativos. Quimicamente o glicerol é obtido como subproduto da produção de propileno. Dado o declínio na produção de propileno e aumento do seu custo, a produção de glicerol por via fermentativa voltou a ganhar terreno [17, 18, 19].

Assim, o glicerol é produzido a partir de óleos e gorduras por reações de saponificação (ou hidrólise alcalina), ou obtido como um subproduto da produção de biodiesel através da reação de transesterificação [17, 18, 19].

2.1.6.2. Aplicabilidade do glicerol

Inicialmente o glicerol era utilizado para a produção de nitroglicerol (ou trinitrato de glicerol), um composto explosivo (obtido pela nitratação do glicerol). Dado a elevada ocorrência de acidentes explosivos, houve uma redução da sua utilização, levando à procura de alternativas [17].

Atualmente são atribuídas ao glicerol um enorme leque de aplicações em diversas áreas, sendo usado diretamente ou, com alterações estruturais básicas, como aditivo a materiais. O glicerol é um composto que é requerido em indústrias como, alimentar, tabaqueira, farmacêutica, de cosmética, entre outras. A maior percentagem de utilização deste composto pertence às áreas da cosmética (incluindo higiene pessoal) e farmacêutica onde, na primeira, se considera a aplicação do glicerol em pastas dentífricas e elixires orais; Na área farmacêutica o seu interesse passa pela incorporação em xaropes, dada a sua elevada viscosidade e, também, é utilizado para a produção de supositórios e expetorantes [17, 18, 19].

Na área alimentar, o glicerol, é utilizado como aditivo alimentar dadas as suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes e adoçantes [17, 18, 19].

Outras aplicações do glicerol, passam pela sua utilização na produção de resinas, ésteres e poliésteres e lubrificantes na indústria têxtil, dada a sua reatividade multifuncional. Na indústria tabaqueira, o glicerol é responsável por controlar a humidade, uma vez que este previne a secagem

do produto, sendo paralelamente utilizado para a produção de compostos solúveis em água e, que não sejam tóxicos e que sejam poucos inflamáveis [17, 18, 19].

Apesar deste composto ter uma larga aplicabilidade no mercado, tendo tendência a aumentar uma vez que a população, cada vez mais, se preocupa com o consumo de materiais naturais, não tóxicos para o ambiente, a sua disponibilidade mantém-se superior ao seu consumo. Esta correlação disponibilidade/consumo leva, então, a uma necessidade de investigação sobre a produção e aplicação de derivados do glicerol [17, 18, 19].

2.1.6.3. Propriedades do glicerol em revestimentos e filmes

Para a formação de revestimentos e filmes é necessário levar em consideração a elasticidade pretendida. Assim o glicerol, com propriedades plastificantes, tem a capacidade de interferir entre cadeias de polímeros (quitosano, por exemplo) que formam a matriz polimérica, provocando uma diminuição das forças intermoleculares e, aumento da molhabilidade das cadeias do polímero [4].

2.1.7. Ácido láctico

2.1.7.1. Obtenção e propriedades do ácido láctico

O ácido láctico, denominação comumente atribuída ao ácido 2-hidroxi-propanóico, é um ácido orgânico natural caracterizado por: possuir aparência cristalina, um sabor suave, solubilidade em água, reatividade bifuncional, estabilidade térmica e química, biodegradabilidade e não-toxicidade mesmo em doses elevadas [20]. Na figura 8, apresenta-se uma representação da estrutura química do ácido láctico.

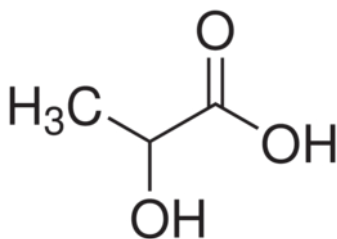


Figura 8. Estrutura química do ácido láctico [20].

Primeiramente, em 1780, C. W. Sheele considerou-o um composto impuro, isolado a partir do leite ácido, pensando que este fosse uma mistura de compostos já conhecidos. Posteriormente,

J. Berzelius, após repetir os procedimentos, concluiu que o ácido láctico se apresentava como um composto simples, encontrando-se presente no leite fresco, na carne bovina, no sangue e noutros fluidos de origem animal [20]

O presente ácido orgânico é uma das moléculas quirais mais simples apresentando-se, na forma de dois estereoisômeros nomeadamente, o ácido L-lático e o ácido D-lático, distinguindo-se os dois pelo efeito em luz polarizada do L-lático [20]. Na figura 9, apresentam-se as estruturas químicas dos dois estereoisômeros.

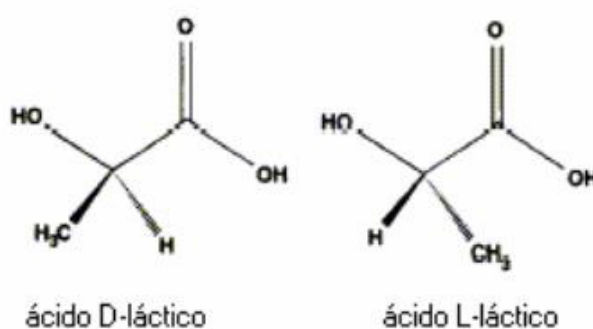


Figura 9. Estrutura química dos estereoisômeros D- e L-lático [20].

O ácido láctico pode ser obtido por dois métodos diferentes nomeadamente, por síntese química e por fermentação [20, 21].

Para primeiro método, existem várias reações possíveis para obtenção deste composto orgânico nomeadamente, a hidrólise da lactonitrila (derivado petroquímico) a oxidação de propilenoglicol, hidrólise de ácido 2-cloropropiônico, ácido acético, ácido nítrico e a oxidação de propileno. De salientar que o método principal é a hidrólise da lactonitrila, onde esta é exposta a ácidos fortes obtendo-se uma mistura racémica de D- e L- ácido láctico (a concentração destes é igual) [20, 21]

A fermentação láctica é realizada por diversos microrganismos, sendo estes principalmente bactérias lácticas. De um modo resumido, a fermentação láctica é a conversão anaeróbica de uma dextrose (glicose) em ácido pirúvico (etapa da glicólise) e, este, por sua vez, sofre uma redução produzindo ácido láctico e energia [20, 21]

2.1.7.2. Aplicabilidade do ácido láctico

O ácido láctico apresenta interesse para diversas áreas da indústria. O principal interesse deste composto passa pela produção de ácido polilático, ou PLA, um polímero sintético caracterizado pela sua biodegradabilidade que é requerido em, áreas como a agricultura (incorporado em redes poliméricas com libertação controlada de pesticidas), alimentar (incorporado em embalagens) e biomédica/farmacêutica (incorporado, por exemplo, em sistemas com libertação controlada de fármacos). [20]

Na indústria química o ácido láctico é utilizado para a produção de etanol, propilenoglicol, ácido acrílico, ácido propanóico, acetaldeídos e, ainda, ésteres e sais derivados do ácido láctico que são utilizados como solventes, emulsificantes e plastificantes. Dada a sua capacidade de retenção de água é utilizado, na área farmacêutica, para a produção de lactatos solúveis em água a partir de ingredientes insolúveis. Na indústria da cosmética, o ácido láctico é utilizado como um agente de controlo de acidez, onde é incorporado em produtos de cuidado pessoal com propriedades de hidratação, regulação de pH e de clarear e rejuvenescer a pele. Por fim, na indústria alimentar, o interesse do ácido láctico passa por inibir o crescimento de bactérias retardando a deterioração dos alimentos e pelas capacidades acidulantes, tamponantes e aromatizantes. Apesar de ter um largo espectro de aplicações na indústria, o ácido láctico, tem mas o seu preço acaba por limitar a sua procura [20]

2.1.7.3. Propriedades do ácido láctico em revestimentos e filmes

O ácido láctico pode ser utilizado como um aditivo na medida em que possui capacidades conservantes, acidulantes e aromatizantes. O seu interesse para revestimentos e filmes é pertinente na medida que é relatado a capacidade dos sais de ácido láctico diminuírem a atividade da água e, por consequência, o alimento em que é aplicado apresenta uma melhor conservação [22, 23].

2.2. Bacteriófagos

2.2.1. Descoberta e caracterização

Bacteriófagos (ou fagos) são vírus que infetam especificamente bactérias, ou seja, parasitas intracelulares que se multiplicam dentro da bactéria ao fazerem uso da maquinaria metabólica do hospedeiro. Estes são inofensivos aos seres humanos, animais e plantas. Os fagos são considerados as entidades biológicas mais abundantes e geneticamente diversificadas do planeta, estimando-se que haja cerca de 10^{31} fagos em diversos ecossistemas, estando prevista a existência de 10^8 espécies de fagos [1, 25, 26]. Na figura 10, apresenta-se uma representação de um fago T4 – um dos fagos mais estudados até à data.

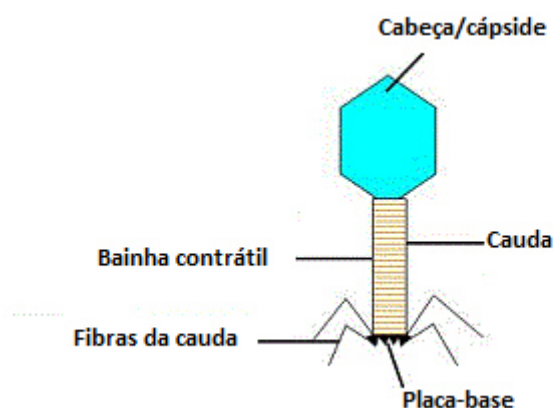


Figura 10. Representação da estrutura de um fago T4 (adaptado de [26]).

No ano de 1915, um bacteriologista Frederick W. Twort (Inglaterra) publicou um artigo que referia a descoberta de um vírus capaz de lisar células mas, não deu continuidade às suas investigações e, em 1917, o microbiologista Félix d'Hérelle (Instituto Pasteur de Paris) reconheceu a virulência deste fenómeno, dando o nome de “Bacteriófagos” a estes [27].

Os fagos existem em muitos tamanhos e formas diferentes sendo que a maioria varia de tamanho entre 24-200 nm de comprimento [28].

A cápside é composta por muitas cópias de uma ou mais proteínas diferentes, onde se encontram os ácidos nucleicos (a cápside age como protectora do material genético) e, esta pode variar de tamanho e forma. A maior parte dos fagos possuem a cauda ligada à cápside do fago sendo esta um tubo oco através do qual passa o material genético durante a infeção. O tamanho da cauda é variável, existem fagos que não a possuem. No fago T4, a cauda é envolvida por uma bainha contrátil que contrai durante a infeção [28].

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) reconhece uma ordem, 13 famílias e 31 gêneros de fagos. Os fagos são classificados de acordo com a morfologia, tipo de ácido nucleico e presença ou ausência de envelope ou camada lipídica. Relativamente ao tipo de ácido nucleico, os fagos podem ser divididos em ADN (cadeia simples ou de cadeia dupla) ou em ARN (cadeia simples ou de cadeia dupla). Os Fagos com cauda (simetria binária) representam a maior percentagem dos vírus, cerca de 96 %, sendo classificados na ordem *Caudovirales* e subdivididos em três grandes famílias filogeneticamente ligadas (*Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*). [27] Na figura 11, apresenta-se um esquema representativo dos maiores grupos fágicos.

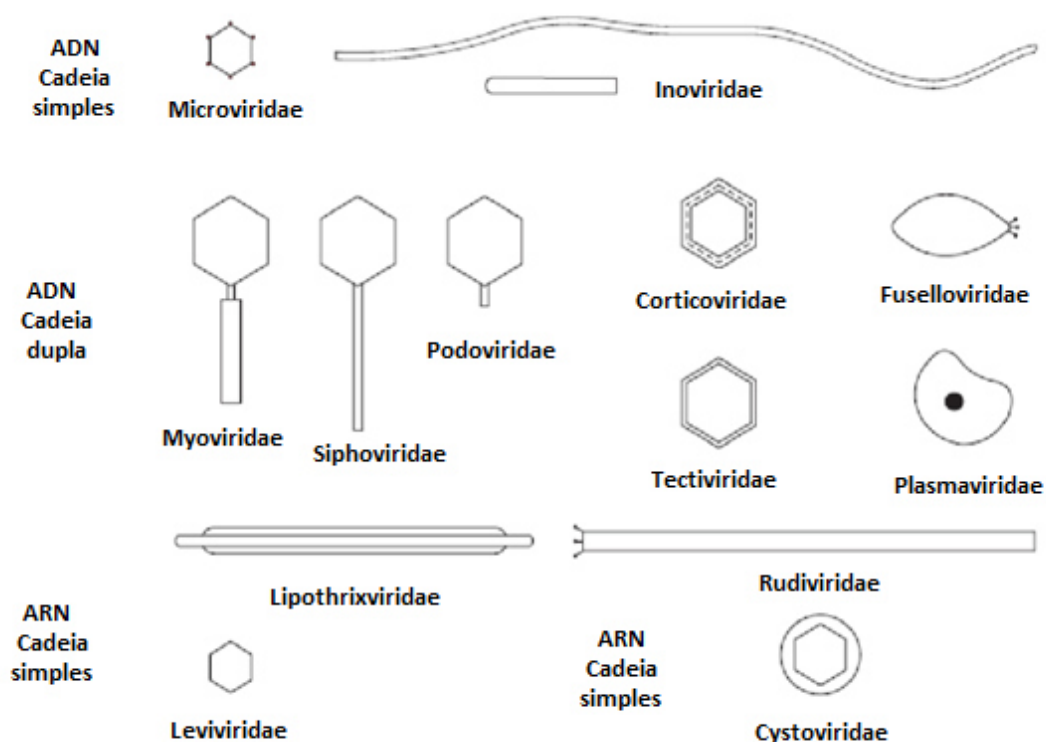


Figura 11. Esquema representativo dos maiores grupos fágico (adaptado de [29]).

Pode evidenciar-se dois ciclos de vida para os fagos, nomeadamente lítico (fagos virulentos ou temperados) e lisogénico (por fagos temperados). Os fagos invadem a bactéria (através da presença do ácido nucleico do fago) interrompendo as suas funções normais; através da energia e maquinaria genética do hospedeiro replicam o seu material genético e sintetizam proteínas e, vão formar-se novos fagos intracelularmente através de um processo de automontagem sendo, posteriormente libertados por lise celular (ciclo lítico). No caso de integração da informação genética no cromossoma bacteriano sem morte celular fala-se em ciclo lisogénico. Sob determinadas condições, naturais e artificiais (tais como radiações ultravioleta, raios X ou certos

agentes químicos), uma bactéria lisogénica pode transformar-se em não-lisogénica e iniciar o ciclo lítico. [1, 28].

Os fagos apresentam diversas vantagens como agentes de bio-controlo nomeadamente, elevada especificidade para um ou até mesmo um conjunto de hospedeiros; auto-replicação e auto-limitação; adaptação aos mecanismos de defesa das bactérias perante os fagos; baixa toxicidade; baixo custo de produção; fácil isolamento e propagação e tempo de vida prolongado [1].

2.2.2. Aplicabilidade dos fagos

Como já referido anteriormente, as doenças causadas pela contaminação de alimentos são um problema significativo, que podem ser causadas por contaminações por protozoários, bactérias, vírus e fungos [2].

No caso de infeções bacterianas, a utilização de terapias com recurso a fagos remonta ao início do século XX, onde se conseguiu demonstrar que a escolha de fagos específicos e apropriados poderia limitar infeções bacterianas. Recentemente, tem-se investigado a hipótese de utilizar os fagos em situações de biocontrolo, uma vez que o aumento da resistência antimicrobiana levou à procura de soluções mais eficientes [30].

Até à data, já se efetuaram estudos aplicando a terapia fágica com objetivo de reduzir a proliferação bacteriana indesejada (por exemplo, contra *Salmonella*) em galinhas e ruminantes onde se apresentaram resultados positivos, havendo uma diminuição das bactérias indesejadas e consequente suavização dos seus efeitos nefastos [30].

Outra aplicação dos fagos passa pela sua microencapsulação, onde os métodos escolhidos têm de levar em conta a compatibilidade com o fago sem comprometer a sua atividade biológica. Foi efetuado um estudo que apresenta um processo de encapsulamento realizado no ambiente de base aquosa que apresenta resultados que não se mostram prejudiciais sobre a viabilidade do fago. O encapsulamento de fagos em microesferas de quitosano e alginato apresentou uma eficiência elevada (93,3%). Quando a solução de alginato de sódio que contém fagos foi deixada num meio de gelificação de cloreto de sódio, formaram-se, instantaneamente, gotículas de microesferas de gel, que aprisionaram o fago numa rede tridimensional de alginato

ionicamente reticulado. Foi ainda mostrado que o fago encapsulado teve uma excelente estabilidade durante o armazenamento sob condições e humidade. Por sua vez, a espermina-alginato e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), apresentaram resultados para a encapsulação de apenas 14% e 30% respetivamente, relativamente à quantidade inicial de vírus que foram aprisionados dentro de microesferas. Por conseguinte, afigurou-se que as matrizes de Ca-alginato tinham uma boa compatibilidade com o fago encapsulado Felix O1 [31].

Face ao risco de contaminações de origem alimentar causadas por bactérias e as características dos fagos, estes apresentam um potencial elevado para reduzir este tipo de doenças mas não tem sido amplamente utilizado na indústria alimentar, em parte, devido à dificuldade de utilizar eficazmente os fagos. No mesmo estudo foi ainda referido que ao utilizar os métodos convencionais como pulverização ou nebulização, a redução de patogénicos é menor que a desejada. A imersão ou lavagem de alimentos em fagos ainda poderá ser eficaz, apesar de alguns alimentos não serem passíveis de se sujeitar a estes métodos em solução aquosa [2].

2.2.3. Fago PF7A

As bactérias, como as *Pseudomonas fluorescens* têm a capacidade de formar biofilmes (comunidades biológicas estruturadas, coordenadas e funcionais; encontram-se embebidas em matrizes poliméricas produzidas por elas próprias). Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície húmida, seja ela biótica ou abiótica, permitindo a sobrevivência em ambientes adversos [32].

O facto de se detetar biofilmes em algumas superfícies de alimentos e, estes, apresentarem resistência a agentes anti-microbianos, que por consequência provocam a sua deterioração, levou à investigação de métodos alternativos para o seu controlo, como a utilização de fagos [32].

O fago PFFA pertence à *Podoviridae*, sendo este, do tipo T7. Tem a capacidade de infetar bactérias *Pseudomonas fluorescens* sendo extremamente eficiente na lise da bactéria em questão mesmo quando esta cresce em biofilmes, num curto intervalo de tempo [20, 21].

2.3. *Pseudomonas fluorescens*

A *Pseudomonas fluorescens* é uma espécie bacteriana pertencente à família *Pseudomonadaceae*. Esta família inclui bactérias Gram-negativas que se caracterizam por serem anaeróbias, quimiorganotróficas ou quimiolitotróficas facultativas, não formadoras de esporos e apresentarem diversos flagelos. O nome “*fluorescens*” advém do facto de serem bactérias capazes de produzir pioverdina (pigmento fluorescente amarelado e solúvel em água) aquando da carência de ferro. Na figura 12, encontra-se a representação da presente bactéria [33, 34].

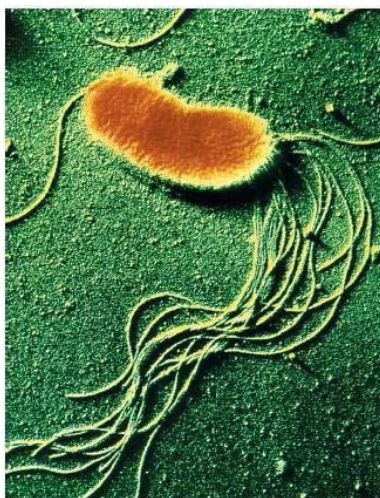


Figura 12. *Pseudomonas fluorescens* [34].

A *Pseudomonas fluorescens* pode encontrar-se em diversos ambientes, tais como: em plantas, no solo e nas superfícies da água. A nível nutricional, esta bactéria utiliza entre 60 a 80 compostos diferentes como fontes de carbono e azoto, apresentando um rápido crescimento para pH neutro com temperaturas ótimas entre 25-30 °C, concluindo-se, que estas são de fácil cultura. De salientar que já foi detetado o crescimento desta bactéria para a temperatura de 4 °C [33, 34].

Esta bactéria raramente é considerada patogénica, porque dificilmente se desenvolve a 37 °C podendo, no entanto, crescer e multiplicar-se no sangue ou em produtos sanguíneos refrigerados, levando à contaminação e deterioração de produtos como carne, leite, ovos e alimentos marítimos refrigerados uma vez que provoca a degradação de lípidos e proteínas [33, 34].

Captítulo 3. Materiais e métodos

3.1. Propagação, purificação e quantificação do fago de *P. fluorescens* (PF7A)

3.1.1. Propagação do fago de *P. fluorescens* (PF7A)

A propagação de fago foi feita de acordo com a técnica de eluição de placa descrita por Sambrook e Russel (2001). Brevemente, formou-se um relvado bacteriano por inclusão de 100 µL de suspensão de *P. fluorescens* em 3 mL de meio TSA_{0,6%} (TSB, *Trypticase Soy Broth*, com 0,6 % agar). Após a solidificação da camada de agar, foram colocados 5 µL de fago em cada placa de Petri e com recurso a pequenas tiras de papel estéreis, o fago foi espalhado por toda a área e as placas foram a incubar à temperatura ambiente até às placas estarem completamente lisadas (durante pelo menos 5 horas) [27].

Após o tempo de incubação, foram adicionados entre 3-4 mL de tampão SM (5,8 g/L NaCl, 2,0 g/L MgSO₄·7H₂O, 50 mL/L Tris-HCl com pH 7,5) e as placas incubadas, sob agitação (82 rpm, Heidolph Unimax 1010, Alemanha) à temperatura de 4 °C durante a noite [27].

3.1.2. Purificação do fago de *P. fluorescens* (PF7A)

O fago eluído no tampão SM foi recolhido e sujeito a concentração e posterior purificação de acordo com (Sambrook e Russell (2001). Sumariamente, a cada 10 mL obtidos adicionou-se 0,584 g de NaCl e colocou-se a 4°C, com agitação (107 rpm, Heidolph Unimax 1010, Alemanha), durante 1 hora [27].

Posteriormente, a solução foi centrifugada (Sigma 3-16K), durante 10 minutos, a 4 °C e 9000 × *g*, recolhendo-se, no final, o sobrenadante. Por cada 10 mL de sobrenadante obtido adicionou-se 1 g de polietilenoglicol (PEG) 8000 e incubou-se, sob agitação (107 rpm, Heidolph Unimax 1010, Alemanha) a 4 °C durante a noite [27].

A solução foi sujeita, posteriormente, a uma centrifugação (Sigma 3-16K, Reino Unido), durante 10 minutos, a 4 °C e 9000 × *g*, recolhendo-se, no final, o precipitado contendo o fago. O precipitado foi ressuspenso em tampão SM e a esta solução foi adicionado clorofórmio (1:3 vol/vol). Após homogeneização da solução, a mesma foi centrifugada (Sigma 3-16K, Reino Unido) durante 15 minutos, a 4 °C e 3500 × *g*. No final, a fase aquosa (fase superior) foi recolhida e conservada a 4 °C [27].

3.1.3. Quantificação do fago de *P. fluorescens* (PF7A)

A quantificação do fago PF7A foi realizada de acordo com metodologia anteriormente descrita por Sambrook e Russel (2001) em que diluições sucessivas de 1:10 (100 µL) foram adicionadas a 100 µL de bactéria e 3 mL de TSA_{0,6 %} e espalhadas numa placa com TSA (1,2 % agar). Após solidificação, as placas foram a incubar à temperatura ambiente, durante a noite. As placas fágicas foram contabilizadas e o título do fago (PFU/mL) determinado recorrendo à equação 1 [27].

$$\text{Título} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de placas fágicas} \times \text{diluição respetiva}}{\text{volume de solução vertida na placa}} \quad \text{Equação 1}$$

Todas as quantificações de fago foram feitas em duplicado.

3.2. Produção de revestimentos e filmes

3.2.1. Produção de revestimentos com e sem fago

Os polímeros utilizados na produção de revestimentos foram o alginato de sódio (FMC BioPolymer, EUA) e o quitosano (Zhejiang Golden-Shell Pharmaceutical CO., LTD., China). O revestimento contendo o alginato é constituído por 1,5 % de alginato e 0,5 % de glicerol (99 %, HiMedia Laboratories, India) e o revestimento de quitosano por 1,5 % de quitosano e 0,5 % de glicerol preparado em uma solução de 1 % de ácido láctico (90 %, Acros Organics, Bélgica). Após a preparar de solução de 1 % de ácido láctico é adicionado o quitosano e, quando este se dissolve completamente há adição de glicerol na solução. Na solução de alginato, após a dissolução do polímero, é adicionado o glicerol. Após a adição do glicerol as soluções foram agitadas durante 24 horas à temperatura ambiente; após esse período a solução é agitada por mais 2 horas a uma temperatura de 70 °C (MR Hei-Tec Heidolph, Alemanha). No caso dos revestimentos com fagos são adicionados 20 µL de fago (13,3 x10⁹ PFU/mL) por cada 13 mL de revestimento.

3.2.2. Produção de filmes com e sem fago

Para proceder à secagem dos revestimentos e, assim, obter o filme, efetuou-se a secagem do filme numa estufa ventilada (WTC binder, Alemanha) a 35 °C, durante 24 horas e, de seguida os filmes foram estabilizados num exsiccador com humidade relativa (HR) de 54 % durante 24 horas. Foram utilizadas placas de Petri, 57 mm de diâmetro, contendo 13 mL de revestimento.

3.3. Estudo da viabilidade do fago em revestimentos e filmes

3.3.1. Teste da gota

Em placas de Petri de 90 mm, previamente preparadas com TSA foram colocados 150 µL de bactéria, 250 µL de revestimento (sem fago) e aproximadamente 3 mL de TSA_{0,6 %}. Após solidificação da camada foram adicionados 20 µL de fago, deixou-se secar a gota de fago e as placas foram a incubar à temperatura ambiente durante a noite. Para controlo deste teste foram preparadas três placas: (A) 150 µL de bactéria e aproximadamente 3 mL de TSA_{0,6 %} e, depois de solidificar, foram adicionados 20 µL de fago; (B) 150 µL de bactéria com 250 µL de revestimento de alginato (sem fago) e aproximadamente 3 mL de TSA_{0,6 %} e (C) 150 µL de bactéria com 250 µL de revestimento de quitosano (sem fago) e aproximadamente 3 mL de TSA_{0,6 %}.

3.3.2. Quantificação do título de fago em revestimentos e filmes

3.3.2.1. *Em revestimentos*

Para a determinação do título do fago presente em revestimentos aplicou-se o método de quantificação de fago acima descrito (em 3.1.3.). As diluições sucessivas foram realizadas a partir de um revestimento contendo fago, diluindo-se em série até à diluição correspondente ao título de fago inicial. Os revestimentos sem fago foram usados como controlo.

3.3.2.2. *Em filmes*

Tal como em revestimentos, o método de quantificação de fago foi semelhante ao descrito anteriormente (3.1.3.). Para a determinação do título do fago em filmes, foi necessário, numa fase prévia dissolver o filme em 15 mL de tampão SM e, posteriormente proceder-se às diluições sucessivas, mais uma vez, até à concentração inicial prevista. O controlo correspondeu a filmes sem fago.

3.3.3. Avaliação da presença de fago

O método aqui descrito não permitiu quantificar o fago presente mas permitiu identificar a presença de fago em filmes após o teste da gota (3.3.1). Sumariamente, utilizou-se um palito para picar o halo de inibição formado por: a) um filme com fago e b) gota de filme com fago dissolvido em tampão SM. Caso este halo seja devido à presença de fago verificar-se-ão placas

fágicas em relvados bacterianos preparados por inclusão (3.1.1) e picotados com a biomassa transferida através do palito e espalhada com tiras de papel estéreis. Os controlos foram realizados com filmes sem fago.

3.4. Caracterização dos revestimentos e filmes com e sem fago

Foram preparados revestimentos com e sem fago. Relativamente aos filmes, foram preparados 3 filmes em placas de 90 mm de diâmetro e 3 filmes em placas de 150 mm de diâmetro (mantendo o valor da concentração de fago constante).

3.4.1. Em revestimentos

3.4.1.1. *Viscosidade*

Para realizar este teste foi necessário preparar amostras de revestimentos, com e sem fago, de 10 mL. Com recurso a um viscosímetro (Model ELV 8 Visco meters, Reino Unido) foram retirados os valores de viscosidade aquando da sua estabilização, para as diferentes velocidades seleccionadas (0,3; 0,6; 1,5; 3; 6; 12; 30 e 60 rpm), com a utilização do *spindle* 6.

3.4.1.2. *Tensão superficial e ângulos de contacto*

Com recurso a um tensiómetro (KRÜSS Force Tensiometer, Alemanha) determinou-se o valor de tensão superficial (γ_u) dos revestimentos a estudar. Para a determinação dos ângulos de contacto recorreu-se a um medidor de ângulos de contacto OCA (OCA 20, Dataphysics, Alemanha). Foram realizadas 10 medições por cada solução a estudar.

Para analisar os coeficientes de espalhamento (W_e), adesão (W_a) e coesão (W_c) dos respetivos revestimentos (equações 2, 3 e 4, respetivamente) foi necessário determinar os ângulos de contacto entre os revestimentos e uma superfície (θ), que, neste caso, se tratou de uma superfície absorvente comumente usada em embalagens de carne (Figura 13) [35].



Figura 13. Película absorvente de embalagens de carne.

$$W_{ei} = \gamma_{Li} \cdot (\cos \theta_i - 1) \quad \text{Equação 2}$$

$$W_{ai} = \gamma_{Li} \cdot (\cos \theta_i + 1) \quad \text{Equação 3}$$

$$W_{ei} = 2 \cdot \gamma_{Li} \quad \text{Equação 4}$$

Além da medição dos ângulos de contacto entre revestimentos e a superfície absorvente, foi necessário, também, determinar os ângulos de contacto entre 3 soluções padrão (água ultra-pura, bromonaftaleno e formamida) e a superfície absorvente, à temperatura ambiente, com o objetivo de avaliar as suas propriedades de superfície (por exemplo: polaridade). A tensão superficial do líquido pode ser separada de acordo com as interações entre as suas moléculas. Tais interações são de dois tipos: polar e dispersiva [35].

Dado um líquido puro, cuja os valores de tensão superficial e contribuições polar (γ_L^p) e dispersivas (γ_L^d) são conhecidos, se θ é o ângulo de contacto entre o líquido e o sólido, a interação pode ser descrita em termos de trabalho de adesão (W_A), de acordo com a equação 5 [35].

$$W_A = W_A^d + W_A^p = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^d + \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^p + \gamma_L^p} \right) = 2 \gamma_L (1 + \cos \theta) \quad \text{Equação 5}$$

Na equação apresentada anteriormente, γ_s^p e γ_s^d , traduzem as contribuições polares e dispersivas da superfície absorvente em estudo. Assim, rearranjando a equação anterior, obtém-se a equação 6 [35].

$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad \text{Equação 6}$$

Os parâmetros, γ_s^p e γ_s^d , são, então determinados pela razão entre $\frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}}$ e $\sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$, em que o γ_s^p traduz o declive e o γ_s^d , a ordenada na origem [35].

3.4.2. Em filmes

3.4.2.1. Espessura

A espessura foi determinada com recurso a um micrómetro (Mitutoyo, Japão) foram retiradas 5 medições, em diferentes pontos, de cada amostra de filme. Posteriormente a média destes valores foi utilizadas para determinar o valor de permeabilidade ao vapor de água bem como, as propriedades mecânicas dos respetivos filmes [36].

3.4.2.2. Cor e opacidade

A cor e opacidade dos filmes foi determinada com recurso a um colorímetro (CR-400/410 CHROMA METER, Konica Minolta, Japão), calibrado com a placa *standard* D65 ($Y = 93.9$; $x = 0.3158$ e $y = 0.3321$), de cor branca. Foram realizadas 5 medições, em diferentes zonas do filme, tendo por base a placa de cor branca. Foram retiradas, também, 5 medições, em diferentes zonas do filme, tendo por base a placa de cor preta.

O parâmetro cor pode ser descrito segundo o código RGB, sendo este determinado com recurso ao programa *Matlab*, através da equação 7 [37]. A opacidade (%) dos filmes foi determinada pela equação 8 [38].

$$\text{lab2rgb}([L \ a \ b], 'OutputType', 'uint8') \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{Opacidade} = \frac{Y \text{ em placa branca}}{Y \text{ em placa preta}} \cdot 100 \quad \text{Equação 8}$$

3.4.2.3. Permeabilidade ao vapor de água

Para a determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP) colocou-se 50 mL de água destilada em copos, sendo estes selados com os filmes. Os copos com a água destilada e os filmes foram, então, colocados num exsicador com sílica (Figura 14) a uma temperatura de 20 °C e com 0 % de humidade relativa (as condições no interior do exsicador consideraram-se constantes) [36].



Figura 14. Sistema laboratorial para a determinação do valor de permeabilidade ao vapor de água.

Para a determinação do valor de permeabilidade (WVP, em g/(h.m.Pa)) foi necessário ter conhecimento da taxa de permeabilidade (WVTR, em g/(h.m²)), a espessura (X_{filme} , em m) e a diferença de pressão (ΔP , em Pa), a 20 °C, uma vez que estes se relacionam, tal como mostra a equação 9 [36].

$$WVP = \frac{WVTR \cdot X_{\text{filme}}}{\Delta P} \quad \text{Equação 9}$$

Para calcular a taxa de permeabilidade (WVTR) foi necessário, primeiramente, relacionar os valores de perda de massa ao longo do tempo, onde se procedeu à sua regressão, obtendo-se o valor do declive (g/L). Pela equação 10, foi, então, possível relacionar o declive com a área de transferência (A_{transf} , em m²) do filme e, assim, obteve-se o valor de WVTR [36].

$$WVTR = \frac{\text{declive}}{A_{\text{transf}}} \quad \text{Equação 10}$$

3.4.2.4. Solubilidade

A solubilidade do filme em água pode ser definida como o conteúdo de matéria seca do filme solubilizado após 24 h de imersão em água. Inicialmente, cortou-se o filme com um diâmetro aproximando de 2 cm, e estes foram colocados dentro de cadinhos, onde se pesou o cadinho mais o filme. De seguida este conjunto foi colocado numa estufa (Termaks, Noruega) a 105 °C num período de 24 horas, procedendo-se, no final, novamente à sua pesagem. Numa fase posterior, colocou-se os filmes secos em copos, com 50 mL de água destilada, selados no topo com *parafilm*. Estes foram colocados em agitação, durante 24 h [36].

O filme que não se dissolveu nas 24 h de agitação em água foi filtrado e reaproveitado a parte não solúvel sendo que esta foi novamente colocada nos respetivos cadinhos para nova pesagem. Por fim, a solubilidade em água foi determinada de acordo com a equação 11 [36].

$$\text{Solubilidade} = \frac{(\text{Massa inicial} - \text{Massa final})}{\text{Massa inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

3.4.2.5. Ângulos de contacto/hidrofobicidade

Para a avaliação da hidrofobicidade do filme, foi necessário avaliar os ângulos de contacto entre uma solução de água ultra-pura e o filme. Para tal recorreu-se ao medidor de ângulos de

contacto OCA (OCA 20, Dataphysics, Alemanha), de onde são retirados 10 medições para cada filme [35].

3.4.2.6. *Propriedades mecânicas*

Foram avaliadas as propriedades mecânicas dos filmes, através da determinação da elongação à quebra e força de tensão, com recurso a um aparelho universal de ensaios (modelo 4500, Instron Corporation, Espanha), seguindo a norma ASTM D 882-91 (ASTM-D-882-91, 1991). Inicialmente, foi fixado uma velocidade de 50 mm/min, tendo as amostras de filmes a seguintes dimensões: 10 cm de comprimento e 2 cm de largura. Para cada amostra, o teste foi efetuado 3 vezes. A força de tensão (Pa) é calculada através da razão entre a carga máxima (N) e a área da secção transversal do filme (largura e espessura, em m²) (equação 12); sendo a elongação, a razão entre o deslocamento (m) e o comprimento do filme (m), sendo esta, expressa em percentagem (equação 13) [36].

$$\text{Força de tensão} = \frac{\text{carga máxima}}{\text{largura} \times X_{\text{filme}}} \quad \text{Equação 12}$$

$$\text{Elongação} = \frac{\text{deslocamento}}{\text{comprimento}} \cdot 100 \quad \text{Equação 13}$$

3.4.2.7. *Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier um parâmetro caracterizado pela determinação dos espectros dos filmes na zona do infravermelho. Estes foram obtidos através de um espectrómetro (16 Perkin-Elmer PC spectrometer, EUA), no modo de reflectância total atenuada entre os 400 e os 4000 cm⁻¹, utilizando 16 varrimentos com uma resolução de 4 cm⁻¹ [36].

3.5. *Análise estatística*

A análise estatística foi efetuada através do teste ANOVA com uma única variável (presença ou ausência de fago), seguida pelo teste de *Tukey* HSD com significância de $p < 0,05$.

Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do *software* STATISTICA versão 10.0 (StatSoft Inc. 2011).

Capítulo 4. Resultados e discussão

4.1. Quantificação do fago de *P. fluorescens* (PF7A)

Após as etapas de propagação e purificação de fago, o fago produzido foi quantificado (Figura 15).

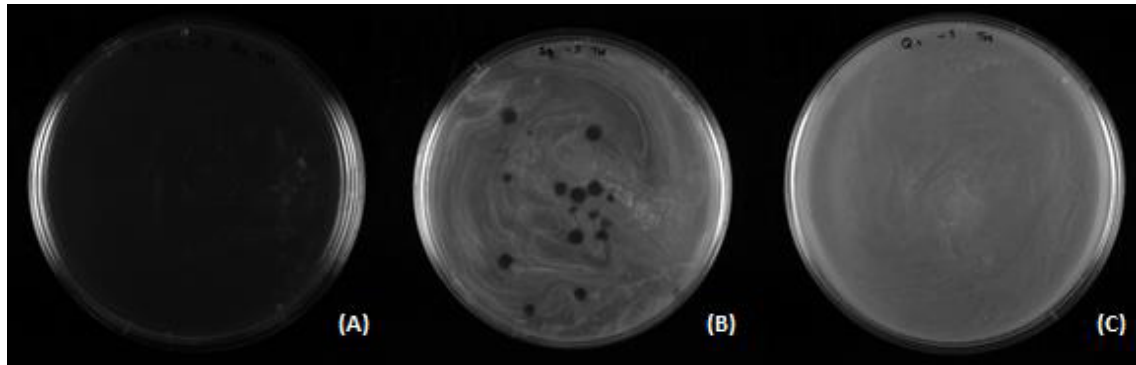


Figura 15. Placas de petri com diferentes diluições de fago. A) placa de petri onde se plaqueou uma concentração elevada de fago e que resultou na lise completa do hospedeiro, B) placa de petri com relvado bacteriano em que são visíveis placas fágicas, C) placa de petri em que a diluição de fago plaqueada já não continha fago.

A produção de fago resultou numa concentração elevada de fago na ordem dos 10×10^{13} PFU/mL.

4.2. Estudo da viabilidade do fago em revestimentos e filmes

4.2.1. Teste da gota

Numa análise preliminar foi avaliada a possibilidade dos revestimentos produzidos poderem inviabilizar o fago. Pela análise da figura 16 é possível verificar que há formação de um halo de inibição resultante da lise da bactéria devido à presença do fago nas análises dos revestimentos de alginato e quitosano contendo fago. Assim, conclui-se, pela análise, que as soluções de revestimentos propostas não inviabilizam o fago.

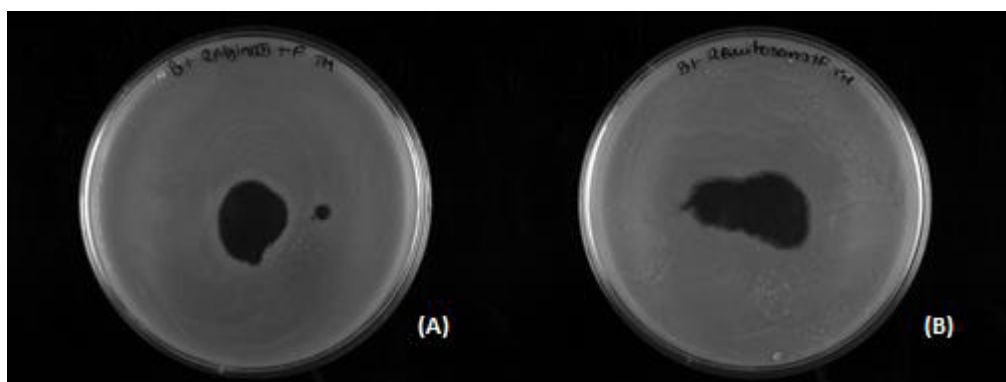


Figura 16. Teste da gota para revestimento de alginato (A) e para revestimento de quitosano (B).

Os controles para este teste (Figura 17), provam que a lise da bactéria apresentada na figura 16, advém da presença de fago, uma vez que a presença de revestimentos em bactéria não provoca nenhuma lise bacteriana.

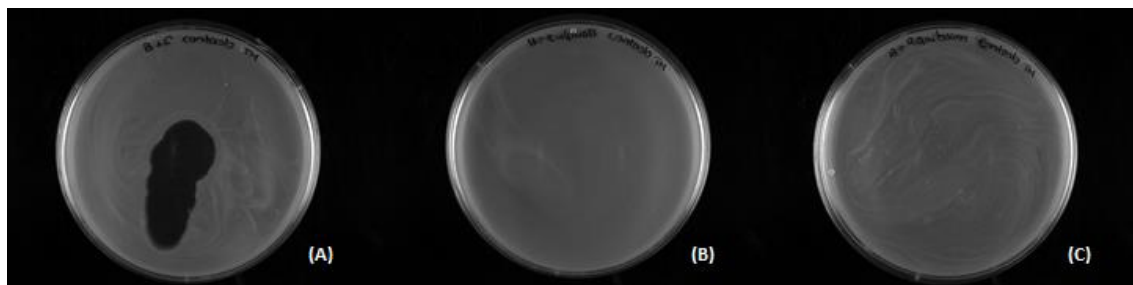


Figura 17. Controle do teste da gota. (A) Lise bacteriana provocada pela gota de fago; (B) ausência de lise bacteriana provocada pelo revestimento de alginato e (C) ausência de lise bacteriana provocada pelo revestimento de quitosano.

4.2.2. Quantificação do título de fago em revestimentos e filmes

4.2.2.1. Em revestimentos

Para determinar a possibilidade dos revestimentos afetarem a viabilidade do fago foi determinado o seu título ao longo do tempo. Inicialmente foram adicionados 20 μ L de fago ($13,3 \times 10^9$ PFU/mL ao revestimento, o que corresponde, a um título de fago de aproximadamente 2×10^7 PFU/mL de revestimento.

Após a aplicação do método de quantificação de fago, para cada um dos revestimentos, pode verificar-se que para a solução contendo alginato (figura 18A) o fago apresenta um título de $1,8 \times 10^7$ PFU/mL, ou seja, o polímero não inviabiliza o fago, uma vez que o valor é muito próximo do título inicial (2×10^7 PFU/mL). Relativamente, à solução contendo quitosano, pode verificar-se (figura 18B) que não é possível quantificar o fago existente, uma vez que não há formação de placas fágicas, podendo concluir-se que a solução de revestimento composto por quitosano inviabiliza o fago.

Após a verificação da perda de título de fago, testou-se se a solução de ácido láctico (1 %), componente presente na formulação de quitosano, uma vez que este poderia influenciar a viabilidade de fago (Figura 18C).

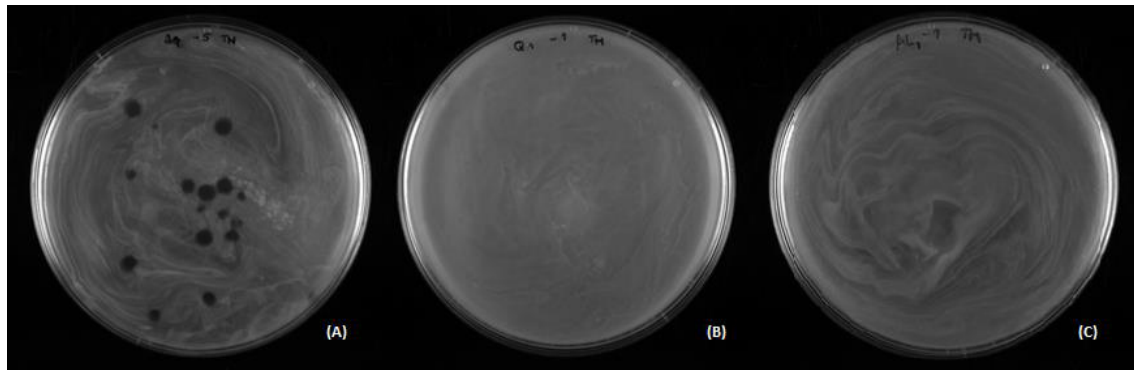


Figura 18. Quantificação de fago em revestimento de (A) alginato, (B) quitosano e numa (C) solução de ácido láctico a 1% com uma concentração inicial de fagos de 2×10^7 PFU/mL.

De acordo com o estudo feito, pode verificar-se que também aqui o fago perdeu viabilidade quanto estava presente na solução de ácido láctico. Este fator, aliado ao baixo pH da solução ($\text{pH} = 4$), um valor que não permite a sobrevivência do fago, faz com que não seja possível utilizar as soluções de quitosano como revestimento para incorporação de fagos. Este facto já havia sido reportado por Amorim *et al.* (2014) que demonstrou que o quitosano, por ser um polímero carregado positivamente, inibiu o fago estudado (fago 933W para *E.coli* C600 – estirpe não patogénica) através de interações electrostáticas com as cargas negativas da cápside [39].

Nesta etapa do processo foi efetuado um controlo, ou seja, a realização do presente método para revestimentos sem fago, e para a solução de ácido láctico a 1 % e, tal como previsto, dada a ausência de fago, não foi detetada, em nenhuma das placas, lise bacteriana (Figura 19).

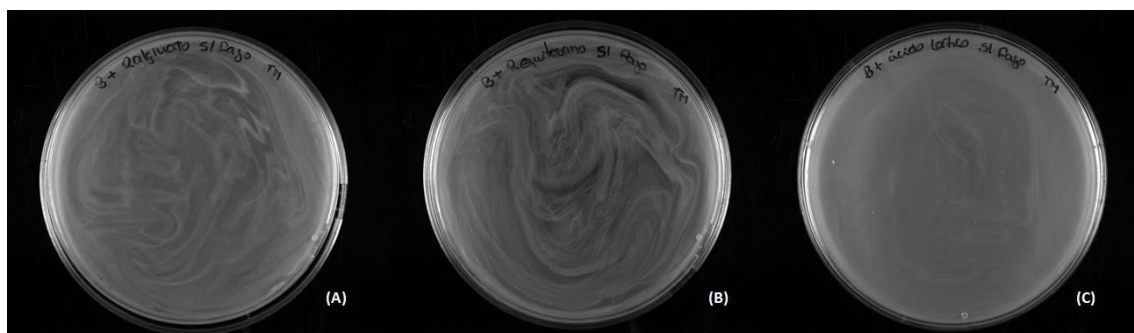


Figura 19. Controlo do teste de quantificação de fagos em revestimento de alginato (A), de quitosano (B) e em solução de ácido láctico a 1% (C) em soluções sem fago.

4.2.2.2. Em filmes

Os filmes foram obtidos a partir da secagem das soluções referidas no ponto anterior (4.2.2.1.).

Após a aplicação do método de quantificação verificou-se, novamente, um resultado negativo para filmes contendo quitosano, em que, à semelhança dos revestimentos de quitosano, resultaram na inviabilização do fago (Figura 20A). No entanto, verificou-se também que para os filmes de alginato não se detetou a existência de placas fágicas (Figura 20B). Isto poderá dever-se ao facto de, ao ressuspender o filme em tampão SM, se obter uma solução com elevada viscosidade o que pode não permitir a uniformização do fago pela solução, e daí os resultados serem inconclusivos.

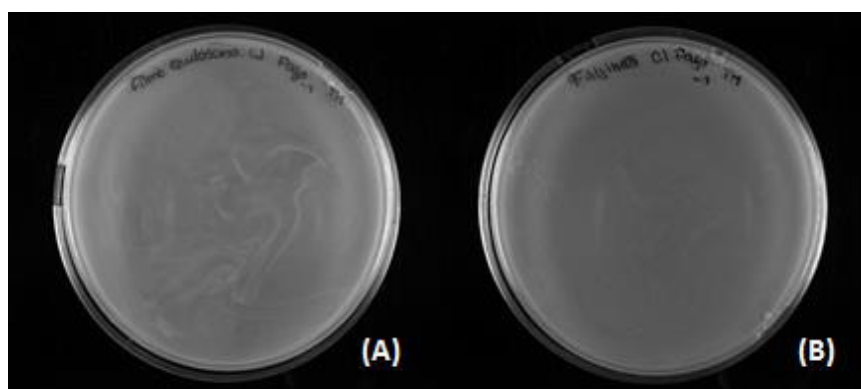


Figura 20. Quantificação de fago em filmes de quitosano (A) e alginato (B) com uma concentração inicial de fagos de 2×10^7 PFU/mL.

Foi efetuado um controlo, ou seja, a realização do presente método para filmes sem fago, (Figura 21) onde, é possível verificar que os resultados vão de acordo ao esperado, ou seja, que não há manifestação da presença de fago.

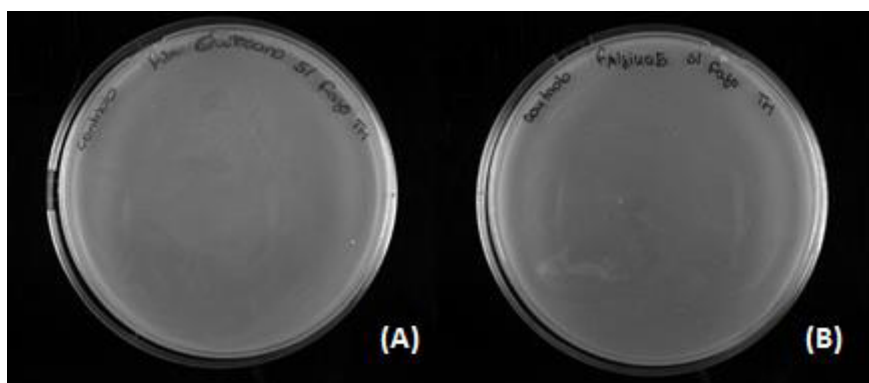


Figura 21. Controlo do teste de quantificação de fagos em filmes de quitosano (A) e de alginato (B) sem fago.

4.2.3. Avaliação da presença de fago

O objetivo desta avaliação foi verificar se efetivamente há perda de fago com a obtenção do filme de alginato ou se a dificuldade de quantificar o fago advém, efetivamente do facto de a solução (filme ressuspensionado em tampão SM) ser demasiado viscosa, não permitindo a uniformização do fago.

Assim, após a colocação dos filmes com e sem fago em placas com o hospedeiro e cobertas de TSA *top agar*, pode-se verificar pela figura 22A), a formação de um halo de inibição em torno dos pedaços de filme com fago, o que não aconteceu para os filmes sem fago (Figura 22B).

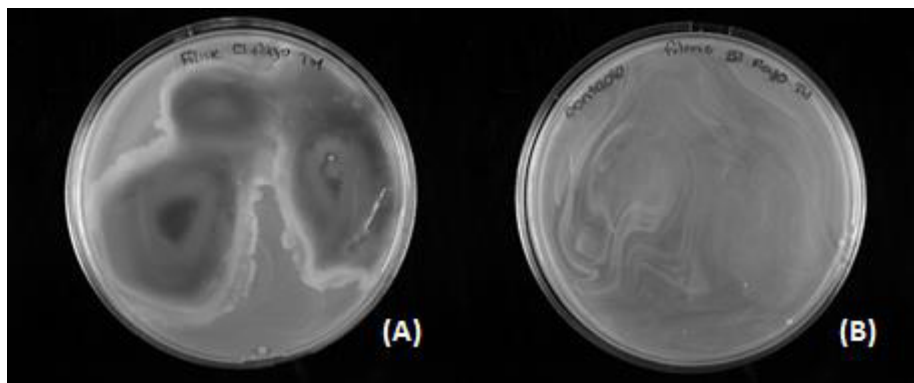


Figura 22. Halos de inibição criados pelos filmes de alginato com fago (A) e sem fago (B).

Foram, igualmente colocadas, gotas de 50 μ L de filme de alginato ressuspensionado em tampão SM (filme com e sem fago), em placas previamente preparadas com um relvado bacteriano e camada de TSA *top agar*. Pela figura 23A, é possível verificar que nas placas com gotas que continham fago, surge um halo de inibição, por outro lado, na placa em que as gotas não continham fago, não houve formação de nenhum halo (figura 23B).

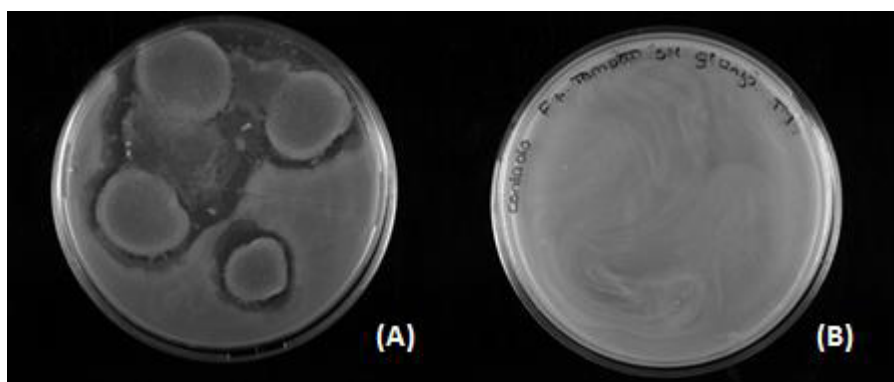


Figura 23. Halos de inibição criados pelas gotas de filmes de alginato ressuspensionado em tampão SM (B), com fago (A) e sem fago (B).

As figuras 22A e 23A, mostram a formação de halos de inibição criado por filme com fago e por gotas de filmes com fago ressuspensos em tampão SM, respectivamente. De forma a perceber se os halos de inibição criados, têm origem na presença de fago, estes foram picados e as respectivas transferências e espalhamentos em placas contendo bactéria foram avaliadas. Assim, pela análise da figura 24, é possível concluir que em ambos os casos há presença de fago uma vez que as ambas as placas apresentam lise bacteriana.

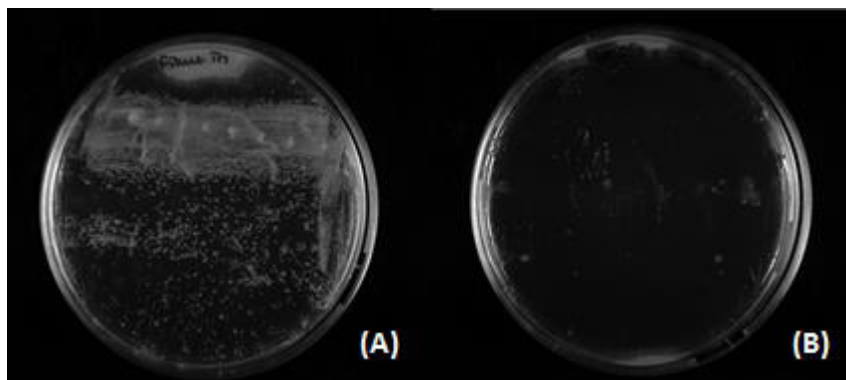


Figura 24. Presença de fago no halo de inibição criado pelo filme de alginato (A) e no halo de inibição criado pela gota de filme de alginato ressuspensionado em tampão SM (B).

Concluiu-se, então, que é possível utilizar revestimentos e filmes de alginato para a incorporação de fagos uma vez que estes se encontram viáveis ao longo do processo. Para o caso do quitosano, é possível afirmar que não é possível a sua utilização para incorporação do fago uma vez que há perda total de fago após o contacto deste com a formulação de quitosano.

4.3. Caracterização dos revestimentos e filmes com e sem fago

Com o objetivo de avaliar o efeito dos fagos nas características em revestimentos e filmes foram realizados testes que permitiram avaliar: a) o uso de revestimento com fagos numa película absorvente usada em embalagens cárneas e b) o efeito dos fagos nas propriedades físico-químicas de filmes.

4.3.1. Revestimentos

4.3.1.1. Viscosidade

Para analisar a viscosidade dos revestimentos obtidos, recorreu-se a um viscosímetro de onde foram obtidos valores de viscosidade para diferentes velocidades de rotação do *spindle* escolhido (0.3, 0.6, 1.5, 3, 12 e 15 rpm). Após a análise dos dados obtidos (Anexo A, Tabela

A.A1.1..), foram construídas as curvas de viscosidade de ambos os filmes em função do *shear rate*, figura 25. O *shear rate* é a razão entre a velocidade e a distância entre dois pontos, sendo a unidade s^{-1} e, este é obtido pela multiplicação do factor *shear rate* (fator dado pelo aparelho) pelas velocidades de rotação.

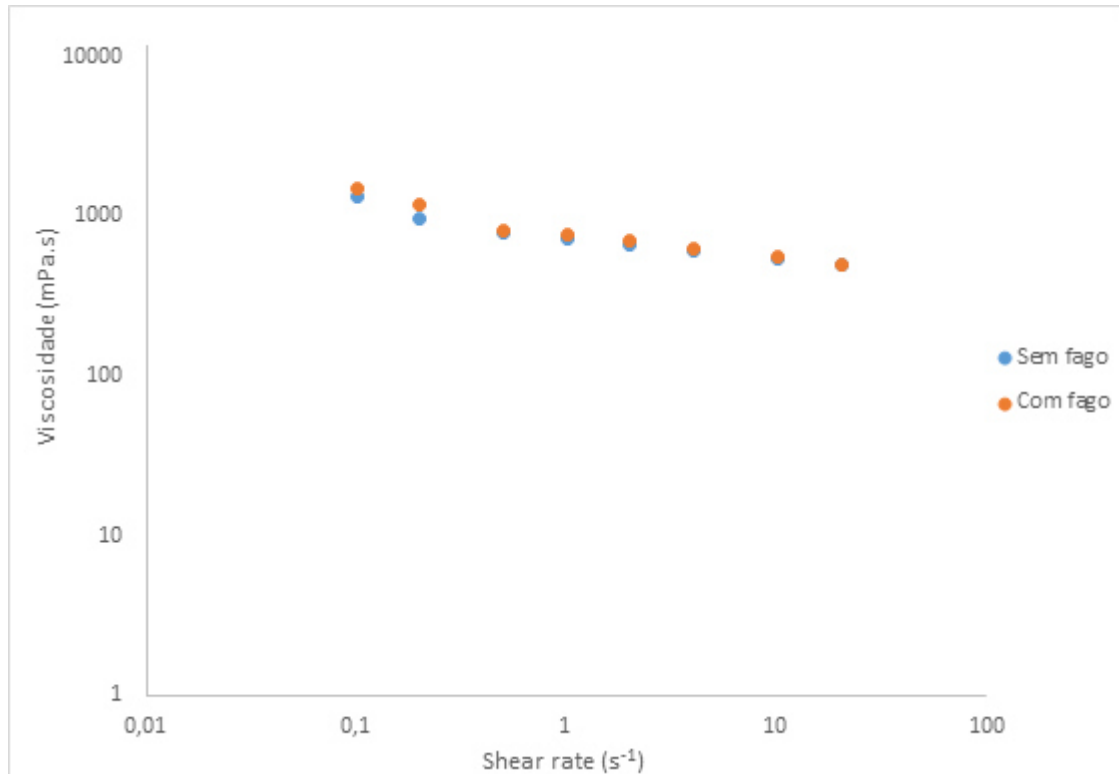


Figura 25. Viscosidade (mPa.s) em função do shear rate (s^{-1}) para filmes com e sem fago.

Pela observação das curvas de viscosidade em função do *shear rate* é possível concluir que estas têm o mesmo comportamento, sendo estas semelhantes. Pela análise estatística dos dados obtidos é possível concluir que a presença de fago não influencia o valor de viscosidade (teste *Tukey*HSD, $p < 0.05$).

4.3.1.2. Tensão superficial e ângulos de contacto

Um dos parâmetros para obter os coeficientes de espalhamento, adesão e coesão é a tensão superficial dos revestimentos. Assim, para revestimentos sem fago obteve-se $55,5 \pm 0,9$ mN/m e, para revestimentos com fago o valor obtido é de $54,5 \pm 0,9$ mN/m. Pode-se verificar que os valores obtidos não apresentam uma diferença significativa, o que permite concluir que a presença do fago não influencia a tensão superficial do revestimento.

De forma a avaliar a possibilidade de aplicar o revestimento na película absorvente foi realizada a medição dos ângulos de contacto entre os revestimentos (com e sem fago) e a película absorvente. Esta avaliação é pertinente para a determinação dos coeficientes já mencionados e para avaliar como poderá ser aplicação dos revestimentos com fagos neste tipo de superfície. Após a análise dos dados recolhidos (Anexo A, Tabela A.A2.2.), os valores médios determinados para revestimentos com e sem fago foram, $88,86 \pm 5,59^\circ$ e $84,38 \pm 4,90^\circ$, respetivamente. Estatisticamente, os valores obtidos para revestimento com e sem alginato não apresentam uma diferença significativa (desvio padrão corresponde a 10 réplicas; teste *Tukey*HSD, $p < 0.05$).

Assim, através das equações 2; 3 e 4 (em 3.4.1.2.) calculou-se os respetivos coeficientes, apresentando-se estes na tabela 1.

Tabela 1. Coeficientes de espalhamento, adesão e coesão para revestimentos com e sem fago na película absorvente.

Revestimento de alginato	Coeficiente de espalhamento, W_{ei} (mN/m)	Coeficiente de adesão, W_{ai} (mN/m)	Coeficiente de coesão, W_{ci} (mN/m)
Sem fago	-50,06	60,94	111
Com fago	-53,42	55,58	109

É possível estimar o carácter hidrofóbico ou hidrofílico de superfícies a partir das componentes da tensão superficial. Para ser possível a determinação das três componentes da tensão superficial da superfície foi necessário determinar, na superfície escolhida, os ângulos de contacto formados por três líquidos de polaridade diferentes, sendo um deles apolar. Assim, os líquidos utilizados para efetuar as medições dos ângulos de contacto com a superfície foram o bromonaftaleno (apolar), água ultra-pura e formamida (polares).

Através da equação 6 (em 3.4.1.2.) foi possível determinar os parâmetros, γ_s^p e γ_s^d , através de uma relação linear de $\frac{1+\cos\theta}{2} \cdot \frac{\gamma_l}{\sqrt{\gamma_l^d}}$ em função de $\sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}}$, em que o γ_s^p traduz o declive e o γ_s^d , a ordenada na origem. Para estabelecer esta relação recorreu-se a valores teóricos de γ_l , γ_l^d e γ_l^p para cada uma das soluções em estudo (tabela 2). Os valores de $\cos\theta$ foram medidos em radianos e, estes, referem-se aos ângulos de contacto de cada uma das soluções em estudo (Anexo A, tabela A.A2.1.).

Tabela 2. Valores teóricos das componentes de tensão superficial de γ_L , γ_L^d e γ_L^p para água, bromonaftaleno e formamida (adaptado de [35]).

Solução	γ_L (mN/m)	γ_L^d (mN/m)	γ_L^p (mN/m)
Água	72,1	19,9	52,2
Bromonaftaleno	44,4	44,4	0
Formamida	56,9	23,5	33,4

Assim, após traçar a relação linear descrita anteriormente obteve-se o gráfico apresentado na figura 26.

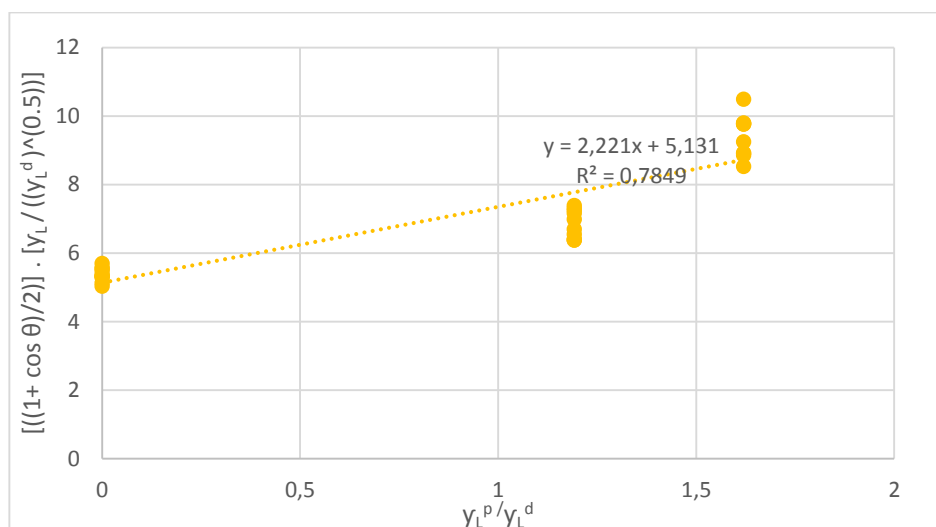


Figura 26. Zisman plot para a película absorvente.

Após a análise do valor de declive e ordenada na origem da equação da linha de tendência e, aplicando à equação é possível afirmar que os valores de γ_s^p e γ_s^d são, respetivamente, 4,93 e 26,33. Na prática estes valores significam que a tensão superficial da película absorvente (γ_s) é de 31,26 mN/m com contribuições polares e de dispersão de 4,93 mN/m e 26,3 mN/m, respetivamente.

4.3.2. Filmes

4.3.2.1. Espessura

A espessura é um dos parâmetros necessários para caracterizar os filmes, sendo pertinente para a determinação do valor da permeabilidade ao vapor de água bem como, das propriedades mecânicas destes.

Para a sua determinação é necessário retirar valores de espessura de 5 pontos de cada filme (Anexo B, Tabela B.B1.1.). Os valores médios obtidos para filmes com e sem fago são,

respetivamente, $0,048 \pm 0,015$ mm e $0,051 \pm 0,013$ mm. Os valores obtidos não estatisticamente diferentes, pelo que se pode concluir que a presença de fago não influencia a espessura.

4.3.2.2. Cor e opacidade

Para avaliar a cor dos filmes obtidos, foram recolhidos, através de um colorímetro, valores de 3 pontos distintos do mesmo filme (Anexo B, Tabela B.B2.1) sendo apresentado na tabela 3, os valores médios das coordenadas obtidas.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de cor (desvio padrão corresponde a 9 réplicas; teste Tukey HSD, $p < 0.05$).

Filmes	Y_{branco}	Y_{preto}	L^*	a^*	b^*
Sem fago	$84,91 \pm 2,67^a$	$6,70 \pm 1,34^b$	$93,79 \pm 1,14^c$	$-0,26 \pm 0,17^d$	$9,34 \pm 2,38^e$
Com fago	$86,44 \pm 2,74^a$	$7,64 \pm 1,81^b$	$94,49 \pm 1,17^c$	$-0,24 \pm 0,14^d$	$8,26 \pm 1,83^e$

Pela análise dos dados apresentados na tabela 3 é possível concluir que estatisticamente a presença de fago não influencia nenhum dos parâmetros apresentados determinados pelo colorímetro (letras iguais, numa mesma coluna, significam conformidade dos valores para a variável em estudo, presença ou ausência de fago).

L^* , a^* e b^* representam as coordenadas no espaço de cor sendo, respetivamente, a coordenada de brilho (*lightness*), coordenada vermelho/verde e, coordenada azul/amarelo. Para valores positivos de a^* considera-se a presença de tons vermelhos e tons verdes para valores negativos. Em relação à coordenada b^* , considera-se a presença de tons amarelos para valores positivos e tons azuis para valores negativos. Assim, pode afirmar-se que para os dois tipos de filmes há uma predominância de tons verdes e amarelos uma vez que se verifica, para todos os pontos respetivos, valores negativos de a^* e positivos de b^* .

Para melhor perceção da cor dos filmes, converteu-se as coordenadas L^* , a^* e b^* em código RGB (*Red, Green e Blue*), através da equação 7 (3.4.2.2.), do Matlab 2015. Posteriormente, converteu-se o código RGB em *Color Hex*. Os valores obtidos para o código RGB, bem como os *Color Hex* encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. Código RGB e Color Hex para filmes com e sem fago.

Filme	R	G	B	Color Hex
Sem fago	244	237	219	#F4EDDB
Com fago	246	239	223	#F6EFDf

Cada código de *Color Hex* encontra-se associado a uma cor, na figura 27, seguintes encontram-se as cores associadas a cada um destes filmes, sem fago (A) e com fago (B).

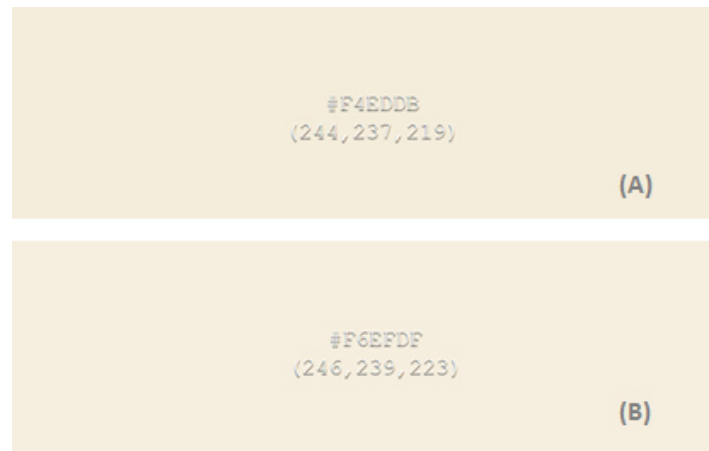


Figura 27. Exemplo de cor para filmes com e sem fago, obtidos pelo Color Hex.

Para a determinação da opacidade, em percentagem, dos filmes recorreu-se à equação 8 (3.4.2.2.). Para filmes sem fago a opacidade determinada foi de $7,89 \pm 0,02$ % e na presença de fago foi de $8,84 \pm 0,02$ %. Após a análise estatística é possível afirmar que os valores são estatisticamente iguais pelo que o fago não influencia este parâmetro.

De modo a perceber melhor a opacidade dos filmes em questão, apresenta-se, na figura 28, uma mesma superfície com e sem os filmes obtidos.



Figura 28. Logótipo CEB (*Centre of Biological Engineering*) sem filme (A); filme sem fago sobreposto ao logótipo CEB (B) e filme com fago sobreposto ao logótipo CEB.

4.3.2.3. Permeabilidade ao vapor de água

Após a análise dos dados obtidos (Anexo B, Tabelas B.B3.1. e B.B3.2.) é possível obter gráfico (Anexo B, Figura B.B3.1) onde é relacionada a taxa de perda de massa ao longo do tempo, determinando assim o declive de cada curva (Anexo B, Tabela B.B3.3.).

Através da equação 10 (3.4.2.3.), determinou-se a taxa de permeabilidade ao vapor de água (WVTR). Este valor é, então, pertinente para calcular o valor de permeabilidade ao vapor de água (WVP) de cada filme, que é calculado através da equação 9 (3.4.2.3.) Os valores médios determinados (Anexo B, Tabela B.B3.4.) de permeabilidade ao vapor de água para os filmes com e sem fago são, respetivamente, $2,64 \pm 0,16 \times 10^{-7}$ g/ (h.m.Pa) e $2,81 \pm 0,31 \times 10^{-7}$ g/(h.m.Pa). De acordo com a análise estatística, a presença de fago não influencia significativamente este parâmetro (desvio padrão corresponde a 3 réplicas; teste *Tukey*HSD, $p < 0.05$).

4.3.2.4. Solubilidade

Tal como explicando anteriormente, foi calculado o peso seco dos filmes (Anexo B, Tabela B.B4.1.), mas o procedimento descrito foi interrompido uma vez que os filmes se dissolveram ao final de 1 minuto. Conclui-se, então, que o facto de os filmes se dissolverem rapidamente favorece o processo de conserva da carne. Quando o filme se encontra em contato com os líquidos libertados pela carne este vai dissolver-se, libertando, assim, o fago presente atuando, este, sobre o hospedeiro em causa.

4.3.2.5. Ângulos de contacto/hidrofobicidade

De modo a perceber a hidrofobicidade dos filmes produzidos (com e sem fago) foi determinados os ângulos de contacto entre uma solução de água ultra-pura e os filmes. Para cada filme foram recolhidas 10 medições (Anexo B, Tabela B.B5.1.). O valor médio dos ângulos de contacto da água com a superfície sem fago é de $101,29 \pm 3,44^{\circ}$ e, para superfícies com fago é $101,52 \pm 3,25^{\circ}$. É possível afirmar que a presença de fago também não influencia este parâmetro ($p > 0.05$). Relativamente à hidrofobicidade dos filmes obtidos, quando os ângulos de contacto entre a água e estes, apresentam valores inferiores a 90° são considerados hidrofílicos, quando superiores a 90° são considerados hidrofóbicos. Assim, conclui-se que os filmes produzidos são hidrofóbicos.

4.3.2.6. *Propriedades mecânicas*

A força de tensão traduz a capacidade de um filme resistir a uma força até quebrar e, a elongação de um filme é a percentagem de aumento do comprimento do filme antes da sua quebra, devido à tensão aplicada neste.

Após a análise dos dados obtidos (Anexo B, Figuras B.B6.1. a B.B6.6.), obteve-se os valores médios carga máxima e deslocamento associados a cada filme.

Aplicando as equações 12 e 13 (3.4.2.6.) obteve-se os valores de força de tensão e elongação dos filmes com e sem fago. Os valores médios dos parâmetros mencionados apresentam-se na tabela 5 (desvio padrão corresponde a 9 réplicas; teste Tukey HSD, $p < 0.05$).

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros das propriedades mecânicas (desvio padrão corresponde a 9 réplicas; teste Tukey HSD, $p < 0.05$).

Filme	Força de tensão (MPa)	Elongação (%)
Sem fago	13,139 $\pm$ 5,812 ^a	4,323 $\pm$ 1,939 ^b
Com fago	12,572 $\pm$ 3,241 ^a	3,071 $\pm$ 0,954 ^b

De acordo com a análise estatística, a presença de fago não varia significativamente nas propriedades mecânicas dos filmes (letras iguais, numa mesma coluna, significam conformidade dos valores para a variável em estudo, presença ou ausência de fago).

4.3.2.7. *Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier*

Para a avaliar a espectroscopia por infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) foi necessário proceder à determinação dos espectros dos filmes, com e sem fago, na zona do infravermelho no modo de reflectância total atenuada. Na figura 14, apresentam-se os respetivos espectros para os filmes estudados, com a identificação das zonas de interesse.

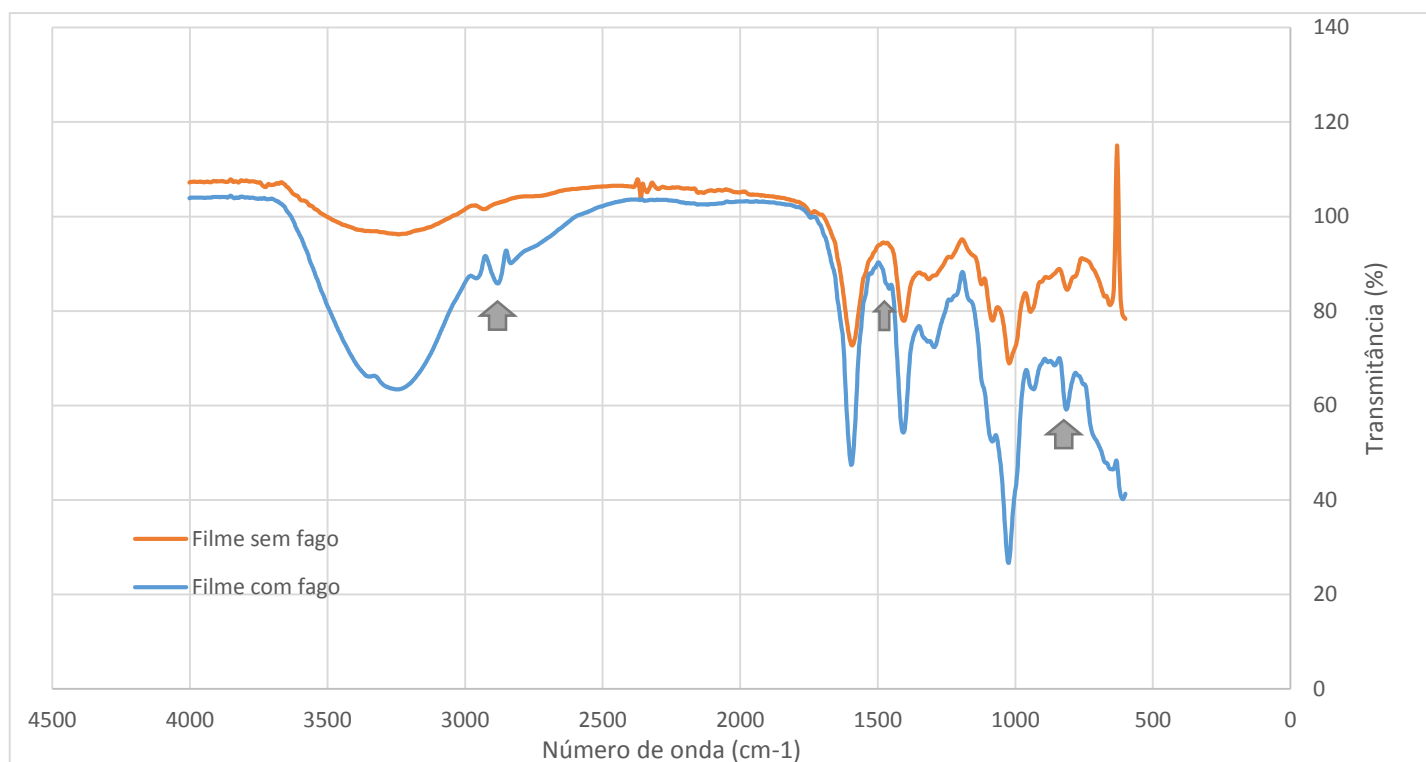


Figura 29. Espectros obtidos para filmes com e sem fago.

As zonas de interesse são, respetivamente $2881,13\text{ cm}^{-1}$, $1457,92\text{ cm}^{-1}$ e $630,61\text{ cm}^{-1}$. Estas foram escolhidas com base no espectro do filme com fago, que comparado ao filme sem fago apresenta um decréscimo acentuado nas zonas em questão, o que pode ser explicado pela presença de fago na matriz de filme do alginato. Estes valores são característicos de um espectro de um fago M13, assim como, referenciado, em outros trabalhos [40].

Para perceber se o espectro obtido para o filme sem fago se encontra de acordo com o esperado, comparou-se o espectro obtido com outro espectro de alginato já reportado [41] concluindo-se que estes se encontram em concordância

Assim conclui-se que neste processo de obtenção de revestimentos/filmes, para o alginato, não há perda de fago, tal como já concluído em 4.2.3.

Capítulo 5. Conclusões gerais e recomendações futuras

No presente trabalho foi estudado a possibilidade de incorporação do fago (PF7A) em duas matrizes, sendo a primeira constituída por 1,5% de alginato e 0,5% de glicerol e, a segunda por 1,5% de quitosano e 0,5% de glicerol preparado em uma solução de 1% de ácido láctico, para a formação de revestimentos e filmes com finalidade de aplicação numa película absorvente comumente utilizada em embalagens, uma vez que as *Pseudomonas fluorescens* encontram-se associadas à deterioração de carnes.

Foi avaliada a possibilidade de os revestimentos e filmes, na sua composição, inibirem o fago. Após os testes de viabilidade do processo verificou-se que este é possível quando se incorpora o fago em alginato enquanto para o quitosano o processo não apresenta viabilidade. O resultado negativo é justificado pelo baixo pH da solução de quitosano obtida e pelas interações electroestáticas do polímero carregado positivamente com as cargas negativas da capsíde do fago.

Para revestimentos foi avaliada a viscosidade e a tensão superficial bem como os coeficientes de adesão, coesão e espalhamento dos revestimentos na superfície. Para os filmes foi determinada a espessura, os parâmetros de cor e opacidade, hidrofobicidade, as propriedades mecânica e de transporte, assim como, a espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier. Estes parâmetros foram realizados de modo a perceber se a presença de fago influenciava de alguma maneira os mesmos. Assim, foi possível concluir, que além do processo ser possível para a matriz de alginato, o fago não influenciou nenhum dos parâmetros estudados.

É importante salientar que os filmes obtidos, apresentaram uma rápida solubilidade em água, o que se pode concluir que ao formar filme na película absorvente da carne, o filme vai ter uma rápida dissolução aquando do contacto com os líquidos libertados pelo alimento, o que provoca a libertação do fago, atuando, este, sobre as possíveis bactérias que contenha.

No presente trabalho não foi possível aplicar diretamente os revestimentos e filmes no alimento, pelo que se entende que seria pertinente, avaliar, na prática, a interação dos revestimentos e filmes obtidos na carne, de modo a perceber a aplicabilidade do processo e verificar como estes interagem com a carne.

Uma vez que a escolha do polímero a utilizar é dependente do tipo de alimento em estudo, propõe-se o estudo de um processo semelhante com outros polímeros, aprovados em legislação, que tenham viabilidade para ser aplicados. Do mesmo modo, a escolha de um fago diferente, ou seja, alternativas a outras bactérias que possam estar presentes noutros alimentos.

Bibliografia

1. Sillankorva, Sanna M; Oliveira, Hugo e Azeredo, Joana (2012). *Bacteriophages and Their Role in Food Safety. International Journal of Microbiology* [online], artigo 863945. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/863945/> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).
2. Robbert, Terhaar H. e Leigh, Hanna. *Bacteriophage coated food products* (2014). Disponível em: <http://www.google.com/patents/WO2014018327A1?cl=en> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).
3. Pinheiro, A. C., et al. *Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares*. Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/16725> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).
4. Godinho, Adriana Carneiro Mira (2014). *Revestimentos comestíveis bioativos com extrato de carqueja: Aplicação na aplicação pós-colheita da cereja*. Tese de mestrado. Instituto superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Disponível em: https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/7824?locale=pt_PT (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).
5. Decreto-Lei nº62/2008 de 1 de Agosto. *Diário da República, 1ª série, nº63*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento e das Pescas, Lisboa.
6. Cerqueira, Miguel (2010). *Development and Characterization of Edible Coatings to the Preservation of Cheese Quality*. Tese de doutoramento. Universidade do Minho. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/12378> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).
7. Cerqueira, Miguel (2013/2014). *Filmes e revestimentos edíveis para alimentos*. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.
8. Azeredo, Henriette Monteiro, et al (2001). *Filmes Comestíveis de Alginato e Goma de Cajueiro*. Fortaleza, Brasil. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42116/1/COT11005.pdf> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).
9. Turbiani, Franciele Rezende Barbosa e Kieckbusch, Theo Guenter (2011). *Propriedades mecânicas e de barreira de filmes de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio e/ou cloreto de cálcio. Brazilian Journal of food Technology*, v. 14, n. 2, pp. 82-90. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v14n2448a.pdf> (consultado em: 20 de Setembro de 2015).
10. Müller, José Miguel; Santos, Renata Lopes e Brigido, Rivelí Vieira (2011). *Produção de Alginato por Microrganismos. Polímeros*, vol.21, n.4, pp. 305-310. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282011000400011&script=sci_abstract&tlng=pt (consultado em: 20 de Setembro de 2015).

11. Amaral, Sofia Maria Lenhas. *Revestimento comestível para pêra "rocha" minimamente processada* (2010). Tese de mestrado, Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Disponível em: <http://repositorio.ipv.pt/handle/123456789/1257> (consultado em: 14 de Setembro de 2015).
12. Barros, Maria Catarina Gomes. *Revestimentos Funcionais de Base Quitosano: Desenvolvimento de Aplicações para a Indústria do Calçado* (2008). Tese de mestrado, Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/1930> (consultado em: 23 de Março de 2015).
13. Fonseca, João Paulo Caria Gerald Queiroz (2012). *Revestimentos comestíveis à base de quitosano e cera de abelha: aplicação na conservação da uva de mesa*. Tese de mestrado, Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5335/1/TESE%20DE%20MESTRADO_JoaoFonseca_vsr_Definitiva.pdf (consultado em: 23 de Março de 2015).
14. Rinaudo, Marguerite (2006). *Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science*, Volume 31, edição 7, pp 603–632.
15. Cordeiro, Cláudia Maria dos Santos (2010). *Desenvolvimento de filmes bioactivos a partir do quitosano*. Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/3141> (consultado em: 23 de Março de 2015).
16. Velásquez, Cristóbal Lárez (2006). *Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro*. Universidad de Los Andes. Venezuela. Disponível em: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/18309/2/divulg-1-2-2006.pdf> (consultado em: 23 de Março de 2015).
17. Rodrigues, Elodie Gonçalves (2008). *Valorização do Glicerol por Oxidação Catalítica*. Tese de mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/59689/2/Texto%20integral.pdf> (consultado em: 18 de Junho de 2015).
18. Chávez, Juan Daniel Rivaldi (2008). *Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado a produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos*. Tese de mestrado, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-03102012-114021/pt-br.php> (consultado em: 18 de Junho de 2015).
19. Umpierre, Alexandre P. e Machado, Fabricio (2012). *Gliceroquímica e Valorização do Glicerol. Revista virtual de química*, v. 5 (1), pp 106-116. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/368/286> (consultado em: 18 de Junho 2015).
20. Capellari, Jaqueline Boldt (2010). *Biossíntese de ácido láctico por Lactobacillus amylovorus a partir de resíduos agroindustriais*. Tese de mestrado, Universidade da Região de Joinville. Disponível em: http://univille.edu.br/community/mestrado_ep/VirtualDisk.html?action=downloadFile&file=Disse

rtacao_Jaqueline_Boldt_Capellari.pdf¤t=%2FDissertacoes_Turma_III (consultado em: 21 de Junho de 2015).

21. [Online] http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Microbiol/eqb353_aula_16.pdf (Consultado em: 5 de Outubro de 2015)

22. Botrel, Diego Alvarenga , et al. (2010). *Revestimento ativo de amido na conservação pós-colheita de pera Williams minimamente processada. Ciência rural*, vol.40 n.8. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782010000800023&script=sci_arttext (consultado em: 23 de Setembro de 2015).

23. [Online] <http://www.quali.pt/aditivos-alimentares/497-lista-outros-aditivos> (consultado em: 4 de Outubro de 2015)

24. Abedon, S. T (2008). *Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*.

25. Santos, Silvio B., et al (2009). *The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. BMC Microbiology*, 9:148. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/148/> (consultado em: 3 de Março de 2015).

26. [Online] <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/bact7-1.GIF> (consultado em: 5 de Outubro de 2015).

27. Sillankorva, Sanna (2004). *Utilização de Bacteriófagos no Controlo de Células Suspensas e Biofilmes de Pseudomonas fluorescens*. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Braga, Portugal. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/574> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).

28. Microbiologia e Imunologia On-line. [Online] http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_7_bp.htm (consultado em: 16 de Fevereiro de 2015).

29. Pinto, Graça (2011). *Implementação de um método expedito na classificação de Bacteriófagos usando o MALDI-TOF*. Projeto em Engenharia Biológica, Universidade do Minho.

30. Saez, Anthea C., et al (Dezembro 2011). *Direct Feeding of Microencapsulated Bacteriophages to Reduce Salmonella Colonization in Pigs. Foodborne Pathogens and Disease*, 8(12): 1269-1274. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2011.0905> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).

31. Ma, Yongsheng, et al (2008). *Microencapsulation of Bacteriophage Felix O1 into Chitosan-Alginate Microspheres for Oral Delivery. American Society For Microbiology*, vol. 74 n. 15. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/74/15/4799.short> (consultado em: 22 de Fevereiro de 2015).

32. [Online] <http://link.springer.com/article/10.1186%2F1472-6750-8-79#page-1> (consultado em: 5 Outubro de Outubro de 2015).
33. Marques, Maria Salomé (2004). *Monitorização de biofilmes de Pseudomonas fluorescens*. Tese de Mestrado, Universidade do Minho. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/576> (consultado em: 22 de Setembro de 2015).
34. [Online] http://web.mst.edu/~microbio/BI0221_2009/P_fluorescens.html (consultado em: 2 de Outubro de 2015).
35. Ribeiro, Clara, et al (Abril 2007). *Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence*. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 44, edição 1, pp 63-70.
36. Cerqueira, Miguel A., et al. (2011) *Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysacchride films - A comparative study*. *Food Hydrocolloids*, vol. 21, edição 1, pp 175-184.
37. [Online] <http://www.mathworks.com/help/images/ref/lab2rgb.html> (consultado em: 10 de Agosto de 2015).
38. Sobral, Paulo José do Amaral (2000). *Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre as suas propriedades funcionais*. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v35n6/4681.pdf> (consultado em: 2 de Outubro de 2015).
39. Amorim, JH, et al (2014). *Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches*. *F1000Research*, 3: 74. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288416.1/> (consultado em: 2 de Outubro de 2015).
40. Dong, Dexian , et al. (2013) *Binding Mechanism and Electrochemical Properties of M13 Phage-Sulfur Composite*. *Plos One*. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082332> (consultado em: 21 de Outubro de 2015).
41. Volkmer, T. M. e Santos, L. A. (2007). *Influência do tempo de indução nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas*. *Cerâmica*, vol. 53, n.328, São Paulo. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0366-69132007000400015&script=sci_arttext (consultado em: 21 de Outubro de 2015).

Anexos

Anexo A. Caracterização de revestimentos

A1. Viscosidade

Tabela A. A1.1. Valores de viscosidade (mPa.s) obtidos em função da velocidade de rotação (rpm) e valores de shear rate obtidos para o spindle 6.

Velocidade de rotação (rpm)	Viscosidade (mPa.s)		Shear rate (fator 0,34)
	Sem fago	Com fago	
0,3	1327	1499	0,102
0,6	973	1180	0,204
1,5	792	821	0,51
3	719	764	1,02
6	661	701	2,04
12	608	634	4,08
30	545	551	10,2
60	502	500	20,4

A2. Tensão superficial e ângulos de contacto

Tabela A. A2.1. Valores de ângulos de contacto entre soluções padrão (água ultra-pura, bromonaftaleno e formamida), os revestimentos (com e sem fago) e uma película absorvente.

Ângulos de contacto					
	Soluções padrão			Revestimentos	
	Água ultra pura	Bromonaftaleno	Formamida	Sem fago	Com fago
COM PELÍCULA	84,10	50,20	84,70	89,00	93,20
	81,70	44,70	85,00	74,00	87,90
	77,90	47,80	85,00	79,70	85,50
	84,00	53,00	83,30	81,50	92,10
	77,80	54,10	81,90	89,00	88,70
	77,70	57,30	77,20	84,10	79,60
	72,60	53,20	79,00	89,00	83,80
	78,00	59,30	76,40	84,10	85,70
	86,80	52,60	75,80	87,90	98,80
	84,50	48,20	75,00	85,50	93,30
Média	80,51	52,04	80,33	84,38	88,86
Desvio Padrão	4,38	4,44	4,08	4,90	5,59

Anexo B. Caracterização de filmes

B1. Espessura

Tabela B.B1.1. Valores de espessura obtidos para filmes com e sem fago.

Filme sem fago	Espessura (mm)	Filme com fago	Espessura (mm)
1	0,043	1	0,055
	0,053		0,067
	0,040		0,042
	0,050		0,068
	0,053		0,032
2	0,045	2	0,042
	0,038		0,028
	0,086		0,060
	0,060		0,056
	0,032		0,045
3	0,049	3	0,053
	0,035		0,053
	0,066		0,053
	0,068		0,073
	0,034		0,029
4	0,055	4	0,045
	0,044		0,048
	0,066		0,051
	0,062		0,065
	0,036		0,043
5	0,043	5	0,036
	0,041		0,081
	0,057		0,048
	0,032		0,025
	0,071		0,032
6	0,051	6	0,054
	0,055		0,025
	0,045		0,058
	0,051		0,031
	0,061		0,055
Média	0,051	Média	0,048
Desvio Padrão	0,013	Desvio Padrão	0,015

B2. Cor e opacidade

Tabela B.B2.1. Parâmetros de cor para filmes com e sem fago.

Filme sem fago	Y_{branco}	Y_{preto}	L^*	a^*	b^*
4	86,33	7,10	94,45	-0,23	7,84
	81,26	8,92	92,25	0,03	12,04
	86,58	6,85	94,13	-0,16	9,18
5	87,33	5,14	94,88	-0,26	6,31
	87,30	6,13	94,86	-0,37	8,13
	80,01	4,78	91,69	-0,16	14,09
6	86,60	5,95	94,57	-0,54	7,90
	84,45	8,05	93,64	-0,43	8,89
	84,37	7,40	93,61	-0,26	9,65
Média	84,91	6,70	93,79	-0,26	9,34
Desvio Padrão	2,67	1,34	1,14	0,17	2,38
Filme com fago	Y_{branco}	Y_{preto}	L^*	a^*	b^*
4	83,22	6,73	93,11	-0,41	10,04
	84,84	9,30	93,81	-0,22	9,88
	84,86	7,30	93,82	-0,28	8,61
5	82,86	5,22	92,95	-0,22	10,38
	87,31	8,15	94,87	-0,22	7,02
	89,37	8,17	95,73	-0,06	5,12
6	86,39	7,46	94,48	-0,39	6,94
	90,82	8,65	96,33	0,01	6,92
	88,26	7,76	95,27	-0,36	9,45
Média	86,44	7,64	94,49	-0,24	8,26
Desvio Padrão	2,74	1,18	1,17	0,14	1,83

B3. Permeabilidade ao vapor de água

Tabela B.B3.1. Valores obtidos das massas dos copos com filme (com e sem fago) e do copo com alumínio, ao longo do tempo.

Tempo (h)	Massa (g)					
	Filmes sem fago			Filmes com fago		
	Filme 4	Filme 5	Filme 6	Filme 4	Filme 5	Filme 6
0	197,0258	193,9418	186,9114	195,6547	201,2845	197,9357
2	196,8648	193,7943	186,7404	195,4944	201,1373	197,7759
4	196,7157	193,6424	186,5689	195,3315	200,9761	197,6043
6,5	196,5361	193,4605	186,3635	195,1391	200,7810	197,3930
8	196,4317	193,3541	186,2443	195,0286	200,6693	197,2745
10	196,2741	193,1979	186,0649	194,8638	200,4911	197,1063
28	195,0555	191,9983	184,7112	193,5797	199,2451	195,8336

Tabela B.B3.2. Valores obtidos da taxa de perda de massa dos copos com filmes (com e sem fago); valores padronizados com o controle de alumínio.

Tempo (h)	Perda de massa (g)					
	Filme sem fago			Filmes com fago		
	Filme 4	Filme 5	Filme 6	Filme 4	Filme 5	Filme 6
0	0	0	0	0	0	0
2	0,1337	0,1202	0,1437	0,1330	0,1199	0,1325
4	0,2698	0,2591	0,3022	0,2829	0,2681	0,2911
6,5	0,4370	0,4286	0,4952	0,4629	0,4508	0,4900
8	0,5343	0,5279	0,6073	0,5663	0,5554	0,6014
10	0,6814	0,6736	0,7762	0,7206	0,7231	0,7591

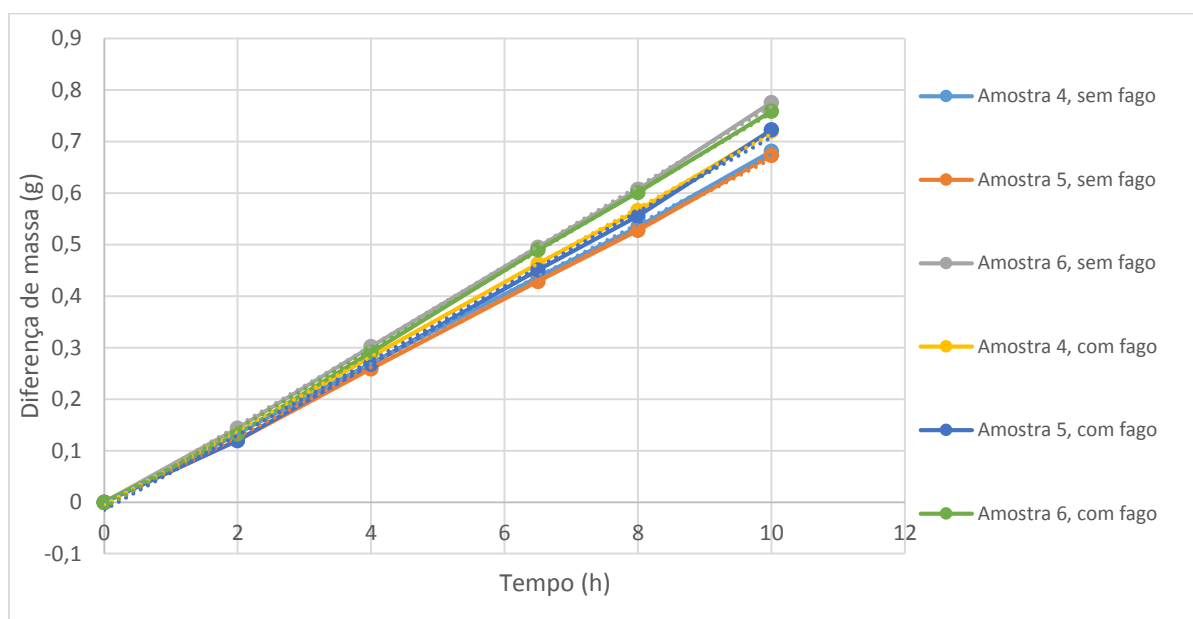


Figura B.B3.1. Gráfico da perda de massa dos copos com filmes (com e sem fago) ao longo do tempo).

Tabela B.B3.3. Equações das linhas de tendência de cada curva representada na figura B.B3 e, respetivos R^2 .

Sem fago		
Filme 4	Filme 5	Filme 6
$y = 0,0677x - 0,0016$	$y = 0,0675x - 0,0083$	$y = 0,0775x - 0,0065$
$R^2 = 0,9998$	$R^2 = 0,9994$	$R^2 = 0,9996$
Com fago		
Filme 4	Filme 5	Filme 6
$y = 0,0721x - 0,0055$	$y = 0,0724x - 0,015$	$y = 0,0766x - 0,0105$
$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9982$	$R^2 = 0,9994$

Tabela B.B3.4. Determinação dos valores dos fatores de permeabilidade ao vapor de água.

	Filmes sem fago			Filmes com fago		
	Filme 4	Filme 5	Filme 6	Filme 4	Filme 5	Filme 6
Área de transferência (m²)	0,005541768					
Diferença de pressão (Pa)	2337					
Declive (g/h)	0,0677	0,0675	0,0775	0,0721	0,0724	0,0766
WVTR (g/(h.m²))	12,216	12,180	13,985	13,010	13,064	13,822
WVP (g/(h.m.Pa))	2,750E-07	2,543E-07	3,148E-07	2,806E-07	2,482E-07	2,638E-07

B4. Solubilidade

Tabela B.B4.1. Valores obtidos de peso seco de filmes com e sem fago.

Filmes sem fago				Filmes com fago			
Amostra	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Δm (g)	Amostra	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Δm (g)
1	30,13	30,117	0,013	1	20,6393	20,6266	0,0127
2	30,7208	30,7106	0,0102	2	31,8665	31,8497	0,0168
3	30,5483	30,5319	0,0164	3	27,7435	27,7294	0,0141
Média			0,0132				0,0145
Desvio Padrão			0,0031				0,0021

B5. Ângulos de contacto/hidrofobicidade

Tabela B.B5.1. Valores de ângulos de contacto obtidos entre uma solução de água ultra-pura e os filmes, com e sem fago.

Filmes sem fago				Filmes com fago			
PLACA	4	5	5	PLACA	4	5	5
Ângulo de contacto entre água ultra pura e filme	95,50°	96,30°	96,60°	Ângulo de contacto entre água ultra pura e filme	95,70°	96,40°	96,60°
	96,90°	98,30°	98,20°		96,80°	98,60°	98,20°
	98,30°	99,50°	98,70°		99,70°	99,50°	98,70°
	98,60°	99,90°	99,80°		100,60°	99,50°	99,80°
	99,80°	99,90°	99,90°		102,60°	100,80°	99,90°
	102,40°	101,10°	100,10°		103,00°	102,20°	100,10°
	103,70°	102,30°	104,00°		103,60°	103,30°	104,00°
	104,00°	105,50°	104,10°		103,90°	103,70°	104,10°

	104,10°	106,00°	104,80°		104,60°	103,80°	°104,80°
	105,80°	108,60°	106,00°		107,20°	107,80°	106,00°
Média	100,91°	101,74°	101,22°	Média	101,77°	101,56°	101,22°
Desvio Padrão	3,53°	3,85°	3,22°	Desvio Padrão	3,57°	3,27°	3,22°

B6. Propriedades mecânicas

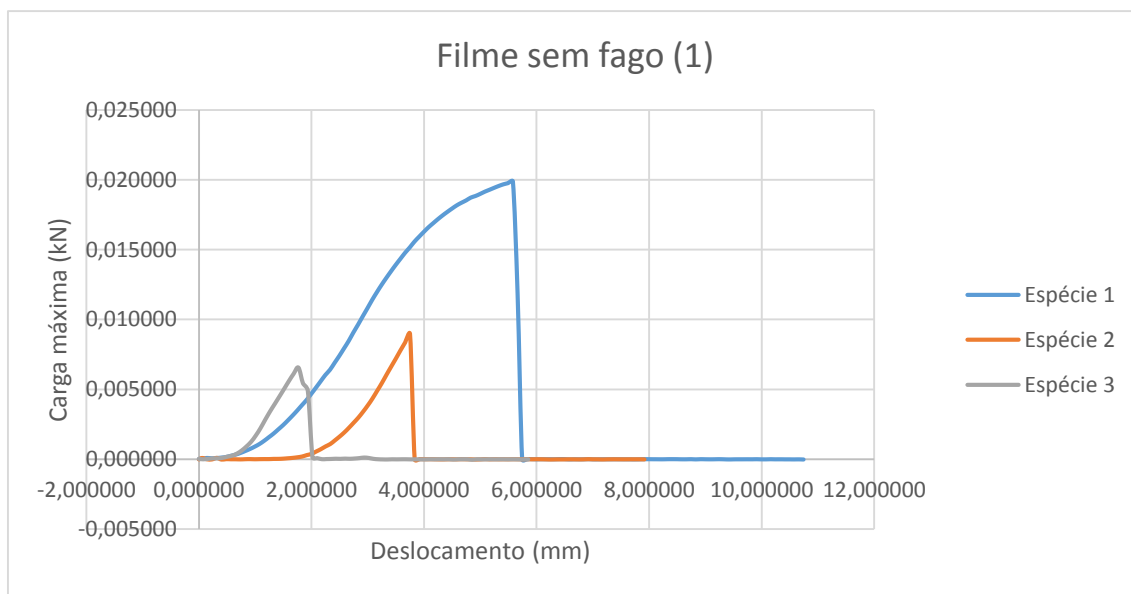


Figura B.B5.1. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 1 de filmes sem fago.

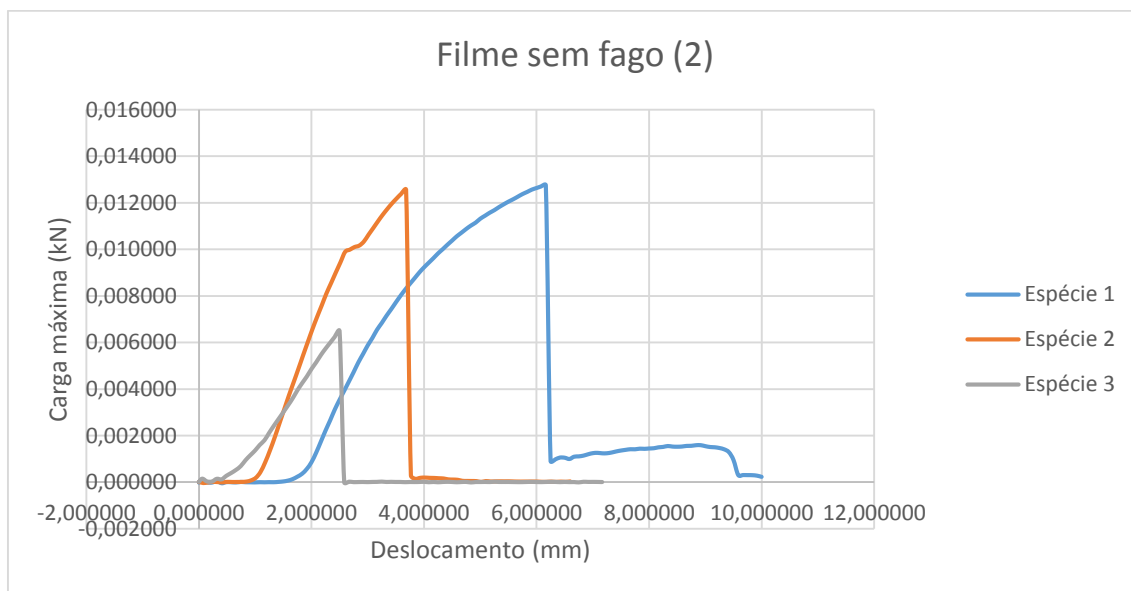


Figura B.B6.2. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 2 de filmes sem fago.

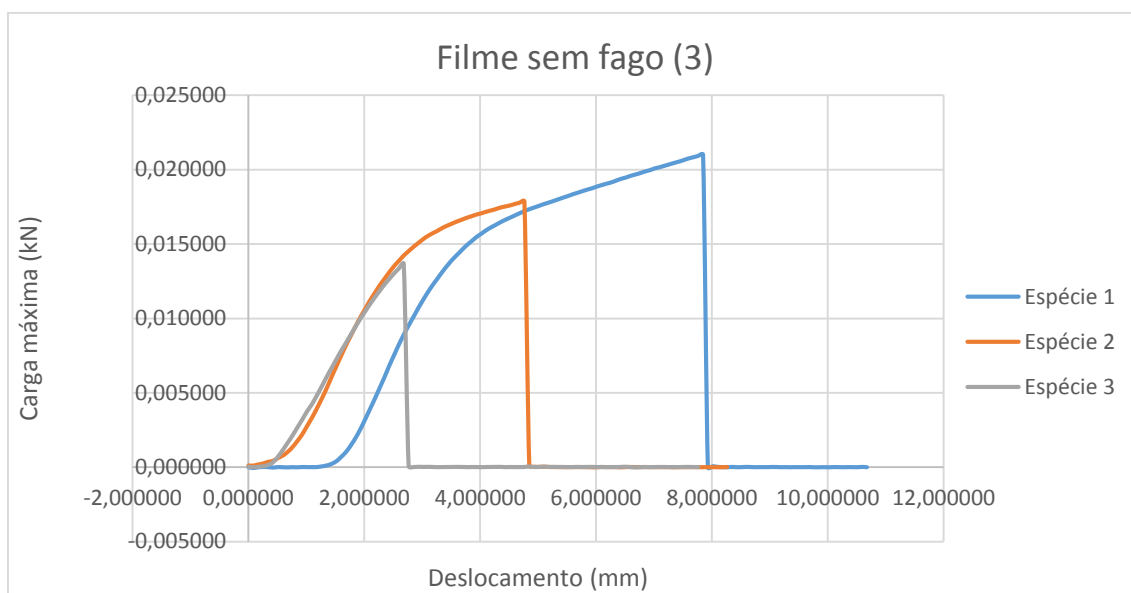


Figura B.B6.3. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 3 de filmes sem fago.

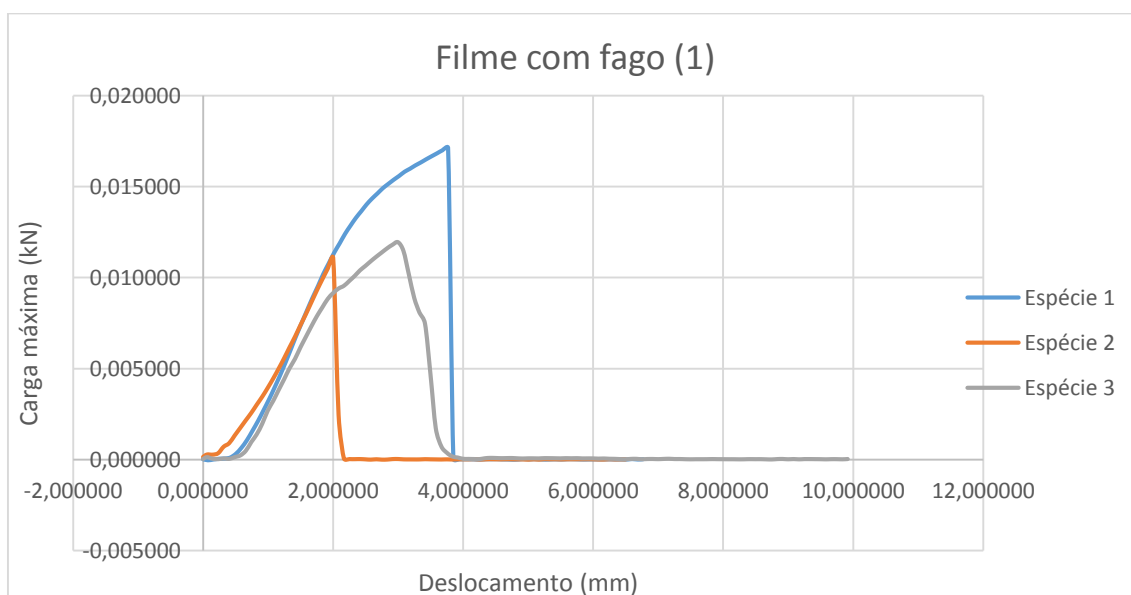


Figura B.B6.4. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 1 de filmes com fago.

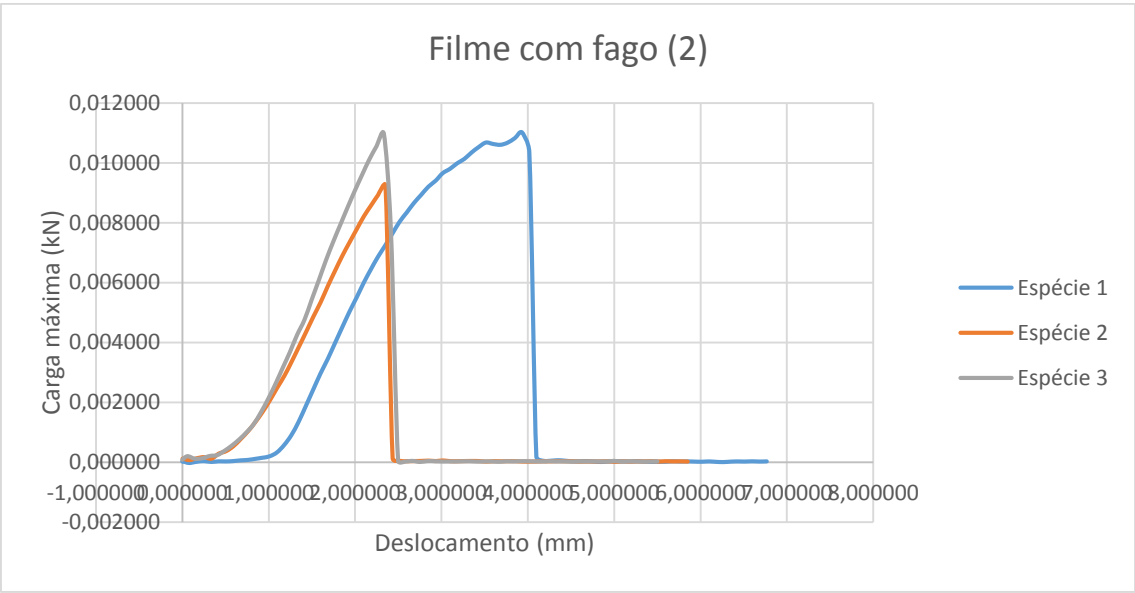


Figura B.B6.5. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 2 de filmes com fago.

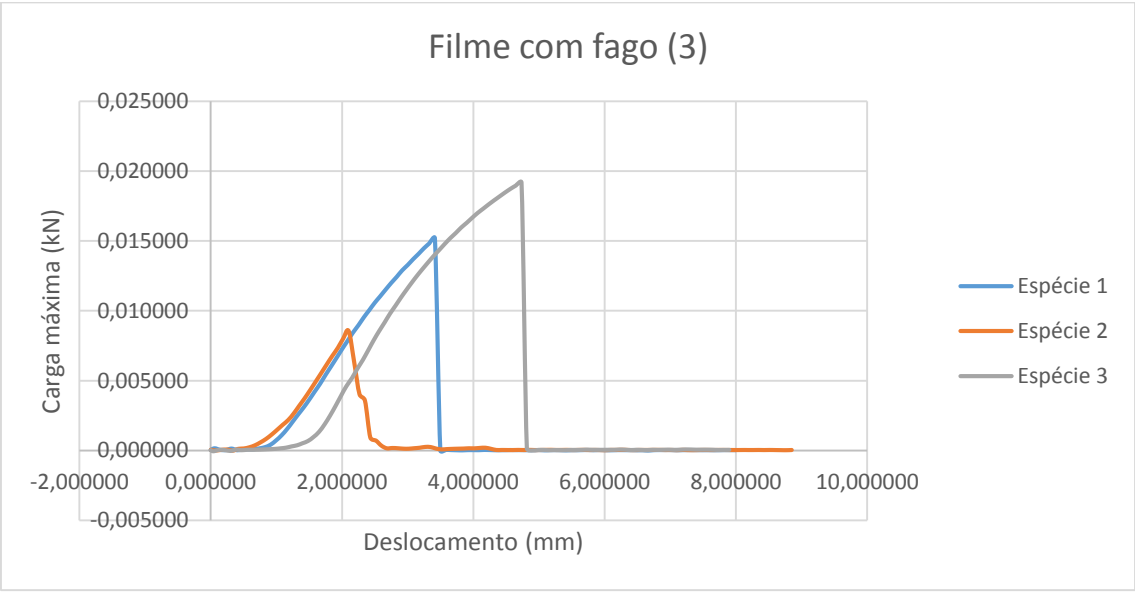


Figura B.B6.6. Carga máxima (kN) em função do deslocamento (mm) da amostra 3 de filmes com fago.