



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Camila Cristina Vieira Velloso

**NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO
INCORPORADAS EM FILMES DE GOMA TARA VISANDO A
PRESERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE FRUTO.**

**Ouro Branco/MG
2016**

Camila Cristina Vieira Velloso

**NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO
INCORPORADAS EM FILMES DE GOMA TARA VISANDO A
PRESERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE FRUTO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às exigências
do Curso de Bacharelado em Engenharia de
Bioprocessos do *Campus* Alto Paraopeba da
Universidade Federal de São João del-Rei.

Orientador: Igor José Boggione Santos

Ouro Branco/MG
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO INCORPORADAS EM
FILMES DE GOMA TARA VISANDO A PRESERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE
FRUTO.**

Autor: Camila Cristina Vieira Velloso.

Orientador: Igor José Boggione Santos.

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou este TCC:

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos (Orientador).

Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior.

Prof. Dr. Edson Romano Nucci.

Ouro Branco, 08 de Dezembro de 2016.

Dedico este trabalho à Deus por me fortalecer nos momentos em que não tive forças e aos meus pais por serem meu porto seguro e com muito carinho não mediram esforços para que eu alcançasse este sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me tantas oportunidades e junto delas discernimento e força para conseguir realizá-las, sendo a luz que me guia em cada incerteza e dificuldade.

A minha família, principalmente aos meus pais, Sérgio e Ivonete, e ao meu irmão, Serginho, por todo amor, incentivo e por terem trilhado comigo este caminho fazendo com que a realização deste sonho, hoje, fosse possível.

Aos meus avôs e avós, paternos, Rita e Leonildo, e maternos, Maria Lúcia e Ivo, por sempre me apoiarem, acreditarem e torcerem por mim, pelas palavras de sabedoria, pelas orações e exemplo de fé e amor.

Ao meu companheiro, Leonardo Cerqueira Hott, pela paciência, parceria, apoio e por nunca me deixar desacreditar que no final tudo daria certo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Boggione, pela dedicação, paciência, profissionalismo e pelo amor em compartilhar seus conhecimentos, sendo inspiração pelo seu exemplo de trabalho e orientação, e nos instigando a correr atrás do que desejamos.

A banca examinadora, Prof. Dr. Edson Nucci e Prof. Dr. Enio Nazare, por aceitarem meu convite sendo sempre disponíveis e prestativos, contribuindo significativamente com a realização deste trabalho.

A Prof.^a Dra. Jane Sélia dos Reis Coimbra da UFV, Prof.^a Dra. Aparecida Barbosa Mageste da UFOP e Prof. Dr. Washington Azevedo da Silva da UFSJ, pela parceria e auxílio na realização dos experimentos.

Aos meus orientadores ao longo da graduação, Prof. Dr. André Aguiar, amiga MsC. Cássia Santana e Prof.^a Dra. Letícia Paiva, pelas oportunidades, amizade e ensinamentos.

A Camila Oliveira, Júlia Moreira, Bruna Pralon e à família do Laboratório Biotecnológico, por todo auxílio, parceria e risadas durante a realização dos experimentos.

A Rafaela Castro, Juliana Batista e Cássio Castro, pela amizade, por todas as risadas e por sempre vibrarem com minhas conquistas nestes cinco anos de graduação.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha graduação, o meu muito obrigada.

RESUMO

Atualmente, não existem procedimentos práticos satisfatórios que realmente mantêm a qualidade da goiaba por maior tempo, sendo extremamente importante e interessante para a indústria, o desenvolvimento de novas tecnologias que busquem minimizar o intenso metabolismo desta fruta. Neste contexto, a utilização da nanotecnologia em embalagens surge com grande potencial de inovação. Portanto, este trabalho buscou desenvolver embalagens comestíveis utilizando nanoestruturas de carbonato de cálcio incorporada em goma tara (GT), ambos com status GRAS (Generally Recognized as Safe), a fim de agregar valor à cadeia produtiva da goiaba e produzir materiais estratégicos para a indústria alimentícia, gerando benefícios fisiológicos, farmacológicos, microbiológicos e nutricionais pelas mudanças nas propriedades físico-química do fruto. A melhor condição para produção das nanoestruturas supracitadas foi 17,5 °C em uma proporção de 1:1 por 60 min. Filmes de GT, glicerol 0.225 g.g⁻¹ e CaCO₃ nanoestruturado 1 e 2% g.g⁻¹ com base na massa da goma tara foram produzidos e caracterizados a fim de avaliar as alterações nestes biofilmes com o acréscimo de nanoestruturas. Os filmes de GT com nanocarbonato apresentaram maiores valores de espessura, gramatura e alongação, e redução da tensão, teor de umidade e da solubilidade devido à presença das nanoestruturas hidrofóbicas. Em relação à permeabilidade ao vapor de água, diferente do que era esperado, houve um aumento linear com a concentração de nanoestrutura de CaCO₃. Supõe-se que com a adição de nanoestruturas houve formação de poros, o que interferiu em todas as análises. Porém, isso deve ser confirmado com uma microscopia ótica de varredura. Acredita-se que esses testes devem ser repetidos em filmes com espessuras similares, a fim de obter maior confiabilidade na comparação entre os mesmos. Apesar de relatado na literatura como antimicrobiano, foi identificado que a nanoestrutura de CaCO₃ não possui esta característica para o fungo isolado de goiaba com antracnose. Sendo assim, a utilização deste biofilme para revestimento de frutas deve ser analisada “*in vivo*” para confirmação do seu potencial, além de verificar a viabilidade de sua aplicação em outros ramos, por exemplo, como filtros biológicos.

Palavras Chaves: nanotecnologia, planejamento box-behnken, embalagens e goiaba.

ABSTRACT

Currently, there are no satisfactory practical procedures in literature that truly maintain the guava quality for a long time, which is extremely important and interesting for the industry and to the development of technologies that seek to maximize the fruit shelf life. In this context, the use of nanotechnology in packaging appears with a great innovation potential for this context. Therefore, this work aimed to develop edible packages using calcium carbonate nanoparticles incorporated in Tara Gum (GT), both with GRAS (Generally Recognized as Safe) status, in order to add value to the guava production chain and to produce strategic materials for the food industry, in which generates physiological, pharmacological, microbiological and nutritional modifications in the physicochemical properties of the fruit. The best condition for producing those nanoparticles was 17.5 °C in a ratio of 1:1 per 60 min. Films of GT, glycerol 0.225 g.g⁻¹ and CaCO₃ nanostructured 1 and 2% g.g⁻¹ based on the mass of the Tara Gum were produced and characterized in order to evaluate the changes in these biofilms with the addition of nanostructures. As regards the results, the nanocarbonate GT films presented higher thickness, weight and elongation values, and tension, moisture content and solubility reduction due to the presence of hydrophobic nanoparticles. In relation to water vapor permeability, different from what was expected, there was a linear increase with the concentration of CaCO₃ nanostructure. It is assumed that with the addition of nanostructures there was pore formation, which interfered in all analyzes. However, this should be confirmed with a scanning optical microscopy. In order to obtain greater reliability in the results comparison, it is suggested to repeat these tests in films of similar thickness. Although the CaCO₃ nanostructure is reported as antimicrobial in the literature, it was identified that it does not have this characteristic for the fungus isolated from guava with anthracnose. Therefore, the use of this biofilm for fruit coatings should be analyzed in vivo to confirm its potential, as well as the viability of its application in other branches, for example as biological filters.

Keywords: nanotechnology, box-behnen design, packaging and guava.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXPORTAÇÃO DE GOIABA FRESCA EM QUILOGRAMAS NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2003 E 2015.....	5
FIGURA 2 – ESTRUTURA MOLECULAR DA GALACTOMANANA.....	11
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA GOMA TARA.....	13
FIGURA 4 – FUNGOS ISOLADOS DE GOIABA COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE NO LABORATÓRIO BIOTECNOLÓGICO DO CAMPUS ALTO PARAÓPEBA/UFSJ EM OURO BRANCO/MG.	22
FIGURA 5 – ESPÉCIES DE FUNGOS DO COMPLEXO DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES</i> ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	23
FIGURA 6 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 3D IDENTIFICANDO A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E PROPORÇÃO NA FORMAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS PARA TEMPO FIXO EM 35 MIN.....	25
FIGURA 7 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 3D IDENTIFICANDO A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E DO TEMPO NA FORMAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS PARA PROPORÇÃO FIXA EM 3.....	26
FIGURA 8 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 3D IDENTIFICANDO A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO TEMPO E DA PROPORÇÃO NA FORMAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS PARA TEMPERATURA FIXA EM 17,5 °C.	26
FIGURA 9 – DIAGRAMA DE PARETO PARA PRODUÇÃO DAS NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO.	28
FIGURA 10 – PRODUÇÃO DO FILME DE GOMA TARA SEM NANOESTRUTURAS, E COM NANOESTRUTURAS NA CONCENTRAÇÃO DE 1, 2 E 3% PELO MÉTODO DE CASTING, (A) SOLUÇÃO FILMOGÊNICA APÓS A HOMOGENEIZAÇÃO; (B) APLICAÇÃO DAS SOLUÇÕES EM SUPORTE DE VIDRO.....	29
FIGURA 11 – FILMES COM 1% DE CARBONATO DE CÁLCIO, (A) NÃO HOMOGENEAMENTE DISPERSO E (B) HOMOGENEAMENTE DISPERSO.	30
FIGURA 12 – FILME DE GOMA TARA COM 3% DE NANOCARBONATO DE CÁLCIO.	30
FIGURA 13 – FILMES RETIRADOS DO SUPORTE DE VIDRO COM NOTÁVEL DIFERENÇA NA OPACIDADE, (A) FILME DE GOMA TARA (GT) SEM NANOESTRUTURAS; (B) FILME DE GT COM 1% DE NANOCARBONATO DE CÁLCIO; E (C) FILME DE GT COM 2% DE CARBONATO DE CÁLCIO NANOESTRUTURADO.	31
FIGURA 14 – RELAÇÃO ENTRE PVA E CONCENTRAÇÃO DE NANOCARBONATO DE CÁLCIO (%). A REGRESSÃO LINEAR FOI A MAIS ADEQUADA PARA ESTE CASO, RESULTANDO EM UM $R^2=0,9898$, PRÓXIMO À 1.....	34
FIGURA 15 – FILMES DE GOMA TARA ANTES DA AGITAÇÃO SEM NANOESTRUTURAS (A) E COM NANOCARBONATO DE CÁLCIO (B), E APÓS AGITAÇÃO, SEM NANOESTRUTURAS (C) E COM NANOCARBONATO DE CÁLCIO (D).....	35
FIGURA 16 – REDUÇÃO DO VOLUME LIVRE EM FILMES DE GOMA TARA QUANDO NANOESTRUTURAS SÃO ADICIONADAS EM SUA COMPOSIÇÃO.	37
FIGURA 17 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO NANOCARBONATO DE CÁLCIO NAS CONCENTRAÇÕES 1, 2 E 3% (NPCs 1%, NPC 2% E NPC 3%), DE FILMES DE GOMA TARA	

COM NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO 1 E 2% (GT 1% E GT 2%) E FILMES DE QUITOSANA (FQ) COMO CONTROLE, ANTES DA INCUBAÇÃO (A) E APÓS A INCUBAÇÃO (B). ...	39
FIGURA 18 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 2D IDENTIFICANDO A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E PROPORÇÃO NA FORMAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS PARA TEMPO FIXO EM 35 MIN.....	53
FIGURA 19 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 2D IDENTIFICANDO A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E DO TEMPO NA FORMAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS PARA PROPORÇÃO FIXA EM 3.....	53
FIGURA 20 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 2D IDENTIFICANDO A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO TEMPO E DA PROPORÇÃO NA FORMAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS PARA TEMPERATURA FIXA EM 17,5 °C.	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA PRODUÇÃO DA NANOESTRUTURA DE CARBONATO DE CÁLCIO.....	17
TABELA 2 – VALORES DE TAMANHO (NM) DAS AMOSTRAS PREPARADAS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANALISADAS NO EQUIPAMENTO NANOZETA SIZER MALVERN (INGLATERRA, REINO UNIDO).....	24
TABELA 3 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA PRODUÇÃO DA NANOESTRUTURA (NP).....	25
TABELA 4 – ANOVA DOS DADOS OBTIDOS NO SOFTWARE STATISTICA.....	27
TABELA 5 – ESPESSURA MÉDIA DOS FILMES DE GOMA TARA, EM MICRÔMETROS E GRAMATURA, EM GRAMAS POR METRO QUADRADO, PRESENTE EM CADA TIPO DE FILME.	32
TABELA 6 – VALORES DE PERMEABILIDADE DE ÁGUA MÉDIOS E DESVIOS-PADRÃO DOS FILMES DE GOMA TARA PADRÃO E ADICIONADOS DE NANOCARBONATO NAS CONCENTRAÇÕES DE 1% E 2%.	33
TABELA 7 – SOLUBILIDADE MÉDIA DOS FILMES DE GOMA TARA COM NANOCARBONATO NA CONCENTRAÇÃO DE 0, 1 E 2% P.P ⁻¹ E SEU RESPECTIVO DESVIO PADRÃO.....	35
TABELA 8 – TEOR DE UMIDADE MÉDIO PRESENTE NOS TRÊS TIPOS DE FILMES (0, 1 E 2% DE NANOCARBONATO DE CÁLCIO) E SEU RESPECTIVO DESVIO PADRÃO.....	36
TABELA 9 – RESISTÊNCIA MÁXIMA À TRAÇÃO (R _{MÁX}) E PORCENTAGEM DE ELONGAÇÃO (%E) E DESVIOS-PADRÃO DOS FILMES (0, 1 E 2% DE NANOCARBONATO DE CÁLCIO).	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
E	Porcentagem de elongação
ε	Espessura média do filme.
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand
GRAS	Generally Recognized as Safe
GT	Goma Tara
NPCs	Nanoestruturas de Carbonato de Cálcio
P	Pressão de vapor de água pura
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
RH	Raio Hidrodinâmico
R _{máx}	Resistência máxima à tração
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
TPVA	Taxa de permeabilidade ao vapor d'água
UR _e	Umidade relativa
YMA	Yeast Malt Agar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. GERAL	3
2.2. ESPECÍFICO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. GOIABA	4
3.1.1. <i>Antracnose</i>	7
3.1.2. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	8
3.2. EMBALAGENS	9
3.3. NANOESTRUTURAS E 'NANOFOOD'	14
4. MATERIAL E MÉTODO	16
4.1. ISOLAMENTO DO FUNGO	16
4.2. OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO	16
4.2.1. <i>Caracterização das nanoestruturas</i>	18
4.2.1.1. <i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	18
4.3. PRODUÇÃO DE FILMES DE GOMA TARA COM NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO	18
4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	19
4.4.1. <i>Espessura dos filmes</i>	19
4.4.2. <i>Gramatura</i>	19
4.4.3. <i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	19
4.4.4. <i>Solubilidade em água</i>	20
4.4.5. <i>Teor de umidade</i>	20
4.4.6. <i>Propriedades Mecânicas</i>	20
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOESTRUTURAS E DO BIOFILME IN VITRO	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. ISOLAMENTO DO FUNGO	22
5.2. OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO	23
5.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE GOMA TARA COM NANOESTRUTURAS DE CARBONATO DE CÁLCIO.	29
5.3.1. <i>Espessura e gramatura</i>	32
5.3.2. <i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	33
5.3.3. <i>Solubilidade em água e teor de umidade nos filmes.</i>	34
5.3.4. <i>Propriedades Mecânicas</i>	38
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS NANOESTRUTURAS E DO BIOFILME IN VITRO	39
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo e o quarto maior produtor de goiaba. No entanto, a produção de goiaba destina-se, principalmente, ao mercado interno, uma vez que somente 0,06% da produção é exportada (TREICHEL et al., 2016). Um dos maiores limitantes é a alta perecibilidade do fruto devido à sua alta taxa metabólica e necessidade de um rigoroso tratamento fitossanitário. Consequentemente, exige-se que o produto seja bem acondicionado e escoado para o mercado internacional por via aérea, onerando demasiadamente os custos de comercialização e orientando a preferência do mercado internacional para o consumo da goiaba na forma de polpa ou suco concentrado (GONZAGA NETO, 2007).

Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que buscam aumentar a vida útil da goiaba, de tal forma a ampliar a sua aplicação industrial, o seu consumo "*in natura*" e a sua comercialização internacional. Neste contexto, a nanotecnologia surge com grande potencial de inovação pela possibilidade de obtenção de novos produtos com características distintas e individualizadas que contribuam para a conservação da goiaba pós-colheita, sendo vital e estratégico investir em estudos nesta área (BOUWMEESTER et al., 2009; FARIA et al., 2013; QUINA, 2004; WAYCHUNAS, 2001).

Uma das áreas da nanotecnologia na indústria alimentícia e agrícola em crescente expansão é a de embalagens, com grande potencial na contenção do alimento, proteção via barreira, informação do produto e visual para a venda, possibilitando ao alimento uma maior durabilidade de vida em exposição, além de manter as suas características "*in natura*" de forma segura e saudável (CHAUDHRY, Q.; CASTLE; WATKINS, 2010; CHAUDHRY, QASIM et al., 2008; GREINER, 2009).

A adição de nanoestruturas, tal como o carbonato de cálcio, para a formação de uma embalagem comestível na goiaba prevê benefícios fisiológicos, farmacológicos e/ou nutricionais pelas mudanças nas propriedades físico-químicas e microbiológicas da superfície da fruta e pela possibilidade de encapsular, nas nanoestruturas, substâncias com propriedades nutricionais, antimicrobianas e/ou farmacológicas (JEONG et al., 2007).

O carbonato de cálcio nanoestruturado destaca-se pelo seu potencial antimicrobiano e por ser reconhecido como seguro pelo GRAS (Generally Recognized as Safe) (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2012; BENSHITRIT et al., 2012). A adição dessa nanoestrutura às embalagens, pode então contribuir para melhora nas propriedades mecânicas, térmicas, microbiológicas e de barreiras das embalagens, ampliando a vida de prateleira de alimentos perecíveis. Vale ressaltar que a aplicação nanoestruturada de carbonato de cálcio em goiabas é incipiente na literatura, tendo relatos de sua aplicação como substrato de nanoestruturas sólidas-lipídicas na conservação de frutas, vegetais, sementes, cereais e/ou gêneros alimentícios frescos (GUERRERO et al., 2014).

Dentro do contexto de embalagens alimentícias nas últimas décadas, tem-se buscado por embalagens biodegradáveis (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997). A goma tara, portanto, torna-se uma alternativa promissora na produção de filmes e revestimentos para alimentos, uma vez que já são utilizadas pela indústria alimentícia e também atende aos padrões científicos necessários para a classificação como um ingrediente de alimentos com status GRAS. Além disso, apresenta um custo relativamente baixo, proporcionando um grande incentivo econômico para sua exploração industrial, sendo que existem poucos estudos da utilização desta galactomanana como um revestimento comestível de alimentos (FSANZ, 2006).

De forma geral, a obtenção de filmes e de revestimentos com propriedades capazes de aumentar a vida de prateleira da goiaba e seu valor nutracêutico pode oferecer vantagens como: desenvolvimento de novos produtos derivados da goiaba com valores técnico-funcional, biológico e nutritivo elevados, agregação de valor às cadeias produtivas da goiaba com melhor aproveitamento da matéria-prima e menor desperdício pós-colheita, aumento das exportações, e valorização do produtor rural.

Portanto, a partir do contexto nacional supracitado, este trabalho visa à obtenção de embalagens com nanoestruturas de carbonato de cálcio incorporadas para aplicação na superfície de goiabas. Objetiva-se, futuramente, tornar este fruto mais resistente à deterioração, mantendo suas características nutricionais, fisiológicas e mercadológicas estáveis, bem como produzir materiais estratégicos

para a indústria alimentícia, gerando resultados que refletirão em impactos nos planos científicos, industriais, econômicos e tecnológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Produzir, caracterizar e incorporar nanoestruturas de carbonato de cálcio em filmes de goma tara.

2.2. Específico

- i. Otimizar a produção das nanoestruturas de carbonato de cálcio via tratamento Box-Behnken;
- ii. Caracterizar as estruturas de carbonato de cálcio obtidas via espalhamento dinâmico de luz;
- iii. Obter e caracterizar a incorporação das nanoestruturas de carbonato de cálcio nas concentrações de 1 e 2% g.g⁻¹ em filmes de goma tara quanto a espessura do filme, teor de umidade, solubilidade em água, gramatura, resistência máxima à tração, porcentagem de elongação e cinética de permeabilidade ao vapor de água;
- iv. Avaliar a atividade antimicrobiana do carbonato de cálcio nanoestruturado à um fungo isolado de goiaba com sintomas de antracnose, via testes de sensibilidade *“in vitro”*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Goiaba

Fruto típico de regiões tropicais e subtropicais, a goiaba (*Psidium guajava* L.) é de grande importância na economia e comércio mundial por possuir características nutritivas potencializadas além de ser apetitosa. É considerada fonte de vitamina C (ácido ascórbico) contendo uma proporção de até 5 vezes maior que a quantidade presente em diversas frutas cítricas, superada apenas pela acerola. Além disso, contém considerável teor de vitamina A, cálcio, tiamina, niacina, fósforo e ferro em sua composição (GILL et al., 2016; MARTIN, 1967; SINGH; SINGH; JOSHI, 2005).

O Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas, superado apenas pela China e Índia, sendo responsável por mais de 40 milhões de toneladas produzidas. Porém, a quantidade de frutas exportadas ainda é pequena no contexto internacional (TREICHEL et al., 2016), mas de importância na economia interna.

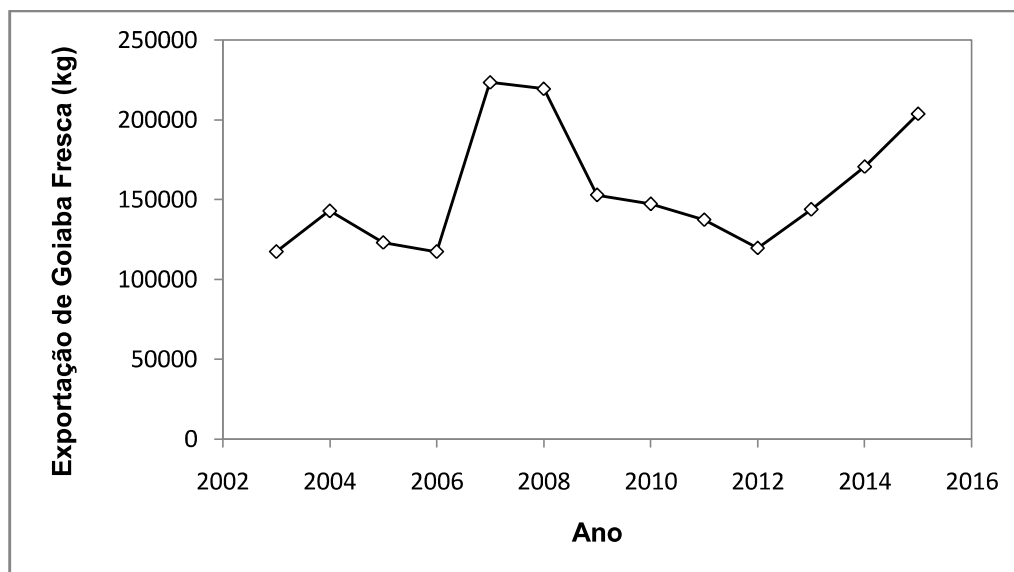
Entretanto, quando se trata de goiaba, o Brasil ocupa a quarta colocação mundial, produzindo mais do que 400 mil toneladas em 2004, ficando atrás apenas da Índia, Paquistão e México (FAO, 2004). É considerado o maior produtor de goiabas vermelhas, enquanto a Índia está em primeiro lugar na produção de goiabas brancas (SEBRAE, 2016). Entre os estados brasileiros, Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco, em conjunto, respondem por mais de 80% da produção nacional de goiaba (GONZAGA NETO, 2007).

A exportação de goiaba "*in natura*" é ainda insignificante, apenas 0,06% em 2015 (TREICHEL et al., 2016), sendo que alguns fatores são responsáveis por esse fato, entre os quais se destaca o pouco conhecimento do produto por parte dos consumidores dos mercados mais rentáveis economicamente e o alto grau de perecibilidade do fruto na fase de pós-colheita. Este último fator exige que o produto seja bem acondicionado e escoado para o mercado internacional por via aérea, o que onera demasiadamente os custos de comercialização. Por esta razão, o mercado internacional tem preferência pelo consumo da goiaba na forma de polpa ou suco concentrado (GONZAGA NETO, 2007).

Apesar de pequena, a exportação de goiabas frescas está em constante crescimento no Brasil desde o ano de 2012 (Figura 1), representando um

crescimento de 70,37%, o que equivale a um aumento de US\$ 223.461,00 na receita. Observa-se também que com o início da crise financeira global (FAO, 2004), ocorreu de 2008 a 2012, uma redução da exportação dessa fruta.

Figura 1 – Exportação de goiaba fresca em quilogramas no Brasil entre os anos de 2003 e 2015.



Fonte: (CARVALHO et al., 2010 ; CORRÊA et al., 2008 ; KIST et al., 2012; POLL et al., 2013; REETZ et al., 2014; REETZ et al., 2007; REETZ et al., 2009; RIGON et al., 2005; ROSA et al., 2006; TREICHEL et al., 2016).

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

A expansão do mercado consumidor de goiaba “*in natura*” está condicionada à qualidade destes frutos e ao aumento da vida útil pós-colheita. Consumidores e clientes do atual mercado global exigem cada vez mais qualidade mercadológica da goiaba de mesa, pois estão preocupados com a segurança dos alimentos e a preservação do meio ambiente. Sabendo que a goiaba é uma fruta altamente perecível devido à sua intensa atividade metabólica pós-colheita, a qual entra em senescência rapidamente após o amadurecimento (AZZOLINI; JACOMINO; BRON, 2004; GILL et al., 2016; LIMA; ASSIS; GONZAGA NETO, 2002), acredita-se que este seja um fator limitante para sua maior exportação. Sendo assim, é extremamente importante e interessante para a indústria, o desenvolvimento de técnicas e novas tecnologias que busquem minimizar o intenso metabolismo desta fruta, visando à redução de perdas pós-colheita e a ampliação do período de conservação, proporcionando a comercialização de frutas de excelente qualidade,

tanto sensorial quanto nutricional, especialmente para o consumo “*in natura*” (VILA et al., 2007).

Portanto, diversos métodos de conservação de goiaba já foram desenvolvidos ou estão sendo estudados (XISTO et al., 2004). Destaca-se, além da refrigeração, a atmosfera modificada, um acondicionamento individual e revestimento na forma de embalagens nos frutos na tentativa de reduzir a perda de peso, de deformação e de deterioração por infecções secundárias, de manter a firmeza, de aliviar o dano pelo frio e de atrasar o desenvolvimento da cor e senescência, preservando a qualidade (ASSIS, O. B. G.; DE BRITTO, 2014; RISSE, 1988; VILA et al., 2007). Todavia, atualmente, ainda não existem procedimentos práticos satisfatórios que realmente mantêm a qualidade da goiaba por maior tempo (GILL et al., 2016).

Além do acondicionamento do fruto, durante o processo de pós-colheita é realizado um tratamento fitossanitário com o objetivo de diminuir as atividades metabólicas e realizar um controle microbiológico e biológico, evitando e eliminando os patógenos presentes no fruto. O tratamento mais comumente utilizado, porém em crescente desuso pela sua fitoxidade e toxicidade ao homem, é a aplicação de agroquímico a base de fumigantes (CHOUDHRY; COSTA; ARAÚJO, 2001). No tratamento de goiaba pré-colheita e pós-colheita, tem-se utilizado o cálcio, tanto para reduzir sua deterioração patológica, quanto para aumentar sua vida útil pós-colheita. Os tratamentos mais utilizados são com os sais nitrato de cálcio a 1,0 % durante 30 minutos e o cloreto de cálcio a 2,0 % durante 10 minutos a 30 °C (TAVARES, S. C. C. D. H.; LIMA, 2001; YAMASHITA; BENASSI, 2000).

A principal doença, em pós-colheita, da goiaba é a antracnose, ou mancha-chocolate, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) (SERRA et al., 2011). Manchas de antracnose em qualquer número ou intensidade são classificadas como podridão (dano patológico que implica qualquer grau de decomposição, desintegração ou fermentação dos tecidos) e defeito grave de acordo com normas de classificação, ocasionando inevitavelmente a desclassificação do lote para comercialização; não sendo permitida a reclassificação quando a podridão for acima de 10% (CEAGESP, 2000).

3.1.1. Antracnose

A antracnose é uma doença encontrada em frutos de diversas regiões de clima tropical úmido e subtropical das Américas, sendo que os principais sintomas variam conforme a espécie do fruto, e o principal causador é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (FEICHTENBERGER et al., 2005; SERRA et al., 2011). *C. gloeosporioides* foi, por muito tempo, considerado o único agente causal da doença (JUNQUEIRA et al., 2002; PICCININ et al., 2005). Porém, recentemente, baseados em técnicas moleculares de identificação de espécies de *Colletotrichum*, PERES et al. (2002) identificaram *Colletotrichum acutatum* associado a lesões de antracnose em goiaba. Assim a antracnose da goiaba pode ser causada por infecções simples ou múltiplas dessas duas espécies fúngicas.

De maneira geral, iniciam-se por pequenas pontuações de coloração marrom a preta, com formato circular, evoluem para manchas necróticas de coloração escura, com bordos definidos e formato irregular, seguidas de podridão de frutos, com formação de massa alaranjada que contém os esporos do fungo (FERRARI et al., 2011).

A alta incidência de antracnose, observada em locais destinados à comercialização de frutas e hortaliças, incitou preocupação em relação às perdas econômicas significativas pela redução do período de comercialização, desclassificação e descarte de frutos, ainda que tratamentos fitossanitários de pré ou pós-colheita tenham sido realizados. O controle químico com a utilização de fungicidas, considerado em muitos casos como a única medida eficiente e economicamente viável, em alguns casos vem ocorrendo de forma exacerbada e indiscriminada, oferecendo risco à saúde da população e danos irreparáveis ao meio ambiente, seja pela não-observância de dosagens e período de carência, seja pelo uso de princípios ativos não registrados para a cultura (ROZWALKA; ALVES; AMARAL, 2010; ROZWALKA et al., 2008; WISNIEWSKI; WILSON, 1992).

Alta umidade e temperaturas noturnas, de 20 a 24°C, adubações inadequadas, ataque de pragas, períodos chuvosos prolongados que propiciam a permanência de uma lâmina de água livre sobre os tecidos suscetíveis, e temperaturas amenas (26°C), são condições que favorecem o desenvolvimento desta doença. Não há

referências sobre cultivares ou variedades de goiaba resistentes a *C. gloeosporioides* (STRACIERI, 2015).

3.1.2. *Colletotrichum gloeosporioides*

Métodos para identificação de características morfológicas, microscópicas e macroscópicas, são utilizados na identificação de fungos filamentosos, porém estas metodologias, na maioria das vezes, exigem tempo, nem sempre apresentam resultados precisos, e muitas vezes levam a diagnósticos e interpretações incorretas dos resultados (ATKINS; CLARK, 2004). Acresce-se a essas dificuldades a natureza polifilética e existências de formas intermediárias, de alguns patógenos (TAYLOR, 1995). Para o caso de fungos do gênero *Colletotrichum*, em particular, a literatura aponta que, em função de problemas dessa natureza, tem havido muitos equívocos na taxonomia de muitas espécies (PHOULIVONG et al., 2010), tornando necessárias revisões do gênero, como a realizada por HYDE et al. (2009).

Então, outras técnicas têm sido utilizadas com êxito na caracterização e identificação das diversas espécies, incluindo as pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, em que se sobressai o emprego de ferramentas moleculares (ANDRADE et al., 2007; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; LOPEZ, 2001; NGUYEN et al., 2010; TOZZE JÚNIOR, 2007).

Trabalhos anteriores relatam que a identificação de isolados de *Colletotrichum* spp., submetidos à identificação molecular, apresentaram amplificação de uma banda específica, de cerca de 450 pb, apenas para *C. gloeosporioides*, quando submetidos à PCR com o par de primers CgInt (5"GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3") específico para *C. gloeosporioides*, com o iniciador ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificação da região ITS (ANUAR; VIJAYA; ZAKARIA, 2014; SOARES-COLLETTI, 2012; STRACIERI, 2015). Sendo que nestes mesmos estudos, PCR realizadas com os primers específicos para *C. acutatum*, CaInt2 (5"GGGGAAGCCTCTCGCGG3")/ITS4, confirmaram a identidade dos isolados como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*.

O fungo *C. gloeosporioides*, pertencente à ordem Melanconiales, produz acérvulos subepidérmicos, dispostos em círculos, dos quais são liberados os conídios através de uma mucilagem de coloração alaranjada (ARAUZ, 2000; RIBEIRO, I. J. A., 2005). Os conídios são hialinos e gutulados, uninucleados, com 12-19 µm de comprimento, por 1,0-6,0 µm de largura, arredondados nas extremidades e levemente curvos (RIBEIRO, I. J. A., 2005). No Brasil, o controle deste patógeno baseia-se no uso de fungicidas de contato ou sistêmicos (FERRAZ, 2010; SOUZA, 2011). No Estado de São Paulo, em determinados anos, especialmente com primavera e verão muito chuvosos, é relatado mais de vinte pulverizações por ciclo no cultivo de goiaba. Considerando que nos últimos dez anos o controle do patógeno vinha sendo alcançado com sucesso, suspeita-se que, dada à pressão de seleção exercida pelo intenso uso de fungicidas, possa ter havido seleção de linhagens do patógeno resistentes aos principais ingredientes ativos (SOUZA, 2011).

3.2. Embalagens

A demanda por melhor qualidade de vida e, conseqüentemente, por alimentos mais frescos, saudáveis e seguros é uma procura incessante dos consumidores na atualidade. Esse termo bastante difundido tanto pelos meios científicos quanto pela mídia vem impulsionando e conduzindo várias pesquisas no desenvolvimento de tecnologias e produtos que atendam às exigências mais diversas. Uma das áreas mais visadas nesta perspectiva é a de embalagens (AZEREDO; FARIA; BRITO, 2012; NOVAES et al., 2012; SOARES et al., 2012).

As estratégias para aumentar a estabilidade dos produtos alimentícios, com manutenção das propriedades nutricionais e sensoriais e durabilidade (prazo de validade ou “*shelf-life*”), incluem o desenvolvimento de novas embalagens com propriedades de barreiras intensificadas, redução de material constituinte, e interação com o alimento de forma ativa ou inteligente. Assim, viabiliza-se um alimento seguro, fresco e economicamente acessível, pela diminuição dos custos no transporte e distribuição (AZEREDO et al., 2012).

As embalagens ativas são aquelas que além da função básica de proteção (passiva), interagem com o produto acondicionado, absorvendo compostos

indesejáveis ou liberando substâncias que favorecem o aumento da estabilidade, como, por exemplo, embalagens antimicrobianas e absorvedoras de oxigênio. Por sua vez, os sistemas de embalagem inteligente não influem na estabilidade, mas indicam ao consumidor o grau de deterioração ou o nível de exposição a um determinado fator que pode degradar o alimento. Podem-se citar embalagens com indicadores tempo-temperatura e sistemas com biossensores para indicar a presença de micro-organismos patogênicos ou presença de algum composto indesejado (AZEREDO et al., 2012; YAMASHITA et al., 2006).

As últimas décadas têm sido marcadas pelo uso crescente de materiais poliméricos (plásticos) para embalagem de alimentos, já que estes suprem diversos fatores de interesse mercadológico, como transparência, leveza, resistência a quebras, versatilidade de formatos e de sistemas de fechamento, além do baixo custo. Ampla gama de propriedades pode ser identificada nos polímeros, as quais dependem da estrutura química, do grau de cristalinidade, o qual está diretamente proporcional à resistência mecânica e propriedades de barreira, do grau de ramificações, da massa molar e sua distribuição, da orientação, entre outras características desta substância. Para embalagem de alimentos estima-se a utilização de polímeros que possuam propriedades de barreira a gases e vapor de água, maior resistência mecânica e química, rigidez, flexibilidade, termossoldabilidade, além de prevenir a migração de seus próprios compostos para o alimento (AZEREDO et al., 2012; GIANCONE et al., 2008; SOARES et al., 2012).

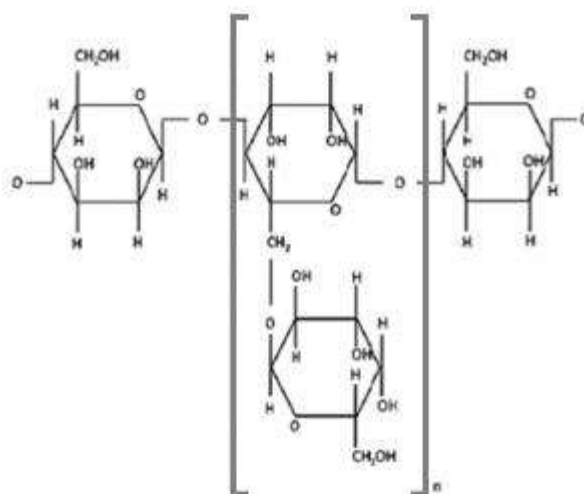
Outra tendência que é válida ressaltar é que, no contexto de sustentabilidade, a substituição de polímeros derivados de petróleo por biopolímeros ambientalmente corretos, biodegradáveis ou até mesmo comestíveis está em crescente estudo (BALDWIN; HAGENMAIER; BAI, 2011).

As embalagens comestíveis podem ser divididas em filmes ou revestimento. Sendo os filmes obtidos primeiramente e depois envolvendo o alimento e os revestimentos aplicados diretamente na superfície do alimento ou entre os constituintes do mesmo com o objetivo de reduzir a perda de gases e nutrientes e/ou estabilizar o metabolismo do alimento, mantendo suas características ideais. Os revestimentos comestíveis reduzem as trocas de CO_2 e de O_2 , criando uma atmosfera modificada com níveis relativamente altos de CO_2 e reduzidos de O_2 .

Contudo, essa atmosfera não deve criar condições de anaerobiose que permitam crescimento de micro-organismos anaeróbios e formação de sabores indesejáveis (BALDWIN et al., 2011; GIANCONE et al., 2008).

Uma substância alternativa utilizada para a obtenção de embalagens comestíveis é a galactomanana. As galactomananas são reservas de polissacarídeos neutros, extraídos do endosperma de sementes de inúmeras plantas, em especial as leguminosas, compostas de cadeia linear de resíduos de (1→4)-β-D-manopiranosil tendo unidades de cadeia lateral de (1→6)-α-D-galactopiranosil, como apresentado na Figura 2. De acordo com a origem, espécie da leguminosa e das técnicas de extração utilizadas para obtenção da galactomanana, são definidos o teor de distribuição entre as unidades básicas de manose e galactose (AZERO; ANDRADE, 1999; CERQUEIRA, M. A. et al., 2011).

Figura 2 – Estrutura molecular da galactomanana.



Fonte: Adaptado de CERQUEIRA, MIGUEL A. et al. (2011).

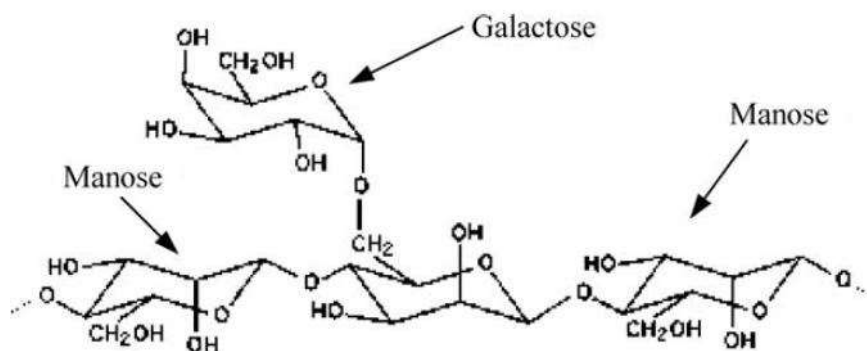
Sabe-se que galactomananas apresentam diferentes características moleculares em solução, como diferentes conformações e viscosidade. A primeira característica citada, muitas vezes relacionada às diferentes massas molares ou às diferenças de comprimento da cadeia polimérica, bem como de seus substituintes, e a segunda, variando conforme a influência da substituição de manose por galactose, provocando expansão ou contração da cadeia do polímero (PINHEIRO et al., 2011; POLLARD, M. A. et al., 2010; SEMENOVA, 2007).

Dentre as inúmeras leguminosas, apenas três são amplamente utilizadas como fonte de galactomanana comercial, *Ceratonia siliqua* (goma alfarroba), *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) e a *Caesalpinia spinosa* (goma tara) (AZERO; ANDRADE, 1999; CERQUEIRA, MIGUEL A. et al., 2011).

A goma tara proveniente do endosperma das sementes da árvore tara (*Cesalpinia spinosa*) é muito utilizada como espessante, estabilizante e na formação de filmes fortes (EMBUSCADO; HUBER, 2009). Além disso, apresenta um custo relativamente baixo, proporcionando um grande incentivo econômico para sua exploração industrial (FSANZ, 2006), sendo que existem poucos estudos da utilização desta galactomanana como um revestimento comestível de alimentos. Sabe-se também que a goma tara foi aprovada para ser usada como ingrediente alimentar pela FAO/WHO, um Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares, já que atende aos padrões científicos necessários para a classificação como um ingrediente de alimentos com status GRAS.

As soluções aquosas de goma tara, mesmo em baixas concentrações, apresentam alta viscosidade e suas propriedades reológicas são pouco afetadas por variações no pH, temperatura e adição de íons. Em baixas taxas de cisalhamento estas soluções apresentam comportamento pseudoplástico com região newtoniana (SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005). Quando comparada às demais galactomananas, a goma tara apresenta solubilidade em água intermediária entre a goma guar, a qual é solúvel em água fria, e a goma locusta, solúvel em água quente. Isso é explicado pelo fato de que moléculas com maior quantidade de galactose são mais solúveis em água (PICOUT et al., 2001). Esta goma em específico, é composta de uma cadeia principal formada de unidades β -D-manose unidas por ligações glicosídicas do tipo 1-4, com ramificações formadas por unidades de β -D-galactose, que estão ligadas no carbono 6 por ligações do tipo α -1,6 (Figura 3) (POLLARD, MICHAEL A.; FISCHER, 2006). A razão entre as moléculas de β -D-manose e β -D-galactose é de 3:1, respectivamente (SITTIKIYOTHIN et al., 2005).

Figura 3 – Estrutura química da goma tara.



Fonte: Adaptado de SITTIKIYOTHIN et al. (2005).

Todavia, a utilização dos polissacarídeos biodegradáveis em embalagens, na maioria das vezes, promove propriedades de barreira e mecânica fracas, se comparadas aos polímeros derivados de petróleo (ANTONIOU et al., 2015). Na tentativa de suprir essa limitação, vários estudos relatam os benefícios da formação de nanocompósitos com esses polissacarídeos (CHIVRAC; POLLET; AVÉROUS, 2009; SORRENTINO; GORRASI; VITTORIA, 2007). LOREVICE; MOURA; MATTOSO (2014) desenvolveram filmes com matriz composta de hidroxipropil metilcelulose, nanoestruturas de quitosana e polpa de mamão. A presença de nanoestruturas nos filmes incrementou as propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água e térmicas, nas quais a adição de nanoestruturas de quitosana mostrou um discreto aumento na temperatura de degradação e de transição vítrea. BILBAO-SAINZ et al. (2011) também obtiveram filmes de hidroxipropil metilcelulose com nanoestruturas de celulose microcristalinas com propriedades mecânicas melhores do que o mesmo filme sem a nanoestrutura. CHANG et al. (2010) estudaram nanocompósitos constituídos de nanoestruturas de quitosana e amido de batata plastificado com glicerol. Eles obtiveram uma distribuição homogênea das nanoestruturas no filme, uma melhoria na resistência à tensão, módulo de estocagem e na propriedade de barreira a vapor de água quando comparado ao filme sem nanoestrutura.

A interação da nanotecnologia e da embalagem permitiu a esta área uma ampliação nas possibilidades de obtenção de novas embalagens com propriedades intrínsecas, específicas e adequadas aos diversos tipos de alimentos, a fim de

atender aos anseios dos consumidores. Portanto, fazem-se necessários maiores estudos na busca de novas embalagens que atendam às exigências mais distintas, como a busca por alimentos seguros, saudáveis e mais próximos ao “*in natura*” (CERQUEIRA, M. A. et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2009).

3.3. Nanoestruturas e ‘Nanofood’

A nanotecnologia é um campo da tecnologia responsável pela caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de materiais com uma ou mais dimensão em tamanho nanométrico (1nm a 300 nm), a fim de se obter processos e produtos com melhor desempenho e/ou novas propriedades (ASSIS, L. M. D. et al., 2012; AZEREDO et al., 2012; CHAU; WU; YEN, 2007; HANDFORD et al., 2014; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

A nanotecnologia tem atraído considerável atenção nos últimos anos em função da expectativa quanto ao potencial impacto que os nanomateriais podem gerar nos mais variados setores industriais, influenciando assim no desenvolvimento tecnológico e econômico do país. Esse interesse por parte de governos, indústrias e centros de pesquisa, se deve ao fato de produtos nanoestruturados possuírem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas (BOUWMEESTER et al., 2009; FARIA et al., 2013; GREINER, 2009; QUINA, 2004; WAYCHUNAS, 2001).

A aplicação desta inovação, apesar de recente, está presente na indústria alimentícia, seja no desenvolvimento de produtos com características funcionais e nutracêuticas, no emprego de aditivos e sistemas de liberação controlada de substâncias bioativas e minerais, no desenvolvimento de processos e em embalagens ativas e inteligentes (ASSIS, L. M. D. et al., 2012; HANDFORD et al., 2014; MORARU et al., 2003).

Na área alimentícia, o termo “*nanofood*” é utilizado para descrever o alimento que foi cultivado, produzido, processado ou empacotado usando técnicas de nanotecnologia, cujo desígnio principal é proporcionar maior segurança alimentar, melhorar nutrição e flavor, além de tentar criar alimentos que sejam funcionais e cortar custos (NUNES; GUIVANT, 2008; SEKHON, 2010).

Embora “*nanofood*” ainda esteja em desenvolvimento, as nanoestruturas estão agora encontrando aplicação como um portador de polipeptídios antimicrobianos necessários contra a deterioração microbiana dos alimentos na indústria alimentícia (SEKHON, 2010); como dispositivos para o encapsulamento de moléculas bioativas (TAVARES, G. M. et al., 2014) e em embalagens, seja com a finalidade de aumentar a estabilidade dos alimentos acondicionados (embalagens ativas) ou para melhorar o desempenho dos materiais, especialmente propriedades mecânicas e de barreira, aumentando o grau de proteção conferido por esses sistemas e reduzindo a exigência de utilização de plásticos como materiais de embalagem, sendo uma alternativa ambientalmente correta (ASSIS, L. M. D. et al., 2012; SORRENTINO et al., 2007; SOZER; KOKINI, 2009; WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006). Devido ao seu tamanho, estas nanoestruturas aplicadas à indústria alimentar podem, por exemplo, aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos, assim como alterar as propriedades sensoriais de alimentos onde sejam utilizados ou ainda promover a liberação controlada de determinado tipo de compostos, sobretudo aqueles que têm baixa solubilidade em água (KUAN et al., 2012; SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

As nanoestruturas de carbonato de cálcio são utilizadas como aditivos nas indústrias de papel e de plástico promovendo propriedades novas, tal como o aumento da rigidez (BABOU-KAMMOE et al., 2012). Além disso, essas nanopartículas também são utilizadas em estudos de liberação controlada de moléculas bioativas (HARUTA et al., 2003; UENO et al., 2005). Existem relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana das partículas de carbonato de cálcio (JEONG et al., 2007) em sua forma nanoestruturada. Portanto, essa nanoestrutura tem um potencial de auxiliar no aumento da vida útil de alimentos pelas suas propriedades mecânicas e, possíveis, propriedades antimicrobianas. Além de que, segundo a pesquisa realizada por HUANG et al. (2009), a nanopartícula de carbonato de cálcio não possui toxicidade essencial “*in vivo*”. Dessa maneira, se faz necessária a verificação da atuação dessa nanoestrutura em filmes para conservação dos frutos pós-colheitas nas embalagens comestíveis.

Entretanto, é importante frisar que a produção de nanoestrutura em escala industrial traz consigo consequências imprevisíveis, quando comparados aos métodos tradicionais, já que se sabe muito pouco ou nada sobre a sua

biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade (FUGAZZA, 2015; QUINA, 2004). Apesar da comercialização rápida da nanotecnologia, há poucos regulamentos de nanomateriais específicos, provavelmente por causa da falta de ferramentas legais e científicas, informações e recursos necessários para monitorar o crescimento de mercado exponencial da nanotecnologia (BLASCO; PICO, 2011).

4. Material e Métodos

Goma Tara (GT) foi obtida do laboratório GastronomyLab (Brasília/DF, Brasil), hidróxido de sódio e carbonato de sódio do ProLab (São Paulo/SP, Brasil), nitrato de sódio e nitrato de cálcio do Labsynth (Diadema/SP, Brasil). Água destilada proveniente da osmose Hidrotek (Santa Iria de Azóia, Portugal) foi utilizada em todos os experimentos. Os demais reagentes foram utilizados sem purificação adicional e foram de qualidade analítica.

4.1. Isolamento do fungo

Goiaba com sintomas de antracnose foi selecionada e os fungos provenientes das manchas necróticas de coloração escura encontradas nesta goiaba foram isolados utilizando o meio YMA (Yeast Malt Agar). O fungo filamentoso com morfologia mais similar ao fungo *Colletotrichum spp.* foi reservado em glicerol para utilização em testes futuros.

4.2. Obtenção de nanoestruturas de carbonato de cálcio

Nanoestruturas de carbonato de cálcio foram obtida de acordo com BABOU-KAMMOE et al. (2012) com modificações. Uma solução de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de carbonato de sódio, $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de hidróxido de sódio e $0,18 \text{ mol.L}^{-1}$ nitrato de sódio foram preparadas e nesta solução foi adicionado gota a gota uma solução de $0,1 \text{ M}$ de nitrato de cálcio sob agitação constante, a 25°C e a 50°C , por 60 min. Após esse tempo a solução foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5804/5804 R - BioResearch do Brasil - Made in Germany) a 3500 rpm durante 10 min e o pellet obtido foi seco em estufa (Estufa Bacteriológica, Solab Equipamentos para Laboratórios LTDA –

EPP, SL 101/81, Piracicaba – SP, Brasil) a 50 °C e reservado para posteriores análises e caracterizações.

A fim de se estudar a relação entre três parâmetros na resposta da produção da nanoestrutura de carbonato de cálcio, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta de Box-Behnken. As variáveis independentes para este estudo foram temperatura (5 a 30 °C), tempo de reação (10 a 60 minutos) e proporção (1 a 5) entre as soluções utilizadas para produzir o carbonato de cálcio. Foram realizadas três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios.

A combinação dos níveis analisados para a otimização da formação da nanoestrutura está apresentada na Tabela 1 em valores decodificados da matriz experimental.

Tabela 1 – Condições utilizadas no delineamento experimental realizado para produção da nanoestrutura de carbonato de cálcio.

Box-Behnken			
Tratamento	Temperatura (°C)	Proporção	Tempo (min)
1	5	1	35
2	30	1	35
3	5	5	35
4	30	5	35
5	5	3	10
6	30	3	10
7	5	3	60
8	30	3	60
9	17,5	1	10
10	17,5	5	10
11	17,5	1	60
12	17,5	5	60
13	17,5	3	35
14	17,5	3	35
15	17,5	3	35

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

Os modelos de superfície de resposta foram ajustados por análise de variância (ANOVA), ao nível de 10% de probabilidade, da regressão seguida por teste-t para os coeficientes do modelo, utilizando SPSS Statistics software (Version 7.0, SPSS Inc. Chicago, IL).

4.2.1. Caracterização das nanoestruturas

4.2.1.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O experimento de DLS foi utilizado para a determinação do raio hidrodinâmico (RH). As medidas foram realizadas no Nano Zetasizer Malvern (Inglaterra, Reino Unido) utilizando um detector de fotodiodo de avalanche (Brookhaven BI-APD, USA) e um correlacionador (TURBOCORR, Brookhaven, USA). A fonte de luz (CVI Melles Griot, USA) foi um laser HeNe de 35 mW de potência e $\lambda=632,8$ nm, linearmente polarizada. Para controle de intensidade foi empregado um sistema de polarizadores cruzados. As dispersões de nanoestruturas foram adicionadas em uma cubeta e esta inserida no equipamento para a análise.

4.3. Produção de Filmes de Goma Tara com Nanoestruturas de Carbonato de Cálcio

As soluções de Goma Tara (GT) foram preparadas utilizando o método descrito por ANTONIOU et al. (2015) com algumas modificações. GT foi dissolvida em água (1%, m/v) a 25 °C por 2 h até se obter uma solução homogênea. Essas soluções foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5804/5804 R - BioResearch do Brasil - Made in Germany) a 3500 rpm durante 25 min para remover matéria não dissolvida e as bolhas de ar. Glicerol a 0,225 g.g⁻¹ com base na massa da GT foi adicionado como plastificante. Nanoestruturas de carbonato de cálcio a 1 e 2 % g.g⁻¹ com base na massa da GT foram adicionadas aos filmes. Os filmes foram confeccionados pela técnica de Casting, que consiste na desidratação de uma solução filmogênica (macromoléculas, solvente e plastificante) aplicada sobre um suporte, seguido de desidratação lenta a baixa temperatura (MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008; TORRES et al., 2011; ZAVAREZE et al., 2012). Antes de depositar tais soluções nas placas, estas foram colocadas no ultrassom durante 4 h com o objetivo de dispersar as nanoestruturas. Então, 80 mL de cada solução foram depositados em placas de vidro retangulares (20 x 15 cm), as quais foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar (marca Tecnal, modelo TE 394-3, Piracicaba, Brasil) a 35 °C por 48 h. Os filmes obtidos foram acondicionados a 25 °C. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4. Caracterização dos filmes

4.4.1. Espessura dos filmes

A espessura média do filme foi calculada medindo, aleatoriamente, 6 pontos diferentes com o auxílio de um micrômetro (Micrômetro Externo Série 436.1M 0 - 25 mm, STARRETT- V436.1MXRL25, Made in PRC), com precisão 0,001 mm.

4.4.2. Gramatura

Os filmes produzidos foram cortados em tamanhos de 2 x 2 cm e pesados em balança analítica (Balança Analítica AY 220, Shimadzu Corporation, Barueri/São Paulo, Brasil), com precisão de 0,001 g. As massas obtidas foram divididas pela área do filme em questão, obtendo-se os teores de gramatura em g.m^{-2} .

4.4.3. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos foi determinada pelo método gravimétrico padrão E96-95 (ASTM, 1995). Em frascos de 50 mL foi colocado aproximadamente 10 g de sílica gel azul, os quais foram lacrados com os filmes previamente preparados, então este conjunto foi pesado em uma balança analítica. Os frascos foram depositados dentro de um dessecador contendo 200 mL de solução salina de cloreto de cálcio 10% (m/v), juntamente com um termohigrômetro para a medição da umidade e temperatura. O dessecador foi mantido em uma incubadora a 30 °C. A umidade média dentro do dessecador foi de 75%.

Durante quatro dias os frascos foram retirados e pesados em balança analítica. A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada pela seguinte equação:

$$PVA = \frac{TPVA \cdot \varepsilon}{P \frac{UR_e}{100}} \quad (1)$$

Onde:

PVA = Permeabilidade ao vapor d'água ($\text{g.}\mu\text{m.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}.\text{mmHg}^{-1}$);

TPVA = Taxa de permeabilidade ao vapor d'água ($\text{g. dia}^{-1} . \text{m}^{-2}$);

ε = Espessura média do filme (μm);

p = Pressão de vapor de água pura na temperatura indicada pelo termo-higrômetro (mmHg);

UR_e = Umidade relativa (indicada pelo termo-higrômetro).

4.4.4. Solubilidade em água

A percentagem de solubilidade da goma, plastificante e nanoestruturas (S%) em água foi determinada com base no método descrito por ANTONIOU et al. (2015) com algumas modificações. Ela foi determinada como percentagem de matéria seca de filme solubilizado após 24 h de imersão em água destilada. O peso inicial (W_0) das folhas de filme seco (2 x 2 cm) foram imersas em 30 mL de água destilada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação constante durante 24 h, seguida de centrifugação a 3500 rpm durante 20 min. A matéria não dissolvida foi seca a 80°C por 24 h até peso constante (W_1). Este teste foi realizado em triplicata e a solubilidade em água (S%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$S\% = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (2)$$

4.4.5. Teor de umidade

O teor de umidade (M%) dos filmes foi determinado por secagem de peças de 2 x 2 cm a 80°C durante 24 h. As amostras foram então pesadas em balança analítica antes (W_0) e após 24 h (W_1), e o teor percentual de umidade foi calculado usando a seguinte equação:

$$M\% = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (3)$$

4.4.6. Propriedades Mecânicas

As propriedades de tração e alongamento dos filmes foram medidas conforme o método padrão D882-02 (ASTM, 2002) em um analisador de textura (Stable Micro Systems, modelo TA.XT Plus, Reino Unido) com célula de carga de 1 kN.

Primeiramente, cortou-se as amostras em tiras (100 x 10 mm) e a separação inicial entre as garras foi de 50 mm com velocidade de 50 mm/min. A resistência a tração foi calculada dividindo a carga máxima pela área da seção transversal do filme. Já o alongamento na ruptura foi calculado pela relação percentual entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial padrão, na ruptura. Testaram-se cinco corpos de prova para cada filme.

4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana das nanoestruturas e do filme *in vitro*

O fungo de goiaba com sintomas de antracnose foi isolado e plaqueado previamente no Laboratório Biotecnológico na UFSJ. Um método adequado para avaliar a eficiência de um agente antimicrobiano consiste em medir o tamanho relativo à zona de inibição (ZOI) ao redor do agente testado. Um inóculo padrão deste micro-organismo foi inicialmente esfregado pelo método de “*Spread Plate*” sobre a superfície de uma placa de petri com o meio de cultura YMA, onde foram colocados papéis-filtro estéreis impregnados com as nanoestruturas de carbonato de cálcio nas concentrações de 1, 2 e 3 % g.g⁻¹ e biofilmes de GT com 1 e 3% g.g⁻¹ de carbonato de cálcio nanoestruturados. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h e a 35 °C em uma estufa bacteriológica, e as ZOI formadas ao redor dos papéis-filtro foram então medidas (VALÁŠKOVÁ et al., 2010).

Os dados foram analisados via Análise de Variância e teste de Turkey ($p < 0,05$) realizados através do *software Origin Pro 8SR4* (Version 8.0, Northampton, USA).

5. Resultados e Discussão

5.1. Isolamento do fungo

Fungos foram isolados (Figura 4) de goiabas com sintomas de antracnose, manchas necróticas de coloração escura, com bordos definidos e formato irregular, no Laboratório Biotecnológico do Campus Alto Paraopeba/UFSJ em Ouro Branco/MG.

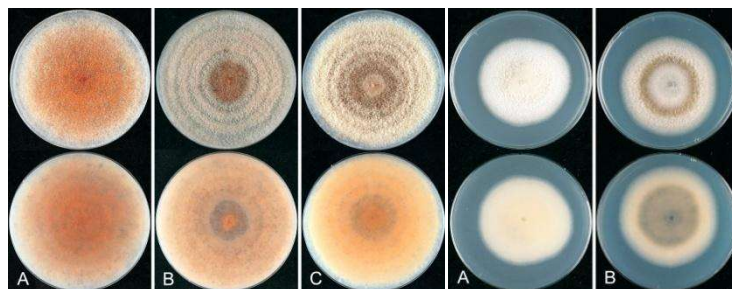
Figura 4 – Fungos isolados de goiaba com sintomas de antracnose no Laboratório Biotecnológico do Campus Alto Paraopeba/UFSJ em Ouro Branco/MG.



Fonte: Próprio Autor, 2016.

ANDRADE et al. (2007) definiram alguns aspectos de certas espécies de *Colletotrichum* ssp., como a cor da colônia e o seu reverso salmão (*C. acutatum*) ou branca (*C. gloeosporioides*), as bordas de ambas na coloração branca, com a presença de micélio aéreo moderadamente abundante para a colônia salmão, e, reduzido e branco para a colônia branca. Além disso, através da comparação morfológica com outros estudos, como se pode observar nas Figura 4 e Figura 5, acredita-se que esses fungos isolados pertencem a essas espécies (*Colletotrichum* ssp.).

Figura 5 – Espécies de fungos do complexo de *Colletotrichum gloeosporioides* encontrados na literatura.



Fonte: WEIR; JOHNSTON; DAMM (2012)

Espécies de *Colletotrichum* são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Características como morfologia de conídios, presença de setas e do teleomorfo, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento têm sido usadas para diferenciar espécies morfológicamente próximas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* J.H. Simmonds (FREEMAN et al., 1998; SUTTON; BAILEY; JEGER, 1992). As dificuldades encontradas na identificação das espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (FREEMAN et al., 1998; LOPEZ, 2001; SUTTON et al., 1992). Para uma melhor identificação dos fungos citados, deve-se realizar alguma técnica molecular, como a PCR com primers específicos.

5.2. Obtenção de Nanoestruturas de Carbonato de Cálcio

Nanoestruturas de carbonato de cálcio (NPCs) obtidas a 50°C apresentaram um tamanho de 167,0 nm e a 25°C apresentaram um tamanho de 224,2 nm. Constatando-se então que o carbonato ao ser exposto a uma maior temperatura apresentou uma nanoestrutura menor do que a exposta a uma temperatura menor.

Com o objetivo de avaliar a inter-relação entre outros parâmetros além da temperatura e obter valores que otimizem as condições experimentais, utilizou-se uma metodologia de superfície de resposta – Planejamento Box-Behnken – em que

as variáveis independentes para este estudo foram temperatura (5 a 30 °C), tempo de reação (10 a 60 min) e proporção (1 a 5) entre as soluções utilizadas para produzir o carbonato de cálcio.

A Tabela 2 mostra o tamanho das estruturas de carbonato de cálcio obtidas no delineamento experimental. USKOKOVIĆ (2007) afirma que nanoestruturas são materiais cujo tamanho varia de 10 a 300 nm, portanto, o tratamento 6 foi o que apresentou o melhor resultado.

Tabela 2 – Valores de tamanho (nm) das amostras preparadas no delineamento experimental e analisadas no equipamento NanozetaSizer Malvern (Inglaterra, Reino Unido).

Tratamento	Tamanho (nm)
1	249,5 ± 11,6
2	532,8 ± 169,5
3	217,6 ± 52,1
4	670,9 ± 117,8
5	426,6 ± 80,2
6	17,9 ± 6,9
7	185,7 ± 16,2
8	119,7 ± 68,6
9	664,5 ± 151,5
10	299,5 ± 66,3
11	28,5 ± 5,8
12	32,9 ± 7,0
13	248,5 ± 11,6
14	484,4 ± 94,4
15	269,1 ± 64,8

*Resultados expressos como média ± desvio-padrão (n=3).

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

Os valores do tamanho de cada nanoestrutura e suas respectivas condições de preparação (temperatura, proporção e tempo), nas formas codificadas e decodificadas, foram agrupados conforme a Tabela 3 para a obtenção dos gráficos de superfície de resposta em 3D. As curvas de contorno das respectivas Figuras se encontram em anexo.

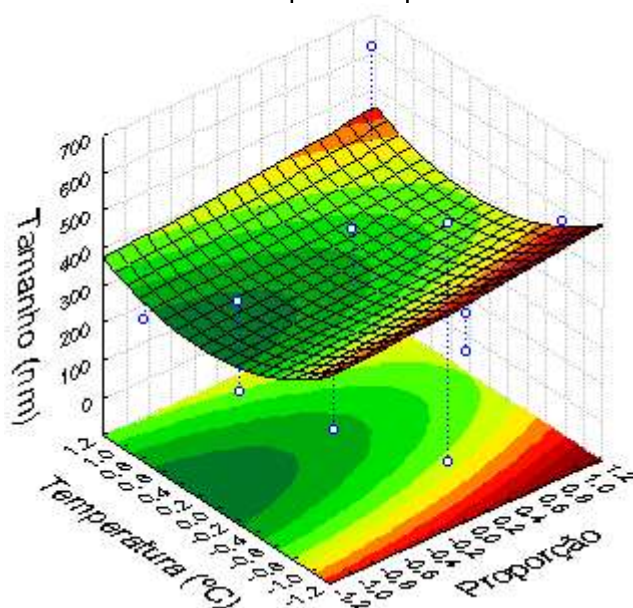
Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental e resultado experimental para o estudo da produção da nanoestrutura (NP).

Tratamento	Temperatura (°C)	Proporção	Tempo (min)	Tamanho (nm)
1	5 (-1)	1 (-1)	35 (0)	249,5
2	30 (1)	1 (-1)	35 (0)	532,8
3	5 (-1)	5 (1)	35 (0)	217,6
4	30 (1)	5 (1)	35 (0)	670,9
5	5 (-1)	3 (0)	10 (-1)	426,6
6	30 (1)	3 (0)	10 (-1)	17,9
7	5 (-1)	3 (0)	60 (1)	185,7
8	30 (1)	3 (0)	60 (1)	119,7
9	17,5 (0)	1 (-1)	10 (-1)	664,5
10	17,5 (0)	5 (1)	10 (-1)	299,5
11	17,5 (0)	1 (-1)	60 (1)	28,5
12	17,5 (0)	5 (1)	60 (1)	32,9
13	17,5 (0)	3 (0)	35 (0)	248,5
14	17,5 (0)	3 (0)	35 (0)	284,4
15	17,5 (0)	3 (0)	35 (0)	269,1

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

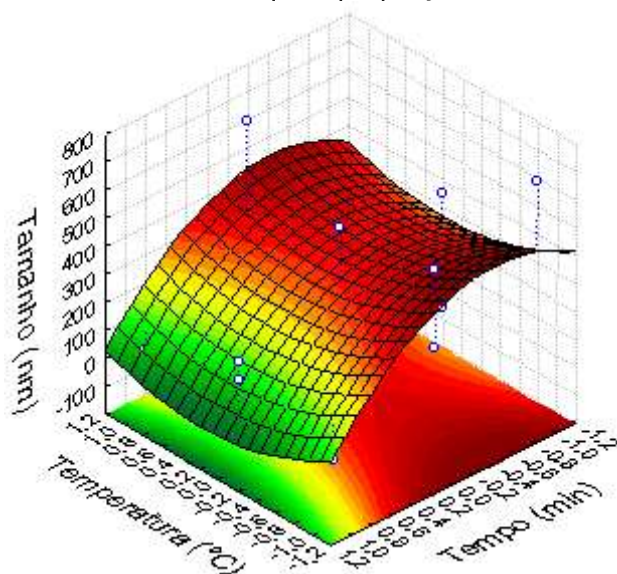
A partir destes dados construiu-se os gráficos de superfície 3D bem como gerou-se a ANOVA (Tabela 4) utilizando-se o *software* Statistica a fim de avaliar as regiões de melhor resposta para a menor NP. As superfícies obtidas podem ser analisadas nas Figura 6, Figura 7 e Figura 8.

Figura 6 – Superfície de resposta 3D identificando a influência da variação da temperatura e proporção na formação das nanoestruturas para tempo fixo em 35 min.



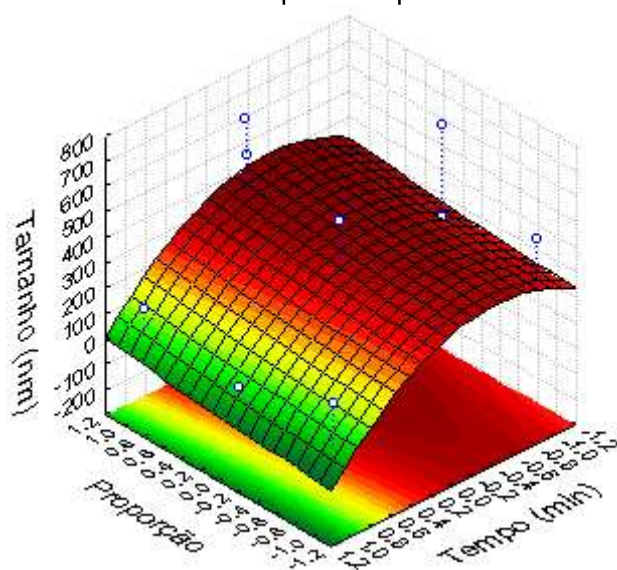
Fonte: Próprio Autor, 2016.

Figura 7 – Superfície de resposta 3D identificando a influência da variação da temperatura e do tempo na formação das nanoestruturas para proporção fixa em 3.



Fonte: Próprio Autor, 2016.

Figura 8 – Superfície de resposta 3D identificando a influência da variação do tempo e da proporção na formação das nanoestruturas para temperatura fixa em 17,5 °C.



Fonte: Próprio Autor, 2016.

Observa-se nas figuras acima que os pontos de interesse se encontram na coloração verde escuro, uma vez que representam os menores tamanhos de nanoestruturas (valores dos eixos podem ser melhor analisados nos gráficos 2D - ANEXO I). Através da superfície plotada, observa-se que quando maior o tempo de gotejamento, ou seja, menor quantidade de líquido for gotejada por tempo, menores

são os tamanhos encontrados para as nanoestruturas. Além disso, a proporção não possui influência significativa na variável resposta e a temperatura ideal é em torno de 17,5 °C.

Tabela 4 – ANOVA dos dados obtidos no software Statistica.

Fator	SS	df	MS	F*	P*
Proporção (L)	49850,1	1	49850,1	2,9201	0,22961
Proporção (Q)	203,1	1	203,1	0,0119	0,92311
Temperatura (L)	1097,7	1	1097,7	0,0643	0,82351
Temperatura (Q)	21486,3	1	21486,3	1,2586	0,37851
Tempo (L)	69710,9	1	69710,9	4,0835	0,18071
Tempo (Q)	87500,0	1	87500,0	5,1256	0,15187
Proporção (L)-Temperatura (L)	7225,0	1	7225,0	0,4232	0,58208
Proporção (L)-Temperatura (Q)	183406,0	1	183406,0	10,7436	0,08182
Proporção (Q)-Temperatura (L)	27234,3	1	27234,3	1,5953	0,33387
Proporção (L)-Tempo (L)	29360,8	1	29360,8	1,7199	0,32004
Proporção (Q)-Tempo (L)	72860,8	1	72860,8	4,2681	0,17482
Temperatura (L)-Tempo (L)	34108,5	1	34108,5	1,9980	0,29307
Erro	34142,4	2	17071,2		
Total SS	657607,1	14			

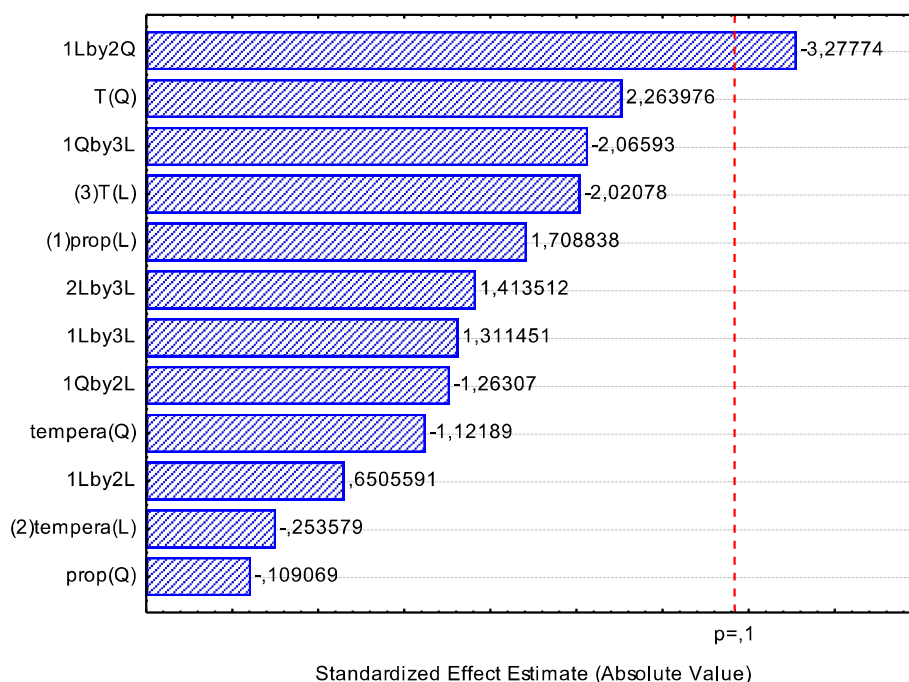
*Significativo ao nível de 10 % de probabilidade.

L: Linear, Q: Quadrática.

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

O teste F apresenta a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} . Sempre que esta relação for maior que 1, a regressão é estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Sabendo que o $F_{\text{Tabelado}} = 2,4344$, nota-se que o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior do que F_{Tabelado} , $10,7436 > 2,4344$. Além disso, outra maneira de avaliar a significância da estatística F é utilizando o p-valor. Caso p-valor for menor que α , a regressão é estatisticamente significativa. Neste mesmo caso, observa-se que o valor de p é inferior ao valor de α (0,10), indicando a relação entre as variáveis proporção, em uma regressão linear, e temperatura para regressão quadrática. Essa afirmação pode ser comprovada observando o Diagrama de Pareto (Figura 9).

Figura 9 – Diagrama de Pareto para produção das nanoestruturas de carbonato de cálcio.



Elaboração: Próprio Autor, 2016.

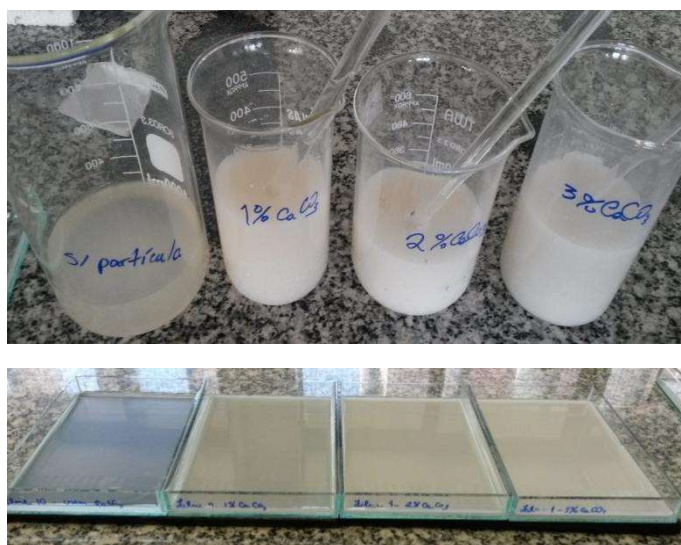
Logo, a partir das análises feitas no software Stastistica, pelas condições utilizadas no experimento e custo energético, as melhores condições avaliadas para produção da nanoestrutura foram de 17,5 °C em uma proporção de 1:1 por 60 min.

Como observado por BABOU-KAMMOE et al. (2012), quanto maior foi a temperatura, maior o tamanho das nanoestruturas formadas, o que pode ser explicado por modificação da solubilidade da calcita e da competição existente entre as fases de nucleação e de crescimento cristalino que ocorrem no processo de cristalização do CaCO_3 , e, quanto maior o tempo de gotejamento, menor o tamanho das partículas encontradas. Esta diminuição do tamanho das nanoestruturas em um maior tempo de mistura pode ser devida ao efeito antagonista do amadurecimento de Ostwald, onde o tamanho médio da partícula começa a aumentar com o tempo de envelhecimento através da dissolução de pequenas partículas e crescimento de grandes partículas (BABOU-KAMMOE et al., 2012).

5.3. Obtenção e caracterização dos Filmes de Goma Tara com Nanoestruturas de Carbonato de Cálcio.

A Figura 10 demonstra a preparação dos filmes de goma tara sem nanoestruturas, e com nanoestruturas na concentração de 1, 2 e 3% através do método de Casting.

Figura 10 – Produção do filme de goma tara sem nanoestruturas, e com nanoestruturas na concentração de 1, 2 e 3% pelo método de Casting, (a) solução filmogênica após a homogeneização; (b) aplicação das soluções em suporte de vidro.



(a)

(b)

Fonte: Próprio Autor, 2016.

A técnica de Casting é a mais empregada e discutida na pesquisa de filmes biodegradáveis (ANDREUCCETTI; CARVALHO; GROSSO, 2009; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007) e por isso foi a opção escolhida. Porém, exige-se um controle rigoroso da forma do suporte e do nível da estufa, para evitar diferenças na espessura provocadas por desníveis durante a secagem e, também, da temperatura, devendo os filmes serem secados a baixas temperaturas para que não quebrem durante a etapa de secagem (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; MOURA et al., 2008).

O tratamento com ultrassom foi realizado com o objetivo de dispersar melhor as nanoestruturas de carbonato de cálcio, conforme pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Filmes com 1% de carbonato de cálcio, (a) não homogeneamente disperso e (b) homogeneamente disperso.



Fonte: Próprio Autor, 2016.

A homogeneidade da solução é importante para que as mesmas características sejam encontradas em todo o filme e evitar o máximo de variação ao longo do mesmo. Portanto, verificou-se que o tratamento com ultrassom é essencial para a obtenção de um filme mais homogêneo.

Apenas as concentrações de 1% e 2% de nanoestruturas de carbonato de cálcio foram escolhidas para a sequência do trabalho, uma vez que o filme com 3% de carbonato de cálcio ficou muito frágil e quebradiço, não sendo possível retirá-lo para realizar as demais análises (Figura 12).

Figura 12 – Filme de goma tara com 3% de nanocarbonato de cálcio.



Fonte: Próprio Autor, 2016.

A Figura 13 ilustra a diferença de opacidade entre os filmes com e sem nanoestrutura. Fator interessante, pelo fato de possibilitar o uso desses filmes opacos em alimentos fotossensíveis.

Figura 13 – Filmes retirados do suporte de vidro com notável diferença na opacidade, (a) filme de goma tara (GT) sem nanoestruturas; (b) filme de GT com 1% de nanocarbonato de cálcio; e (c) filme de GT com 2% de carbonato de cálcio nanoestruturado.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Próprio Autor, 2016.

PADUA; WANG; GENNADIOS (2002) afirmaram que os filmes quando produzidos pela Técnica Casting apresentam formas distintas decorrentes do processo de secagem proporcionando diferenças morfológicas entre os dois lados: o superior em contato com o ar e o inferior em contato com a superfície. Durante a secagem o lado na superfície de contato é mais homogêneo e brilhante resultando

numa microestrutura mais lisa e sem uma característica definida, enquanto o lado em contato com o ar apresenta-se irregular e opaco, com uma microestrutura mostrando depósitos globulares (Figura 13).

5.3.1. Espessura e gramatura

A espessura média do filme foi calculada medindo, aleatoriamente, 6 pontos diferentes com o auxílio de um micrômetro (STARRETT - V436.1MXRL25, Made in PRC), com precisão 0,001 mm e analisada estatisticamente utilizando o *software Origin Pro 8SR4*, a qual está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Espessura média dos filmes de goma tara, em micrômetros e gramatura, em gramas por metro quadrado, presente em cada tipo de filme.

Nanocarbonato (%)	Espessura média dos filmes (μm)	Gramatura (g.m^{-2})
0	$24,17 \pm 2,92^a$	$0,0035 \pm 0,0001^d$
1	$49,61 \pm 1,55^b$	$0,0072 \pm 0,0004^e$
2	$69,83 \pm 4,49^c$	$0,0109 \pm 0,0005^f$

*Resultados expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=3).

** Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

É possível constatar que quanto maior a concentração de nanoestruturas de carbonato de cálcio, maior a espessura do filme para um mesmo volume depositado sobre a placa, sendo os valores médios das diversas condições diferentes entre si pelo Teste Tukey. Acredita-se que a interação da nanoestrutura com a goma tara alterou a conformação tridimensional deste biopolímero, como, por exemplo, através da formação de poros, de forma a torná-lo mais espesso. A uniformidade da espessura de um filme é um parâmetro importante para não influenciar nas análises e determinações das propriedades do material e facilitar comparações dos resultados entre os tratamentos, por isso, para futuras análises, deve-se variar o volume das soluções a serem depositadas em placas a fim de obter espessuras próximas.

O controle da espessura influencia largamente as propriedades mecânicas e de barreiras dos filmes, principalmente a força na perfuração e a permeabilidade ao vapor de água (LÓPEZ et al., 2011; PARK; CHINNAN, 1995; ZAVAREZE et al.,

2012). Além disso, filmes com maior espessura necessitam de maior força para serem rompidos e apresentam maior elongação (MALI et al., 2005), além de possuírem maior opacidade (SOBRAL, 2000). Portanto, observa-se que os filmes com nanoestruturas sugerem apresentar maior força à tração, maior elongação, menor permeabilidade ao vapor de água e, como já observado, maior opacidade.

5.3.2. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Resultados de PVA podem ser úteis para entender os possíveis mecanismos de transferência de massa e interações entre polímeros e soluto em filmes comestíveis (BERTUZZI; VIDAURRE; et al., 2007). A Tabela 6 apresenta os valores médios e os desvios-padrão da permeabilidade ao vapor de água dos filmes, de acordo com a quantidade de nanocarbonato adicionada.

Tabela 6 – Valores de permeabilidade de água médios e desvios-padrão dos filmes de goma tara padrão e adicionados de nanocarbonato nas concentrações de 1% e 2%.

Nanocarbonato (%)	TPVA (g.m ⁻² .dia ⁻¹)	PVA (g.µm.m ⁻² .dia ⁻¹ .mmHg ⁻¹)
0	568,55 ± 5,56 ^a	568,89 ± 73,09 ^b
1	569,68 ± 21,62 ^a	1170,34 ± 80,01 ^c
2	550,87 ± 3,56 ^a	1591,92 ± 116,53 ^d

*Resultados expressos como média ± desvio-padrão (n=3).

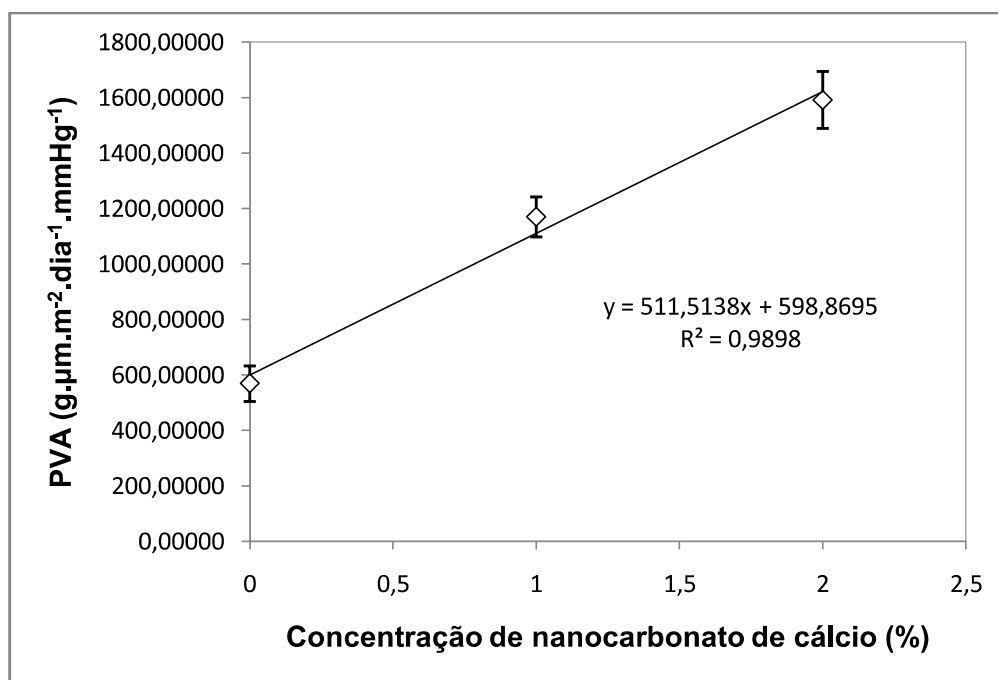
** Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

A transferência de vapor de água geralmente ocorre através da porção hidrofílica do filme, logo, a TPVA depende da relação de componentes hidrofílico-hidrofóbicos dos filmes (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000). Observou-se que mesmo em filmes com nanocarbonato, hidrofóbico, não houve diferença significativa (teste Tukey 5% de probabilidade) nas taxas de transferência de vapor de água. Porém, diferentemente do encontrado em outros estudos (RIBEIRO, W. X., 2014) e do esperado, quanto maior foi a concentração de nanocarbonato, maior a permeabilidade ao vapor de água, mesmo que estes apresentem maiores espessuras. Além disso, observa-se que houve um aumento linear no valor da PVA em relação ao aumento da concentração de nanocarbonato de cálcio no filme

(Figura 14). Sugere-se que a nanoestrutura provocou maior porosidade na estrutura do filme que deve ser comprovada pela microscopia eletrônica de varredura.

Figura 14 – Relação entre PVA e concentração de nanocarbonato de cálcio (%). A regressão linear foi a mais adequada para este caso, resultando em um $R^2=0,9898$, próximo à 1.



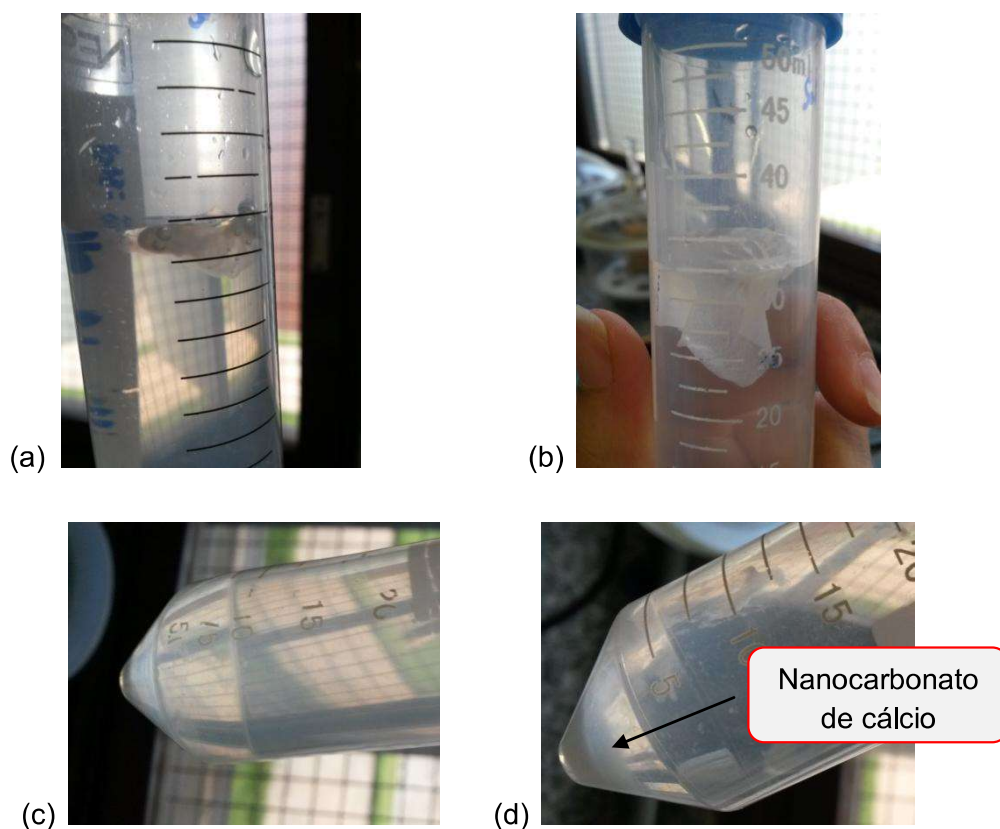
Elaboração: Próprio Autor, 2016.

OCUNO; SOBRAL (2000) afirmam que um material muito permeável ao vapor de água pode ser indicado para embalagens de vegetais frescos, enquanto um filme pouco permeável pode ser indicado para produtos desidratados, por exemplo.

5.3.3. Solubilidade em água e teor de umidade nos filmes.

A Figura 15 mostra a interação dos diferentes tipos de filme com a água antes e após 24 horas de agitação, sendo que a solubilidade destes está apresentada na Tabela 7.

Figura 15 – Filmes de goma tara antes da agitação sem nanoestruturas (a) e com nanocarbonato de cálcio (b), e após agitação, sem nanoestruturas (c) e com nanocarbonato de cálcio (d).



Fonte: Próprio Autor, 2016.

Tabela 7 – Solubilidade média dos filmes de goma tara com nanocarbonato na concentração de 0, 1 e 2% p.p⁻¹ e seu respectivo desvio padrão.

Nanocarbonato (%)	Solubilidade (%)
0	97,39 ± 2,94 ^a
1	51,30 ± 1,89 ^b
2	36,44 ± 2,23 ^c

*Resultados expressos como média ± desvio-padrão (n=3).

** Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

A solubilidade possui uma ligação direta com os componentes estruturais do filme, portanto, como já era esperado, constatou-se que a goma tara possui grande solubilidade em água, sendo o valor encontrado 97.39 ± 0.05 %. Já o nanocarbonato de cálcio possui caráter hidrofóbico (VASSEN, 2015), como constatado na Figura 15, logo a solubilidade dos demais filmes foi menor se comparada ao filme sem esta nanoestrutura, sendo assim considerado o menos hidrofílico. O decréscimo da

solubilidade em água pode ser um indicativo bastante interessante da maior estabilidade desses materiais às diferentes condições ambientais (DEBIAGI et al., 2010).

Todos os filmes produzidos apresentaram-se desintegrados quando, após 24 horas, foram retirados da imersão em água, indicando que a rede não se manteve intacta. A adição de plastificantes tem uma grande influência sobre a solubilidade de filmes, devido ao seu caráter hidrófilo, pois o plastificante interage fortemente com a água, adicionando-a à rede do filme através de ligações de hidrogênio (MÜLLER et al., 2008). Além disso, o plastificante pode interagir com a matriz polimérica, aumentando o espaço entre as cadeias, facilitando a migração de água para a matriz e, por conseguinte, aumentando a solubilidade (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2012; MEHYAR; HAN, 2004).

A solubilidade dos biofilmes é uma característica importante que está relacionada ao tipo de aplicação e é influenciada também pelos componentes da formulação. Em alguns casos, é desejado um filme que seja solúvel em água, como por exemplo, para encapsulação de alimentos, aditivos ou medicamentos, enquanto que em algumas aplicações deseja-se um filme que seja parcialmente solúvel em água, como na produção de fertilizantes de liberação lenta. Por outro lado, muitas aplicações demandam filmes que sejam insolúveis, para proteger a integridade do produto embalado e conferir resistência à água (BERTUZZI; ARMADA; GOTTIFREDI, 2007).

O teor de umidade presente nos filmes está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 – Teor de umidade médio presente nos três tipos de filmes (0, 1 e 2% de nanocarbonato de cálcio) e seu respectivo desvio padrão.

Nanocarbonato (%)	Teor de Umidade (%)
0	15,36 ± 1,03 ^b
1	9,14 ± 0,88 ^a
2	9,00 ± 0,56 ^a

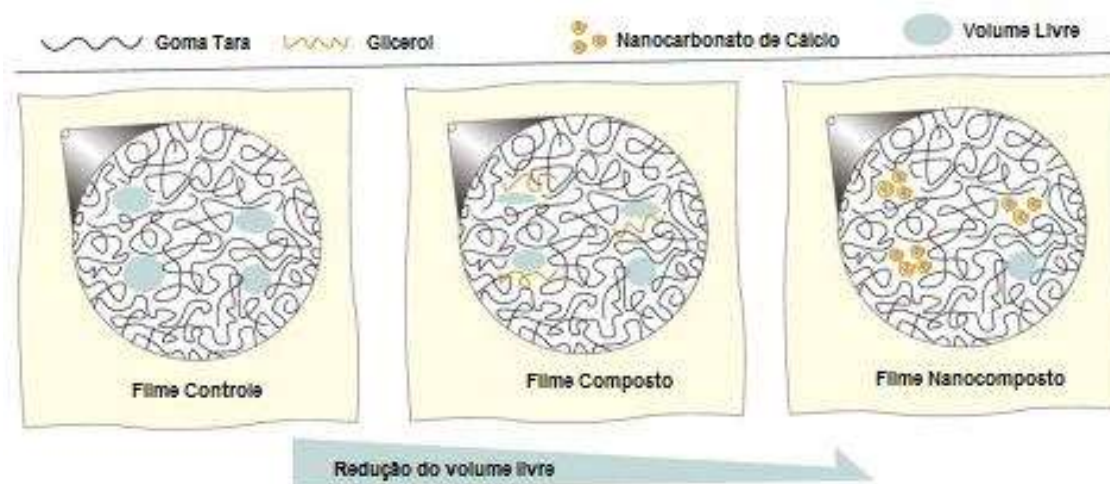
*Resultados expressos como média ± desvio-padrão (n=3).

** Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

É notório que com a adição de nanocarbonato há uma redução de aproximadamente 59% no teor de umidade no filme, sendo comprovado pelo teste de Tukey que os filmes com 1 e 2% não são significativamente diferentes. Isso pode ser explicado pelo fato de que quando nanoestruturas são incorporadas ao filme, reduz-se o volume livre no mesmo (Figura 16). Além disso, acredita-se que a estrutura compacta de nanoestruturas permitiu que menos grupos hidroxila da cadeia GT expostas se ligassem com moléculas de água.

Figura 16 – Redução do volume livre em filmes de Goma Tara quando nanoestruturas são adicionadas em sua composição.



Fonte: Adaptado de ANTONIOU et al. (2015).

Constata-se que com a inserção de nanocarbonato de cálcio, maior foi a PVA e menor foi o teor de umidade presente no filme, além de que se observou que o filme com essas nanoestruturas possivelmente possui caráter higroscópico. Quando deixado à temperatura ambiente há uma tendência neste em se contorcer. Supõe-se que esse nanocompósito tende a ser mais permeável ao vapor de água devido a essas características supracitadas. O resultado identificado, maior concentração de nanocarbonato relacionado à menor umidade nos filmes, é similar ao encontrado por RIBEIRO, W. X. (2014) em filmes à base de zeína.

5.3.4. Propriedades Mecânicas

Os dados obtidos para a resistência máxima à tração ($R_{\text{máx}}$) e porcentagem de alongação (%E) encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Resistência máxima à tração ($R_{\text{máx}}$) e porcentagem de alongação (%E) e desvios-padrão dos filmes (0, 1 e 2% de nanocarbonato de cálcio).

Nanocarbonato (%)	$R_{\text{máx}}$ (Mpa)	Elongação (%)
0	$38,012 \pm 9,163^a$	$2,7002 \pm 0,4008^c$
1	$9,3731 \pm 1,4748^b$	$11,2096 \pm 2,0712^d$
2	$5,6843 \pm 1,6534^b$	$10,7751 \pm 1,5288^d$

* Resultados expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=3).

** Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Elaboração: Próprio Autor, 2016.

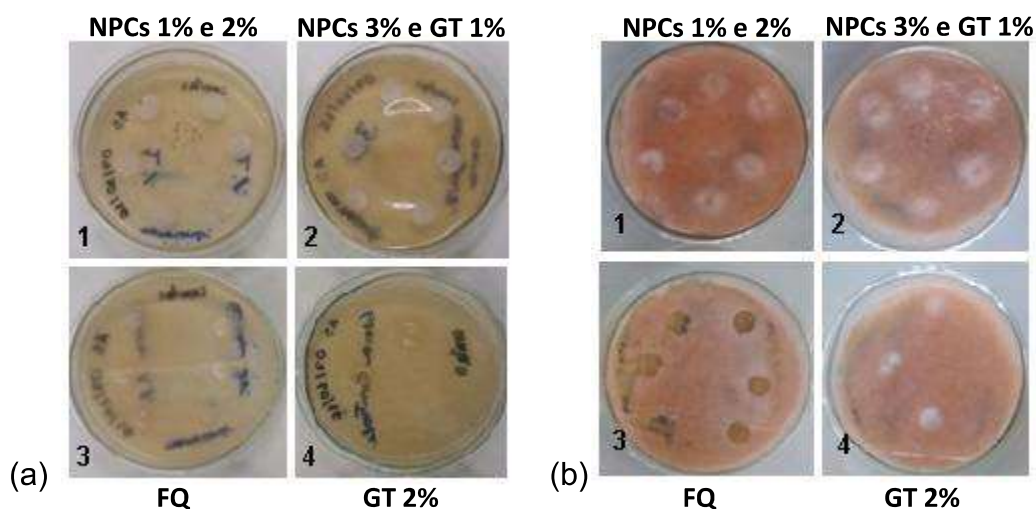
A tensão na ruptura indica a tensão máxima que o filme pode suportar, antes de se romper, já a alongação na ruptura é a variação máxima de comprimento de uma amostra de teste, submetido a uma tensão, antes de se romper (PEREDA; AMICA; MARCOVICH, 2012). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, nota-se que quando se adiciona carbonato de cálcio nanoestruturado, há uma redução na $R_{\text{Máx}}$ e um aumento no valor de E, não havendo diferença significativa para as concentrações de 1 e 2 % de CaCO_3 (teste Tukey). Segundo MATTA JUNIOR (2009), geralmente, quando a estrutura do filme torna-se menos rígida, as propriedades de resistência/tensão são reduzidas e o alongamento aumenta. Um alongamento maior indica que o filme é mais flexível. Portanto, a adição do nanocarbonato resultou em materiais mais elásticos e flexíveis, porém menos resistentes se comparados com o filme na ausência deste.

Comportamento similar foi evidenciado por RIBEIRO, W. X. (2014) em filmes de zeína acrescidos desta mesma nanoestrutura. RIBEIRO, W. X. (2014) afirma que esse desempenho se deve à presença de grandes glóbulos de gordura na estrutura identificados nas micrografias realizadas pela autora.

5.4. Avaliação da Atividade Antifúngica das nanoestruturas e do biofilme *in vitro*

Constata-se na Figura 17b que não houve formação de halo de inibição em nenhuma das soluções de nanocarbonato aplicadas sobre o papel filtro, e houve crescimento do fungo por cima do filme de GT com nanocarbonato. JEONG et al. (2007) afirma que o nanocarbonato possui atividade antibacteriana para a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, porém como é observado nesta figura, este não apresentou atividade antifúngica para o fungo estudado. É necessário realizar outros testes, como, por exemplo, testes em meio líquido e com outros microorganismos, a fim de se observar a ação dessa nanoestrutura.

Figura 17 – Avaliação da atividade antifúngica do nanocarbonato de cálcio nas concentrações 1, 2 e 3% (NPCs 1%, NPC 2% e NPC 3%), de filmes de goma tara com nanoestruturas de carbonato de cálcio 1 e 2% (GT 1%, GT 2%) e filmes de quitosana (FQ) como controle, antes da incubação (a) e após a incubação (b).



Fonte: Próprio Autor, 2016.

6. CONCLUSÃO

A partir das análises feitas no software Stastistica utilizando planejamento Box-Benhken, as melhores condições para produção da nanoestrutura foram de 17,5 °C em uma proporção de 1:1 por 60 min. O desenvolvimento de embalagens comestíveis com incorporação de nanoestruturas possibilitará o desenvolvimento de produtos de maior valor fisiológico e nutritivo; o aumento das vendas e valorização do produtor de goiaba, através da redução da perda de goiaba pós-colheita e da inserção de novos produtos; a otimização do aproveitamento da goiaba, agregando-se um melhor aproveitamento à matéria-prima e ao valor dos componentes básicos disponíveis; a melhora no rendimento e aumento da exportação “*in natura*” da goiaba.

Como se pode observar, em filme de GT com nanoestruturas de carbonato de cálcio incorporadas houve redução da tensão, da solubilidade em água, do teor de umidade presente no filme, maiores espessuras e gramatura para um mesmo volume de filme depositado na placa, aumento da elongação, porém não apresentou propriedades antimicrobianas. Em relação à permeabilidade ao vapor d'água (PVA), diferente do que era esperado, houve um crescimento linear com a concentração do nanocarbonato. Supõe-se que com a adição de nanoestruturas, houve formação de poros no filme, o que pode explicar alguns dos resultados nos testes supracitados, porem isso deve ser confirmado com uma microscopia ótica de varredura. Acredita-se que estes testes devem ser repetidos em filmes com espessuras similares, a fim de obter maior confiabilidade na comparação entre os mesmos.

Trabalhos adicionais devem ser realizados para a compreensão do processo de dispersão da nanoestrutura na GT e a avaliação da aplicação deste filme “*in vivo*”. Sugere-se o estudo da viabilidade de aplicação deste nanocompósito para outras finalidades, como por exemplo, a utilização como membranas de filtração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 13-21, 2012.

ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatol. Bras**, v. 32, n. 1, p. 22, 2007.

ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1113-1121, 2009.

ANTONIOU, J. et al. Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 309-319, 2015.

ANUAR, I. S. M.; VIJAYA, S. I.; ZAKARIA, L. Molecular characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* sp. from guava. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, n. 13, p. 1549-1556, 2014.

ARAUZ, L. F. Mango Anthracnose: economic Impact and Current Options For Integrated Managaement. **Plant disease**, v. 84, n. 6, p. 600-611, 2000.

ASSIS, L. M. D. et al. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of food technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

ASSIS, O. B. G.; DE BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações/Review: edible protective coatings for fruits: fundamentals and applications. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87, 2014.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material E 96-95. In: ASTM (Ed.). **Annual book of ASTM standards**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1995. p.96.

ASTM. Standard test method for static modulus of elasticity and Poisson's ratio of concrete in compression. In: ASTM (Ed.). **Annual book of ASTM standards**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, v.4, 2002.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **J Appl Genet**, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

AZEREDO, H. M. C. D.; FARIA, J. D. A. F.; BRITO, E. S. D. Embalagens e suas interações com os alimentos. In: TECNOLÓGICA, E. I. (Ed.). **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2ª ed. Brasília, DF, 2012.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Extração e caracterização da galactomanana de sementes de caesalpinia pulcherrima. **Polímeros**, v. 9, n. 2, p. 54-59, 1999.

AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Indices to evaluate postharvest quality of guavas under different maturation stages. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2004.

BABOU-KAMMOE, R. et al. Synthesis of CaCO₃ nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions. **The Canadian journal of chemical engineering**, v. 90, n. 1, p. 26-33, 2012.

BALDWIN, E. A.; HAGENMAIER, R.; BAI, J. **Edible coatings and films to improve food quality**. CRC Press, 2011. ISBN 1420059629.

BENSHITRIT, R. C. et al. Development of oral food-grade delivery systems: Current knowledge and future challenges. **Food & Function**, v. 3, n. 1, p. 10-21, 2012.

BERTUZZI, M. A.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Physicochemical characterization of starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 17-25, 2007.

BERTUZZI, M. A. et al. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of food engineering**, v. 80, n. 3, p. 972-978, 2007.

BILBAO-SAINZ, C. et al. HPMC reinforced with different cellulose nano-particles. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1549-1557, 2011.

BLASCO, C.; PICO, Y. Determining nanomaterials in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 84-99, 2011.

BOUWMEESTER, H. et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 52-62, 2009.

CARVALHO, C. D. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2010**. 2010. 128p.

CEAGESP. **Classificação da goiaba (Psidium guajava L.)**. São Paulo: Centro de Qualidade em Horticultura, 2000.

CERQUEIRA, M. A. et al. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 12, p. 662-671, 2011.

CERQUEIRA, M. A. et al. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate polymers**, v. 75, n. 3, p. 408-414, 2009.

CERQUEIRA, M. A. et al. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 179-185, 2011.

CHANG, P. R. et al. Preparation and properties of glycerol plasticized-starch (GPS)/cellulose nanoparticle (CN) composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 301-305, 2010.

CHAU, C.-F.; WU, S.-H.; YEN, G.-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L.; WATKINS, R. **Nanotechnologies in the Food Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns. Nanotechnologies in food**. RSC Nanoscience & Nanotechnology: Royal Society of Chemistry Publishers. 14: 1-17 p. 2010.

CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food additives and contaminants**, v. 25, n. 3, p. 241-258, 2008.

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch–Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. **Food hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 59-67, 2012.

CHIVRAC, F.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Progress in nano-biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2009.

CHOUDHRY, M. M.; COSTA, T. S. D.; ARAÚJO, J. L. P. **Agronegócio da Goiaba**. EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001.

CORRÊA, S. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2008**. 2008. 136p.

DEBIAGI, F. et al. Efeito de fibras vegetais nas propriedades de compósitos biodegradáveis de amido de mandioca produzidos via extrusão. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 34, n. 6, p. 1522-1529, 2010.

EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. **Edible films and coatings for food applications**. Springer, 2009. ISBN 0387928235.

FAO. **Tropical Fruits Compendium**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. ISBN 92-5-105349-9.

FARIA, E. M. D. et al. Nanotecnologia e meio ambiente: uma análise sobre os riscos e benefícios dessa tecnologia em um contexto atual. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 18-26, 2013.

FEICHTENBERGER, E. et al. Doenças dos citros (Citrus spp.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, v. 4, p. 239-269, 2005.

FERRARI, J. T. et al. Antracnose associada às fruteiras, 2011. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/antracnose/index.htm>. Acesso em: 10 de Outubro.

FERRAZ, D. M. M. **Controle da antracnose (Colletotrichum gloeosporioides) em pós-colheita da goiaba (Psidium guajava), produzida em sistema de cultivo convencional e orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotermia e cloreto de cálcio**. 2010. 103p. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of Colletotrichum species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

FSANZ. **Tara gum as a food additive**. New Zealand, Austrália: Food Standards Australia New Zealand, 2006.

FUGAZZA, J. **Estudo da toxicidade aguda e crônica de nanopartículas de óxido de cromo iii sobre o microcrustáceo marinho mysidopsis juniae (SILVA, 1979)**. 2015. 90 Dissertação (mestrado) Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Joinville/SC.

GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Journal of food science**, v. 65, n. 6, p. 941-944, 2000.

GIANCONE, T. et al. Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 89, n. 2, p. 195-203, 2008.

GILL, K. S. et al. Enhancing postharvest shelf life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda by pre-harvest application of hexanal containing aqueous formulation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 224-232, 2016.

GONZAGA NETO, L. **Produção de goiaba**. Fortaleza – CE 2007. 64p.

GREINER, R. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. **Nutrire-Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, n. 1, p. 243-260, 2009.

GUERRERO, D. Q. et al. **Composition of solid lipid nanoparticles for the long-term conservation of fruits, vegetables, seed, cereals and/or fresh foodstuffs using a coating**. United States. MEXICO, U. N. A. D. Mexico. US 2014/0205722 A1, 2014.

HANDFORD, C. E. et al. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 226-241, 2014.

HARUTA, S. et al. An effective absorption behavior of insulin for diabetic treatment following intranasal delivery using porous spherical calcium carbonate in monkeys and healthy human volunteers. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2003.

HUANG, S. et al. Effects of nano calcium carbonate and nano calcium citrate on toxicity in ICR mice and on bone mineral density in an ovariectomized mice model. **Nanotechnology**, v. 20, n. 37, p. 375102, 2009.

HYDE, K. D. et al. Colletotrichum: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 1-17, 2009.

JEONG, M. S. et al. Characterization of antibacterial nanoparticles from the scallop, *Ptinopecten yessoensis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2242-2247, 2007.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Controle das doenças da goiabeira. **Controle de doenças de plantas—Fruteiras**, v. 2, p. 1247-1277, 2002.

KIST, B. B. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2012**. 2012. 128p.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, D. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food technology (USA)**, 1997.

KUAN, C.-Y. et al. Nanotech: propensity in foods and bioactives. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 1, p. 55-71, 2012.

LIMA, M. A. C. D.; ASSIS, J. S. D.; GONZAGA NETO, L. Caracterização dos frutos de goiabeira e seleção de cultivares na região do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 273-276, 2002.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 291-337, 2001.

LÓPEZ, O. V. et al. Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 254-263, 2011.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. D.; MATTOSO, L. H. C. Nanocomposite of papaya puree and chitosan nanoparticles for application in packaging. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 931-936, 2014.

MALI, S. et al. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 157-164, 2005.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MARTIN, A. **Industrialização da goiaba**. Boletim do Centro Tropical de Pesquisa de Alimentos. 12: 37-54 p. 1967.

MATTA JUNIOR, M. D. **Caracterização de biofilmes obtidos a partir de amido de ervilha (*Pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol**. 2009. 110 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MEHYAR, G. F.; HAN, J. H. Physical and mechanical properties of high-amylose rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 9, p. 449-454, 2004.

MORARU, C. I. et al. Nanotechnology: a new frontier in food science. **Food Technology**, v. 57, 2003.

MOURA, M. R. D. et al. Properties of Novel Hydroxypropyl Methylcellulose Films Containing Chitosan Nanoparticles. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, p. N31-N37, 2008.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 82-87, 2008.

NGUYEN, P. T. H. et al. Identification of Colletotrichum species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, n. 1, p. 73-87, 2010.

NOVAES, S. F. D. et al. **Influência das novas tecnologias de conservação sobre os alimentos de origem animal**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 9: 1-21 p. 2012.

NUNES, D. M.; GUIVANT, S. J. Nanofood: “crer sem ver”. 2008. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro4/cd/ARQUIVOS/GT11-239-57-20080510215355.pdf>>. Acesso em: 20 de Outubro.

OCUNO, D.; SOBRAL, P. J. A. Permeabilidade ao Vapor de Água de Biofilmes à Base de Proteínas Miofibrilares de Carne. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 11-16, 2000.

PADUA, G. W.; WANG, Q.; GENNADIOS, A. **Protein-Based Films and Coatings**: CRC Press, Boca Raton, 2002.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of food engineering**, v. 25, n. 4, p. 497-507, 1995.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1318-1325, 2012.

PERES, N. A. R. et al. Identification and Characterization of *Colletotrichum* spp. affecting Fruit after Harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 33-43, 2010.

PICCININ, E. et al. Doenças da goiabeira (*Psidium guajava*). **Manual de Fitopatologia**, v. 2, p. 401-405, 2005.

PICOUT, D. R. et al. Pressure cell assisted solution characterization of polysaccharides. 1. Guar gum. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1301-1309, 2001.

PINHEIRO, A. C. et al. Rheological characterization of κ -carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 392-399, 1/10/ 2011.

POLL, H. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2013**. 2013. 136p.

POLLARD, M. A. et al. Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate polymers**, v. 79, n. 1, p. 70-84, 2010.

POLLARD, M. A.; FISCHER, P. Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans—What is the quantitative basis? **Current opinion in colloid & interface science**, v. 11, n. 2, p. 184-190, 2006.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

REETZ, E. R. et al. **Anuário brasileiro da Fruticultura 2014**. 2014. 136p.

REETZ, E. R. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2007**. 2007. 136p.

REETZ, E. R. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2009**. 2009. 128p.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L., et al (Ed.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 52, p.457-465.

RIBEIRO, W. X. **Caracterização de biofilme à base de zeína e ácido oléico adicionado de nanocarbonato**. 2014. 55 Dissertação (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

RIGON, L. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2005**. 2005. 136p.

RISSE, L. Individual film wrapping of Florida fresh fruit and vegetables. International Symposium on Postharvest Handling of Fruit and Vegetables 258, 1988. p.263-270.

ROSA, G. R. D. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2006**. 2006. 136p.

ROZWALKA, L. C.; ALVES, E.; AMARAL, D. C. Ultrastructural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. **Interciencia**, v. 35, n. 12, p. 912-915, 2010.

ROZWALKA, L. C. et al. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SEBRAE. O cultivo e o mercado da goiaba. 2016. Disponível em: < <https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-goiaba,d3aa9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em: 03 de Outubro.

SEKHON, B. S. Food nanotechnology – an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 3, p. 1-15, 05/04/2010.

SEMENOVA, M. G. Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 1, p. 23-45, 2007.

SERRA, I. M. R. D. S. et al. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, v. 37, p. 42-51, 2011.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 854-867, 2012.

SINGH, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. Prolonging storability of Indian gooseberry (*Emblica officinalis*) under semi-arid ecosystem of Gujarat. **Indian journal of agricultural science**, v. 75, n. 10, p. 647-650, 2005.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 3, p. 339-350, 2005.

SOARES-COLLETTI, A. R. **Doenças quiescentes em goiabas: quantificação e controle pós-colheita**. 2012. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba.

SOARES, N. D. F. F. et al. Embalagem ativa na conservação de alimentos. In: TECNOLÓGICA, E. I. (Ed.). **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2ª ed. Brasília, DF, 2012.

SOBRAL, P. J. D. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 84-95, 2007.

SOUZA, A. D. **Caracterização molecular e patogênica de isolados de Colletotrichum spp. associados a sintomas de antracnose em mangueiras**. 2011. x, 91p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

STRACIERI, J. **Caracterização morfocultural e molecular de Colletotrichum spp. associados a antracnose em manga, mamão e goiaba** 2015. ix,109p. Tese

(Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

SUTTON, B. C.; BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. **Colletotrichum: biology, pathology and control.**, p. 1-26, 1992.

TAVARES, G. M. et al. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, n. 1, p. 5-20, 2014.

TAVARES, S. C. C. D. H.; LIMA, M. F. **Goiaba: fitossanidade.** 2001.

TAYLOR, J. W. Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of mitosporic and meiosporic fungi. **Canadian journal of botany**, v. 73, n. S1, p. 754-759, 1995.

TORRES, F. G. et al. Biodegradability and mechanical properties of starch films from Andean crops. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 603-606, 2011.

TOZZE JÚNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de Colletotrichum associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil.** 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba.

TREICHEL, M. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2016.** 2016. 88p.

UENO, Y. et al. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 1, p. 93-98, 2005.

USKOKOVIĆ, V. Nanotechnologies: What we do not know. **Technology in Society**, v. 29, n. 1, p. 43-61, 2007.

VALÁŠKOVÁ, M. et al. Preparation and characterization of antibacterial silver/vermiculites and silver/montmorillonites. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 74, n. 22, p. 6287-6300, 2010.

VASSEN, A. B. **EFEITOS DA ADIÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO NANOPARTICULADO NAS PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DO MTA.** 2015. 60 p. Mestrado Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

VILA, M. T. R. et al. Chemical and biochemical characterization of guavas stored under refrigeration and modified atmosphere. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1435-1442, 2007.

WAYCHUNAS, G. A. Structure, aggregation and characterization of nanoparticles. **Reviews in Mineralogy and geochemistry**, v. 44, n. 1, p. 105-166, 2001.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in mycology**, v. 73, p. 115-180, 2012.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of food science**, v. 71, n. 9, 2006.

WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. **HortScience**, v. 27, n. 2, p. 94-98, 1992.

XISTO, A. L. R. P. et al. Texture of Pedro Sato guavas submitted to the application of calcium chloride. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 113-118, 2004.

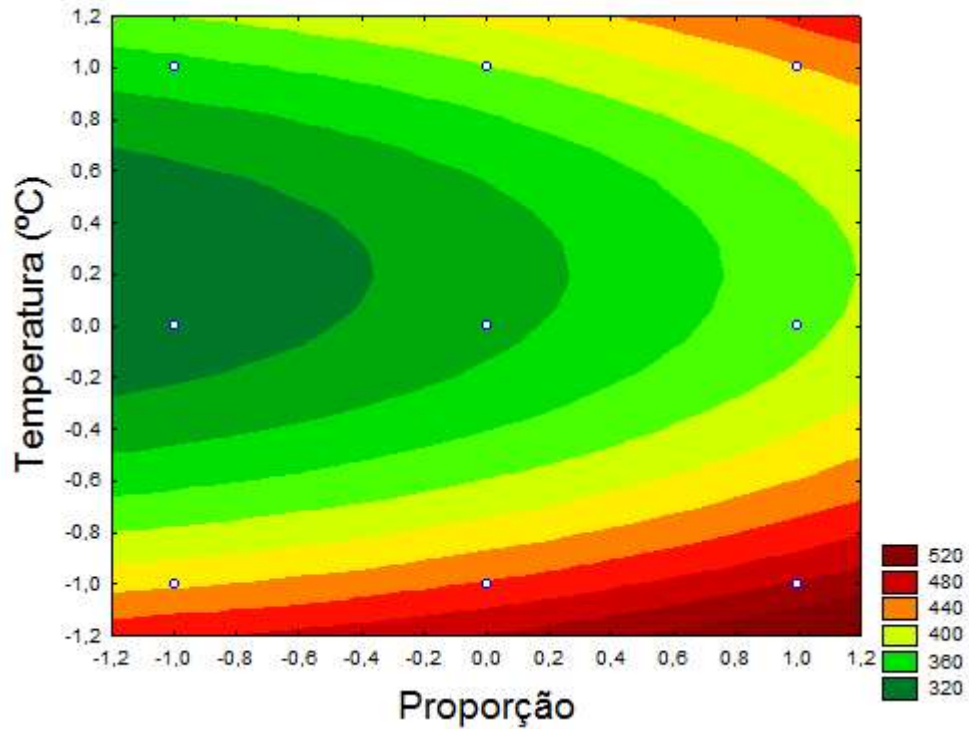
YAMASHITA, F.; BENASSI, M. D. T. Influência da embalagem de atmosfera modificada e do tratamento com cálcio na cinética de degradação de ácido ascórbico e perda de massa em goiabas (*Psidium guajava*, L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2000.

YAMASHITA, F. et al. Embalagem ativa para frutos de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology (ITAL)**, v. 9, n. 2, p. 95-100, 2006.

ZAVAREZE, E. D. R. et al. Development of oxidised and heat-moisture treated potato starch film. **Food chemistry**, v. 132, n. 1, p. 344-350, 2012.

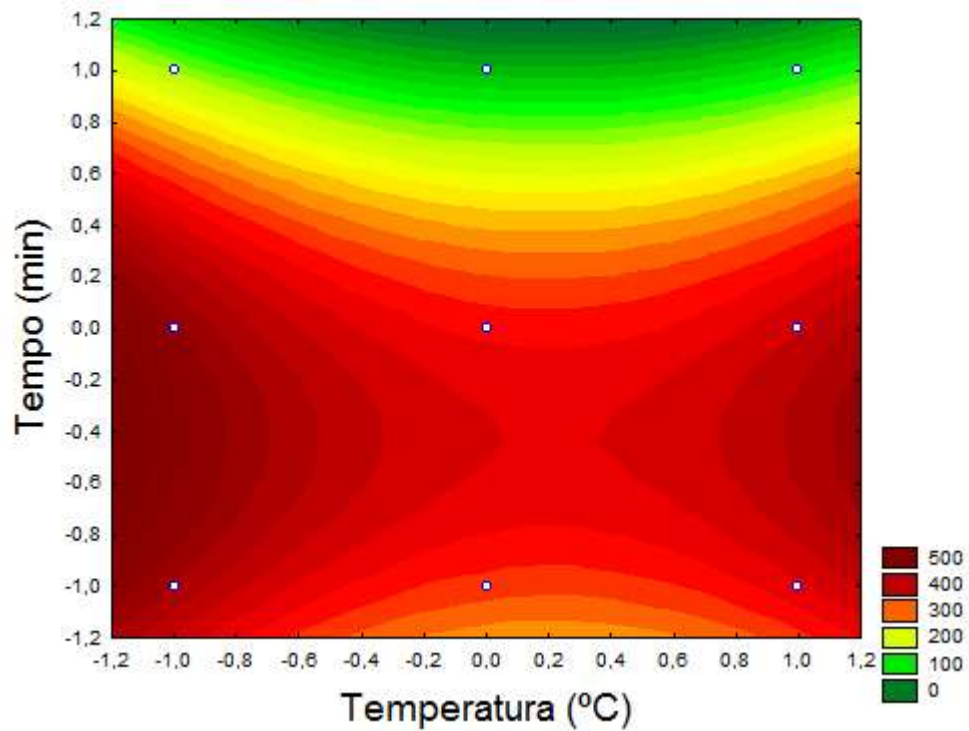
ANEXO

Figura 18 – Superfície de resposta 2D identificando a influência da variação da temperatura e proporção na formação das nanoestruturas para tempo fixo em 35 min.



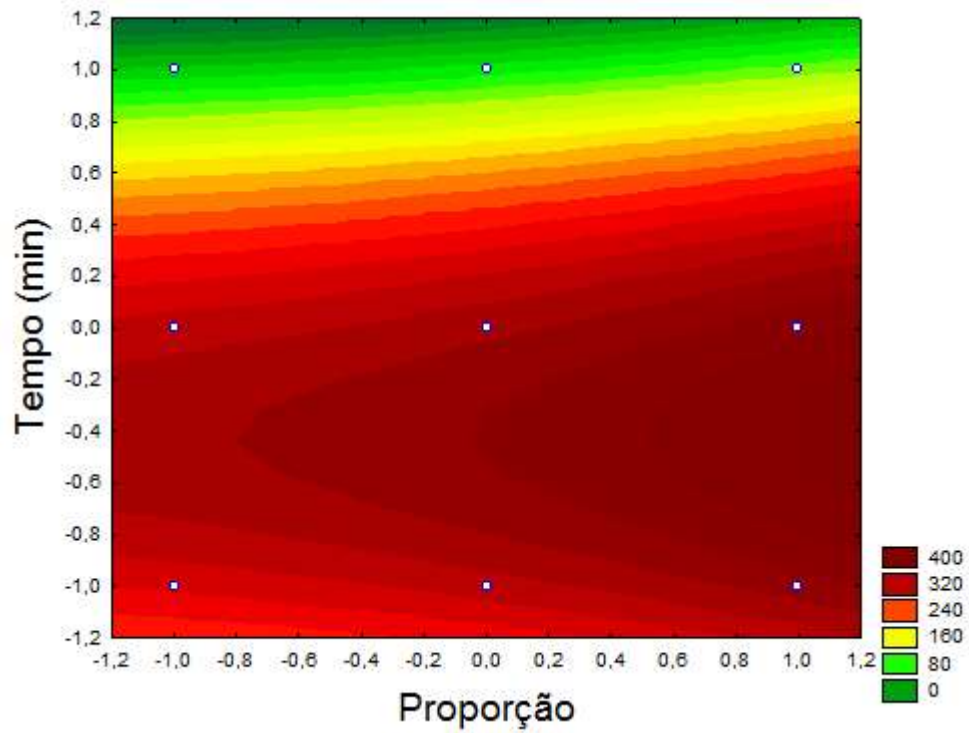
Fonte: Próprio Autor, 2016.

Figura 19 – Superfície de resposta 2D identificando a influência da variação da temperatura e do tempo na formação das nanoestruturas para proporção fixa em 3.



Fonte: Próprio Autor, 2016.

Figura 20 – Superfície de resposta 2D identificando a influência da variação do tempo e da proporção na formação das nanoestruturas para temperatura fixa em 17,5 °C.



Fonte: Próprio Autor, 2016.