



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE EMBALAGEM ATIVA PARA QUEIJO MARINHAS

Por

Joana Maria de Pinho Leão Fernandes

Novembro, 2013



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE EMBALAGEM ATIVA PARA QUEIJO MARINHAS

ACTIVE PACKAGING SYSTEM DEVELOPMENT TO MARINHAS CHEESE

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Joana Maria de Pinho Leão Fernandes

Local: Lacticínios Marinhas

Orientação: Doutora Fátima Poças

Novembro, 2013

RESUMO

O Queijo é um alimento que faz parte da dieta humana há milhares de anos, é sólido e é feito a partir do leite de vacas, cabras, ovelhas e/ou outros mamíferos. Existem centenas de tipos de queijos produzidos em todo o mundo, entre os quais, o queijo Marinhas.

O queijo Marinhas diferencia-se pelo seu sabor característico e inconfundível, trata-se de um queijo artesanal, sem adição de produtos químicos antifúngicos. No entanto, a empresa produtora atualmente depara-se com um problema de conservação do queijo devido ao aparecimento de bolores à sua superfície.

As propriedades dos revestimentos de quitosano sobre a atividade antimicrobiana têm sido intensamente estudada como relatado na literatura (Balicka-Ramisz et al 2005; Raafat et al 2008; Dutta et al 2012). Este pode ser aplicado como revestimento diretamente sobre o alimento ou associado a outros materiais. O quitosano representa um bom exemplo de uma embalagem ativa.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do quitosano no revestimento de queijo Marinhas, por forma a evitar o desenvolvimento de fungos de superfície. Usaram-se ferramentas de análise de imagem, o CellProfiler (www.cellprofiler.org) para avaliar o desenvolvimento de bolores.

O queijo Marinhas foi submetido a testes de caracterização das suas propriedades físico-químicas. O fungo foi identificado através de testes de ADN, realizados na Biopremier, como sendo *penicillium raistrickii*.

Por forma a avaliar o efeito do revestimento de quitosano no desenvolvimento do fungo, foram seguidas duas abordagens diferentes. Na primeira foram colocadas placas de agar de extrato de levedura em contato com o papel revestido com o quitosano em diferentes concentrações. Estas experiências foram realizadas na Escola Superior de Biotecnologia. Na segunda abordagem o revestimento de quitosano foi aplicado diretamente no queijo. Estas experiências foram realizadas na Escola Superior de Biotecnologia e na empresa Lacticínios das Marinhas

Nas experiências com placas (na primeira abordagem experimental), verificou-se que o aparecimento do fungo é retardado. Na segunda abordagem não se verificou o mesmo. Nas experiências conduzidas em queijo, não foi possível observar um efeito positivo do quitosano na inibição ou retardação do crescimento do fungo do queijo. Conclui-se assim que a aplicação deste revestimento não resolve o problema do aparecimento de bolores no queijo Marinhas devendo ser seguida uma abordagem alternativa.

Palavras-chave: Queijo Marinhas; fungos; quitosano; CellProfiler

ABSTRACT

The cheese is a food that makes part of human diet for thousands of years, is solid and is made from cows, goats, sheep and/or other mammal's milk. There are hundreds of cheese types produced around the world, including the Marinhas cheese.

Marinhas cheese differentiates itself by its distinctive and unmistakable flavor, this is a handmade cheese without anti-mold chemicals adding. However, the production company currently faces a cheese conservation problem due to mold appearing on its surface.

The properties of chitosan coatings regarding antimicrobial activity have been intensively studied as reported in published literature (Balicka-Ramisz et al. 2005; Raafat et al. 2008; Dutta et al. 2012). It can be applied as coating directly on the food or associated with others materials. Chitosan represents a good example of an active packaging.

This work aimed at studying the effect of chitosan coating on Marinhas cheese on protecting surface mold development. To evaluate the mold development, it was used image analyses tools, CellProfiler (www.cellprofiler.org).

The Marinhas cheese has been subject to physico-chemical properties characterization tests. The fungus was also identified through DNA testing performed by Biopremier as being *Penicillium raistrickii*.

In order to evaluate the chitosan coating effect on fungal growth, two different approaches were followed. In the first, at Biotechnology Superior School, a yeast extract agar plates were placed in contact with paper coated with different chitosan concentrations. In the second, at Biotechnology Superior School and at Lactícínios das Marinhas factory, chitosan coating was applied directly on the cheese.

In experiments with plates (first experimental approach), it was verified that fungus appearing is delayed and the temperature played an important role. In the second approach doesn't happened the same. In the cheese experiences, wasn't possible verify a positive effect on surface mold inhibition or retardment. Therefore, it's conclude that this coating application doesn't solve the mold appearance on cheese Marine problem, so an alternative approach should be followed.

Key words: Marinhas cheese; mold; chitosan; CellProfiler

AGRADECIMENTOS

Gostava de expressar o meu agradecimento para com todas as pessoas que me encorajaram durante estes dois anos de realização do presente trabalho e me mostraram o verdadeiro significado desta fase da minha vida. Em especial o ânimo que me foi dado em todos os momentos em que queria desistir, e me souberam dizer as palavras certas para que seguisse em frente.

À Professora Fátima Poças, na qualidade de orientadora pelo empenho demonstrado desde o primeiro dia ao nível da escolha do tema, bem como pela transmissão de conhecimentos, pelo rigor científico, pela exigência, pela leitura crítica, orientação e correção do texto e ainda pelas suas palavras de incentivo que muito contribuíram para a evolução do trabalho.

À Dona Berta e Senhor Rui, pela sua disponibilidade e pelo facto de me ter aberto as portas da empresa, por poder trabalhar e estudar o seu produto (queijo Marinhas) e por disponibilizarem amostras de queijos e dados relativos à empresa.

À Dr^a Isabel Santos pela sua disponibilidade, paciência, dedicação. Por me saber apoiar, encorajar e por ter contribuído com a sua experiência e conhecimento científico na área da microbiologia, garantido o progresso do trabalho;

Agradeço aos meus pais, a minha irmã, à minha tia Lúcia à minha prima Regina e em particular ao Diogo por toda a paciência, carinho e força que me fizeram superar desilusões e me incentivaram a lutar pelo futuro, acreditando nas minhas capacidades.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Indústria de lacticínios das Marinhas, Lda	2
Figura 2.2 - Aspeto do queijo Marinhas	3
Figura 2.3 - Fluxograma de produção do queijo Marinhas	4
Figura 2.4 - Etapas da produção do queijo Marinhas	6
Figura 4.1 - Representação da Técnica de Van Gulik NP-2105,1983	12
Figura 4.2 - Determinação da acidez	13
Figura 4.3 - Determinação do pH	13
Figura 4.4 - Determinação cloretos pelo método de titulação potenciométrica	14
Figura 4.5 - Montagem experimental para determinação da isoterma de absorção	16
Figura 4.6 - Gráfico do teste de perfil de textura	17
Figura 5.1 - Humidade relativa ao longo do tempo para os diferentes sais	22
Figura 5.2 - Relação entre o teor de humidade e a_w no queijo Marinhas	23
Figura 5.3 - Papel vegetal sem quitosano (observado pelo microscópio eletrónico: ampliação=400x;WD=19;Spot size=57;vacuum=29)	25
Figura 5.4 - Papel vegetal com quitosano (observado ao microscópio eletrónico: ampliação=400x;WD=11; Spot size=61; vacuum=29).....	25
Figura 5.5 - Aspeto morfológico da placa com o fungo isolado	26
Figura 5.6 - Aspeto microscópico do fungo <i>Penicillium raistrickii</i>	26
Figura 5.7 - Aspeto das placas após incubação a 25 °C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de 10^9 a 10^6	27
Figura 5.8 - Aspeto das placas após incubação a 25 °C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de 10^5 a 10^1	28
Figura 5.9 - Aspeto das placas após incubação a 10 °C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de 10^9 a 10^6	28
Figura 5.10 - Aspeto das placas após incubação a 10 °C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de 10^5 a 10^1	29
Figura 5.11 - Área ocupada pelo bolor na caixa de petri no cellprofiler (cores referenciam as colónias de bolor)	30
Figura 5.12 - Efeito do revestimento de quitosano no desenvolvimento de <i>Penicillium raistrickii</i> , a 25°C	30
Figura 5.13 - Efeito do revestimento de quitosano no desenvolvimento de <i>Penicillium raistrickii</i> a 10°C	31
Figura 5.14 - Aspeto dos queijos após 2 meses de incubação, a 10°C. (A e B) - Amostras sem inóculo e sem quitosano. (C e D) - Amostras sem inóculo e com quitosano.	32
Figura 5.15 - Aspeto dos queijos após 2 meses de incubação, a 10°C. (A e C) - Amostras com inóculo e sem quitosano. (B e D) - Amostras com inóculo e com quitosano.	32
Figura 8.1 - Textura do queijo Marinhas com casca 1.....	41
Figura 8.2 - Textura do queijo Marinhas com casca 2.....	41
Figura 8.3 - Textura do queijo Marinhas com casca 3.....	42
Figura 8.4 - Textura do queijo Marinhas com casca 4.....	42
Figura 8.5 - Textura do queijo Marinhas com casca 5.....	43
Figura 8.6 - Textura do queijo Marinhas sem casca 1.....	45
Figura 8.7 - Textura do queijo Marinhas sem casca 2.....	45
Figura 8.8 - Textura do queijo Marinhas sem casca 3.....	46
Figura 8.9 - Textura do queijo Marinhas sem casca 4.....	46
Figura 8.10 - Textura do queijo Marinhas sem casca 5.....	47
Figura 8.11 - Estrutura química e produção do quitosano (adaptado Raafat e Sahl,2009)	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Valores de referência apresentados pela empresa laticínios das Marinhas (extrato húmido).	7
Tabela 2.2 - Descrição resumida dos parâmetros do teste de perfil de textura (TPA)	9
Tabela 5.1 - Resultados físico-químicos das amostras de queijo (em extrato húmido).....	21
Tabela 5.2 - Comparação da a_w e teor de humidade do queijo em cada um dos sais no fim da experiência	21
Tabela 5.3 - Evolução da humidade relativa ao longo de 10 dias.	22
Tabela 5.4 - Textura do Queijo Marinhas com casca	24
Tabela 5.5 - Textura do Queijo Marinhas sem casca	24
Tabela 8.1 - Resultado do texturómetro - Queijo Marinhas com casca, agulha com 3mm de diametro	40
Tabela 8.2 - Resultado do texturómetro - Queijo Marinhas sem casca, agulha com 5mm de diâmetro	44
Tabela 8.3 - Espessura.....	48
Tabela 8.4 - Gramagem	48
Tabela 8.5 - Ensaio de cobb	48
Tabela 8.6 - Aplicações do Quitosano	51

ÍNDICE GERAL

RESUMO	V
ABSTRACT.....	VII
AGRADECIMENTOS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ÍNDICE	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	2
2.1 - Apresentação da empresa “Lacticínios das Marinhas”	2
2.2 - Características relevantes do Queijo Marinhas	3
2.3 - Descrição do processo	4
2.4 - Caracterização físico-química do queijo	7
2.4.1 - Matéria Gorda	7
2.4.2 - Acidez e pH	7
2.4.3 - Cloretos	8
2.4.4 - Humidade	8
2.4.5 - Isotermas de adsorção	8
2.4.6 - Textura	8
3. EMBALAGEM ATIVA	10
4. METODOLOGIA.....	12
4.1 - Determinação das características químicas do queijo	12
4.1.1 - Teor de matéria gorda.....	12
4.1.2 - Determinação da acidez e pH.....	12
4.1.3 - Determinação de cloretos.....	13
4.1.4 - Determinação da matéria seca	15
4.2 - Isotermas de adsorção	15
4.3- Caracterização da textura do queijo.....	16
4.4 - Identificação do fungo problema do queijo Marinhas	17
4.5 - Avaliação do efeito do revestimento do quitosano	18
4.6 - Preparação do revestimento do quitosano	18
4.6.1 - Formulação do quitosano	18
4.6.2 - Preparação do inóculo	19
4.6.3 - Aplicação do revestimento sobre o queijo.....	19
4.6.4 - Avaliação por microscópio electrónico de varrimento (SEM) do revestimento sobre papel vegetal	19
4.7 - Cellprofiler	20

4.8 - Amostras analisadas	20
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	21
5.1 - Características físicas químicas.....	21
5.2 - Caracterização da textura do queijo.....	23
5.3 - Papel vegetal com e sem revestimento (quitosano)	25
5.4 - Identificação do bolor.....	26
5.5 - Resultados registados na aplicação de quitosano no papel vegetal	27
5.6 - Resultados registados na aplicação do quitosano no queijo.....	31
6. CONCLUSÃO	33
7. BIBLIOGRAFIA	34
8. ANEXOS	39
8.1 - ANEXO I.....	40
8.2 - ANEXO II.....	44
8.3 - ANEXO III.....	48
8.4 - ANEXO IV	49
8.5 - ANEXO V	50
8.5 - ANEXO VI	54

1. INTRODUÇÃO

A produção de queijo começou há cerca de 800 anos atrás, tendo os seus processos de produção evoluído ao longo da história da humanidade, existindo atualmente cerca de 1000 variedades diferentes. Queijo é o nome genérico usado para um dos grupos de alimentos derivados de leite fermentado, produzidos numa grande variedade de sabores e formas, em todo o mundo (Poças, 2009). Nos últimos anos, tem-se registado um interesse crescente, em termos científicos e tecnológicos, por produtos alimentares tradicionais manufacturados artesanalmente devido às características organolépticas únicas resultantes das particularidades do processo de fabrico.

O queijo em análise é o queijo artesanal Marinhas, diferencia-se pelo seu sabor característico e inconfundível, onde não é usado qualquer produto químico no seu revestimento ao longo do seu processo de fabrico (www.lmarinhas.com). A empresa, atualmente depara-se com um problema de conservação do queijo, pois este evidencia um reduzido prazo de validade, devido ao aparecimento de bolores à sua superfície durante a fase de armazenamento e venda do produto, que resulta do fato de não serem adicionados aditivos antifúngicos na superfície do queijo. Esta situação leva a uma rejeição do produto pelos consumidores. Face ao aumento do consumo de produtos regionais, pelas suas características e qualidade, é necessário criar formas de manutenção da qualidade do queijo, sem alterar as suas propriedades, prolongando o seu período de conservação. Para se conseguir encontrar uma solução para este problema, é necessário conhecer os fatores físico-químicos e microbiológicos que determinam estas alterações (Machado, 2003).

Avaliando-se as várias hipóteses de solução e tendo em conta que o queijo em questão se trata de um queijo artesanal, onde se pretende preservar as suas características naturais, optou-se por aplicar como embalagem ativa sem químicos, usando para isso o quitosano.

O quitosano é uma substância predominantemente à base de um polissacarídeo natural, a quitina, derivado de crustáceos ou de fungos. A adição de quitosano nos produtos alimentares não altera as suas características sensoriais e pode ser usado para prolongar o seu tempo de conservação. (Fajardo, P. et al, 2010; Pierro, P. et al, 2010).

Este trabalho teve como objetivo a análise do queijo Marinhas, a sua caracterização físico-química (matéria gorda, acidez, pH, cloretos, humidade, isothermas de adsorção e textura do produto). Pretendeu-se, também, identificar o fungo responsável pelo desenvolvimento de bolores no queijo em causa e estudou-se o impacto da aplicação de um revestimento à base de quitosano (variando a temperatura de incubação e a concentração de quitosano). Para avaliar o crescimento dos fungos avaliou-se o uso da aplicação informática de processamento de imagem: CellProfiler (www.cellprofiler.org).

É de referir que no decorrer deste trabalho, foi apresentado um poster (anexo IV), na 11th International Conference of the European Chitin Society.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1 - Apresentação da empresa “Lacticínios das Marinhas”

A fábrica de lacticínios Marinhas está situada na freguesia das Marinhas, concelho de Esposende, distrito de Braga.

Os Srs. Dr. Amílcar Castilho, Eng. Reinaldo Castilho e Manuel da Costa Pais, fundaram, em 1954, uma sociedade por quotas denominada “Lacticínios das Marinhas, Lda”, que exploram até à presente data esta unidade industrial. (Figura 2.1)



Figura 2.1 - Indústria de lacticínios das Marinhas, Lda

Ao longo dos últimos anos e em particular na década de 80, a empresa efetuou poucos investimentos, mas à necessidade de tornar a empresa mais competitiva para enfrentar os problemas gerados pela abertura dos mercados agrícolas, levou a que no triénio 1992/93/94 se realizassem vários investimentos de vulto nos mais diversos sectores da empresa, tais como a aquisição de equipamentos que garantissem uma maior produtividade e qualidade; melhoramentos das condições higiene-sanitárias das instalações; controlo laboratorial dos produtos fabricados, matérias-primas, ingredientes e eliminação dos efeitos dos efluentes sobre o meio ambiente.

No biénio 1999/2000, a empresa apostou em tornar-se cada vez mais competitiva, pela qualidade dos seus produtos e serviços. Encarando com otimismo a entrada no novo milénio, delineou uma estratégia que privilegia a segurança alimentar e a reestruturação interna, quer através da introdução de um plano de autocontrolo (HACCP), quer através da implementação de um Sistema de Qualidade segundo a norma NP EN ISO 9002.

A empresa foi certificada pela NP EN ISO 9002 em Julho de 2001 (certificado nº 01/CEP.1493) e pela DS 3027 E:1998 – Segurança Alimentar através do HACCP em Abril de 2002 (certificado nº 02/CSA.005), tornando-se na primeira empresa de lacticínios em Portugal a obter esta certificação.

A empresa efetuou a transição para a nova norma NP EN ISO 9001:2000 no ano de 2002, tendo-lhe sido atribuído o certificado com o mesmo número em Janeiro de 2003. Em 2009 a empresa

efetuou a transição do seu sistema de Segurança Alimentar para a nova norma NP EN ISO22000:2005.

2.2 - Características relevantes do Queijo Marinhas

É um queijo curado, tipo prato com aproximadamente 1,1Kg, fabricado a partir de leite pasteurizado, parcialmente desnatado, com adição de fermentos lácteos, cloreto de cálcio e coalho, sem corantes, com um teor de matéria gorda entre 12% e 16%, casca não comestível (Figura 2.2). É um produto pronto a consumir e tem um prazo de validade de 2 meses (www.lmarinhas.com).



Figura 2.2 - Aspeto do queijo Marinhas

Uma das características específicas deste queijo é não possuir um revestimento externo, o que lhe confere um processo de cura contínuo, facto que acentua o seu paladar. Decorrentes deste facto, podem aparecer bolores na casca que devem ser limpos com uma escova ou um pano húmido. O queijo deve ser conservado em local fresco e arejado, longe de fontes de cheiro e sabor intenso.

Na sequência do aparecimento excessivo de bolores, a empresa viu-se na necessidade de encontrar uma solução, para minimizar esse crescimento. O trabalho que aqui é apresentado, visa encontrar um revestimento para o controlo de bolores na superfície do queijo.

2.3 - Descrição do processo

O fluxograma de produção do queijo Marinhos está apresentado na Figura 2.3.

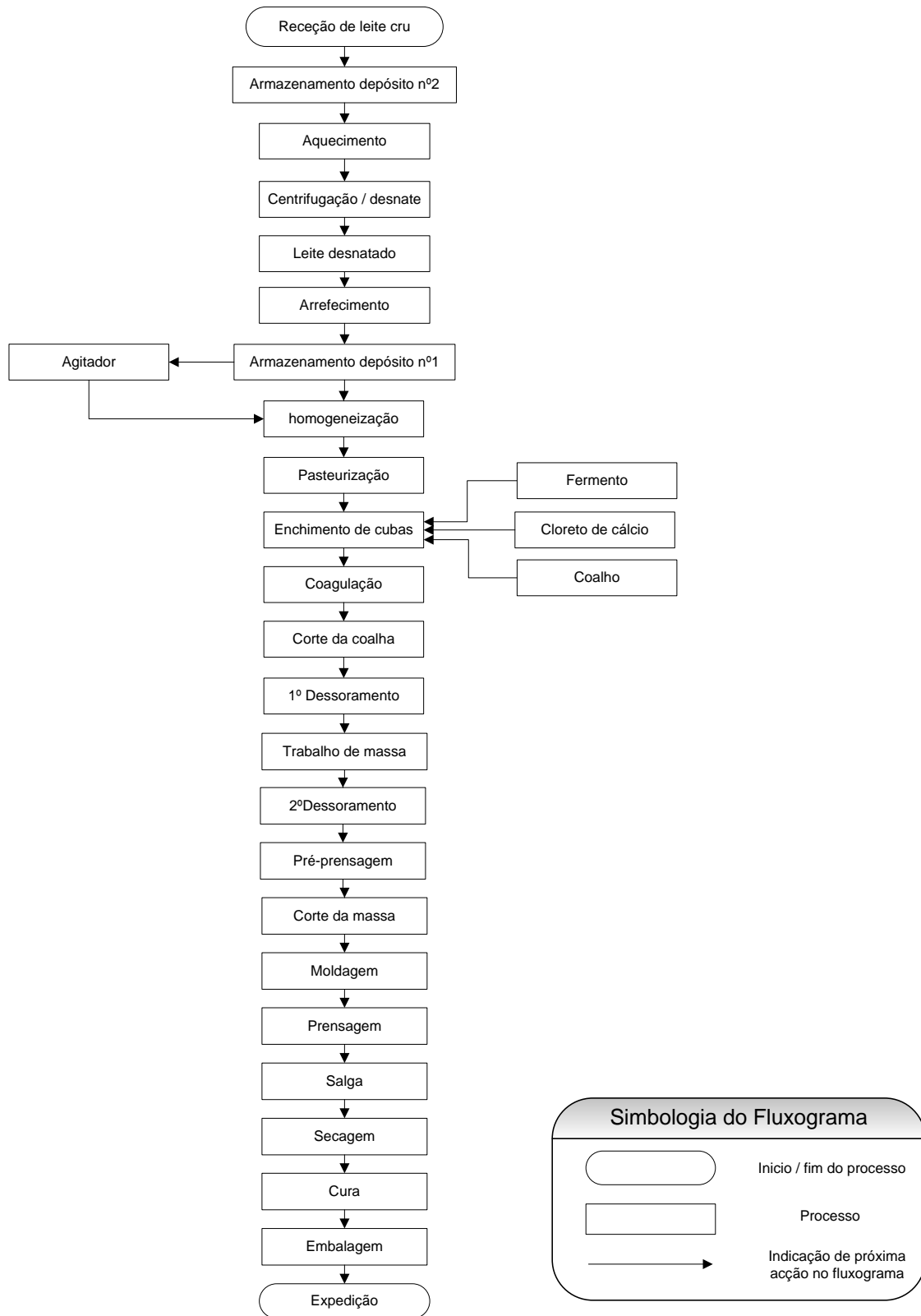


Figura 2.3 - Fluxograma de produção do queijo Marinhos

Na receção de leite cru refrigerado (e antes da sua descarga) são feitas análises à matéria gorda, acidez e é feito registo da temperatura. A pesquisa de inibidores (penicilina, água oxigenada, formol e cloro) já vem feita pela empresa de leites.

O leite é armazenado num depósito onde existe aquecimento, o que leva a uma centrifugação/desnate e conseqüentemente a separação da nata e do leite desnatado, em que a nata sofre alguns processos até se transformar em manteiga. O leite desnatado é o produto que entra para a produção do queijo. O leite desnatado sofre um arrefecimento e é armazenado em depósito, onde é agitado para ocorrer a homogeneização. De seguida é submetido a pasteurização, que consiste em submeter o produto a altas temperaturas e, posteriormente a baixa temperatura. Com esta rápida variação de temperatura é possível destruir as bactérias indesejáveis existentes, eliminando possíveis agentes de modificação do produto. Depois de concluída a pasteurização dá-se o enchimento das cubas onde é adicionado o fermento, o coalho (enzima Mucorzime "L" Biostar diluída em água) e cloreto de cálcio. O cloreto de cálcio é um ingrediente essencial na elaboração de queijos, permitindo melhor rendimento e eficiência da coagulação. A coagulação é realizada aproximadamente em 30 minutos, sendo remexido manualmente, por um operário e ainda mecanicamente, para aumentar a homogeneização das partes sólidas.

O corte da coalhada é feito com instrumentos próprios e assim ocorre o primeiro dessoramento onde é libertado algum soro. Numa segunda fase manual e com utensílios próprios ocorre o segundo dessoramento. No momento em que o queijo vai para a prensa e é envolvido em panos de revestimento. Estes panos têm a função de não deixar que a massa arrefeça rapidamente, facilitar o dessoramento e ajuda a retirar o queijo.

A prensagem é feita com prensas verticais o que ajusta a pressão de forma a evitar deformações, ficando nesta forma, 24 horas, tendo o cuidado de colocá-la no centro do prato e com a respetiva tampa.

Uma vez terminada a prensagem os queijos são desenformados, aparados, moldados e identificados com o número de lote e colocados em salmoura. O tempo de permanência na salga do queijo varia entre 3 a 7 horas, é efetuada com água saturada e com sal marinho, o pH entre 5 e 7 e a temperatura entre 12 e 20°C. O sal adicionado a água é completamente dissolvido, com a ajuda de um agitador próprio. A salmoura depois de preparada é filtrada, utilizando equipamento apropriado. O filtro da salmoura é ligado diariamente, antes da colocação dos primeiros queijos na salga e deve permanecer ligado enquanto existir queijo na salga. Após terminar o processo da salga, são colocados em cestos próprios onde ficam a secar, até poderem ir para a cura, oito dias, a uma temperatura de 8°C a 4°C, numa câmara. Depois de devidamente curado, este é embalado com a colocação do rótulo e acontece a expedição para diferentes locais: queijarias, grandes superfícies, consumidor final (Figura 2.4).

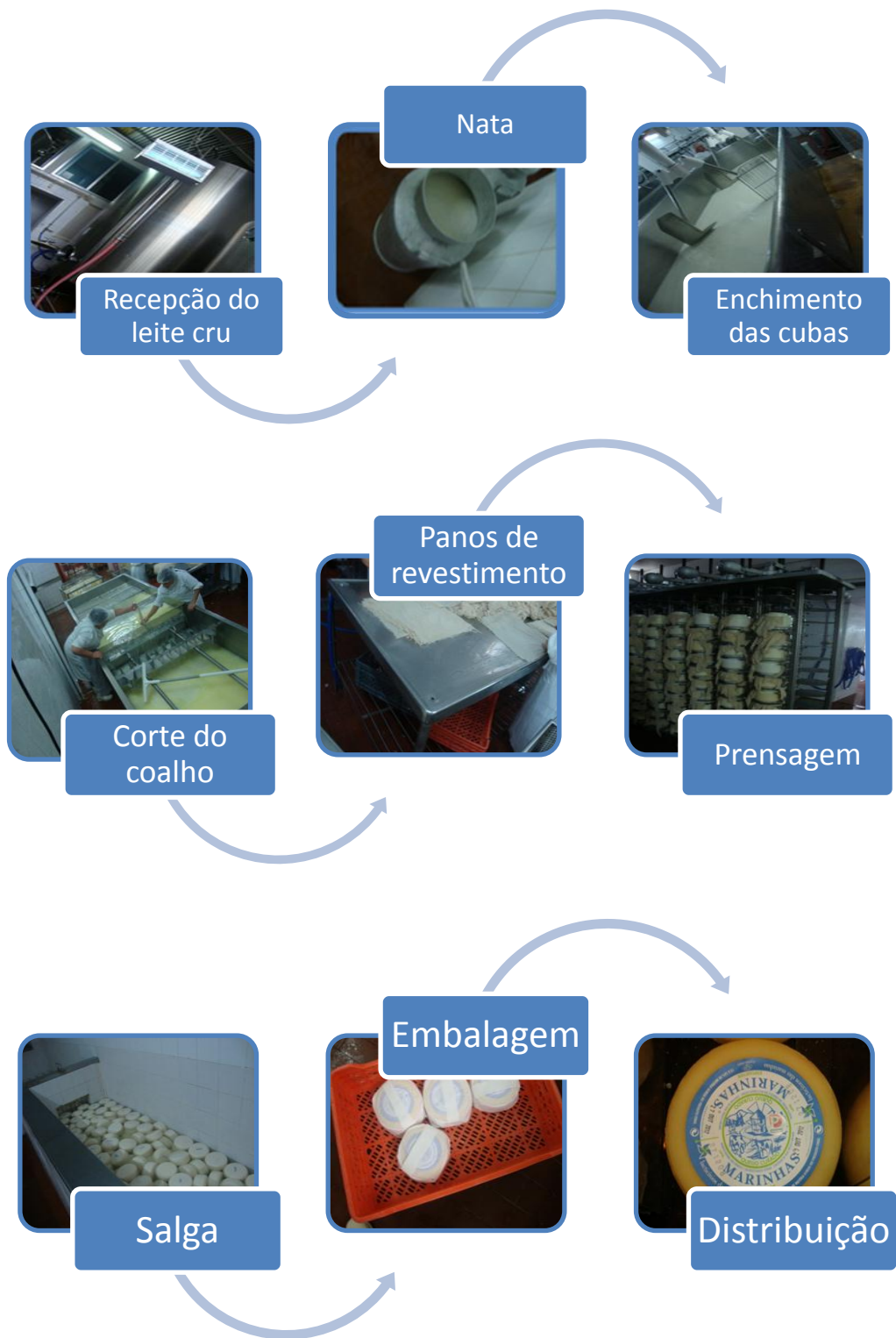


Figura 2.4 - Etapas da produção do queijo Marinhas

2.4 - Caracterização físico-química do queijo

As características organolépticas de um queijo dependem de inúmeros fatores associados não só à matéria-prima, como também à sua composição e características microbiológicas, quer ainda aos métodos e práticas de fabrico (Martins e Vasconcelos, 1993). Neste sentido é fundamental, para consolidar este estudo, fazer uma breve caracterização de alguns fatores físico-químicos do queijo Marinhos. Assim, na análise físico química foi efetuada a determinação da matéria gorda, acidez, pH, cloretos, humidade. As análises foram efetuadas no laboratório da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica, em amostras de queijo Marinhos disponibilizadas pela fábrica.

Os valores definidos pela empresa com base no seu histórico são apresentados na Tabela 2.1:

Tabela 2.1 - Valores de referência apresentados pela empresa laticínios das Marinhos (extrato húmido).

		Gordura total (%)	Acidez (% ác. láctico)	Cloretos (%)	Humidade (%)
Valores de referência da empresa	Limite mínimo	10	0,6	0,8	40
	Limite máximo	16	1,2	2	60

No queijo Marinhos foi também realizada, a determinação de dois parâmetros que nos fornecem informações importantes sobre o produto: isoterma de adsorção e textura.

2.4.1 - Matéria Gorda

Matéria gorda é o conjunto de substâncias lipídicas de um determinado produto, equivale à matéria gorda do queijo. Este fator é específico de cada queijo, sendo os valores de referência fornecidos pela empresa. Como anteriormente foi referido, o queijo Marinhos apresenta um teor de matéria gorda de 10% a 16% em extrato húmido o que equivale de 20% a 32% em extrato seco. Enquanto, por exemplo o queijo Limiano, em extrato seco, possui um teor de matéria gorda de 45% a 60 tal como o queijo Serpa, Azeitão e Paiva. Um teor superior a 60% é específico de queijos como o Serra da Estrela.

2.4.2 - Acidez e pH

O índice de acidez corresponde à quantidade de hidróxido de sódio necessário para neutralizar uma determinada solução. Este parâmetro, num alimento, influencia o seu sabor, odor, cor, estabilidade e manutenção da sua qualidade. Pelo que a sua caracterização é fundamental para a caracterização do seu prazo de validade e fatores de alteração do produto. A acidez do queijo Marinhos pode variar entre 0,6% e 1,2%.

2.4.3 - Cloretos

Entende-se por teor em cloretos a quantidade de íons cloreto, expresso em percentagem. Esta característica está diretamente relacionada com a quantidade de sal utilizada no alimento e pode constituir um fator de alteração do próprio produto. No queijo Marinhos, os valores oscilam entre um valor mínimo de 0,8% e um máximo de 2%.

2.4.4 - Humidade

Esta determinação é fundamental para avaliar a quantidade de água num determinado produto, já que a presença de água em quantidades indesejáveis, poderá ser um fator de alteração do alimento. A quantidade de água no produto afeta a sua segurança, qualidade, estrutura e deterioração do alimento. É possível verificar uma relação direta com a textura, isto é, ao existir deterioração haverá mudança da estrutura do produto e a sua textura será diferente.

2.4.5 - Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção estabelecem a relação entre a atividade de água e a humidade de um produto. A qualidade dos produtos depende da atividade de água, humidade, migração da água, absorção e perda da água durante o armazenamento. O valor relativo à água de um alimento, só por si não fornece informações sobre suas propriedades uma vez que estas também são influenciadas pela composição do alimento.

A atividade da água é o parâmetro da humidade que está relacionado com o crescimento de fungos.

2.4.6 - Textura

A textura é uma propriedade extremamente complexa, determinada por diferentes parâmetros interrelacionados entre si. Nos alimentos, os atributos de textura desempenham um papel importante nas decisões de compra e consumo, sendo assim um dos atributos dominantes na preferência dos consumidores (Gunasekaran & Ak, 2003).

A Organização Internacional de Normalização (ISO, 1992) define textura como o conjunto das propriedades reológicas e atributos estruturais de uma alimento percebidos por meios mecânicos, tácteis e, quando apropriados, os recetores auditivos e visuais (Alvarenga, 2000; Gunasekaran & Ak, 2003).

As propriedades do queijo que contribuem para a sua textura são divididas em três categorias:

- i) Mecânicas relacionadas com a reação do produto a uma pressão, que compreendem a dureza, dimensão, viscosidade, elasticidade e aderência;
- ii) Geométricas relacionadas com a dimensão, forma e arranjo das partículas no queijo;
- iii) De superfície relacionadas com as sensações, tais como as que são produzidas na cavidade bucal por água e/ou gorduras (Alvarenga, 2000; Fox et al.; 2000; Gunasekaran & Ak, 2003).

A textura do queijo depende da composição química e da força das interações entre os elementos estruturais que compõem a sua micro e macroestrutura.

As propriedades estruturais dos alimentos são a dureza, adesividade, coesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade. Pode ver-se a sua descrição resumida na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Descrição resumida dos parâmetros do teste de perfil de textura (TPA)

Propriedades texturais	Definição
Dureza	Força necessária para obter uma dada deformação (expresso em Newton, neste caso em Kgf. $Kgf=9,80665N$)
Adesividade	Trabalho necessário para vencer as forças de atracão entre a superfície do alimento e as superfícies com as quais este entra em contacto (área 3, expresso em N.s, neste caso Kgf.s).
Coesividade	Força das ligações internas que definem a estrutura do alimento (área 2 / área 1, adimensional).
Elasticidade	Capacidade que uma amostra, após deformação, recupera a sua condição inicial quando retirada a força aplicada (distância 2 / distância 1, adimensional).
Gomosidade	É considerado um parâmetro secundário obtido a partir dos parâmetros primários: $gomosidade = dureza \times coesividade$
Mastigabilidade	É considerado um parâmetro secundário obtido a partir dos parâmetros primários: $mastigabilidade = gomosidade \times elasticidade$

3. EMBALAGEM ATIVA

O crescente interesse no desenvolvimento de embalagens que mantenham as propriedades sensoriais dos alimentos, que sejam seguras e eliminem microrganismos visando o aumento do tempo de prateleira de produtos alimentícios, tem impulsionado pesquisas com filmes e revestimentos comestíveis por suas propriedades contra a deterioração de alimentos (Diab et al., 2001). O uso de polissacarídeos para este fim, tem sido alvo de grande interesse devido à estabilidade estrutural, por exemplo, na perda de massa e na contaminação microbiológica dos alimentos. Além destes polissacarídeos serem incolores com aparência não oleosa, têm baixo teor calórico (Embuscado e Huber, 2009, Souza, 2001). Um polissacarídeo de crescente utilização na indústria de alimentos é o quitosano (Diab et al., 2001), obtido a partir da desacetilação da quitina (Costa-Silva et al., 2006). Este possui propriedades antimicrobianas em relação a diversos microrganismos, o que justifica sua utilização no desenvolvimento de filmes e revestimentos para aplicação alimentar (Park et al., 2004).

Face ao problema detetado no queijo Marinhos, surge assim a necessidade em desenvolver uma embalagem ativa que possa minimizar o problema. Assim, tentou-se estudar um sistema de embalagem ativa para o queijo Marinhos que regule a atividade da água superficial e evite o desenvolvimento do fungo. Esta embalagem deve constituir uma barreira a humidade otimizada e/ou um sistema ativo de função anti bolor. Com esta embalagem pretende-se impedir o crescimento de bolores superficiais sem alterar as características típicas sensoriais do queijo.

O quitosano é obtido a partir da quitina, correspondente a forma desacetilada, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando assim diversos derivados deste polissacarídeo natural. A quitina é o componente orgânico mais abundante na estrutura esquelética de muitas classes que formam o grupo dos invertebrados (ex: os artrópodes, os anelídeos e os moluscos), está também presente nos fungos (ex: ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos) e em algas.

Comercialmente é obtida essencialmente a partir de crustáceos (cascas de camarão, caranguejo, lagostins, etc), subprodutos de indústrias de processamento alimentar.

Hoje em dia existem várias aplicações da quitina e do quitosano na indústria alimentar em diferentes áreas de aplicação como agente antimicrobiano, filmes edíveis, aditivo, qualidade nutricional, purificação de águas entre outros exemplos. No Anexo V, é apresentada mais informação sobre o quitosano.

O queijo Marinhos é um queijo artesanal sem qualquer produto químico e/ou substância química, procurou-se então um produto que não altere a sua qualidade. Na bibliografia são apontados dois tipos de agentes antifúngicos, referindo-se o uso de natamicina e nisina (Marck et al., 2010) e quitosano (Attanasio et al, 2009; Porta et al 2011) em alguns queijos comercializados ao nível mundial. No entanto, a nisina e natamicina são substâncias químicas que podem alterar as características naturais do queijo em estudo.

Por outro lado a embalagem à base de quitosano é usada em vários queijos tradicionais, os quais se destaca o referenciado em Attanasio et al, 2009. Neste trabalho, a adição de quitosano em fabrico de queijo, em combinação com revestimento ativo (lisozima e ácido etilenodiamino tetraacético, sal disódico) e MAP (embalagem em atmosfera modificada) foi usado para prolongar a vida

de prateleira de “Fior di latte”. Os fatores que parecem estar relacionados com a deterioração deste produto são as *Pseudomonas spp.* e coliformes. No queijo embalado e armazenado a 4°C, o pH, o nível microbiológico, a composição do gás e alterações sensoriais foram monitorizadas ao longo de um período de 8 dias. Os resultados mostraram que a combinação de quitosano, de revestimento ativo e MAP, melhoram “Fior di latte” aumentando a vida de prateleira, em 5 dias, em comparação com a embalagem artesanal. Esta característica pode ter resultado do efeito sinérgico entre os compostos ativos e as condições atmosféricas no headspace da embalagem. Este revestimento parece reduzir o desenvolvimento microbiano e em especial inibe o crescimento de pseudomonas.

No estudo relacionado com a aplicação do quitosano em queijo Ricotta, este foi revestido com um filme à base de proteína com quitosano, e armazenado sob atmosfera modificada a 4 °C (Pierro, P. et al, 2010). O revestimento de uma superfície de filme com Ricotta reduziu o crescimento de contaminantes microbianos e prolongou a vida de prateleira. Este revestimento também atrasou o desenvolvimento de acidez indesejável e melhorou a manutenção da textura, mantendo as características sensoriais.

A atividade antibacteriana do quitosano sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, parece estar intimamente dependente do nível de inóculo, peso molecular e concentração utilizada (Pintado, M et al,2008).

O efeito antimicrobiano do quitosano é fortemente dependente do tipo de microrganismo alvo (bactérias Gram negativa contra Gram positiva) e do peso molecular do quitosano. Verifica-se que no caso das bactérias Gram negativa o efeito antimicrobiano é maior quitosano com baixos pesos moleculares, e o inverso no caso de uma bactéria Gram positiva. O estudo sugere que a utilização de quitosano (independentemente do peso molecular) estará limitada a produtos alimentares que possuam um baixo teor de proteínas. Por outro lado, a interferência de proteínas no efeito inibidor do quitosano diminui com o aumento do peso molecular.

Além das suas propriedades antimicrobianas, a utilização de quitosano, em alimentos tem sido incentivada devido à sua biocompatibilidade, não-toxicidade, indigestibilidade e biodegradabilidade. O contato das células fúngicas de *Aspergillus niger* com o quitosano provoca desorganização molecular e alterações estruturais do citoplasma e membrana plasmática, bem como enfraquecimento e inchaço das hifas (Plascencia-Jatomea, M. et al, 2003).

A morfologia do fungo *Aspergillus niger* foi observada por microscópio de transmissão de elétrons, tendo-se verificado que o quitosano atua inibindo o crescimento de esporos(Xiao-Fang, L. et al, 2008). Neste estudo é elucidado o efeito da atividade antifúngica do quitosano principalmente causada pela inibição do DNA para o RNA de transcrição. Outra espécie de *Aspergillus* que é inibida pelo quitosano é a *Aspergillus alternata* (Pintado, M. et al, 2012).

4. METODOLOGIA

4.1 - Determinação das características químicas do queijo

4.1.1 - Teor de matéria gorda

O teor em matéria gorda foi determinado segundo a técnica de Van Gulik (NP-2105,1983). Esta técnica consiste num processo de separação da matéria gorda da amostra por centrifugação no butirómetro. A separação da matéria gorda é facilitada pela adição de uma pequena quantidade de álcool isoamílico. Os resultados são expressos em percentagem.



Figura 4.1 - Representação da Técnica de Van Gulik NP-2105,1983

Para preparação da amostra, inicialmente retirou-se a casca (ou a porção superficial) com manchas ou bolores, não comestível, de modo a obter uma amostra representativa do queijo tal como ele é consumido.

Para a determinação de teor de matéria gorda, usou-se 3g de amostra do queijo quantidade necessária para representar o queijo em estudo.

4.1.2 - Determinação da acidez e pH

A determinação da acidez foi efetuada pelo método titulométrico. Assim, para uma amostra de 10 g de queijo, é titulada com uma solução de NaOH, 0,1 N, sendo o resultado expresso em percentagem de ácido láctico. O pH não tem unidades e têm por base o uso de uma escala com soluções tampão.



Figura 4.2 - Determinação da acidez

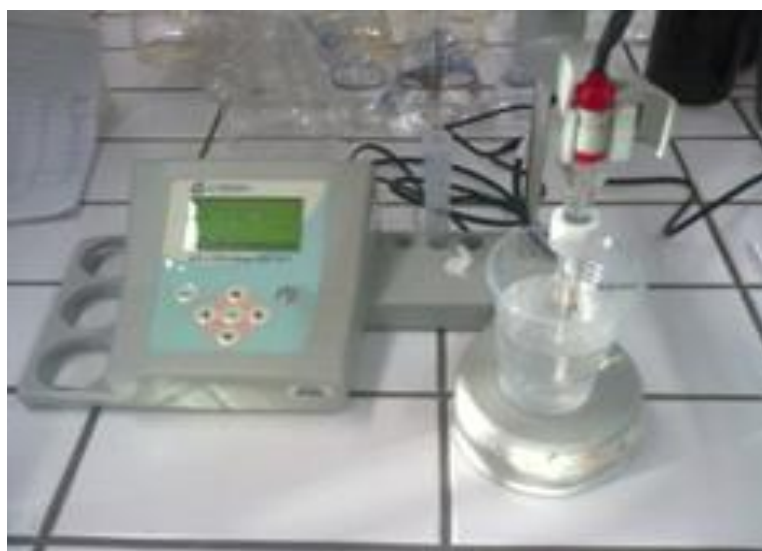


Figura 4.3 - Determinação do pH

4.1.3 - Determinação de cloretos

A determinação de cloretos foi efetuada pelo método de titulação potenciométrica. Esta determinação é baseada na ISO 5943:2006 e IDF 88:2006 sendo expressa em percentagem.

O queijo foi suspenso em água sendo de seguida acidificado com ácido nítrico e titulados com uma solução de nitrato de prata (usando para o efeito um eléctrodo de prata). Antes da análise, a superfície da casca ou bolor da camada de queijo foi removida, de forma a obter uma amostra representativa de queijo como este é normalmente consumido.



Figura 4.4 - Determinação cloretos pelo método de titulação potenciométrica

No que se refere ao procedimento, pesou-se 2 g de amostra num recipiente de ensaio com uma precisão de 0,001 g.

O cálculo final da percentagem de cloretos é determinado pela seguinte fórmula:

$$W_{CL} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot \frac{C}{1000} \cdot M}{m} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

Em que:

V_0 -> Corresponde ao volume, em ml de solução de nitrato de prata padrão usado no ensaio em branco;

V_1 -> Corresponde ao volume, em ml de solução padrão de nitrato de prata utilizadas na determinação;

C -> Corresponde a concentração real, expressa em moles por litro de solução de nitrato de prata padrão;

m -> Corresponde a massa, em gramas, da toma de ensaio;

M -> Corresponde a massa molar utilizada para expressar o resultado como uma fração de massa, em percentagem do cloreto em causa.

4.1.4 - Determinação da matéria seca

A determinação da matéria seca equivale a perda de água por secagem. A perda por secagem foi calculada a partir da diferença de massa antes e após a secagem da amostra. Assim, para o procedimento, pesou-se a cápsula com aproximadamente 10 g de areia obtendo-se o peso da cápsula e da areia (m_0). Depois foi adicionado 2 g de queijo ralado e homogeneizou-se na mesma cápsula e pesar (m_1). Triturou-se cuidadosamente o queijo com a areia e secar durante 4 horas na estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$. Fechou-se a cápsula e deixou-se arrefecer durante 45 minutos no exsiccador. De seguida, pesou-se novamente, obtendo o peso final (m_2). O resultado é expresso em percentagem.

Fórmula para calcular o valor da matéria seca:

$$\text{Matéria seca: } \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad (4.2)$$

Fórmula para calcular as perdas por secagem:

$$\text{Perda por secagem: } \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad (4.3)$$

4.2 - Isotermas de adsorção

Para a determinação da isoterma de adsorção, as amostras de queijo foram equilibradas em diferentes humidades relativas, em pequenas câmaras fechadas a 10°C . A humidade relativa em cada câmara foi criada através das soluções saturadas de cada sal (Figura 4.5).

Foram utilizados os sais cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl_2), sulfato de potássio (K_2SO_4) e nitrito de potássio (KNO_3) com percentagens de humidades relativas respetivamente de 80,2%, 75,5%, 33,1%, 99,0%, 92,5% (Florentin, L et al, 2010). Os valores reais da humidade relativa dos sais foram medidos com um termo-higrómetro (medidor de humidade e temperatura de um ambiente) (Omegaette HH314 TEMPERATURE METER).

A preparação das soluções saturadas de sais foi feita do seguinte modo: em copos com 30 ml de água destilada em aquecimento foram adicionados os sais até se atingir saturação e precipitação.

Para as isotermas as câmaras com as soluções saturadas foram colocadas na câmara grande a 10°C (Walk in marca Aralab, modelo Fitoclima 5000 EDTU).

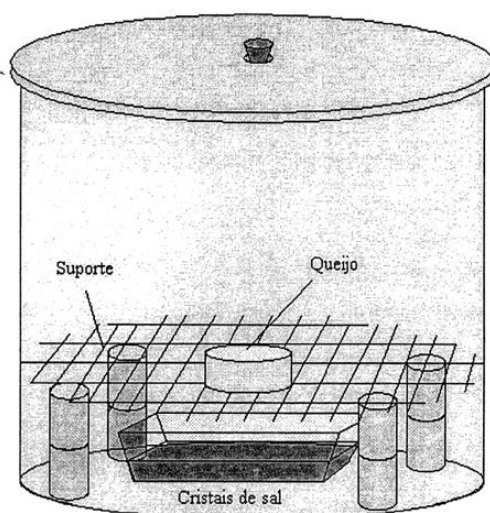


Figura 4.5 - Montagem experimental para determinação da isoterma de absorção

O teor de humidade na amostra foi medido ao fim de 2, 8 e 10 dias. Foi, também, feita uma observação visual das amostras (cor e aspeto).

No fim da experiência, as propriedades da textura foram avaliadas no texturómetro, medida a a_w e o teor de humidade.

Ao fim do 10º dia, os queijos já apresentavam bolores que inviabilizavam a continuidade da experiência.

4.3- Caracterização da textura do queijo

A determinação da textura foi efetuada por um texturómetro Stable Micro Systems, modelo TA XT.Plus Texture Analyser – TPA (teste de perfil de textura).

A partir da curva dada pelo equipamento anteriormente referido, foi possível obter a dureza, a adesividade, a coesividade, a elasticidade, a mastigabilidade e a gomosidade da amostra (Ribeiro, 1998; Alvarenga, 2000; Machado, 2003; Gunasekaran & Ask, 2003). Neste ensaio a amostra de queijo foi perfurada com uma sonda cilíndrica de diâmetro 5 mm para o queijo sem a casca e com uma sonda cilíndrica de diâmetro 3 mm para o queijo com casca. A força foi registada à medida que a sonda perfura na amostra. Os resultados das propriedades estruturais são mais facilmente interpretados observando o gráfico do teste de perfil de textura apresentado na Figura 4.6.

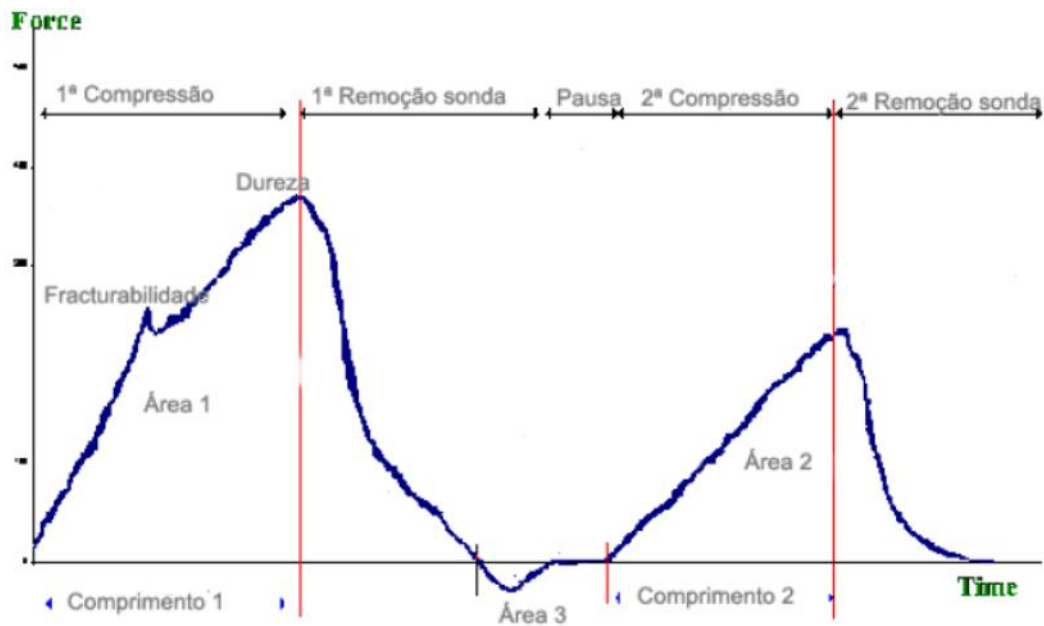


Figura 4.6 - Gráfico do teste de perfil de textura

Analisando a Figura 4.6, é possível calcular as propriedades estruturais da seguinte forma:

- A dureza é dada pelo valor do pico na área 1, ou seja, o pico mais alto da primeira curva;
- A adesividade é dada pela área 3;
- A coesividade é calculada dividindo a área 2 pela área 1;
- A elasticidade do alimento obtém-se dividindo a distância percorrida na área 2 pela distância percorrida na área 1;
- A gomosividade é dada pelo produto entre a dureza e a coesividade.
- Por fim, a mastigabilidade é obtida efetuando o produto entre a gomosividade e a elasticidade.

Nos Anexos I e II encontram-se os valores obtidos pelo texturómetro na realização deste trabalho, onde foram aplicados os cálculos anteriormente associados a cada propriedade da textura.

4.4 - Identificação do fungo problema do queijo Marinhas

O bolor presente no queijo Marinhas, tem um aspeto verde com “bordos” brancos, redondo e aveludo. No entanto, estas são características meramente macroscópicas, insuficientes para a sua identificação. Neste sentido, foi necessário isolar a estirpe do fungo para o identificar através da sua sequência de ADN. Para tal, recolheu-se uma porção de bolor com ansa e zaragatoa para uma caixa de petri com o meio de cultura Rose Bengal Agar, na qual se desenvolveu o fungo.

Na Biopremier (empresa de biotecnologia de âmbito internacional, especializada em testes de ADN, localizada em Lisboa), foi extraído o ADN e identificado o fungo.

4.5 - Avaliação do efeito do revestimento do quitosano

De forma a avaliar o efeito do revestimento do quitosano na inibição do desenvolvimento do fungo no queijo Marinhos, pretende-se realizar ensaios onde o fungo seja colocado em contacto com o revestimento de quitosano. Seguiram-se duas abordagens diferentes, na primeira o quitosano foi aplicado em papel vegetal e na segunda foi aplicado no queijo.

As concentrações de quitosano foram testadas, utilizando várias concentrações de fungos por forma a encontrar a concentração mais adequada. Com este objetivo, diferentes concentrações de quitosano foram aplicadas sobre o papel vegetal proveniente da fábrica (características do papel estão apresentadas no Anexo III), os quais foram colocados em placas de Petri, com o meio ym-agar, para diferentes temperaturas de incubação de 10°C (temperatura do frigorífico) e de 25°C (temperatura ótima de crescimento). Para cada uma das concentrações de fungos foram preparadas placas de controlo onde não foi aplicado quitosano. Para cada concentração de quitosano (20, 17, 13) g/l, foram aplicadas nove diluições da solução do fungo (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9).

A avaliação da evolução do crescimento dos fungos foi efetuada pela aplicação informática de processamento digital de imagem CellProfiler

A aplicação do quitosano na superfície do queijo foi efetuada, em quatro amostras:

- 1) Queijo sem quitosano e sem inóculo;
- 2) Queijo sem quitosano e com inóculo;
- 3) Queijo com quitosano e sem inóculo;
- 4) Queijo com quitosano e com inóculo.

O inóculo foi colocado no queijo com uma micropipeta e posteriormente espalhado por toda a superfície do queijo com o uso de um espalhador.

4.6 - Preparação do revestimento do quitosano

4.6.1 - Formulação do quitosano

O quitosano comercial (Aqua Premier Co, Thailand), apresenta-se em pó (desacetilação superior a 75% e viscosidade de 800 a 2000 mPa.s) de elevado peso molecular ($C_{12}H_{24}N_2O_9$). Para aplicação do quitosano será efetuada uma solução solúvel de modo a poder ser usada para as diferentes concentrações. De acordo com as concentrações pretendidas, neste caso 1:50 ml, juntar-se-á 49 ml água destilada, 1 ml ácido láctico e 1 g quitosano, agitando-se para homogeneizar a solução. Após obter uma solução homogénea será adicionado 0,5 ml glicerol (um plastificante) e agita-se até a solução ficar novamente homogénea. Depois de bem homogeneizada, a solução está pronta para ser aplicada.

4.6.2 - Preparação do inóculo

O desenvolvimento do bolor foi realizado no meio Yeast Malt Agar (ym-agar). Após 10 a 12 dias, a uma temperatura de 25°C, foi verificado um crescimento abundante de bolor e a formação de esporos. Posteriormente, foram adicionados 10 ml de uma solução de Ringer estéril à superfície das placas de agar.

A recuperação de esporos foi feita através da suave agitação da solução de soro fisiológico sobre as colónias de bolor. Por este processo, foram obtidas suspensões de esporos de cerca de 10^6 a 10^9 ufc/ml.

4.6.3 - Aplicação do revestimento sobre o queijo

A solução de quitosano foi aplicada com as luvas em toda a extensão do queijo, tendo o cuidado de manter a mesma espessura ao longo do produto. Após o revestimento aplicado no queijo secar, ficou com um aspeto mais brilhante.

4.6.4 - Avaliação por microscópio electrónico de varrimento (SEM) do revestimento sobre papel vegetal

Para verificar o efeito do quitosano sobre a folha de papel vegetal, pretende-se observar a morfologia do mesmo com um SEM antes e após a adição de uma solução de quitosano (20 g/l). Esta solução de quitosano foi a escolhida dado que esta foi a solução onde se obtiveram melhores resultados.

O SEM é capaz de produzir imagens da superfície de uma amostra com elevada ampliação, resolução e aparência tridimensional.

O método para operação do equipamento está descrito no manual de utilização do Scanning Electron Microscopy *JEOL JSM 5600LV* do Centro de Biotecnologia e Química Fina da Escola Superior de Biotecnologia.

O ensaio foi realizado em modo "*Low vacuum*". Os parâmetros usados na operação do microscópio foram:

- Work distance (distância do trabalho) - distância entre a lente final e a superfície do espécime. Deve-se utilizar uma distância do trabalho (WD) mais baixa que o espécime permitir para uma maior resolução.
- Spot size (tamanho do ponto) - menor tamanho do ponto, maior resolução.
- Magnification (ampliação) - número de vezes que a imagem é aumentada em relação ao objeto real.

4.7 - Cellprofiler

As placas foram analisados com o software de análise de imagem “CellProfiler”, um software livre, de código aberto, projetado para explorar e analisar dados de imagem (www.cellprofiler.org). O software permite quantificar a área de pontos originados pelo crescimento do bolor, tal como a área total da superfície da placa. A área da placa total é o limite que é feito ao desenhar com o controlo (rato do computador) a área de toda a placa (A_t). A superfície coberta pelos pontos (bolor), é possível calcular ao limitar/assinalar todos os pontos que aparecem no software de imagem que indiquem a presença de bolor (Figura 5.15). Após este passo, a área ocupada pelo bolor é calculada e somada (A_m).

$$\text{Razão entre a área de superfície coberta por bolor e a área total} = \frac{A_m}{A_t} \quad (4.4)$$

$$\text{Percentagem de área coberta por bolor} = \frac{A_m}{A_t} \times 100\% \quad (4.5)$$

O cellprofiler não permite efetuar elevadas contagens de bolor, dado que perde a sensibilidade nos resultados obtidos. Sendo assim, este software apenas permite processar um número "contável" de amostras. Como contáveis, pretende-se designar um número de bolores com valores entre 0 a 150 bolores.

Neste trabalho, a análise dos resultados incidiu sobre as diluições de 10^5 e 10^6 , pois estas são as diluições onde se consegue efetuar a contagem dos bolores (como se poderá ver no próximo capítulo).

4.8 - Amostras analisadas

As amostras de queijo analisadas foram fornecidas pela fábrica dos Lacticínios das Marinhas. As primeiras amostras foram utilizadas para caracterização química. Após a realização desta experiência, foram pedidas mais amostras para a determinação da textura. Posteriormente, foram solicitadas mais amostras para a determinação das isotermas de adsorção e ainda, para aplicação do quitosano no queijo.

As amostras enviadas pela fábrica, foram disponibilizadas a partir do lote produzido nesse momento.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 - Características físicas químicas

Os resultados aqui apresentados, foram obtidos no laboratório da faculdade por forma a caracterizar o queijo Marinhos sob ponto de vista químico e de textura.

Tabela 5.1 - Resultados físico-químicos das amostras de queijo (em extrato húmido).

Nº Amostra	Gordura total (%)	pH	Acidez (%)	Cloretos (%)	Matéria seca (%)	Teor de humidade (%)	Atividade da água (a_w)
1	12,3	5,44	0,57	1,36	51,7	48,2	0,995
2	12,5	5,40	0,60	1,36	48,3	51,7	0,984
3	12,0	5,34	0,54	1,34	45,3	54,7	0,983
4	12,5	5,39	0,69	1,33	45,9	54,1	0,983
5	13,0	5,43	0,57	1,27	47,2	52,8	0,984

Relativamente à tabela anterior, pode-se retirar algumas conclusões:

- Quanto à gordura total e cloretos, os valores das 5 amostras encontram-se dentro dos limites máximos e mínimos de referência fornecidos pela empresa (Tabela 2.1).
- Quanto à acidez os valores são ligeiramente inferiores ao valor mínimo (0,6%),
- Quanto aos cloretos registam-se valores muito próximos e dentro do intervalo sugerido pela empresa.
- Quanto à matéria seca não há diferenças relevantes entre as 5 amostras estudadas.

Os resultados alcançados relativos à análise das isotermas de adsorção são apresentados nas Tabelas 5.2 e 5.3.

Tabela 5.2 - Comparação da a_w e teor de humidade do queijo em cada um dos sais no fim da experiência

Sal	Nº Amostra	Atividade da água (a_w)	Teor de humidade (%)
MgCl ₂	1	0,911	20,1
NaCl	2	0,963	37,8
KCl	3	0,972	44,7
KNO ₃	4	0,979	44,8
K ₂ SO ₄	5	0,982	53,4

Tabela 5.3 - Evolução da humidade relativa ao longo de 10 dias.

Sal	Humidade relativa do queijo (%)					
	Sem o queijo	2 dias	8 dias	10 dias	Média	Desvio padrão
MgCl ₂	38,4	49,5	43,8	42,6	45,3	3,6
NaCl	75,2	84,6	84,2	82,8	83,9	0,9
KCl	84,6	90,6	88,8	87,8	89	1,4
KNO ₃	90,6	91,4	90,7	91,0	90,9	0,3
K ₂ SO ₄	91,9	90,6	91,6	90	91	0,8

Os resultados alcançados, apresentados nas Tabelas 5.2 e 5.3, encontram-se também nas Figuras 5.1 e 5.2 sob a forma de gráficos.

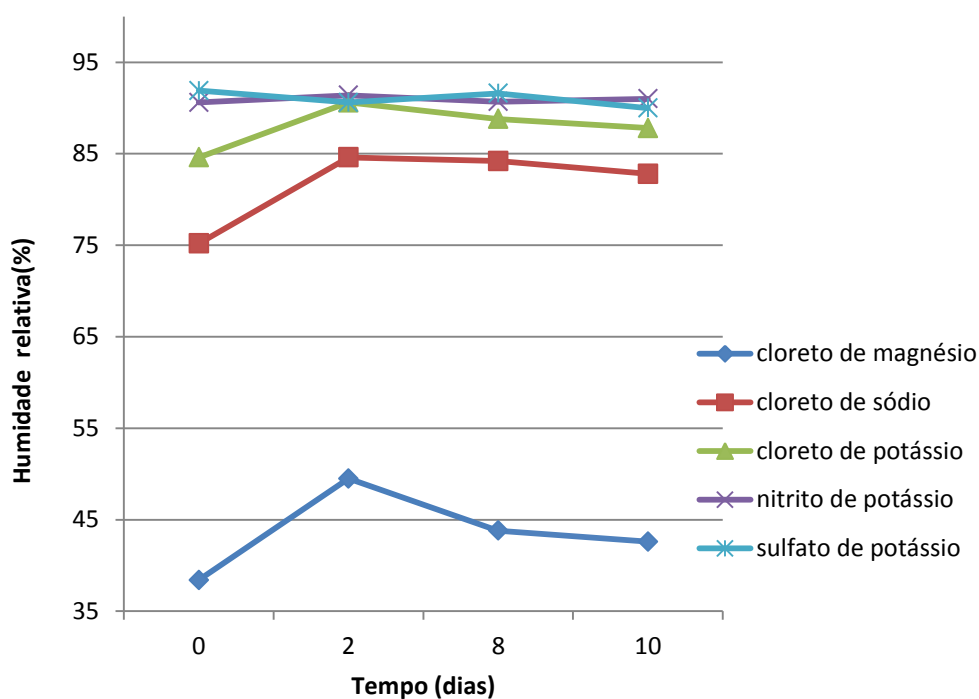


Figura 5.1 - Humidade relativa ao longo do tempo para os diferentes sais

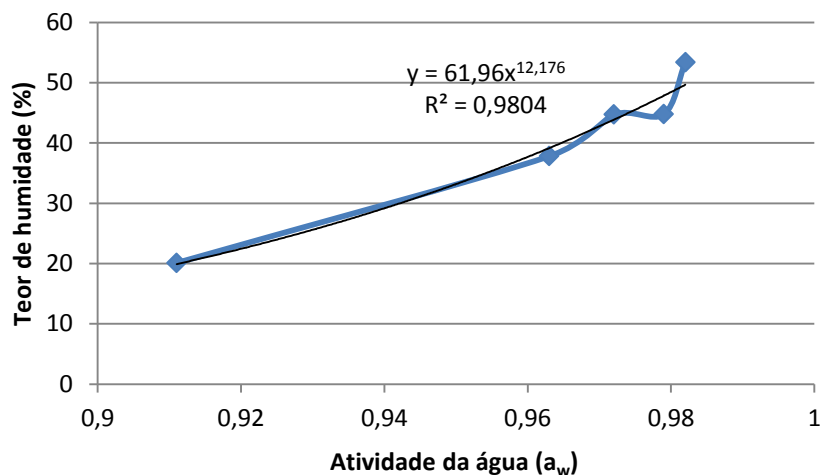


Figura 5.2 - Relação entre o teor de humidade e a_w no queijo Marinhas

Ao fim de 2-3 dias, a humidade relativa estava estabilizada apesar de não se atingirem os valores teóricos ditos anteriormente. A Figura 5.1 representa a isoterma de adsorção, é possível verificar que a quantidade de água do produto afeta a qualidade deste como o seu sabor e a sua estrutura. Quer isto dizer que existe uma deterioração da amostra, verificando-se assim uma relação com a textura. A humidade dá-nos sempre informação da textura do alimento.

Em todos os queijos foram efetuadas análises da a_w antes do estudo das isotermas. É possível verificar que ocorreram ligeiras descidas em todos os sais (Figura 5.1). Embora no sulfato de potássio, a diferença seja pouco significativa (0,982) os outros sais apresentam uma descida nos valores de a_w , mas com maior relevância no cloreto de magnésio (0,911) visto ser o sal que apresenta valores de humidade relativa mais baixa e como tal perde menos humidade. Assim pode-se constatar que quanto maior a humidade relativa, maior será a a_w , logo regista-se uma maior perda de humidade do queijo.

5.2 - Caracterização da textura do queijo

Para analisar a textura do queijo, foram efetuadas duas avaliações aos queijos, sendo uma amostras com casca (Tabela 5.4) e sendo a outra amostras sem casca (Tabela 5.5). Para cada queijo foram determinadas várias características que permitem avaliar a textura do queijo, tais como a dureza, adesividade, coesividade, elasticidade, gomosividade e mastigabilidade. Os resultados obtidos no texturómetro, são apresentados nesta secção, de forma sumária. Os dados primários encontram-se disponíveis nos Anexos I e II.

Tabela 5.4 - Textura do Queijo Marinhas com casca

Nº Amostra	Dureza (Kgf)	Adesividade (Kgf.s)	Coesividade	Elasticidade	Gomosidade (Kgf)	Mastigabilidade (Kgf)
1	1,151	0,009	0,746	1	0,859	0,859
2	1,238	0,019	0,388	1	0,480	0,480
3	0,637	0,049	0,497	1	0,317	0,317
4	0,426	0,075	0,499	1	0,231	0,231
5	0,563	0,058	0,599	1	0,510	0,510
Média	0,803	0,042	0,546	1	0,479	0,479
Desvio padrão	0,367	0,027	0,135	0	0,241	0,241

Tabela 5.5 - Textura do Queijo Marinhas sem casca

Nª Amostra	Dureza (Kgf)	Adesividade (Kgf.s)	Coesividade	Elasticidade	Gomosidade (Kgf)	Mastigabilidade (Kgf)
1	0,659	0,061	0,639	1	0,421	0,421
2	0,745	0,222	0,538	1	0,401	0,401
3	0,589	0,115	0,559	1	0,710	0,710
4	0,624	0,087	0,591	1	0,369	0,369
5	0,639	0,074	0,634	1	0,405	0,405
Média	0,651	0,112	0,592	1	0,461	0,461
Desvio padrão	0,058	0,065	0,045	0	0,140	0,140

O queijo com maior dureza é o identificado com o número de amostra 2, onde foi aplicada uma força de 1,238 Kgf. Por outro lado, o queijo que apresenta menor dureza é a amostra identificada com o número 4, onde foi aplicada uma força de 0,426 Kgf. Os resultados obtidos nas 5 amostras relativos à elasticidade são semelhantes, o que evidencia é um queijo que recupera rapidamente a sua forma inicial.

A adesividade obtida nas 5 amostras apresenta valores reduzidos e próximos entre os diferentes lotes de queijo analisados, ou seja, a aderência dos queijos é equivalente. Na coesividade os valores registados também não são significativamente diferentes, ou seja, é necessário a mesma força para mastigar o queijo. A gomosidade e a mastigabilidade, parâmetros secundários (uma vez que derivam de outros parâmetros já analisados), apresentam também resultados semelhantes. O queijo sem casca apresenta um desvio padrão mais pequeno do que os queijos com casca, quer isto

dizer que, nos queijos sem casca existe uma menor diferença nas propriedades de textura das diferentes amostras de queijos.

5.3 - Papel vegetal com e sem revestimento (quitosano)

A aplicação de quitosano foi testada no papel vegetal para verificar o efeito deste (as características do papel encontram-se presentes no Anexo III). Analisou-se a morfologia do papel vegetal num microscópio eletrónico antes e depois da adição da solução de quitosano. É possível observar o papel vegetal simples na Figura 5.3 e posteriormente o papel vegetal com a aplicação do revestimento (quitosano) na Figura 5.4.

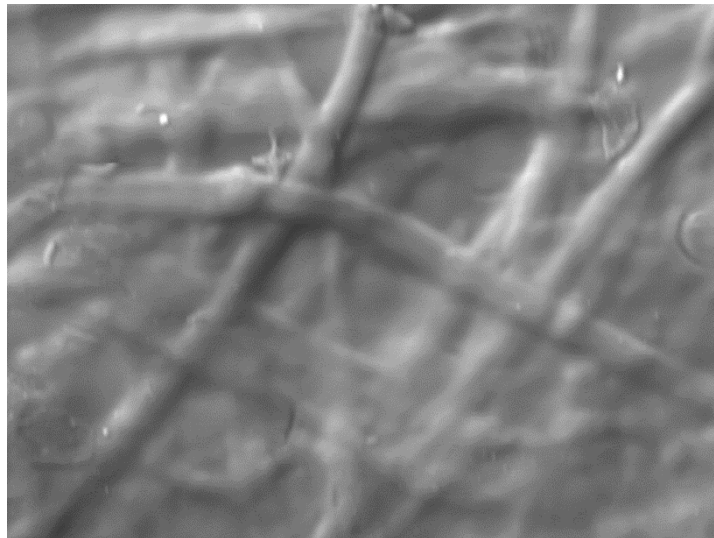


Figura 5.3 - Papel vegetal sem quitosano (observado pelo microscópio eletrónico: ampliação=400x;WD=19;Spot size=57;vacuum=29)

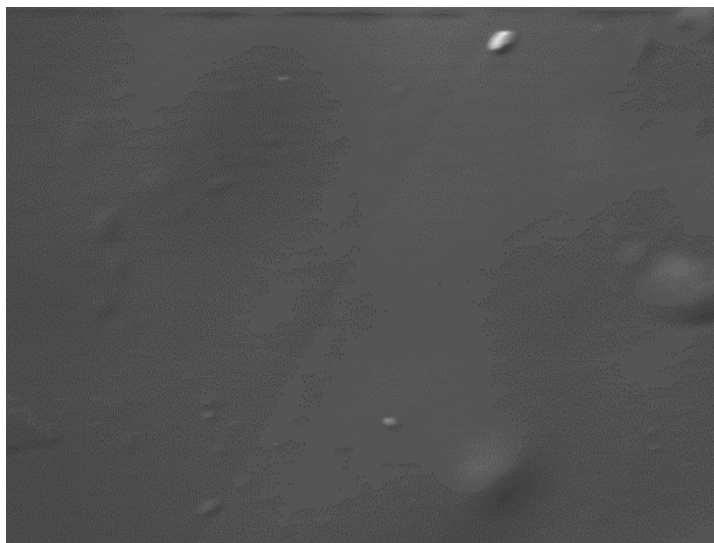


Figura 5.4 - Papel vegetal com quitosano (observado ao microscópio eletrónico: ampliação=400x;WD=11; Spot size=61; vacuum=29)

Observando a Figura 5.3 e 5.4, verifica-se que as fibras de celulose do papel vegetal, após a adição de quitosano, deixam de ser visíveis, como se estas se unissem e ficasse um papel uniforme. Podemos concluir que o quitosano une e vai apresentar um aspeto uniforme e brilhante o que é bom para o queijo em termos de isolamento.

5.4 - Identificação do bolor

Para se desenvolver, o fungo foi colocado numa caixa de petri, com o meio de cultura Rose Bengal Agar. Foi efetuada uma análise de ADN a este fungo, para se poder identificar a sua espécie. Esta análise foi efetuada com a colaboração da Biopremier (relatório da Biopremier presente no Anexo VI).

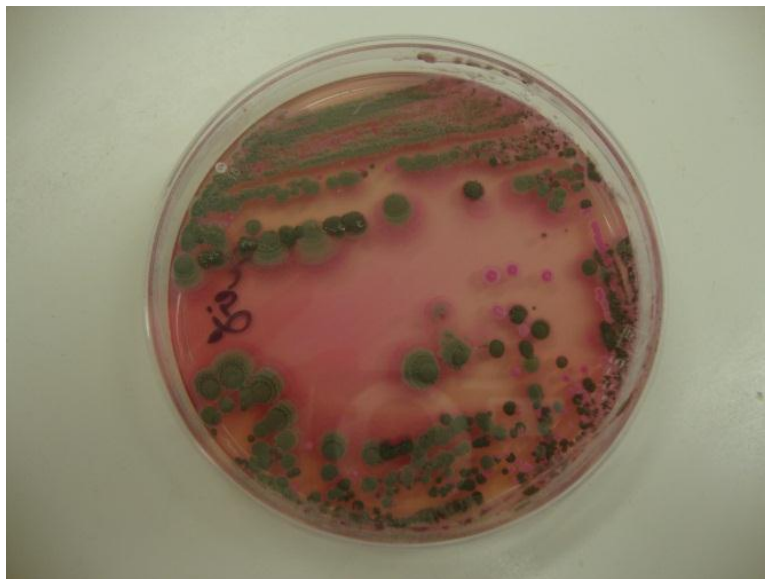


Figura 5.5 - Aspeto morfológico da placa com o fungo isolado



Figura 5.6 - Aspeto microscópico do fungo *Penicillium raistrickii*

Através do resultado dos testes de ADN efetuados, chegou-se à conclusão que a espécie do fungo em estudo é designada por *Penicillium raistrickii*.

5.5 - Resultados registados na aplicação de quitosano no papel vegetal

Após avaliados os crescimentos de fungos nas diferentes concentrações para as duas temperaturas (10°C e 25°C) obtiveram-se resultados distintos. Isto é, para os 25°C (Figuras 5.7 e 5.8) foi registado um crescimento de fungos ao final de dois dias de incubação e para os 10°C (Figuras 5.9 e 5.10) foi registado um crescimento de fungos no final de sete dias de incubação.

A figura 5.7 representa o aspeto das placas após incubação a 25°C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l para as diluições de fungo de 10^9 a 10^5 .

A Figura 5.8 representa o aspeto das placas após a incubação a 25°C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l para as diluições de fungo de 10^5 a 10^1 .

A Figura 5.9 representa o aspeto das placas após incubação a 10°C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l para as diluições de fungo de 10^9 a 10^5 .

A Figura 5.10 representa o aspeto das placas após a incubação a 10°C para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l para as diluições de fungo de 10^5 a 10^1 .

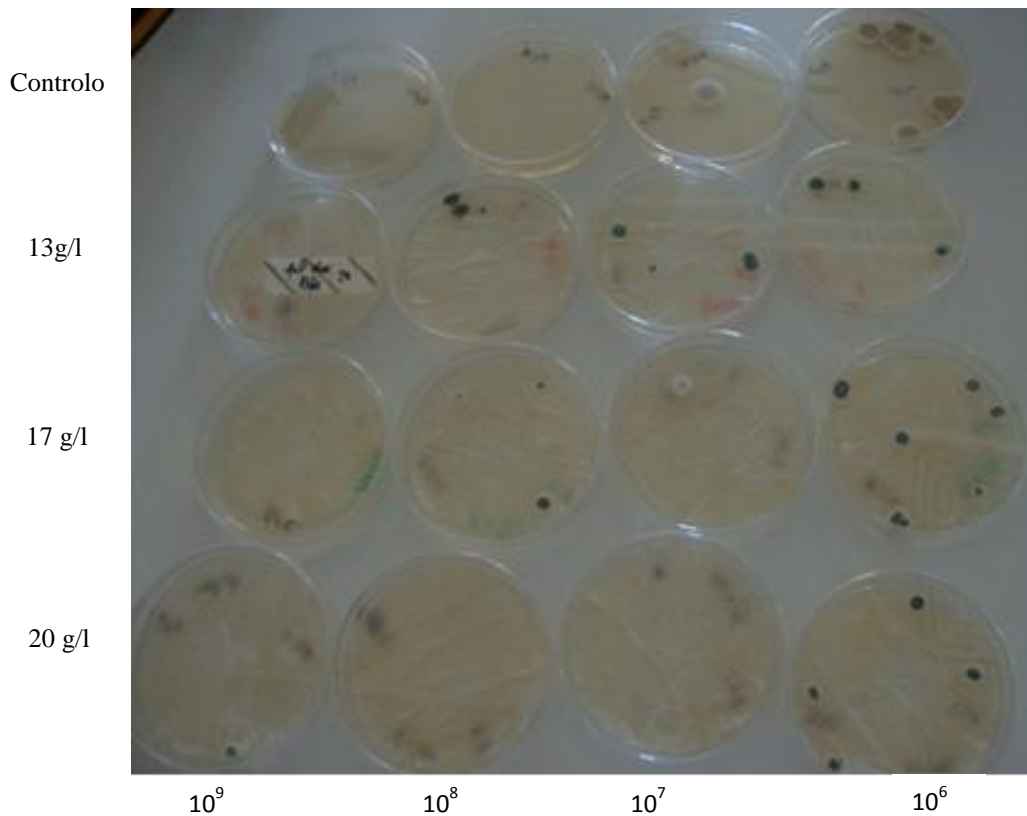


Figura 5.7 - Aspeto das placas após incubação a **25 °C** para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de **10^9 a 10^6**

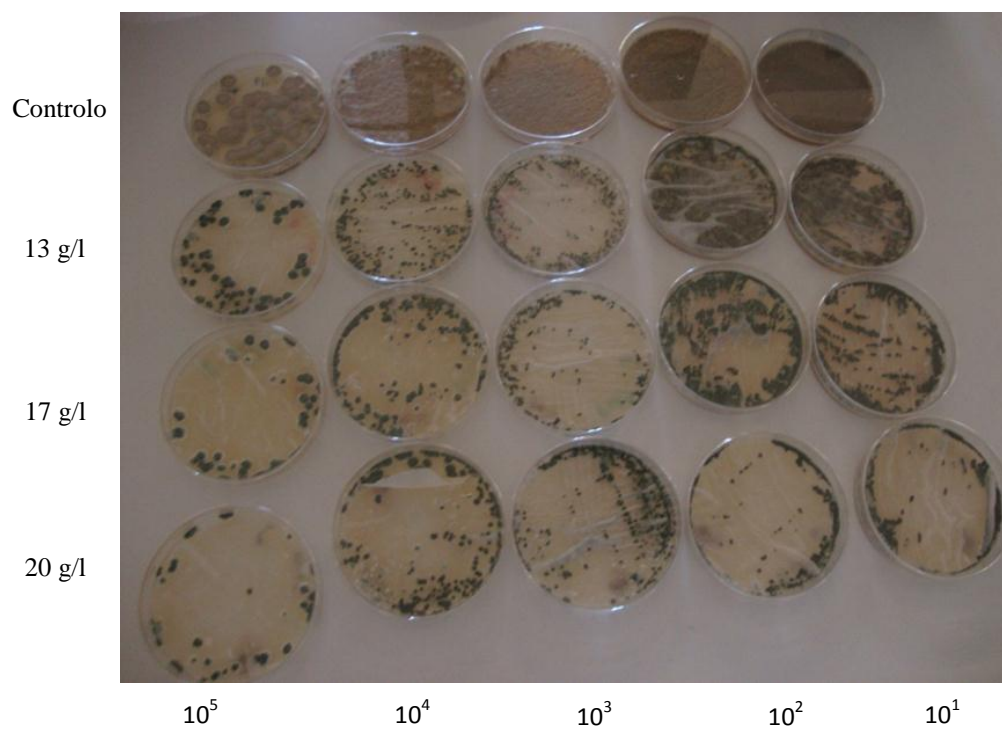


Figura 5.8 - Aspecto das placas após incubação a **25 °C** para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de 10^5 a 10^1

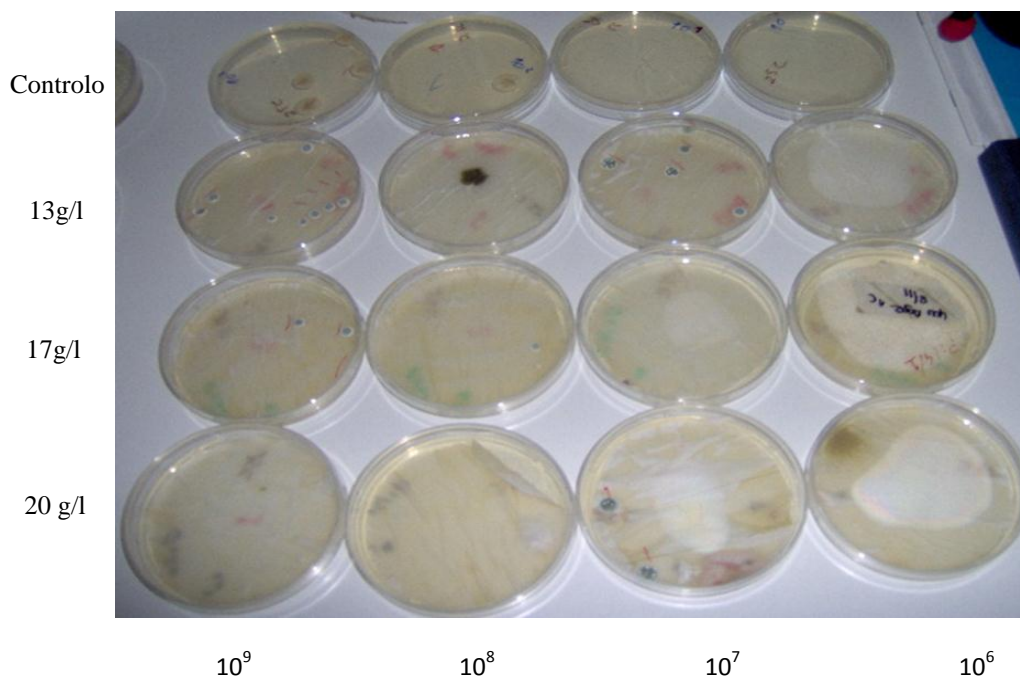


Figura 5.9 - Aspecto das placas após incubação a **10 °C** para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de 10^9 a 10^6

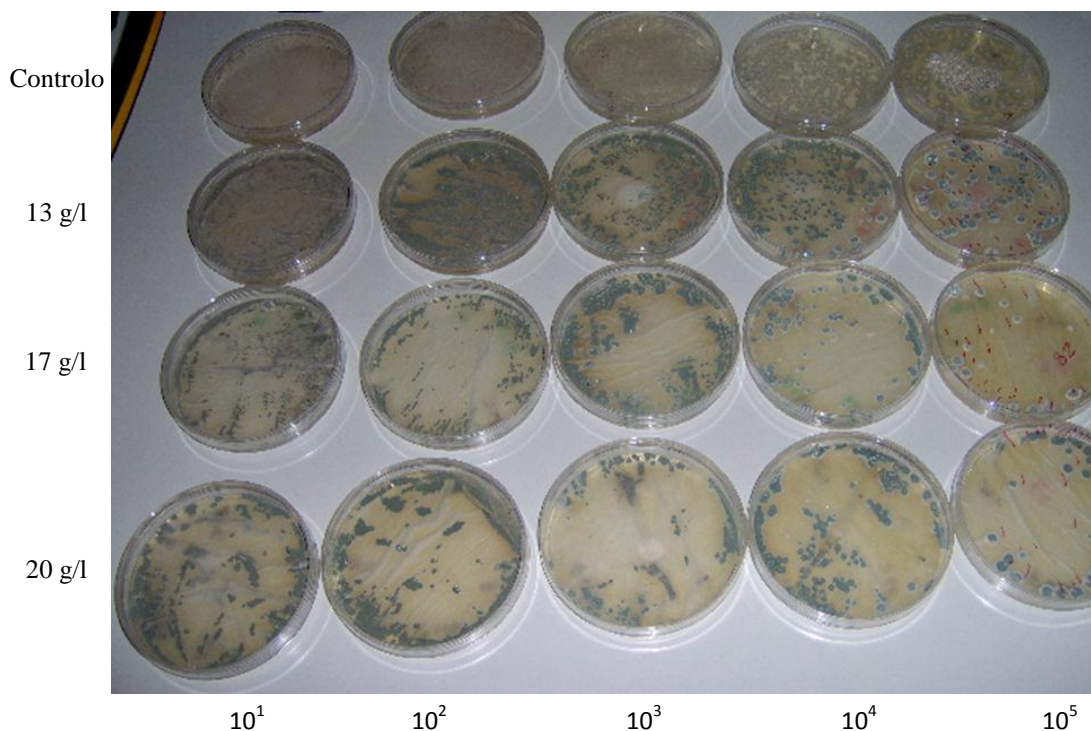


Figura 5.10 - Aspecto das placas após incubação a **10 °C** para as concentrações de quitosano de (13, 17, 20) g/l e para as diluições de fungo de **10⁵** a **10¹**

Para a temperatura de 25°C (temperatura óptima de crescimento), ocorreu o aparecimento do bolor ao final de 2 dias, para as diferentes concentrações de quitosano nas diferentes diluições de fungo. De registar que, para diluições menores do fungo o desenvolvimento registado é menor (Figuras 5.7 a 5.8). É possível observar que a concentração 13 g/l de quitosano apresenta mais bolor ao longo do tempo, seguida de 17 g/l e depois 20 g/l. Tendo em conta estes resultados, parece existir uma relação directa entre a quantidade de quitosano presente e a diminuição de crescimento do fungo.

Para a temperatura de 10°C (temperatura de frigorífico), o crescimento de bolor registado é menor (registado após sete dias de incubação). Regista-se também uma relação entre o aumento da concentração de quitosano e a diminuição do crescimento fungíco. No entanto, nestas placas, embora os níveis de quitosano condicionem o desenvolvimento dos fungos, parece ser a temperatura o principal fator que adia o crescimento de bolor.

Globalmente, as placas onde se consegue efectuar uma contagem mais significativa de fungos que cresceram são as das diluições 10⁵ e 10⁶.

As placas foram analisados com o software de análise de imagem Cellprofiler. A razão entre a área dada pelo crescimento do bolor e a área total da superfície da placa (Fórmula 4.4), foi calculada a partir das experiências realizadas com revestimentos de quitosano com diferentes concentrações. Esta razão calculada foi correlacionada com a concentração de quitosano a diferentes temperaturas, Figuras 5.12 e 5.13.

Na Figura 5.11, do lado esquerdo, são mostradas as colônias de bolor identificadas da caixa de petri. Do lado direito, é mostrado o aspecto da caixa de petri com as colônias de bolor (identificadas pelas cores).

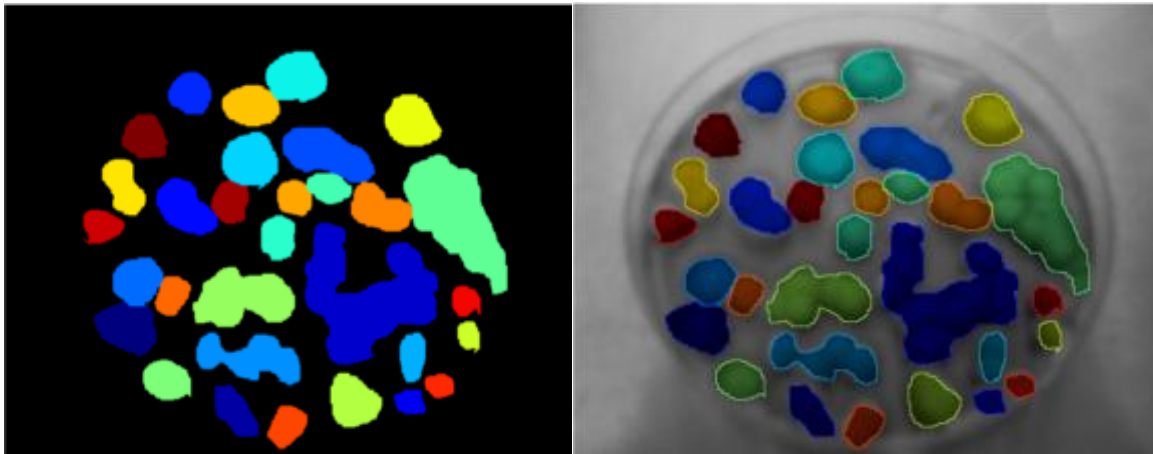


Figura 5.11 - Área ocupada pelo bolor na caixa de petri no cellprofiler (cores referenciam as colônias de bolor)

As Figura 5.12 e 5.13 representam graficamente a relação entre a área de bolor (normalizada com a área total da superfície) e a concentração de quitosano.

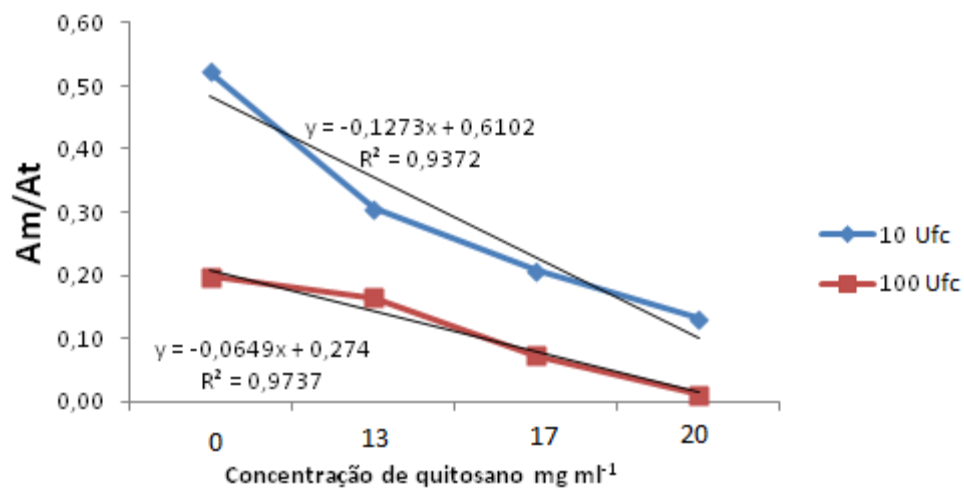


Figura 5.12 - Efeito do revestimento de quitosano no desenvolvimento de *Penicillium raistrickii*, a 25°C

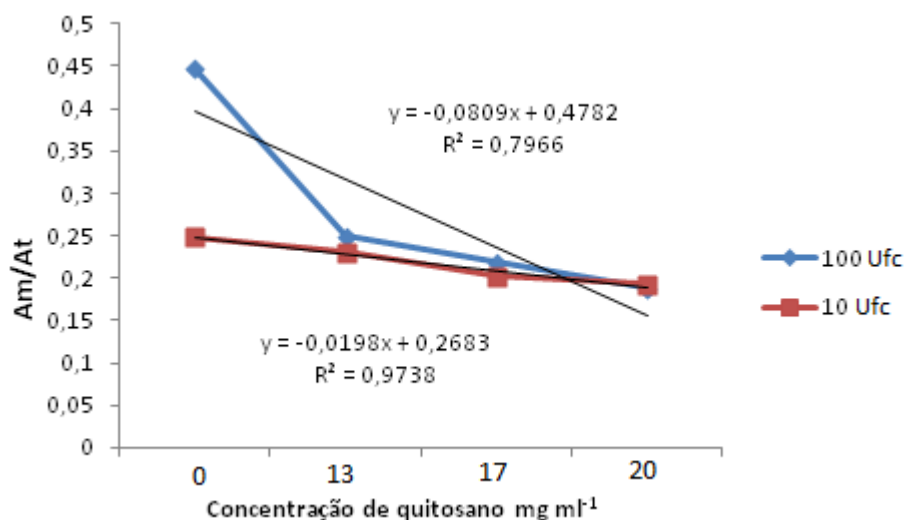


Figura 5.13 - Efeito do revestimento de quitosano no desenvolvimento de *Penicillium raistrickii* a 10°C

Concluiu-se que, embora o número de colónias seja semelhante para as diferentes concentrações de quitosano, em ambas as temperaturas existe uma relação evidente entre a área de superfície da placa ocupada pelo fungo e a concentração de quitosano. A 25 °C, o efeito do revestimento à base de quitosano é mais pronunciada do que a 10 °C. Quanto maior é a concentração de quitosano, menor é área ocupada por bolor.

5.6 - Resultados registados na aplicação do quitosano no queijo

A Figura 5.14 mostra os resultados obtidos a 10 °C após dois meses para os queijos revestidos com quitosano a uma concentração de 20 g/l.

A Figura 5.15 mostra os resultados obtidos a 10 °C para as amostras inoculadas, com e sem quitosano.

Não foi possível registar diferenças consideráveis entre as amostras sem inoculo com e sem quitosano. O desenvolvimento do bolor foi ligeiro e foi localizado na superfície que mantinha contato com a grelha branca.

Relativamente aos ensaios com inóculo também não se registam muitas diferenças com ou sem quitosano.

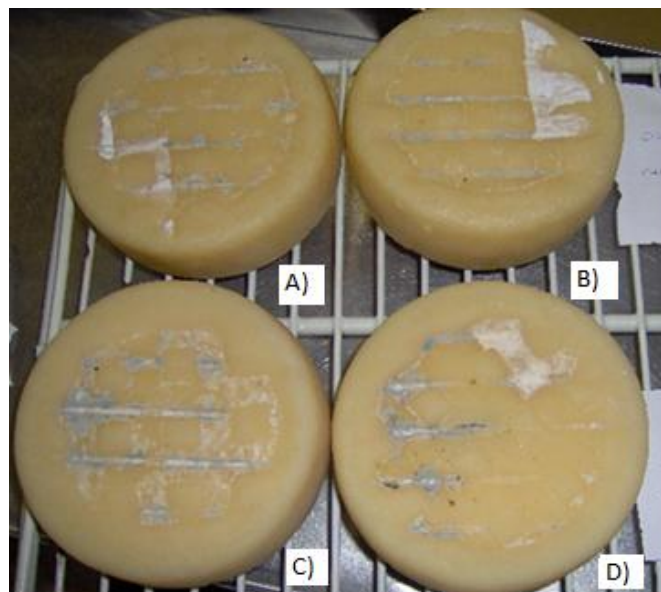


Figura 5.14 - Aspeto dos queijos após 2 meses de incubação, a 10°C. (A e B) - Amostras sem inóculo e sem quitosano. (C e D) - Amostras sem inóculo e com quitosano.

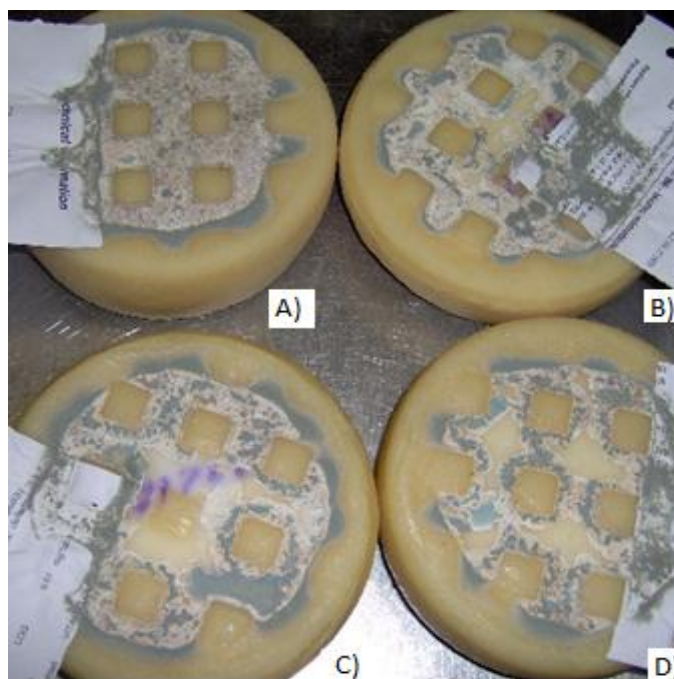


Figura 5.15 - Aspeto dos queijos após 2 meses de incubação, a 10°C. (A e C) - Amostras com inóculo e sem quitosano. (B e D) - Amostras com inóculo e com quitosano.

Assim, com base nos resultados apresentados, foi possível verificar que não existe uma diferença assinalável na quantidade de bolor nas amostras de queijo com revestimento de quitosano, porém, é de realçar que estes dados foram obtidos passado dois meses após a data da sua produção, ou seja, no limite do prazo de validade do queijo Marinhas.

6. CONCLUSÃO

Com base nos ensaios efetuados e nos resultados obtidos e apresentados neste trabalho podem-se inferir as seguintes conclusões:

- Aplicação de quitosano em papel vegetal:
 - Para menores diluições do fungo, o desenvolvimento deste registado é menor, por outro lado, para maiores concentrações de quitosano, também se regista um menor crescimento de fungos. Verifica-se assim, uma relação entre o aumento da concentração de quitosano e a diminuição do crescimento fúngico, como seria de esperar.
 - A temperatura tem um efeito muito importante como é evidente pela comparação dos resultados obtidos a 25°C e a 10°C. Para a temperatura de refrigeração (10°C), o crescimento de bolores registado é muito menor. A temperatura parece ser o principal inibidor do crescimento, embora os níveis de quitosano também condicionem o desenvolvimento dos fungos. Este facto é confirmado pela elevada atividade da água que indica a importância do controlo da temperatura neste tipo de queijo.
 - Verificou-se que para uma dada temperatura controlada o revestimento de quitosano retardará por alguns dias o aparecimento fúngico (para uma temperatura de 25°C e uma concentração de quitosano de 20 g/l, em 100 Ufc, o aparecimento de bolor foi adiado em aproximadamente 2 dias).
- Aplicação de quitosano em amostras de queijo:
 - Com a aplicação do revestimento do quitosano no queijo Marinhas, verificou-se que não existe diferença na quantidade de bolor na superfície dos queijos face aos queijos sem revestimento. Assim, conclui-se que o revestimento de quitosano, por si só, não é capaz de ter um efeito inibitório ou retardado do crescimento do fungo para o queijo Marinhas.

Não obstante das considerações apresentadas anteriormente, existem alguns estudos que poderiam ser realizados, como por exemplo:

- A avaliação do efeito do revestimento do quitosano sobre as características organolépticas do queijo, efetuando análise sensorial.
- Repetição dos ensaios realizados num maior número de amostras por forma a validar os resultados obtidos.
- A monitorização do estado de conservação dos queijos, em particular nas superfícies de venda.
- Análise comparativa do desenvolvimento do fungo em várias zonas de venda, comparando as condições de conservação por forma a avaliar a verdadeira eficácia do revestimento do quitosano.

7. BIBLIOGRAFIA

Aleksandra Balicka-Ramisz, Anna Wojtasz-Pajak, Bogumila Pilarczyk, Alojzy Ramisz, Lukasz Laurans, (2005) ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOSAN, *Sea Fisheries Institute Gdynia-Poland*.

Alvarenga, N. (2000). *Estudos em textura de Queijo Serpa*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos; Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Anandan, R., Nair, P.G.V., and Mathew, S. (2004) Anti-ulcerogenic effect of chitin and chitosan on mucosal antioxidant defence system in HCl-ethanol-induced ulcer in rats. *J Pharm Pharmacol* 56: 265–269.

Attanasio, M., Conte, A., Gammariello, D., Nobile M. (2009) A combination of chitosan, coating and modified atmosphere packaging for prolonging Fior di latte chesse shelf life, *Itália Carbohydrate Polymers* 78,151-156.

Broad Institute. URL: www.cellprofiler.org., Consultado em Março de 2013

Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E.T. (2004) Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot* 67: 833–848.

Chi, F.H., and Cheng, W.P. (2006) Use of chitosan as coagulant to treat wastewater from milk processing plant. *J Polym Environ* 14: 411–417.

Cimiano, P. C. (1991), *Guia para el analisis quimica de la leche y lois derivados lácteos*. Edition: Editions Ayala, Revista I LE.

Costa-Silva, H. S. R.; Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I.(2006). *Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços*. *Química Nova*. 29:4.

Crini, G., and Badot, P.M. (2008) Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature. *Prog Polym Sci* 33: 399–447.

deMan, J. M.(1999) *Principles of Food Chemistry*. USA, Aspen.

Diab, T.; Biliaderis, C. G.; Gerasopoulos, D.; Sfakiotakis, E.(2001) Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:988-1000.

Dias, F.S., Queiroz, D.C., Nascimento, R.F., and Lima, M.B. (2008) Simple system for preparation of chitosan microspheres. *Quím Nova* 31: 160–163.

Durango, A.M., Soares, N.F.F., Benevides, S., Teixeira, J., Carvalho, M., Wobeto, C., and Andrade, N.J. (2006) Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan. *Packaging Technol Sci* 19: 55–59.

Dutta, J. (2012) Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, Department of Chemistry, Motilal Nehru national Institute of Technology, Allahabad 211 004

El Tahlawy, K.F., El Bendary, M.A., Elhendawy, A.G., and Hudson, S.M. (2005) The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. *Carbohydr Polym* 60: 421–430.

Embuscado, ME e Huber KC (eds). (2009.) *Edible Films and Coatings for Food Applications*. NY: Springer. 403 pp.

Fajardo, P., Martins, T., Pastana, L., Teixeira A., Vicente, A., (2010) Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese, *Jornal of Food Engineering*, 101, 349-356.

Felt, O., Carrel, A., Baehni, P., Buri, P., and Gurny, R. (2000) Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy. *J Ocul Pharmacol Ther* 16: 261–270.

Fiorentin, L., Menon, B., Barros, S., Pereira, N., Lima, O. (2010) Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial bagaço de laranja, *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.14,n.6, p.653-659

Fox, P.; McSweeney, P.; Cogan, T.; Guinee, T. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*, Aspen Publishers, USA.

Gunasekaran, S.; Ak, M. (2003) *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press, USA.

Hasegawa, M., Yagi, K., Iwakawa, S., and Hirai, M. (2001) Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 92: 459–466.

Hino, T., Kawashima, Y., and Shimabayashi, S. (2000) Basic study for stabilization of w/o/w emulsion and its application to transcatheter arterial embolization therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 45: 27–45.

Hirano, S. (1996) Chitin biotechnology applications. *Biotechnol Annu Rev* 2: 237–258.

Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N., and Davis, S.S. (2001) Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 51: 81–96.

Kawase, M., Michibayashi, N., Nakashima, Y., Kurikawa, N., Yagi, K., and Mizoguchi, T. (1997) Application of glutaraldehyde-crosslinked chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biol Pharm Bull* 20: 708–710.

Kofuji, K., Akamine, H., Qian, C.J., Watanabe, K., Togan, Y., Nishimura, M., *et al.* (2004) Therapeutic efficacy of sustained drug release from chitosan gel on local inflammation. *Int J Pharm* 272: 65–78.

Kumar, M.N.V. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive Funct Polym* 46: 1–27.

Lactícínios das Marinhas, 2013. URL: www.lmarinhas.com. Consultado em Outubro de 2013

Lee, H.W., Park, Y.S., Choi, J.W., Yi, S.Y., and Shin, W.S. (2003) Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats. *Biol Pharm Bull* 26: 1100–1103.

Machado, M. (2003) *Evolução da textura e composição do queijo Serpa durante a sua maturação* Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciência e Engenharia de Alimentos; Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Marck et al, 2010, Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinyl dichloride lacquer coating:Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging, *Journal of Food Engineering* 99 491-496, República checa.

Martins, A. P. L.; Vasconcelos, M. M. (1993). Alguns aspetos da qualidade do leite e o fabrico de queijos regionais. *Via Láctea*, n.º 2, 73-79.

Mulawarman, Hallmann, J., Bell, D., Kopp-Holtwiesche, B., and Sikora, R.A. (2001) Effects of natural products on soil organisms and plant health enhancement. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol Wet* 66: 609–617.

Nunthanid, J., Laungtana-Anan, M., Sriamornsak, P., Limmatvapirat, S., Puttipatkhachorn, S., Lim, L.Y., and Khor, E. (2004) Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets. *J Control Release* 99: 15–26.

Park, S.; Zhao, Y.(2004) Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan based-films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:1933-1939.

Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Porta, R.(2010) Chitosan/Whey protein film as active coating to extend ricotta cheese shelf-life, *LWT-Food Science and Technology*,44,2324-2327.

Pintado, M., Fernandes, J., Tavora, F., Ramos, O., Monteiro, M., Malcata, F.,(2008) Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems, *Journal Elsevier, Food Microbiology* 25: 922-928.

Pintado, M., Fernandes, J., Ramos, O., Silva, S., Malcata, X.,(2012) Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties, *Critical reviews in food science and nutrition*, 52:6, 533-552.

Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M., Shirai, Keiko.(2003) Effect of chitosan and temperature on spore germination of aspergillus niger , Universidad de Sonora, Departamento de Investigacion en Polimeros y Materiales, Hermosillo, Mexico ,3: 582-586

Poças, M.F.F., Pintado, M.M.(2009) Packaging and the Shelf life of cheese Chapter 6 In Novel Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide, CRC Press, Taylor and Francis Group, ISBN 978-1-4200-7844-2, pp 103-125

Raafat, D. et Sahl H, 2009, Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey, ISAH 2005 - Warsaw, Poland, Vol 2. 406

Rhoades, J., and Roller, S. (2000) Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. Appl Environ Microbiol 66: 80–86.

Sherwin, E. Antioxidants(1990). Food additives. In: R. Branen. New York. 139–193

Souza, M. P.(2010) Desenvolvimento e otimização de revestimentos comestíveis a base do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) para melhorar a qualidade pós-colheita de frutas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. p.15, 2010.

Xiao-Fang, L., Xiao-Qiang, F., Sheng, Y., Ting-Pu, W., Zhong-shing, S.,(2008) Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against aspergillus niger, Iranian polymer journal 17: 843-852

Xie, W.M., Xu, P.X., and Liu, Q. (2001) Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorg Med Chem Lett 11: 1699–1701.

Yan, X.L., Khor, E., and Lim, L.Y. (2001) Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. J Biomed Mater Res 58: 358–365.

8. ANEXOS

8.1 - ANEXO I

Tabela 8.1 - Resultado do texturômetro - Queijo Marinhas com casca, agulha com 3mm de diametro

Nº Amostra	Pico força positiva [ciclo 1] (Kgf)	Pico força negativa [ciclo 2] (Kgf)	Pico força negativa [ciclo 1] (Kgf)	Pico força negativa [ciclo 2] (Kgf)	Área positiva [ciclo 1] (Kgf.sec)	Área positiva [ciclo 2] (kgf.sec)	Área negativa [ciclo 1] (Kgf.sec)	Área negativa [ciclo 2] (Kgf.sec)	Para área de pico positivo [ciclo 1] (kgf.sec)	Para área de pico positivo [ciclo 2] (kgf.sec)	Pico distância positiva [ciclo 1] (mm)	Pico distância positiva [ciclo 2] (mm)
1	1,151	1,005	-0,057	-0,12	1,562	1,166	-0,009	-0,035	1,083	0,813	9,996	9,996
2	1,238	0,439	-0,228	-0,223	1,517	0,588	-0,19	-0,251	1,136	0,174	9,996	9,996
3	0,637	0,38	-0,109	-0,111	0,61	0,303	-0,049	-0,073	0,377	0,242	9,996	9,997
4	0,426	0,3	-0,111	-0,089	0,441	0,22	-0,075	-0,072	0,273	0,18	9,996	10
5	0,563	0,441	-0,109	-0,106	0,609	0,365	-0,058	-0,072	0,468	0,281	9,996	9,996
Média	0,803	0,513	-0,123	-0,13	0,947	0,528	-0,076	-0,101	0,667	0,338	9,996	9,997
Desvio padrão	0,367	0,281	0,063	0,053	0,544	0,381	0,068	0,086	0,41	0,269	0	0,002

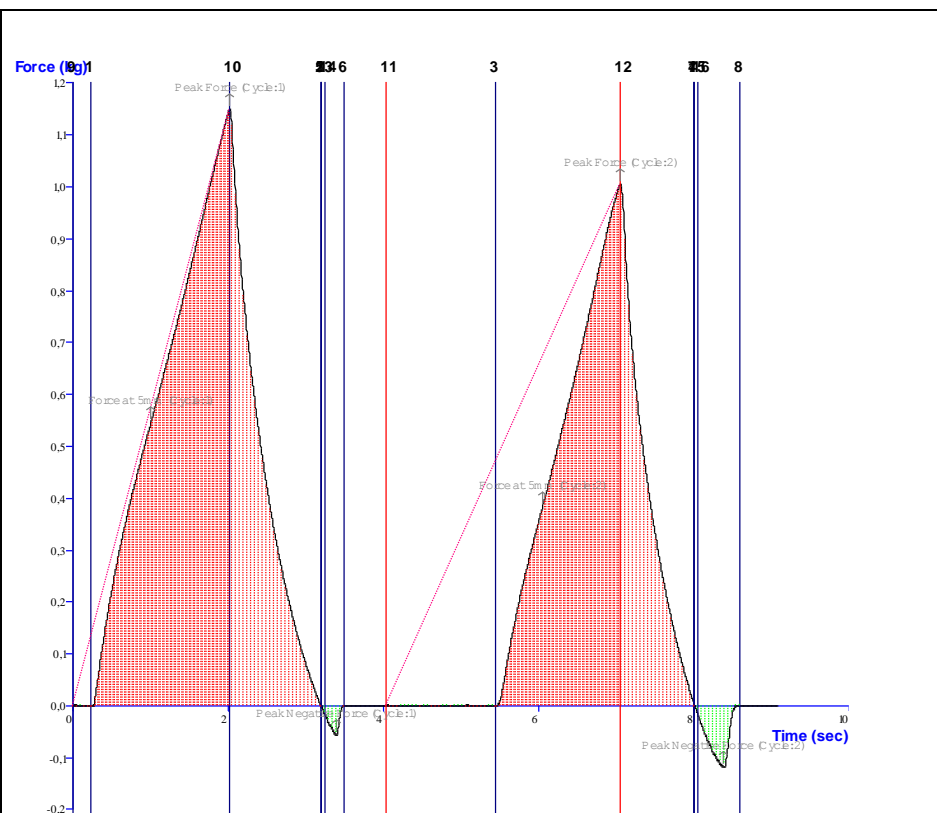


Figura 8.1 - Textura do queijo Marinhãs com casca 1

Propriedades texturais

Dureza	1,151 Kgf
Adesividade	0,009 Kgf.s.
Coevisidade	0,746
Elasticidade	1
Gomosidade	0,859 kgf
Mastigabilidade	0,859 kgf

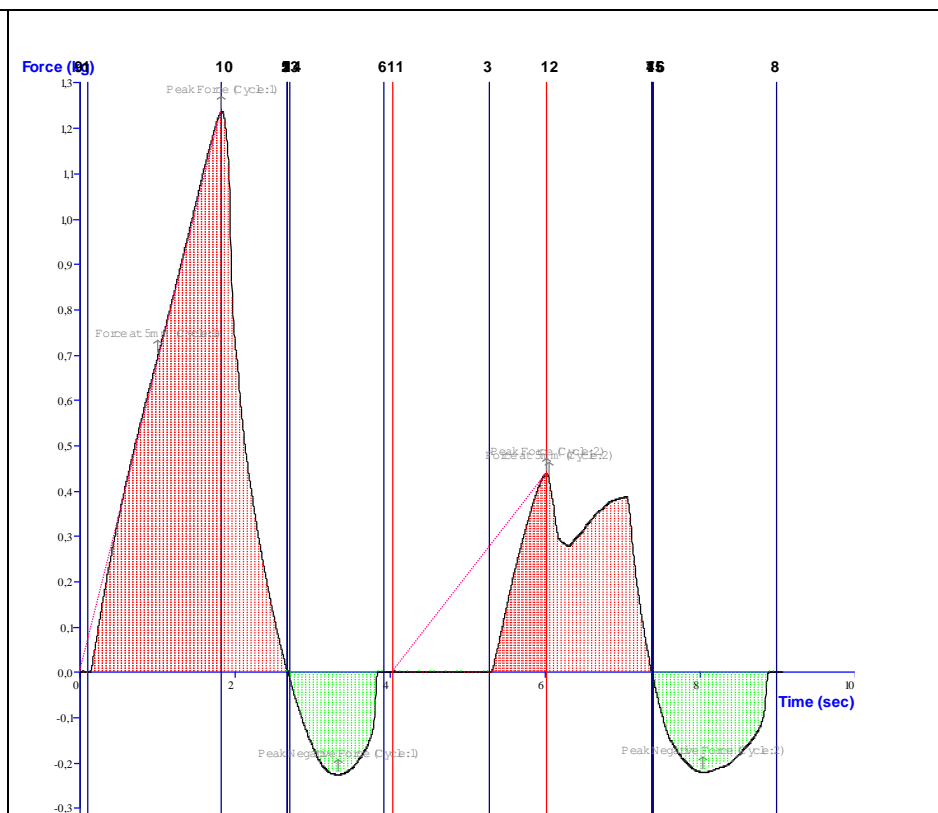


Figura 8.2 - Textura do queijo Marinhãs com casca 2

Propriedades texturais

Dureza	1,238 Kgf
Adesividade	0,019 Kgf.s.
Coevisidade	0,388
Elasticidade	1
Gomosidade	0,480 kgf
Mastigabilidade	0,480 kgf

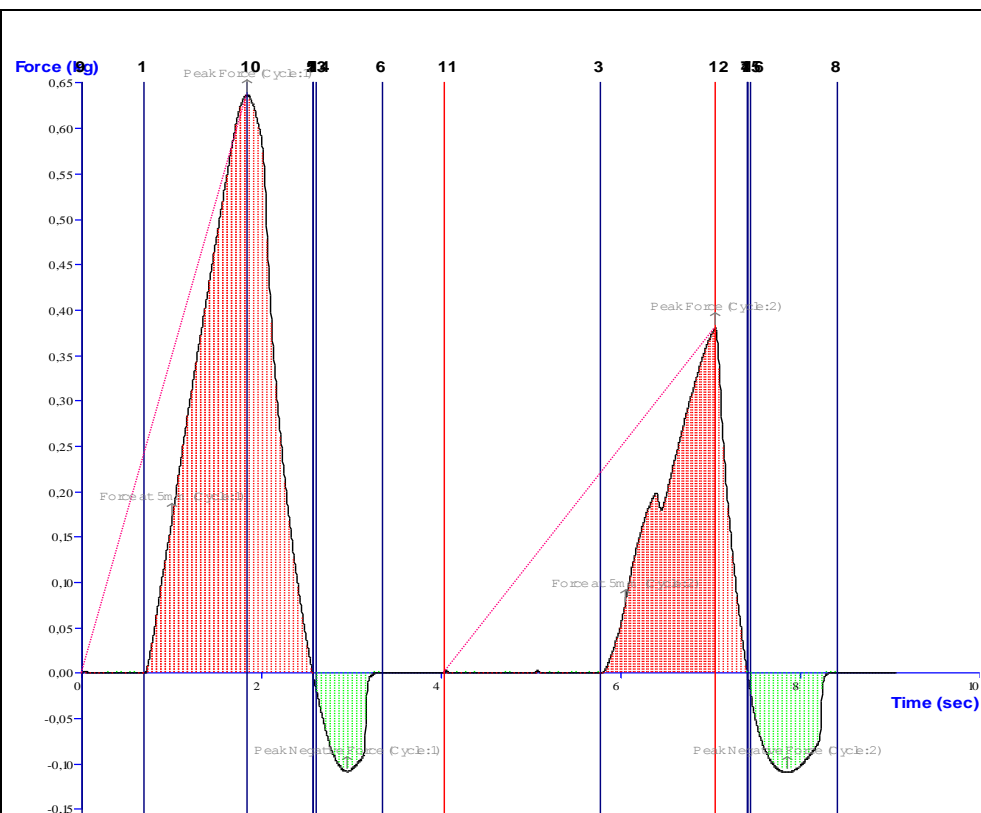


Figura 8.3 - Textura do queijo Marinhas com casca 3

Propriedades texturais

Dureza	0,637 Kgf
Adesividade	0,049 Kgf.s.
Coevisidade	0,497
Elasticidade	1,001
Gomosidade	0,317 kgf
Mastigabilidade	0,317 kgf

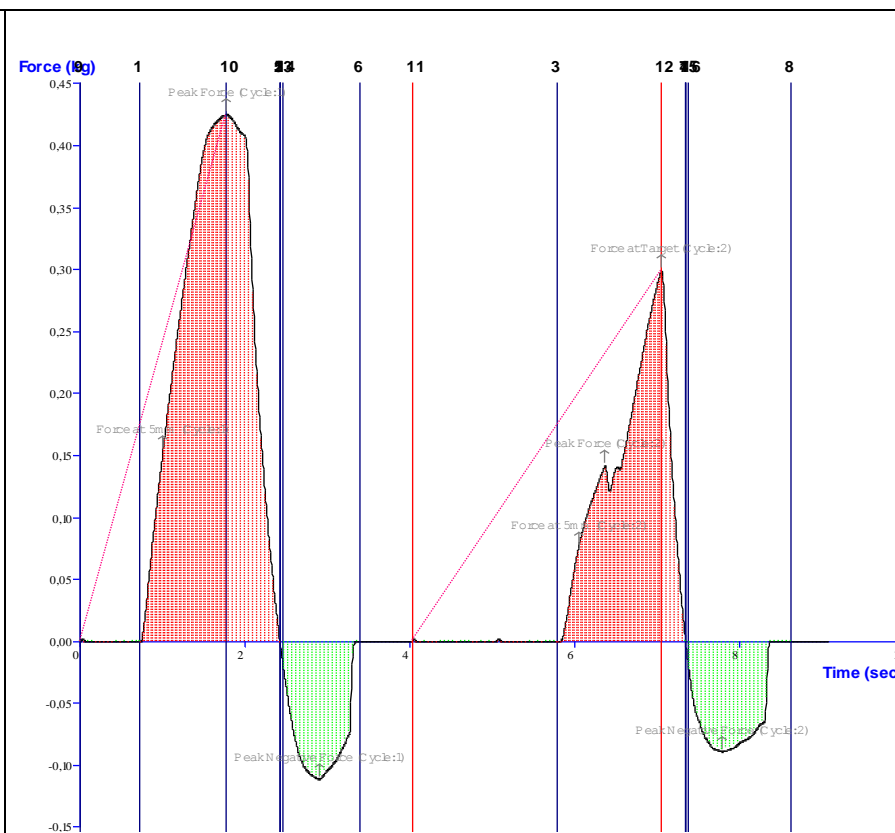


Figura 8.4 - Textura do queijo Marinhas com casca 4

Propriedades texturais

Dureza	0,426 Kgf
Adesividade	0,075 Kgf.s.
Coevisidade	0,499
Elasticidade	1
Gomosidade	0,213 kgf
Mastigabilidade	0,213 kgf

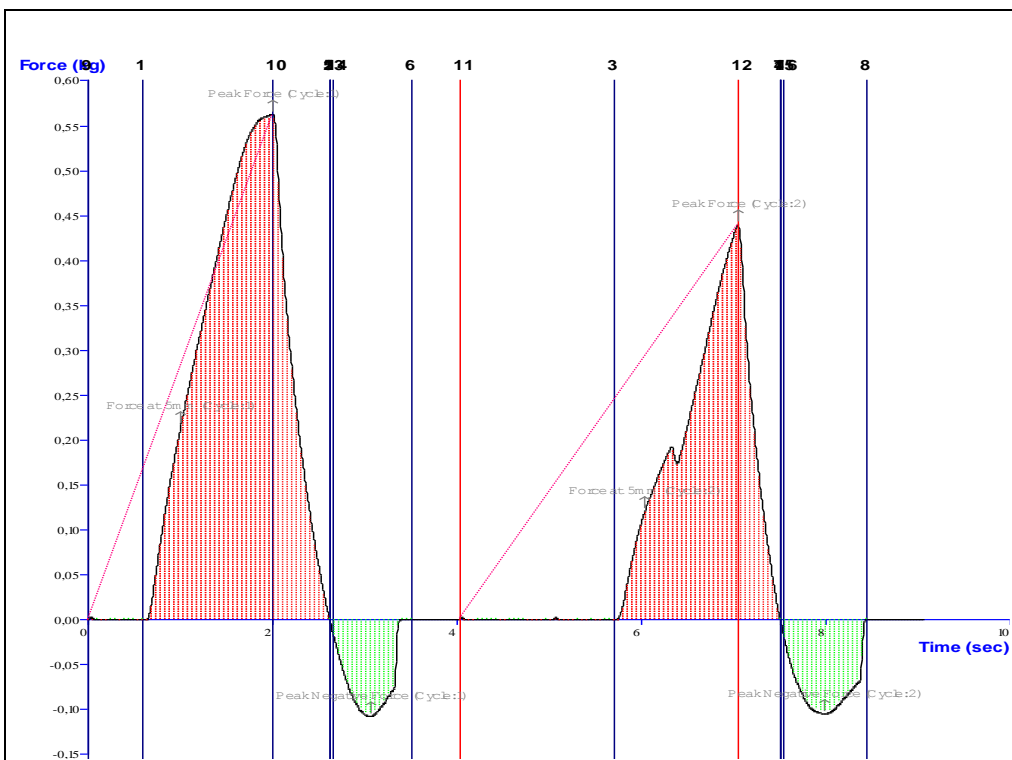


Figura 8.5 - Textura do queijo Marinhas com casca 5

Propriedades texturais

Dureza	0,563 Kgf
Adesividade	0,058 Kgf.s.
Coevisidade	0,599
Elasticidade	1
Gomosidade	0,51 kgf
Mastigabilidade	0,51 kgf

8.2 - ANEXO II

Tabela 8.2 - Resultado do texturômetro - Queijo Marinhas sem casca, agulha com 5mm de diâmetro

Nº Amostra	Pico força positiva [ciclo 1] (Kgf)	Pico força negativa [ciclo 2] (Kgf)	Pico força negativa [ciclo 1] (Kgf)	Pico força negativa [ciclo 2] (Kgf)	Área positiva [ciclo 1] (Kgf.sec)	Área positiva [ciclo 2] (kgf.sec)	Área negativa [ciclo 1] (Kgf.sec)	Área negativa [ciclo 2] (Kgf.sec)	Para área de pico positivo [ciclo 1] (kgf.sec)	Para área de pico positivo [ciclo 2] (kgf.sec)	Pico distância positiva [ciclo 1] (mm)	Pico distância positiva [ciclo 2] (mm)
1	0,639	0,511	-0,148	-0,135	0,752	0,477	-0,074	-0,085	0,565	0,358	9,996	10
2	0,589	0,411	-0,178	-0,169	0,701	0,392	-0,115	-0,13	0,496	0,315	9,996	9,996
3	0,624	0,487	-0,179	-0,179	0,649	0,384	-0,087	-0,108	0,506	0,298	9,996	10
4	0,659	0,534	-0,147	-0,167	0,807	0,516	-0,061	-0,098	0,609	0,389	9,996	9,996
5	0,745	0,538	-0,195	-0,189	1,08	0,581	-0,222	-0,037	0,894	0,445	9,996	9,997
Média	0,651	0,496	-0,169	-0,168	0,798	0,47	-0,112	-0,092	0,614	0,361	9,996	9,998
Desvio padrão	0,058	0,052	0,021	0,020	0,168	0,083	0,065	0,035	0,163	0,059	0	0,002

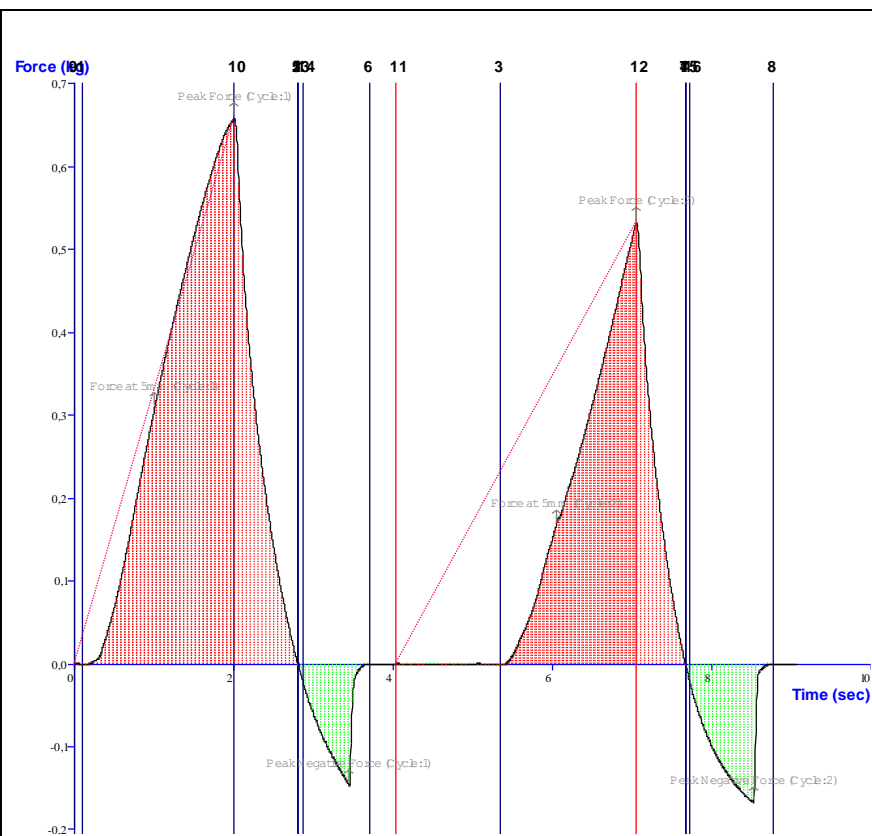


Figura 8.6 - Textura do queijo Marinhas sem casca 1

Propriedades texturais

Dureza	0,659 Kgf
Adesividade	0,061 Kgf.s.
Coevisidade	0,639
Elasticidade	1
Gomosidade	0,421 Kgf
Mastigabilidade	0,421 kgf

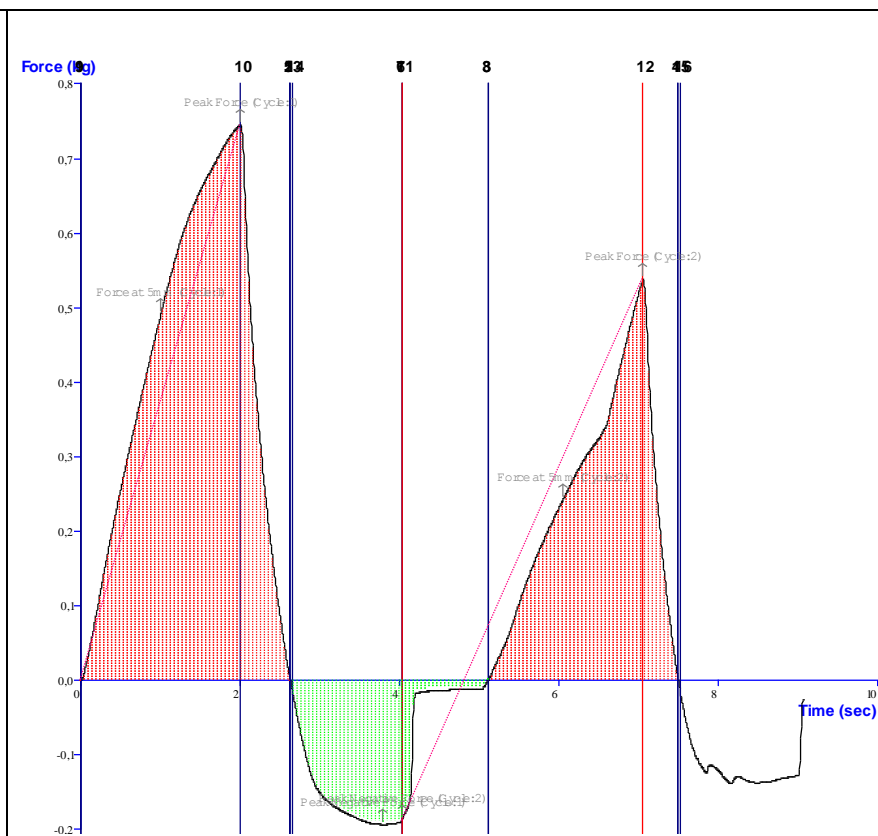


Figura 8.7 - Textura do queijo Marinhas sem casca 2

Propriedades texturais

Dureza	0,745 Kgf
Adesividade	0,222 Kgf.s.
Coevisidade	0,538
Elasticidade	1
Gomosidade	0,401 kgf
Mastigabilidade	0,401 kgf

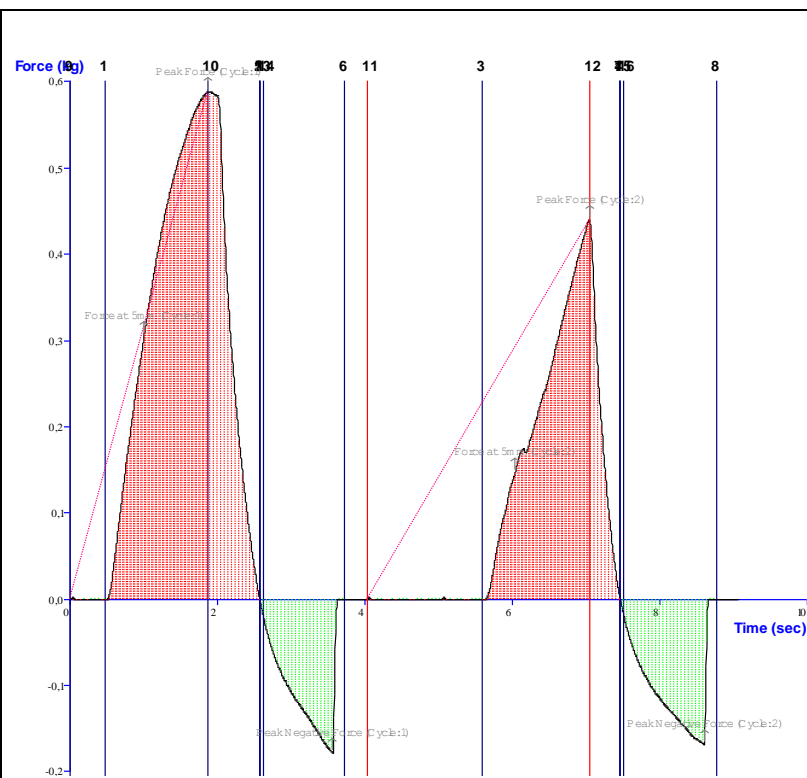


Figura 8.8 - Textura do queijo Marinhas sem casca 3

Propriedades texturais

Dureza	0,589 Kgf
Adesividade	0,115 Kgf.s.
Coevisidade	0,559
Elasticidade	1
Gomosidade	0,710 kgf
Mastigabilidade	0,710 kgf

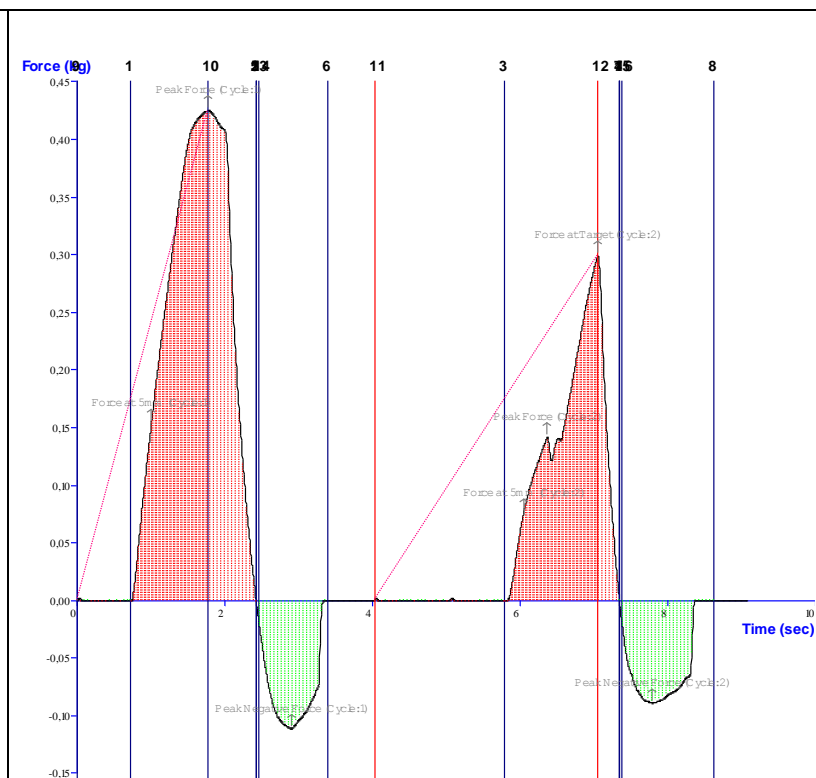


Figura 8.9 - Textura do queijo Marinhas sem casca 4

Propriedades texturais

Dureza	0,624 Kgf
Adesividade	0,087 Kgf.s.
Coevisidade	0,591
Elasticidade	1
Gomosidade	0,369 Kgf
Mastigabilidade	0,369 kgf

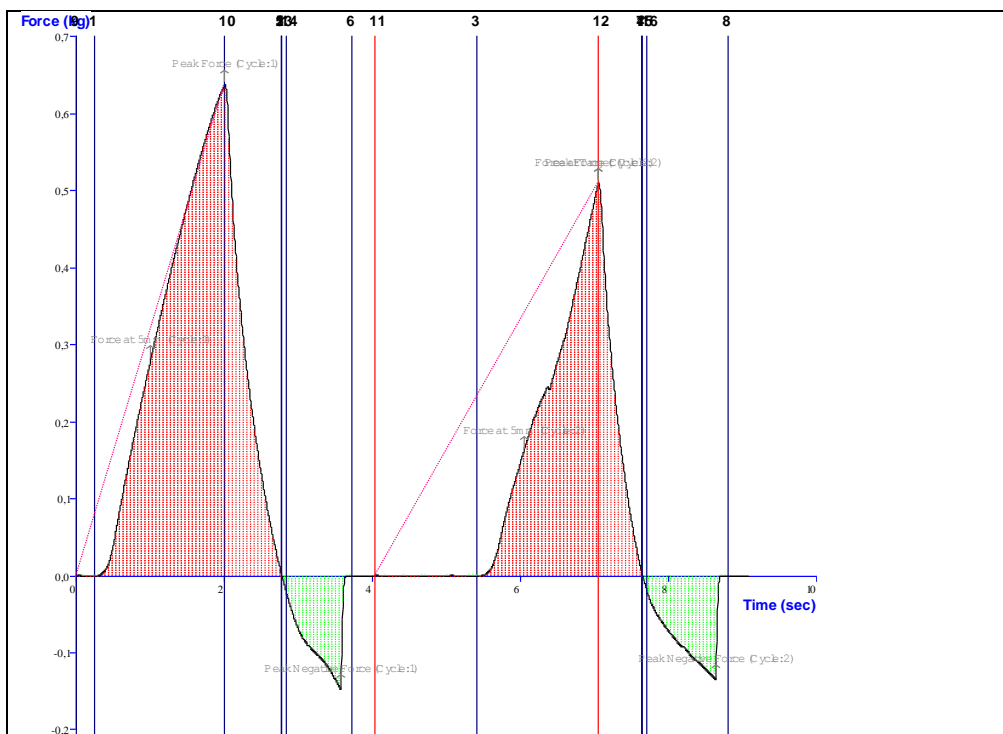


Figura 8.10 - Textura do queijo Marinhas sem casca 5

Propriedades texturais

Dureza	0,639 Kgf
Adesividade	0,065 Kgf.s.
Coevisidade	0,045
Elasticidade	1
Gomosidade	0,405 kgf
Mastigabilidade	0,405 kgf

8.3 - ANEXO III

Características do papel vegetal

Tabela 8.3 - Espessura

Nº Amostra	Espessura da amostra de papel vegetal (μm)				
	Medição 1	Medição 2	Medição 3	Medição 4	Medição 5
1	56	53	54	52	53
2	53	57	54	56	59
3	61	57	56	58	55
4	55	54	53	56	55
5	53	55	53	54	56
Média	55,120				
Desvio padrão	2,147				

Tabela 8.4 - Gramagem

Amostras	Gramagem (g/m^2)
1	39,40
2	39,00
3	39,90
4	38,90
5	39,30
Média	30,300
Desvio Padrão	0,352

Tabela 8.5 - Ensaio de cobb

Amostras	Massa seca (g)	Massa Húmida (g)	Área (m^2)	Determinação da absorção da água (g/m^2)	<i>Média</i> (g/m^2)	<i>Desvio padrão</i>
1	0,66	0,855	0,010	19,50	18,92	0,377
2	0,562	0,752	0,010	19,00		
3	0,586	0,771	0,010	18,50		
4	0,846	1,035	0,010	18,90		
5	0,843	1,03	0,010	18,70		

8.4 - ANEXO IV

Poster apresentado na 11th International Conference of the European Chitin Society

IMPROVING MARKETABILITY OF MARINHAS CHEESE BY USING CHITOSAN COATING. MONITORING EFFECT THROUGH IMAGE ANALYSIS

Fernandes, J.; Santos, I.; Mena, C.; Poças, F.*; Almeida, G

CBQF - Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa

Rua Dr. António Bernardino de Almeida 4200-72 Porto

*E-mail address: mpocas@porto.ucp.pt



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

ABSTRACT

The work aimed at studying the effect of chitosan coating on Marinhas cheese on protecting surface mould development by using image analyses tools. This cheese is a traditional cheese with no addition of anti-mould chemicals typically used in industrialized cheeses (www.lmarinhas.com). The properties of chitosan coatings regarding antimicrobial activity have been intensively studied as reported in published literature (Balicka-Ramisz et al. 2005; Raafat et al. 2008; Dutta et al. 2012). Applied as coating directly on the food or associated to other materials, chitosan represents a good example of an active packaging. The present study focused on semi-quantifying the chitosan effect on preventing cheese surface mould growth as perceived by the consumer. This perception was simulated by analyzing the ratio of mould-covered surface area to mould-free surface area using the image analysis software: CellProfiler (www.cellprofiler.org). Experiments were performed by submitting yeast extract agar plates to contact with paper coated with chitosan at different concentrations. The plates were inoculated with the pre-identified mould and incubated at 10°C. The development of mould on the surface was monitored during 2 weeks. A good correlation ($R^2=0,899$) was found between the chitosan concentration in the applied coating and the mould area coverage on the cheese surface.

INTRODUCTION

Cheese is a complex system where different reactions take place during the maturation and storage processes. After manufacture, semi-hard cheese undergoes a maturation process according to the ripening conditions the cheese is exposed to [1]. Marinhas cheese is a cured regional cheese, with ca 1 kg, produced with pasteurized milk, with a fat content between 12 and 16% and characteristic organoleptical properties (www.lmarinhas.pt). This cheese has no anti-mould chemicals typically added in industrialized cheeses. Consequently, the producer faces a problem of relative short shelf-life and limited marketability due to surface mould development, which inhibits consumer acceptance.

Chitosan is a natural cationic polysaccharides that can be derived from crustacean or fungi. Having antimicrobial properties against many bacteria, filamentous fungi and yeast [2] chitosan applications as edible film and coating are very attractive [3][4]. Applied as coating directly on the food or associated to other materials, chitosan represents a good example of an active packaging. The properties of chitosan coatings regarding antimicrobial activity have been intensively studied as reported in published literature. Chitosan coatings applied on cheese surfaces have been used as carriers of antimicrobials and as semipermeable barrier to gases and moisture leading to weight loss reduction and respiratory rate modification [5][6].

The present study focused on semi-quantifying the chitosan effect on preventing cheese surface mould growth as perceived by the consumer. Since the consumer perception on the degree of cheese contamination by the mould relies on visual senses, image analysis was used to assess the mould growth and how this is affected by chitosan treatment.

MATERIALS & METHODS

1. Identification of mold

- Cheese was collected from the market (supplied by Lactínios das Marinhas, Esposende, Portugal) to isolate and identify the mould prevailing in this cheese. The mould was isolated using Rose Bengal Agar (Oxoid®, England). Identification was performed by DNA sequencing.

2. Effect of chitosan

- To study the effect of chitosan, experiments were conducted by submitting yeast extract agar plates to contact with paper coated with chitosan at different concentrations.
- Mould growth was performed in Yeast Medium agar (YM agar) (Difco, France). Once abundant growth and spore formation were obtained, generally after 10 to 12 days at 25 °C, 10 ml of a sterile Ringer solution (Oxoid, England) was added to the surface of the agar plates. The spores were recovered by gentle swirling of the saline solution over the mould colonies. YM agar plates were inoculated with spore mould concentrations between 1 and 10⁹ /ml [7] and
- Inoculated Petri dishes were covered with coated paper containing each of the chitosan concentrations (20 g/L, 17 g/L and 13 g/L). Mould growth was evaluated after incubation at 25°C and 10°C for up to 7 days.

3. Chitosan coatings

- Chitosan with a degree of deacetylation of approximately 90% (Aqua Premier Co., Thailand). Chitosan solutions of 13, 17 and 20 g/L were prepared by dissolving 1 g of chitosan in 49 mL distilled water plus 1 mL lactic acid (Merck, Germany) under agitation, 0.5 g of glycerol (Riedel de Haen, Germany) as plasticizer were added and the solution homogenised. The coating was applied on top and side walls of the cheese.

4. Image Analyses

- The plates were analysed with image analysis software: CellProfiler, a free open-source software designed for exploring and quantitative analysing image-derived data (www.cellprofiler.org). The software allows to quantify the spots area originated by the growth of the mould as the ratio to total plate surface area. The ratio between the plate surface area covered with mould to the surface area mould-free (Am/At) was calculated from the experiments with the chitosan coatings with different concentrations. This ratio was correlated with the chitosan concentration.

REFERENCES

- [1] Paoletti, M.F.; Pizzato, M.M. 2009. Packaging and the Shelf life of cheese. Chapter 6 in Novel Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide. CRC Press, Taylor and Francis Group, ISBN 978-1-4200-7944-2, pp 103-125.
- [2] Rabea, E.I.; Badawy, M.E.T.; Stevens, C.V.; Spraggue, G.; Seutouat, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules 4 (6), 1457-1465.
- [3] Fajardo P., Martins J.T., Fucillo C., Pastrana L., Teixeira J.A., Vicente A.A. (2010) Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Salcoo cheese. Journal of Food Engineering, 101, 349-356.
- [4] Di Pierris P., Governato A., Mannella L., Giordano C.V., Porta R., (2011) Chitosan/Whey protein film as active coatings extend ricotta cheese shelf-life. LWT-Food Science and Technology, 44, 2324-2327.
- [5] Raafat D., Van Bagen K., Haas A., Sah H.S. Insights in the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74, 3764-73.
- [6] Coma Y., Marañón-Gros A., Ganeau S., Cognat A., Salin F., Deschamps A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. Journal of Food Science, 2002, 67, 1162-9.
- [7] Foster, Patrick (1997) Effect of Incubation Techniques and Relative Humidity on the Growth of Molds on the Surfaces of 'Yellow Layer' Cakes. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 192-198.

RESULTS & DISCUSSION



Figure 1. *Penicillium raistrickii* mould observed.

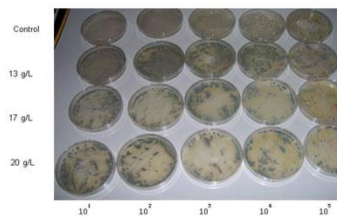


Figure 2. Plates with mould growth after incubation at 10°C. Series of different dilutions and plates in contact with papers coated with different chitosan concentrations.

Figure 2 shows the mould development incubation at 10°C for the control (non-chitosan) and 3 coatings with different chitosan concentrations corresponding to dilutions 10⁵ a 10¹.

At 25 °C, the optimum growth temperature, the mould was observed after 2 days only in all chitosan concentrations and dilutions, however the mould development was more intense in plates with paper coated with lower chitosan concentration for all dilutions tested. The results suggested a direct relationship between the chitosan concentration and the lower mould development. The observed mould growth at 10°C was lower than at 25 °C (as expected). At this temperature, the major factor inhibiting the mould growth seemed to be the temperature although the higher chitosan concentration limited more the mould development.

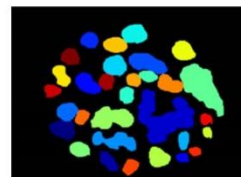


Figure 3. Example of mould surface area in the plate after CellProfiler analysis treatment

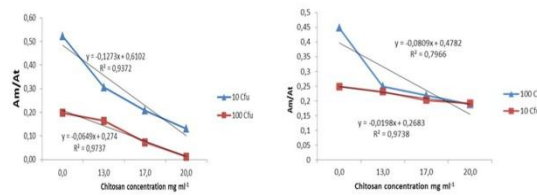


Figure 4. Effect of chitosan coating on the development of *Penicillium raistrickii* at 25°C

Figure 5. Effect of chitosan coating on the development of *Penicillium raistrickii* at 10°C.

The plates with 10⁵ e 10⁶ dilutions were used with the image analysis software to allow for an objective comparison between the effect of the coating with different concentration of chitosan. Figure 3 shows an example of a plate where the surface area occupied by the mould (Am) was delimited with the software.

The mould area was normalised with the total plate area (At) and the surface areas ratio was plotted against the chitosan concentration used in the paper coating (Figures 4 and 5).

It was concluded that although the number of colonies was similar in the different chitosan concentrations and in the two temperatures, there was an evident relationship between the plate surface area occupied by the mould and the chitosan concentration. This is what is perceived by the consumer. At 25 °C the effect of the chitosan is more pronounced than at 10 °C.



8.5 - ANEXO V

Quitosano

O quitosano é constituído essencialmente, por quitina. A quitina é uma substância abundante nos crustáceos, insetos, diatomáceas Marinhas e algas, bem como algumas células fúngicas, trata-se de um material de suporte. (Kumar,2000;Raafat e Sahl,2009).

O quitosano produzido através das paredes celulares dos fungos, algas verdes, leveduras e protozoários pode diferir ligeiramente do que é extraído dos crustáceos. (Raafat e Sahl,2009).

A quitina é uma substância branca, dura, não elástico. Quimicamente, trata-se de um polissacarídeo nitrogenado. A quitina como um polissacárido estrutural, é altamente hidrofóbico, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (Kumar,2000).

Estruturalmente, a quitina é muito semelhante à celulose, sendo a principal diferença a presença de uma acetamida (-NHCOCH₃) no grupo c-2 positivo com a substituição de um grupo hidroxilo (-OH) (Raafat e Sahl,2009).

Propriedades físico-químicas

O quitosano é um grupo (1-4) formando-se 2-amino-2 desoxi-β-d-glucano, preparados a partir da quitina, por hidrólise alcalina dos grupos N- acetil. A produção de quitosano a partir de quitina ocorre por desacetilação alcalina exaustiva, sendo esta quase sempre incompleta.

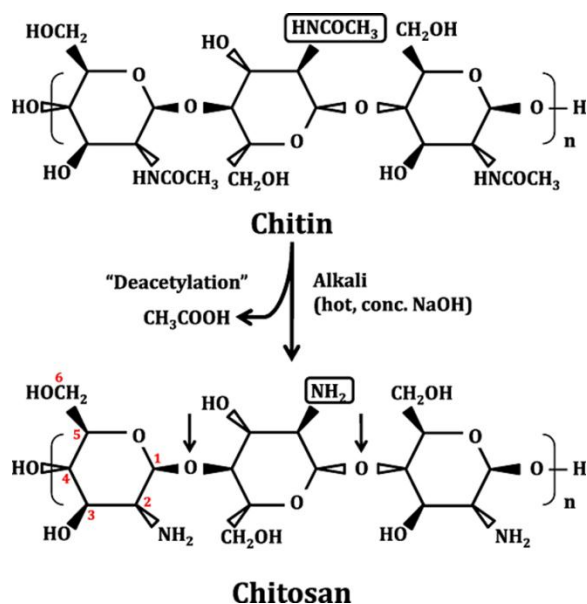


Figura 8.11 - Estrutura química e produção do quitosano (adaptado Raafat e Sahl,2009)

O quitosano foi descoberto por Rouget (1989), é de um elevado peso molecular (HMW), heteropolissacarídeo linear, constituído por dois monossacarídeos ligados entre si por β - (1 → 4). A

quantidade relativa dos dois monossacarídeos em quitosano molecular pode variar de amostras que sejam provenientes de diferentes graus de desacetilação (DD) (entre 75% - 95%), diferente peso molecular (MW) (entre 50kDa - 200kDa) e viscosidade (Raafat e Sahl,2009).

A elevada percentagem de grupos de nitrato (6,98%) fornece capacidade quelante. Em conjunto com atividade antitumoral, que realiza atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e biocompatibilidade assim o quitosano é um biomaterial muito procurado (Kumar,2000;Raafat e Sahl,2009).

O quitosano está disponível em vários graus de pureza: peso molecular, grau de desacetilação, formas de sal, viscosidades e valores de retenção de água. Essas propriedades afetam as suas características físico-químicas, que por sua vez governam quase todas as suas aplicações.

O quitosano, no entanto, possui algumas limitações. Tem utilização limitada devido à sua solubilidade em água, é solúvel apenas em alguns ácidos orgânicos, tais como o ácido acético e fórmico, possui uma elevada viscosidade e tendência para coagular as proteínas a um pH elevado.

Propriedades biológicas

O interesse comercial no quitosano e seus derivados resulta do facto destes se combinarem. Características biológicas favoráveis, incluindo a biodegradabilidade, biocompatibilidade e não-toxicidade. Estas propriedades são importantes, para materiais valiosos, com aplicações biomédicas, farmacêuticas e industriais.

O quitosano, e os seus oligómeros constituem novos biomateriais para inúmeras aplicações que vão de produtos farmacêuticos, cosméticos, médicos, alimentos e têxteis para aplicações agrícolas, resumidas na seguinte tabela:

Tabela 8.6 - Aplicações do Quitosano

Aplicações	Benefícios / vantagens	Referências
<u>Produtos farmacêuticos e cosméticos</u>		
As formulações convencionais		
Tablet fabricação	Binder; desintegrante; revestimento; lubrificante; diluente	Nunthanid et al.(2004)
Géis	Liberação sustentada, maior absorção	Kofuji et al.(2004)
Os filmes e membranas	Liberação controlada de drogas	Yan et al.(2001)
Emulsões	Estabilizador	Hino et al.(2000)

Aplicações	Benefícios / vantagens	Referências
As microesferas, microcápsulas	Mucoadesivo, aumento da biodisponibilidade, a entrega da droga sustentado; aumento da penetração	Dias et al.(2008)
As formulações oftálmicas	Tolerância ocular; mucoadhesive; molhamento e penetração de reforço propriedades; antibacteriano; prolongada residência de drogas pré-corneal	Felt et al.(2000)
<u>Entrega de vacinas</u>		
Vacinação da mucosa	A indução de respostas imunes das mucosas e sistêmicas, a penetração na mucosa intestinal e respiratória	Illum et al.(2001)
<u>Médica e biomédica</u>		
Antiácido e anti-ulcerogenic	Efeito emoliente e protetora da mucosa do estômago	Anandan et al. (2004)
Hipoglicemiante, hipertensivo	anti- A redução do nível de glicose no sangue, aumentando a tolerância à glicose e secreção de insulina	Lee et al.(2003)
Antioxidante	Scavenging de radicais e agentes quelantes de metais bivalentes	Xie et al.(2001)
Antitumoral	A indução de apoptose em células tumorais	Hasegawa et al. (2001)
As lentes de contato e bandagem	Clareza óptica; cicatrização de feridas; antimicrobiana; estabilidade mecânica, compatibilidade imunológica; correção óptica; permeabilidade ao gás; molhabilidade	Kumar (2000)
<u>A engenharia de tecidos</u>		
Scaffold para aplicações em engenharia de tecidos	A promoção do crescimento e diferenciação de tecidos	Kawase et al.(1997)
Enxertos de pele artificiais	Não antigénico; molde biodegradável para a síntese de tecido neodermis	Kumar (2000)

Aplicações	Benefícios / vantagens	Referências
<u>Agricultura</u>		
Do solo e da planta revitalizar	Prevenção da infecção microbiana, a promoção do crescimento de plantas	Mulawarman et al. (2001)
Revestimento conservante e biofungicida	Pulverizado em sementes para prolongar a sua vida de armazenamento	Hirano (1996)
<u>Indústrias alimentares</u>		
Processamento de alimentos	Melhora a segurança, qualidade e vida de prateleira de alimentos; esclarecimento de líquidos; preservativo; espessante	Rhoades e Roller (2000)
Revestimentos para legumes, frutas e peixes	Melhorar a vida de prateleira, impedindo a perda de umidade, retardando o crescimento de fungos	Cagri et al. (2004)
Filmes antimicrobianos comestíveis para embalagens de alimentos	-	Durango et al. (2006)
<u>Indústrias têxteis</u>		
Acabamento de têxteis	Antimicrobianos, controle de umidade e propriedades de absorção de corante	El Tahlawy et al. (2005)
Novas fibras para tecidos	-	Kumar (2000)
<u>Tratamento de águas residuais</u>		
Plantas de processamento de alimentos e bebidas	Coagulação e agente floculante; resultante lamas secas utilizadas em rações para animais	Chi e Cheng (2006)
Efluentes têxteis	Adsorção de corantes (de afinidade elevada para muitas classes de corantes)	Crini e Badot (2008)
<u>Diverso</u>		
Papel fotográfico	A resistência à abrasão; características ópticas favoráveis, a capacidade de formação de película	Kumar (2000)
Acabamento de papel	Confere resistência à umidade para papel	Kumar (2000)

8.5 - ANEXO VI

Relatório da Biopremier



RELATÓRIO DE ENSAIOS

Tipo de Relatório	Data	N/Refº
Original	11.04.2013	13OP1

DADOS DA AMOSTRA	DADOS CLIENTE
<p>Código Biopremier: 13OP1 Código Cliente: Flaca Petri</p> <p>Descrição: Cultura de fungo Data de colheita: NA Data transporte: 06-03-2013 Resp. transporte: Cliente Tipo produto: ND Requisição: NA</p>	<p>A/C: Cristina Mena Entidade: Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia Morada: Rua Dr. António Bernardino de Almeida 4200-072 Porto</p>
Data recepção	Data Início
08.03.2013	11.03.2013
Data Conclusão	
16.03.2013	

ENSAIO	CÓDIGO DO ENSAIO	UNIDADE	RESULTADO
Parâmetros de Análises de DNA		Data início:	11-03-2013
		Data fim:	16-03-2013
Identificação de fungos por sequenciação de DNA em amostras puras	PT0102 15.02.2012	NA	Penicillium raistrickii

Nota:

Legenda:

LD- Limite Detecção; LQ- Limite Quantificação;
 _Ensaio fora do âmbito de acreditação
 --Ensaio subcontratado acreditado
 ---Ensaio subcontratado não acreditado



Mário Gadanho, Dr
 Responsável de Laboratório

As notas estão fora do âmbito de acreditação. Após envio deste relatório, o remanescente da amostra será guardado por 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitada pelo cliente. Este Relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório. Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste Relatório. O presente Relatório foi emitido com assinatura electrónica. A amostragem está fora do âmbito de Acreditação.

BIOPREMIER - Inovação e Serviços em Biotecnologia, SA Cont. Nº 506 604 233
 Edifício ICAT - Campus da FCUL Campo Grande - 1749-016 Lisboa | Tel: 217 500 473 | Fax: 217 500 432 | E-mail: email@biopremier.com