



Propriedades Físicas e Antimicrobianas de Filmes Biodegradáveis de Amido e Mel

Physical and antimicrobial properties of starch and honey biodegradable films

CAVALIERI, Natália Furtado¹; DIAS, Jane de Souza Rui¹; MIYAGUSKU, Luciana¹; AMARAL, Marcos Serrou¹; PRATES, Mariana Ferreira Oliveira¹.

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, jane.srdias1978@gmail.com; mariana.prates@ufms.br.

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físicas e antimicrobianas de filmes biodegradáveis (FB) de amido e mel (1,0% e 2,0%). Os FB foram elaborados pela técnica de *casting*, sendo preparado um filme padrão para fins de comparação. Os FB foram avaliados quanto à umidade, espessura, gramatura, permeabilidade ao vapor de água (Pva), solubilidade em água e atividade antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella Epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e as médias comparadas por Tukey ($p < 0,05$). A adição de mel em filmes biodegradáveis de amido pode ocasionar a redução da umidade dos filmes, enquanto aumentou a espessura, gramatura, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade dos mesmos. A adição de mel contribuiu para aumento da resistência mecânica dos filmes, com redução das propriedades de barreira. Não foi observado efeito da adição de mel na presença de atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis frente aos microorganismos estudados.

Palavras-chave: embalagens ativas, embalagem biodegradável, *casting*.

Abstract: The objective of this work was to evaluate the physical and antimicrobial properties of biodegradable films (BF) of starch and honey (1.0% and 2.0%). The BF were elaborated by the casting technique, and a standard film was prepared for comparison purposes. The BF were evaluated for moisture, thickness, weight, water vapor permeability (WVP), water solubility and antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli*, *Salmonella Epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The result was expressed as mean \pm standard deviation and the means compared by Tukey ($p < 0.05$). The addition of honey to biodegradable starch films may lead to the reduction of film moisture while increasing the thickness, weight, water vapor permeability and solubility of the films. The addition of honey contributed to increase the mechanical strength of the films, with reduction of barrier properties. No effect of honey addition on the presence of antimicrobial activity of the biodegradable films against the studied microorganisms was observed.



Keywords: active packaging, biodegradable packaging, casting.

Introdução

Os alimentos estão susceptíveis a contínuas mudanças físicas, químicas, microbiológicas ou enzimáticas que levam a sua deterioração podendo acarretar à diminuição da qualidade e inaptidão para o consumo humano. Torna-se necessário a utilização de embalagens para agir como barreira entre o ambiente externo e o alimento (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Embalagens sintéticas são frequentemente empregadas para auxiliar na conservação dos alimentos, porém não há controle no seu descarte. O emprego de filmes biodegradáveis tornou-se uma alternativa para a minimização do problema (MALI et al., 2010).

A utilização do amido em biofilmes está baseada na formação de géis pela amilose. Os filmes elaborados unicamente com amido tendem a ter baixa flexibilidade e serem quebradiços. A incorporação de agentes plastificantes, como o sorbitol, pode aperfeiçoar as propriedades mecânicas dos filmes (SHIMAZU et al., 2007). A elaboração de filmes de amido é através da técnica de *casting*. Essa técnica permite a obtenção de filmes com transparência significativa (SILVA, 2011).

O uso de embalagens antimicrobianas é considerado eficiente por apresentar uma lenta migração do agente para o alimento (SOARES et al., 2009). A utilização de antimicrobianos naturais é uma alternativa eficaz e econômica na substituição de antimicrobianos sintéticos, uma vez que a alta empregabilidade de antimicrobianos sintéticos pode causar a resistência de microorganismos patogênicos aos compostos sintéticos (VARGAS et al., 2004).

O mel além de alimento é um produto terapêutico e de alta qualidade, constituído por mais de 200 compostos, alguns conferem capacidade antimicrobiana (LOPES, 2010).

Fragoso (2017) pesquisou as propriedades antioxidantes e antimicrobianas de méis monoflorais de cipó de uva e aroeira e mel silvestre da cidade de Campo Grande e Bodoquena – MS e verificou que todos apresentaram atividades antioxidantes e antimicrobianas significativas. Outros estudos foram realizados no sentido de incorporar extrato de própolis e mel em filmes biodegradáveis a fim de verificar a eficiência e aplicabilidade na substituição de antimicrobianos sintéticos frente a cepas específicas de microorganismos tanto gram-negativos como gram-positivos (LOPES, 2010; FERNANDES JUNIOR et al., 2006; VARGAS et al., 2004). Porém



não há relatos de estudos do efeito da incorporação de mel nas propriedades de barreira de embalagens biodegradáveis a base de amido. Torna-se interessante avaliar se o processo de incorporação de mel em filmes biodegradáveis permite a manutenção das propriedades antimicrobianas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação de mel em filmes biodegradáveis de amido nas suas propriedades físicas e antimicrobianas.

Metodologia

O experimento foi realizado na Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande – MS, entre os meses de outubro a dezembro de 2017.

Foram utilizados para a elaboração das soluções filmogênicas (SF) amido de milho comercial, sorbitol e mel silvestre. Inicialmente o amido foi caracterizado, em triplicata, quanto ao teor de açúcares totais, cinzas e umidade segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBON et al., 2008). Os filmes biodegradáveis foram elaborados a partir da técnica de *casting*, que consiste na preparação de uma SF a partir da solubilização e geleificação do amido em um solvente e posteriormente aplicação em um suporte e secagem para evaporação do solvente (ZACTITI, 2004). O filme padrão (FP) foi elaborado com 4% de amido, 0,22% de sorbitol e 95,78% de água destilada, totalizando 100%. A solução filmogênica foi levada ao aquecimento em banho-maria sob agitação constante até atingir a temperatura de 81°C durante 5 minutos (PELLISSARI et al., 2013), o processo de arrefecimento foi à temperatura ambiente.

O filme com mel 1% (FM1) foi adicionado de 4% de amido, 0,22% de sorbitol, 1% de mel e 94,78% de água destilada. O filme com mel 2% (FM2) foi adicionado de 4% de amido, 0,22% de sorbitol, 2% de mel e 93,78% de água destilada. O mel foi incorporado à solução filmogênica após o processo de arrefecimento visando preservar as propriedades antimicrobianas.

Aproximadamente 18 g de cada SF foram aplicadas em placas de petri com cerca de 4 cm de diâmetro. As SF foram desidratadas em estufa (Fanem 315 SE) a 40°C por cerca de 20 horas até atingirem peso constante. Após resfriamento natural os filmes biodegradáveis foram retirados das placas com o auxílio de pinças e acondicionados à vácuo à temperatura ambiente, separadamente para posterior caracterização. Todos os filmes foram elaborados em triplicata.



A espessura foi determinada de acordo com Vicentini (2003), com medições em sete pontos diferentes de cada filme biodegrável elaborado, com auxílio de um micrômetro (Digimess) com precisão 0,005 mm. O resultado foi expresso em média \pm desvio padrão das sete leituras.

A umidade do filme foi determinada segundo metodologia descrita pela AOAC (2010). A gramatura (G) foi obtida pela equação 1 (SILVA, 2011)

$$G = \frac{m}{A} \quad (1)$$

Em que G = gramatura (g cm^{-2}), m = massa do filme (g) e A = área do filme (cm^2).

A permeabilidade ao vapor de água (Pva) foi determinada gravimetricamente, segundo teste da ASTM (1995). Os filmes, em forma de disco de 2,3 cm de diâmetro foram colocados em célula contendo sílica gel (UR = 0%; 0 Pa de pressão de vapor) de forma a funcionarem como uma membrana, garantindo que a migração de umidade ocorra exclusivamente através dos filmes. As células foram colocadas dentro de um dessecador contendo água destilada (UR = 100%; $0,4297 \times 10^4$ Pa de pressão de vapor), em sala climatizada a 25°C, com umidade relativa e pressão de vapor constante. A célula foi pesada em balança analítica, com precisão de 0,0001 g, a cada 24 h por sete dias consecutivos. Permeabilidade foi calculada por meio da Equação 2.

$$Pva = \frac{GV}{AT \cdot (p_1 - p_2)} \quad (2)$$

Em que: Pva é a permeabilidade ao vapor de água [g (m dia Pa)^{-1}]; G é o ganho de massa (g) da célula durante 24 h; V é a espessura (m) média do filme; A é a área (m^2) de permeação do filme; T é o tempo (dias) e $p_1 - p_2$ é o gradiente de pressão (Pa) de vapor entre as superfícies do filme ($0,4297 \times 10^4$ Pa).

Na determinação da solubilidade dos filmes foram retiradas três amostras com 2 cm de diâmetro, de umidade conhecida, pesadas e imersas em 50 ml de água destilada. O sistema foi agitado a 120 rpm, a 25°C, por 24 horas, em agitador (BIOMIXER TS-2000 A VDRL SHAKER). Após este período as amostras foram retiradas da água e secas (105°C por 24h) para determinar a massa do material que não foi solubilizada e o resultado foi obtido por diferença de massa (VICENTINI, 2003). A solubilidade em água foi expressa em porcentagem de material solubilizado, calculada a partir dos resultados em triplicata, por meio da Equação 3.



$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{(m_i - m_f) \cdot 100}{m_i} \quad (3)$$

Em que: m_i é a massa inicial e m_f é a massa final.

Os filmes biodegradáveis padrão (FP) foram utilizados como controle negativo das análises. O antibiótico, controle positivo, foi preparado na concentração de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, com água ultrapura (água Milli-Q®), do fármaco azitromicina.

Foi preparado inóculo bacteriano das cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Epidermidis (ATCC 14990) e *Listeria Monocytogenes* (ATCC 13932) cedidas pelo Instituto Fiocruz/RJ, de acordo com metodologia proposta pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2003). As cepas dos microorganismos selecionados foram isoladas em ágar Muller-Hinton (MH) (HIMEDIA) e em seguida diluídas em tubos de ensaio contendo solução salina a 0,85%, obtendo-se turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland (Probac®), correspondente a cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} .

Foram semeadas em placas MH, e em seguida confeccionados, com furador metálico autoclavado, poços de 4 mm de diâmetro, para inserção de 50 μL das amostras dos filmes biodegradáveis adicionados de mel em triplicata, 50 μL de azitromicina ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 50 μL de filmes biodegradáveis sem adição de mel (controle negativo). Foram incubados a 37°C pelo período de 24h, com posterior medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em mm, com utilização de paquímetro (Western PRO®).

O delineamento experimental inteiramente casualizado. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Foi realizada análise de variância (ANOVA) e aplicado teste de Tukey (nível de significância de 5%) para comparação de médias, utilizando o software Origin 6.1.

Resultados e discussões

O teor de umidade do amido comercial foi de $11,16 \pm 0,27\%$, estando dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira para amidos com limite de 14% (BRASIL, 2005). O conteúdo de mineral fixo foi de $0,14 \pm 0,00\%$ e $85,74 \pm 0,13\%$ de açúcares totais presentes no amido de milho comercial.



Na Tabela 1 estão apresentadas as propriedades físicas e de barreira dos Filmes Biodegradáveis elaborados.

Tabela 1. Propriedades físicas dos filmes biodegradáveis padrão (FP), com 1% (FM1) e com 2% de mel (FM2).

Parâmetro/ amostra	FP	FM1	FM2
Umidade (g 100g ⁻¹)	27,09±16,6a	23,52±5,21b	16,05±1,20c
Gramatura (g m ⁻²)	215,03±5,62a	294,62±14,48b	333,71±8,94c
Espessura (mm)	0,075±0,002a	0,090±0,008b	0,113±0,013c
Pva x 10 ⁶ * [g (m dia Pa) ⁻¹]	0,74±0,20a	1,53±0,24b	2,16±0,55c
Solubilidade (%)	30,00±0,87a	51,89±0,52b	73,42±1,97c

*Pva = permeabilidade ao vapor de água.

Médias na mesma linha seguidas de diferentes letras diferem significativamente (p≤0,05) pelo teste de Tukey.

Todos os parâmetros avaliados nos filmes biodegradáveis elaborados foram afetados pela adição de mel (p≤0,05). Os filmes FM2 apresentaram menor teor de umidade, maior espessura, gramatura, Pva e solubilidade, quando comparado aos demais tratamentos.

Os valores de umidade dos filmes variaram de 16,05 (filmes com 2% de mel) a 27,09 (filmes padrão), com diferenças significativas (p≤0,05) entre as formulações. Dantas et al. (2015) caracterizaram filmes de amido e glicerol adicionados de polpa de manga, acerola seriguela e encontraram valores de 10,93 a 19,69, constatando que as formulações contendo maiores percentuais de polpa de frutas possuíam maiores umidades, superiores aos filmes controle. Souza et al. (2012) estudaram a umidade de filmes de amido de mandioca plastificados com açúcar invertido e sacarose e demonstraram o aumento da umidade com a incorporação de polpa de manga e acerola (de 15,03 a 19,76%). A interação entre aditivos e o plastificante pode influenciar na umidade de filmes de amido (MALI et al., 2004).

Como esperado a adição de mel aos filmes biodegradáveis aumentou a gramatura dos mesmos (p≤0,05), já que foi incorporada matéria na solução filmogênica. A gramatura está diretamente relacionada à resistência mecânica do filme, quanto maior a gramatura maior a resistência mecânica que o filme oferece (HENRIQUE et al., 2008).



A adição de mel provocou um aumento na espessura dos filmes elaborados ($p \leq 0,05$), sugerindo que pode promover o aumento das suas propriedades de barreira. O aumento da espessura dos filmes em relação à adição de matérias-primas também foi observado por Farias et al. (2012) em filmes elaborados com amido de mandioca adicionados de polpa de acerola e por Souza et al. (2012) em filmes de amido de mandioca com polpa manga e acerola. No presente estudo os filmes elaborados apresentaram espessura menor quando comparados com a dos filmes de amido de mandioca e própolis plastificado com glicerol (ARAÚJO, 2014).

A determinação da espessura é um processo essencial, pois consegue avaliar a uniformidade dos filmes elaborados e sua interferência nas propriedades de barreira, resistência mecânica e permeabilidade ao vapor de água (SOBRAL, 1999).

Os valores de permeabilidade ao vapor de água (P_{va}) dos filmes elaborados (Tabela 1) variaram de 0,74 a 2,16 g (m dia Pa)^{-1} , enquanto com incremento nos resultados com a adição de mel aos mesmos ($p \leq 0,05$). O aumento da espessura dos filmes pode ter contribuído para o aumento na P_{va} observado, propriedades inter-relacionadas. Souza et al. (2012) constataram que a adição de polpa de manga e de acerola em baixos percentuais (2,9%) em filmes de amido de mandioca plastificado com sacarose e açúcar invertido resultou em um aumento nos valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Os autores sugeriram que a natureza hidrofílica do amido e das fibras oriundas das polpas pode ter contribuído para os resultados. A hidrofiliidade dos polissacarídeos presentes no mel pode ter contribuído para o aumento na permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

Os resultados de P_{va} encontrados neste estudo foram inferiores aos relatados por Souza (2011) para filmes biodegradáveis de amido de mandioca e glicerol ($4,92 \pm 0,75 \text{ g mm m}^{-2} \text{ dia}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$). Farias et al. (2012) encontrou valores superiores de P_{va} em filmes elaborados com amido de mandioca, glicerol e polpa de acerola (4,99 a 5,55 $\text{g mm dia}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$).

A solubilidade em água dos filmes variou de 30 a 73% (Tabela 1). A adição de mel apresentou efeito significativo ($p \leq 0,05$) positivo, indicando que quanto mais elevado o teor de mel adicionado maior a solubilidade em água dos filmes. Os valores de solubilidade em água encontrados nesse estudo foram maiores que os encontrados por Farias et al. (2012) em filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca adicionados de polpa de acerola, com valores entre 16 a 52%. Os valores de solubilidade encontrados para FP e FM1 foram menores que os encontrados por Dantas et al. (2015) para filmes biodegradáveis a base de amido de mandioca e glicerol adicionados de polpas de manga, acerola e seriguela. Os valores variaram



de 62,51 a 81,62%, com redução da espessura com o incremento de polpa de frutas. A solubilidade dos filmes em água é uma importante propriedade, podendo atuar como proteção para alimentos em que a a_w é alta (GONTARD et al., 1994). Os filmes biodegradáveis elaborados não apresentaram efeito antimicrobiano contra os microrganismos testados – *Escherichia coli*, *Salmonella Epidemidis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Não foi observada a presença do halo de inibição para as amostras avaliadas. Estudos anteriores revelaram que o mel puro avaliado apresentou propriedades antimicrobianas frente a microrganismos de interesse para a indústria alimentícia (FRAGOSO, 2017). A extração dos compostos com atividade antimicrobiana do mel para inoculação nos filmes é uma alternativa para estudos futuros.

Conclusões

A adição de mel em filmes biodegradáveis de amido de milho ocasionou a redução da umidade dos filmes, enquanto aumentou a espessura, gramatura, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade dos mesmos. A adição de mel contribuiu para aumento da resistência mecânica dos filmes, com redução das propriedades de barreira. Não foi observado efeito da adição de mel na presença de atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis frente aos microrganismos estudados.

Referências bibliográficas

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Designation: **D638M-93, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM, 1995.

BRASIL (2005). **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. DOU 23/09/2005, Seção 1, p. 6.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Clinical laboratory standards**, Wayne – Pennsylvania, 2003.

DANTAS, E.A.; COSTA, S.S.; CRUZ, L.S.; BRAMONT, W.B.; COSTA, A.S.; PADILHA, F.F.; DRUZIAN, J.I.; MACHADO, B.A.S. Caracterização e avaliação das



propriedades antioxidantes de filmes biodegradáveis incorporados com polpas de frutas tropicais. **Ciência Rural**, v.45, n.1, p.142-148, jan, 2015.

FARIAS, M.G.; FAKHOURI, F.M.; DE CARVALHO, C.W.P.; ASCHERI, J.L.R. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Química Nova**, v. 35, n. 3, p.546-552, 2012.

FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de Apis mellifera obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, jan-fev, 2006.

FRAGOSO, M.R. **Ação antimicrobiana e funcional de méis do estado de Mato Grosso do Sul**. (Dissertação de mestrado) 2017. 70p. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n.39, 1994.

HENRIQUE, C M, CEREDA, M P, SARMENTO, S B S (2008). Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28: 231-240.

LOPES, M.F.P.D. **Bioatividade do mel: Atividade antioxidante, antimicrobiana e composição em ácidos orgânicos**. (Dissertação de mestrado). 2010. 113p. Universidade de Lisboa, Faculdade de ciências.

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

PELISSARI, F. M.; ANDRADE-MAHECHA, M. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain banana (*Musa paradisiaca*). **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 681-690, 2013.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.de.; CANAVESI, E. Requisito de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. **Centro de tecnologia de embalagem**. 2º edição, Campinas, 2002.



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

SILVA, E.M.da. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão**. (Dissertação) 2011. p.43. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; PIRES, A.C.S.; CAMILLOTO, G.P.; SILVA, P.S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v.56, n.4, p.370-378, jul/ago, 2009.

SOBRAL, P.J.A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**, Uberlândia, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

SOUZA, A.C. **Desenvolvimento de embalagem biodegradável ativa a base de fécula de mandioca e agentes antimicrobianos naturais**. (Tese de doutorado, Engenharia Química) 2011. 138p. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

DE SOUZA, C.O.; SILVA, L.T.; DRUZIAN, J.I. Estudo comparativo da caracterização de filmes biodegradáveis de amido de mandioca contendo polpas de manga e acerola. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 262-267, 2012.

VARGAS, A.C. de.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M; COSTA, M.M. da.; SILVA, M.S; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34. n.1. p. 159-163. Jan/fev, 2004.

VICENTINI, N.M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 198f. Tese (Doutorado em Concentração em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2003.

ZACTITI, E.M.; **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de alginato de cálcio sem e com sorbato de potássio**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) 2004. 150p. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2004.

ZENEON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. **Instituto Adolfo Lutz**. 4ª ed. 1ª ed digital. p.1020, 2008.