



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

NEI FRONZA

**FILMES POLIMÉRICOS COM ADIÇÃO DE AGENTE
ANTIMICROBIANO A BASE DE PRATA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
EM CORTES DE CARNE BOVINA**

**Florianópolis - SC
2009**

NEI FRONZA

**FILMES POLIMÉRICOS COM ADIÇÃO DE AGENTE
ANTIMICROBIANO A BASE DE PRATA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
EM CORTES DE CARNE BOVINA**

Trabalho submetido ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Mara Gabriela Novy Quadri

Co-orientador:

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado

**Florianópolis – SC
2009**

NEI FRONZA

**FILMES POLIMÉRICOS COM ADIÇÃO DE AGENTE
ANTIMICROBIANO A BASE DE PRATA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
EM CORTES DE CARNE BOVINA**

Trabalho submetido ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Florianópolis, ___ de _____ de 2009.

Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado

Banca Examinadora:

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela felicidade da vida.

À Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri, pelo privilégio de poder contar com a sua orientação, sua infinita disponibilidade, atenção, confiança e por todos os momentos que tive oportunidade de aprender com a sua seriedade e empenho na realização deste trabalho. Agradeço a Deus por a ter colocado em minha vida, por termos construído esta amizade maravilhosa. Muito Obrigado.

À empresa BRASKEM Petroquímica, unidade de Triunfo – RS pelo apoio técnico para produção das amostras dos filmes. Agradecimento especial ao Sr. Edwin Moncada de Azevedo do Laboratório de Ciência dos Polímeros e Nanotecnologia, pois além do apoio técnico, nos tornamos grandes amigos e parceiros em outros trabalhos. Também à empresa MILLIKEM CHEMICAL, especialmente ao Sr. Rodrigo Santiago pelo fornecimento dos aditivos.

Aos meus colegas de trabalho, do grupo de alimentos: Aline, Carina, Fabiana, Gini, Neiva, Nelsi, Léo, Tony, pelos ótimos momentos que diariamente passamos juntos. Agradeço também a Ana Maria Sândi, por fazer verdadeira ginástica na confecção dos horários de aula.

Agradecimento muito especial, sem palavras, a minha esposa Daniele e para minha filha Isabela, que por muitas vezes, deixei de dar a atenção merecida.

Aos dirigentes e colegas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFET, campus Concórdia por disponibilizar a estrutura física para realização deste trabalho. À Universidade do Contestado – UnC.

RESUMO

Embalagens ativas, especialmente os filmes antimicrobianos vêm sendo estudados e avaliados como método auxiliar de conservação de alimentos, principalmente por aumentar a vida-de-prateleira e reduzirem os níveis de conservantes adicionados diretamente ao alimento. Neste trabalho, foram desenvolvidos filmes antimicrobianos de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD), preparados por extrusão industrial, adicionados de antimicrobiano à base de prata (AlphaSan®) a concentrações de 0, 0,1, 0,5 e 1,0% (m/m). Os filmes extrusados foram avaliados quanto à espessura, distribuição da partícula de prata nos filmes e propriedades de tração, resistência a perfuração e barreira ao oxigênio (TPO₂). O potencial antimicrobiano in-vitro de cada filme em relação aos microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* spp. e *Salmonella* spp. foi testado. Amostras de carne bovina (contrafilé) foram acondicionadas em embalagens a vácuo elaboradas com os filmes nas concentrações citadas, para verificação da ação antimicrobiana em relação à Contagem Bacteriana Total-CBT e bactérias do gênero *Pseudomonas* por 10 dias, em condições de refrigeração comercial (3±1°C). Adicionalmente, foi realizada a análise de cor utilizando colorímetro e metodologia digital, além da avaliação do teor de prata no alimento. O aditivo a base de prata inserido nos filmes de PEBD não modificou de forma significativa as propriedades de tração, resistência à perfuração e barreira ao oxigênio, mostrando dispersão homogênea das partícula de prata nos filmes. As embalagens com as três concentrações de antimicrobiano estudadas mostraram-se eficientes na inibição do crescimento in-vitro de *Staphylococcus aureus*., porém, apenas o filme com maior concentração de prata (1%) apresentou inibição de *Salmonella* spp. Este filme também mostrou melhor desempenho na redução de microrganismos Contagem bacteriana total-CBT e contagem de *Pseudomonas*, apresentando, ao final de um tempo de avaliação de 10 dias, uma redução de 2 ciclos logarítmicos para CBT e 1 ciclo para *Pseudomonas*, em relação à carne acondicionada no filme sem adição de agente antimicrobiano. A cor da carne acondicionada nos filmes antimicrobianos contendo 0,5 e 1% adquiriu coloração vermelho-cereja, enquanto que as amostras acondicionadas a 0,1% de prata e no filme controle mostraram intensificação da coloração marrom referente à formação de metamioglobina, cor típica de carne embalada a vácuo. O método digital para obtenção dos parâmetros de cor mostrou ser mais fiel à observação visual do produto quando comparado com os resultados obtidos pelo colorímetro. Foi observado um teor máximo de prata presente no alimento de $0,0375 \pm 0,0028$ mg de Ag.kg⁻¹, correspondente ao filme com adição 1% de prata. Este valor, porém, não excedeu a quantidade determinada pela legislação vigente, que é de 0,05 mg.kg⁻¹.

ABSTRACT

Active packages, specially antimicrobial films, are being studied and evaluated as auxiliary methods of food conservation, mainly for increasing shelf-life and reducing the levels of additives added directly in the foods. In this work, antimicrobial films made of Low Density Polyethylene Films (LDPE), prepared by industrial extrusion with silver addition (AlphaSan®). The films produced were evaluated regarding to thickness, silver particle distribution and traction properties, resistance to perforation and oxygen barrier (O₂PT). The in-vitro microbial potential of each film related to the pathogenical microorganisms *Staphylococcus aureus* spp. and *Salmonella* spp. were tested. Samples of beef, Striploin (*m. Longissimus dorsi*) were packed for microbial action verification on Total Bacterial Counting (TBC) and growth of *Pseudomonas* for 10 days in chilled commercial conditions (3±1 °C). Additionally, a meat color study in each treatment was done by traditional colorimetric methods, using a colorimeter, and by digital and computational method. Determination of the silver content was evaluated in the meat. The addition of the silver-based additive has not significantly modified ($p>0,05$) the traction properties, perforation resistance and oxygen barrier, showing also a good homogeneity in the silver particle distribution and thickness of the film. The antimicrobial films in the three concentrations were evaluated and considered efficient on the in-vitro growth inhibition of *Staphylococcus aureus*. Considering the other microorganisms tested, just the 1% silver-based film F3 film (film with greater concentration of silver (1%)) showed inhibition against *Salmonella* spp. It The F3 film also had a better performance on the psychotrophic microorganism reduction and counting of *Pseudomonas* reducing 2 logarithmic cycles for TBC and 1 cycle for *Pseudomonas* in ten days, the end of the evaluation time. The color of meat packaged using 0,5% and 1% antimicrobial films showed to keep the bright red coloration, while the samples packed in the Control or 0,1% silver films showed a brownish color, characteristic of the metamioglobina formation, a typical compound found in vacuum packed meat. The digital color meter method gave better informations about the meat color in the storage time. Colorimetric measures given by a colorimeter did not correspond to the meat color as observed by eyes. Silver maximum contents detected in meat packed using films with 0,5 and 1% m:m silver amount was $0,0375 \pm 0,0028$ mg Ag.kg⁻¹, and did not exceeded that one determined by Brazilian Food Law (0,05mg.kg⁻¹), in the evaluated times.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - (a) embalagens com substâncias absorvedoras de oxigênio incorporadas ao material polimérico. (b) <i>Sachet</i> absorvedor de oxigênio em contato com alimentos.	24
Figura 2.2 - sistemas de embalagens com absorção de umidade	26
Figura 2.3 - Sachês geradores de gás SO ₂ GRAPEGE®	27
Figura 2.4 - Métodos de incorporação de agente antimicrobiano em embalagens.....	28
Figura 2.5 - Halo de inibição ao redor de uma moeda de prata	33
Figura 2.6 - Troca iônica do elemento prata por grupamentos dos microrganismos	34
Figura 2.7 - Curva de tração em função da deformação	38
Figura 2.8 - Polietileno de baixa densidade com estrutura ramificada	42
Figura 3.1 - Ilustração detalhando o panorama dos procedimentos experimentais.	48
Figura 3.2 - Masterbatches de PEBD HS150 com 30% do antimicrobiano <i>AlphaSan</i> ®	50
Figura 3.3 - Saqueta para acondicionamento de carne.....	52
Figura 3.4 - Ilustração do procedimento para a preparação dos inóculos de <i>S. aureus spp</i> e <i>Salmonella spp</i>	57
Figura 3.5 - Procedimento para realização do teste do halo.	58
Figura 3.6 - Sistema de acondicionamento e armazenamento das amostras.	59
Figura 4.1 - Fotomicrografias da superfície dos filmes de P.E a diferentes concentrações de <i>AlphaSan</i> ®. FC: 0%, F1: 0,1%; F2: 0,5%, F3: 1,0% . (aumento 500x).....	66
Figura 4.2 - Fotomicrografias de superfície do PE com 1,0% de antimicrobiano (F3).	67
Figura 4.3 - Fotomicrografias de superfície dos filmes (aumento 2000x), para a) F1, e b) FC	68
Figura 4.4 - Halos de inibição dos filmes antimicrobiano (F1, F2, F3) e filme controle contra <i>S. aureus</i>	75
Figura 4.5 - Aproximação do halo de inibição de <i>S. aureus spp</i> . contra o filme 3 (F3)	76
Figura 4.6 - Mecanismo da ação oligodinâmica entre a prata e enzimas de microrganismos (Pelczar <i>et. al.</i> , 2005)., à similaridade da Prata.	77

Figura 4.7 - Halo de inibição do filme F3 em relação à <i>Salmonella spp.</i>	78
Figura 4.8 - Contagem Bacteriana Total de <i>Psicrotróficos</i> (CBT) para os tratamentos	80
Figura 4.9 - Contagem Bacteriana Total de <i>Psicrotróficos</i> (CBT) para os tratamentos FC e F3.....	82
Figura 4.10 - Contagem de <i>Pseudomonas</i> para os tratamentos antimicrobianos F1, F2, F3, e controle, FC.....	83
Figura 4.11 - Coloração dos três estados de oxidação do pigmento da carne bovina.	85
Figura 4.12 - Comparação da cor das amostras de carne nos tratamentos FC, F1, F2 e F3 após 3 dias de armazenamento.....	88
Figura 4.13 - Comparação da cor da carne após 10 dias de armazenamento.	89
Figura 4. 14 - Teor de prata (mg.Kg ⁻¹) das amostras acondicionadas nos tratamentos F2 e F3.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Resumo de agente antimicrobiano versus microrganismo alvo/suporte polimérico.....	31
Tabela 3.1 - Cálculo mássico para elaboração dos filmes.....	51
Tabela 4.1 - Espessura dos filmes com adição de AlphaSan a diferentes concentrações	65
Tabela 4.2 - Taxa de permeabilidade ao Oxigênio de PE adicionado de antimicrobiano a diferentes concentrações.....	69
Tabela 4.3 - Ensaio de tração para os filmes antimicrobianos e controle.....	70
Tabela 4.4 - Determinação das componentes de perfuração dos filmes	73
Tabela 4.5 - Raio do halo de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>Salmonella</i>	74
Tabela 4.6 - Parâmetros de cor para as amostras de carne acondicionadas nos filmes adicionados de antimicrobiano.	87
Tabela 4.7 - Parâmetros de cor para carne acondicionada nos filmes antimicrobianos e controle.	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 Objetivos.....	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Conservação de alimentos e segurança alimentar	20
2.2 embalagens ativas: conceitos, tipos de sistemas ativos e aplicações.....	21
2.2.1 Conceitos de embalagens ativas.....	21
2.2.2 Tipos de sistemas de embalagens ativas	22
2.2.3 Embalagens com liberação ou absorção de CO ₂ e etanol ou SO ₂	26
2.2.4 Embalagens antimicrobianas	27
2.3 Uso dos compostos a base de metais como agentes antimicrobianos.....	32
2.3.1 Agente antimicrobiano AlphaSan [®]	33
2.4 Panorama das pesquisas e aplicações de filmes.....	34
2.5 Fundamentos sobre as propriedades físicas de filmes.....	37
2.5.1 Propriedades mecânicas	37
2.5.2 Propriedades de tração	38
2.5.3 Propriedades de barreiras	40
2.6 Polietileno de baixa densidade (PEBD).....	40
2.7 Efeito da adição de agentes antimicrobianos em polímeros aplicados a alimentos	42
2.8 Deterioração de carne por ação dos microrganismos.....	43
2.8.1 Conceitos gerais sobre microbiologia da carne.....	43
2.8.2 Principais microrganismos patogênicos em carnes.....	44
2.8.3 Principais microrganismos deteriorantes em carnes	45
2.9 Legislação para embalagens ativas	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Material.....	48
3.1.1 Agente antimicrobiano.....	48
3.1.2 Polietileno de baixa densidade, PEBD.....	49
3.1.3 Elaboração dos filmes	49
3.1.4 Confeção das saquetas.....	51
3.2 Métodos	52
3.2.1 Caracterização dos filmes	52

3.2.2	Atividade antimicrobiana in-vitro dos filmes produzidos.....	55
3.2.3	Acondicionamento das amostras de carne nos filmes elaborados	58
3.2.4	Avaliação microbiológica da carne durante o armazenamento....	59
3.2.5	Avaliação da cor da carne durante a estocagem.....	61
3.2.6	Teor de prata nos cortes de carne.....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Caracterização dos filmes	64
4.1.1	Espessura.....	64
4.1.2	Distribuição das partículas de aditivo nos filmes.....	65
4.1.3	Permeabilidade ao oxigênio.....	68
4.1.4	Determinação da resistência dos filmes à tração.....	70
4.1.5	Resistência à perfuração.....	72
4.2	Avaliação da ação antimicrobiana <i>in-vitro</i> dos filmes produzidos .	74
4.3	Avaliação da eficiência antimicrobiana dos filmes em corte de carne bovino	79
4.3.1	Contagem total bacteriana de psicrotróficos – CBT	79
4.3.2	Contagem de <i>Pseudomonas</i>	83
4.4	Avaliação da cor da carne acondicionada em filmes antimicrobianos.....	84
4.4.1	Avaliação da cor da carne embalada com uso de colorímetro	85
4.4.2	Avaliação da cor da carne por método fotográfico digital	89
4.5	Avaliação do teor de prata na carne embalada com filme antimicrobiano	91
5	CONCLUSÕES.....	94
	REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o estilo de vida dos consumidores estabelece desafios aos pesquisadores das mais diferentes áreas. Neste contexto, a indústria alimentícia não poderia tomar um rumo diferente. Nos últimos anos, pode ser percebida uma brusca mudança a nível mundial nos hábitos e costumes alimentares. O número de consumidores que buscam alimentos “*prontos para o consumo*” tem crescido a cada ano, fato este que se deve, possivelmente, ao pouco tempo por parte da população para o preparo culinário mínimo doméstico.

Por outro lado, a busca pela alimentação prática e rápida não eliminou por completo a exigência de alimentos sensorialmente similares aos alimentos *in natura*, além da manutenção quanto aos valores nutricionais e a segurança do alimento (AHVENAINEM *et al.*, 1998). Os organismos mundiais de atenção à saúde e qualidade de vida, dentre eles a *World Health Organization* (WHO), enfocam constantemente em suas campanhas a preocupação com a qualidade nutricional e, principalmente, com as questões ligadas à saúde pública, ou seja, a qualidade microbiológica.

Wurlitzer (2007) relata que os grandes volumes de alimentos industrializados põem em evidência a ocorrência de doenças veiculadas pelos mesmos. Estimativas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos indicam 76 milhões de casos de doenças alimentares por ano, com aproximadamente 5000 óbitos (CLEVELAND *et al.*, 2001). Na União Européia foram relatados 42.447 casos de doenças de origem alimentar (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2005), com maior número de casos causados por *Salmonella* e *Campylobacter*, seguidos por *Yersinia*, *E.coli* e *Listeria monocytogenes*, sendo reportadas 107 mortes por listeriose, em 2004. No Brasil, em levantamento realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), foram constatados que 4,5 e 4,8% das infecções hospitalares diagnosticadas como infecções intestinais são causadas pela ingestão de alimentos microbiologicamente alterados.

Para os casos citados de veiculação de doenças por alimentos, o abuso da exposição do alimento ao binômio de tempo e temperatura se faz presente na grande maioria dos casos, juntamente com a presença de microrganismos pertencentes à classe dos patogênicos. Mas a classe dos microrganismos patogênicos não é a única que afeta a integridade de um produto alimentício.

Os microrganismos deteriorantes não transmitem doenças mas, em contrapartida, são responsáveis por alterações indesejáveis nas propriedades organolépticas, influenciando na vida de prateleira do alimento. Um exemplo é o sistema de acondicionamento de carne *in-natura* para comercialização no Brasil, cujas embalagens a vácuo possuem, em sua constituição, envoltórios com filmes de alta barreira ao oxigênio. Este sistema, embora seja eficiente como barreira aos microrganismos pertencentes à flora aeróbia, e que são associados à patogenicidade, não impede, de forma significativa, o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. Estes últimos são tipicamente microaerófilos, ou mesmo anaeróbios, e neste conceito a embalagem exerce apenas o papel de barreira contra o oxigênio.

O crescimento de microrganismos deteriorantes acarreta na carne resfriada odores indesejáveis e, também, a formação da “limosidade superficial”, popularmente chamada “mela”, fator este que exerce influência negativa na escolha do produto por parte dos consumidores. Além da limosidade e odores indesejáveis, o sistema a vácuo, por conta da baixa disponibilidade de oxigênio, acarreta a mudança de coloração vermelha típica de carne fresca, levando-a a tonalidades de vermelho escuro intenso, por vezes quase marrom, que muitas vezes é associada a produtos deteriorados.

Na busca por alternativas que minimizem os efeitos do sistema a vácuo, surge a possibilidade de aplicação de sistemas de embalagens ativas. Embalagens ativas têm como conceito não apenas atuar como barreira ao oxigênio e/ou demais fatores externos, mas também de controlar um ponto crítico de conservação por meio de interações entre a própria embalagem e o alimento acondicionado. Para este caso específico de acondicionamento de carne, o tipo de embalagem ativa adequada envolve os filmes com capacidade antimicrobiana.

Embora a proposta do sistema apresente inúmeras vantagens, diversos pontos devem ser avaliados na aplicação de filmes antimicrobianos em escala industrial. Por se tratar de estudos relativamente recentes, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos a respeito da verificação da eficiência de agentes antimicrobianos, especialmente aqueles que contêm prata (Ag), sobre microrganismos emergentes *in vitro* e, em alguns casos, incorporação da prata em biofilmes. No entanto, poucos estudos estão voltados à incorporação da prata em filmes poliméricos com potencialidade de aplicação em situações comerciais.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Com foco no estudo de aplicações de filmes ativos em alimentos, este trabalho apresenta, como proposta, a incorporação de um aditivo antimicrobiano à base de prata, diretamente ao processo de extrusão de filmes comerciais de polietileno. Dos filmes produzidos, pretende-se avaliar possíveis alterações sofridas pelo filme devido à incorporação do aditivo, bem como as potencialidades de aplicação em cortes de carne bovina.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Produzir, por sistema de extrusão industrial, filmes de PEBD em três diferentes concentrações do agente antimicrobiano *AlphaSan*[®];
- b) Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* dos filmes em relação aos microrganismos de referência em carne bovina acondicionadas à vácuo (*Staphylococcus aureus spp.*, *Salmonella spp.*);
- c) Avaliar o efeito da incorporação do aditivo antimicrobiano sobre as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes produzidos;
- d) Analisar a distribuição da partícula do aditivo antimicrobiano inserido nos filmes;
- e) Caracterizar o potencial microbiológico do filme utilizado como embalagem a vácuo de cortes de carne bovina durante a estocagem em sistema de refrigeração comercial, no que diz respeito a microrganismos psicrotóxicos e *Pseudomonas*;
- f) Verificar o efeito do filme com agente microbiano à base de prata sobre a cor da carne ao longo do tempo de estocagem;
- g) Detectar a contaminação do alimento por liberação da prata oriunda da embalagem.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Conservação de alimentos e segurança alimentar

Mudanças nos hábitos e costumes alimentares têm acompanhado o homem durante toda sua trajetória. A necessidade de armazenamento durante os períodos de escassez impôs a ele a busca por alternativas de conservação para sustento de seus dependentes, gerando, mesmo que por instinto, técnicas de conservação de alimentos que muito contribuíram para a ciência aplicada hoje. Como exemplos de sucesso tem-se a salga, a secagem e o resfriamento (WURLITZER, 2007).

O estilo atual de vida dos consumidores tem gerado desafios aos fabricantes de alimentos pois, a cada dia, cresce a procura por alimentos que sejam cada vez mais convenientes, com curto tempo de preparo e longa vida de prateleira. A vida de prateleira de um alimento depende de uma série de fatores ligados a alterações de ordem química, física e principalmente microbiológica. As alterações de ordem física e química estão fortemente associadas a fatores externos, como presença de luz e temperaturas de transporte e armazenamento (OLIVEIRA, 2004).

Embora as alterações de ordem microbiológica tenham também relação com fatores ambientais, os alimentos apresentam, em sua maioria, uma diversidade de fatores tal que se tornam excelentes meios de crescimento para microrganismos. Dentre os alimentos comercializados, a carne, especialmente a bovina, é merecedora de atenção. A principal propriedade que explica o rápido crescimento microbiano na carne bovina consiste em sua própria composição: 75% de água e 25% de vários outros metabólitos, como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e açúcares (LAWRIE, 1979). A temperatura é um dos fatores de grande importância, mas não o único. A proporção de bactérias presentes na superfície dos cortes bovinos é, em grande parte, oriunda da manipulação nas mesas frigoríficas, da água utilizada no processo e das câmaras frigoríficas de armazenamento. Com tantas fontes contaminantes possíveis, a carne torna-se um foco de grande importância no âmbito da segurança alimentar.

Segundo levantamento realizado por Silveira (2005), já é conhecido que mais de 200 doenças são transmitidas através do alimento. Muitos patógenos que causam sérios problemas hoje, como por exemplo *Campylobacter cavatenesis*, não eram reconhecidos como causadores de doenças veiculadas por alimentos, há 25 anos (MEAD *et al.*, 1991). Em

1996, 46% dos casos confirmados e reportados pelo *Center for Disease Control (CDC)* e *Food and Drug Administration (FDA)*, foram causados por *Campylobacter cavatenesis*, sendo seguidas por *Salmonella* (28%), *Shigela* (17%) e *Escherichia coli* O157: H7 (5%) (ALTEKRUSE *et al.*, 1999). Os sintomas variam de moderada gastroenterite a síndromes renais, hepáticas e neurológicas.

De 1995 a 1999, 22 países latino-americanos enviaram informações ao Sistema Regional de informações Epidemiológica das doenças veiculadas por alimentos, indicando a ocorrência de 3.577 surtos, 113.349 casos e 210 mortes. Para os surtos o alimento associado foi identificado em 2.540 ocorrências (74,5%). Os alimentos de origem animal foram os que se apresentaram com maior frequência (1.457 surtos), o que representa 61,7% do total. Os agentes etiológicos foram identificados em 1.939 surtos, sendo que a *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureos* foram os que contribuíram em maiores proporções (SILVEIRA, 2005 *apud* OPAS, 2000).

Dados disponíveis pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no período de 1998 a 2001, mostraram que 4,5 e 4,8% das infecções hospitalares diagnosticadas como infecções intestinais, como a cólera, febre tifóide, shigelose, amebíase e gastroenterite, foram, em 90% dos casos, causadas pela ingestão de alimentos microbiologicamente alterados. Foi o grupo de maior número de internações em relação a outras doenças infecciosas.

Além dos problemas relacionados à segurança alimentar causados por microrganismos patogênicos, existe ainda a população dos microrganismos deteriorantes. Estes, por sua vez, muito embora não sejam protagonistas de doenças, são responsáveis por grandes perdas industriais de matéria-prima, com ênfase acentuada aos produtos de origem animal (SILVEIRA, 2006).

2.2 embalagens ativas: conceitos, tipos de sistemas ativos e aplicações

2.2.1 Conceitos de embalagens ativas

A função mais antiga e primordial da embalagem é preservar ao máximo a qualidade do produto, criando condições que minimizem alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas. Contudo, o conceito tradicional de que esta função deve ser exercida por meio de uma interação mínima entre a embalagem e o produto está superada frente às várias tecnologias que vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas, e que têm,

por princípio, uma interação embalagem/produto como forma de preservar a qualidade e a segurança do alimento (OLIVEIRA, 2004).

Yan *et al.* (2005) e Miltz *et al* (2006) definem embalagens ativas como sendo um sistema que propicia uma interação do próprio material de embalagem, sua atmosfera interna e o alimento, com propósito de aumentar a vida de prateleira. Uma embalagem ativa deve atuar sobre um ponto crítico de controle para conservação, ou seja, a reação indesejável que ocorre levando o produto ao estado impróprio para consumo. Em alimentos, inúmeras reações são indesejáveis, podendo estas ser de ordem química, física e principalmente de ordem microbiológica.

Um conceito similar também pode ser visto nos trabalhos de WURLITZER (2007) apud APPENDINI e HOTCHKISS (2002): embalagem ativa é aquela que interage com o produto nos pontos de contato embalagem-alimento, para restringir o crescimento de microrganismos ou então reduzir processos de deterioração da qualidade.

Soares (1998) conceituou como embalagens ativas aquelas que interagem com o alimento, modificando alguma propriedade de forma a proporcionar segurança, melhoria de qualidade sensorial e ampliar a vida de prateleira do produto.

Segundo Rooney (1995) a sistemática da embalagem ativa é definida como aquela que não apenas separa o alimento do meio ambiente, mas que interage com o alimento para manter suas propriedades. De acordo com Scannel *et al.* (2000), embalagem ativa é um conceito inovador que combina avanços em tecnologia e segurança dos alimentos, embalagens e materiais, em um esforço para atender e melhorar às demandas dos consumidores por alimentos mais frescos e seguros.

2.2.2 Tipos de sistemas de embalagens ativas

a) Embalagens com sistemas absorvedores de oxigênio

A alteração indesejável de um produto alimentício, sendo esta de ordem química, física ou microbiológica, normalmente encontra-se ligada a um fator condicionado ao meio ao qual o produto é exposto, tecnicamente chamado de “fator de sensibilidade”. A maioria dos alimentos apresenta alta sensibilidade ao oxigênio, particularmente o grupo das carnes e produtos derivados, devido à natureza aeróbia de um grande número de microrganismos deteriorantes e patogênicos (WURLITZER, 2007).

Para controlar a disponibilidade de oxigênio no interior de um sistema, substâncias com capacidade de absorção do gás podem ser incorporadas diretamente ao próprio material de embalagem, embora esta adição possa promover alterações nas propriedades do material em questão (OLIVEIRA, 2004).

Outra maneira para proporcionar contato entre a substância com capacidade de absorção de Oxigênio e o alimento é colocar a substância absorvedora acondicionada em um *sachet*, onde sofrerá redução pelo Oxigênio e que será consumido gradualmente. Conseqüentemente ocorrerá uma diminuição da concentração de Oxigênio residual na embalagem ao nível exigido para uma situação específica. Estudos mostram que é possível diminuir a concentração de Oxigênio residual a valores menores que 0,1 % no espaço livre (SUPPAKUL et al., 2003).

As substâncias comumente utilizadas nos estudos de absorção de Oxigênio residual são sais de ferro, ácido ascórbico, pigmentos fotossensíveis, enzimas (glicose-oxidases e etanol oxidase) bem como ácidos graxos insaturados. A forma mais comum de utilização de absorvedores de oxigênio é a de *sachet*. Diversos produtos estão disponíveis comercialmente, e, alguns deles também podem ser incorporados em polímeros como polietileno e polipropileno, através da oxidação da cadeia polimérica ou de grupos laterais, sendo a reação catalisada por sais metálicos, em geral à base de cobalto (OLIVEIRA, 2004). Alguns exemplos de filmes absorvedores de Oxigênio e *sachets* absorvedores são mostrados na Figura 2.1.

Dentre os filmes disponíveis comercialmente, a CryoVac possui a linha OS-Films™[®], onde o filme capaz de ligar-se ao oxigênio é composto por 90 % de terpolímero oxidável (etileno metacrilato ciclohexenil metil acrilato) e 10 % de catalisador metálico à base de sais de cobalto e fotoiniciador. Este filme é utilizado como camada interna na fabricação de embalagens flexíveis destinadas a alimentos. Como o polímero tem capacidade limitada em absorver oxigênio residual interno da embalagem, é necessário que a camada externa do filme apresente uma barreira ao oxigênio, como um filme de poliamida ou etileno vinil-álcool, EVOH (BUTLER, 2002; OLIVEIRA, 2004; WURLITZER, 2007).

A Crevron-Phillips Co. possui um filme com mesma composição, o OSP[®], cujo mecanismo de ativação ocorre através da aplicação de luz UV na linha de embalagem. Este filme tem sido aplicado em carnes, queijos e massas frescas, e como não necessita de umidade para ativação, pode ser aplicado também a produtos secos como café, nozes ou misturas de

panificação (MARKARIAN, 2004). Outro exemplo, o filme o ShelfplusTMO₂[®] da Ciba Chemicals, à base de sais ferrosos, é ativado por umidade, aplicado a produtos úmidos (OLIVEIRA, 2004). A empresa Wipak Walsrode desenvolveu um filme com barreira a oxigênio que é aplicado a tripas artificiais de produtos cárneos, o Combitherm O₂ Absorber[®], sendo que a camada ativa de poliamida é interna a outras camadas plásticas, não entrando em contato com o alimento e sendo isolada do ambiente externo. A ativação ocorre na linha de embalagem do produto e acredita-se que a retirada de oxigênio seja um pouco mais lenta, sendo necessário que este primeiro permeie a barreira interna passiva (OLIVEIRA, 2004 apud WURLITZER, 2007).



Figura 2.1 - (a) embalagens com substâncias absorvedoras de oxigênio incorporadas ao material polimérico. (b) *Sachet* absorvedor de oxigênio em contato com alimentos.

(SARANTÓPULOS e MORAES, 2006)

b) Embalagens com absorvedores de umidade

Além do Oxigênio, outro fator crítico na conservação de alimentos é a umidade do produto. Os alimentos que devem ter como sua propriedade a baixa umidade, sofrem reações de alteração quando uma pequena parcela da água de constituição é condensada no interior do sistema, podendo levar o produto a um estado impróprio, principalmente sob o ponto de vista sensorial. Em contrapartida, alimentos de alta umidade, como é o caso de carnes frescas, produtos do mar, cortes de frango, sofrem, inevitavelmente, exudação da água de composição. O conteúdo da água exudada, além de causar um aspecto visual indesejável, pode atuar como acelerador de crescimento dos microrganismos de superfície (WURLITZER, 2007).

Para casos onde a água no interior de um sistema deve ser aprisionada, filmes poliméricos contendo sais de poliacrilato e copolímeros de amido auxiliam na absorção de pequenas frações de água pelo próprio material de embalagem (ROONEY, 1995). Outro fator negativo é a deturpação da visibilidade e translucidez provocada pela condensação de água na embalagem em alimentos não expostos a refrigeração. Alimentos embalados que são expostos a variações de temperatura, nos quais ocorre condensação de umidade sobre a superfície do filme e redução da transparência, podem utilizar aditivo *antifog*, tendo como exemplos vinilon orientado biaxialmente e polietileno de alta densidade orientado em rolos de compressão (OZDEMIR e FLOROS, 2004). Estes materiais reduzem a tensão interfacial entre o condensado e o filme, contribuindo para a transparência e permitindo ao consumidor visualizar o produto, apesar de não afetar a quantidade de água presente no interior da embalagem.

Absorvedores de umidade podem ter sua ação potencializada quando se combina seu poder de absorção de umidade com um agente antimicrobiano, como descrito em patente registrada por SOARES (2004), em que pesquisas demonstraram a efetividade de *sachets* absorvedores de umidade antimicrobianos na inibição de microrganismos. Alimentos desidratados ou secos, nos quais pequenas quantidades de vapor de água provocam alterações sensoriais, podem se beneficiar da adição de um *sachet* contendo agente dessecante (sílica gel, óxido de cálcio, silicatos de alumínio, potássio, sódio e cálcio, entre outros), como já usado em pipocas, batata chips, doces e condimentos. A Figura 2.2 mostra embalagens com sistemas de absorção de umidade.



Figura 2.2 - sistemas de embalagens com absorção de umidade (SARANTÓPULOS e MORAES, 2006)

2.2.3 Embalagens com liberação ou absorção de CO_2 e etanol ou SO_2

O dióxido de carbono, em níveis de 60 % a 80 %, tem capacidade de inibir o crescimento microbiano em superfícies de alimentos e, assim, colabora para aumentar a vida de prateleira, ou então para reduzir o colapso da embalagem pela diminuição do volume gasoso em seu interior. A adição de substâncias geradoras de CO_2 em embalagens de alimentos pode ser efetuada na forma de *sachet* ou por adição à estrutura do polímero plástico (WURLITZER, 2007). Como a permeabilidade de polímeros plásticos ao CO_2 é 3 a 5 vezes maior que ao O_2 em muitos plásticos, é necessário que o CO_2 seja gerado continuamente, para manter a concentração desejada no interior da embalagem (SUPPAKUL et al., 2003). Geradores de CO_2 podem ser aplicados em carne fresca, frango, pescado e embalagem de queijos, sendo que altas concentrações de CO_2 podem provocar alterações sensoriais em produtos e desenvolvimento de glicólise anaeróbica indesejável em frutas. Outro ponto importante a ser observado no uso de CO_2 é aquele que diz respeito à mudança de cor da carne, provocada pela ausência de oxigênio, tornando-a de coloração marrom indesejável

(FRANCO, 1996). Um exemplo de composto gerador de CO₂ é a mistura seca de bicarbonato de sódio e ácido cítrico, que em contato com a umidade do alimento, reage e libera CO₂ no interior da embalagem (BRODY et al., 2001).

No caso de embalagens geradoras de etanol, segundo descrito por Wurlitzer (2006), os primeiros *sachets* com esta função foram constituídos de etanol grau alimentício encapsulado em pó inerte fino, sendo a taxa de liberação de etanol controlada pela permeabilidade do filme. Ao final do período de estocagem, o teor de álcool pode ser inaceitável para o consumidor, podendo ser evaporado por aquecimento antes do consumo do produto (SUPPAKUL et al., 2003). OZDEMIR e FLOROS (2004) indicam a possível adição de aromatizantes como baunilha ou outro, com objetivo de reduzir a percepção do odor de álcool na embalagem.

Sarantópulos e Moraes (2006) mostraram que saches de Na₂S₂O₅ (P-sulfado de sódio), quando em contato com a umidade do alimento, ocasiona a liberação de SO₂, eficiente na inativação bactérias e fungos indesejáveis em uvas, preservando-as por até 140 dias (Figura 2.3).



Figura 2.3 - Sachês geradores de gás SO₂ GRAPEGE® (SARANTÓPULOS; MORAES, 2006)

2.2.4 Embalagens antimicrobianas

A embalagem antimicrobiana atua reduzindo, inibindo ou retardando a microbiota presente, principalmente na superfície do alimento embalado, ponto onde ocorre a maior parte das reações de deterioração, ou mesmo o crescimento de patógenos. Essas embalagens podem apresentar-se de várias

formas: adição de sachês no interior da embalagem contendo substâncias antimicrobianas voláteis e não voláteis; adição direta da substância antimicrobiana no polímero de diferentes maneiras, sendo estas maneiras: (a) recobrimento, (b) incorporação do agente antimicrobiano direto no polímero, (c) imobilização do antimicrobiano no polímero, e (d) modificação da superfície. (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002, apud SILVEIRA, 2006; WURLITZER, 2007), conforme mostrado na Figura 2.4.

a) Na Figura 2.4.a, a adição, por recobrimento na forma de spray, de um agente antimicrobiano sobre a embalagem antes do contato com o alimento, é uma barreira adicional aderida ao próprio alimento, como é o caso dos filmes comestíveis aplicados em frutas. Além do benefício devido ao fato de ser comestível e biodegradável, tem simples manuseio, podendo ser aplicada a seco ou com cobertura úmida (HAN, 2003). Publicações de OLIVEIRA e OLIVEIRA (2004) e SUPPAKUL et al. (2003) mostraram a possibilidade de agregar nisina às coberturas como agente antimicrobiano, porém, a dificuldade de retirada da cobertura no momento do consumo pode deixar resíduos indesejáveis ao alimento.

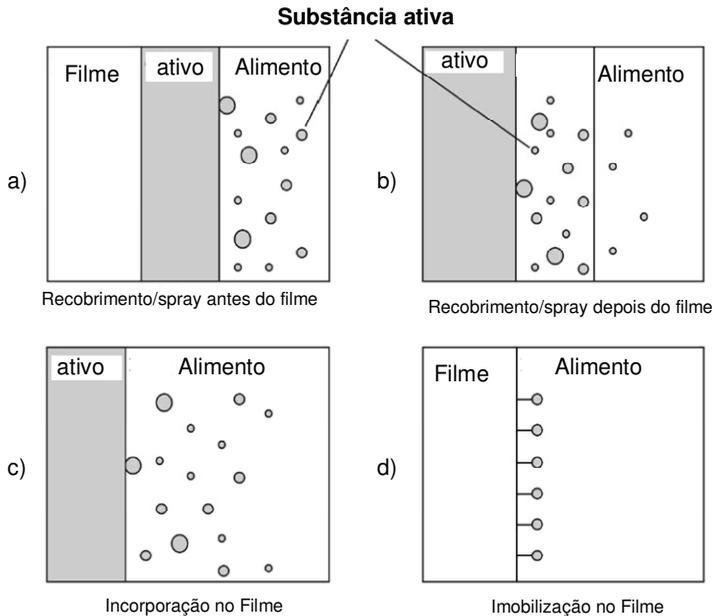


Figura 2.4 - Métodos de incorporação de agente antimicrobiano em embalagens (QUINTAVALLA, S., VICINI, 2002)

b) A Figura 2.4.b mostra uma metodologia que consiste na alternativa mais viável e com melhores resultados até o momento. Trata-se da adição de um aditivo antimicrobiano diretamente na mistura de polímeros, com obtenção de pellets, os quais serão destinados à extrusão. Este processo também pode ser chamado de aditivização antimicrobiana. Embora exista uma infinidade de aditivos com possíveis potencialidades antimicrobianas (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002), o aditivo a ser utilizado deve ser resistente às mesmas condições processuais do polímero em questão, o qual, em geral, é submetido a condições de temperatura bruscas. Para a eficiência do processo e posterior atuação antimicrobiana, faz-se necessário um estudo da estabilidade do aditivo frente às condições processuais. BUONOCORE (2005) estudou a extrusão de filmes de PEBD enriquecidos com extrato de alecrim, observando a ineficiência dos filmes devido à desestabilização do aditivo pela temperatura processual de extrusão.

c) Em 2.4.c, a imobilização do agente no polímero é realizada quando existe, já no próprio polímero, atividade biológica, ou grupamento lateral que permita a covalência dos íons com efeito antimicrobiano, não permitindo desta forma a migração dos componentes ao alimento acondicionado, como é o caso do polímero de quitosana. A imobilização da substância antimicrobiana pode ser efetuada por ligação covalente, adequada para os casos em que a legislação não permita migração, devendo a inibição acontecer apenas na interface embalagem-produto. Um dos métodos para ligar agentes bioativos a polímeros é o uso de glutaraldeído, agente eficiente na formação de ligações cruzadas entre proteínas ou outras moléculas biológicas a polímeros. Exemplo desta tecnologia é dada pela enzima naringinase (SOARES, 1998). Também são usados métodos que utilizam carboimidás e ésteres ativos de succinimidil succinato (STEVEN e HOTCHKISS, 2003).

d) A Figura 2.4.d mostra que a ação antimicrobiana se deve à modificação das características físicas da superfície. PAIK et al. (1998) efetuaram estudos com uso de irradiação ultravioleta (UV) sobre filmes de poliamida (nylon 6,6), provocando a transformação do grupo amida do filme em aminas, atuando estes grupos como sítios de superfície com ação antimicrobiana. O filme foi testado contra *Staphylococcus aureus* promovendo três reduções decimais após 6 horas, a partir de uma concentração inicial de 8×10^3 UFC.mL⁻¹.

Na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o crescimento microbiano é superficial, até mesmo porque a maior parte da carga

microbiana dos alimentos é adquirida na manipulação durante o processamento dos alimentos. Na indústria frigorífica, por exemplo, um dos microrganismos mais indesejáveis é o *Staphylococcus áureos*, que normalmente impregna o produto nas mesas de preparação (LAWRIE, 1979).

Para o controle da carga microbiana superficial, um intenso contato entre o agente antimicrobiano é necessário, logo, alimentos acondicionados a vácuo apresentam grande potencial do uso desta tecnologia (VERMEIREN et al., 2002). Para que haja contato eficiente entre o alimento e o agente antimicrobiano, o sistema que apresenta maior viabilidade são os filmes, devido à flexibilidade física e facilidade do contato direto. Em alimentos acondicionados a vácuo, estes pré-requisitos são facilmente cumpridos (QUINTAVALLA e VICINI, 2002).

Além de carne e produtos derivados de leite, que são os de maior atenção por parte dos órgãos de segurança alimentar, as embalagens antimicrobianas vêm sendo utilizadas em uma variedade de produtos como pães, bolos, biscoitos, pizza, massa fresca, queijo, carnes frutas entre outros. Cada um destes produtos têm mecanismos diferentes de deterioração, que deverão ser entendidas para que se possa definir uma embalagem antimicrobiana apropriada para cada caso em particular (VERMEIREN et. Al, 2002-a).

2.2.4.1 Tipos de agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos a serem considerados para possível uso em materiais de embalagens destinadas a alimentos devem, obrigatoriamente, ser quimicamente classificados como aditivos de grau alimentício, ou então como substâncias naturais presentes em alimentos (Tabela 2.1).

Considerando que os alimentos possuem diferentes características químicas e biológicas tais como pH, atividade de água, fontes de carbono e nitrogênio, pressão parcial de oxigênio e temperatura, alimentos diferentes oferecem condições ambientais distintas para microrganismos e agentes antimicrobianos (BRODY et al., 2001). Por exemplo, o pH do alimento altera a ionização da maioria das substâncias químicas ativas afetando a atividade antimicrobiana e a taxa de crescimento; a atividade de água afeta a atividade antimicrobiana e a estabilidade química de substâncias incorporadas, entre outras características.

Tabela 2.1 - Resumo de agente antimicrobiano versus microrganismo alvo/suporte polimérico

Antimicrobiano	Suporte polimérico	Microrganismo	Referências
<i>Ácidos orgânicos/anidridos:</i> Propiônico, benzóico, sorbico, acético, láctico e málico	Flmes comestíveis, EVA, PELBD	bolores	Guilbert (1988), Baron e Sumner (1993) Torres e Karel (1985) Devlieghere, Vermeiren, Bockstal e Debevere, (2000) Weng e Hotchkiss (1993)
<i>Gases inorgânicos:</i> SO ₂ , dióxido de cloro	Várias poliolefinas	bolores, bactérias, fungos	CSIRO (1994) Wellinghoff (1995)
<i>Metais:</i> Prata	Várias poliolefinas	bactérias	Ishitani (1995)
<i>Fungicida:</i> benomil, imazil	PEBD	fungos	Weng (1992)
<i>Bacteriocinas:</i> nisina, pediocinas, lactocinas	Filmes comestíveis, celulose, PEBD	Bactérias Gram-positivas	Padgett, Han e Dawson (1998) Siragusa, Cutter e Willett (1999)
<i>Enzimas:</i> Lizosima, glucose-oxidase	Acetato de celulose, Poliestireno, filmes comestíveis	Bactérias Gram-positivas	Appendini e Hotchkiss (1997) Padgett et al. (1998)
<i>Agentes quelantes:</i> EDTA	Fimes comestíveis	Bactérias Gram-negativas	Padgett et al. 1998
<i>Especiarias:</i> canela, cafeína, raiz forte (alisiotiocinato)	Nylon/PE, celulose	fungos, bolores, bactérias	Hoshino, Iijima, Hayashi e Shibata (1998) Anon (1995) , Nielsen e Rios 2000 Lee, Hwang e Cho(1998) Imakura, Yamada e Fukazawa (1992)
<i>Óleos essenciais, extrato de plantas:</i> óleo de sementes de uva, bambu-seco	PEBD, celulose	fungos, bolores, bactérias	Oki (1998) , Chung, Cho e Lee (1998) Hong et al. (2000)
<i>Parabenos:</i> propil-parabeno, etil-parabeno	Clay-cout, celulose e PEBD	fungos	Katz (1998) Dobias et al. (1998)
<i>Combinações:</i> Hexametil n-tetramina	PEBD	bolores, anaeróbios e aeróbios	Devlieghere et al. (2000)

(QUINTAVALLA e VICINI, 2002).

Entre as substâncias antimicrobianas, as de maior potencial parecem ser aquelas que contém sais de prata pois são capazes de liberar íons do metal. Íons de cobre também podem destruir microrganismos, mas são

considerados tóxicos quando em contato com alimentos, além de serem catalisadores de reações de oxidação e outras reações de degradação (OLIVEIRA, 2004). A prata não produz íons tão facilmente quanto o cobre, mas é considerada segura e relativamente inerte, sendo utilizada como agente antimicrobiano na indústria farmacêutica e em tratamento de água.

2.3 Uso dos compostos a base de metais como agentes antimicrobianos

No caso de incorporação de agentes antimicrobianos em filmes, aquele que tem sido mais discutido nos últimos tempos é a Prata. Sabe-se, que nos tempos antigos, a água era armazenada em recipientes de prata e cobre pois, já naquela época, as pessoas notaram que os vasilhames de metal conservavam melhor o sabor e a qualidade da água para beber. O mercúrio e seus derivados têm uma longa história no controle de infecções, incluindo a sífilis. O cloreto de mercúrio (HgCl_2) era amplamente usado no século XX como um desinfetante geral, mas desde então, tem sido substituído por outros agentes menos tóxicos e corrosivos (PELCZAR, 1997). Solução a 1% de nitrato de prata (AgNO_3) era amplamente empregada para prevenir infecções oculares por gonococos em recém-nascidos; atualmente, soluções de AgNO_3 são utilizadas na prevenção de infecções por queimaduras (PELCZAR, 1997).

A capacidade de quantidades extremamente pequenas de certos metais, particularmente a prata, de exercer efeito letal sobre as bactérias é denominada *ação oligodinâmica*, termo que se origina do Grego: olígos (pequeno) e dinamokós (poder). No mecanismo *oligodinâmico*, a prata exerce força química sobre os componentes, arrastando, por efeito indutivo mesomérico, enzimas da superfície do microrganismo. A desconformidade química das enzimas superficiais do microrganismo sofrem uma diferença da conformação espacial enzimática, interrompendo o metabolismo do microrganismo, e causando a morte (KAMPMANN *et. al.* 2007).

Este fenômeno pode ser demonstrado em laboratório, colocando-se uma moeda de prata (previamente limpa) sobre a superfície de um meio de cultura previamente inoculado. Após a incubação, uma zona de inibição (sem crescimento) é observada ao redor da moeda. Acredita-se que a atividade destes íons metálicos se deve à inibição de certas enzimas que se combinam com o metal (PELCZAR, 1997). Uma foto do halo de inibição de uma moeda em meio de cultura pode ser visto na Figura 2.5.



Figura 2.5 - Halo de inibição ao redor de uma moeda de prata
(PELCZAR, 1997)

2.3.1 Agente antimicrobiano AlphaSan[®]

O aditivo AphaSan[®] é um composto cerâmico a base de Zircônio-Fosfato contendo na superfície da partícula um revestimento de íon Prata (Ag) apto a ser substituído (KAMPMANN *et. al.* 2007).

A prata contida na superfície do aditivo AlphaSan[®] (3,8%) atua como doadora de elétrons para os grupamentos contendo Enxofre, Oxigênio ou Fósforo. As proteínas de sistemas enzimáticos, ou que revestem a parede celular de microrganismos são ricas em grupamentos sulforados e oxidofosforados (KAMPMANN *et. al.* 2007).

Pelczar *et. al.* (1997) afirmam que os metais pesados e seus derivados inativam as proteínas celulares combinando-se com alguns de seus componentes, como o ataque nos grupamentos sulfidrilas. A troca de íons prata do aditivo por grupamentos da superfície celular de um microrganismo é esquematizada na Figura 2.6.

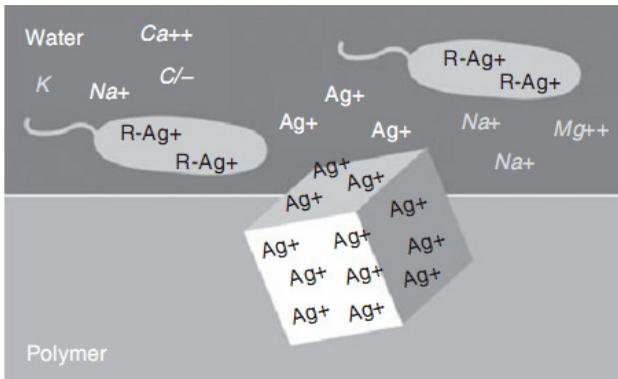


Figura 2.6 - Troca iônica do elemento prata por grupamentos dos microrganismos (KAMPMANN *et. al.*, 2007)

2.4 Panorama das pesquisas e aplicações de filmes

JUNG *at al.* (1992) observaram a existência da interação de emulsificantes de ácidos graxos de leite com nisina, reduzindo sua atividade antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes*. GUILBERT *et al.* (1997), observaram em suas pesquisas que o ácido sórbico apresentou maior atividade antimicrobiana sobre o crescimento de fungos, quando incorporado em filmes à base de pectina/glútem/monoglicerídios do que quando adicionado diretamente no alimento.

Para determinar a eficácia de um filme antimicrobiano, Mauriello *et al* (2005) revestiu com nisina o filme para observar a inibição de *Micrococcus luteus* ATCC 10240 na microbiota do leite cru durante o armazenamento. Verificou que os filmes revestidos com nisina foram eficazes em inibir o *Micrococcus luteus* ATCC 10240 da flora bacteriana no leite, e a liberação da nisina era dependente do pH e da temperatura podendo, por isso, controlar a qualidade de alimento e aumentar o tempo de conservação do mesmo.

Estudos realizados por Cooksey (2005) centraram-se no estabelecimento de métodos para revestir filmes de polietileno de baixa densidade com celulose metálica para aplicação de nisina. Estas películas reduziram significativamente a presença de *Listeria monocytogenes* nos acondicionamentos. Os mesmos autores também testaram em outra pesquisa o uso da quitosana juntamente com *saches* de dióxido de cloro a fim de inibir *Listéria monocytogenes*, obtendo como resultado uma redução

significativa do microrganismo.

Pires *et al.* (2008) observou que ácidos orgânicos ou seus sais como agentes antimicrobiais, incluindo o ácido propiônico, o ácido benzóico e o ácido sórbico, incorporados em filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) não têm sua atividade antimicrobiana inibida pela extrusão do polímero. Além disso, os filmes em que o anidrido benzóico foi incorporado exibiram a atividade antimicrobiana quando em contato com queijo.

Weng e Hotchkiss (1993) incorporaram 1% de anidrido benzóico em filmes de polietileno de baixa densidade, inibindo completamente o crescimento de *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp. e *Aspergillus toxicarius* em meio de cultura. Na concentração de 2% houve uma inibição do crescimento dos fungos em queijo.

Lactato de sódio mostrou eficiência antimicrobiana em salsicha, quando incorporado em filmes de base celulósica (MELO, 2003). Também Soares *et al.* (2002), trabalhando com propionato de sódio incorporado em filmes de base celulósica, observaram uma inibição do crescimento microbiano em pães. Melo (2003) observou redução de 2 ciclos logarítmicos na contagem de *Staphylococcus* sp. em queijo coalho coberto com filme incorporado com nisina.

Soares e Marques (2007), estudando um filme para a conservação de manteiga, concluiu que o filme incorporado com ácido sórbico apresentou maior resistência e alongamento, além de ter sido eficiente na redução de fungos filamentosos e leveduras em manteiga. Os resultados indicaram que filmes ativos incorporados com antimicrobiano são desenvolvimentos inovadores com grande potencialidade de aplicação na área de alimentos para desenvolvimento de novas embalagens, e de um novo nicho no mercado alimentício, o de uso de filmes ativos incorporados com antimicrobianos.

Lee *et al.* (1998) incorporou uma combinação de agentes antimicrobiais que incluíram extratos naturais, ácido sórbico e prata em LDPE. A incorporação destes aditivos naturais e inorgânicos no LDPE não afetou a força mecânica do filme. As películas, que foram usadas para embalar vegetais, mostraram o crescimento reduzido de bactérias aeróbias totais comparadas com uma película sem aditivo. Além disso, a presença do agente no LDPE não afetou outros atributos da qualidade dos vegetais durante o armazenamento.

A resistência antimicrobiana de *S. aureus* e de *E. coli* foi avaliada em leite cru e seus derivados (ADESIYUN, 2007; RUEGG, 2003). Foi relatado

que o emprego de agentes antimicrobiais poderiam conduzir à resistência das bactérias (HATCHKISS, 1995). Hong *et al.* (2000) incorporou compostos antimicrobiais naturais derivados de extratos de própolis e cravo-da-índia no LDPE. Os compostos foram misturados diretamente ao filme durante o processo de extrusão da película. A incorporação direta dos aditivos no LDPE produziu uma matriz uniforme do filme. A incorporação destes agentes naturais não afetou significativamente as propriedades mecânicas ou a permeabilidade das películas. Além disso, as películas incorporadas de agentes naturais mostraram a habilidade no controle de *L. plantarum*.

Estudos mostraram que a incorporação de 1% de Ag-zeólito em polietileno foi suficiente para reduzir, na superfície do plástico, a contagem microbiana de 10^5 a 10^6 células/mL para menos de 10 células/mL em 24 horas. O aumento da espessura do filme não aumentou a atividade antimicrobiana devido à dificuldade encontrada para a migração do íon prata para a superfície, já que sua efetividade depende de um contato direto com o microrganismo. Com elevada resistência térmica, o Ag-zeólito resiste às temperaturas de extrusão dos filmes plásticos, podendo ser incorporados, por exemplo, ao polietileno e ao polipropileno. A quantidade de Ag-zeólito incorporada ao filme e o diâmetro das partículas podem ter efeitos adversos nas propriedades de termossoldagem e outras propriedades físicas, a exemplo da transparência. Vários materiais incorporados de agentes antimicrobianos, particularmente Ag-zeólito, estão disponíveis comercialmente, principalmente no Japão (BRODY, STRUPINSK, KLINE, 2001).

Chung *et al.* (1998) incorporaram 1% (w/w) de agentes antimicrobiais de extratos orgânicos e inorgânicos, como zeólito de prata, no LDPE, para a preservação de morangos. Os estudos foram conduzidos sob atmosfera modificada para manter as concentrações de oxigênio e dióxido de carbono. A película do LDPE retardou com sucesso o crescimento de bactérias aeróbias totais, bactérias do ácido láctico e fermentos, conduzindo a uma taxa de deterioração significativamente mais baixa, e não apresentando nenhum efeito negativo nas qualidades físicas ou químicas dos morangos.

Wang *et al.* (2005) investigaram a atividade antimicrobiana de filmes de LDPE contendo nanopartículas de óxido de titânio. Os polímeros de LDPE enriquecidos da nanopartículas não demonstraram a atividade antimicrobiana. Já Padgett *et al.* (1998), estudaram a atividade antimicrobiana de filmes de proteína isolada de soja e milho incorporados

com lisozima e nisina. Os resultados demonstraram potencial antimicrobiano para aplicação em produtos de panificação.

Silveira *et al.* (2005) desenvolveram filmes de base celulósica por solubilização em solvente e incorporação com ácido sórbico. Filmes de 25 e 70 μ m de espessura com 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6% de ácido sórbico foram produzidos e intercalados com a massa de pastel sem conservantes para avaliar sua eficiência antimicrobiana. Após 40 dias de estocagem a 8 \pm 1 $^{\circ}$ C, as massas embaladas com filmes de 70 μ m contendo 3, 4, 5 e 6% de ácido sórbico apresentam, estatisticamente, crescimento microbiano menor ou igual ao da massa controle.

2.5 Fundamentos sobre as propriedades físicas de filmes

Na elaboração de um filme polimérico para fins de acondicionamento de alimentos, faz-se necessário a observação de algumas propriedades fundamentais para uma boa adaptação do polímero à situação onde deve ser aplicado. Dentre estas propriedades, devem ser consideradas principalmente as propriedades mecânicas de tração, as propriedades de barreira do filme (taxa de permeabilidade ao vapor de água, permeabilidade aos gases CO₂ e O₂), além da transparência e temperatura de trabalho (SARANTOPOULOS, 2002).

2.5.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de um filme flexível monocamada estão associadas principalmente a dois fatores: características químicas do material polimérico e tipo de processo. Como características químicas, entende-se estrutura química do material, da composição de blendas, da aditivação, da estrutura molecular, peso molecular, densidade, temperatura de transição e do tipo de copolímero. O processo de fabricação, por sua vez, determina propriedades associadas à orientação das moléculas, como ocorrência ou não de defeitos superficiais. De maneira geral, as propriedades que são influenciadas pela orientação das moléculas na fabricação diferem em relação à direção do filme como, por exemplo, as propriedades de tração e a resistência ao rasgamento, que devem ser determinadas separadamente para cada uma das direções do filme, longitudinal e transversal (SARANTOPOULOS, 2002). As características

são avaliadas por meio de ensaios técnicos que fornecem respostas, quando estes materiais são submetidos a diversas condições de tensão-deformação (SEBIO, 2003).

2.5.2 Propriedades de tração

As propriedades de tração expressam a resistência do material à deformação por alongamento. O corpo-de-prova é submetido ao alongamento, a uma velocidade constante e controlada, registrando-se ao longo do ensaio a força, ou resistência que o material oferece à deformação até a completa ruptura, conforme demonstrado na Figura 2.7. Deste gráfico, podem ser retiradas as demais propriedades mecânicas de interesse, como descrito por Sarantopoulos (2002).

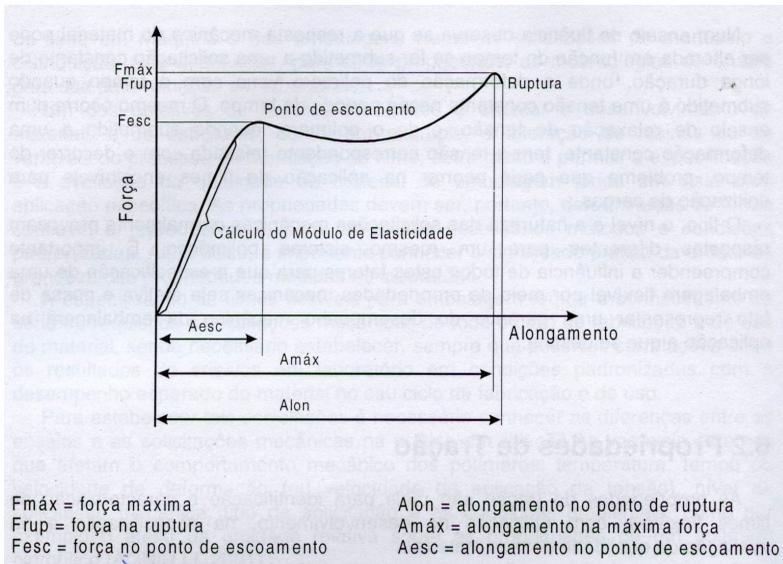


Figura 2.7 - Curva de tração em função da deformação (SARANTOPOULOS, 2002)

a) Resistência máxima a tração (nominal):

Trata-se da resistência máxima oferecida pelo material quando submetido à tração, ou relação entre a força medida pela área transversal inicial do corpo-de-prova, é expressa em MPa ou N/m^2 , ou ainda Kgf/cm^2 .

b) Resistência à tração na ruptura:

É a resistência oferecida pelo material no ponto de ruptura, expressa em MPa ou N/m^2 , ou ainda Kgf/cm^2 .

c) Tensão de tração no ponto de escoamento

A tensão de tração no ponto de escoamento é a resistência oferecida pelo material correspondente à deformação no ponto de escoamento, expressa em MPa ou N/m^2 , ou ainda Kgf/cm^2 .

d) Porcentagem de alongamento

É a relação percentual entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial, podendo ser determinada para a situação de ruptura ou no ponto de escoamento.

e) Módulo de elasticidade ou de Young

Relação entre a tração e a deformação na região linear da curva *versus* deformação ($T \times d$), conhecida como região elástica. Para a determinação do módulo de elasticidade, deve-se traçar uma tangente à curva $T \times d$ na região linear inicial, e escolher qualquer ponto desta tangente, calculando-se a razão entre a tensão e a deformação correspondente, Este resultado é um indicador de rigidez do filme, e deve ser expresso em MPa ou N/m^2 , ou ainda Kgf/cm^2 .

f) Módulo secante

Na impossibilidade de determinação exata da região elástica da curva de $T \times d$ é utilizado um ponto específico de alongamento desde que localizado bem antes do ponto de escoamento, para o qual é determinada a relação entre a tensão de tração e deformação. Para filmes plásticos, é utilizado como referência 1% de alongamento. Expresso em MPa ou N/m^2 , ou ainda Kgf/cm^2 , este parâmetro é considerado um indicativo de rigidez.

g) Energia de tração para a ruptura ou Tenacidade

Tenacidade ou energia de tração para a ruptura (*tensile energy to break* – TEB ou *Tensile energy absorption* – TEA) é a energia total absorvida por unidade de volume do corpo-de-prova até o ponto de ruptura. Calculada a partir da integral da força de tração *versus* alongamento, dividida pelo volume original do corpo-de-prova; é expressa em MJ/m^3 .

2.5.3 Propriedades de barreiras

A permeabilidade de um material de embalagem é de fundamental importância para a manutenção da vida de prateleira de um produto alimentício. Na realidade, muitas das reações químicas, bioquímicas ou microbiológicas podem ser evitadas quando for possível evitar a passagem de gases ou vapor de água através das paredes da embalagem, pois várias destas reações podem ser aceleradas quando houver entrada de água ou gases, provocando uma espécie de “respiração” do alimento acondicionado (POUZADA e GOMES, 2003).

Nas embalagens destinadas ao acondicionamento de cortes de carne resfriados, a propriedade de barreira de maior importância é Taxa de Permeabilidade ao Oxigênio (TPO₂). A entrada do Oxigênio para o interior de uma embalagem atua diretamente na velocidade de crescimento de microrganismos deteriorantes contidos no produto, diminuindo de forma direta a vida útil do produto, sendo percebida nas características organolépticas. Determinadas quantidades de Oxigênio de uma embalagem pode também atuar como catalisador de crescimento de microrganismo patogênico, comprometendo, além das propriedades organolépticas, a segurança alimentar (JAY, 1992). No sentido inverso, quantidades de água podem ser perdidas por este mesmo fenômeno (transferência de massa), ocasionando perdas de massa ou alterações na integridade física do alimento (POUZADA e GOMES, 2003).

Em sistemas de acondicionamento de alimentos por uso da tecnologia de atmosfera modificada (AM), determinadas concentrações (variando de 30 a 60%) de gás carbônico são adicionadas no interior da embalagem. Nestas concentrações, o gás carbônico atua como bacteriostático ou fungistático, alongando de forma significativa a vida útil do produto e a segurança do alimento. Para esta situação, a propriedade de barreira de maior interesse é da taxa de Permeabilidade ao CO₂ (TPCO₂). Esta tecnologia vem sendo aplicada com sucesso em vegetais e produtos de panificação (FERNANDES, 2001).

2.6 Polietileno de baixa densidade (PEBD)

O polietileno é um dos materiais termoplásticos mais utilizados para embalagem. É obtido pela polimerização do monômero de etileno, e pode ter estrutura molecular linear ou ramificada (Figura 2.4). Dependendo do

processo de síntese, em reatores com controle da temperatura e pressão, na presença de catalisadores, vários tipos de polietilenos e seus derivados podem ser obtidos, constituindo-se uma ampla classificação, a saber: cadeia ramificada/homopolímeros (baixa e média densidade), cadeia ramificada/copolímeros (acrilatos, acetatos e vinílicos), cadeia linear/homopolímero (alta densidade e alto peso molecular, baixa densidade, ultra-baixa densidade) (SARANTOPOULOS, 2002).

Como pode ser constatado, através do tipo de estrutura molecular, grau de polimerização, tamanho molecular e características dos monômeros utilizados na polimerização, obtêm-se os diversos polímeros do grupo dos polietilenos (HANLON, 1971). Quando se usa alta temperatura e alta pressão, produz-se o polietileno de baixa densidade ramificado e, quando se usa catalisador estereoespecífico, obtêm-se o polietileno de alta densidade em condições de pressão e temperatura relativamente menores (POUZADA e CASTRO, 2003).

Com base na densidade final do polímero, os polietilenos recebem as seguintes denominações: polietileno linear de ultra baixa densidade - PELUBD (0,890 - 0,915g/mL), polietileno linear de baixa densidade - PELBD (0,916 - 0,940g/mL), polietileno de média densidade - PEMD (0,925 - 0,940g/mL); polietileno de alta densidade - PEAD (0,940 - 0,965g/mL), polietileno de alta densidade e alto peso molecular - PEAPM (0,940 - 0,965g/mL) (GARCIA, PADULA e SARANTÓPOULOS, 1989). A densidade está relacionada com a disposição molecular, portanto quanto maior a ramificação menor a densidade, tal como acontece com o PEBD. Essa propriedade física depende também do grau de cristalinidade; por exemplo, o PEAD que apresenta mais de 70% de sua estrutura molecular na forma cristalina, aumentando desta forma a opacidade e as propriedades de barreira (OSWIN, 1975).

A síntese dos polietilenos de baixa densidade é feita pela polimerização em massa do etileno a altos valores de temperatura e pressão, na presença de traços de oxigênio. O processo mais utilizado para a obtenção de filmes é a extrusão de um tubo de polímero, que é expandido com pressão interna de gás inerte (FERNANDES, 2001). As características e propriedades dos polietilenos de baixa densidade (Figura 2.8) são a adequação para produção de filmes com alta flexibilidade, boa transparência dos filmes de baixa espessura; boa barreira ao vapor de água, alta permeabilidade aos gases e faixa de temperatura de termoselagem ampla (POUZADA & CASTRO, 2003).

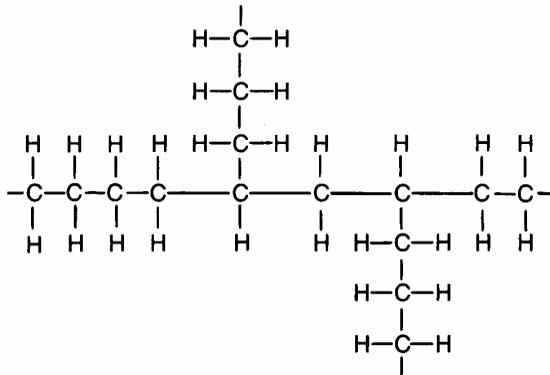


Figura 2.8 - Polietileno de baixa densidade com estrutura ramificada (FERNANDES, 2001)

O PEBD é um dos polímeros mais usados para a produção de filmes destinados a embalagens em geral devido à alta elasticidade (obtida sem plastificante), elasticidade, alta resistência à ruptura, resistência química, resistência à propagação de corte, boas características ópticas, alta permeabilidade a gases, boa barreira a vapor de água e baixo custo (FERNANDES, 2001).

São exemplos de aplicações dos polietilenos:

- produção de filmes para uso diverso;
- filmes esticados e/ou encolhíveis;
- embalagens convertidas por laminação ou extrusão;
- sacolas para supermercados (PEAD e PEAPM);
- embalagens rígidas (garrafas, bombonas, bandejas, caixas) (SARANTÓPOULOS, 2002).

2.7 Efeito da adição de agentes antimicrobianos em polímeros aplicados a alimentos

Substâncias antimicrobianas, ao serem incorporadas em materiais de embalagem, podem afetar as propriedades físicas (HAN, 2000; QUINTAVALLA e VICINI, 2002) e mecânicas (HAN, 2000) do filme obtido. Segundo APPENDINI e HOTCHKISS (2002), as mudanças nestas propriedades são específicas para cada combinação antimicrobiano-

polímero.

Han e Floros (1997) observaram um decréscimo na transparência do filme de polietileno de baixa densidade com a adição de sorbato de potássio, porém não houve mudança significativa nas propriedades de tensão. GROWER *et al.* (2004), trabalhando com filme de polietileno de baixa densidade incorporado com nisina, observaram aumento da tensão com o aumento da concentração de nisina no filme.

Ahvenainen (2003), estudando filmes antimicrobiais incorporados com nisina, natamicina e uma combinação de ambos em polímero de celulose, verificou que a incorporação de compostos antimicrobiais diminuiu a resistência e a elasticidade dos filmes devido a mudanças em sua conformação molecular.

Mistry (2006) estudou o desenvolvimento de filmes eficazes contendo agentes antimicrobiais e a redução das perdas desses agentes ativos. Foram avaliados filmes de polietileno glicol (PEG) e do acetato de vinil etileno (EVA) na diminuição da perda de agente ativo durante a fabricação do filme do polietileno de baixa densidade (LDPE), medindo-se a liberação do agente antimicrobiano no alimento. Os resultados apontaram que a incorporação do agente antimicrobiano não afetou as propriedades mecânicas do filme LDPE/EVA e os filmes retêm 75% dos agentes antimicrobiais após a extrusão.

2.8 Deterioração de carne por ação dos microrganismos

Além dos problemas relacionados à segurança alimentar causados por microrganismos patogênicos, existe ainda uma população de microrganismos de ação deteriorante. Estes, por sua vez, muito embora não sejam protagonistas de doenças, são responsáveis por grandes perdas industriais de matéria-prima, principalmente em produtos de origem animal (JAY, 1979).

2.8.1 Conceitos gerais sobre microbiologia da carne

Dependendo do tipo de interação existente entre microrganismo e o alimento, pode-se classificá-los em três grupos distintos: aqueles que contribuem beneficemente na tecnologia de produção, aqueles causadores de alterações químicas prejudiciais, e aqueles que apresentam risco à saúde

(FRANCO, 1996). Independentemente do grupo no qual o microrganismo se encontra inserido, a carne é um excelente meio para crescimento e desenvolvimento para praticamente todos eles. A principal propriedade que explica o rápido crescimento microbiano na carne bovina consiste em sua própria composição: 75% de água e 25% de vários outros metabólitos, como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e açúcares (LAWRIE, 1979). A temperatura é um dos fatores de grande importância, mas não o único.

A proporção de bactérias presentes na superfície dos cortes bovinos é oriunda de diferentes fontes, como a pele do animal, que agrega contaminação no processo de esfolagem, os de origem do trato gastrointestinal e do ar, que são agregados à carne durante as operações processual e na manipulação para elaboração dos cortes (JAY, 1992).

2.8.2 Principais microrganismos patogênicos em carnes

Os microrganismos do gênero coliformes são utilizados para avaliar as condições higiênicas, contaminação após o processamento, limpeza e sanitização deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante processamento ou estocagem (SILVA, 2000). Incluem-se nesta classe as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. No mecanismo de crescimento, fermentam a lactose produzindo ácido, aldeído e gás, em 24 horas a 35°C (SILVA, 1997) e (BRASIL, 2004). Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Fazem parte, predominantemente, bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e dos animais. Os demais, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* e *Shigella*. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO 1996).

Para os microrganismos patogênicos possivelmente contidos em alimentos, a Legislação da RDC-12, ANVISA (1994), determina ausência em 25 gramas da amostra de alimento avaliada.

2.8.3 Principais microrganismos deteriorantes em carnes

Carnes acondicionadas a vácuo possuem meio atmosférico microaerófilo ou anaeróbico. Deste modo, favorece-se apenas o crescimento de microrganismos anaeróbios ou aeróbios facultativos de carga superficial. As bactérias lácticas estão presentes em quase todo o tipo de produtos cárneo fresco ou mesmo os curados, com crescimento também em temperaturas de refrigeração (JAY, 2005).

O crescimento de bactérias lácticas no interior de uma embalagem provoca influência direta na vida de prateleira do produto, pois o mecanismo de formação de ácidos orgânicos como fórmico, acético e propiônico, que são os principais metabólitos destes microrganismos, são responsáveis pela formação do “limo” superficial, que é uma secreção viscosa destes microrganismos. Isto ocorre principalmente se houver níveis significativos (maior que 10^3 UFC/g) de bactérias lácticas. Além da formação do “limo”, a ação desta classe de microrganismo pode acarretar o processo de *esverdeamento* (FRANCO, 1996). A carne bovina tem como microbiota natural aproximadamente 10^4 UFC/g de bactérias lácticas. Normalmente, quando alterações em relação à viscosidade e limosidade são detectadas, significa que populações superiores a 10^6 UFC/g estão presentes no alimento. Entretanto há aqueles que são necessários 10^7 ou até mesmo 10^8 UFC/g do alimento (JAY, 1992) para haver alterações perceptíveis em relação à viscosidade, odor e cor da carne.

Em termos práticos, a legislação brasileira recomenda que seja realizado o controle bacteriano total (CBT-Contagem Bacteriana Total) a um nível máximo de 10^9 UFC/g de alimento. Este valor compreende a soma de células de microrganismos lácticos e formadores de “limo” RDC-12, ANVISA (1994).

2.9 Legislação para embalagens ativas

O uso de agentes antimicrobianos como aditivos em embalagens para contato com alimentos deve seguir as recomendações e aprovações de agências reguladoras. Assim, o uso de substâncias já autorizadas para contato com alimentos, aditivos grau alimentício e o uso de antimicrobianos naturais, como extratos de plantas ou condimentos, é alternativa promissora no que diz respeito às pesquisas em embalagens ativas devido ao seu apelo de produto natural, preferência por parte do consumidor e menores conflitos

com as legislações vigentes (YAMADA, 2004). O agente antimicrobiano deve ser classificado como um aditivo de embalagem, substância de contato com alimentos ou como ingrediente ou aditivo alimentar (HAN, 2003).

Até 2008 a legislação brasileira não se pronunciava com relação às embalagens ativas, devendo a produção deste material ser considerada juntamente com a lista de aditivos aprovados para uso em alimentos, a legislação de materiais de embalagens, e a migração de substâncias e possíveis contaminantes.

Após reuniões conduzidas por especialistas em embalagens ativas e segurança alimentar, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou no diário Oficial da União (DOU), em 14 de Agosto de 2008, a lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinadas à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos, bem como os limites máximos para cada finalidade.

De acordo com SUPPAKUL et al. (2003), diversas substâncias receberam autorização de uso do FDA (Food and Drug Administration) para uso em embalagens ativas em contato com alimentos. Na Comunidade Européia, até 2004, Diretiva 89/109/EEC, que trata da legislação de embalagens de alimentos, estabelecia o limite de 60 mg.Kg^{-1} de substâncias de embalagens totais migradas para o alimento. Isto era impeditivo para embalagens ativas, já que a finalidade das mesmas é liberar a substância adicionada ao material de embalagem para o alimento (FABECH et al., 2000).

No período de 1999 a 2001, foi realizado, na União Européia, o projeto “Actipak”, com a finalidade de avaliar a segurança, efetividade, impacto econômico-ambiental e aceitação pelo consumidor de embalagens ativas e inteligentes, FAIR-Project PL 98-4170 (van Beest, 2004). Obteve-se como resultado o Regulamento CE 1935/2004 do Parlamento Europeu (2004), que regula e permite a utilização de embalagens ativas, admite a migração de substâncias de embalagens e regulamenta o registro destas substâncias, indicando ainda uma rotulagem específica. Todos os novos sistemas de embalagens ativas e inteligentes necessitam avaliação da Autoridade Européia de Segurança dos Alimentos (JONG et al., 2005).

Embalagens ativas têm um grande potencial de aplicação futura na tecnologia de alimentos, entretanto mais informações são necessárias em relação aos efeitos químicos, microbiológicos e fisiológicos destes sistemas sobre os alimentos acondicionados, especialmente sobre a qualidade nutricional e segurança dos consumidores (HAN e FLOROS, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e metodologias utilizadas, tanto na elaboração como para caracterização analítica dos filmes desenvolvidos. Os procedimentos para realização dos testes de medida da eficiência antimicrobiana e influência dos filmes sobre a coloração da carne também serão descritos. Ao final do capítulo, é apresentada a metodologia analítica utilizada para detecção de prata migrada do filme para o alimento (contaminação por elemento prata).

O seguinte procedimento geral foi seguido:

Foram elaborados filmes poliméricos de PEBD com diferentes concentrações de agente antimicrobiano à base de prata, os quais foram submetidos a testes de determinação das propriedades mecânicas, microscopia de varredura (MEV) e propriedade de barreira ao oxigênio. Os filmes foram testados quanto à capacidade antimicrobiana *in-vitro*, para dois microrganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus* spp. (padrão Gram positivo anaeróbio alimentício) e *Salmonella* spp. (padrão Gram negativo aeróbio alimentício). Testes em cortes bovinos foram desenvolvidos através da fabricação de embalagens a vácuo destes filmes, e o produto foi submetido à armazenagem em condições idênticas àquelas praticadas por postos de venda e distribuição de carne. A eficiência antimicrobiana dos filmes sobre a carne foi determinada com base na Contagem Bacteriana Total – CBT e crescimento de *Pseudomonas* spp. por 10 dias. A cor e teor de prata nos cortes de carne também foram determinados. A Figura 3.1 ilustra a seqüência dos procedimentos experimentais utilizados.

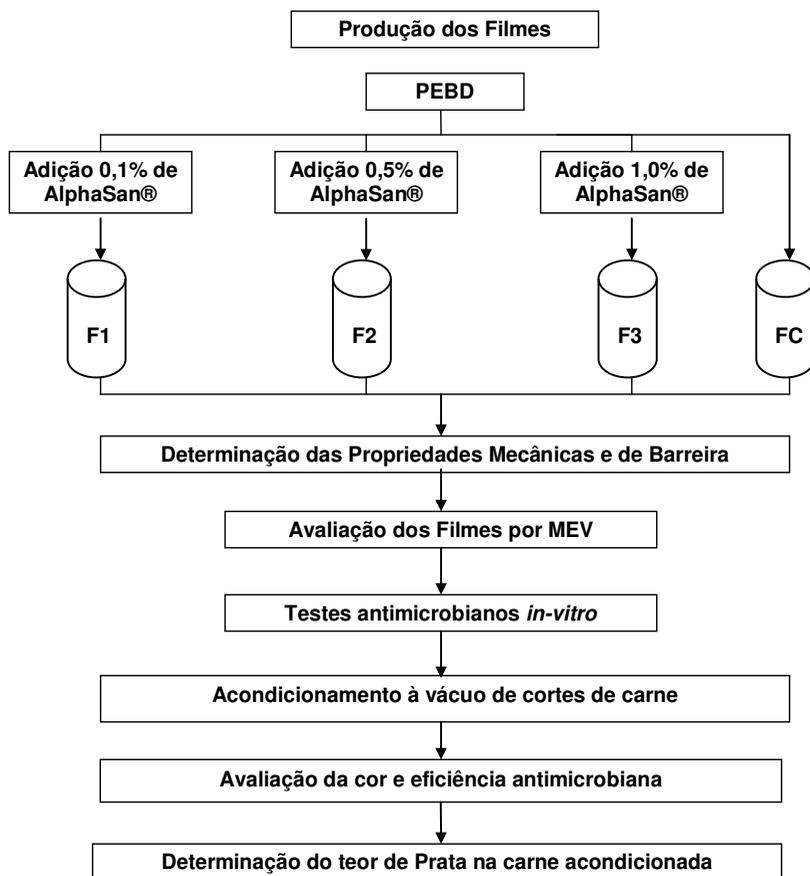


Figura 3.1 - Ilustração detalhando o panorama dos procedimentos experimentais.

3.1 Material

3.1.1 Agente antimicrobiano

O agente antimicrobiano testado foi escolhido considerando, primordialmente, questões legais que norteiam o uso de aditivos para polímeros em contato com alimentos. O aditivo antimicrobiano a base de sais de fosfatos-zircônio (suporte) contendo íons prata, com o nome comercial *AlphaSan*[®], foi fornecido pela empresa Milliken Chemical

(USA), e usualmente vêm sendo utilizado como agente antimicrobiano em tecidos destinados a confecção de vestimentas para práticas esportivas. Recentemente, o órgão FDA - USA (*Food and Drug Administration*) reconheceu o aditivo como agente antimicrobiano passível para uso em materiais de embalagens, utensílios e equipamentos em contato com alimentos. Segundo informações do fabricante, suas características são apresentadas abaixo:

1. aparência: pó branco cristalino;
2. tamanho médio de partícula: 1,3 microns;
3. quantidade de íon prata: 3,8%
4. Impurezas: <0,5%;
5. densidade: 0,25 – 0,3g/cm³;
6. estabilidade térmica: > 800°C;
7. máxima concentração de uso: 1.0% (m/m);

Além da liberação pelo FDA, o uso deste aditivo contendo prata é aceito perante a “*lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos*” da ANVISA, publicada no diário Oficial da União (DOU) em 14 de Agosto de 2008 – ANVISA. A concentração máxima permitida para incorporação em polímeros é de 1% em relação à massa da resina.

3.1.2 Polietileno de baixa densidade, PEBD

O polietileno de baixa densidade foi fornecido pela Braskem SA, sendo denominado PEBD HS150, e cujas especificações são:

- a) ponto de fusão: 116°C
- b) índice de fluidez: 1 a 2,5g/10 min
- c) cristalinidade parcial: 50 a 60%
- d) densidade: 0,915 g/cm³

3.1.3 Elaboração dos filmes

3.1.3.1 Desenvolvimento dos masterbatches

O Masterbatch foi obtido pela mistura mecânica da resina de PEBD com agente antimicrobiano à concentração de 30% m/m, pesados em

balança analítica (MARTE-5000). A temperatura do processo de extrusão foi de 130°C (extrusora *Drais*); os pellets foram obtidos na forma de macarrão com diâmetro médio de 8 mm. As quantidades utilizadas neste procedimento foram: 3,5Kg da resina e 1,5 Kg do aditivo, totalizando 5 Kg material aditivado. Após o processo de incorporação e pelletização, o material foi acondicionado em bolsa de polietileno multicamadas (Figura 3.2) ao abrigo da unidade, sendo posteriormente transportado ao local de fabricação dos filmes.



Figura 3.2 - Masterbatches de PEBD HS150 com 30% do antimicrobiano *AlphaSan*[®]

3.1.3.2 Extrusão dos filmes

O processo de extrusão dos filmes antimicrobianos foi realizado na empresa BRASKEM S.A, unidade fabril de Triunfo – RS. A operação ocorreu em extrusora de escala industrial marca Leonard modelo 30F0, com velocidade da rosca de 2.000 rpm e gradiente de temperatura programado de 165°C para a zona 1, 170°C para a zona 2, 175°C para a zona 3, 180°C para a zona 4, 185°C para a zona 5, 190°C para a zona 6 e 195°C para a zona 7.

Procedeu-se à pesagem do masterbatch em balança semi-analítica (MARTE modelo 500R) para obtenção de concentrações finais de antimicrobiano nos filmes de 0,1, 0,5 e 1,0%. As massas pesadas são mostradas na Tabela 3.1. Um filme, isento de antimicrobiano (filme controle FC), foi extrusado para ensaios controle. A mistura mecânica Masterbatch/resina foi feita em misturador helicoidal a 200 rpm por 15 minutos. A extrusora foi ajustada para obtenção de filmes 30 µm de espessura nominal.

Tabela 3.1 - Cálculo mássico para elaboração dos filmes

Tratamento	masterbatch (g)	PEBD (g)	AlphaSan (%)	m total (g)
F1	3,33	1000	0,1	1003,33
F2	16,66	1000	0,5	1016,66
F3	33,33	1000	1,0	1033,33
FC	-	1000	-	1000

Os filmes foram produzidos em ordem crescente de concentração. Após cada operação foi aplicado o procedimento de limpeza e higienização do equipamento, que consiste em passagem do solvente metilcetona no sentido da rosca de condução para a rosca de extrusão. Ao término de cada operação de extrusão, os filmes foram fracionados em duas porções. A primeira, que consiste em uma amostra de 6m de comprimento da largura nominal (30cm), acondicionada em bolsas de polietileno multicamadas, destinada à determinação das propriedades mecânicas e propriedade de barreira. O restante foi destinado à confecção das “saquetas” para acondicionamento da carne.

3.1.4 Confecção das saquetas

Após a extrusão dos filmes de cada tratamento (F1, F2, F3 e FC), foram confeccionadas “saquetas” com dimensões de 20 x 5cm², com auxílio de molde de corte Hot-Cut M45. A selagem foi empregada na extremidade inferior e nas duas extremidades laterais, permanecendo aberta apenas a face superior, como ilustrado na Figura 3.3.



Figura 3.3 - Saqueta para acondicionamento de carne.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização dos filmes

3.2.1.1 Caracterização física: determinação da espessura do filme

Os procedimentos de análises para determinação da espessura total de cada filme foram realizados no Laboratório de Ciência de Polímeros da empresa BRASKEM S.A. Petroquímica, unidade de Triunfo, RS. Utilizou-se como equipamento de análise um micrômetro digital, marca *MITUTOYO*, modelo 7/A com escala de 0 a 25 mm e menor divisão de escala de $0,001\mu\text{m}$ ($1\mu\text{m}$). A metodologia da análise utilizada foi dada pela norma ASTM F 2251-03. O valor de espessura nominal para as amostras de cada tratamento foi calculado através da média aritmética dos resultados de 5 repetições em cada amostra, conforme solicitado pela norma.

3.2.1.2 Determinação das propriedades mecânicas

Os filmes F1, F2, F3 e FC foram testados quanto às propriedades mecânicas de Tração e Resistência a Perfuração, no Laboratório de Inovação e Tecnologia de Polímeros da empresa BRASKEM S.A Petroquímica, unidade de Triunfo, RS, conforme descrito na metodologia oficial.

a) Resistência à Perfuração

A resistência à perfuração foi avaliada segundo a norma ASTM D5748-95 (2001). Cada amostra foi fracionada em 10 corpos-de-prova, cada qual com tamanho de $76 \times 76 \text{ cm}^2$, e os mesmos foram acondicionados por 40 horas à temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \pm 2 \%$ de Umidade Relativa, UR. Cada amostra a ser ensaiada foi fixada no suporte de uma célula de carga de um aparelho Universal de Testes marca Instron, modelo 3367, e que permite a exposição de uma área de 35 mm^2 .

A perfuração foi realizada com uma sonda metálica de ponta esférica com diâmetro de 3,2 mm e velocidade de penetração de 25 mm min^{-1} . A ponteira foi posicionada o mais próximo possível da amostra, porém sem contato físico. O ensaio foi encerrado no momento da perfuração completa do material, percebida a olho nu ou representada por uma queda na resistência. Os valores de resistência à perfuração na falha (N), energia necessária para a perfuração (J) e deformação da amostra na evidência de perfuração (mm) foram obtidos para cada corpo-de-prova, por meio de análise fornecida pelo equipamento.

b) Resistência à Tração

Amostras de $100 \times 25,4 \text{ mm}^2$ foram utilizadas como corpos-de-prova para o teste de tração, com distância fixa de 50 mm entre as garras, e velocidade de tração de 50 mm-min^{-1} (Norma ASTM DS882-02, 1996). Foi utilizado o aparelho universal de testes (marca INSTRON, modelo 3367), com célula de carga de 1 kN (100 kg) e sonda de tração com presilhas de 50 mm. Considerando que as propriedades dos filmes e embalagens plásticas podem sofrer alterações significativas com as alterações de temperatura e umidade relativa, foi efetuado o condicionamento prévio: os corpos de prova foram colocados em dessecador com umidade relativa constante de $58 \pm 2 \%$ UR e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em estufa BOD, por 40h.

Os testes de Tração foram realizados 30 dias após a fabricação dos filmes, sendo determinadas as componentes de Tensão ao Escoamento

(mPa), Tensão na Ruptura (mPa), Alongamento na Ruptura (mPa), Alongamento no Escoamento (mPa), Rasgamento Inicial (Kgf cm^{-1}). Os valores destas propriedades foram calculados segundo as Equações 3.1 a 3.4.

$$\text{Tensão no Escoamento (MPa)} = \frac{F_{\text{esc}}}{A_{\text{min}}} \quad (3.1)$$

$$\text{Tensão na Ruptura (MPa)} = \frac{F_{\text{rup}}}{A_{\text{min}}} \quad (3.2)$$

$$\text{Alongamento na Ruptura (MPa)} = \left(\frac{A_T}{DG} \right) \cdot 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Alongamento no Escoamento (MPa)} = \left(\frac{F_{\text{esc}}}{A_{\text{min}}} \right) \cdot 100 \quad (3.4)$$

Onde:

F_{esc} = força registrada no ponto de escoamento (N);

F_{rup} = força registrada no ponto de ruptura (N);

A_{min} = área mínima inicial do corpo-de-prova (m^2);

A = área média inicial do corpo-de-prova (m^2);

DG = distância inicial entre as garras (m);

Embora a norma ASTM sugira 5 repetições de cada amostra para o ensaio de tração, por questão de precisão os ensaios foram repetidos 10 vezes em cada amostra nos sentidos DM, direção de máquina, e DT, direção transversal dos filmes avaliados.

3.2.1.3 Determinação das propriedades de barreira

A Taxa de Permeabilidade ao Oxigênio (TPO_2) foi determinada em triplicata para cada amostra, conforme especificações descritas nas normas ASTM D3985-95 (2001) e F1927-98 (2001).

As amostras foram selecionadas de modo a evitar a presença de vincos e dobras visíveis, ou microfuros. Cada corpo-de-prova foi cortado com auxílio de gabarito e estilete, e em seguida acondicionado por dois dias

a 23 ± 2 °C e UR de $50 \% \pm 5 \%$.

Após o período de acondicionamento, os corpos-de-prova foram afixados na célula de difusão do equipamento OXTRAN (marca Modern Company Inc) e selados com graxa de silicone de alta viscosidade (marca Apiezon T). As duas metades da célula de difusão foram hermeticamente fechadas. Oxigênio gás, grau de pureza de 99,5% sob pressão, foi permeado na célula. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste do oxigênio permeado até o sensor coulométrico. O sensor foi calibrado segundo a Lei de Faraday, com a seguinte base estequiométrica: a cada 4 elétrons lidos pelo detector, considerou-se a passagem de uma molécula carregada pelo gás de arraste. Portanto, a TPO_2 é calculada pela leitura direta do sensor, corrigida pelo coeficiente estequiométrico. O resultado foi expresso em $cm^3(CNTP) (m^{-2} \cdot dia^{-1})$.

3.2.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias das superfícies dos filmes foram obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca SHIMADZU, modelo SSX-550, pertencente ao laboratório de Microscopia do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG.

Previamente ao ensaio, as amostras de cada tratamento foram cortadas em tamanho de 1 cm^2 e recobertas com uma fina camada de ouro em metalizador marca SHIMADZU, modelo IC-50. As imagens foram registradas com aumento de 200 a 500 vezes.

3.2.2 Atividade antimicrobiana in-vitro dos filmes produzidos

Para cada filme elaborado foi realizado o “teste do halo”, ensaio em que a atividade antimicrobiana é observada *in-vitro*, com objetivo de verificar a capacidade e eficiência de inativação de dois microrganismos de referência em alimentos: *Staphylococcus aureus spp.* e *Salmonella spp.*

A técnica, sugerida por LIMJAROEN *et al.* (2003), e também aplicada por WURLITZER (2007), consiste na verificação de possíveis zonas de inibição do crescimento celular ao redor da amostra avaliada em um meio de cultura específico, quando o sistema experimental encontrar-se em condições ideais para crescimento do microrganismo alvo.

O resultado pode ser expresso de forma qualitativa ou quantitativa.

Na primeira a leitura é “eficiente”, quando resultar em presença de halo, e “ineficiente”, quando não houver halo de inibição na placa de cultura. Na segunda faz-se a medida do raio do halo de inibição (mm), quando a presença destes for observada.

O teste foi conduzido com 3 repetições para cada tratamento, inclusive o controle. O procedimento para determinação do potencial antimicrobiano é composto por três etapas: a) preparação do inóculo, que consiste na suspensão, com concentração conhecida, do microrganismo alvo; b) inoculação das placas; c) colocação dos discos de filme nas placas. Os procedimentos de cada etapa estão sendo descritos nos itens seguintes a este tópico.

3.2.2.1 Ativação das cepas e preparação dos inóculos de *Staphylococcus aureus* spp e *Salmonella* spp

a) Reidratação e reativação das cepas:

Para a preparação de cada inóculo, utilizou-se cepa padrão purificada e liofilizada dos microrganismos *Staphylococcus aureus* spp. e *Salmonella* spp., ambas fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz. As amostras liofilizadas foram reidratadas e ativadas conforme indicação técnica do fornecedor que consiste em incubação da cepa a 37°C por 24 horas em repouso, em caldo nutriente Baird-Parker (BP-Merck-USA) para *Staphylococcus aureus* spp., e em caldo nutriente xilose lisina desoxicolato (XLD-Merck-USA) para *Salmonella* spp..

b) Preparação do inóculo:

Uma alçada de cada uma das suspensões ativadas de *S. aureus* spp e *Salmonella* spp. foram novamente incubados em caldo nutriente BP e XLD respectivamente, por 24 horas a temperatura de 37°C. Após o período de incubação, 0,1ml de cada suspensão foi diluída em 9 mL de água peptonada (MERCK), correspondendo à diluição 10^{-1} . Este procedimento de diluição foi repetido por mais duas vezes, chegando-se na diluição 10^{-3} . O procedimento resumido para preparação dos inóculos pode ser visto na Figura 3.4.

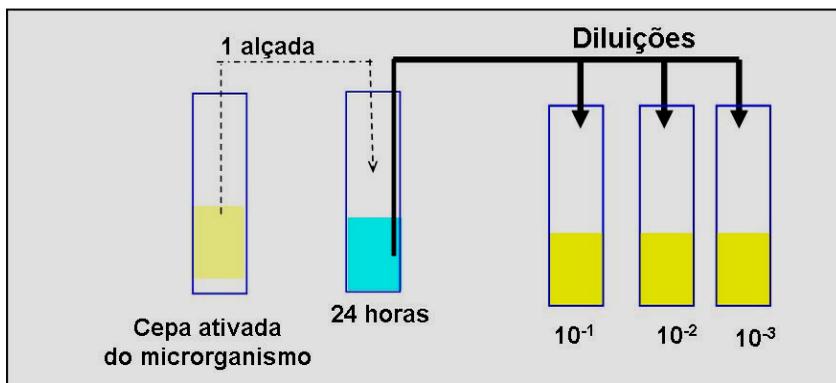


Figura 3.4 - Ilustração do procedimento para a preparação dos inóculos de *S. aureus spp* e *Salmonella spp*.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCTA, Instituto Federal de Ensino, Ciência e Tecnologia Catarinense, IFET, Campus de Concórdia.

3.2.2.2 Teste do halo

O teste do halo baseia-se no princípio da idealidade dos fatores de crescimento microbiano. Para o inóculo de *S. aureus spp*, foi utilizado o ágar-BP e para *Salmonella spp*, agar XLD (Merck-USA). O meio de cultura de cada microrganismo, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 min, foi vertido e solidificado em placas de Petri. Na superfície destas placas foram inoculados 0,1 mL da suspensão do microrganismo em teste com inóculo à diluição de 10^{-3} , previamente preparado conforme procedimento padrão descrito anteriormente. Pequenos discos de diâmetro 2,1 cm dos filmes F1, F2, F3 e FC foram colocados assepticamente no centro geométrico da placa, sobre a superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e a formação de halos de inibição do crescimento microbiano ao redor da amostra dos filmes foi observada. A Figura 3.5 mostra o esquema para realização do teste do halo.

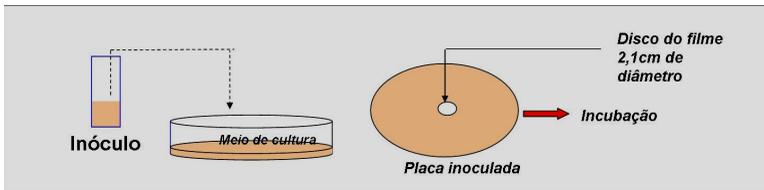


Figura 3. 5 - Procedimento para realização do teste do halo.

3.2.3 Acondicionamento das amostras de carne nos filmes elaborados

3.2.3.1 Seleção das amostras de carne

Foram utilizados cortes de carne bovina *Longissimus dorsi* (contrafilé), oriundos do Frigorífico e Abatedouro Piloto do Instituto Federal de Ensino, Ciência e Tecnologia, IFET, Campus de Concórdia. As amostras, formadas de peças de aproximadamente 5 Kg, foram coletadas ao término do período de *rigor mortis*, ou seja, 24 horas após o abate, e transportadas embaladas em bolsas de polietileno e caixas isotérmicas até o laboratório de microbiologia de alimentos do IFET.

3.2.3.2 Acondicionamento da carne em embalagens antimicrobianas

Bifes transversais de cerca de 100 g, retirados das peças de contrafilé, constituíram as amostras individuais. Este procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar previamente esterilizada por ação de luz UV por 30 minutos. A seguir, as amostras foram acondicionadas nas saquetas confeccionadas com os filmes antimicrobianos provenientes dos diferentes tratamentos e do controle (F1, F2, F3, FC). Para cada tratamento, foi realizado o acondicionamento de 10 amostras, correspondentes a uma amostra destinada a cada dia de avaliação. O experimento foi realizado em duplicata, totalizando então, 80 amostras.

As amostras acondicionadas nas “saquetas” dos diferentes filmes foram embaladas em sistema de vácuo com auxílio de uma seladora automática marca SELOVAC[®], modelo 3380 (Figura 3.6.a e 3.6.b). Após a selagem, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a temperatura controlada (temperatura comercial de refrigeração de 5°C), em câmara B.O.D com refrigeração, marca ELETROlab, modelo 101/M3 (Figura 3.6.c). O tempo de armazenamento foi de 10 dias, sendo duas amostras de

cada tratamento retiradas por dia para avaliação microbiológica.



a) seladora; b) carne embalada a vácuo; c) armazenamento a temperatura de refrigeração controlada.

Figura 3.6 - Sistema de acondicionamento e armazenamento das amostras.

3.2.4 Avaliação microbiológica da carne durante o armazenamento

Durante o período de armazenamento (10 dias), foram retiradas amostras de cada tratamento, as quais foram destinadas à análise microbiológica para determinação de Contagem Bacteriana Total de microrganismos Psicotróficos (CTB) e Contagem de *Pseudomonas* (CP). As amostras foram retiradas da câmara de B.O.D. e armazenadas em caixas isotérmicas até utilização. Todas as análises foram realizadas em duplicata de amostra, seguindo-se as metodologias descritas pelo “*Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Food* (APHA – 2001)”.

3.2.4.1 Determinação da Contagem Bacteriana Total de Microrganismos Psicrófilos (CBT)

a) Preparação das amostras e obtenção de diluições seriadas

Saquetas contendo amostras a serem analisadas microbiologicamente, foram higienizadas superficialmente antes de serem abertas por algodão embebido em solução de álcool a 70%. Após a higienização superficial foram retirados 25g das amostras de carne de cada tratamento, com auxílio de bisturi previamente esterilizado. Para compor o analito, pequenas frações de diferentes pontos da amostra foram retiradas. O analito foi então misturado a 225mL de água peptonada (H₂Op) (MERCK-USA) 0,1%, previamente esterilizada em autoclave (121 °C por 30 min), obtendo-se deste procedimento a diluição 10⁻¹, a qual foi homogeneizada por 60 segundos em aparelho Estomacher 400 (laboratory Blender). Após a obtenção da primeira diluição de cada amostra, foram realizadas as demais diluições seriadas, transferindo-se 1mL da diluição 10⁻¹, a um segundo tubo contendo 9mL de H₂Op, chegando-se a diluição 10⁻². O procedimento foi repetido para a diluição 10⁻² para obter-se a diluição 10⁻³.

b) Contagem Bacteriana Total de Bactérias Psicrófilas (CBT).

Para CBT, 1 mL de cada uma das diluições foi inoculado em profundidade de placas de Petri. Em seguida as placas foram cobertas por cerca de 15 a 20 mL de meio de cultura PCA (Plate Count Agar-Merk-USA), previamente esterilizado em autoclave e resfriado a 40°C. Após a adição do meio de cultura, as placas foram homogeneizadas manualmente em forma de oito por 10 movimentos e deixadas solidificar naturalmente. Cada diluição foi inoculada em duplicata de amostra. Todos os procedimentos foram feitos em capela de fluxo laminar.

Posteriormente a inoculação de cada amostra, as placas foram encubadas em posição invertida a 7±1 °C por 10 dias em estufa B.O.D., marca *ELETROlab* modelo 101/M3 . Ao término do período de incubação, a leitura de cada placa foi realizada com auxílio de lupa de contagem, contando-se as colônias viáveis na placa. O resultado, isto é, a média de duas placas de cada diluição, foi expresso em UFC g⁻¹.

c) Contagem Bacteriana de *Pseudomonas*

Para a contagem de *Pseudomonas* foi utilizada a técnica de contagem por superfície. Um volume de 0,1 mL de cada diluição foi adicionado

asépticamente sobre placas de *Petri* previamente preenchidas com 20mL de meio de cultura OXOID-USA solidificado. O meio e cultura foi preparado dissolvendo-se 23,2 g do meio sólido em 500mL de água destilada, juntamente com 5 mL de glicerol. A mistura foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 30 minutos.

O inóculo, preparado descrito anteriormente, foi espalhado em placa de *Petri*, com auxílio de uma alça de Drigalski, por toda a superfície do meio de cultura até a absorção completa do líquido. As placas foram encubadas invertidas em estufa (marca MARCONI, modelo MRI) a 27±1 C por 48 horas. Ao fim do período de incubação, as colônias foram contadas com auxílio de lupa. A faixa de aceitabilidade do teste é de 100 até, no máximo, 1000 colônias por placa. Após a contagem, realizou-se a prova bioquímica de confirmação de “colônia de *Pseudomonas*” (Prova de oxidase). Uma gota de solução da enzima oxidase (1ppm) foi adicionada sobre uma colônia de cada placa lida. Havendo a formação de círculo de coloração púrpura, anotou-se o resultado como CONFIRMADO.

3.2.5 Avaliação da cor da carne durante a estocagem

a) Avaliação da cor da carne por Colorímetro

Os procedimentos de determinação da cor foram realizados imediatamente após a retirada da fração de amostra destinada às determinações microbiológicas.

A medida da cor foi feita utilizando-se um colorímetro portátil (CHROMA METER CR-400), com fonte de luz D65, ângulo de observação de 10° e abertura de célula 30 mm, usando-se coordenadas L*, a*, b* do sistema CIElab, onde o L* é o croma associado à luminosidade (L*=0 preto, 100 branco), e a* é o parâmetro de cor que varia do verde (-) ao vermelho (+), e b* o parâmetro de cor que mede variações do azul (-) ao amarelo (+). O equipamento foi calibrado com padrão branco e preto.

O experimento de leitura dos parâmetros L*, a* e b* foram feitos para todas as amostras estudadas, sendo: 10 amostras de cada tratamento em duplicata de amostra, totalizando 80 amostras. Foram feitas 3 leituras de cada amostra.

Por meio das coordenadas L*, a* e b*, foi calculada a diferença de coloração (ΔE^*) para cada tratamento durante o tempo de avaliação, através da equação:
$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$
.

b) Avaliação da cor da carne por Método Fotográfico Digital

Para a avaliação digital da cor, foram retiradas duas amostras das fotografias da carne acondicionada em cada tratamento avaliado. Para a obtenção das fotografias, foi utilizada uma câmera digital Samsung (Modelo D5000), resolução de 5 MPixel. A lente da câmera foi posicionada perpendicularmente à superfície do produto, a uma distância de 20cm e ajustou-se o balanço de branco para luz do dia. As imagens foram feitas em fundo branco.

As imagens selecionadas de cada amostra avaliada foram convertidas em dados de RGB médios em aplicativo de leitura de cor pixel a pixel, usando o software Mathematica 5.0[®] (Quadri, 2004). Os resultados obtidos foram convertidos para o sistema CIELab e CIELCH pelo programa CIE Color Calculator (LINDBLOOM, 2004) obtendo-se as dimensões L*, a*, b*, C* e H°. A partir destes dados foram calculadas as diferenças de cor DE* através da equação $\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$.

3.2.6 Teor de prata nos cortes de carne

Ao término dos experimentos de medida dos parâmetros de cor, as amostras de cada tratamento, em duplicata foram acondicionadas em bolsas de polietileno multicamada impermeável e congeladas -20°C. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para determinação do teor de prata em Espectrômetro de Absorção Atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (ETAAS), marca VARIAN, modelo ZEEMAN 220. O experimento foi realizado no Centro Tecnológico – CENTEC – UNISUL.

Para a determinação do teor de prata, as amostras foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento:

- Após o descongelamento à temperatura ambiente, 2g de carne de cada tratamento foram pesados em balança analítica (QUIMIS 0,0001g), e as amostras foram digeridas em becker de 50mL, com 10mL de ácido nítrico concentrado (99% de pureza) (Merck).
- O conjunto foi coberto com filme PVC e deixado em repouso por 24 horas.
- Após este período, as amostras foram encaminhadas a um bloco digestor equipado com condensador de refluxo iniciando-se o processo a 50°C. A temperatura foi lentamente aumentada a 125°C,

onde permaneceu por duas horas.

- Após a completa digestão, o conteúdo foi filtrado e transferido a um balão volumétrico de 25 ml, e o volume foi completado com solução de ácido nítrico a 2 % para realização da leitura de prata.
- O resultado foi expresso em mg de Ag Kg⁻¹ de amostra de carne avaliada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos em cada etapa de realização do trabalho. Primeiramente serão abordados os resultados obtidos quanto à caracterização de espessura e propriedades mecânicas dos filmes. A seguir serão apresentados os testes de atividade antimicrobiana *invitro* e também os resultados de aplicação dos filmes antimicrobianos em carne bovina. Finalizando o capítulo, são mostrados os resultados de caracterização da cor da carne acondicionada nas embalagens antimicrobianas e também os resultados da avaliação do teor de prata migrado dos filmes para a carne.

4.1 Caracterização dos filmes

4.1.1 Espessura

Os resultados da determinação de espessura dos filmes de cada tratamento (FC, F1, F2 e F3) mostrou-se sem variações ao nível de significância de 5%. Os resultados médios podem ser vistos na Tabela 4.1.

A não variabilidade da espessura encontrada nas amostras dos tratamentos F1, F2 e F3 em relação ao tratamento FC, deve-se, muito provavelmente, à forma da deposição da partícula do aditivo entre as cadeias poliméricas do Polietileno (PE), provocando variações, em níveis não significativos, do grau de orientação dos monômeros. BRODY, STRUPINSK e KLINE (2001) encontraram diferenças microestruturais em filmes com carga mineral incorporada. As alterações microestruturais a que se referiram, remetiam as variações de posição dos monômeros nas estruturas poliméricas.

O tamanho médio da partícula do aditivo AlphaSan[®] é de 1,3 microns, e este possui em sua composição 3,5% de íons prata sobre uma base de sais de fosfato e zircônio. Devido ao potencial eletronegativo do átomo de prata, os mesmos podem ficar mais próximos uns dos outros no momento de maior disponibilidade energética, que neste caso é o momento de fusão (BRODY, STRUPINSK e KLINE, 2001), melhorando a cinética de deposição das partículas do aditivo.

A aglomeração iônica decorrente da junção das partículas metálicas adicionadas a um filme pode influenciar também na Taxa de

Permeabilidade ao Oxigênio (TPO₂), nas propriedades mecânicas e também nas propriedades morfológicas dos filmes devido ao espaçamento intermolecular ocasionado devido ao efeito da aglomeração iônica (BROWN, 1992).

Tabela 4.1 - Espessura dos filmes com adição de AlphaSan a diferentes concentrações

Amostra	Espessura (μm)		Intervalo de confiança	
	Média (μm)	dp (μm)	-95 %	+95 %
FC	30,25	0,43	30,03	30,47
F1	30,75	1,19	30,15	31,35
F2	31,08	1,09	30,53	31,64
F3	31,40	0,95	30,92	31,88

Médias obtidas dos valores de três repetições, com 5 medidas em cada repetição.

4.1.2 Distribuição das partículas de aditivo nos filmes

Substâncias antimicrobianas ao serem incorporadas em materiais de embalagem podem afetar as propriedades físicas (HAN, 2000; QUINTAVALLA e VICINI, 2002) e principalmente morfológicas (HAN, 2000) do filme obtido. Esta variação nas propriedades, em muitos casos, deve-se à forma como as partículas do aditivo adicionado encontram-se distribuídas e agregadas ao longo da cadeia polimérica, efeito este tecnicamente chamado de falha de homogeneidade.

No caso da adição de AlphaSan[®], os íons de Prata (Ag⁺) contidos na superfície de um suporte inorgânico de Fosfato/Zircônio podem, em determinadas situações, ligar-se por força iônica a alguns dos monômeros de repetição do PE provocando descontinuidade na rede do polímero. Os defeitos estruturais no material polimérico por adição do aditivo podem ser minimizados se a distribuição das partículas do aditivo no filme for homogênea (KLINE, 2001). Industrialmente, a melhor homogeneização do aditivo é alcançada quando o aditivo a ser incorporado é previamente diluído em pequenas proporções do material (pré-diluições ou

Masterbatches). Adicionalmente, os *Masterbatches* devem ser misturados à resina polimérica em sistema de rosca dupla como garantia adicional ao processo de homogeneização.

A avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes antimicrobianos e filme controle permitiram observar a topografia das superfícies de cada filme em relação à distribuição da partícula do aditivo nas amostras. Esta topografia é mostrada na Figura 4.1 para as diferentes concentrações de antimicrobiano (FC, F1, F2 e F3).

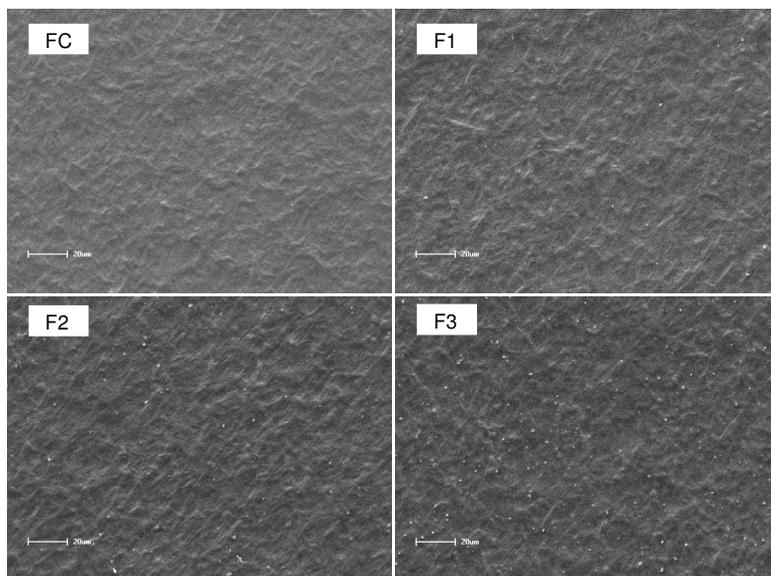


Figura 4.1 - Fotomicrografias da superfície dos filmes de P.E a diferentes concentrações de AlphaSan[®]. FC: 0%, F1: 0,1%; F2: 0,5%, F3: 1,0% . (aumento 500x).

Observa-se na micrografia do filme controle (FC) da Figura 4.1 uma topografia homogênea, padrão de filmes de polietileno. Pequenos pontos brancos ao longo da extensão da amostra podem ser observados na micrografia F1, indicando a presença do agente antimicrobiano contendo íons Ag^+ . O número destes pontos aumenta com o aumento da concentração de antimicrobiano. Embora os pontos brancos se apresentem em evidência nas micrografias, não há presença de “cortes”, espaços vazios, ou mesmo falhas na continuidade da rede polimérica em relação ao filme controle.

Podem ser observados que a matriz polimérica de todas as amostras

permaneceram inalteradas, tendo apenas a modificação na região de deposição da partícula do aditivo antimicrobiano adicionado. LIMJAROEN *et. al.* (2003) indicaram que, mantendo a estrutura da matriz polimérica, menor serão as alterações das propriedades do polímero.

A manutenção na homogeneidade das partículas no polímero deve-se à regularidade e eficiência da operação de mistura entre os componentes no processo de extrusão, que foi obtida através do mesmo procedimento como mencionado para o tratamento F1. Na Figura 4.2 pode ser visto a micrografia do tratamento F3 (maior concentração de aditivo) para ampliação de 1.000x.

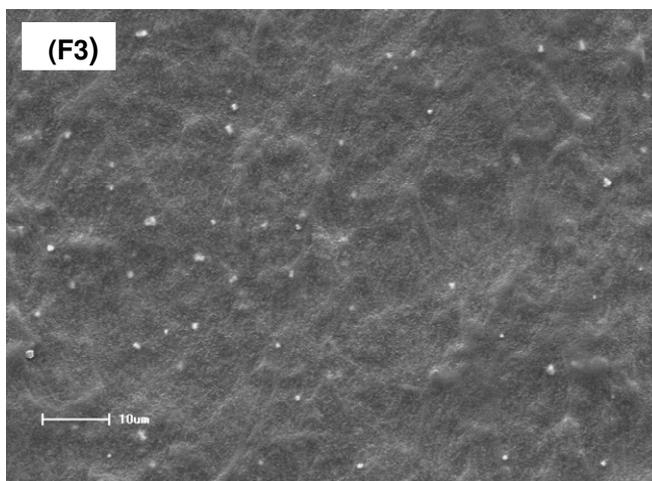


Figura 4. 2 - Fotomicrografias de superfície do PE com 1,0% de antimicrobiano (F3).

A forma como o antimicrobiano se mistura à matriz polimérica pode ser vista na Figura 4.3 (ampliação 2000x). Ao comparar F1 (Figura 4.3.a) e FC (Figura 4.3.b), observa-se que a partícula é recoberta por uma fina camada de PE, dando a sensação de aprisionamento dentro da massa polimérica. Não se observam espaços vazios nas proximidades do material, reforçando a possibilidade da prata apresentar-se inerte ao polímero.

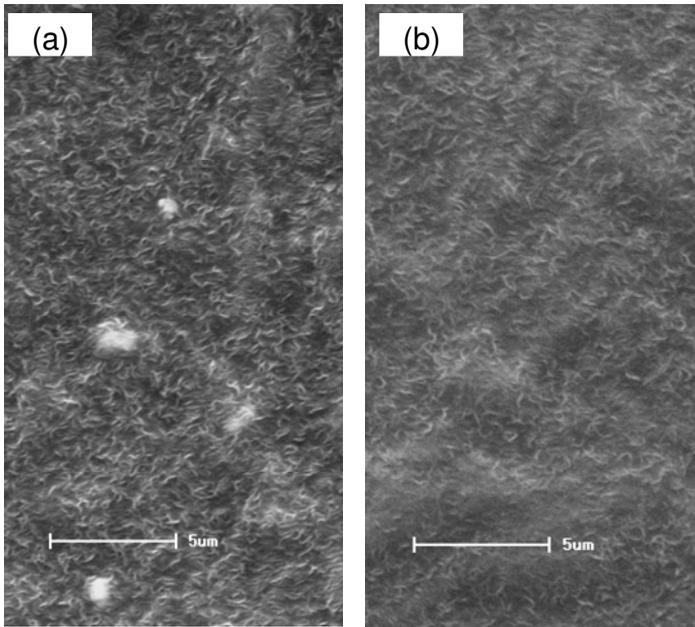


Figura 4.3 - Fotomicrografias de superfície dos filmes (aumento 2000x), para a) F1, e b) FC

Outro fato que pode contribuir para não haver interação química entre as espécies é a estabilidade térmica do aditivo. Segundo instruções técnicas do fornecedor (MILLIKEM CHEMICAL, 2008), a estabilidade do AlphaSan[®] é maior que 800°C, temperatura que não foi atingida em nenhuma das zonas de fusão do processo de extrusão pois a temperatura máxima de extrusão foi de 195°C.

Tratando-se de um filme destinado ao acondicionamento de alimentos, faz-se necessária a manutenção das propriedades mecânicas, e em especial a propriedade de barreira ao Oxigênio característica dos filmes a base de PE.

4.1.3 Permeabilidade ao oxigênio

A Taxa de Permeabilidade ao Oxigênio (TPO₂) dos filmes antimicrobianos (F1, F2 e F3), do mesmo modo que a espessura, não foi modificada pela incorporação do aditivo para valores do nível de

significância de 5%. Os valores resultantes da avaliação para este parâmetro podem ser observados na Tabela 4.2. Da mesma forma que anteriormente, os intervalos de confiança se sobrepõem, e as médias são muito próximas.

Tabela 4.2 - Taxa de permeabilidade ao Oxigênio de PE adicionado de antimicrobiano a diferentes concentrações

Tratamento	TPO ₂ (mL(CNTP))/(m ² .dia)		
	M	IV	CV
FC	8,737	8,468 – 9,005	4,4%
F1	8,808	8,789 – 8,826	0,3%
F2	8,779	8,562 – 8,977	3,5%
F3	8,779	8,062 – 9,537	11,9%

Valores referentes a três determinações. M – média; IV – intervalo de variação; CV – Coeficiente de variação.

Sabendo que muitas reações químicas, bioquímicas ou microbiológicas podem ser evitadas pela passagem de gases ou vapor de água através das paredes da embalagem onde está contido, a troca gasosa deve ser impedida tanto quanto possível. Por isso é tão importante certificar-se da qualidade do filme quanto à entrada de água ou gases no alimento acondicionado (POUZADA e GOMES, 2003).

A entrada do oxigênio para o interior de uma embalagem atua diretamente na velocidade de crescimento de microrganismos, patogênicos ou deteriorantes, contidos no produto, atuando de forma direta na diminuição de sua vida útil, o que é percebido pela modificação das características organolépticas. O oxigênio quando atua como catalisador de crescimento de microrganismos patogênicos compromete além das propriedades organolépticas, a segurança alimentar (JAY, 1992).

Tendo em vista estas considerações, vê-se quão importante é evitar o crescimento microbiano. Por outro lado, o controle da passagem de gases também o é. Deste modo, a adição de agentes antimicrobianos é uma solução altamente eficaz para o controle de seu crescimento e garantir que a data de validade do produto seja cumprida.

O fato da permeabilidade não ser afetada pelo antimicrobiano é um resultado bastante promissor, pois não é necessária uma adição maior de aditivo para compensar o possível crescimento microbiano devido à maior

entrada de oxigênio.

4.1.4 Determinação da resistência dos filmes à tração

Na Tabela 4.3, são mostrados os valores de Resistência ao rasgamento inicial das amostras dos filmes antimicrobianos e filme controle, bem como os valores das demais componentes que deram origem a esta propriedade. Observou-se pelos resultados que a adição do agente antimicrobiano nos tratamentos utilizados para o Filme 1 (0,1% m/m), Filme 2 (0,5% m/m) e Filme 3 (1% m/m) reduziram significativamente ($p > 0,05$) a Resistência ao rasgamento inicial das amostras avaliadas em relação ao tratamento controle (FC). Entretanto, não houve variação significativa ($p > 0,05$) entre as amostras aditivadas nas concentrações testadas neste experimento.

Tabela 4.3 - Ensaio de tração para os filmes antimicrobianos e controle.

Direção do ensaio	Filme	Escoamento (Mpa)	Ruptura (Mpa)	Alongamento na Ruptura (Mpa)	Alongamento no Escoamento (mm)	Resistência ao Rasgamento Inicial (Kgf /cm)
MD	FC	27,9 ± 0,2	54,3 ± 0,2	810 ± 0,5	83,3 ± 0,6	201,0 ± 0,2^a
	F1	25,8 ± 0,3	50,0 ± 0,3	768 ± 0,2	86,7 ± 0,4	198,0 ± 0,3^b
	F2	25,3 ± 0,9	50,2 ± 0,2	803 ± 0,3	87,1 ± 0,4	194,0 ± 0,4^b
	F3	24,9 ± 0,3	54,2 ± 0,4	802 ± 0,3	84,5 ± 0,5	196,0 ± 0,3^b
DT	FC	17,2 ± 0,4	34,1 ± 0,3	1262 ± 0,4	14,0 ± 0,3	202,0 ± 0,1^a
	F1	16,7 ± 0,7	33,0 ± 0,4	1196 ± 0,2	13,9 ± 0,5	196,0 ± 0,3^b
	F2	16,1 ± 0,5	33,5 ± 0,7	1263 ± 0,3	14,5 ± 0,3	198,0 ± 0,3^b
	F3	16,0 ± 0,1	35,3 ± 0,3	1247 ± 0,3	14,3 ± 0,4	199,0 ± 0,2^b

DM: Direção de Máquina; DT: Direção Transversal. Médias seguidas de letras diferentes, na vertical, diferem estatisticamente entre si, em teste de *Tukey* entre as médias ($p < 0,05$).

A inexistência de diferenças significativas entre os resultados obtidos para as amostras dos filmes antimicrobianos (F1, F2 e F3), demonstra que não existe relação estabelecida entre o aumento da concentração do aditivo antimicrobiano e diminuição da resistência ao rasgamento.

Para o filme controle (FC), os resultados foram similares tanto na avaliação no sentido de máquina (DM) como em sentido transversal (DT), compondo uma média de 201,5kgf/cm em relação a uma média de 196,8kg/cm para os filmes antimicrobianos, também avaliados em DM e DT. Em se tratando de filmes destinados ao acondicionamento de alimentos, a resistência ao rasgamento é a principal variável a ser considerada, pois reflete a flexibilidade do material frente às condições de estocagem, transporte, laminação, impressão e manuseio (SARANTOPOULOS, 2002).

Levando em consideração as médias para os valores de resistência ao rasgamento inicial, observa-se que houve uma redução de 4,7Kgf/cm na resistência, o que significa uma perda de 2,4% na resistência final do material. Além da diminuição na resistência ao rasgamento inicial dos filmes antimicrobianos, observa-se também a diminuição do Alongamento na Ruptura das amostras F1, F2 e F3, que foi de aproximadamente 10 unidades no sentido DM e 110 unidades em sentido DT. Perdas nos valores desta componente podem acarretar dificuldades durante o processo de acondicionamento de produtos alimentícios com formato irregular ou com dureza elevada, o que é comum em produtos cárneos industrializados.

Mesmo com a diminuição aproximada de 2,4% da resistência à tração, a média resultante obtida para os filmes antimicrobianos (196,8kgf/cm) está dentro da faixa (180 – 230 kgf/cm) de parâmetros de resistência ao rasgamento inicial adotados comercialmente por unidades frigoríficas para acondicionamento de cortes desossados.

Muito provavelmente, um dos motivos que pode ter acarretado a diminuição da tração, já que a espessura dos filmes se mostrou inalterada, foi a carga mineral adicionada com o aditivo antimicrobiano para suporte dos íons prata. Mesmo não estando ligado quimicamente às cadeias carbônicas, a prata pode ocasionar uma diminuição da força de atração intermolecular dos monômeros de repetição da matriz polimérica. Sothornvit e Krochta, (2000), descreve que a adição de partículas metálicas em sistemas poliméricos modifica a estrutura molecular tridimensional da rede, diminuindo as forças de atração intermoleculares e elevando o volume livre do sistema; conseqüentemente, a rede se torna menos densa.

Lim; Miney e Tung (1998) afirmam que a força de ruptura de um

filme é influenciada pela interação entre as moléculas da matriz polimérica, e que aditivos junto à matriz filmogênica, em diversos sítios ativos das cadeias, podem reduzir os espaços por solvatação (quando diluído) principalmente dos sítios apolares.

Fernandes (2001) relatou uma brusca diminuição (18%) nas propriedades de tração quando incorporou 3% de Zeólito em filmes de PEBD, relacionando esta diminuição às falhas ocasionadas nos filmes devido ao grande tamanho da partícula dos Zeólitos incorporados (6,5 μ m).

Wurlitzer (2007) adicionou 2% de antimicrobiano Triclosan em filmes de PVDC com espessura média de 8 mm, obtendo um valor de tração de 8 N, 2N menor que o do filme controle que mostrou um valor de 10 N, para a mesma espessura. Linjaroen *et al.* (2003) relatou a redução de 4% no valor do rasgamento inicial quando incorporou de 1 a 3% (m/m) de aditivo antimicrobiano a base de prata em filmes de PEAD.

4.1.5 Resistência à perfuração

A resistência à perfuração de um filme é um parâmetro de qualidade importante para materiais utilizados em acondicionamento de produtos com pontas, cantos vivos ou outros tipos de protuberâncias que possam danificar a embalagem durante o acondicionamento e a distribuição, a exemplo de produtos com ossos e ração animal. No caso de cortes cárneos desossados acondicionados a vácuo, a inexistência de pontas, como aquelas dos ossos, não elimina a necessidade de um material com boa resistência a perfuração.

A pressão exercida pelo sistema a vácuo, juntamente com o aumento da rigidez causada pelo frio da cadeia de manutenção da temperatura durante a vida de prateleira, são fatores críticos à perfuração de uma embalagem.

Comparando os resultados dos ensaios de perfuração dos filmes antimicrobianos com o filme controle, mostrados na Tabela 4.4, observou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores determinados para as amostras de cada tratamento. Os valores obtidos para carga na ruptura dos filmes foram de 4,2 a 4,4 N para os diferentes tratamentos, e de 13,9 a 14,5 mm para o alongamento da ruptura. Estes valores encontram-se dentro da faixa de especificação comercial para acondicionamento de carne sem ossos, que é de no mínimo 4 N para carga máxima e 12 mm de alongamento.

Tabela 4.4 - Determinação das componentes de perfuração dos filmes

Tratamentos	Carga na ruptura (N)	Alongamento na Ruptura (mm)	Carga Máxima (N)	Alongamento na Carga máxima (mm)
FC	4,2 ± 0,1	14,5 ± 0,1	5,0 ± 0,4	10,6 ± 0,1
F1	4,4 ± 0,2	14,0 ± 0,2	5,3 ± 0,3	10,1 ± 0,1
F2	4,4 ± 0,3	13,9 ± 0,4	5,3 ± 0,2	10,2 ± 0,2
F3	4,3 ± 0,1	14,2 ± 0,2	5,2 ± 0,1	10,5 ± 0,1

Medias oriundas de 10 medições para cada amostra de filme.

A propriedade de perfuração de um filme relaciona-se principalmente com o grau de orientação molecular de etileno da matriz polimérica. Espaços vazios, no momento da extrusão de um filme, proporcionam lacunas intramoleculares, ocasionando fragilidade do material quanto à resistência à perfuração. Fernandes (2001) estudou a associação da resistência à tração com as propriedades de perfuração. Ele relatou uma diminuição de 18% nas propriedades de tração com a incorporação de 3% de Zeólito em filmes de PEBD, porém não observou variação significativa na resistência à perfuração dos filmes testados naquela mesma concentração do aditivo avaliado. Segundo o mesmo autor, a resistência à perfuração pode ser afetada pela variação da espessura do material ensaiado; este fato, porém, pode ser descartado no presente trabalho, pois não foram observadas diferenças significativas de espessura entre os tratamentos.

O efeito sobre a propriedade de tração pode ser percebido nos resultados obtidos para a propriedade de Tração (Tabela 4.3), onde foi mencionada uma diminuição de 2,4% em média na capacidade de resistência à tração dos filmes antimicrobianos em relação ao filme controle. Este efeito pode ter exercido influência, mesmo que não significativa, na resistência a perfuração das amostras dos mesmos tratamentos (FC, F1, F2 e F3). Quando Fernandes (2001) relatou a diminuição de 18% nas propriedades de tração com a incorporação de 3% de Zeólito em filmes de PEBD, não houve variação significativa na resistência à perfuração dos filmes testados naquela concentração do aditivo avaliado. Adicionalmente, a propriedade de perfuração pode ser afetada (diminuída) pela espessura do material ensaiado, porém, este fato pode ser

descartado por não haver diferenças significativas de espessura entre os tratamentos.

4.2 Avaliação da ação antimicrobiana *in-vitro* dos filmes produzidos

O teste de atividade antimicrobiana mais utilizado observa a eventual formação de halos de inibição ao redor da amostra a ser testada. As condições de tempo e temperatura devem ser as consideradas ideais de crescimento dos microrganismos avaliados, neste caso 37°C por 24 horas para ambas as cepas. Em não havendo formação de halos de inibição, considera-se o resultado como sendo negativo. Na Tabela 4.5 podem ser observadas as medidas, em mm dos halos de inativação.

Tabela 4.5 - Raio do halo de inibição do crescimento de *S. aureus* e *Salmonella*

Microorganismo	Raio do halo* (mm)			
	FC	F1	F2	F3
<i>Staphylococcus aureus spp.</i>	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,3	3,1 ± 2,1	6,5 ± 3,5
<i>Salmonella spp.</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 1,2

*Média de três repetições, em triplicata de amostra

Para os testes conduzidos com *S. aureus spp.* pode-se observar um aumento do raio do halo de inibição do crescimento com o aumento da concentração de antimicrobiano, o que pode ser associado à eficiência de inativação dos filmes. Foram obtidas zonas de inibição médias de 1,1 mm para a amostra F1 (0,1% de aditivo antimicrobiano), 3,1mm de inibição para F2 (0,5%) e 6,5 mm para F3, amostra que contém 1% de aditivo antimicrobiano. Para o filme controle não foram detectados halos de inibição nas condições do teste (Figura 4.5).

Resultado similar, porém mais eficiente, foi encontrado por WURLITZER (2007), para filmes de PVDC contendo 0,5% (m/m) de Triclosan, onde a inibição de *Staphylococcus aureus spp.*, nas mesmas condições, resultou em um halo de inibição de 8,9 mm.

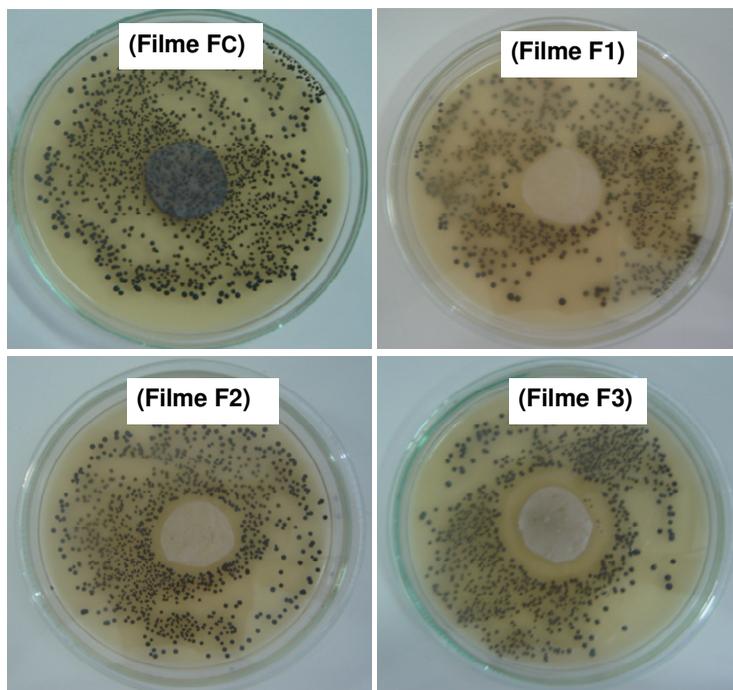


Figura 4.4 - Halos de inibição dos filmes antimicrobiano (F1, F2, F3) e filme controle contra *S. aureus*

Alguns fatores podem influenciar na formação de halos de inibição em testes antimicrobianos, como a difusão do antimicrobiano e da velocidade de crescimento do microrganismo (TOLEDO, 2000). Considerando que a cepa do microrganismo testado, *S. aureus spp.* e a umidade do Agar, são idênticos pois foram obtidos de um mesmo inóculo e uma mesma batelada, pode-se supor que os filmes foram capazes de liberar íons de prata suficientes para inativar os microorganismos; esta liberação foi tanto maior quanto maior a concentração no filme. Uma imagem aproximada do maior halo de inibição (F3) do teste com *S. aureus spp.* pode ser visualizado na Figura 4.6.

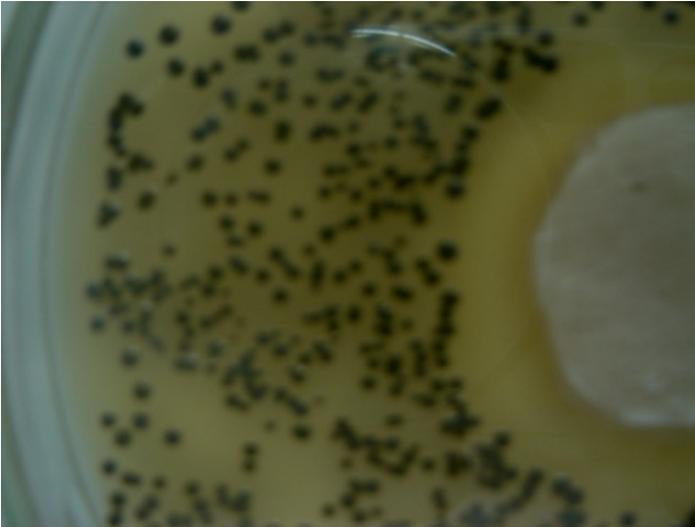


Figura 4.5 - Aproximação do halo de inibição de *S. aureus* spp. contra o filme 3 (F3)

O mecanismo exato de inibição do metabolismo de crescimento microbiano frente a alguns íons metálicos ainda é merecedor de estudos aprofundados em fisiologia de microrganismos. Muitos autores associam a inativação de microrganismo na presença de íons metálicos devido à incompatibilidade da carga do íon com a composição (Gram) do microrganismo, tornando possível uma interação entre ambos no sentido de repulsões iônicas. Portanto, linhagens que apresentam Gram positivo como *S. aureus* são mais sensíveis a íons do elemento prata devido às interações químicas de repulsão entre as cargas, pois este elemento apresenta também carga positiva; a partir disto, pode haver uma conseqüente desestabilização do metabolismo bacteriano. Esta sugestão de mecanismo, porém, não é única.

Pelczar *et. al.* (2005) descreve que os metais pesados e seus derivados inativam as proteínas celulares combinando-se com algum componente da proteínas. O ataque ocorre nos grupamentos sulfidríla da extremidade das proteínas. Este fato é conhecido há algum tempo, quando solução de nitrato de prata (AgNO_3) era utilizada para prevenir infecções oculares por *Gonococcus* em recém-nascidos. A ação do mercúrio, também um metal pesado, é explicada quimicamente. Acredita-se que a prata exerça o mesmo mecanismo, como mostrado na Figura 4.7.

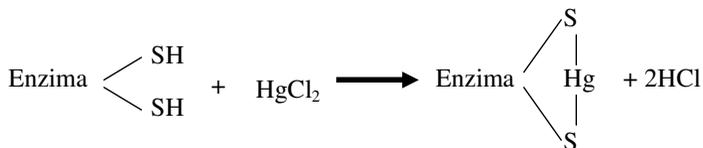


Figura 4.6 - Mecanismo da ação oligodinâmica entre a prata e enzimas de microrganismos (Pelczar *et. al.*, 2005), à similaridade da Prata.

Baseado no mecanismo de ação oligodinâmica sugerido por Pelczar *et. al.* (2005), as enzimas contidas na superfície da célula são rapidamente ligadas aos íons metálicos. Esta ligação provoca uma mudança significativa na estrutura das enzimas, tornando-as inativas e impedindo, portanto, o crescimento microbiano.

Campbell (2006) discorre a respeito dos mecanismos de inativação enzimática, e sugere que a inativação de enzimas frente aos íons metálicos pode provocar um rearranjo da estrutura espacial, causando uma mudança de configuração. Em mecanismos enzimaticamente dependentes, que é o caso de bactérias, quando uma enzima sofre desnaturação, o metabolismo é rapidamente interrompido, levando à morte do microrganismo por mecanismo oxidativo ou mesmo por coagulação da proteína central.

Em contrapartida, na avaliação antimicrobiana dos filmes em relação ao inóculo de *Salmonella spp.*, não foram detectados formação de halos de inibição nos tratamentos 1 e 2, correspondentes aos filmes com concentração de 0,1 e 0,5% de aditivo antimicrobiano. A inibição ocorreu apenas no teste contendo disco do filme F3 (1% de aditivo antimicrobiano), resultando em um halo de inibição de 2,6 mm (Tabela 4.5). O resultado do halo de inibição para *Salmonella spp.* pode ser visto na Figura 4.8.

A justificativa mais simples para a inexistência de halos de inibição para *Salmonella spp.* nas menores concentrações (amostras F1 e F2), pode ser dada pela estrutura da parede celular dos microrganismos Gram negativos.

Estes, embora tenham uma espessura de parede mais fina que os microrganismos Gram positivos, possuem uma composição bastante complexa, constituída de uma camada de peptidoglicano, outra de lipoproteína, seguida da membrana celular e de mais uma camada de lipopolissacarídeo. Comparativamente, os microrganismos Gram positivos são bem mais simples: embora possuindo uma camada mais espessa, sua parede celular é constituída quase que exclusivamente de peptidoglicano, permitindo mais facilmente a atuação da prata, assim como o faz com o

corante de violeta de genciana, que o colore facilmente. Isto implicaria em uma maior resistência por parte dos microrganismos Gram negativos ao ataque dos íons prata, exigindo maiores concentrações para poderem atuar sobre o microrganismo, de modo a atingir o citoplasma ou destruir a parede celular (TORTORA, 2005).

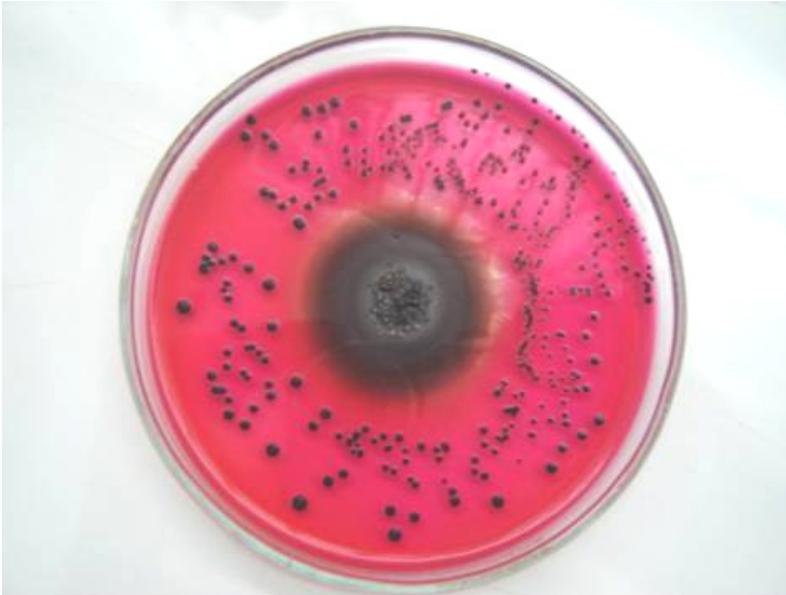


Figura 4.7 - Halo de inibição do filme F3 em relação à *Salmonella spp.*

Outra hipótese que justificaria este comportamento é possível existência da Concentração Inibitória Mínima – MIC (Minimal Inhibitory Concentration), que é a concentração mínima deste antimicrobiano capaz de inibir a *Salmonella*. Segundo CHUAN CHUEN (2003), este valor pode chegar a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para algumas linhagens.

Vários autores avaliaram a eficiência de filmes ativos incorporados com a mesma espécie química obtendo diferentes resultados em diferentes microrganismos. Pranoto, Rakshit e Salokhe (2005) estudaram a atividade antimicrobiana de filmes incorporados com nisina e sorbato de potássio contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus*. Os autores observaram a formação de halo de inibição apenas para *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes*.

Em estudo realizado por Pereira et al. (2006), filmes antimicrobianos

incorporados com natamicina foram avaliados para *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* Houve inativação para todas as espécies testadas, porém, com o aumento da concentração de natamicina houve aumento da eficiência antimicrobiana. Com o aumento da concentração de natamicina, o *Penicillium roqueforti* apresentou maior susceptibilidade.

Limjaroen et al. (2003) desenvolveram filmes à base de cloreto de polivinilideno (PVDC) incorporados de diversos agentes antimicrobianos (lactoferrina, nisina, sorbato de potássio, ácido sórbico, diacetato de sódio) contra *L. monocytogenes*. Na leitura do halo não foi detectado inativação com os filmes que continham lactoferrina e diacetato de sódio. A elevação na concentração de ácido sórbico, de 1,5 para 2%, aumentou o diâmetro do halo de inibição. Os filmes contendo 1, 2 e 3% de sorbato de potássio apresentaram halos de inibição, porém não houve diferença entre as concentrações.

4.3 Avaliação da eficiência antimicrobiana dos filmes em corte de carne bovino

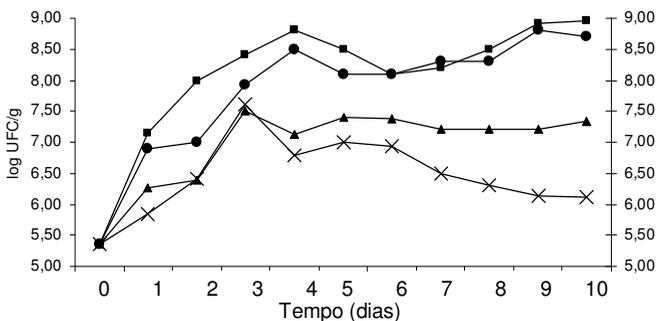
Para a avaliação da eficiência antimicrobiana, amostras de bifes de contrafilé foram acondicionadas assepticamente em sistema a vácuo em saquetas previamente confeccionadas com o filme Controle (FC) e os filmes antimicrobianos de cada tratamento (F1, F2 e F3). Após acondicionadas, as amostras foram mantidas sob refrigeração de 5°C por 10 dias, sendo retirada uma amostra diariamente para determinação da Contagem Bacteriana Total de *Psicrotróficos* (CBT) e *Pseudomonas*. Os experimentos foram repetidos duas vezes, e as análises realizadas em duplicata.

4.3.1 Contagem total bacteriana de psicrotróficos – CBT

A Figura 4.9 apresenta graficamente os valores médios para Contagem Bacteriana Total (CBT) nos intervalos de avaliação (10 dias) para os filmes antimicrobianos (F1, F2 e F3) e controle (FC).

Inicialmente, todas as amostras dos diferentes tratamentos partiram do valor de CBT de $2,3 \times 10^5$ UFC/g (5,36 log UFC/g). Este valor foi oriundo da determinação da CBT da peça de contrafilé utilizada na preparação das amostras do respectivo experimento, podendo também ser admitido como

indicativo de boa qualidade microbiológica inicial da carne. Segundo Venturini (2003), bons cortes de Contrafilé, provenientes de boas condições processuais de abate e manipulação, podem apresentar CBT de microrganismos *Psicrófilos* de 10^4 a 10^5 UFC/g.



Legenda: (■) Filme Controle; (●) Filme 1; (Δ) Filme 2; (x) Filme 3;

Figura 4.8 - Contagem Bacteriana Total de *Psicrófilos* (CBT) para os tratamentos

Para a carne acondicionada no filme controle (FC), sem adição de aditivo antimicrobiano, pode-se ver na Figura 4.9, um aumento da CBT de 5,36 para 7,15 (log UFC/g) já no primeiro dia de acondicionamento, representando a elevação de um ciclo logarítmico da população microbiana *Psicrófila*. A elevação da população microbiana em ordem logarítmica, como mencionado anteriormente, pode indicar a ausência da fase de adaptação dos microrganismos perante as condições avaliadas. Esta hipótese é fortalecida quando avaliado o aumento praticamente constante da CBT até o quinto dia de acondicionamento do mesmo tratamento (FC), gerando, neste período, um aumento de 3 ciclos logarítmicos da população microbiana (8,81 log UFC/g). Do sexto ao décimo dia de acondicionamento, não foram percebidas variações significativas, finalizando a CBT final para este tratamento em 8,95 (log UFC/g).

Resultado similar, embora não esperado, ocorreu para o perfil de crescimento da CBT da carne acondicionada no filme 1 (F1) contendo 0,1% (m/m) do agente antimicrobiano. Para este tratamento, o valor de CBT no quinto dia de avaliação foi de 8,5 (log UFC/g), que não mostra diferença significativa, em ordem logarítmica, do resultado obtido para o mesmo

tempo de avaliação da carne em filme controle (FC). O mesmo ocorreu com a diferença gerada da CBT dos tratamentos FC e F1 no décimo dia de acondicionamento (0,25 log UFC/g). Para tanto, pode-se dizer que o tratamento F1 não apresentou eficiência na redução microbiana.

Um dos motivos que pode explicar a ineficiência antimicrobiana é a existência de diferentes tipos de microrganismos com diferentes resistências ao antimicrobiano à base de prata, como o observado para o *S. aureus* e *Salmonella*. Outra hipótese é o fato do filme F1 ter apresentado, apesar de não significativo, uma permeabilidade de 8.808 mL(CNTP)/(m².dia), 0,071mL de oxigênio maior que aquele apresentado pelo filme controle FC (TPO₂ de 8,737 mL(CNTP)/(m².dia)).

Suppakul *et al.*, (2003) mostraram que a presença de 25 μmol de O₂ promoveu um aumento de 1 ciclo logarítmico de microrganismos *mesofílicos* e diminuição de 3 dias da vida útil, que é de 7 dias para o produto acondicionado em sistema de vácuo parcial. Em amostras de vácuo total, com resíduo de 11 μmol de O₂, a vida útil do produto foi de 14 dias.

Viana, Gomide e Vanetti (2005) observaram que o aumento de 0,17 mL/m²/24h a 25 °C e 1 atm favoreceu de forma significativa (p>0,05) o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos (VENTURINI, 2007).

A carne acondicionada no filme F2, contendo 0,5% m/m do aditivo antimicrobiano, atingiu a CBT máxima de 7,6 (log UFC/g) no terceiro dia de avaliação, representando um aumento de 2 ciclos logarítmicos em relação à população inicial do mesmo tratamento. A população microbiana inicial de CBT, apresentou o mesmo valor inicial que a amostra anterior, ou seja, de 5,36 (log UFC/g). Pode-se ver pela Figura 4.9 que, além do menor valor da CBT, houve uma diminuição de um dia na fase de crescimento exponencial quando comparado com os tratamentos FC e F1.

Igualmente ao ocorrido para o perfil dos tratamentos FC e F1, a população microbiana de F2 manteve-se sem variações logarítmicas até o último dia de armazenagem, apresentando CBT no décimo dia de avaliação de 7,34 (log UFC/g) contra 8,81 (log UFC/g) para o tratamento FC no mesmo período. Em termos de eficiência de redução microbiológica para *Psicrotróficos*, o tratamento F2 apresentou uma redução de um ciclo logarítmico em relação ao controle nas mesmas condições.

Conforme esperado, o melhor desempenho na redução microbiana de CBT ocorreu no tratamento F3, filme contendo a maior concentração do agente antimicrobiano (1% m/m). Este resultado comparativo é mostrado na Figura 4.10.

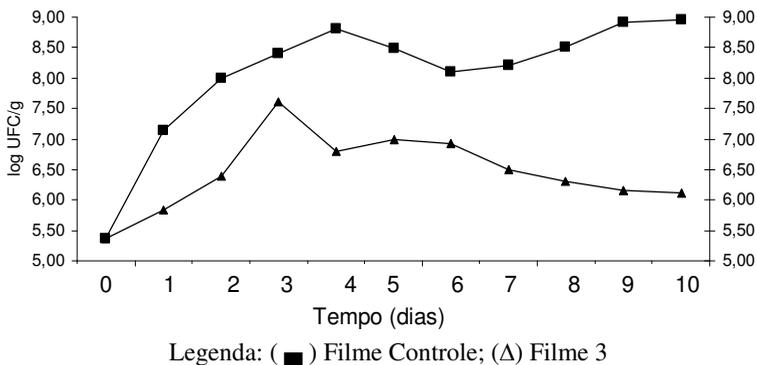


Figura 4.9 - Contagem Bacteriana Total de *Psicotróficos* (CBT) para os tratamentos FC e F3

A CBT máxima para o tratamento F3 ocorreu no terceiro dia de avaliação, resultando em 7,6 (log UFC/g). Na Figura 4.10), vê-se que, além de um menor número de microrganismos, o perfil de crescimento do quarto ao décimo dia de avaliação difere dos demais. Observa-se que há uma redução microbiana maior que um ciclo logarítmico, ou seja, de 1,49 (log UFC/g) durante o armazenamento do 4º ao 10º dia, neste tratamento. Este foi, portanto, o tratamento mais eficiente, resultando na redução de 2 ciclos logarítmicos na população de CBT nas condições avaliadas.

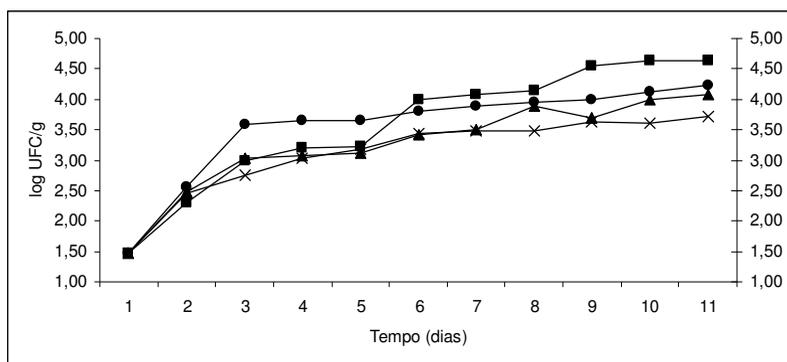
Um dos fatores limitantes da vida-de-prateleira de carnes acondicionadas a vácuo é o crescimento de microrganismos *Psicotróficos*, pois é nesta classe que estão contidas as bactérias lácticas, responsáveis pela conversão da glicose residual da carne em ácido láctico (FRANCO, 2005). A evolução da formação de ácido láctico, que ocorre de forma correlacionada ao crescimento de microrganismos *Psicotróficos*, provoca efeitos indesejáveis na qualidade do produto. Dentre estes efeitos é importante destacar: a intensificação do sabor ácido, despigmentação decorrente do abaixamento excessivo do pH, e degradação de proteínas, ocasionando odores não característicos da carne e sentidos pelo nitrogênio amoniacal liberados.

Perante a norma RDC-12 da ANVISA (1994), todas as amostras avaliadas neste trabalho encontram-se em conformidade com os padrões estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que estabelece o valor máximo de CBT de 10^9 UFC/g. Valores acima dos estabelecidos

pela legislação não foram encontrados em nenhuma das amostras avaliadas.

4.3.2 Contagem de *Pseudomonas*

Os resultados médios para a contagem de *Pseudomonas* em 10 dias de armazenamento para os filmes antimicrobianos (F1, F2 e F3) e controle (FC) podem ser visualizados na Figura 4.10. Para todos os tratamentos, supôs-se um valor igual a 3×10^1 UFC/g (1,48 log UFC/g) como população inicial, valor este obtido a partir da determinação de *Pseudomonas* da peça de contrafilé utilizada na preparação das amostras.



Legenda: (■) Filme Controle; (●) Filme 1; (▲) Filme 2; (x) Filme 3; —

Figura 4.10 - Contagem de *Pseudomonas* para os tratamentos antimicrobianos F1, F2, F3, e controle, FC

Para a carne acondicionada no filme controle, pode-se ver uma elevação exponencial na população de *Pseudomonas*, de 1,48 para 2,9 (log UFC/g) nos primeiros dias de acondicionamento. Assim como observado para a CBT, há ausência da fase lag, responsável pela adaptação dos microrganismos ao meio. O crescimento microbiano para este tratamento permaneceu praticamente constante até o quarto dia de avaliação, onde atingiu o valor de 3,2 (log UFC/g), e no final do tempo de armazenamento, isto é, após 10 dias, a população de *Pseudomonas* foi de 4,64 (log UFC/g). Houve portanto um aumento total entre a população inicial e final de *Pseudomonas* na carne embalada com o filme controle de 3 ciclos logarítmicos.

O mesmo aumento de 3 ciclos logarítmicos também foi observado

para os tratamentos F1 e F2 que, ao final do tempo de armazenamento (10 dias) apresentaram valores de 4,23 log UFC/g ($1,2 \times 10^4$) e 4,08 log UFC/g ($1,7 \times 10^4$), respectivamente.

No tratamento F3, o crescimento microbiano de *Pseudomonas* foi similar ao obtido com o controle até o quarto dia de avaliação (3,18 (log UFC/g) em F3 contra 3,23 (log UFC/g) em FC. O histórico de crescimento microbiano de F3 porém diferencia-se dos demais tratamentos pois manteve-se em menor velocidade de crescimento até o último dia de estocagem, atingindo a população final de 3,71 (log UFC/g). Em relação ao filme controle, observou-se uma redução de 1 ciclo logarítmico da população de *Pseudomonas* nas condições avaliadas. Em termos de desempenho antimicrobiano, o tratamento F3, o filme com maior concentração de aditivo antimicrobiano (1% m/m), foi o único a apresentar efeito na redução do crescimento de microrganismos do gênero *Pseudomonas*.

Apesar de ocorrerem algumas deteriorações da carne na ausência de microrganismos, tais como quebras enzimáticas de tecidos, reações de oxidação e hidrólise de gorduras, o crescimento microbiano é o fator mais importante relacionado à manutenção da qualidade da carne fresca (LAMBERT et al; 1991). Dentre os microrganismos deteriorantes que podem crescer na carne resfriada, e particularmente naquela acondicionada a vácuo, sem dúvida o crescimento do gênero *Pseudomonas* é o de maior importância. Embora a legislação brasileira não se manifeste em relação aos valores máximos deste microrganismo em alimentos, segundo o que foi publicado por Franco (1996), valores de 10^4 UFC/g de células do gênero *Pseudomonas* foram suficientes para provocar a exudação excessiva em carne resfriada com conseqüente formação de limosidade.

A valores de 10^6 UFC/g pode ser iniciado o processo de “esverdeamento”. Entretanto, dependendo das condições de armazenamento, há casos em que são necessários 10^7 ou até mesmo 10^8 UFC/g do alimento para ocorrer o início de reações indesejáveis (JAY, 1992).

4.4 Avaliação da cor da carne acondicionada em filmes antimicrobianos

A cor da carne bovina mais aceitável pelos consumidores é o vermelho cereja brilhante. Esta cor, porém, possui vida útil muito curta no

acondicionamento em sistemas a vácuo. A diminuição da coloração vermelho cereja ocorre devido às baixas concentrações de oxigênio nos sistemas a vácuo, convertendo a oximioglobina, pigmento vermelho cereja, em metamioglobina, pigmento de coloração vermelho marrom (LUCHIARI, 2000).

A Figura 4.11 mostra os três estados de coloração da carne bovina, sendo: mioglobina a cor da carne logo após a sangria; oximioglobina a cor vermelho cereja, e metamioglobina a cor vermelho amarronzada, ou acinzentada, que ocorre na ausência de oxigênio como nos sistemas a vácuo. A amostra inicial da carne (Figura 4.11.a) destinada ao acondicionamento foi exposta por 30 minutos ao oxigênio atmosférico para completa saturação do nível de pigmento oximioglobina (Figura 4.11.b). A Figura 4.11.c mostra a mesma carne após embalagem a vácuo.

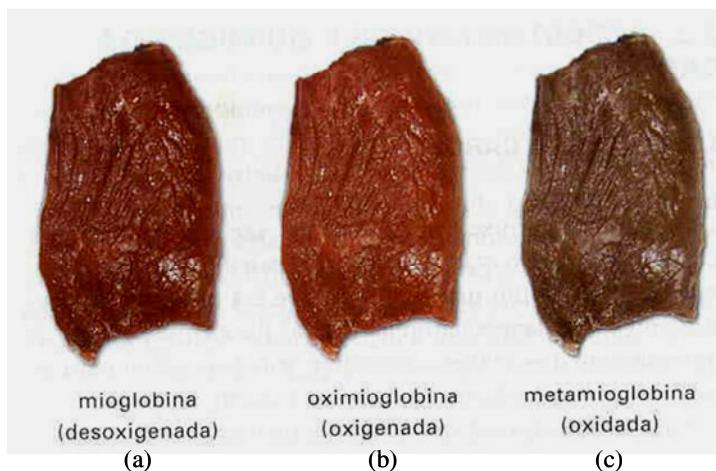


Figura 4.11 - Coloração dos três estados de oxidação do pigmento da carne bovina.

4.4.1 Avaliação da cor da carne embalada com uso de colorímetro

O estudo da variação da cor da carne embalada em filmes antimicrobianos por meio de colorímetro foi feito abrangendo em um período de armazenamento de 10 dias, sendo a carne saturada de oxigênio (Figura 4.11.b) considerada como padrão. A medida da cor no sistema CIELab forneceu os valores de $L^*=34,26 \pm 0,5$, $a^*=19,70 \pm 0,6$ e $b^*= 4,46$

$\pm 0,1$. Estes resultados foram muito próximos aos obtidos por VENTURINI (2003) quando estudou a coloração inicial de contrafilé nas mesmas condições. Seus valores foram de 34,91 para L^* , a^* de 18,87 e 1,47 para b^* .

A Tabela 4.6 mostra os valores obtidos para as coordenadas L^* , a^* e b^* das amostras acondicionadas nos filmes controle e antimicrobianos (F1, F2, F3 e FC) durante os 10 dias de acondicionamento. A diferença do índice de cor (ΔE^*), calculada a partir do tempo zero e igual à carne da cor padrão, foi calculada para cada intervalo de tempo. A última coluna ilustra a cor encontrada para as carnes, transformada para o sistema RGB (Bruce Lindbloom, 2009), como indicado em Material e Métodos, de forma a permitir a visualização da cor fornecida pelos parâmetros medidos pelo colorímetro. Observa-se, para o filme controle, FC, que há variação na luminosidade L^* , a qual diminui de cerca de 34 a 31, enquanto a^* , o parâmetro que reflete a componente verde-vermelho, aumenta de quase 20 a 22; b^* permanece praticamente constante. Isto reflete uma variação de cor muito pequena, abaixo de 5, e que segundo FRANCIS (1983), praticamente não é detectada pelo olho humano. O mesmo pode ser observado para a carne embalada em F1. Para os filmes F2 e F3, aqueles com maior quantidade de antimicrobiano (0,5 e 1,0%), a variação de cor é ainda menor. Os valores de ΔE^* encontrados foram menores que 1.

Nesta tabela, segundo a cor traduzida para o sistema RGB, a carne apresenta uma cor arroxeadada e praticamente igual, nos 10 dias de armazenamento, independente do filme no qual tenha sido embalada. Além disso, esta cor não corresponde ao observado visualmente, mostrando que para este caso o colorímetro não foi capaz de traduzir corretamente a cor do alimento observado após 3 e 10 dias de armazenamento, como mostram as Figuras 4.12 e 4.15.

Tabela 4.6 - Parâmetros de cor para as amostras de carne acondicionadas nos filmes adicionados de antimicrobiano.

	t (dias)	L*	a*	b*	□E	Cor
FC	0	34,26	19,70	4,46		
	1	34,07	19,84	4,26	0,31	
	2	34,09	19,77	4,57	0,21	
	3	31,35	22,85	4,44	4,29	
	4	31,09	22,58	4,75	4,29	
	5	31,51	21,91	4,96	3,56	
	6	31,96	21,83	4,30	3,14	
	7	31,83	22,23	4,08	3,53	
	8	31,92	22,10	4,56	3,35	
	9	31,85	22,19	4,32	3,47	
10	31,67	22,00	4,48	3,46		
F1	0	34,26	19,7	4,46		
	1	34,77	18,35	4,36	1,4466	
	2	33,39	18,64	4,36	1,375	
	3	31,62	22,45	4,27	3,8168	
	4	31,74	22,95	4,75	4,1227	
	5	31,06	22,9	4,41	4,5258	
	6	31,6	23,26	4,36	4,4451	
	7	31,62	22,27	4,76	3,6966	
	8	31,59	22,8	4,72	4,0996	
	9	31,3	22,06	4,5	3,7859	
10	31,32	23,91	4,64	5,1381		
F2	0	34,26	19,7	4,46		
	1	34,31	19,77	4,23	0,2456	
	2	34,22	19,16	4,82	0,6502	
	3	34,63	19,58	4,74	0,4793	
	4	33,93	19,72	4,3	0,3673	
	5	34,06	18,86	4,54	0,8672	
	6	34,89	19,77	4,44	0,6342	
	7	33,96	18,82	4,43	0,9302	
	8	34,2	19,42	4,32	0,3187	
	9	34,3	19,59	4,28	0,2147	
10	34,18	19,97	4,22	0,37		

Continua...

	t (dias)	L*	a*	b*	□E	Cor
Continuação						
F3	0	34,26	19,7	4,46		
	1	34,24	19,52	4,38	0,198	
	2	34,38	19,47	4,84	0,4601	
	3	33,43	19,83	4,77	0,8955	
	4	34,26	19,84	4,54	0,1612	
	5	34,01	19,65	4,53	0,2644	
	6	34,04	18,85	4,56	0,8837	
	7	34,03	18,86	4,5	0,8718	
	8	34,16	19,62	4,13	0,354	
	9	34,43	19,3	4,32	0,4566	
	10	34,17	19,82	4,58	0,1921	

Valores médios referentes a 3 determinações por amostra.

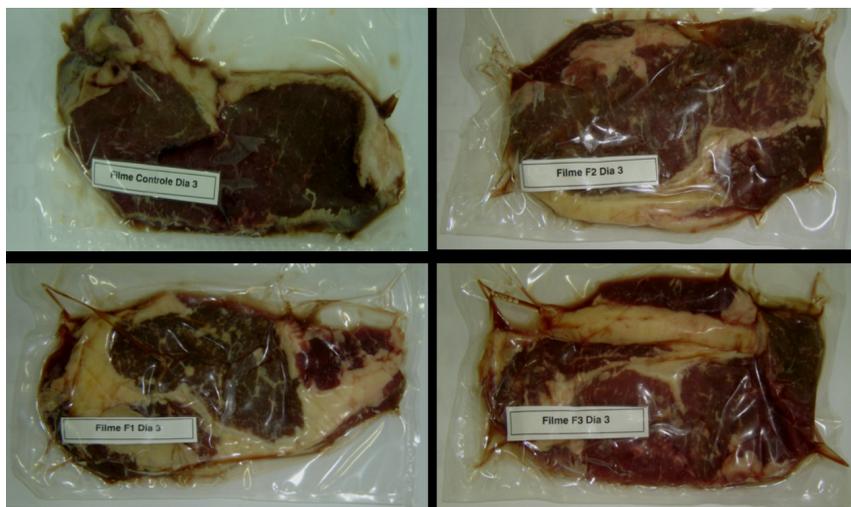


Figura 4.12 - Comparação da cor das amostras de carne nos tratamentos FC, F1, F2 e F3 após 3 dias de armazenamento.

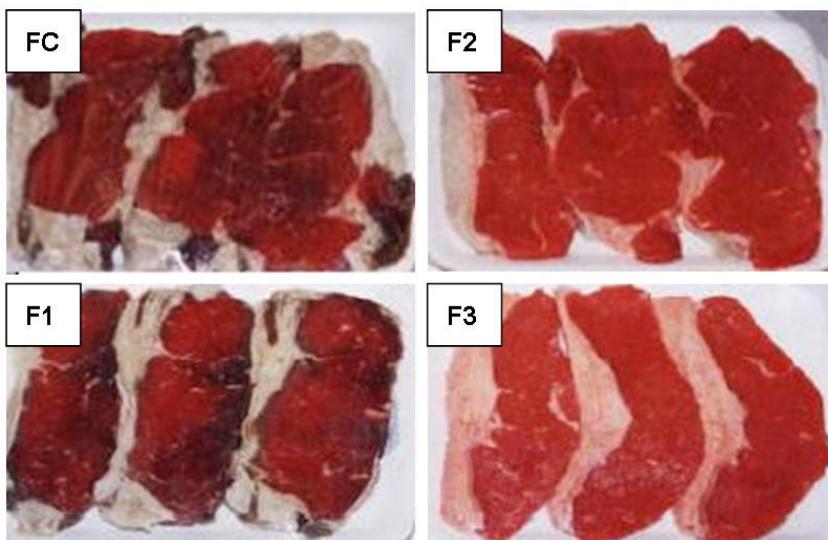


Figura 4.13 - Comparação da cor da carne após 10 dias de armazenamento.

4.4.2 Avaliação da cor da carne por método fotográfico digital

Sob o ponto de vista comercial, sistemas a vácuo, embora vastamente aplicados por questões de segurança alimentar, apresentam tradicionalmente um efeito negativo sobre a cor devido à baixa disponibilidade de oxigênio, levando a carne a uma cor escura. Isto, no entanto, não pôde ser em evidência na metodologia de avaliação utilizada anteriormente.

No estudo da avaliação da cor utilizando a metodologia fotográfica digital, foram testadas amostras de carne acondicionada em cada sistema a partir das Figuras 4.14 e 4.13, como descrito na seção Material e Métodos. Os resultados obtidos para cada avaliação da leitura podem ser vistos na Tabela 4.7.

As amostras padrão das carnes mostraram valores dos parâmetros de cor, obtidos pelo método digital, bastante diferentes daqueles provenientes do ensaio com colorímetro. Neste método os valores encontrados foram de $L^*=25,3\pm 16,3$, $a^*=32,4\pm 2,49$ e $b^*=30,2\pm 3,39$, enquanto que para aquele método foi de $L^*=34,26 \pm 0,5$, $a^*=19,70 \pm 0,6$ e $b^*= 4,46 \pm 0,1$. Embora este não seja um método padrão de descrição da cor, e não tenham sido encontradas comparações na literatura, ele se mostra mais adequado para

representar os resultados observados no presente trabalho.

Tabela 4.7 - Parâmetros de cor para carne acondicionada nos filmes antimicrobianos e controle.

Tipo embalagem/ Estado de oxidação	L*	a*	b*	Cor	ΔE*
MO*	29,2±1,3	28,1±0,4	21,8±0,1		12,2
OX*	34,7±3,9	33,6±2,4	31,2±3,5		A**
MT*	35,4±1,7	13,9±0,7	17,6±0,4		24,0
FC	26,6±5,3	31,4±0,2	17,8±0,5		B***
F1	32,0±1,9	37,0±1,1	20,2±0,5		15,22
F2	37,6±0,4	46,6±0,1	30,9±0,5		21,17
F3	42,2±3,8	47,0±1,2	28,3±1,5		22,77

ΔE*=diferença de cor em relação ao controle. *MO metamioglobina, OX oximioglobina, MT metamioglobina. **Padrão utilizado para cálculo da diferença de cor com a mioglobina e metamioglobina. ***Padrão utilizado para cálculo da diferença de cor nos filmes F1, F2 e F3.

Comparativamente ao padrão da oximioglobina, a mioglobina possui componentes vermelho e amarelo menos intensos, seguida da metamioglobina, o que resulta em diferenças de cor cerca de 12 e 24 para cada um destes pigmentos, respectivamente.

As carnes embaladas mostram padrões de cor diferentes entre si. A amostra em FC desenvolveu uma cor similar à da mioglobina, como esperado. A diferença de cor entre estas duas amostras foi de 5,8, uma diferença praticamente não perceptível. Por outro lado, difere da oximioglobina de 15,8 unidades, mostrando a ausência da mioglobina oxidada.

À medida que a concentração de prata aumenta no filme, as amostras embaladas apresentam cores cada vez mais claras com tendência ao vermelho. Observa-se um aumento crescente nos parâmetros a* e b*, correspondentes às componentes vermelho e amarelo, assim como na

luminosidade L*. Esta última é a principal responsável pelo padrão de cor claro.

Esta modificação da cor pode ser explicada pela ação da prata sobre a mioglobina, pois esta é um agente oxidante, levando o pigmento ao estado oxidado. Vê-se claramente que a mudança de cor da carne é diretamente proporcional ao aumento da concentração de prata no filme. Em todos os casos, as diferenças de cor em relação ao filme controle foram bem maiores do que 5, sendo esta uma diferença facilmente perceptível. Por outro lado, se diferenciam bastante do padrão Oximioglobina: 11,8, 13,2 e 15,6, são as diferenças de cor para este padrão. Isto provavelmente deve a uma excessiva oxidação da mioglobina quando em contato com a prata. O padrão possui menor quantidade de mioglobina oxidada devido ao pouco tempo (apenas 30 minutos) em contato com o oxigênio.

Um dos motivos que pode ter influenciado na cor da carne acondicionada nos filmes antimicrobianos F2 e F3 é a migração de prata para a carne. A prata é um agente oxidante de média reatividade, podendo variar seu estado de oxidação de Ag^0 (estado fundamental) ao estado oxidado Ag^{1+} (RUSSEL, 1994). No agente antimicrobiano incorporado ao filme, a prata encontra-se na forma de sal de prata, juntamente a um íon zircônio. Durante a estocagem, a prata migrou solubilizando-se na água de superfície da carne. Uma vez solubilizada em água, ocorre o fenômeno de dissociação, liberando o íon Ag^{1+} , sendo este instável. Para adquirir estabilidade, a prata necessita ser reduzida a seu estado fundamental (Ag^0), oxidando os compostos do meio, que no caso da carne é a mioglobina. Uma vez oxidada, a mioglobina mantém a coloração vermelho cereja, que é extremamente desejável sob o ponto de vista sensorial.

4.5 Avaliação do teor de prata na carne embalada com filme antimicrobiano

Para as amostras de carne acondicionadas com F1, não foram detectadas concentrações de prata residual dentro da margem de segurança analítica do método ($<0,001 \text{ mg de Ag.kg}^{-1}$). Portanto, pode-se considerar que a prata, na concentração usada neste filme (0,1% m/m), se manteve aderida ao filme de polietileno nas condições avaliadas. Esta afirmação é reforçada pelos resultados obtidos na avaliação de cor e potencial antimicrobiano deste tratamento, onde em ambos os experimentos não foi observada diferença significativa em relação ao tratamento controle.

Entretanto, as amostras acondicionadas nos tratamentos F2 e F3 mostraram presença de prata na carne, com valores médios de $0,0142 \pm 0,0013$ e $0,0375 \pm 0,0028$ após 10 dias de acondicionamento na embalagem antimicrobiana. Para ambos os tratamentos, a prata migrada foi detectada desde o primeiro dia de avaliação (Figura 4.14).

Em geral, metais pesados, incluindo a prata, por não serem biodegradáveis, podem bioacumular nos tecidos vivos, podendo, em função da concentração e tempo de exposição, ocasionar anomalias em tecidos vivos de seres humanos. Um dos problemas mais freqüentes causados por metais em tecidos humanos é a substituição de metais co-fatores enzimáticos essenciais por metais pesados oriundos de contaminantes (MINDELL e MUNDIS, 1996). A substituição pode provocar a inativação do sistema celular contaminado, desta forma, a célula perde sua atividade de equilíbrio, e em muitos casos aparecem indícios carcinogênicos (FAO/WHO, 1997).

Segundo a norma n°, de 14 de Agosto de 2008, ANVISA publicada no diário Oficial da União (DOU), a prata está presente na lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos, bem como os limites máximos para cada finalidade. Para aditivos antimicrobianos à base de prata, a legislação permite até o limite de 1% (m/m) de aditivo à resina polimérica, enfatizando que a migração máxima, expressa em Ag, não exceda 0,05mg/kg da amostra.

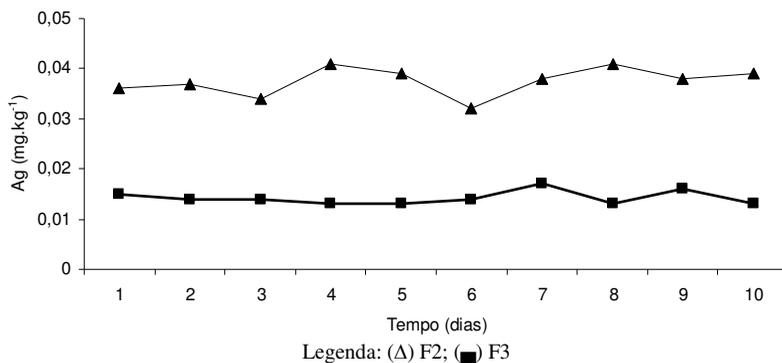


Figura 4.14 - Teor de prata (mg.Kg^{-1}) das amostras acondicionadas nos tratamentos F2 e F3

Deste modo, o bom desempenho na manutenção da cor vermelha da carne dos filmes F2 e F3, assim como a eficiência de redução da carga microbiana de microrganismos *Psicrotróficos* e do gênero *Pseudomonas*, ao longo da vida-de-prateleira, podem ser considerados como positivos e adequados à aplicação na indústria de carnes. Esta afirmação apenas é possível, porque a quantidade de prata migrada ao se situa a níveis de aceitação toxicológica abaixo do estabelecido pela legislação vigente.

Deve-se salientar que até 2008, o Brasil não possuía parâmetros de contaminação por este componente. Até o momento, ainda se tem poucos trabalhos publicados com foco na avaliação do potencial de contaminação do alimento por aditivos antimicrobianos.

5 CONCLUSÕES

A matriz polimérica de polietileno de baixa densidade (PEBD) suportou a incorporação dos percentuais de aditivo antimicrobiano à base de prata testados neste trabalho, que foram 0,1, 0,5 e 1% (m/m), tendo em vista que as propriedades mecânicas de tração e resistência à perfuração, bem como a propriedade de barreira ao oxigênio dos filmes antimicrobianos, não mostraram diferenças significativas quando comparadas àquelas medidas para o filme sem adição do aditivo antimicrobiano. Isto foi reforçado pelas micrografias dos diferentes filmes que mostraram Tipografias homogêneas em relação à distribuição das partículas do aditivo nos filmes.

O estudo *invitro* mostrou aumento no efeito inibitório dos filmes antimicrobianos com o aumento da concentração de aditivo incorporado ao filme, em relação ao *Staphylococcus aureus spp* quando diminuído por 10 vezes. Para *Salmonella spp*, apenas o filme de maior concentração mostrou-se eficiente; esta eficiência foi menor para este microrganismo que para *S. aureus*.

Os filmes antimicrobianos incorporados com sais de prata, nas concentrações de 0,5 a 1,0% do aditivo aqui apresentados, mostraram grande potencial como embalagem ativa antimicrobiana para acondicionamento de carne in-natura, reduzindo possíveis contaminações microbiológicas. Na avaliação do potencial antimicrobiano, o filme de maior concentração foi também aquele que mostrou melhor desempenho, apresentado ao final do tempo de avaliação redução de 2 ciclos logarítmicos para de Contagem Bacteriana Total, e 1 ciclo logarítmico para *Pseudomonas*.

Além disso, estes mesmos filmes promoveram o desenvolvimento de cor vermelho cereja nas amostras de carne acondicionadas naquelas embalagens. Este ponto é de extrema importância sob o ponto de vista de aplicação comercial destas embalagens, pois, a maior rejeição por parte dos consumidores de carne a vácuo se deve a coloração vermelho escuro dada pela metamioglobina, que decorre da baixa disponibilidade de oxigênio. Embora os estudos indiquem uma ação oxidante da prata, estudos ainda devem ser feitos no sentido de aprimoramento do efeito da prata sobre a mioglobina em carnes.

Ainda em relação à cor, a metodologia digital de medida dos parâmetros mostrou ser uma alternativa viável e confiável, pois apresentou uma resposta semelhante à observação visual do produto embalado

comparativamente aos parâmetros medidos por colorímetro, metodologia vastamente utilizada para este fim.

A pouca aplicabilidade de filmes antimicrobianos à base de prata em alimentos, por muitos anos ficou atrelada a falta de legislação para incorporação destes aditivos. Sua regulamentação em 2008 pela ANVISA a níveis máximo permitidos de 0,05 mg de prata por kg de alimento permitiu mostrar que as embalagens aqui apresentadas deixam um teor de prata máximo no alimento de 0,0375 mg de Ag.kg⁻¹. Foi observado que este teor não aumenta ao longo do tempo, sendo a prata dissolvida na carne assim que é posta em contato com a embalagem.

Com base nos pontos avaliados, e considerando a necessidade de novas metodologias de conservação e aumento de vida-de-prateleira de alimentos, filmes de PEBD adicionados de antimicrobiano à base de prata apresentam-se como uma tecnologia promissora, principalmente no que diz respeito aos fatores ligados à segurança alimentar. No entanto, não substituirão a boa qualidade inicial da matéria-prima e as boas práticas de fabricação e manipulação a serem empregadas no processamento de alimentos.

REFERÊNCIAS

- AHVENAIMEN, R., HURME, E., SMOLANDER, M. *Active and smart packaging for food products*. *Technisch-Wissenschaftliche Beilage*, 49, n 7, 36-40,1998.
- ALTEKRUSE, F.S.; STERN, N.J.; FIEDLDS, P.I.; SWERDLOW. *Campylobacter jejuni – An emerging food borne pathogen – Emerging infectious diseases*. V.5, n.1, January – march, 1999.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science e Emerging Technologies*, v.3, p.113-126, 2002.
- AHVENAINEN, R., *Active and Intelligent Packaging*. In: *Novel Food Packaging Techniques, Food science and technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Ahvenainen, R. (Ed), 2003.
- AMERICAN Society for testing and materials. Philadelphia. *Standard test methods for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor* ASTM D 3985-81
- AMERICAN Society for testing and materials. Philadelphia. *Standard test methods for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a sensor* ASTM F1927-98. 2001.
- AMERICAN Society for testing and materials. Philadelphia. *Standard test methods for tensile properties of thin plastics sheeting*. ASTM D 882 – 01 (1996)
- AMERICAN Society for testing and materials. **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting D 882-02**. Copyright ASTM International, West Conshohocken, United States. 1992.
- AMERICAN Society for testing and materials. Philadelphia. *Standard test methods for thickness of solid*. ASTM F 2251-03. 2001. 4p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 352, de 23 de dezembro de 2002. **Regulamento técnico de boas práticas de fabricação para**

estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos de origem animal. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 08 jan. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinadas à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos**, publicada no diário Oficial da União (DOU) em 14 de Agosto de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos de origem animal**, publicada no diário Oficial da União (DOU) em 12 de Agosto de 1994.

BUONOCORE, A.G.G.; CONTE, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; DEL NOBILE, M. A. Mono- and multilayer active films containing lysozyme as antimicrobial agent. In: Innovative Food Science and Emerging Technologies. V. 6, p. 459 – 464. 2005.

BRODY , A. L.; STRUPINSK, E. R.; KLINE, L. R. *Active packaging for food applications*. Lancaster: Technomic, 2001. 218p.

BUTLER, B.L. Cryovac® OS2000™ **Polymeric Oxygen Scavenging Systems**. Apresentado na Worldpak, 2002. Disponível na internet: <<http://www.sealedair.com/library/articles/article-os2008.html>>. Acesso em 11/10/2008.

BROWN, W. F. *Plastics in Food Packaging*. New York, Editora. Marcel Dekker, 1992. 540p.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, L.M. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71:1-20, 2001.

CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. Porto Alegre : Artmed, 2002.

COMPENDIUM OF METHODS FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATIONS OF FOODS. Fourth Edition. Washington, DC, By the American Public Health Association (APHA), p.659, 2001.

COOKSEY, K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food additives & contaminants: part A, Volume 22*, Capítulo 10 Outubro de 2005 , p. 980 – 987

CHUANHUEN, R. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. **American Journal of Infection Control**. 31, 124-127, 2003.

CHUNG, D.: CHIKINDAS, M. L.:YAM, K, L. *Inhibition of saccharomices cerevisiae by slow release of propyl paraben from a polymer coating*. Journal of Food Protection, v. 64, n.9, p.1424, 2000.
FRANCO. Bemadete D.G. de M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FERNANDES, T. D. B. **Desenvolvimento e caracterização de filme polimérico ativo para embalagens de frutas e hortaliças**. Campinas, SP: 2001. Dissertação de Mestrado Engenharia Química- Unicamp.
FRANCIS, F. J. **Colorimetry of foods**. In: PELEG, M., BAGLEY, E. B. Physical properties of food. Westport: AVI Publishing. 105-124, 1983.

FABECH, B.; HELLSTROM, T.; HENRYSDOTTER, G.; NILSSON, J.; RÜDINGER, L.; SOLLI, E.; SVENSSON, K.; THORKELSSON, A.; TUOMAALA, V. **Active and Intelligent Food Packaging – A Nordic report in the legislative aspects**. 2005.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging. *Food additives and contaminants*. v.14, n.6-7. p.741 – 751, 1997.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. *Food technology*, v. 54, n.3, p.56-65, 2000.

HAN, J. H.; FLOROS, J. D. Casting antimicrobial packaging film and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of plastic film and sheeting*, v. 13, p 13, p. 287 – 298, 1997.

HONG, S., PARK, J., AND HIM, D. Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. *Food science and biotechnology* 9, 38-42. (2000).

HATCHKISS, J. H. Safety considerations in active packaging. In: **Active food packaging**. ROONEY, M. L. (ed.). London, Blakie Academic and Professional. P.238-255, 1995.

JUNG, D.; BODYFELT, F. w.; DAESCHEL.; M. A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **Journal of dairy science**. V.75, n.2, p. 387 – 393, 1992.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 4^a Ed. Chapman & Hall, New York, 1992.

HAN, J.H. Antimicrobial Food Packaging. In_ AHVENAINEN, RAIJA. **Novel food packaging techniques**. CRC Press – Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. 2003.

JONG, A. R.; BOUMANS, H.; SLAGHEK, T.; VEEN, J.; RIJK, R.; ZANDVOORT, M.N. Active and intelligent packaging for food: Is it the future? **Food Additives and Contaminants**, 22(10)975-979, 2005.

KAMPMANN, Y.; CLERCK, E.; KOHN, S.; PATCHALA, D. K.; LANGEROCK, R.; KREYENSCHMIDT J. **Study on the antimicrobial effect of silver-containing inner liners in refrigerators**. **Journal of Applied Microbiology**, V,9. 2007.

LAWRIE, R. A. Meat science (3.ed). Oxford: Pergamon press, 1979, 451 p.

LIMJAROEN, P.; RYSER, E.; LOCKHART, H.; HARTE, B. Development of a Packaging Coating Material with Antimicrobial Properties. **Journal of Plastic Film and Sheeting**. vol 19, n° 2, p. 95-109, 2003.

KAMPMANN, Y.; CLERCK, E.; KOHN, S.; PATCHALA, D. K.; LANGEROCK, R.; KREYENSCHMIDT J. **Study on the antimicrobial effect of silver-containing inner liners in refrigerators**. **Journal of Applied Microbiology**, V,9. 2008.

LEE, D. S.; IIWANG, Y. I.; CHO, S. Developing antimicrobial packaging film for curled lettuce and soy-bean sprouts. **Food Science Biotechnology** 7(2):117-21, 1998.

LINDBLOOM, B. J.. **CIE Color Calculator**. Disponível em <<http://www.brucelindbloom.com>>.

LIM, L. T.; MINEY, Y.; TUNG, A. Transglutaminase cross-linked egg white proteins films: tensile properties and oxygen permeability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.10, p. 4022-4029, 1998.

MEAD, OS.; SLUSTKR, L.; DIETZ, V., McCAIG, L.; BRESEE.; J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN P.M.; TAIXE.; R. V. **Food related illness and death in the United States**. V.5, n.5, 1991.

MISTRY, Yogesh. Development of LDPE-based Antimicrobial Films for Food Packaging. A thesis submitted in fulfilment of the requirements for the Award of Masters Degree. Faculty of Health, Engineering and Science Victoria University-Australia. 2006.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição do *Staphylococcus sp.***, Viçosa-MG: UFV, 2003. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

MAURIELLO G.; DE LUCA E.; LA STORIA A.; VILLANI F.; ERCOLINI D.; Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. **Letters in applied microbiology**, (2005), vol. 41, n^o6, pp. 464-469

MARKARIAN, J. Packaging gets active additives lead the way. In *Plastics, Additives and Compounding*. 6(2):22-25. 2004.

MLLIKEM CHEMICAL. Manual of information Antimicrobial AlphaSan[®]. Internet. www.alphasan.com. Milliken & Company 2008. Mindell, e.; mundis, h. **Vitaminas: guia de propriedades e aplicações**. 1996.

OLIVEIRA, L. M. Embalagens ativas e inteligentes para produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, n.329, 2004.

OLIVEIRA, L.M.; OLIVEIRA, P.L.V. Revisão: Principais Agentes Antimicrobianos Utilizados em Embalagens Plásticas. *Brazilian Journal of Food Technology*. V.7(2):161-165. 2004.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Active Food Packaging Technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:185-193, 2004.

POUZADA, A S.; CASTRO A G, Embalagens para a indústria alimentar. **Instituto Piaget, Ciência e Técnica, 2003. 610p.**

PIRES, A C. S.; SOARES, N., F. F., ANDRADE, N. SILVA, L. CAMILLOTO, G., BERNARDES, P. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. ***Packaging technology and science*** vol. 21, Pages 375 – 383 Published Online: 28 Apr 2008.

PELCZAR JR. Joseph Michael; CHAN, E.C.S.; KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1997. 2v.

PEREIRA, R. M.; BOTREL, D. A.; FRAGA, K. de F.; SOARES, N. F. F.; FONTES, E. A. F. . Avaliação da qualidade de queijo tipo Gorgonzola envolvido com filme antimicrobiano laminado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 61, n. 351, p. 144-147, 2006.

PAIK, J.S.; DHANASEKHARAN, M.; KELLY, M.J. Antimicrobial Acivity of UV Irradiated Nylon Film for Packaging Applications. **Packaging Technology and Science**, 11, 179 – 187. 1998.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K. ; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporation garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie**, v. 38, p. 859-865, 2005.

QUINTAVALLA, S., VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat science**, 62, 2002. 373-380, 2002.

ROONEY, M. L. **Overview of active food packaging**. In: Active food packaging. London, Blakie Academic and Professional, p.1-37, 1995.
RUSSEL, J. B.; **Química Geral**. 2ª ed., Makron Books: vol. 2. São Paulo-SP, 1994.

SOARES, N.F.F., CRUZ, R.S., VILLADIEGO, A.M.D., MELO, N.R., SILVEIRA, M.F.A., BASTOS, M.S.R., GERALDINE, R.M.,

WURLITZER, N.J., RODRIGUES, P.P.C.F. Embalagem ativa na conservação de alimentos. In: Azeredo HMC. (eds) **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza-CE, EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2004. p. 167 – 195.

SCANNELL, AG.M.; HILL, C.; ROSS, R.P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E.K. **Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin**. International Journal of Food Microbiology 60, (2000) 241– 249.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L., OLIVEIRA, L. M., PADULA, M., COLTRO, L., ALVES, R. M. V., GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

SOARES, N.F.F. **Bitterness Reduction in Citrus Juice Through Naringinase Immobilized into Polymer Film**. Ph.D. Dissertation, New York: Cornell University, 130p., 1998.

SILVEIRA, M. F. A.; SOARES, N. F. **Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. Tese apresenta ao departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa-UFV. 2005.

STEVEN, M.D.; HOTCHKISS, J.H. Non-migratory bioactive polymers (NMBP) in food packaging. In_ AHVENAINEN, RAIJA. **Novel food packaging techniques**. CRC Press – Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. 2003.

SUPPAKUL, P.; MILTZ J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science* v 68(2): 408-420, 2003.

SEBIO, L. **Desenvolvimento de plástico biodegradável a base de amido de milho e gelatina pelo processo de extrusão: Avaliação das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira**. Campinas: UNICAMP, 2003. Tese de doutorado em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on oxygen permeability of *lactoglobulina* films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.12, p.:6298-6302, 2000.

TORTORA, Gerard, J. **Microbiologia: Uma Introdução**. 8 Edição. Artmed. Porto Alegre-RS. 2005.

TOLEDO, M.M. **Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCK 400 e Produção de Nisina em Meio à Base de Extratos Vegetais**. Viçosa – MG: UFV, 2000. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; DEBEVERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v.19 - suplemento, p.163-171, 2002-a.

VENTURINI, A. C. **Embalagem de transporte (masterpack) com atmosfera modificada e absorvedores de oxigênio para aumento de vida útil de carne bovina**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de São Paulo – UNESP. 2003.

WANG, Z., LI, G., XIE, G., AND ZHANG, Z. (2005). Dispersion behaviour of titanium dioxide nanoparticles in LLDPE and LDPE nanocomposites. **Macromolecular Chemistry and Physics**. 206, 258-262.

WURLITZER, Nedio Jair. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli(cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan**. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa-UFV. 2007.

WENG, Y.; HOTCHHISS, J. H. Anhydrides as antimicrobial agents added to polyethylene films for packaging. **Packaging technology and Science**. V.6, p. 123 – 128, 1993.

YAMADA, E. Desenvolvimento de sistema de embalagem antimicrobiana. In: **Boletim CTC TecnoCarnes**, Vol XIV. Ital, Campinas – SP, 2004.