

JULIANO VINÍCIUS TOSATI

**COBERTURA COMESTÍVEL À BASE DE AMIDO DE CÚRCUMA:
ESTUDO DO PROCESSO DE MIGRAÇÃO E LIBERAÇÃO DA
CURCUMINA EM MEIO SIMULANTE E EFEITO
ANTIMICROBIANO EM SALSICHA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr^a. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz.

Coorientador: Prof. Dr. Nitin Nitin

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis – SC

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tosati, Juliano Vinícius

Cobertura comestível à base de amido de cúrcuma:
estudo do processo de migração e liberação da
curcumina em meio simulante e efeito antimicrobiano
em salsicha / Juliano Vinícius Tosati ; orientadora,
Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz, coorientador,
Nitin Nitin, coorientador, José Vladimir de
Oliveira , 2017.

207 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

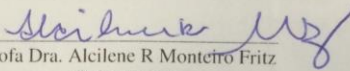
1. Engenharia de Alimentos. 2. Filme comestível.
3. Inativação microbiana. 4. Coeficiente de difusão
da curcumina. 5. Terapia Fotodinâmica . I. Fritz,
Alcilene Rodrigues Monteiro. II. Nitin, Nitin. III.
Oliveira , José Vladimir de IV. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos. V. Título.

**“COBERTURA COMESTIVEL A BASE DE AMIDO DE
CÚRCUMA: ESTUDO DO PROCESSO DE MIGRAÇÃO E
LIBERAÇÃO DA CURCUMINA EM MEIO SIMULANTE E
EFEITO ANTIMICROBIANO EM SALSICHA”**

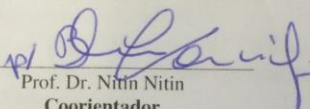
Por

Juliano Vinicius Tosati

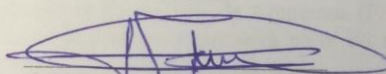
Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



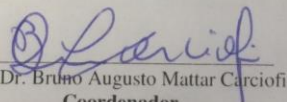
Prof. Dra. Alcilene R. Monteiro Fritz
Orientadora



Prof. Dr. Nitin Nitin
Coorientador

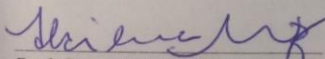


Prof. Dr. Jose Vladimir de Oliveira
Coorientador

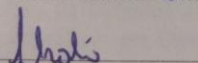


Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador

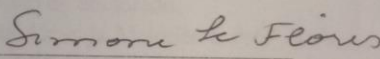
Banca Examinadora:



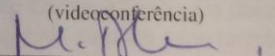
Prof. Dra. Alcilene R. Monteiro Fritz



Dra. Alessandra Valério



Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres
(videoconferência)



Prof. Dr. Marco Di Luccio

Florianópolis, 10 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela vida e saúde.

Aos meus pais Airton Lori Tosati e Bernardete Bin Tosati que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos, aconselhando em todo tempo sempre buscar evoluir em todos os sentidos da vida.

Aos meus irmãos e cunhadas pelo incentivo de sempre buscar algo mais na vida, e essa conquista é uma delas.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante todo o doutorado e também pela bolsa dentro do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior –PDSE para a realização do estágio doutoral.

Ao Cnpq, pela concessão da bolsa durante o período de estágio doutoral em Campinas.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do doutorado nessa instituição.

A *Department of Food Science and Technology*, da cidade de Davis, Estados Unidos da América, que me oportunizou realizar o estágio doutoral durante o período de 1 ano.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), de Campinas, pela oportunidade de realizar a primeira parte do trabalho durante o período de 6 meses.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz, pela orientação, dedicação, paciência e incentivo e a confiança depositada na realização do trabalho.

Ao meu Coorientador estrangeiro Prof. Dr Nitin Nitin, por todo auxílio com relação à minha ida aos EUA, pela paciência em me compreender durante o período de estágio e principalmente pela ajuda na condução da parte experimental do trabalho.

Ao meu Coorientador Prof. Dr José Vladimir de Oliveira, por todo auxílio e esclarecimento durante o período do doutorado.

As Prof^a. Dr^a. Maria Angela de Almeida Meireles e Prof^a. Dr^a. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio, pela disponibilização do uso dos laboratórios de Tecnologia Supercrítica e Carnes e Derivados durante o período de estágio em Campinas e pela ajuda na parte experimental do trabalho.

Aos professores da banca, pela disponibilidade e pela contribuição para a avaliação deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório PROFI, por todos os momentos de estudo e descontração.

Aos amigos conhecidos no período do estágio doutoral realizado no EUA e em Campinas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho, tanto na parte experimental quanto na parte de descontração.

A todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

A indústria de alimento tem aumentado os investimentos em pesquisa e inovação no processo de produção de alimento para obter uma melhor qualidade, segurança e conveniência para o consumidor. Produtos cárneos prontos para o consumo são submetidos a tratamento térmico para eliminação de patógenos. Uma forma de retardar crescimento microbiano em alimentos prontos ao consumo é a aplicação de revestimento comestível incorporados de compostos bioativos. Buscando alternativas tecnológicas para reduzir contaminação cruzada de alimentos, o presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial antimicrobiano do resíduo de cúrcuma como revestimento comestível de produtos cárneos usando como modelo a salsicha e a *Listeria innocua* (substituto da *Listeria monocytogenes*) como micro-organismo alvo. A cobertura (blenda) a base de amido de cúrcuma adicionada de gelatina, foi produzida a partir do resíduo gerado da extração do óleo essencial de cúrcuma em meio supercrítico. Para efeitos de comparação com a blenda foram preparadas duas coberturas: uma contendo amido do resíduo de cúrcuma, uma segunda apenas contendo gelatina. As mesmas foram caracterizadas na forma de filmes quanto a suas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira. Em seguida salsichas foram revestidas com a blenda (resíduo de cúrcuma e gelatina) e avaliou-se os efeitos dessa cobertura nas características físico-químicas e microbiológicas das salsichas estocadas a 5 °C e 10 °C por 30 dias. Os resultados mostraram que o filme da blenda apresentou características mecânicas e térmicas melhor que os demais filmes. A blenda usada como revestimento nas salsichas retardou crescimento de bactérias mesófilas, psicrotróficas e lácticas, e não houve mudança nas propriedades físico-químicas das salsichas quando comparado ao controle. A segunda etapa do estudo, uma outra blenda polimérica foi elaborada, tendo como base de amido de mandioca e gelatina adicionada de curcumina, mantendo-se a blenda usada na etapa 1 (blenda a base de resíduo de cúrcuma e gelatina). Nessa etapa determinou-se o coeficiente de difusão da curcumina de ambos os filmes em soluções etanólicas de 50 % e 90 % como fluido simulador de alimento às temperaturas de 23 °C e 4 °C. Determinou-se a mobilidade da curcumina nos filmes em três condições pela técnica de recuperação da fluorescência após fotodegradação (FRAP). Além disso, realizou-se ensaios de migração da curcumina dos filmes e coberturas para salsicha. Os coeficientes de difusão da curcumina em solução etanólica de 50 % e 90 % foram na ordem de grandeza de 10^{-12} e 10^{-14} cm²/s, respectivamente.

Desse modo, comprovou-se que a liberação da curcumina dos filmes em solução a 50 % em etanol foi mais rápida e maior do que em 90 %. Enquanto, a temperatura influenciou somente a liberação da curcumina dos filmes a 50 %. A análise através da técnica FRAP apresentou que a curcumina tem baixa mobilidade em filmes secos, filmes úmidos e em contato com óleo. Os resultados de migração mostraram que a migração da curcumina foi maior nas coberturas comestíveis aplicadas em salsicha do que quando presentes em filmes. A terceira e última etapa do presente trabalho, avaliou-se atividade antimicrobiana da curcumina naturalmente presente e purificada nas coberturas contra *Listeria innocua* ativada pela luz UV-A a 23 °C e 4 °C em solução simulando contaminação cruzada em salsicha. As coberturas com curcumina naturalmente presente ou adicionadas (purificada) nas matrizes apresentaram inativação da bactéria somente na presença de luz e as temperaturas de ensaio não influenciaram na inibição. Das salsichas revestidas com as coberturas expostas à luz UV-A reduziu-se 4 log CFU/mL de bactérias incubadas. Níveis abaixo do limite de detecção de 1 log CFU/mL, em um tempo de 5 min e 20 min para curcumina adicionada e naturalmente presente, respectivamente. A inativação da *L. innocua* foi realizada em baixa concentração de curcumina liberada das coberturas entre 0.5-10 µg/mL para a solução bacteriana. Com isso, conclui-se que o revestimento comestível a base do resíduo de cúrcuma tem potencial para ser usado com recobrimento em salsichas para retardar o crescimento microbiano e proteger contra a contaminação cruzada quando combinado com a luz UV-A.

ABSTRACT

Food industries has supported the researches and innovation in protection, quality and convenience for food with focus in the sustainability and health. Ready to eat (RTE) meat products are subjected to a proper heat treatment for elimination of pathogens. Edible coatings incorporated of the bioactive compounds are an alternative to inhibit microbial growth and reduce the cross-contamination of foods. Thus, this work aimed to use edible coating based on starch turmeric residue onto sausages to inactivate *Listeria innocua*. A Coated (blend) based on turmeric starch and gelatin was elaborated from the turmeric residue obtained after supercritical fluid extraction (SFE) and pressurized liquid extraction (PLE) of curcumin and curcuminoids. For comparison, two coatings were prepared: one based on turmeric starch-residue and a second based on gelatin. Mechanical, thermal and barrier properties of the films obtained from edibles coating were assessment. Then, the sausages were coated with coating turmeric-gelatin blend, stored at 5°C and 10°C for 30 days and its physicochemical and bacteriostatic effects on the sausage were measured. The turmeric-gelatin blend film showed better mechanical e thermal proprieties than films made with turmeric starch and gelatin separately. The effect of the turmeric-gelatin blend coating on sausages stored at 5 °C and 10 °C showed a significant positive effect on the inhibition of microbial growth over 30 days. Physicochemical characteristics, such as texture profile and moisture, remained constant when compared to control. Second step edible films or coatings were made with turmeric-gelatin and cassava-gelatin based added of curcumin. To elucidate curcumin behavior in edible films and coatings three methods were used: release of curcumin in food simulant; analysis of diffusion by Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP); and curcumin migration from film or coating to sausage. By FRAP analysis the films were analyzed under three conditions: dry, oil and wet environment. The food simulant test showed faster curcumin release from film in ethanol 50% than 90% due to the swelling by water. The temperature decreased significantly diffusion coefficient for 50% ethanolic solution, while for ethanol 90% no effect of the temperature was observed. Applying FRAP analysis, curcumin showed low mobility for dry, in oil and wet films. When used as edible coating and film on sausage, curcumin release from coating to sausage was better. The third and last step was studied light-activated antimicrobial activity of curcumin naturally present and purified curcumin in coating against *L. innocua* on sausage at 23 °C and 4 °C regarding their ability to prevent bacterial cross-contamination. It was observed that coatings with curcumin naturally

present or added (purified) were only able to inactivate the bacteria in presence of light and the antimicrobial activity of the coatings were not affected by the temperatures. Sausage-coated exposed to UV-A light were able to reduce 4 log CFU/mL of incubated bacteria to levels below the detection limit of 1 log CFU/mL after 5 and 20 min of light exposure for curcumin purified and naturally present, respectively. Further, the *L. innocua* inactivation was performed by low curcumin concentration release from coating between 0.5-10 µg/mL for the bacterial solution. Thus, edible coatings based on turmeric starch residue and gelatin have potential application on sausages to slow down microbial growth and protect against cross-contamination, using UV-A light to activate the curcumin antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Ilustração Botânica da <i>Cúrcuma longa</i> L.	33
Figura 2.2. Rizoma de <i>cúrcuma</i>	34
Figura 2.3. Estrutura química da curcumina nas formas cetônica e enólica.	35
Figura 2.4. Propriedades funcionais da curcumina.	36
Figura 2.5. Mecanismo de liberação de composto ativo em matriz polimérica.....	49
Figura 2.6. Análise pela técnica FRAP para obtenção do coeficiente de difusão.....	61
Figura 2.7. Diagrama de Jablonski- Ilustração gráfica do processo fotodinâmico para produção de ROS e oxigênio singlete.	64
Figura 3.1. Representação da obtenção do resíduo de <i>cúrcuma</i>	92
Figura 3.2. Esquema do procedimento de obtenção da solução comestível à base de resíduo de <i>cúrcuma</i> e gelatina.....	93
Figura 3.3. a) Foto do acondicionamento das salsichas no suporte inoxidável para aderência do revestimento comestível. b) amostra de salsicha com e sem revestimento comestível.	98
Figura 3.4. Curva de análise de perfil de textura instrumental típica.	99
Figura 3.5. Imagens do experimento de liberação de curcumina. a) Tempo inicial; b) tempo final do processo de difusão.....	104
Figure 4.1. DSC thermograms of pure films and blend.	125
Figure 4.2. (A). Film fracture of 2000X. (B) Surface contact drying air of 1000X. (C) Surface contact with the plate of 1000X. (1). Turmeric residue film. (2) Turmeric-residue and gelatin film. (3). Gelatin film.....	126
Figure 4.3. FTIR spectra of (a) turmeric-residue film, (b) gelatin film e (c) turmeric-residue and gelatin film.....	127
Figure 5.1. Curcumin concentration from turmeric powder residue obtained by conventional extraction with solvent methanol (100%) and ethanol (100, 75, 50 and 30 %). Averages with the same letter do not differ statistically ($p \geq 0.05$) according Tukey's test.....	147
Figure 5.2. Diffusion kinetics in ethanol 50% a and b) TGF at 23°C and 4 °C, respectively. c and d) CGC at 23 °C and 4 °C, respectively. The line is model fit and the circle is release dates of curcumin in solution.	148
Figure 5.3. Diffusion kinetics in ethanol 90 %. a and b) TGF at 23 °C and 4 °C, respectively. c and d) CGC at 23 °C and 4 °C, respectively. The line is model fit and the circle is release dates of curcumin in solution.	149
Figure 5.4. Images showing recovery of fluorescent intensity within the bleach disk.....	152
Figure 5.5. Normalized intensity vs. time curve for each film and conditions in a Frap experiment. Data represent the averaged FRAP data	

for 10 films from a representative experiment. a) 90% HR. b) oil c) dry.	155
Figure 5.6. Concentration of curcumin on sausage surface vs time....	158
Figure 6.1. Physical properties (a) and optical images (b) of the Turmeric-Gelatin hydrogel (TGH) and the Cassava-Gelatin hydrogel (CGH). Control hydrogel (K) consists of Cassava-Gelatin hydrogel without the addition of curcumin.	175
Figure 6.2. Inactivation of <i>Listeria innocua</i> incubated on Turmeric-Gelatin hydrogel (TGH) or on Cassava-Gelatin hydrogel (CGH) and exposed (L+) or not exposed (L-) to UV-A light at 23 °C and 4 °C. (a) and (b) represent CGH at 23 °C and at 4°C, respectively; (c) an and (d) represent TGH at 23 °C and at 4 °C, respectively. Control hydrogel (K) consists of Cassava-Gelatin hydrogel without the addition of curcumin. Initial bacterial load was 6 log CFU/mL. * The limit of detection was 5 log CFU/mL of bacterial inactivation.	177
Figure 6.3. Inactivation of <i>Listeria innocua</i> incubated on sausage-coated Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) or on sausage-coated Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) and exposed to UV-A light at 4 °C. Initial bacterial load was (a) 6 log CFU/mL and (b) 4 log CFU/mL. Control hydrogel (K) consists of Cassava-Gelatin hydrogel without the addition of curcumin. * The limit of detection was (a) 5 log CFU/mL of bacterial inactivation and (b) 3 log CFU/mL of bacterial inactivation.....	178
Figure 6.4. Multiple inactivation cycles of <i>Listeria innocua</i> incubated on (a) sausage-coated Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) or (b) sausage-coated Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) and exposed to UV-A light at 4 °C. Initial bacterial load was 4 log CFU/mL. * The limit of detection was 3 log CFU/mL of bacterial inactivation.	179
Figure 6.5. (a) Inactivation of <i>Listeria innocua</i> incubated with curcumin released from Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) and Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) and exposed to 5 min of UV-A light. Release of curcumin from hydrogels to water were conducted for 5 (white) and 30 (gray) min before <i>L. innocua</i> incubation and UV-A light exposure. (b) Inactivation of <i>Listeria innocua</i> incubated with different curcumin concentrations and exposed to 5 min of UV-A light. For (a) and (b) the initial bacterial load was 6 log CFU/mL and * the limit of detection was 5 log CFU/mL of bacterial inactivation.	180
Figure 6.6. Degradation of curcumin present in the Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) and the Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) after exposure to UV-A light for 5, 15 and 30 min.	182
Figura 8.1. Curva de intensidade normalizada pelo tempo para os filmes em diferentes condições no experimento FRAP. a) seco; b) óleo.....	197

Figura 8.2.Perda de água da salsicha para os filmes comestíveis.....	200
Figura 8.3. Umidade final dos filmes.	201
Figura 8.4.Migração da curcumina para salsicha.	202
Figura 8.5.Teste de zona de inibição do filme de resíduo de cúrcuma contra <i>Listeria. innocua</i>	203

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Trabalhos encontrados na literatura de diferentes matrizes de filmes comestíveis adicionadas de compostos antimicrobianos com alguns valores do coeficiente de difusão em diferentes fluidos simuladores de alimentos.	52
Tabela 2.2. Trabalhos encontrados na literatura sobre migração de composto antimicrobiano do filme para o alimento.	58
Tabela 2.3. Trabalhos encontrados na literatura sobre inativação de micro-organismos patogênicos com o uso de curcumina como FS na área de alimentos.	66
Tabela 3.1. Composição da salsicha.	97
Tabela 3.2. Valores dos parâmetros a e b para curva padrão para diferentes concentrações de etanol em diferentes temperaturas e metanol.	101
Table 4.1. Sausage composition.	121
Table 4.2. Mechanical properties, water vapor permeability, and melting temperature of turmeric, gelatin, and blend films.	123
Table 4.3. pH and Aw of CC or UC sausages.	128
Table 4.4. L*, a*, and b* values of the UC and CC sausages over storage.	129
Table 4.5. Texture profile analysis of UC and CC sausages over storage.	131
Table 5.2. Diffusion coefficients (m ² /s) of curcumin in different film matrices.	151
Table 5.3. Diffusion coefficients by FRAP methods.	157
Tabela 8.1. Dados de coeficiente de difusão e mobilidade da curcumina dos filmes elaborados separadamente.	199

SUMÁRIO

CAPÍTULO. 1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1. OBJETIVOS.....	26
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	27
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
1.2. REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO. 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1. CURCUMA LONGA L.	33
2.2. SALSICHA.....	37
2.3. COBERTURAS COMESTÍVEIS	39
2.3.1 POLISSACARÍDEOS	41
2.3.2 PROTEÍNA	42
2.4. PROPRIEDADES DOS FILMES COMESTÍVEIS.....	43
2.4.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES	43
2.4.2 PROPRIEDADES DE BARREIRA DE FILMES.....	44
2.4.3 PROPRIEDADES TÉRMICAS	45
2.5. APLICAÇÃO DE REVESTIMENTO COMESTÍVEIS EM SALSICHA	46
2.6. MIGRAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS EM FILME OU REVESTIMENTO COMESTÍVEL.	47
2.6.1 MIGRAÇÃO DA CURCUMINA DO FILME OU REVESTIMENTO COMESTÍVEL EM ESCALA MACROSCÓPICA.....	48
2.6.2 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO PELO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA APÓS FOTODEGRADAÇÃO (FRAP).....	59
2.7. TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDA)	63
2.8. CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	68
2.9. REFERÊNCIAS.....	70
CAPÍTULO. 3 MATERIAIS E MÉTODOS	91
3.1. CAPÍTULO 4. APLICAÇÃO DE REVESTIMENTO COMESTÍVEL À BASE DE RESÍDUO DE CÚRCUMA E GELATINA EM SALSICHA	91
3.2. MATERIAIS	91
3.3. OBTENÇÃO DO RESÍDUO DE CÚRCUMA	91
3.4. DESENVOLVIMENTO DO REVESTIMENTO E FILME COMESTÍVEL	93
3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS COBERTURAS NA FORMA DE FILME.....	94
3.5.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES	94
3.5.2 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA)	95
3.5.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	95
3.5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	95

3.5.5 ESPECTRO NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	96
3.6. ELABORAÇÃO DA SALSICHA.....	96
3.7. APLICAÇÃO DO REVESTIMENTO COMESTÍVEL NA SALSICHA.....	97
3.8. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS SALSICHAS	98
3.8.1 ANÁLISE DE COR, ATIVIDADE DE ÁGUA (AA) AND PH	98
3.8.2 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA).....	98
3.8.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	99
3.9. CAPÍTULO 5. LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DOS FILMES COMESTÍVEL PARA FLUIDO SIMULADOR DE ALIMENTO E SALSICHA E ANÁLISE DE MOBILIDADE DA CURCUMINA PELA TÉCNICA FRAP....	100
3.10. MATERIAIS.....	100
3.11. EXTRAÇÃO DA CURCUMINA DO RESÍDUO DE CÚRCUMA.	101
3.12. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PARA ELABORAÇÃO DOS REVESTIMENTOS E FILMES	102
3.12.1 SOLUÇÃO DO RESÍDUO DE CÚRCUMA COM GELATINA.....	102
3.12.2 SOLUÇÃO DE AMIDO DE MANDIOCA E GELATINA ADICIONADO DE CURCUMINA PURIFICADA	102
3.12.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES.....	102
3.13. LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DO FILME DE RESÍDUO DE CÚRCUMA E GELATINA (TGF) E FILME DE AMIDO DE MANDIOCA E GELATINA ADICIONADO DE CURCUMINA (CGF) PARA FLUIDO SIMULADOR DE ALIMENTO.....	103
3.14. RECUPERAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA APÓS FOTODEGRADAÇÃO (FRAP)	104
3.15. ENSAIO DE MIGRAÇÃO DA CURCUMINA PARA SALSICHA.....	106
3.16. CAPÍTULO 6: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CURCUMINA ATIVADA PELA À LUZ UV-A EM HIDROGEL	107
3.17. MATERIAIS.....	107
3.18. PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS	107
3.18.1 SOLUÇÃO À BASE DE AMIDO DO RESÍDUO DE CÚRCUMA E GELATINA E SOLUÇÃO À BASE DE AMIDO DE MANDIOCA E GELATINA ADICIONADO CURCUMINA.....	107
3.18.2 FORMAÇÃO DOS HIDROGÉIS EM PLACAS.	108
3.19. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	108
3.20. CULTURA MICROBIANA.....	109
3.21. CÂMARA DE LUZ UV-A	109

3.22. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS HIDROGÉIS ATIVADA PELA LUZ UV-A	109
3.23. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS HIDROGÉIS ATIVADAS PELA LUZ UV-A NA SUPERFÍCIE DA SALSICHA.....	110
3.24. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA ATIVADA PELA LUZ UV-A PELA LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DOS HIDROGÉIS	111
3.25. DEGRADAÇÃO DA CURCUMINA NOS HIDROGÉIS PELA EXPOSIÇÃO À LUZ UV-A	111
3.26. DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO FILME DE RESÍDUO DE CÚRCUMA E GELATINA.....	112
3.27. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	112
REFERÊNCIAS.....	112
CAPÍTULO. 4 ANTIMICROBIAL EFFECT OF EDIBLE COATING BASED ON TURMERIC STARCH RESIDUE AND GELATIN APPLIED ONTO FRESH PORK SAUSAGE	
4.1. INTRODUCTION.....	116
4.2. MATERIAL AND METHODS	117
4.2.1 RAW MATERIALS.....	117
4.2.2 FILMS FROM EDIBLE COATING CHARACTERIZATION	118
4.2.2.1 <i>Film Thickness and Mechanical Tests</i>	118
4.2.2.2 <i>Water Vapor Permeability (WVP)</i>	119
4.2.2.3 <i>Differential Scanning Calorimetry (DSC)</i>	119
4.2.2.4 <i>Scanning Electron Microscopy</i>	119
4.2.2.5 <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>	120
4.2.3 SAUSAGE PROCESSING	120
4.2.4 SAUSAGE ANALYSIS CONTROL	121
4.2.4.1 <i>Color, Water Activity, and pH</i>	121
4.2.4.2 <i>Texture Measurement</i>	121
4.2.4.3 <i>Microbiological Analysis</i>	122
4.2.5 STATISTICAL ANALYSIS.....	122
4.3. RESULTS AND DISCUSSION.....	122
4.3.1 FILM PROPERTIES	122
4.3.1.1 <i>Film Thickness and Mechanical Properties</i>	122
4.3.1.2 <i>Water Vapor Permeability (WVP)</i>	123
4.3.1.3 <i>Thermal behavior of films</i>	124
4.3.1.4 <i>Morphology</i>	125
4.3.1.5 <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)</i>	126
4.3.2 SAUSAGE ANALYSES	127

4.3.2.1 Color, pH, and water activity (aw) Measurement.....	127
4.3.2.2 Texture Profile Analysis.....	129
4.3.2.3 Microbiological count.....	131
4.4. CONCLUSION	133
4.5. REFERENCE	134
CAPÍTULO. 5 RELEASE OF CURCUMIN FROM TURMERIC STARCH-GELATIN AND CASSAVA STARCH- GELATIN FILMS INTO A FOOD SIMULANT AND PORK SAUSAGE USING.....	139
5.1. INTRODUCTION.....	140
5.2. MATERIAL AND METHODS	141
5.2.1 RAW MATERIALS.....	141
5.2.2 CURCUMIN EXTRACTION FROM TURMERIC RESIDUE.....	142
5.2.3 FILM AND COATING SOLUTION PREPARATION.....	142
5.2.3.1 Turmeric-gelatin solution.....	142
5.2.3.2 Cassava-gelatin solution.....	143
5.2.3.3 Films preparation.....	143
5.2.4 DIFFUSION OF CURCUMIN FROM TURMERIC-GELATIN FILM (TF) AND CASSAVA-GELATIN FILM ADDED WITH CURCUMIN (CF) IN FOOD SIMULANT.	143
5.2.5 FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTOBLEACHING (FRAP).....	144
5.2.6 MIGRATION ASSAY IN SAUSAGE.....	145
5.3. RESULT AND DISCUSSION	146
5.3.1 CURCUMIN EXTRACTION FROM TURMERIC RESIDUE.....	146
5.3.2 DIFFUSION OF CURCUMIN FROM TURMERIC STARCH-GELATIN AND CASSAVA STARCH-GELATIN FILMS IN FOOD SIMULANT	147
5.3.3 DIFFUSION AND MOBILITY OF CURCUMIN BY FRAP	152
5.3.4 RELEASE OF CURCUMIN INTO SAUSAGE.....	157
5.4. CONCLUSION	159
5.5. REFERENCE	159
CAPÍTULO. 6 LIGHT-ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TURMERIC RESIDUE EDIBLE COATINGS AGAINST CROSS-CONTAMINATION OF LISTERIA INNOCUA ON SAUSAGES.....	165
6.1. INTRODUCTION.....	166
6.2. MATERIALS AND METHODS	169
6.2.1 MATERIALS.....	169
6.2.2 HYDROGEL PREPARATION.....	170

6.2.2.1 Turmeric-gelatin solution	170
6.2.2.2 Cassava-gelatin hydrogel solution.....	170
6.2.2.3 Turmeric-gelatin hydrogel and Cassava-gelatin hydrogel coatings.....	171
6.2.3 HYDROGELS COATINGS CHARACTERIZATION	171
6.2.4 MICROBIAL CULTURE	172
6.2.5 UV-A LIGHT CHAMBER.....	172
6.2.6 UV-A LIGHT ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HYDROGELS COATINGS	172
6.2.7 UV-A LIGHT ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HYDROGEL-COATED SAUSAGES	173
6.2.8 UV-A LIGHT ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CURCUMIN RELEASED FROM HYDROGEL COATINGS	174
6.2.9 DEGRADATION OF CURCUMIN IN HYDROGEL COATINGS BY UV-A LIGHT IRRADIATION	174
6.3. RESULTS.....	175
6.3.1 HYDROGELS CHARACTERIZATION	175
6.3.2 UV-A LIGHT ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HYDROGEL COATINGS	175
6.3.3 UV-A LIGHT ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HYDROGEL-COATED SAUSAGES.....	177
6.3.4 ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HYDROGEL-COATED SAUSAGES EXPOSED TO MULTIPLE CYCLES OF UV-A LIGHT	178
6.3.5 UV-A LIGHT ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CURCUMIN RELEASED FROM HYDROGEL COATINGS	179
6.3.6 DEGRADATION OF CURCUMIN AFTER HYDROGEL EXPOSURE TO UV-A LIGHT	182
6.4. DISCUSSION	182
6.4.1 CGH AND TGH COATINGS ACT AS A CARRIER FOR THE DELIVERY OF CURCUMIN	182
6.4.2 UV-A LIGHT EXPOSURE OF SAUSAGES COATED WITH CGH AND TGH REDUCED CROSS-CONTAMINATION LOAD OF BACTERIA	184
6.4.3 COATED SUBSTRATE INFLUENCES THE RELEASE OF CURCUMIN AND THE LIGHT-ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CGH AND TGH COATINGS	185
6.4.4 POTENTIAL OF TURMERIC RESIDUE-BASED ANTIMICROBIAL COATINGS	186
6.5. CONCLUSIONS	187
6.6. REFERENCE	188

CAPÍTULO. 7 CONCLUSÕES FINAIS.....	195
7.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS SEGUINTE	196
CAPÍTULO. 8 APÊNDICE 1	197
8.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO COMPLEMENTARES	197
8.1.1 FRAP DOS FILMES EM MATRIZ POLIMÉRICA ELABORADOS SEPARADAMENTE.....	197
8.1.2 MIGRAÇÃO DA CURCUMINA E PERDA DE ÁGUA	200
8.1.3 ZONA DE INIBIÇÃO DO FILME DE RESÍDUO DE CÚRCUMA E GELATINA	202

DIAGRAMA CONCEITUAL DA TESE

Por quê?

- A curcumina é um composto que exibe um conjunto de efeitos funcionais e medicinais de acordo com estudos mostrados na literatura;
- Avaliar a possibilidade de substituir o revestimento sintéticos por naturais e ativos em salsichas e outros alimentos para prevenir e minimizar contaminação cruzada;
- Compreender o fenômeno de migração da curcumina, composto hidrofóbico nas coberturas e no alimento;
- Potencializar os efeitos antimicrobiano da curcumina ativada através de luz ultravioleta.

O que já foi feito?

- Aplicação de filme ou revestimento comestível com outros antimicrobianos em alimentos para retardar crescimento de micro-organismo;
- Determinação do coeficiente de difusão de outros compostos hidrofílicos em alimentos e filmes;
- Trabalhos utilizando curcumina em solução aquosa para inativar micro-organismo de origem alimentar com exposição à luz blue led;

Hipóteses da pesquisa

- É possível utilizar o resíduo de cúrcuma para formular filme comestível e aplicá-lo em salsicha para retardar o crescimento microbiano sem alterações nas propriedades físico-químicas?
- É possível um composto hidrofóbico difundir-se de cobertura (na forma de filme) para alimento com teor de água?

- A concentração de curcumina presente do resíduo de cúrcuma será suficiente para sua atividade antimicrobiana?
- E possível potencializar o efeito antimicrobiana da curcumina através da luz UV-A?

Métodos

- Produção de revestimento comestível a base de amido de cúrcuma a partir de resíduo obtido da extração de oleoresina de raízes de turmerico;
- Determinar o coeficiente de difusão da curcumina naturalmente presente e adicionada em matriz polimérica em fluido simulante de alimento
- Utilizar o método de recuperação da fluorescência após fotodegradação para determinar a mobilidade da curcumina em matrizes poliméricas secas, úmidas e em contato com óleo;
- Migração da curcumina de filmes e revestimentos comestíveis para superfície de salsicha ativada por luz ultravioleta e obtida por extração em etanol e leitura da concentração em espectrofotômetro UV-visível;
- Aplicar luz UV-A na superfície do revestimento comestível com curcumina para inativar *Listeria innocua*;

Respostas

- Obter cobertura a base de resíduo de cúrcuma com atividade antimicrobiana e funcional para inibir crescimento microbiano em salsicha;
- Coeficiente de difusão da curcumina naturalmente presente e adicionada em filmes
- A mobilidade da curcumina em diferentes meios acondicionados;
- Atividade antimicrobiana da curcumina presente nos revestimentos comestíveis exposta à luz UV-A;

CAPÍTULO. 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de embalagens sintéticas no ano de 2014 atingiu um valor de 300 milhões de toneladas, e é esperado que essa produção seja duplicada nos próximos 20 anos. Do total produzido, somente 14% das embalagens plásticas são coletadas para reciclagem, e o restante é descartado ao meio ambiente ocasionando sérios problemas ambientais (CERQUEIRA et al., 2016).

Nos últimos 20 anos, biofilmes ou revestimentos têm sido propostos como alternativa para aumentar a vida útil de alimentos e, ao mesmo tempo reduzir a poluição ambiental devido ao uso de embalagens sintéticas não degradáveis. Os materiais utilizados para produção de embalagens biodegradáveis são oriundos de matérias-primas agrícolas ou resíduos das indústrias de processamento de alimentos, farmacêuticas, entre outras. Polissacarídeos, proteínas e lipídeos são os principais biopolímeros empregados para produzir revestimentos comestíveis, e denominados de funcionais ou ativos quando combinados com agentes antioxidantes ou antimicrobianos (FU et al., 2017).

Recentemente, o uso de resíduos industriais tem sido estudado para obtenção de filmes e revestimentos comestíveis (CARVALHO et al., 2008; MANIGLIA et al., 2014). O resíduo de cúrcuma (*Curcuma longa* L) é gerado após obtenção da oleoresina e curcuminóides por métodos de extrações convencionais (sonicação, Soxhlet, etc.) ou extração fluido supercrítico (SFE) seguida da extração líquida pressurizada (PLE) (OSORIO-TOBÓN et al., 2014). Dos processos de extração são gerados resíduos de cúrcuma que contêm cerca de 30-50% de amido e traços de oleoresina e curcuminóides (coloração amarela), sendo classificados como um amido especial com alto potencial comercial (BRAGA; MORESCHI; MEIRELES, 2006). Dessa maneira, o resíduo de cúrcuma pode ser utilizado como base polimérica para produção de filmes ou revestimentos comestíveis com propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas uma vez que possui em sua matriz curcumina (MANIGLIA et al., 2014, 2015).

As embalagens comestíveis incorporadas com compostos antimicrobianos são projetadas para interagir e liberar os compostos ativos para os alimentos, a fim de estender sua vida de prateleira (KAPETANAKOU; KARYOTIS; SKANDAMIS, 2016). Para alcançar tais objetivos, ensaios de migrações das substâncias ativas de baixa massa molecular (< 1000 Dalton) são realizados para garantir que as embalagens ativas liberem os compostos ativos para os alimentos (KARBOWIAK et al.,

2009; BENBETTAÏEB et al., 2016). O processo de transferência de massa de um composto da embalagem para o alimento é o resultado dos processos de difusão, dissolução e equilíbrio, e pode ser avaliado através de fluido simulador de alimento (método indireto) e recuperação da fluorescência após fotodegradação método (direto) (PAYET et al., 2008).

Associada às coberturas ativas, pesquisas na área de alimentos têm explorado o uso de processos não térmicos tais como, irradiação ultravioleta (UV-C), alta pressão hidrostática, ultrassom ou campos eletromagnéticos pulsados para inativar ou reduzir a contaminação cruzada em alimentos (BAYINDIRLI et al., 2006; SHAHBAZ et al., 2014; JANISIEWICZ et al., 2015; MUKHOPADHYAY; UKUKU; JUNEJA, 2015; TAWEMA et al., 2016; SOMMERS et al., 2017). Entretanto, esses processos apresentam alto custo de investimento em equipamento, limitando as suas utilizações em alimentos. Com isso, a abordagem da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) com compostos reconhecidos como seguro tem sido utilizada para inativar micro-organismos relacionados com alimentos (LÓPEZ-CARBALLO et al., 2008; TIWARI et al., 2009; BUCHOVEC et al., 2016; COSSU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

O desenvolvimento de revestimento comestível e sua aplicação em alimentos vem sendo realizado há pelo menos uma década pelo grupo de pesquisa a qual se inclui a presente tese. Dentre os trabalhos realizados, destacam-se a produção de cobertura a base de hidroximetilpropilcelulose (HPMC) adicionada de antifúngicos químicos e aplicação como revestimento em tomates cerejas para inibição de crescimento de *Botrytis cinérea* e *Alternaria alternata* (FAGUNDES et al., 2013, 2014, 2015; TOSATI et al., 2015). Outros trabalhos desenvolvidos incluem: aplicação de cobertura a base de HPMC e resíduos de cápsulas farmacêuticas em *Physalis* capaz de manter as propriedades físico-químicas da fruta (MORAES, 2013; SCARTAZZINI, 2014), coberturas a base de amido de arroz e mandioca em peras Williams para minimizar injúrias físicas (MORAES et al., 2012); coberturas a base de gelatina para diminuir a oxidação dos carotenoides das cenouras minimamente processadas (BARBOSA; AMBONI; MONTEIRO, 2011), entre outros.

Diante do exposto, o uso de materiais das agroindústrias podem ser uma alternativa para produção de revestimentos ou filmes comestíveis com potencial para aplicação em alimentos prontos ao consumo.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar aplicação de coberturas comestíveis à base de resíduo de cúrcuma, além da combinação com outros processos para inativação microbiana em salsichas.

1.1.2 Objetivos específicos

- a. Produzir e caracterizar três coberturas quanto às propriedades mecânicas, barreira ao vapor de água e térmicas: blenda polimérica obtida a partir de resíduo de cúrcuma adicionada de gelatina, cobertura à base de gelatina e cobertura à base do amido de resíduo de cúrcuma;
- b. Substituir o revestimento sintético de salsicha pela cobertura à base de resíduo de cúrcuma e avaliar as características físico-químicas e microbiológica das salsichas com e sem revestimento, armazenadas a 5 °C e 10 °C durante 30 dias;
- c. Determinar e comparar o coeficiente de difusão de curcumina naturalmente presente no amido de cúrcuma e adicionada nos filmes elaborados com amido de mandioca, em fluido simulante de alimentos;
- d. Determinar a migração da curcumina presente nos revestimentos e filmes comestíveis elaborados com resíduo de cúrcuma e com amido de mandioca para superfície das salsichas;
- e. Determinar a atividade antimicrobiana contra *Listeria innocua* dos filmes preparados com resíduo de cúrcuma (curcumina naturalmente presente) e com amido de mandioca adicionado de curcumina, quando exposta à luz UV-A;

1.2. Referências

- BARBOSA, L. das N.; AMBONI, R. D. de M. C.; MONTEIRO, A. R. Influence of temperature and edible coating on the physical and chemical parameters and sensory acceptance of fresh-cut organic carrots Influencia de la temperatura y cobertura comestible en los parámetros físicos y químicos y aceptación sensorial de las zanahorias cortadas frescas. **CyTA - Journal of Food**, v. 9, n. 1, p. 31–36, 1 maio 2011.
- BAYINDIRLI, A.; ALPAS, H.; BOZOĞLU, F.; HIZAL, M. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. **Food Control**, v. 17, n. 1, p. 52–58, jan. 2006.
- BENBETTAÏEB, N.; CHAMBIN, O.; KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F. Release behavior of quercetin from chitosan-fish gelatin edible films influenced by electron beam irradiation. **Food Control**, v. 66, p. 315–319, ago. 2016.
- BRAGA, M. E. M.; MORESCHI, S. R. M.; MEIRELES, M. A. A. Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 340–346, 3 mar. 2006.
- BUCHOVEC, I.; LUKSEVICIUTE, V.; MARSALKA, A.; REKLAITIS, I.; LUKSIENE, Z. Effective photosensitization-based inactivation of gram (–) food pathogens and molds using the chlorophyllin–chitosan complex: towards photoactive edible coatings to preserve strawberries. v. 15, n. 4, p. 506–516, 13 abr. 2016.
- CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; THOMAZINE, M.; HABITANTE, A. M. Q. B.; GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Development of edible films based on differently processed *Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus)* skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 6, p. 1117–1123, ago. 2008.
- CERQUEIRA, M. A. P. R.; PEREIRA, R. N. C.; RAMOS, O. L. da S.; TEIXEIRA, J. A. C.; VICENTE, A. A. **Edible food packaging: materials and processing technologies**. [s.l.] CRC Press, 2016.
- COSSU, A.; ERCAN, D.; WANG, Q.; PEER, W. A.; NITIN, N.; TIKEKAR, R. V. Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh

produce wash water and biofilm. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 37, Part A, p. 44–52, out. 2016.

FAGUNDES, C.; PALOU, L.; MONTEIRO, A. R.; PÉREZ-GAGO, M. B. Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, p. 1–8, jun. 2014.

FAGUNDES, C.; PALOU, L.; MONTEIRO, A. R.; PÉREZ-GAGO, M. B. Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce *alternaria* black spot and maintain postharvest quality of cold-stored cherry tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 249–257, 22 set. 2015.

FAGUNDES, C.; PÉREZ-GAGO, M. B.; MONTEIRO, A. R.; PALOU, L. Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 391–398, 16 set. 2013.

FU, S.; WU, C.; WU, T.; YU, H.; YANG, S.; HU, Y. Preparation and characterisation of Chlorogenic acid-gelatin: A type of biologically active film for coating preservation. **Food Chemistry**, v. 221, p. 657–663, 15 abr. 2017.

JANISIEWICZ, W. J.; TAKEDA, F.; GLENN, D. M.; CAMP, M. J.; JURICK, W. M. Dark Period Following UV-C Treatment enhances killing of *Botrytis cinerea* *Conidia* and controls gray mold of strawberries. **Phytopathology**, v. 106, n. 4, p. 386–394, 29 dez. 2015.

KAPETANAKOU, A. E.; KARYOTIS, D.; SKANDAMIS, P. N. Control of *Listeria monocytogenes* by applying ethanol-based antimicrobial edible films on ham slices and microwave-reheated frankfurters. **Food Microbiology**, v. 54, p. 80–90, abr. 2016.

KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A.; TRYSTRAM, G. From macroscopic to molecular scale investigations of mass transfer of small molecules through edible packaging applied at interfaces of multiphase food products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 116–127, jan. 2009.

LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R.; OCIO, M. J. Photoactivated chlorophyllin-based gelatin films and coatings to prevent microbial contamination of food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1–2, p. 65–70, 15 ago. 2008.

MANIGLIA, B. C.; DOMINGOS, J. R.; DE PAULA, R. L.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269–277, maio 2014.

MORAES, K. S. de. **Influencia da atmosfera modificada e cobertura comestível na qualidade de physalis (*Physalis peruviana* L.) armazenada em diferentes temperaturas**. 2013. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, Florianópolis, 2013. Disponível em: <<http://tede.ufsc.br/teses/PEAL0183-T.pdf>>.

MORAES, K. S. de; FAGUNDES, C.; MELO, M. C.; ANDREANI, P.; MONTEIRO, A. R. Conservation of Williams pear using edible coating with alginate and carrageenan. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 4, p. 679–684, dez. 2012.

MUKHOPADHYAY, S.; UKUKU, D. O.; JUNEJA, V. K. Effects of integrated treatment of nonthermal UV-C light and different antimicrobial wash on *Salmonella enterica* on plum tomatoes. **Food Control**, v. 56, p. 147–154, out. 2015.

OLIVEIRA, E. F. de; COSSU, A.; TIKEKAR, R. V.; NITIN, N. Enhanced antimicrobial activity based on a synergistic combination of sub-lethal levels of stresses induced by UV-A light and organic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM.00383–17, 31 mar. 2017.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; CARVALHO, P. I. N.; ROSTAGNO, M. A.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, nov. 2014.

PAYET, L.; PONTON, A.; LÉGER, L.; HERVET, H.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Self-diffusion in chitosan networks: from a gel–gel method to Fluorescence Recovery after Photobleaching by fringe pattern. **Macromolecules**, v. 41, n. 23, p. 9376–9381, 9 dez. 2008.

SCARTAZZINI, L. **ELABORAÇÃO DE COBERTURA COMESTÍVEL A PARTIR DE RESÍDUO À BASE DE GELATINA E AVALIAÇÃO DA SUA APLICAÇÃO EM PHYSALIS (*Physalis peruviana* L.)**. 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. Disponível em: <<http://tede.ufsc.br/teses/PEAL0226-D.pdf>>.

SHAHBAZ, H. M.; AHN, J.-J.; AKRAM, K.; KIM, H.-Y.; PARK, E.-J.; KWON, J.-H. Chemical and sensory quality of fresh pomegranate fruits exposed to gamma radiation as quarantine treatment. **Food Chemistry**, v. 145, p. 312–318, 15 fev. 2014.

SOMMERS, C.; SHEEN, S.; SCULLEN, O. J.; MACKAY, W. Inactivation of *Staphylococcus saprophyticus* in chicken meat and purge using thermal processing, high pressure processing, gamma radiation, and ultraviolet light (254 nm). **Food Control**, v. 75, p. 78–82, maio 2017.

TAWEMA, P.; HAN, J.; VU, K. D.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of combined UV-C or gamma radiation with natural antimicrobial formulations against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and total yeasts/molds in fresh cut cauliflower. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 451–456, jan. 2016.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O' DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 22 jul. 2009.

TOSATI, J. V.; OLIVEIRA, D. de; LERIN, L. A.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. .; MONTEIRO, A. R. Respiration rate of cherry tomatoes and gas permeability of hydroxypropylmethyl cellulose-based coating. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 5, n. 3, p. 281–287, mar. 2015.

CAPÍTULO. 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Curcuma longa* L.

O açafrão-da-terra ou cúrcuma é uma espécie aromática obtida a partir dos rizomas moídos secos da *Curcuma longa* L pertencente à família Zingiberácea (PINTEA, 2007). A cúrcuma é uma planta nativa do sul e sudoeste da Ásia, mas especificadamente na costa ocidental do sul da Índia, aonde cresce em clima quente e úmido, podendo ser encontrada em países do sudoeste asiático e América do Sul (GOVINDARAJAN; STAHL, 1980; NAHAR; SARKER, 2007). Mais de cem espécies de cúrcuma são descritas, contudo *Curcuma longa* L é comercialmente a mais importante contendo uma produção mundial anual de 1.100 toneladas (Figura 2.1) (NAIR, 2013).

Figura 2.1. Ilustração Botânica da *Curcuma longa* L.



Fonte:(BRAGA, 2002).

A cúrcuma tem diversas finalidades como corante, condimento e medicina tradicional para tratamento de certas doenças desde 4000 a.C (NAIR, 2013). Na indústria de alimentos é utilizada como um corante natural para substituir os corantes sintéticos em produtos como, enlatados, *chutneys*, mostarda, pão, iogurte, manteiga, queijo, entre outros, porém a mais

importante utilização é na preparação de *curry* (OSORIO-TOBÓN et al., 2014).

A composição química encontrada no rizoma da cúrcuma (Figura 2.2) é influenciada por vários fatores tais como: cultivo, tipo de plantio, solo, disponibilidade hídrica, época de colheita, clima entre outros. Dessa maneira, a cúrcuma apresenta uma composição química de 30 a 50% de amido, 6 a 10% de proteína, 6,5 a 8,5% de cinzas, 2 a 6% de fibras, 3 a 6% de óleo volátil e 2 a 8% de curcuminóides (GOVINDARAJAN; STAHL, 1980; BRAGA et al., 2003). A coloração amarela dos rizomas é principalmente atribuída pelos compostos fenólicos classificados como curcuminoides. Estes compostos polifenólicos são divididos em três principais substâncias, a curcumina (80%), a desmetoxicurcumina (DMC) (18%) e a bis-desmetoxicurcumina (BDMC) (2%), que são diferenciadas apenas pela quantidade de grupos metoxila (OCH_3) presentes na estrutura química. A curcumina apresenta dois grupos metoxila, a desmetoxicurcumina contém apenas um grupo metoxila e a bis-desmetoxicurcumina não apresenta grupo metoxila (Figura 2.3) (ANAND et al., 2008; GOEL; AGGARWAL, 2010).

Figura 2.2. Rizoma de cúrcuma.

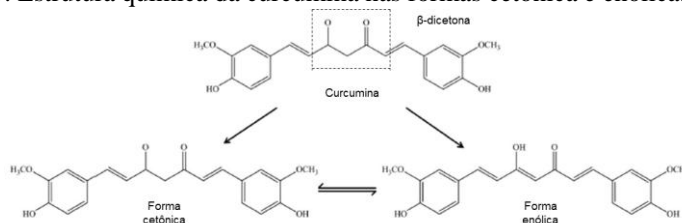


Fonte: Braga, (2002)

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dien 3,5 diona) é o pigmento ativo de maior concentração, de 2-5 %, nos rizomas secos, sendo extensivamente estudado com mais de 5600 citações (AGGARWAL et al., 2013). Esse polifenol hidrofóbico apresenta baixa massa molecular (368,37 g/mol) e ponto de fusão de aproximadamente 183 °C e baixa solubilidade em água (0,6 ug/mL). Além disso, a curcumina possui

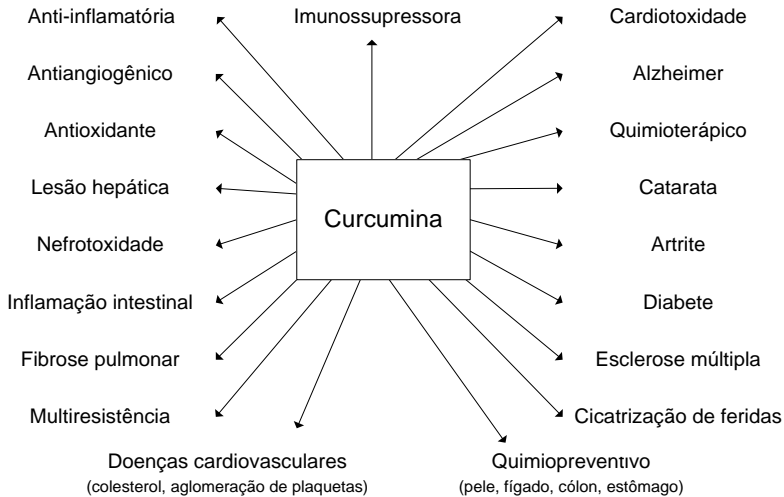
um pico de absorção visível em 420 nm e, é capaz de emitir fluorescência verde quando excitada em 430 nm (LEE et al., 2013; SARKAR; HUSSAIN, 2016). Sua estrutura química é composta por dois anéis metoxifenóis, que são simetricamente ligados em conjugação através da porção β -dicetona, que confere propriedades interessantes. A estrutura β -dicetona é responsável pela transferência intramolecular do átomo de hidrogênio que conduz esta molécula a um tautomerismo ceto-enol (Figura 2.3). Em pH de 3-7 a forma cetônica predomina, enquanto em pH acima de 8 a forma enólica é predominante (PRIYADARSINI, 2009).

Figura 2.3. Estrutura química da curcumina nas formas cetônica e enólica.



Fonte LEE et al., 2013.

Devido às suas características químicas de afetar diferentes alvos moleculares, a curcumina tem sido reconhecida como agente pleiotrópico (pode atuar sobre diferentes tipos celulares) (JEENGER et al., 2015). Assim, inúmeras pesquisas têm sido realizadas demonstrando seu potencial terapêutico como: inibir e induzir importantes enzimas que regulam os processos anti-inflamatórios e antioxidantes (MUKHOPADHYAY et al., 1982; PULLA REDDY; LOKESH, 1994; BROUET; OHSHIMA, 1995; MENON; SUDHEER, 2007), no combate de células cancerígenas pela geração de espécies de oxigênio reativas (CHEN et al., 2006a, 2006b; DIVYA; PILLAI, 2006) e entre outras que são demonstradas na Figura 2.4.

Figura 2.4. Propriedades funcionais da curcumina.

Fonte- Aggarwal et al. (2010).

Devido aos inúmeros casos de doenças transmitidas por alimentos, a propriedade antimicrobiana da curcumina é de grande interesse para controlar e/ou reduzir a incidência de contaminação microbiana. Dessa maneira, a curcumina pode ser aplicada em alimentos como produtos cárneos na quantidade de 0,02 mg/g de produto de acordo com a Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998 e tem um limite diário de consumo de 3 mg/kg de massa segundo o comitê conjunto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) de peritos em aditivos alimentares (JECFA).

A oleoresina de cúrcuma pode ser extraída por técnicas convencionais como, extração Soxhlet, sonicação e extração líquido-líquido usando acetona, metanol, etanol e isopropanol como solventes orgânicos. Também, uma outra alternativa de obter a oleoresina é a utilização da extração com fluido supercrítico (EFS), e em seguida, um processo integrado realizado para a extração dos curcuminoides com líquido pressurizado usando etanol como solvente (OSORIO-TOBÓN et al., 2014). Dos processos de extração são gerados resíduos de cúrcuma que contêm cerca de 30-50% de amido e traços de oleoresina e curcuminoides (coloração amarela), sendo classificados como um amido especial com alto potencial comercial (BRAGA;

MORESCHI; MEIRELES, 2006). Dessa maneira, o resíduo de cúrcuma pode ser utilizado como base polimérica para produção de filmes ou revestimentos comestíveis com propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas uma vez que possui em sua matriz curcumina (MANIGLIA et al., 2014, 2015).

Alguns estudos foram realizados para determinar a concentração mínima inibitória de curcumina para patógenos alimentares como: bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*) e fungos (*Penicillium notatum* e *Aspergillus niger*) e apresentaram resultados que variam de 100-400 µg/mL (BHAWANA et al., 2011; SANDIKCI ALTUNATMAZ et al., 2016).

Gul; Bakht (2015) aplicaram extrato de cúrcuma em combinação com tratamento térmico em refeições prontas para o consumo e obtiveram um alimento seguro e livre de contaminação microbiológica durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Outro estudo utilizou curcumina nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0% em carne moída para inibir o crescimento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Os autores concluíram que adição de curcumina alterou significativamente a contagem das bactérias, contudo as doses de 0,5% e 1,0% de curcumina foram as melhores aceitas sensorialmente (SANDIKCI ALTUNATMAZ et al., 2016). Mais recentemente Musso; Salgado; Mauri, (2017) utilizaram curcumina para produção de embalagem de alimentos inteligente, no qual seria possível informar aos consumidores se o produto está adequado para o consumo através da sua capacidade detectar alterações de pH pela mudança da cor da embalagem.

2.2. Salsicha

O processo de preservação de carne por meio da trituração, adição de sais, temperos, especiarias e embutimento em tripas de animais remonta milhares de anos, para os antigos gregos e romanos. A palavra salsicha foi derivado da palavra latina “*salsus*” que significa salgados, ou conservados em salga. Com o passar do tempo, o aperfeiçoamento nos processos e variações em ingredientes obtiveram salsichas com uma grande variedade de sabores, texturas e formas (HUI, 2012).

Segundo denominação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2000), a salsicha é um produto cárneo industrializado, formulado com carnes de diferentes espécies e miúdos

comestíveis, embutida em um envoltório natural ou artificial ou por processo de extrusão e submetida a um processo térmico adequado. Poderá ter como processo alternativo o tingimento, depilação, defumação e a utilização de recheios e molhos.

A produção de salsicha é realizada conforme as seguintes etapas: preparação da massa; embutimento, cozimento, resfriamento, depelagem, tingimento e empacotamento. Na preparação da massa todos os ingredientes cárneos e não cárneos são pesados e moídos em tamanhos específicos para obter partículas pequenas e uniformes. Em seguida, os ingredientes são adicionados no *cutter* no qual sofrem o processo de mistura e cominuição até obtenção de uma massa fina e lisa. Nessa etapa acontece a extração das proteínas miofibrilares por sua solubilidade em soluções de alta força iônica, as quais são responsáveis pelas propriedades de capacidade de retenção de água, emulsificação e ligação de gordura. Após a obtenção da massa é realizado o embutimento em envoltórios naturais ou artificiais e em seguida o produto é submetido a tratamento térmico. O cozimento da salsicha tem como objetivo aumentar as características de aroma, cor, consistência e eliminar as bactérias patogênicas e deteriorantes. O processo é realizado até que o produto alcance uma temperatura interna de 72 °C, acompanhado pela inserção de termopares no centro do produto. Após o cozimento, as salsichas sofrem um banho de água fria para manterem a umidade e cessarem o processo de cozimento. O banho também ajuda a prevenir o encolhimento e enrugamento do produto. Os próximos passos são: depelagem, que acontece para os produtos embutidos com tripa artificial; tingimento e empacotamento a vácuo (HUI, 2012).

A resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, estabelece os critérios de padrões microbiológicos para caracterização dos micro-organismos e/ou suas toxinas consideradas de interesse sanitário para produtos cárneos embutidos, sendo: bactérias termotolerantes, clostrídios sulfito redutores e estafilococos coagulase positiva num limite de tolerância máxima de 10^3 , 3×10^3 e 5×10^2 UFC (unidades formadoras de colônias) /g, respectivamente, e ausência de *Salmonella*. Entretanto, para *Listeria monocytogenes* a legislação brasileira somente exige ausência em queijos. Por outro lado, baseado em avaliações de risco microbiológicos, a OMS e a FAO enfatizam que devem ser estabelecidos níveis máximos para a presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, devido às altas taxas de letalidade (20-30%) causada pela contaminação de produtos (FAO/WHO, 2001; ROCOURT et al., 2003). Dessa maneira, a salsicha, que é um alimento cozido, estando inclusa na categoria de produtos prontos para o consumo,

caso os limites de contagens microbiológicas para *L. monocytogenes* forem estabelecidos, a indústria de alimentos brasileira deverá se adequar às novas normas (MARTINS; LEAL GERMANO, 2011).

Há relatos mundialmente de vários surtos de listeriose devido ao consumo de produtos processados (THÉVENOT et al., 2005). Na Europa, a contaminação por *L. monocytogenes* afetou aproximadamente 2.200 pessoas em 2015 causando 270 mortes, sendo o maior número anual de mortes reportado desde 2008 (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016). Nos Estados Unidos, de acordo com centros de controle e prevenção de doenças (CDC), de 1998 a 2015 ocorreram 818 contaminações por *L. monocytogenes*, ocasionando 121 mortes (BUCHANAN et al., 2017). No Brasil não há relatos de surtos, porém *L. monocytogenes* tem sido isolada de uma variedade de alimentos tais como: queijo (DA SILVA; HOFER; TIBANA, 1998; SILVA et al., 2003; ABRAHÃO et al., 2008; BARANCELLI et al., 2011; IN LEE et al., 2017) salame/presunto (BORGES et al., 1999; MARTINS; LEAL GERMANO, 2011; ARAÚJO et al., 2012), linguiça/carne moída (BARROS et al., 2007; MIYASAKI et al., 2009), frutas e hortaliças (SANT'ANA et al., 2012).

Os surtos ocorridos por contaminação de alimentos pela *L. monocytogenes* são na sua grande maioria provocados por contaminação cruzada de equipamentos e ambientes na indústria de alimentos não higienizados de maneira adequada (BRASILEIRO et al., 2016). Com isso, o fato da bactéria apresentar algumas características essenciais para o seu desenvolvimento em diferentes condições tais como: resistência à alta concentração de sal (acima de 10 %), capacidade de sobreviver e crescer em alimentos refrigerados, ambientes aeróbicos e anaeróbicos, ampla faixa de pH (4,6-9,4), dificulta o controle do micro-organismo no ambiente de processamento de alimentos (MAGALHÃES et al., 2016).

2.3. Coberturas comestíveis

Polímeros de fontes renováveis têm atraído cada vez mais atenção ao longo das últimas duas décadas, principalmente devido a uma crescente conscientização da interconexão de fatores ambientais, princípios de sustentabilidade, ecologia industrial, ecoeficiência e engenharia (YU; CHEN, 2009).

Revestimentos e filmes comestíveis são aplicados no exterior do alimento de modo que o produto final seja apropriado para o consumidor. Entretanto, um filme é diferenciado de um revestimento, porque filme é um

material de embalagem independente, enquanto que um revestimento é diretamente aplicado e formado na superfície do alimento e deve atender diversos requisitos quanto aos aspectos legais e de segurança. Além disso, durante o armazenamento não devem fermentar, coagular, separar, desenvolver aromas desagradáveis, e outras formas de deterioração (MITTAL, 2012).

As características que os revestimentos e filmes comestíveis apresentam quando forem elaborados e aplicados são: espalhamento uniforme, boa aderência, secagem rápida e não formação de espumas. Uma vez aplicado, não deve quebrar, descolorir, desprender, ser pegajoso ou aderir na embalagem, prejudicar a qualidade sensorial e reagir com o alimento de maneira negativa, durante o manuseio e armazenamento (BALDWIN; HAGENMAIER, 2011).

Em cada alimento acontece pelo menos um fenômeno de transferência de massa, seja migração de umidade, intrusão de oxigênio, perda ou ganho de aroma e sabor. Entretanto, a aplicação de filmes ou revestimentos comestíveis nos alimentos têm como objetivo permitir ou restringir a troca de gases, aromas voláteis e vapor de água (BALDWIN; HAGENMAIER, 2011). Além disso, podem ser incorporados na matriz polimérica compostos bioativos que são liberados ao produto para promover um controle do crescimento microbiano e prolongamento da vida de prateleira (PAVLATH; ORTS, 2009).

Geralmente, polissacarídeos, proteínas e lipídeos são os principais biopolímeros empregados para produzir revestimentos comestíveis, e denominados de funcionais ou ativos quando combinados com agentes antioxidantes ou antimicrobianos (YU; CHEN, 2009).

Carne e produtos cárneos são altamente suscetíveis à oxidação lipídica, provocando rápido desenvolvimento de rancidez ou sabor oxidado. Segundo Gennadios; Hanna; Kurth, 1997, a utilização de revestimentos comestíveis em produtos cárneos oferece alguns benefícios como: redução na perda de umidade durante o tempo de armazenamento das carnes frescas ou congeladas; prevenção da exsudação quando esses produtos são embalados em bandejas de plástico de varejo; diminuição da oxidação da mioglobina; redução da deterioração e de micro-organismos patogênicos; desaceleração da rancificação e descoloração. Compostos antimicrobianos e antioxidantes quando aplicados nas matrizes dos polímeros melhoram a qualidade nutricional e retardam o crescimento de micro-organismos nos alimentos revestidos.

2.3.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros de cadeias longas que apresentam alta solubilidade em água, ampla disponibilidade e baixo custo. Essas substâncias podem apresentar boa barreira ao oxigênio devido ao seu bom estado de compactação da matriz polimérica, porém não apresentam boa barreira ao vapor de água devido a sua natureza hidrofílica. Esses compostos têm várias funções diferentes, tais como adesividade, capacidade de formação de gel, e a sensação de gosto adocicado na boca (SOLIVA-FORTUNY; ROJAS-GRAU; MARTÍN-BELLOSO, 2011).

Vários tipos de materiais existentes nessa área estão sendo estudados devido à sua capacidade inerente de se decompor no meio ambiente. Dentre os polissacarídeos mais utilizados na formação de coberturas ou blendas poliméricas estão os derivados hidrossolúveis de celulose (PASTOR et al., 2011), amido (BERTUZZI et al., 2007), quitosana (DUTTA et al., 2009), entre outros.

Amido é o mais abundante polissacarídeo de reserva em vegetais e, como tal, é um recurso renovável de uso prático em grande escala. Amido é biodegradável, produzido em abundância a baixo custo e exibe comportamento termoplástico. A fonte botânica do amido são as sementes, raízes e tubérculos, nos quais é armazenado intracelularmente em forma de grânulos esféricos com diâmetro variando de 2-100 μm (YU; CHEN, 2009). As principais fontes comerciais de amido são milho, batata e mandioca. No entanto, há um número significativo de espécies que têm alto conteúdo de amido, incluindo legumes (ervilha, feijão, grão de bico, lentilhas), grãos (amaranto, quinoa, arroz, aveia,) e várias amêndoas (nozes pecan, castanhas, amendoins, sementes de girassol e gergelim). As propriedades do amido dependem da fonte, distribuição e morfologia do grânulo, genótipo, razão de amilose/amilopectina e outros fatores como composição, pH, e qualquer modificação química. Em produtos à base de amido, a gelatinização e o comportamento reorganizacional controlam a textura e a estabilidade do produto final (VÁZQUEZ; FORESTI; CYRAS, 2011).

Os grânulos de amido têm dois principais componentes, amilose e amilopectina, constituídos de ligações α (1 \rightarrow 4) ligados à unidade de D-glicose. A estrutura linear da amilose faz um comportamento próximo ao dos polímeros sintéticos convencionais. A massa molecular é de aproximadamente 10^6 g/mol dependendo da fonte e processo empregado na extração do amido, no qual é 10 vezes maior que uns polímeros sintéticos convencionais (VÁZQUEZ; FORESTI; CYRAS, 2011). Por outro lado, a

amilopectina é um polímero com estrutura composta por uma parte ramificada com ligações α (1 \rightarrow 6) e uma parte linear com ligações α (1 \rightarrow 4). Medições de dispersão de luz indicam uma massa molecular em ordem de grandeza entre 10^7 - 10^9 g/mol (YU; CHEN, 2009).

Os grânulos de amido exibem estruturas cristalinas e amorfas, no qual amilopectina é o maior constituinte cristalino, enquanto amilose e ramificações de amilopectina formam a parte amorfa. A estrutura nativa do amido é constituída de hélices que estão organizadas mais ou menos radialmente formando um granulado, com anéis concêntricos que representam membranas semicristalinas separadas por regiões essencialmente amorfas (VÁZQUEZ; FORESTI; CYRAS, 2011). O amido de cúrcuma apresenta uma conformação tipo B (moléculas de amilopectina com mais de 22 unidades de glicose) e possui uma superfície lisa com forma elíptica regular. Em sua composição tem 52% de amilopectina e 48% de amilose e apresenta baixa viscosidade para dispersões aquosas (BRAGA; MORESCHI; MEIRELES, 2006; KUTTIGOUNDER; LINGAMALLU; BHATTACHARYA, 2011).

As fontes de amido exibem diferentes características físico-químicas e o amido proveniente desta pode ser aplicado em diferentes objetivos em alimentos. Por exemplo, amidos com alto teor de amilose são amplamente utilizados na produção de lanches fritos para criar crocância e brilho. Além disso, o amido rico em amilose é agente gelificante fortemente aplicado em produção de geleias e de confeitaria. Outras características observadas em amidos com alta concentração de amilose são transparência, flexibilidade, resistência à água e à tração (HAUSMANN; BROER, 2011).

2.3.2 Proteína

A proteína é uma das três macromoléculas essenciais do sistema biológico e pode ser facilmente encontrada em plantas e animais. Elas possuem aproximadamente 20 aminoácidos, que podem ser neutros, básicos (lisina) e ácidos (ácido aspártico), no qual contém um grupo amina (NH_2) e um grupo carboxil (COOH) ligado a um átomo de carbono central. Os grupos laterais ligados ao carbono central conferem caráter único aos aminoácidos que exibem diferentes polaridades (apolar e/ou polar) e cargas (positivo e/ou negativo) (KROCHTA, 2002; YU; CHEN, 2009).

Muitas proteínas contêm de 100-500 aminoácidos. A organização sequencial dos aminoácidos determinará a estrutura primária. As diferentes estruturas ao longo da cadeia polimérica (estrutura secundária) são baseadas

entre as ligações entre as unidades de aminoácidos como: força de Van der Waals, interações eletrostáticas, ponte de dissulfeto, ligação covalente e pontes de hidrogênio. A estrutura terciária da proteína reflete como as estruturas secundárias organizam-se em relação a outra, com base nos mesmos tipos de interação, para formar uma estrutura globular, fibrosa, ou estrutura de proteína aleatória. Finalmente, a estrutura quaternária ocorre quando as proteínas inteiras interagem umas com as outras em associação para proporcionar uma única estrutura ou uma atividade metabólica. Essas estruturas podem ser facilmente modificadas para otimizarem a configuração e interação da proteína, no qual resultam as propriedades dos filmes (KROCHTA, 2002; PÉREZ-GAGO, 2011).

Materiais de base proteica que são utilizados para formar filmes e revestimentos comestíveis podem ser de fontes animais (colágeno, gelatina, proteína miofibrilar de peixe, queratina, proteína da clara de ovo, caseína e soro do leite) e vegetais (zeína, glúten de trigo, proteína de soja, amendoim e proteína de sementes de algodão). A escolha da fonte dependerá da característica do alimento a ser aplicado e disponibilidade da matéria (KROCHTA, 2002).

A gelatina é o resultado de uma parcial hidrólise do colágeno. Esse processo envolve aquecimento lento em meio ácido (gelatina A) ou básico (gelatina B). Uma vez que se origina do colágeno, os principais aminoácidos encontrados na gelatina são prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina. Estes biopolímeros são de grande interesse por ser uma matéria-prima abundante, baixo custo, possui excelente propriedade filmogênica e biodegradável. As características de filmes e revestimentos comestíveis formados a partir de gelatina exibem boas propriedades de retenção de gás, aromas, porém baixa barreira ao vapor de água (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009; GÄLLSTEDT; HEDENQVIST; TURE, 2011; PÉREZ-GAGO, 2011).

2.4. Propriedades dos filmes comestíveis

2.4.1 Propriedades mecânicas de filmes

O conhecimento das propriedades mecânicas dos filmes comestíveis é importante para garantir a proteção do alimento revestido durante o transporte, manuseio e armazenamento. Filmes que apresentam resistência mecânica e flexibilidade adequadas podem se adaptar às eventuais

deformações dos alimentos, sem causar danos a sua integridade (YANG; PAULSON, 2000; OZDEMIR; FLOROS, 2008).

As propriedades mecânicas dos filmes comestíveis podem ser determinadas por teste de tração. O ensaio consiste no filme fixado entre as extremidades de duas garras e a sua separação a uma velocidade constante sendo monitorada a força e deformação até que a amostra se rompa (SARANTÓPOULOS et al., 2002). As propriedades mecânicas avaliadas para medir a resistência dos filmes são: Tensão de ruptura (TS) é a força máxima que o filme suporta antes de romper. Alongamento na ruptura (EAB) é o comprimento máximo que o filme aumenta durante o ensaio, sendo que, o resultado é expresso em porcentagem em relação ao seu comprimento inicial. Módulo de elasticidade ou de Young (YM) está relacionado com a rigidez do filme, é a relação entre a resistência à tração e a porcentagem de alongamento na região linear da curva de tração por deformação.

Segundo Hosseini et al. (2013), uma matriz polimérica de polissacarídeo possui maior rigidez e tensão de ruptura e menor alongamento do que uma matriz proteica. Essas diferenças estão associadas com a estrutura molecular, na qual os polissacarídeos apresentam uma cadeia linear, enquanto as proteínas apresentam uma estrutura mais complexa com interações inter e intramoleculares dos grupos radicais.

Coughlan et al. (2004) adicionaram polissacarídeos em uma matriz proteica e obtiveram filmes com maior rigidez, alongamento e tensão de ruptura, enquanto outros autores afirmaram que acrescentar gelatina em filme de amido permite obter o mesmo resultado nas propriedades mecânicas encontradas pelo autores citados anteriormente, (TONGDEESOONTORN et al., 2012). Esses resultados podem ser atribuídos à formação da interação de pontes de hidrogênio entre grupamento OH^- do polissacarídeo e o grupamento NH_3^+ da proteína.

2.4.2 Propriedades de barreira de filmes

Os filmes devem proteger os alimentos contra danos físicos e dificultar a passagem de gases, vapor de água, luzes e odores do ambiente externo para o interior do produto (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Visto que a principal função de filmes ou revestimentos comestíveis é geralmente impedir a transferência de umidade do alimento para ambiente externo, a permeabilidade ao vapor de água é a propriedade mais estudada por muitos grupos de pesquisas (GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1996). Muitos estudos demonstram que filmes hidrofílicos têm sua permeabilidade ao vapor

de água afetada pelo teor de plastificante, concentração de lipídeos adicionada, pH, tipo de polímero (polissacarídeo, proteína) e condições ambientais (temperatura e umidade relativa) (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992; GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1996; MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008). O conhecimento da permeabilidade ao vapor de água é importante para evitar ganho ou perda de umidade do produto. Um filme com uma apropriada permeabilidade ao vapor de água protege o alimento contra crescimento microbiano e alterações físico-químicas e organolépticas (GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1996).

De acordo com Al-Hassan; Norziah, (2012), Fakhouri et al., (2013) e Fakhouri et al., (2015), a mistura de gelatina e amido resulta em um valor de maior permeabilidade ao vapor de água quando a concentração de gelatina está em maior proporção. Os autores explicam que esse fenômeno acontece devido a gelatina ser mais higroscópica que o amido. Sendo assim, a afinidade para moléculas de água será mais elevada nestes filmes e, conseqüentemente, resultando uma maior difusão de água nos filmes.

2.4.3 Propriedades térmicas

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma das técnicas mais populares para análise térmica de matérias poliméricas (SCHAWWE, 2015). O DSC é um aparelho de análise térmica que mede como as propriedades físicas (fusão, sublimação, transição vítrea, decomposição) de uma amostra mudam com o aumento ou diminuição regulada da temperatura. Em outras palavras, o dispositivo é um instrumento de análise térmica que determina a temperatura e o fluxo de calor associados com as transições dos materiais em função do tempo e da temperatura (GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010). Os principais dados fornecidos pela análise térmica de DSC para polímeros são: temperatura de fusão (T_f), cristalização, transição vítrea (T_g) (ponto de transição entre o estado vítreo e o borrachoso) e calor de transição (entalpia) (SCHICK, 2009).

A compatibilidade dos componentes nos filmes obtidos pode ser observada pela análise dos termogramas. A mistura de dois polímeros imiscíveis é apresentada com separação do pico de fusão durante o processo de aquecimento, indicando que cada componente cristaliza individualmente (BHATIA et al., 2007; ZOUBARI et al., 2017). Uma completa miscibilidade da mistura de dois polímeros é identificada pela ocorrência de pico endotérmico nos termogramas de DSC (HOSSEINI et al., 2013). Além disso, a análise do termograma de DSC possibilita determinar a temperatura de

transição vítrea (T_g) do polímero, a qual está associada com a mobilidade segmental das moléculas. Abaixo da T_g , o polímero não tem energia suficiente para deslocar uma cadeia em relação a outra por mudanças conformacionais, apresentando-se duro, rígido e quebradiço no estado vítreo. Acima da T_g (estado elastômero) há uma maior mobilidade das cadeias poliméricas, devido a um aumento dos espaços vazios na matriz, tornando o material mais flexível (YOSHIOKA; HANCOCK; ZOGRAFI, 1994).

2.5. Aplicação de revestimento comestíveis em salsicha

Para indústria de alimentos, a qualidade de produto cárneo processado é dependente da degradação química e de deterioração microbiológica (SIRIPATRAWAN; NOIPHA, 2012). Para o consumidor, o produto deve apresentar características organolépticas satisfatórias, oferecer compostos que possam ajudar a reduzir doenças e conseguir se conservar o máximo de tempo possível sem perder a qualidade (ZAMUDIO-FLORES et al., 2015). Com isso, um crescente interesse no uso de revestimento comestível como uma tecnologia emergente para complementar os procedimentos de preservação empregados pela indústria de alimento é uma alternativa para aumentar a inocuidade dos alimentos, manter as propriedades organolépticas dos produtos e estender a vida de prateleira (BLANCO-FERNANDEZ et al., 2013).

A pesquisa na aplicação de filmes e revestimentos comestíveis em produtos cárneos para aumentar a vida de prateleira vem crescendo nos últimos anos. Segundo Cagri; Ustunol; Ryser, (2002), Cagri et al., (2003) e Gadang et al., (2008), a aplicação de filme comestível à base de isolado proteico do soro com incorporação de diversos antimicrobianos (ácido p-aminobenzoico (PABA), ácido ascórbico, ácido málico, nisina, extrato de sementes de uva e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)) em diferentes tipos de salsicha apresentaram o efeito inibitório para os micro-organismos: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella entérica*, bactéria mesófila aeróbica, bactéria ácido láctica e fungos/leveduras. Nguyen; Gidley; Dykes, (2008) utilizaram filmes comestíveis de celulose com adição de nisina para revestir salsicha Frankfurt e demonstraram o controle do crescimento bacteriano de *Listeria monocytogenes* e aeróbicos totais em 14 dias de armazenamento a 2 °C. Outro trabalho inibiu crescimento de aeróbios totais, bactérias ácido lácticas, fungos e leveduras em salsicha por 20 dias armazenados a 4 °C com a aplicação de filme comestível de quitosana adicionado de extrato de chá verde (SIRIPATRAWAN; NOIPHA, 2012).

Mais recentemente, foi utilizado filme comestível de amido com nanopartículas de prata em salsicha para controlar o crescimento de bactérias ácido lácticas por 15 dias a 10 °C (MARCHIORE et al., 2017). Dessa maneira, os trabalhos expostos demonstraram um alto potencial para aplicação de revestimento comestível em salsicha, de diferentes matrizes poliméricas (polissacarídeos ou proteína), com adição de um composto antimicrobiano para manter a qualidade e estender a vida de prateleira.

2.6. Migração de compostos ativos em filme ou revestimento comestível.

Migração é o processo de transferência de massa pelo qual substâncias de baixa massa molecular inicialmente presentes nas embalagens são liberadas para o ambiente ou para produto em contato com a embalagem. Este é um processo crítico, pois o controle de liberação de compostos antioxidantes e/ou antimicrobianos da embalagem para o alimento permitirá uma proteção e extensão da vida útil do produto (HWANG et al., 2013). Com isso, o conhecimento de difusão de pequenas moléculas em biopolímeros sobre várias condições externas é de grande importância para aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentos e de embalagens (KARBOWIAK et al., 2008).

A transferência de massa de várias moléculas (água, soluto, agentes corantes, compostos aromáticos) pode ocorrer entre o alimento e o ambiente exposto, ou entre diferentes fases do produto alimentar. Essas transferências de moléculas podem levar à instabilidade físico-química, bioquímica e microbiológica, no qual posteriormente produzirão modificações da aceitação sensorial do alimento, no que diz respeito à textura, cor, sabor e gosto (KARBOWIAK et al., 2009). Dessa maneira, a migração de moléculas pode ser limitada com a inserção de embalagem comestível entre o alimento e o ambiente em que o alimento será exposto (atmosfera modificada, meio ambiente, embalagem primária, etc.) (KARBOWIAK et al., 2009). Com isso, as embalagens comestíveis têm como função controlar a passagem de água, gases (oxigênio, gás carbônico, entre outros compostos aromáticos) e/ou transportar compostos bioativos (antimicrobianos e antioxidantes) da embalagem para o alimento (MIN; RUMSEY; KROCHTA, 2008).

Os métodos utilizados para determinação da difusividade de pequenas moléculas em embalagens (comestíveis ou sintéticas) de alimentos podem ser divididos em duas categorias: indireto e direto. No método indireto (escala macroscópica), as embalagens que contêm inicialmente as moléculas difusoras são colocadas em contato com fase receptora (geralmente uma fase

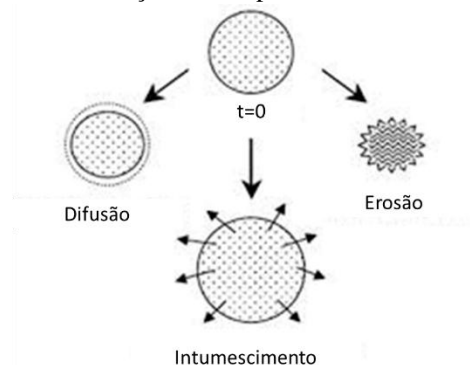
líquida ou gel). A partir da evolução temporal, a concentração de molécula no receptor é determinada por métodos analíticos como: gravimetria, volumetria e instrumentais (espectrofotometria, cromatografia, condutivimetria, microscopia, etc.). O método direto é realizado monitorando o movimento das partículas na matriz em tempo real, sem uso de uma fase receptora. As medidas são efetuadas em escala microscópica por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) ou recuperação da fluorescência após fotodegradação (FRAP) (PAYET et al., 2008).

2.6.1 Migração da curcumina do filme ou revestimento comestível em escala macroscópica.

Um dos maiores desafios da ciência da embalagem de alimentos é o monitoramento de compostos ativos que migram de materiais de embalagem para os alimentos (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Entretanto, o acompanhamento da migração de substâncias é realizado através de testes em alimentos ou fluido simulador de alimento (FSA). Esses testes são realizados em condições específicas de tempo e temperatura, de acordo com as características de uso e armazenamento do produto e de que maneira o alimento será embalado (GRANDA-RESTREPO et al., 2009).

Os mecanismos de liberação controlada de composto ativo de um material polimérico são: difusão, intumescimento e erosão (Figura 2.5). Um sistema controlado por difusão acontece quando o composto ativo dissolve nos canais preenchidos por água ou através da estrutura polimérica. No caso do intumescimento, o polímero absorve água e as redes poliméricas tornam-se afastadas permitindo que o composto seja liberado por difusão. No sistema controlado por erosão, o composto é liberado após a degradação e erosão da matriz polimérica. Dependendo do sistema (polímero / composto ativo) e das condições ambientais, um dos mecanismo pode prevalecer (FREDENBERG et al., 2011; SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

Figura 2.5. Mecanismo de liberação de composto ativo em matriz polimérica.



Fonte. JAWAHAR; MEYYANATHAN, 2012.

O processo de migração de uma substância ativa a partir de uma rede polimérica para um FSA ocorre em duas fases. A primeira etapa, as moléculas de água da solução exterior penetram e difundem para o interior do filme. Consequentemente, as malhas de rede polimérica tornam-se cada vez espaçadas, permitindo a difusão do agente ativo através do filme para a solução externa até se atingir um equilíbrio químico entre as duas fases (BUONOCORE et al., 2003; IMRAN et al., 2014). A taxa de migração dependerá da composição química e estrutura (densidade, cristalinidade e ramificação) do polímero, da afinidade do composto ativo com o polímero ou FSA, concentração do composto ativo, massa molecular, solubilidade, polaridade, tempo e temperatura (CANELLAS et al., 2010; FERNANDO; LOW; AHMAD, 2011).

A composição química afeta o nível de compatibilidade com o FSA, e, portanto, a sorção. Um polímero lipofílico não polar absorve preferencialmente substâncias orgânicas não polares, enquanto um polímero hidrofílico polar será propenso a atrair água e compostos polares. Além disso, os compostos ativos passam pelos espaços vazios e outras lacunas do polímero, com isso a taxa de migração dependerá, em grande parte, do volume molecular e da forma dos compostos ativos, do tamanho e número de lacunas no polímero. As propriedades termodinâmicas dos compostos ativos como polaridade e solubilidade influenciam no transporte de massa devido à interação entre o polímero, o composto ativo e o FSA. Por exemplo, se o composto ativo tem uma baixa solubilidade no FSA não ocorrerá migração (GAVARA; CATALÁ, 2002; HELMROTH et al., 2002).

Para a realização de teste de liberação de um composto ativo é utilizado um FSA que representa as principais propriedades físico-químicas dos alimentos, simulando o comportamento de um grupo de alimentos que têm características semelhantes (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Diferentes fluidos simuladores de alimentos têm sido identificados e aprovados pelo *Food and Drug Administration's* (FDA's) para teste de migração. Os fluidos disponíveis para alguns produtos alimentícios incluem: água (para produtos à base de água); ácido acético a 3% (produtos ácidos); etanol a 50% (para produtos lácteos) e etanol a 95% e isooctano para alimentos gordurosos (USFDA, 2007).

A fim de avaliar o transporte de substância ativa na matriz polimérica, o uso de modelos matemáticos possibilita a compreensão dos mecanismos de transferência de massa. A partir de dados experimentais de liberação de compostos ativos para um FSA, pode ser realizada a determinação de parâmetros específicos do sistema (PINHEIRO et al., 2013). Vários autores propuseram relações matemáticas para descrever o mecanismo de liberação de compostos, incluindo modelos empíricos e mecanísticos. O primeiro modelo matemático é puramente descritivo e seus parâmetros não são baseados em fenômenos físicos, químicos e biológicos reais. Entretanto, modelos mecanísticos são baseados em fenômenos reais, como difusão, dissolução, intumescimento, erosão e degradação que permitem uma maior compreensão dos fenômenos do sistema de liberação (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

Em materiais poliméricos, a liberação de um composto ativo pode ser controlada pelo mecanismo de difusão, ou seja, é o processo pelo qual a matéria é transportada de uma parte de sistema para outra como um resultado dos movimentos moleculares aleatórios. A lei de Fick de difusão para substâncias isotrópicas é baseada na hipótese de que a taxa de transferência do composto ativo por unidade de área de seção é proporcional ao gradiente de concentração medido normal à seção (CRANK, 1975).

$$j = -D \frac{d\rho}{dx} \quad (2.1)$$

sendo j é o fluxo mássico ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), ρ é a concentração mássica (g/m^3), x a posição (m) e D é o coeficiente efetivo de difusão do composto ativo através do filme (m^2/s). Combinado a equação da primeira lei de Fick e a equação da continuidade para o composto ativo sem reação química, considerando uma placa plana e D constante obtemos a Equação 2.2 (CRANK, 1975):

$$\frac{\partial \rho(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \rho(x, t)}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

em que t representa o tempo (s).

A Equação 2.2 pode ser resolvida considerando que: 1) tanto difusão de água e o relaxamento da matriz macromolecular são mais rápidos que a difusão do composto ativo através da rede intumescida; 2) o aumento do filme devido ao intumescimento é desprezível; 3) a concentração inicial do composto antimicrobiano no FSA é zero; 4) o composto ativo está uniformemente distribuído e sua concentração está abaixo da concentração de saturação do sistema (volume infinito). Sobre essas condições, a Equação 2.2 é resolvida em termos da concentração mássica média, integrada na posição como apresentado na Equação 2.3 (MASTROMATTEO et al., 2009):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[\frac{-D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4l^2} \right] \quad (2.3)$$

em que M_t (g), é a massa do composto antimicrobiano liberado do filme num tempo t , M_∞ (g) é a massa do composto antimicrobiano no tempo t no infinito e l a espessura do filme (μm).

A tabela 2.1 apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura de migração de compostos antimicrobianos de filmes comestíveis para fluidos simuladores de alimentos, afim de demonstrar os fatores que influenciam a liberação. O mecanismo de liberação do composto ativo para o FSA apresentado na literatura usaram a solução analítica da lei de Fick para obtenção do coeficiente de difusão, com ordem de grandeza entre 10^{-7} a 10^{-13} cm^2/s e o mecanismo foi controlado por difusão.

Tabela 2.1. Trabalhos encontrados na literatura de diferentes matrizes de filmes comestíveis adicionadas de compostos antimicrobianos com alguns valores do coeficiente de difusão em diferentes fluidos simuladores de alimentos.

Polímero	Composto ativo	FSA	Principais resultados	Coefficiente de difusão (cm ² /s)	Referência
Quitosana	Lauril arginato (LAE)	Água	Quanto maior a concentração do composto mais lenta é a liberação	4°C - 5.4x10 ⁻¹⁰ - 8.9x10 ⁻¹⁰ 28°C 10.6x10 ⁻¹⁰ -13.4x10 ⁻¹⁰	(HIGUERAS et al., 2013)
Quitosana	Carvacrol	Óleo e etanol 96%	Liberação mais rápida em etanol do que óleo	Não determinado o valor	(FERNÁNDEZ-PAN et al., 2015)
Quitosana	Limoneno	Água, 10%, 50% e 95% etanol e iso-octano)	Não houve liberação em iso-octano.	Não determinado o valor	(SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011)
Quitosana	Resveratrol	Etanol 50%	40% de liberação em 24h e mais 40% até o quinto dia.	Não determinado o valor	(BLANCO-FERNANDEZ et al., 2013)
Quitosana	Extrato de groselha	Água	Porcentagem de extrato liberado diminuiu com aumento da concentração	Não determinado	(MAYACHIEW; DEVAHASTIN, 2010)
Quitosana e gelatina de peixe	Quercetina	Etanol 30%	Não houve diferença significativa aplicando irradiação no filme	1.94-2.51 x10 ⁻⁹	(BENBETTAÏEB et al., 2016b)

Quitosana e gelatina de peixe	Tirosol e ácido ferúlico	Água	Tirosol maior liberação que ácido ferúlico	Tirosol 67×10^{-8} ácido ferúlico 1.68×10^{-8}	(BENBETTAÏEB et al., 2016a)
Quitosana	Ácido acético (AC) e ácido propanóico (AP)	Água com fosfato de sódio 0.2M	O pH não apresentou efeito, mas adição de óleo diminuiu o coeficiente de difusão	AC-1.19- 2.59×10^{-8} AP-0.91- 1.87×10^{-8}	(OUATTARA et al., 2000)
HPMC, quitosana (CTS), caseinato de sódio (CS) e PLA	Nisina	Etanol 95%	Quitosana e PLA não apresentaram diferença significativa variando a temperatura	4°C- HPMC- 49.3; CTS- 1.97; SC- 1.27; PLA- 2.01×10^{-13}	(IMRAN et al., 2014)
PLA	Resveratrol	Etanol 100%	Mostrou a influência da temperatura no coeficiente de difusão	3.47×10^{-13} 8.26×10^{-11}	(SOTO-VALDEZ; AURAS; PERALTA, 2011)
PLA	Resveratrol	Etanol 100% e óleo	Liberou menor quantidade para o óleo (15 ug/mL) do que para etanol (100ug/mL)	Etanol- 3.16- 38×10^{-11} , óleo-valor não determinado	(MANZANAREZ-LÓPEZ et al., 2011)
PLA	BHA, BHT, PG e TBHQ	Etanol 10%, 50% e 95%	Rápida liberação em etanol 95%	0.27- 176.1×10^{-10}	(JAMSHIDIAN; TEHRANY; DESOBRY, 2012)
PLA e amido de milho	Resveratrol e Tocoferol	Etanol 100%	Liberação mais rápida do resveratrol do que tocoferol	Tocoferol 0.40- 282×10^{-11} Resveratrol $10.073-309 \times 10^{-11}$ cm^2/s	(HWANG et al., 2013)

Gelatina	Catequina	Etanol 50% e 95%	Maior intumescimento da matriz a 50% etanol do que 95%.	Etanol-50%-0.39- 5.54×10^{-11} Etanol 90% 0.38- 1.59×10^{-13}	(LIU et al., 2016)
Gelatina	Timol	Água	Liberção depende da espessura do filme e concentração de farelo de farinha	$2.67-23.3 \times 10^{-8}$	(MASTROMATT EO et al., 2009)
Agar e gelatina	Extrato de chá verde	Água	Adição de gelatina no filme de ágar controlou a liberação do extrato de chá verde	Não determinado valor	(GIMÉNEZ et al., 2013)
Gelatina	Óleo de canela	Óleo de milho	Óleo de canela nano-encapsulado obteve maior controle de liberação	Não determinado valor	(WU et al., 2015b)
Zefina	Lisozima	Água	Controle da liberação com adição de óleo na matriz	Não determinado valor.	(ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2013)
Zefina	Lauril arginato (LAE)	Água, ácido acético 3% e etanol 10%	Liberção mais lenta comparado com quitosana	Água- 9×10^{-12} - 3×10^{-11} . Ácido- 5×10^{-10} - 5×10^{-9} . Etanol- 9×10^{-12} - 3×10^{-9}	(KASHIRI et al., 2016)
Proteína de ervilha e amido	Lisozima	Agar gel	Proteína da ervilha é mais fácil de ser liberada que	Não determinado valor.	(FABRA; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; CHIRALT, 2014)

de pipoca			amido de pipoca		
Proteína de soro de leite	Sorbato de potássio	Solução o água e glicero l	Maior coeficiente de difusão com aumento da concentração do composto	6.62-9.76x10 ⁻⁷	(OZDEMIR; FLOROS, 2001)
Proteína de soro de leite	Sorbato de potássio e Natamici na	Água com glicero l	Quanto maior a concentração de proteína menor é o valor do coeficiente de difusão	Sorbato potássio 1.09-9.73x10 ⁻⁷ Natamicin a 6.26-37.6x10 ⁻¹⁰	(FRANSSEN; RUMSEY; KROCHTA, 2004)
Amido de mandioca	Extrato de alecrim	Água e etanol 95%	Maior migração em água do que etanol	Não determino u o valor	(PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017)
Carrage na	Sorbato de potássio	Água com pH-3.8;5.2 e 7	O pH não influenciou na difusão	1.29-6.42x10 ⁻⁹	(CHOI et al., 2005)
Amido de arroz	Ácido ascórbico e BHT	Água e etanol 10% e 95%	Ácido ascórbico liberou mais em água e etanol 10% enquanto BHT em etanol 95%	Não determino u valor	(ASHWAR et al., 2015)
Alginato e pectina	Natamici na	Água	Coeficiente de difusão da pectina maior do que alginato	Pectina - 3.2x10 ⁻⁹ alginato – 9.2x10 ⁻¹²	(BIERHALZ; DA SILVA; KIECKBUSCH, 2012)
Acetato de celulose	Resveratr ol	Etanol 10%	Temperatura não afeta o coeficiente de difusão	4°C- 1.1x10 ⁻¹¹ ; 20°C- 2.49x10 ⁻¹¹	(SILVA et al., 2016)

PLA- políácido láctico; BHT-Hidroxitolueno butilado; BHA-2,3-terc-butil-4-hidroxianisol; PG- Propil galato; TBHQ Terc-butil-hidroquinona;

Os fatores descritos em relação ao composto ativo são: massa molecular, polaridade, solubilidade e concentração. A influência da solubilidade do composto ativo no solvente estudada por Imran et al. (2014) e Ozdemir; Floros (2001) mostra que para cobertura à base de proteína do soro de leite adicionado de sorbato de potássio, a liberação é mais rápida para água, com valores do coeficiente de difusão na ordem de 10^{-7} cm²/s. Para cobertura à base de HPMC, caseinato de sódio, quitosana e poliácido lático (PLA) adicionados de nisina apresentaram liberação lenta em solução etanólica a 95%, obtendo valores do coeficiente de difusão na ordem de grandeza de 10^{-13} cm²/s, devido à baixa solubilidade da nisina em etanol (BERRIDGE, 1949).

Com relação ao tamanho da molécula foi observado que quanto maior a molécula, mais lenta é a liberação do composto ativo para a solução (OUATTARA et al., 2000; HWANG et al., 2013; BENBETTAÏEB et al., 2016a). Jamshidian; Tehrani; Desobry (2012) estudaram a liberação de hidroxitolueno butilado (BHT), -2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), propil galato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), apresentando diferentes polaridades em etanol, a partir da incorporação em cobertura à base de PLA, obtiveram um maior valor do coeficiente de difusão para o PG que tem a polaridade mais próxima do etanol. Entretanto, resultado oposto foi observado no estudo de Sánchez-González et al. (2011) da liberação de limoneno em isooctano que apresentam polaridades próximas (0,92 e 0, respectivamente), mas não houve a liberação devido provavelmente à insolubilidade do isooctano (solvente apolar), na matriz polimérica de quitosana (altamente polar) mantendo a estrutura do polímero intacta. A liberação de carvacrol em óleo (apolar) e etanol (polar) foi estudado por Fernández-Pan et al. (2015). Os autores verificaram que apesar de uma alta hidrofobicidade do carvacrol, a liberação foi mais lenta no óleo, devido à baixa permeação do óleo na matriz polimérica de quitosana, que acaba dificultando a difusão e migração do carvacrol para o meio.

Pode ser ainda observada uma rápida difusão de ácido ascórbico em água e etanol 10% e BHT em etanol 95% devido a afinidade do emigrante com o fluido simulador de alimento (FSA) (ASHWAR et al., 2015). Em outros trabalhos, substâncias como polifenol de chá verde e extrato de alecrim, que têm maior solubilidade em etanol 95% do que em água ou etanol a 50%, apresentaram uma migração mais lenta, pois os compostos estão aprisionados na matriz polimérica. Com isso, para que ocorra o fenômeno de migração do composto para o FSA em filme hidrofílico, é necessária uma

quantidade de água suficiente para ocorrer intumescimento e relaxamento da matriz polimérica para permitir a difusão do composto ativo para o FSA (LIU et al., 2016; PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017).

A modificação da matriz polimérica com a adição de óleo (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2013) ou gelatina (GIMÉNEZ et al., 2013) na matriz e nanoencapsulamento de óleo de canela (WU et al., 2015b) fazem com que a liberação do composto ativo seja mais controlada. Benbettaieb et al., (2016b) não conseguiram controlar a liberação de quercetina em filme de quitosana com gelatina de peixe aplicando doses de radiação gama de 40 e 60 kGy. Outros estudos demonstraram que um aumento da espessura do filme diminui a taxa de migração do composto ativo para FSA devido ao aumento do caminho que a molécula deve percorrer na matriz polimérica (FRANSSEN; RUMSEY; KROCHTA, 2004; MASTROMATTEO et al., 2009).

A temperatura é um parâmetro importante no estudo da difusão. Soto-Valdez; Auras; Peralta, (2011) estudaram o efeito da temperatura de 9-43 °C no coeficiente de difusão do resveratrol em filmes de PLA, mostrando que os valores do coeficiente de difusão variaram na ordem de grandeza de 10^{-13} para 10^{-10} cm²/s, respectivamente. Estudo da difusão de nisina em filmes produzidos com PLA, os autores não observaram diferença significativa nos valores dos coeficientes de difusão com o aumento da temperatura de 4 °C para 40 °C (IMRAN et al., 2014). Outro trabalho que apresentou o mesmo comportamento, sem influência da temperatura, foi a liberação de resveratrol em etanol 10%, com os valores dos coeficientes de difusão na mesma ordem de magnitude de 10^{-11} cm²/s (SILVA et al., 2016). Esses resultados demonstram que a solubilidade, polaridade e afinidade química do emigrante no meio simulante têm maior influência na liberação do que a temperatura.

A tabela 2.2 apresenta trabalhos encontrados na literatura que analisaram a migração de compostos antimicrobianos de filmes para os alimentos. Observa-se na tabela 2.2 que apenas os três primeiros trabalhos foram determinados os coeficientes de difusão dos compostos nos filmes e nos alimentos. Nota-se também que os valores encontrados para o coeficiente de difusão nos alimentos foram 10^4 vezes mais rápidos que no filme, demonstrando que a aplicação de revestimentos ou filmes comestíveis conseguem controlar a liberação de substâncias ativas para o alimento.

Tabela 2.2. Trabalhos encontrados na literatura sobre migração de composto antimicrobiano do filme para o alimento.

Composto	Filme	Alimento	CDF x 10^{-10}	CDA x 10^{-6}	Referência
Tiocianato	Farelo de mostarda	Salmão	2,7	1,9	(LEE; OH; MIN, 2015)
Hipotiocianato	Farelo de soja	Presunto	4,18	2,78	(LEE; KIM; MIN, 2015)
Lisozima	Proteína de soro de leite	Salmão	9,8	0,48	(MIN; RUMSEY; KROCHTA, 2008)
Hipotiocianato	Farelo de soja	Presunto	0,36	-	(LEE; MIN, 2013)
Tiocianato e Hipotiocianato	Proteína de soro de leite	Salmão	18,7 1,31	-	(MIN; KROCHTA; RUMSEY, 2007)
Natamicina	Quitosana	Queijo	0.013	-	(FAJARDO et al., 2010)
Cinamaldeído e eugenol	Amido de semente de tamarindo	Carne	0.81×10^{-5} e 1.07	-	(CHANDRA MOHAN et al., 2017)
Nanopartículas de prata	Amido	Salsicha	-	-	(MARCHIORE et al., 2017)

CDF- coeficiente de difusão no filme cm^2/s ; CDA- Coeficiente de difusão no alimento em cm^2/s .

Fajardo et al. (2010) e Chandra Mohan et al. (2017) estudaram a migração dos compostos ativos do filme para alimento e do filme para FSA (solução salina). Nesses estudos, os resultados mostram maior porcentagem de liberação da substância ativa e rápida difusão no FSA que no alimento, pois o processo de difusão em meio sólido é de fato muito mais complexo do que em um FSA. A menor liberação no alimento pode ser explicada devido a uma pequena quantidade de água que se difunde no filme, sendo o principal mecanismo de liberação para revestimento comestível, como visto anteriormente.

Outro componente avaliado quanto à migração foi referente à liberação de nanopartículas de prata de revestimento comestível à base de

amido para salsicha (MARCHIORE et al., 2017). Os autores constataram que a concentração de nanopartículas de prata na superfície da salsicha permaneceu inalterada após os períodos de armazenamento de 15 e 30 a 10 °C dias, evidenciando que provavelmente as nanopartículas não difundem para o seu interior.

As referências mostradas nas tabelas 2.1 e 2.2 ratificam que há poucos estudos sobre migração de compostos ativos de revestimentos ou filme comestíveis para o alimento, devido à demora e complexidade de obtenção de dados do composto ativo no alimento.

2.6.2 Determinação do coeficiente de difusão pelo método de Recuperação da Fluorescência após Fotodegradação (FRAP)

Apenas poucas técnicas permitem a determinação direta de um coeficiente de difusão sem introduzir perturbações em massa no sistema. Outra solução para avaliar a difusividade de uma substância com uma determinada massa molecular em uma matriz é utilizar um corante molecular de referência, cuja difusão pode ser facilmente caracterizada. Desta forma, o coeficiente de difusão de um composto fluorescente em filmes poliméricos pode ser medido pela recuperação de fluorescência após fotodegradação (KARBOWIAK et al., 2008).

Desenvolvida na década de 1970, FRAP tem se tornado uma técnica importante e versátil para medir a mobilidade translacional de moléculas fluorescentes em vários sistemas, como células vivas, membranas e outros campos biológicos (AXELROD et al., 1976; HAGMAN; LORÉN; HERMANSSON, 2010; FLOURY et al., 2012). Entretanto, a técnica FRAP parece ser uma valiosa ferramenta para estudar a difusão de moléculas pequenas em filmes poliméricos e pode contribuir para obter informação sobre sua organização molecular e sua potencial funcionalidade como barreira. Além disso, no campo farmacêutico, tem um grande potencial para a caracterização de liberação de fármacos em sistemas macromoleculares, por estudo do efeito da matriz na taxa de difusão de moléculas ativas através das cápsulas (KARBOWIAK et al., 2006).

A análise do FRAP é baseada nas propriedades de fluorescência e fotodegradação (perda da propriedade de fluorescência pela intensidade da luz) de uma dada molécula fluorescente (KARBOWIAK et al., 2009). Os experimentos de degradação podem ser facilmente realizados em microscópios de varredura confocal (CLSM) uma vez que são frequentemente equipados com recursos para degradação de regiões

arbitrárias na amostra. Como o CLSM é um microscópio de alta precisão, a técnica de FRAP fornece informação local e pode ser realizada em qualquer material manuseável que seja suficientemente fotoestável para ser irradiado com um *laser* (HAGMAN; LORÉN; HERMANSSON, 2010).

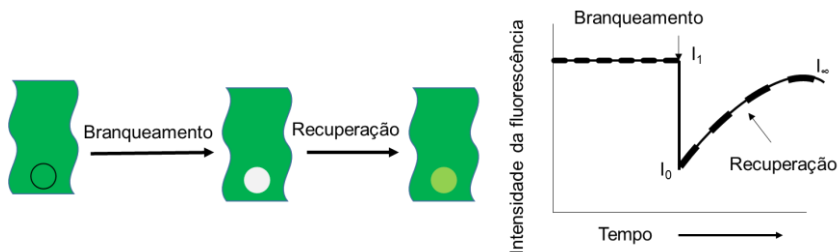
Experimentalmente, imagens numa região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) selecionada na amostra são captadas por um determinado tempo com *laser* em baixa intensidade, para verificar que a amostra não seja afetada pelo *laser* durante a fase de recuperação da fluorescência. Depois de ter sido analisada uma quantidade fixa de imagens, uma parcial fotodegradação das moléculas fluorescentes no ROI é obtida por uma breve exposição a um feixe de *laser* focado de alta potência, enquanto a intensidade do *laser* ao redor do ROI é mantida baixa durante o processo. Imediatamente, após a fotodegradação, as moléculas fluorescentes não degradadas difundem lateralmente para região degradada. Com isso, a fluorescência recuperada na área degradada é monitorada ao longo do tempo com baixa intensidade do *laser* (Figura 2.6) (SPRAGUE; MCNALLY, 2005; KARBOWIAK et al., 2009; FLOURY et al., 2012).

A quantidade e a forma de degradação obtidas experimentalmente são características essenciais para a realização de uma experiência confiável em FRAP. Geralmente, a quantidade de degradação deve ser entre 30 a 70 % da intensidade inicial. Se a degradação for muito baixa, a forma das curvas de recuperação não é suficientemente típica para ser analisada adequadamente. Se a quantidade de degradação é muito elevada, ruídos ou sinais podem mascarar a real intensidade de fluorescência registrada. Experimentalmente, a quantidade de degradação pode ser influenciada pela mudança do tempo de degradação ou a intensidade da luz (MEYVIS et al., 1999).

Os experimentos de FRAP fornecem informação sobre a mobilidade da molécula fluorescente num compartimento definido. Dois parâmetros podem ser deduzidos do FRAP: a fração móvel da molécula fluorescente e a velocidade de mobilidade (REITS; NEEFJES, 2001). A Figura 2.6 apresenta as imagens da intensidade no ROI (região representada pelo círculo) antes da fotodegradação, após a fotodegradação e ao final do processo de recuperação da fluorescência, além de uma curva típica da recuperação da fluorescência, permitindo a determinação dos dois parâmetros: fração móvel e coeficiente de difusão. A fração móvel pode ser determinada comparando a fluorescência na região degradada após a recuperação total (I_{∞}) com a fluorescência antes da degradação (I_1) e imediatamente após a degradação (I_0), apresentada pela Equação 2.4:

$$R = (I_{\infty} - I_0)/(I_1 - I_0) \quad (2.4)$$

Figura 2.6. Análise pela técnica FRAP para obtenção do coeficiente de difusão.



Fonte: SPRAGUE; MCNALLY, 2005.

A fração móvel pode mudar em diferentes circunstâncias, por exemplo quando a molécula fluorescente interage com outras moléculas ou com o polímero. A fração móvel pode também ser afetada pelas barreiras e microdomínios do polímero (SPRAGUE; MCNALLY, 2005).

Dependendo do tamanho, da forma da área degradada e quais pressupostos foram assumidos quanto aos mecanismos de difusão e a resposta da amostra, existem diferentes modelos para o cálculo da taxa de difusão a partir das informações de recuperação da fluorescência (HAGMAN; LORÉN; HERMANSSON, 2010). Técnicas de FRAP permitem a determinação de coeficientes de difusão na ordem de grandeza de 10^{-16} cm²/s e mostrou-se adequada para estudos de difusão de moléculas em polímeros. Modelos de FRAP descrevem a relação entre a difusão em uma região degradada bidimensional (2D) e a recuperação da fluorescência como observado pelo microscópio de fluorescência (BRAECKMANS et al., 2003).

A intensidade da fluorescência recuperada devido à difusão de moléculas não degradadas na área degradada é o produto espacialmente integrado da intensidade do feixe de leitura com a distribuição de concentração de moléculas não degradadas. Para difusão em 2D, a intensidade depende do tempo $I(t)$ para perfil de intensidade Gaussiana e pode ser escrito como uma expansão em série mostrada na Equação 2.5:

$$I(t) = I_0 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-\kappa)^n}{n!} \frac{1}{1 + n \left(1 + 2 \left(\frac{t}{\tau_{\text{rad}}} \right) \right)} \quad (2.5)$$

sendo $I(t)$ intensidade ao longo do tempo de recuperação da fluorescência; e κ é o parâmetro de profundidade da degradação que depende da intensidade e duração da luz de degradação, e da sensibilidade das moléculas de fluorescência à degradação. τ_{rad} é o tempo de difusão característico de moléculas fluorescentes não degradadas que se difundem para área degradada. Braeckmans et al., 2003 derivaram uma expressão válida para recuperação da fluorescência em 3D usando microscópio confocal no limite de óptica de uma baixa abertura numérica ($NA \approx 0,2$), a qual apresenta um perfil de iluminação cilíndrica. Entretanto, para configuração de larga abertura numérica, os dados do experimento podem ser ajustados com uma simples função exponencial, apresentada na equação 2.6 (BONETTI; ROGER, 2013):

$$I(t) = (I_{\infty} - I_0) \times \left\{ 1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_{\text{diff}}} \right) \right\} + I_0 \quad (2.6)$$

Na Equação 2.6; I_{∞} é a intensidade da fluorescência no tempo infinito; τ_{diff} é definido como o tempo característico para molecular difundir através da área degradada ao longo de um comprimento característico. O tempo difusivo característico (τ_{diff}) é relacionado com o coeficiente de difusão pela equação 2.7:

$$D = \frac{R^2}{4\tau_{\text{Diff}}} \quad (2.7)$$

em que R (μm) é o comprimento sobre o qual a difusão ocorre (BONETTI; ROGER, 2013).

Apesar de seu interesse, a técnica de FRAP é pouco aplicada em medições de coeficiente de difusão em meios alimentares. Perry; Fitzgerald; Gilbert, (2006) determinaram o coeficiente de difusão de sondas do conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) marcado com dextrana em soluções de amido. Outro trabalho aplicando a técnica FRAP foi realizado por Carvajal-Rondanelli; Lanier, (2010), que determinou os coeficientes de

difusão de diferentes inibidores de proteases marcados com FITC em fibras musculares de peixe. Mais recentemente, Chapeau et al., (2016) utilizaram a técnica para obter o coeficiente de difusão de dextrana (tamanho molecular entre 10 e 500 kDa) em queijos curados e frescos.

2.7. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) foi utilizada há mais de 4000 anos pelos egípcios, empregando a ingestão de plantas (contendo os psolralenos, furo [3,2 -g]- couramina ou ácido 6-hidroxi-5-benzofurano-acrilico δ -lactona) associados com a exposição à luz solar para tratar doenças como o vitiligo em humanos. Entretanto, somente em 1900 a técnica foi aplicada cientificamente por Oscar Raab, o qual observou a toxicidade de corantes de acridina e luz solar contra *Parramecium caudatum*, publicando assim o primeiro artigo na área com os efeitos fotodinâmicos de compostos químicos em micro-organismos. Com o passar do tempo, pesquisas foram desenvolvidas para o uso do processo fotodinâmico como alternativa aos métodos mais convencionais de inativação de micro-organismos (MACHADO, 2000; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; DENIS et al., 2011; ALVES et al., 2015).

O TDFa consiste na utilização de uma fonte de luminosa (luz visível de comprimento de onda adequado), um agente oxidante (oxigênio molecular) e um agente intermediário (denominado fotossensibilizador) capaz de absorver e transferir a energia da fonte luminosa para o oxigênio molecular, levando à formação de espécies altamente citotóxicas (ALVES et al., 2015).

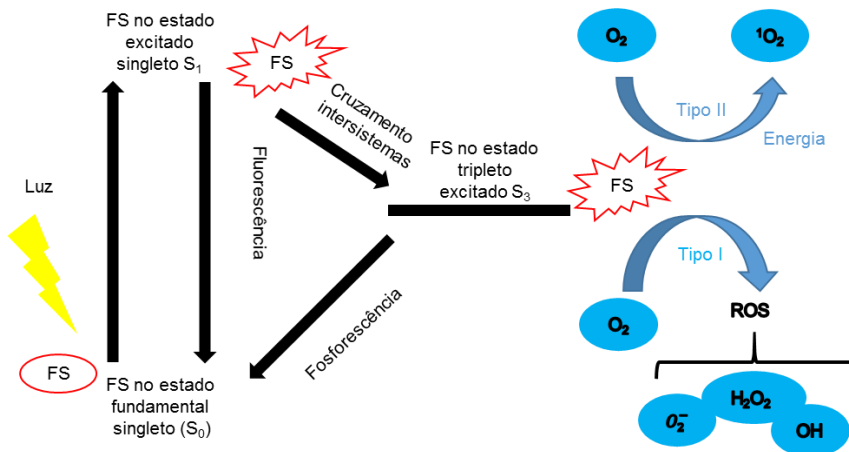
O mecanismo de ação da TDFa inicia-se a partir da absorção de fótons de energia do fotossensibilizador (FS) pela irradiação com uma fonte de luz em um comprimento de onda apropriado, no qual está no seu estado fundamental singleto (S_0), passando para um estado de maior energia, chamado de singleto excitado (S_1). A partir do S_1 , o FS pode retornar ao seu estado fundamental (S_0) por uma combinação de etapas, envolvendo processo radiativo (fluorescência) ou se houver a possibilidade de acoplamento spin-orbital, a transição eletrônica entre estados excitados de diferentes multiplicidades deve acontecer no processo denominado de cruzamento intersistemas, fazendo com que FS permaneça em estado mais estável com menor energia, denominado tripleto (S_3) (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013).

Nesse estado tripleto, pode acontecer outra reversão de spin do elétron excitado da molécula retornando ao estado fundamental pelo processo de fosforescência. Por outro lado, pode reagir com moléculas do meio e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), e os radicais livres, hidroxilas e ânions superóxidos. A geração de ROS como consequência da TDFa segue duas vias principais caracterizadas por diferentes mecanismos fotoquímicos denominados "tipo I" e "tipo II" (Figura 2.7) (WU et al., 2016).

O mecanismo tipo I envolve a transferência de elétrons entre o FS no estado tripleto e componentes do sistema, ocorrendo a geração de superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila (ALVES et al., 2015).

No mecanismo tipo II, acontece a transferência de energia, na qual o fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia para a molécula de oxigênio produzindo o oxigênio singleto, um agente altamente citotóxico, que pode interagir com um grande número de substratos biológicos, induzindo danos à parede celular de bactéria, fungos, etc. (REZUSTA et al., 2012; PAZ-CRISTOBAL et al., 2014).

Figura 2.7. Diagrama de Jablonski- Ilustração gráfica do processo fotodinâmico para produção de ROS e oxigênio singleto.



Fonte: Hamblin, (2016).

Os dois mecanismos de foto-inativação podem levar à morte celular e a destruição de micro-organismos. Entretanto, o oxigênio singleto possui um tempo de meia vida em solvente aquoso de aproximadamente 4 μs ; possuindo

um raio de ação muito reduzido. Apesar disso, $^1\text{O}_2$ é capaz de interagir com diversos componentes biológicos, tais quais organelas, fosfolípidios da membrana celular, DNA e mitocôndrias, promovendo sua oxidação e morte celular. Os ROS formados podem causar danos irreversíveis a qualquer macromolécula dentro da célula (PERUSSI, 2007).

As vantagens do TDFa são: ação sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários; usar fonte de luz de baixo custo para a ativação do agente FS; baixa probabilidade de desencadear o desenvolvimento de resistência em micro-organismos; ser potencialmente aplicada em várias áreas: hospitalar, odontológica, industrial, meio ambiente e alimentos (PENHA et al., 2016).

Os fotossensibilizadores que têm sido estudados para erradicação de micro-organismos pertencem a diferentes grupos de compostos, como os xantenos halogenados tais como Rosa de Bengala (RB), fenotiazínicos tais como azul de toluidina O (TBO) e azul de metileno (AM), acridinas e conjugados de clorina (DENIS et al., 2011). A escolha de um FS está associada com suas propriedades físico-químicas e com o sistema biológico em que irá atuar. Com isso, o FS deve ser capaz de inativar várias classes de células microbianas em concentrações relativamente baixas e baixa energia luminosa. Além disso, outros requisitos importantes são necessários como: ser quimicamente puro e de composição conhecida, ser biologicamente estável, ter toxicidade mínima no escuro, sendo citotóxico somente na presença de luz, possuir alto rendimento quântico (facilidade para absorver ou emitir fótons) nos estados tripleto ou singleto (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013).

No que diz respeito à escolha da fonte de luz, coerente (uma única frequência) e não-coerente, para o processo de inativação microbiana, há uma ampla variedade que pode ser utilizada como, por exemplo: os *lasers*, os diodos emissores de luz, assim como as lâmpadas incandescentes e fluorescentes. O aspecto prioritário para preferência por uma fonte de luz apropriada é a sua habilidade de excitar o FS, provocando um efeito citotóxico ao micro-organismo alvo (NAGATA et al., 2012).

Processos térmicos convencionais usados para preservação de alimentos são efetivos contra muitos dos patógenos alimentares. Entretanto, a contaminação cruzada de produtos alimentares após tratamento térmico por equipamento e o ambiente geral das fábricas de processamento, durante as diferentes etapas do processo ou de preparação dos produtos finais, é o principal problema enfrentado pela indústria de alimentos. Com isso, a TDFa é considerada uma estratégia promissora com uma elevada eficácia para inativar os patógenos de origem alimentar (MAGALHÃES et al., 2016).

Vários trabalhos são encontrados na literatura com inativação de patógenos com diferentes FS na área de alimentos, dentre eles podemos destacar o uso da curcumina como FS, que é um composto geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pelo FDA (US FDA, 2013). A Tabela 2.3 apresenta algumas pesquisas realizadas com a aplicação da curcumina para inativação de diferentes micro-organismos na área de alimentos.

Tabela 2.3. Trabalhos encontrados na literatura sobre inativação de micro-organismos patogênicos com o uso de curcumina como FS na área de alimentos.

Trabalhos	Luz	Concentração de curcumina	Micro-organismos	Meio	Fluência	Tempo	Referência
1	Luz azul LED 470 nm	0.92 µg/mL	<i>Staphylococcus</i>	In vitro	3 J/cm ²	50s	(JIANG et al., 2014)
2	Luz azul LED 470 nm	7.36 µg/mL	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Ostra	3,6 J/cm ²	60s	(WU et al., 2016)
3	Luz led 450nm	0.74-3 mg/mL	<i>Streptococcus mutans</i>	In vitro	24-72 J/cm ²	2-5min	(PASCH OAL et al., 2013)
4	Lâmpada de xênon 420	1.9-37 µg/mL	<i>Aspergillus flavus</i>	Milho	60 J/cm ²	*	(TEMBA et al., 2016)
5	Luz azul LED 455nm	7.36 µg/mL	<i>Candida albicans</i>	In vitro	5,28 J/cm ²	4 min	(DOVIGO et al., 2011)
6	Luz azul LED 430 nm	0.37-9.2 µg/mL	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> e <i>E. Coli</i>	In vitro	0,5-30 J/cm ²	30s-30min	(HAUKVIK et al., 2009)

7	Luz azul LED 470	1.85-7.36 µg/mL	<i>Norovirus</i>	In vitro	3,6 J/cm ²	60s	(WU et al., 2015a)
8	Luz azul LED 470	28 µg/mL	<i>Staphylococcus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i>	In vitro	139-417 J/cm ²	10-30 min	(PENHA et al., 2016)
9	Luz azul LED 435nm	19-37 µg/mL	<i>S. aureus</i>	Pepino, pimentão e frango	33,8J/cm ²	60min	(TORTIK ; SPAETH ; PLAETZER, 2014)

* Não apresentou a potência para poder fazer a conversão para o tempo de exposição.

Alguns pontos são destacados da Tabela 2.3 tais, como: concentração de curcumina, tempo de exposição à luz, fluência e tipo de luz utilizada no sistema, micro-organismo alvo e meio da realização da inativação (solução ou alimento). Observa-se que as concentrações de curcumina usadas para inativar os micro-organismos foram menores que 40 µg/mL, com exceção do trabalho de Paschoal et al., (2013) que utilizaram uma concentração variando de 0,7-3 mg/mL. Com relação a trabalhos que empregaram curcumina sem exposição à luz, a concentração mínima inibitória está entre 100-400 µg/mL (BHAWANA et al., 2011; SANDIKCI ALTUNATMAZ et al., 2016). Com isso, é comprovado que a combinação de baixa concentração de curcumina com exposição à luz apresenta um grande potencial antimicrobiano para prevenir contaminação microbiana.

A maioria dos ensaios fotodinâmicos de inativação microbiana é realizado em solução de curcumina e o micro-organismo alvo. No entanto, quando se realiza a simulação da contaminação do alimento pela inoculação do micro-organismo, pode acontecer a diminuição da eficiência do processo fotodinâmico, devido ao micro-organismo estar no interior do alimento, dificultando assim a ativação da curcumina pela exposição à luz. Dessa maneira, foi simulada a contaminação de ostra, milho, pepino, pimentão e frango, a fim de comprovar que essa tecnologia tem grande potencial para

aplicação em alimentos com objetivo de reduzir a carga microbiana (TORTIK; SPAETH; PLAETZER, 2014; TEMBA et al., 2016; WU et al., 2016). Os alimentos contaminados foram expostos à luz e imersos em uma solução de curcumina, sendo que o melhor resultado obtido foi a inativação de 6 log (UFC/g) de *Vibrio parahaemolyticus* presentes em ostras em 60 s de exposição à luz com uma concentração de curcumina de 7,36 µg/mL, evidenciando que a tecnologia de fotodinâmica com uso de um FS pode ser aplicada para inibir a contaminação microbiana em alimentos.

Várias tecnologias necessitam de tempo elevado para alcançar uma redução bacteriana satisfatória. Entretanto, nos experimentos fotodinâmicos observa-se que alguns micro-organismos precisaram de apenas 1 min de exposição à luz em soluções de curcumina para conseguir uma redução na carga microbiana de 2 a 5 log (UFC/mL) (HAUKVIK et al., 2009; JIANG et al., 2014; WU et al., 2015a, 2016).

2.8. Considerações sobre o estado da arte

A curcumina é um pigmento amarelo isolado do rizoma de cúrcuma, na qual é muito utilizada como tempero ou corante em alimentos. Esse polifenol tem múltiplas atividades biológicas e seus efeitos medicinais estão apresentados na base de dados do Instituto Nacional de Saúde (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado 05 de junho de 2017). Em seres humanos, os resultados mais promissores da curcumina foram observados no tratamento do câncer, doenças inflamatórias, distúrbios cutâneos, oculares, neurológicos e nefropatia diabética (GUPTA et al., 2012).

Em nível celular, ao longo dos últimos 50 anos foram realizados extensivos estudos mostrando que a curcumina é uma molécula altamente pleiotrópica e que sua atividade vem da capacidade de agir sobre diferentes moléculas presentes na célula. Em particular, a curcumina possui múltiplas atividades farmacológicas como: atividades anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante e antibacteriana, (MAHESHWARI et al., 2006; MULIK et al., 2010; SIDDIQUI et al., 2012; GUPTA, 2017).

Embora o amplo potencial terapêutico da curcumina seja conhecido, a sua utilização como composto ativo em revestimento e filmes comestíveis ainda é restrita. Para aplicação e utilização em coberturas e/ou biofilmes, faz-se necessário compreender o fenômeno de migração da curcumina desses materiais para o alimento. O processo de migração geralmente é controlado pelo mecanismo de difusão, no qual o composto ativo passa pelo espaço vazio da matriz polimérica. A determinação dos coeficientes de difusão

desses compostos ativos incorporados nos filmes fornecerá algumas informações relevantes como: o tempo necessário para o composto ativo ser liberado para o alimento; se a concentração liberada será suficiente para ter efeito contra um micro-organismo alvo; a concentração do composto ativo remanescente no filme após o contato com o alimento terá efeito inibitório para evitar contaminação cruzada.

O efeito antimicrobiano apresentado pela curcumina para determinados micro-organismos patogênicos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium notatum* e *Aspergillus niger*) necessita de uma concentração de 150 a 400 ug/mL (BHAWANA et al., 2011). No entanto, uma alternativa para superar essa barreira é a utilização da terapia fotodinâmica, que ativa o princípio ativo necessitando de baixa concentração para inativar, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aspergillus flavus*, *E. coli* entre outros (TORTIK; SPAETH; PLAETZER, 2014; PENHA et al., 2016; TEMBA et al., 2016; WU et al., 2016).

O presente trabalho tem como contribuição significativa o estudo do comportamento da curcumina presente em cobertura comestível aplicado como revestimento natural em salsichas, dados do coeficiente de difusão da curcumina em diferentes matrizes poliméricas e aplicação da terapia fotodinâmica para potencializar o efeito antimicrobiano da curcumina na presença de componente hidrofílico.

2.9. Referências

ABRAHÃO, W. M.; ABRAHÃO, P. R. da S.; MONTEIRO, C. L. B.; PONTAROLO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 289–296, jun. 2008.

AGGARWAL, B. B.; YUAN, W.; LI, S.; GUPTA, S. C. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: identification of novel components of turmeric. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 9, p. 1529–1542, 1 set. 2013.

AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 108–117, jan. 2012.

ALVES, E.; FAUSTINO, M. A. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; CUNHA, Â.; NADAIS, H.; ALMEIDA, A. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 22, p. 34–57, mar. 2015.

ANAND, P.; THOMAS, S. G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; SUNG, B.; THARAKAN, S. T.; MISRA, K.; PRIYADARSINI, I. K.; RAJASEKHARAN, K. N.; AGGARWAL, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, Special Issue: Apoptosis World 2008. v. 76, n. 11, p. 1590–1611, 1 dez. 2008.

ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M. E. M. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 7, p. 393–399, 13 jun. 2012.

ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Development of flexible zein–wax composite and zein–fatty acid blend films for controlled release of lysozyme. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 208–216, abr. 2013.

ASHWAR, B. A.; SHAH, A.; GANI, A.; SHAH, U.; GANI, A.; WANI, I. A.; WANI, S. M.; MASOODI, F. A. Rice starch active packaging films loaded with antioxidants—development and characterization. **Starch - Stärke**, v. 67, n. 3-4, p. 294–302, 1 mar. 2015.

AXELROD, D.; KOPPEL, D. E.; SCHLESSINGER, J.; ELSON, E.; WEBB, W. W. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. **Biophysical Journal**, v. 16, n. 9, p. 1055–1069, set. 1976.

BALDWIN, E.; HAGENMAIER, R. Introduction. In: BALDWIN, E. .; HAGENMAIER, R.; BAI, J. (Ed.). **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**. New York: CRC Press, 2011. p. 1–12.

BARANCELLI, G. V.; CAMARGO, T. M.; REIS, C. M. F.; PORTO, E.; HOFER, E.; OLIVEIRA, C. a. F. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 816–819, 1 maio 2011.

BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; SILVA, L. C.; D’OVIDIO, L.; MONTEIRO, F. A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v. 76, n. 4, p. 591–596, ago. 2007.

BENBETTAÏEB, N.; ASSIFAOU, A.; KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; CHAMBIN, O. Controlled release of tyrosol and ferulic acid encapsulated in chitosan–gelatin films after electron beam irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Ionizing Radiation and Polymers symposium, IRaP 2014. v. 118, p. 81–86, jan. 2016a.

BENBETTAÏEB, N.; CHAMBIN, O.; KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F. Release behavior of quercetin from chitosan–fish gelatin edible films influenced by electron beam irradiation. **Food Control**, v. 66, p. 315–319, ago. 2016b.

BERRIDGE, N. J. Preparation of the antibiotic nisin. **Biochemical Journal**, v. 45, n. 4, p. 486–493, 1949.

BERTUZZI, M. A.; CASTRO VIDAURRE, E. F.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 972–978, jun. 2007.

BHATIA, A.; GUPTA, R.; BHATTACHARYA, S.; CHOI, H. Compatibility of biodegradable poly (lactic acid) (PLA) and poly (butylene succinate) (PBS) blends for packaging application. **Korea-Australia Rheology Journal**, v. 19, n. 3, p. 125–131, 2007.

BHAWANA; BASNIWAL, R. K.; BUTTAR, H. S.; JAIN, V. K.; JAIN, N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 2056–2061, 9 mar. 2011.

BIERHALZ, A. C. K.; DA SILVA, M. A.; KIECKBUSCH, T. G. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 1, p. 18–25, maio 2012.

BLANCO-FERNANDEZ, B.; RIAL-HERMIDA, M. I.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCEIRO, A. Edible chitosan/acetylated monoglyceride films for prolonged release of vitamin e and antioxidant activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 2, p. 626–635, 15 jul. 2013.

BONETTI, M.; ROGER, M. Translational diffusion of probe molecules under high pressure: A study by fluorescence recovery after photobleaching technique. **Review of Scientific Instruments**, v. 84, n. 2, p. 023904, 1 fev. 2013.

BORGES, M. de F.; SIQUEIRA, R. S. de; BITTENCOURT, A. M.; VANETTI, M. C. D.; GOMIDE, L. A. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 362–364, dez. 1999.

BRAECKMANS, K.; PEETERS, L.; SANDERS, N. N.; DE SMEDT, S. C.; DEMEESTER, J. Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 4, p. 2240–2252, out. 2003.

BRAGA, M. E. M. **Extração supercrítica de curcuminóides de Curcuma longa L. usando como solvente mistura de CO₂ + etanol e/ou isopropanol: um estudo da cinética e das propriedades funcionais do extrato.** 2002. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BRAGA, M. E. M.; LEAL, P. F.; CARVALHO, J. E.; MEIRELES, M. A. A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6604–6611, 1 out. 2003.

BRAGA, M. E. M.; MORESCHI, S. R. M.; MEIRELES, M. A. A. Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 340–346, 3 mar. 2006.

BRASILEIRO, I. S.; BARBOSA, M.; IGARASHI, M. C.; BISCOLA, V.; MAFFEI, D. F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. de M. Use of growth inhibitors for control of *Listeria monocytogenes* in heat-processed ready-to-eat meat products simulating post-processing contamination. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 7–13, dez. 2016.

BROUET, I.; OHSHIMA, H. Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, n. 2, p. 533–540, 17 jan. 1995.

BUCHANAN, R. L.; GORRIS, L. G. M.; HAYMAN, M. M.; JACKSON, T. C.; WHITING, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1–13, maio 2017.

BUONOCORE, G. G.; DEL NOBILE, M. A.; PANIZZA, A.; CORBO, M. R.; NICOLAIS, L. A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications. **Journal of Controlled Release**, v. 90, n. 1, p. 97–107, 5 jun. 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; OSBURN, W.; RYSER, E. t. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on hot dogs using antimicrobial whey protein-based edible casings. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 291–299, 1 jan. 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. t. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2317–2324, 1 ago. 2002.

CANELLAS, E.; AZNAR, M.; NERÍN, C.; MERCEA, P. Partition and diffusion of volatile compounds from acrylic adhesives used for food packaging multilayers manufacturing. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 5100–5109, 2010.

CARVAJAL-RONDANELLI, P. A.; LANIER, T. C. Diffusion of active proteins into fish meat to minimize proteolytic degradation. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 9, p. 5300–5307, 12 maio 2010.

CHANDRA MOHAN, C.; RADHA KRISHNAN, K.; BABUSKIN, S.; SUDHARSAN, K.; AAFRIN, V.; LALITHA PRIYA, U.; MARIYAJENITA, P.; HARINI, K.; MADHUSHALINI, D.; SUKUMAR, M. Active compound diffusivity of particle size reduced *S. aromaticum* and *C. cassia* fused starch edible films and the shelf life of mutton (*Capra aegagrus hircus*) meat. **Meat Science**, v. 128, p. 47–59, jun. 2017.

CHAPEAU, A. L.; SILVA, J. V. C.; SCHUCK, P.; THIERRY, A.; FLOURY, J. The influence of cheese composition and microstructure on the diffusion of macromolecules: A study using Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). **Food Chemistry**, v. 192, p. 660–667, 1 fev. 2016.

CHEN, J.; BAI, H.; WANG, C.; KANG, J. Trichostatin A improves the anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 8, p. 710–716, 1 ago. 2006a.

CHEN, J.; TANG, X. Q.; ZHI, J. L.; CUI, Y.; YU, H. M.; TANG, E. H.; SUN, S. N.; FENG, J. Q.; CHEN, P. X. Curcumin Protects PC12 Cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway. **Apoptosis**, v. 11, n. 6, p. 943–953, 1 jun. 2006b.

CHOI, J. H.; CHOI, W. Y.; CHA, D. S.; CHINNAN, M. J.; PARK, H. J.; LEE, D. S.; PARK, J. M. Diffusivity of potassium sorbate in κ -carrageenan based antimicrobial film. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 417–423, jun. 2005.

COUGHLAN, K.; SHAW, N. b.; KERRY, J. f.; KERRY, J. p. Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 6, p. E271–E275, 1 ago. 2004.

CRANK, J. **THE MATHEMATICS OF DIFFUSION**. SECOND EDITION ed. London: CLARENDON PRESS, 1975.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Structure and function of protein-based edible films and coatings. In: HUBER, K. C.;

EMBUSCADO, M. E. (Ed.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**. [s.l.] Springer New York, 2009. p. 25–56.

DA SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354–356, 1 mar. 1998.

DENIS, T. G. S.; DAI, T.; IZIKSON, L.; ASTRAKAS, C.; ANDERSON, R. R.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. All you need is light. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509–520, 1 nov. 2011.

DIVYA, C. S.; PILLAI, M. R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, n. 5, p. 320–332, 1 maio 2006.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BRUNETTI, I. L.; COSTA, C. A. de S.; JACOMASSI, D. P.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 1 jul. 2011.

DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173–1182, 15 jun. 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, v. 14, n. 12, p. n/a–n/a, 1 dez. 2016.

FABRA, M. J.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A. Lysozyme release from isolate pea protein and starch based films and their antimicrobial properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 22–26, jan. 2014.

FAJARDO, P.; MARTINS, J. T.; FUCIÑOS, C.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 4, p. 349–356, dez. 2010.

FAKHOURI, F. M.; COSTA, D.; YAMASHITA, F.; MARTELLI, S. M.; JESUS, R. C.; ALGANER, K.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.;

INNOCENTINI-MEI, L. H. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 2, p. 681–689, 20 jun. 2013.

FAKHOURI, F. M.; MARTELLI, S. M.; CAON, T.; VELASCO, J. I.; MEI, L. H. I. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 109, p. 57–64, nov. 2015.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Risk characterization of *Salmonella* spp. in eggs and broiler chickens and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. In: Rome, Italy. **Anais...** In: FAO FOOD AND NUTRITION PAPER NO. 72. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome, Italy: 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/y1332e/y1332e07.htm#bm07>>. Acesso em: 31 mar. 2017.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; MATÉ, J. I.; GARDRAT, C.; COMA, V. Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 60–68, out. 2015.

FERNANDO, W. J. N.; LOW, H. C.; AHMAD, A. L. Dependence of the effective diffusion coefficient of moisture with thickness and temperature in convective drying of sliced materials. A study on slices of banana, cassava and pumpkin. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 4, p. 310–316, fev. 2011.

FLOURY, J.; MADEC, M.-N.; WAHARTE, F.; JEANSON, S.; LORTAL, S. First assessment of diffusion coefficients in model cheese by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 551–556, 15 jul. 2012.

FRANSSEN, L. r.; RUMSEY, T. r.; KROCHTA, J. m. Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C347–C350, 1 jun. 2004.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1–2, p. 34–52, 30 ago. 2011.

GADANG, V. p.; HETTIARACHCHY, N. s.; JOHNSON, M. g.; OWENS, C. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, p. M389–M394, 1 out. 2008.

GÄLLSTEDT, M.; HEDENQVIST, M. S.; TURE, H. Production, chemistry and properties of proteins. In: PLACKETT, D. (Ed.). **Biopolymers – New Materials for Sustainable Films and Coatings**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 107–132.

GAVARA, R.; CATALÁ, R. Mass transfer in food/plastic packaging systems. In: **Engineering and Food for the 21st Century**. Food Preservation Technology. J. Welte-Chanes, G. V. Barbosa- Cánovas, & J. M. Aguilera ed. Florida: CRC Press, 2002. p. 1104.

GENNADIOS, A.; HANNA, M. A.; KURTH, L. B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A Review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 337–350, 1 jun. 1997.

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, p. 167–193, 2010.

GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ DE LACEY, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agar–gelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 264–271, jan. 2013.

GOEL, A.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, the golden spice from indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 7, p. 919–930, 23 set. 2010.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQU, J.-L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190–195, 1 jan. 1992.

GOVINDARAJAN, V. S.; STAHL, W. H. Turmeric — chemistry, technology, and quality. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 199–301, 1 jun. 1980.

GRANDA-RESTREPO, D. M.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; GÁMEZ-MEZA, N.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z. Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1396–1402, dez. 2009.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 10–17, 1 jan. 1996.

GUL, P.; BAKHT, J. Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2272–2279, 1 abr. 2015.

GUPTA, S. Anti Inflammatory and anti arthritic activity of different milk based formulation of curcumin in rat model. **Current Drug Delivery**, 20 mar. 2017.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; KOH, W.; AGGARWAL, B. B. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 283–299, 1 mar. 2012.

HAGMAN, J.; LORÉN, N.; HERMANSSON, A.-M. Effect of gelatin gelation kinetics on probe diffusion determined by frap and rheology. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3359–3366, 13 dez. 2010.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials Microbial systems biology. v. 33, p. 67–73, 1 out. 2016.

HAUKVIK, T.; BRUZELL, E.; KRISTENSEN, S.; TØNNESEN, H. H. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 10, p. 666–673, 1 out. 2009.

HAUSMANN, T.; BROER, E. Renewable polymers in transgenic crop plants. In: MITTAL, V. (Ed.). **Renewable Polymers: Synthesis, Processing, and Technology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. p. 247–304.

HELMROTH, E.; RIJK, R.; DEKKER, M.; JONGEN, W. Predictive modelling of migration from packaging materials into food products for regulatory purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 3, p. 102–109, mar. 2002.

HIGUERAS, L.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R.; ROLLINI, M. Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N α -dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 339–345, 1 ago. 2013.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, ASSET 2011. v. 136, n. 3–4, p. 1490–1495, 15 fev. 2013.

HUI, Y. . Safe practices for sausage production in the United States. In: HUI, Y. . (Ed.). **Handbook of Meat and Meat Processing, Second Edition**. New York: CRC Press, 2012. p. 619–646.

HWANG, S. W.; SHIM, J. K.; SELKE, S.; SOTO-VALDEZ, H.; MATUANA, L.; RUBINO, M.; AURAS, R. Migration of α -tocopherol and resveratrol from poly(L-lactic acid)/starch blends films into ethanol. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p. 814–828, jun. 2013.

IMRAN, M.; KLOUJ, A.; REVOL-JUNELLES, A.-M.; DESOBRY, S. Controlled release of nisin from HPMC, sodium caseinate, poly-lactic acid and chitosan for active packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 143, p. 178–185, dez. 2014.

IN LEE, S. H.; BARANCELLI, G. V.; DE CAMARGO, T. M.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; DA CRUZ, A. G.; CAPPATO, L. P.; DE OLIVEIRA, C. A. F. Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. **Food Research International**, v. 91, p. 88–91, jan. 2017.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E. A.; DESOBRY, S. Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 445–455, dez. 2012.

JAWAHAR, N.; MEYYANATHAN, S. N. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: a comprehensive review. **International Journal of Health & Allied Sciences**, v. 1, n. 4, p. 217, 1 out. 2012.

JEENGER, M. K.; SHRIVASTAVA, S.; YERRA, V. G.; NAIDU, V. G. M.; RAMAKRISHNA, S.; KUMAR, A. Curcumin: A pleiotropic phytonutrient in diabetic complications. **Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 276–282, fev. 2015.

JIANG, Y.; LEUNG, A. W.; HUA, H.; RAO, X.; XU, C. Photodynamic action of led-activated curcumin against staphylococcus aureus involving intracellular ROS increase and membrane damage. **International Journal of Photoenergy**, v. 2014, p. e637601, 14 maio 2014.

KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A.; TRYSTRAM, G. From macroscopic to molecular scale investigations of mass transfer of small molecules through edible packaging applied at interfaces of multiphase food products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 116–127, jan. 2009.

KARBOWIAK, T.; GOUGEON, R. D.; RIGOLET, S.; DELMOTTE, L.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. **Food Chemistry**, 4th International Workshop on Water in Foods. v. 106, n. 4, p. 1340–1349, 15 fev. 2008.

KARBOWIAK, T.; HERVET, H.; LÉGER, L.; CHAMPION, D.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Effect of plasticizers (water and glycerol) on the diffusion of a small molecule in iota-carrageenan biopolymer films for edible coating application. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 2011–2019, 1 jun. 2006.

KASHIRI, M.; CERISUELO, J. P.; DOMÍNGUEZ, I.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE). **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 547–554, dez. 2016.

KROCHTA, J. Proteins as raw materials for films and coatings. In: GENNADIOS, A. (Ed.). **Protein-Based Films and Coatings**. [s.l.] CRC Press, 2002.

KUTTIGOUNDER, D.; LINGAMALLU, J. R.; BHATTACHARYA, S. Turmeric powder and starch: selected physical, physicochemical, and microstructural properties. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. C1284–C1291, 1 nov. 2011.

LEE, H.-B.; OH, Y. A.; MIN, S. C. Prediction of the coating requirements for smoked salmon protection against *Listeria monocytogenes* using a defatted mustard meal-based antimicrobial edible film containing thiocyanates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 231–237, abr. 2015.

LEE, H.; KIM, J. E.; MIN, S. C. Quantitative risk assessments of the effect of an edible defatted soybean meal-based antimicrobial film on the survival of Salmonella on ham. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 30–38, ago. 2015.

LEE, H.; MIN, S. C. Antimicrobial edible defatted soybean meal-based films incorporating the lactoperoxidase system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 42–50, nov. 2013.

LEE, W.-H.; LOO, C.-Y.; BEBAWY, M.; LUK, F.; MASON, R. S.; ROHANIZADEH, R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 4, p. 338–378, jul. 2013.

LIU, F.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; CHIOU, B.-S.; LI, Y.; MA, Y.; WILLIAMS, T. G.; WOOD, D. F.; MCHUGH, T. H.; ZHONG, F. Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. **Food Hydrocolloids**, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16303411>>. Acesso em: 9 ago. 2016.

MACHADO, A. E. da H. Photodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, abr. 2000.

MAGALHÃES, R.; FERREIRA, V.; BRANDÃO, T. R. S.; PALENCIA, R. C.; ALMEIDA, G.; TEIXEIRA, P. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. **Food Microbiology**, v. 57, p. 103–108, ago. 2016.

MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences, NATURECEUTICALS (NATURAL PRODUCTS), NUTRACEUTICALS, HERBAL BOTANICALS, AND PSYCHOACTIVES: DRUG**

DISCOVERY AND DRUG-DRUG INTERACTIONS. v. 78, n. 18, p. 2081–2087, 27 mar. 2006.

MANIGLIA, B. C.; DE PAULA, R. L.; DOMINGOS, J. R.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization of turmeric film plasticized with glycerol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1187–1195, dez. 2015.

MANIGLIA, B. C.; DOMINGOS, J. R.; DE PAULA, R. L.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269–277, maio 2014.

MANZANAREZ-LÓPEZ, F.; SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R.; PERALTA, E. Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 508–517, jun. 2011.

MAPA. Department of Agriculture, Livestock and Food Supply. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no. 04, de 31 março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Brazilian Public DOU 05/04/2000**, 2000. . Disponível em:

<http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/carnes_salsicha.htm>. Acesso em: 31 out. 2016.

MARCHIORE, N. G.; MANSO, I. J.; KAUFMANN, K. C.; LEMES, G. F.; PIZOLLI, A. P. de O.; DROVAL, A. A.; BRACHT, L.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V. Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages. **LWT - Food Science and Technology**, SLACA 2015: “Food Science for quality of life and health ageing” Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. v. 76, Part B, p. 203–208, mar. 2017.

MARTINS, E. A.; LEAL GERMANO, P. M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 297–302, fev. 2011.

MASTROMATTEO, M.; BARBUZZI, G.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Controlled release of thymol from zein based film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 222–227, abr. 2009.

MAYACHIEW, P.; DEVAHASTIN, S. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 594–601, 1 fev. 2010.

MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF CURCUMIN. In: AGGARWAL, B. B.; SURH, Y.-J.; SHISHODIA, S. (Ed.). **The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease**. ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY. New York: Springer US, 2007. p. 105–125.

MEYVIS, T. K. L.; SMEDT, S. C. D.; OOSTVELDT, P. V.; DEMEESTER, J. Fluorescence Recovery After Photobleaching: A versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 8, p. 1153–1162, 1 ago. 1999.

MIN, S.; KROCHTA, J. M.; RUMSEY, T. R. Diffusion of thiocyanate and hypothiocyanite in whey protein films incorporating the lactoperoxidase system. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 4, p. 1116–1124, jun. 2007.

MIN, S.; RUMSEY, T. R.; KROCHTA, J. M. Diffusion of the antimicrobial lysozyme from a whey protein coating on smoked salmon. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 39–47, jan. 2008.

MITTAL, V. Polymers from renewable resources. In: MITTAL, V. (Ed.). **Renewable Polymeres: Synthesis, Processing, and Technology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. p. 1–22.

MIYASAKI, K. N.; CHIARINI, E.; SANT'ANA, A. de S.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. de M. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguíça, a Brazilian fresh pork sausage. **Meat Science**, v. 83, n. 3, p. 523–527, nov. 2009.

MUKHOPADHYAY, A.; BASU, N.; GHATAK, N.; GUJRAL, P. K. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. **Agents and Actions**, v. 12, n. 4, p. 508–515, 1 abr. 1982.

MULIK, R. S.; MÖNKKÖNEN, J.; JUVONEN, R. O.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: Enhanced in vitro anticancer activity by induction of

apoptosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, n. 1–2, p. 190–203, 15 out. 2010.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 82–87, 3 abr. 2008.

MUSSO, Y. S.; SALGADO, P. R.; MAURI, A. N. Smart edible films based on gelatin and curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 8–15, maio 2017.

NAGATA, J. Y.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; BATISTELA, V. R.; TERADA, R. S. S.; GRACIANO, A. X.; BAESSO, M. L.; HAYACIBARA, M. F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122–131, jun. 2012.

NAHAR, L.; SARKER, S. Phytochemistry of the genus *Curcuma*. In: RAVINDRA, P. .; BADU, K. .; SIVARAMAN, K. (Ed.). **Turmeric**. Medicinal and aromatic plants - industrial profiles. New York: CRC Press, 2007. p. 71–106.

NAIR, K. P. P. **The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: The Invaluable Medicinal Spice Crops**. [s.l.] Newnes, 2013.

NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 471–478, maio 2008.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; CARVALHO, P. I. N.; ROSTAGNO, M. A.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, nov. 2014.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; PIETTE, G.; BÉGIN, A.; HOLLEY, R. A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1–2, p. 139–148, 5 dez. 2000.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 2, p. 149–155, fev. 2001.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 116–123, jan. 2008.

PASCHOAL, M. A.; TONON, C. C.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; BAGNATO, V. S.; GIUSTI, J. S. M.; SANTOS-PINTO, L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 313–319, set. 2013.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; MARCILLA, A.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 1, p. 64–70, abr. 2011.

PAVLATH, A. E.; ORTS, W. Edible films and coatings: Why, What, and How? In: HUBER, K. C.; EMBUSCADO, M. E. (Ed.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**. [s.l.] Springer New York, 2009. p. 1–23.

PAYET, L.; PONTON, A.; LÉGER, L.; HERVET, H.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Self-diffusion in chitosan networks: from a gel–gel method to fluorescence recovery after photobleaching by fringe pattern. **Macromolecules**, v. 41, n. 23, p. 9376–9381, 9 dez. 2008.

PAZ-CRISTOBAL, M. P.; GILABERTE, Y.; ALEJANDRE, C.; PARDO, J.; REVILLO, M. J.; REZUSTA, A. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Trichophyton Spp*. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3-4, p. 221–225, 1 out. 2014.

PENHA, C. B.; BONIN, E.; DA SILVA, A. F.; HIOKA, N.; ZANQUETA, É. B.; NAKAMURA, T. U.; DE ABREU FILHO, B. A.; CAMPANERUT-SÁ, P. A. Z.; MIKCHA, J. M. G. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–5, 2016.

PÉREZ-GAGO, M. Protein-based films and coatings. In: BAI, J. (Ed.). **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**. [s.l.] CRC Press, 2011. p. 13–77.

PERRY, P. A.; FITZGERALD, M. A.; GILBERT, R. G. Fluorescence Recovery after Photobleaching as a probe of diffusion in starch systems. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 2, p. 521–530, 1 fev. 2006.

PERUSSI, J. R. Photodynamic inactivation of microorganisms. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, ago. 2007.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D.; MEDINA-JARAMILLO, C.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; GOYANES, S. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, fev. 2017.

PINHEIRO, A. C.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; QUINTAS, M. A. C. Transport mechanism of macromolecules on hydrophilic bio-polymeric matrices – Diffusion of protein-based compounds from chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 3, p. 633–638, jun. 2013.

PINTEA, A. Food colorants derived from natural sources by processing. In: SOCACIU, C. (Ed.). **Food Colorants**. Chemical & functional properties of food components. New York: CRC Press, 2007. p. 303–426.

PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, jun. 2009.

PULLA REDDY, A. C.; LOKESH, B. R. Effect of dietary turmeric (*curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 279–283, 1 mar. 1994.

REITS, E. A. J.; NEEFJES, J. J. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 6, p. E145–E147, jun. 2001.

REZUSTA, A.; LÓPEZ-CHICÓN, P.; PAZ-CRISTOBAL, M. P.; ALEMANY-RIBES, M.; ROYO-DÍEZ, D.; AGUT, M.; SEMINO, C.; NONELL, S.; REVILLO, M. J.; ASPIROZ, C.; GILABERTE, Y. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida species*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 613–619, 1 maio 2012.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; MELO, N. R. de; SANCHES-SILVA, A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 132–140, mar. 2017.

ROCOURT, J.; BENEMBAREK, P.; TOYOFUKU, H.; SCHLUNDT, J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat

foods: the FAO/WHO approach. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 263–267, 1 abr. 2003.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; DESOBRY, S. Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 138–143, jul. 2011.

SANDIKCI ALTUNATMAZ, S.; YILMAZ AKSU, F.; ISSA, G.; BASARAN KAHRAMAN, B.; DULGER ALTINER, D.; BUYUKUNAL, S. Antimicrobial effects of curcumin against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 pathogens in minced meat. **Veterinárni Medicína**, v. 61, n. No. 5, p. 256–262, 15 jul. 2016.

SANT'ANA, A. S.; IGARASHI, M. C.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 1–2, p. 1–9, 2 abr. 2012.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. .; OLIVEIRA, M. .; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. .; GARCIA, E. E. . **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. 1 ED ed. [s.l.: s.n.]

SARKAR, T.; HUSSAIN, A. Photocytotoxicity of curcumin and its iron complex. v. 5, n. 1, 2016.

SCHAWÉ, J. E. K. Analysis of non-isothermal crystallization during cooling and reorganization during heating of isotactic polypropylene by fast scanning DSC. **Thermochimica Acta**, Chip Calorimetry. v. 603, p. 85–93, 10 mar. 2015.

SCHICK, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 6, p. 1589, 1 nov. 2009.

SIDDIQUI, M. A.; AHAMED, M.; AHMAD, J.; MAJEED KHAN, M. A.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; ALROKAYAN, S. A. Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 641–647, 1 mar. 2012.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL. v. 64, Supplement, p. 163–174, dez. 2012.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Future perspectives in pharmaceutics contributions from younger scientists. v. 364, n. 2, p. 328–343, 8 dez. 2008.

SILVA, Â.; DUARTE, A.; SOUSA, S.; RAMOS, A.; DOMINGUES, F. C. Characterization and antimicrobial activity of cellulose derivatives films incorporated with a resveratrol inclusion complex. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 481–489, nov. 2016.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241–248, 25 mar. 2003.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, set. 2002.

SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 102–108, maio 2012.

SOLIVA-FORTUNY, R.; ROJAS-GRAU, M.; MARTÍN-BELLOSO, O. Polysaccharide coatings. In: BALDWIN, E. ; HAGENMAIER, R. ; BAI, J. (Ed.). **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**. New York: CRC Press, 2011. p. 103–136.

SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R.; PERALTA, E. Fabrication of poly(lactic acid) films with resveratrol and the diffusion of resveratrol into ethanol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 2, p. 970–978, 15 jul. 2011.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 108–120, ago. 2013.

SPRAGUE, B. L.; MCNALLY, J. G. FRAP analysis of binding: proper and fitting. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 84–91, fev. 2005.

TEMBA, B. A.; FLETCHER, M. T.; FOX, G. P.; HARVEY, J. J. W.; SULTANBAWA, Y. Inactivation of *Aspergillus flavus* spores by curcumin-mediated photosensitization. **Food Control**, v. 59, p. 708–713, jan. 2016.

THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S.; VERNOZY-ROZAND, C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 85–94, 25 jun. 2005.

TONGDEESOONTORN, W.; MAUER, L. J.; WONGRUONG, S.; SRIBURI, P.; RACHTANAPUN, P. Mechanical and physical properties of cassava starch-gelatin composite films. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 61, n. 10, p. 778–792, 1 set. 2012.

TORTIK, N.; SPAETH, A.; PLAETZER, K. Photodynamic decontamination of foodstuff from staphylococcus aureus based on novel formulations of curcumin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 10, p. 1402–1409, 17 set. 2014.

USFDA. Ingredients, Additives, GRAS & Packaging - Guidance for Industry: Preparation of Premarket Submissions for Food Contact Substances: Chemistry Recommendations. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm081818.htm#i1c>>. Acesso em: 8 fev. 2017.

US FDA. Generally recognized as safe (GRAS) status of curcumin: GRN number 460. 2013. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm368039.htm>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

VÁZQUEZ, A.; FORESTI, M. L.; CYRAS, V. Production, chemistry and degradation of starch-based polymers. In: PLACKETT, D. (Ed.). **Biopolymers – New Materials for Sustainable Films and Coatings**. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 15–42.

WU, J.; HOU, W.; CAO, B.; ZUO, T.; XUE, C.; LEUNG, A. W.; XU, C.; TANG, Q.-J. Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 12, n. 3, p. 385–392, set. 2015a.

WU, J.; LIU, H.; GE, S.; WANG, S.; QIN, Z.; CHEN, L.; ZHENG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Q. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 427–435, jan. 2015b.

WU, J.; MOU, H.; XUE, C.; LEUNG, A. W.; XU, C.; TANG, Q.-J. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 15, p. 34–39, set. 2016.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**, v. 33, n. 7, p. 571–578, ago. 2000.

YOSHIOKA, M.; HANCOCK, B. C.; ZOGRAFI, G. Crystallization of indomethacin from the amorphous state below and above its glass transition temperature. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 12, p. 1700–1705, 1 dez. 1994.

YU, L.; CHEN, L. Polymeric material from renewable resources. In: YU, L. (Ed.). **Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 1–14.

ZAMUDIO-FLORES, P. B.; OCHOA-REYES, E.; ORNELAS-PAZ, J. D. J.; APARICIO-SAGUILÁN, A.; VARGAS-TORRES, A.; BELLO-PÉREZ, L. A.; RUBIO-RÍOS, A.; CÁRDENAS-FÉLIX, R. G. Effect of storage time on physicochemical and textural properties of sausages covered with oxidized banana starch film with and without betalains. **CyTA - Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 456–463, 3 jul. 2015.

ZOUBARI, G.; STAUFENBIEL, S.; VOLZ, P.; ALEXIEV, U.; BODMEIER, R. Effect of drug solubility and lipid carrier on drug release from lipid nanoparticles for dermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 110, p. 39–46, jan. 2017.

CAPÍTULO. 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para melhor entendimento dos métodos utilizados estas serão descritas detalhadamente uma vez que nos manuscritos submetidos estão resumidos.

3.1. Capítulo 4. Aplicação de revestimento comestível à base de resíduo de cúrcuma e gelatina em salsicha

3.2. Materiais

A cúrcuma foi fornecida pela Oficina de Ervas Farmácia de Manipulação Ltda (Ribeirão Preto, Brasil). A gelatina foi adquirida de um mercado local da marca Royal (Gelco Gelatinas do Brasil LTDA, SP). O glicerol, utilizado com plastificante, da marca Sigma-Aldrich foi adquirido da Casa da Química Indústria e Comércio LTDA, (São Paulo, Brasil). As matérias primas cárneas: carne bovina e toucinho foram obtidos do estabelecimento JBS/Brasil. Os ingredientes (fécula de mandioca, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja, tripolifosfato de sódio, eritorbato de sódio e nitrato de sódio) foram fornecidos pela empresa New Max Industrial.

3.3. Obtenção do resíduo de cúrcuma

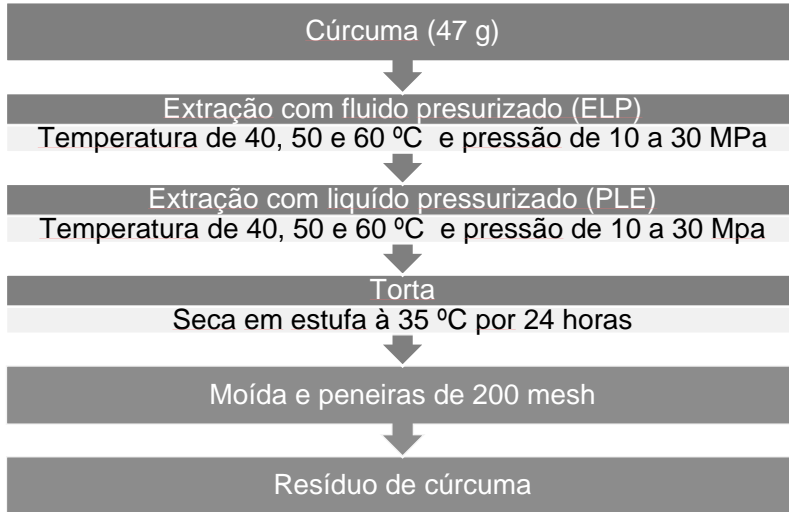
O resíduo de cúrcuma foi obtido no Laboratório de Tecnologia Supercrítica LASEFI-/DEA/UNICAMP. O método para obtenção do resíduo utilizado foi descrito por Osorio-Tobón et al. (2014). Antes do processo de extração, os rizomas foram mantidos sob refrigeração a 2 °C, moídos em um moinho de facas (Marconi, model MA340, Piracicaba, São Paulo), e em seguida passados por um conjunto de peneiras de malhas entre 24 a 48 mesh (WS Tyler, Wheeling, USA).

O processo de extração com fluido supercrítico (EFS) e a extração com líquido pressurizado (ELP) foram realizados sequencialmente em um equipamento montado no laboratório de tecnologia supercrítica (LASEFI) descrito por Farias-Campomanes; e Meireles (2013). Este equipamento pode ser usado para realizar os processos EFS (com ou sem cossolvente) e ELP. A fim de integrar o processo de EFS e ELP, os rizomas foram inicialmente submetidos ao EFS obtendo fração de resíduo

da cúrcuma desaromatizado (DCRs). Imediatamente após o processo de EFS, sem remover a matéria prima da célula de extração, os curcuminoides foram extraídos por ELP usando etanol como solvente.

O processo para EFS e ELP foi realizado com 47 g de cúrcuma colocados dentro da célula de extração (415 cm³) (Figura 3.1).

Figura 3.1. Representação da obtenção do resíduo de cúrcuma.



A amostra utilizada continha aproximadamente 13 % do volume total da célula de extração. O volume do recipiente foi preenchido com pérolas de vidro de mesh de 8-10 em uma coluna de teflon. O solvente foi o dióxido de carbono (99,9 % CO₂, Gama Gases Especiais Ltda., São Bernardo do Campo, Brasil). Primeiramente, o CO₂ foi resfriado a -10 °C no banho termostático (Marconi, model MA-184, Piracicaba, SP) e então bombeado para o extrator. A temperatura da célula de extração foi aquecida até a temperatura de 40 ou 50 °C e mantida constante pelo banho termostático (Marconi, model MA-184, Piracicaba, SP), com óleo como fluido circulante. A célula de extração foi pressurizada usando o CO₂ como solvente. Após alcançar a temperatura e pressão de trabalho, a célula foi mantida por um período estático de 20 min e em seguida a válvula de bloqueio foi aberta e a válvula micrométrica era cuidadosamente ajustada para manter a pressão do sistema e controlar a vazão de CO₂ constante de 8.6×10^{-3} kg/min e uma taxa solvente/alimentação de 12 para 1.

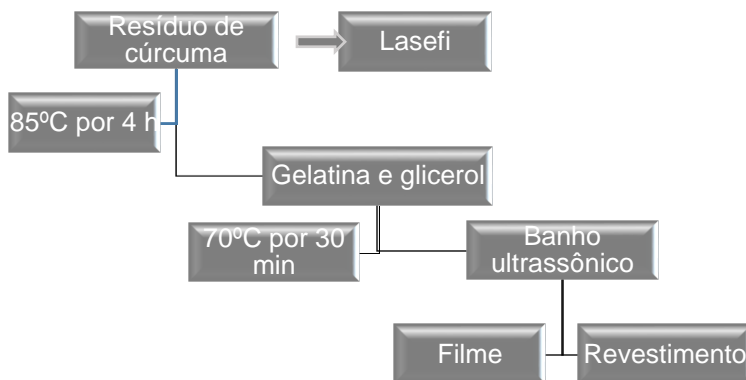
Ao final do processo de EFS, imediatamente iniciava-se o processo de ELP com o bombeamento do etanol 99.5 % (Dinâmica, São Paulo, Brasil) para o extrator usando uma bomba de HPLC (Thermo Separation Products, model Consta Metric 3200 P/F, Fremont, USA). O recipiente de extração foi aquecido como previamente descrito no processo para a EFS. Novamente, após alcançar a pressão e temperatura de operação, a célula de extração foi mantida por um período estático de 20 min. Em seguida, a válvula de bloqueio era aberta, e a válvula micrométrica era cuidadosamente ajustada para manter a pressão do sistema e o fluxo de solvente constante de 1.11×10^{-4} kg/s e a taxa de solvente/alimentação de 9.5. Em ambas as extrações foram avaliadas seis pressões (10,15,20,25,30 MPa) e três temperaturas (313,323 e 333 K).

Após os processos de extração, a torta obtida foi seca em uma estufa com circulação de ar a 35 °C por 24 horas, e em seguida moída novamente passando por peneiras com aberturas de 74 µm (200 mesh), no qual o pó obtido foi denominado resíduo de cúrcuma e posteriormente utilizado para a formação da solução filmogênica.

3.4. Desenvolvimento do revestimento e filme comestível

A elaboração da solução filmogênica de resíduo de cúrcuma e gelatina utilizada para o revestimento na salsicha foi realizada da pelo procedimento descrito a seguir (Figura 3.2).

Figura 3.2. Esquema do procedimento de obtenção da solução comestível à base de resíduo de cúrcuma e gelatina.



A formulação utilizada para elaborar as coberturas à base de amido do resíduo de cúrcuma seguiu o método descrito por Maniglia et al., (2015). Uma suspensão aquosa com 5 % do resíduo de cúrcuma foi homogeneizada por 30 minutos em um agitador magnético (FISATOM, 752A). Posteriormente, a suspensão foi aquecida a 85 °C por 4 horas e a cada hora foi homogeneizada com Ultra-Turrax T25 (Ika-Werke, Germany) por 2 minutos a 12000 rpm, para obter uma completa liberação do amido que está preso entre proteínas e fibras. Em seguida, sob agitação foram adicionados gelatina e glicerol e mantido a 70 °C por mais 30 minutos, para completa miscibilidade. Logo após, a solução passou por um banho ultrassônico por 20 minutos, para retirada de bolha de ar. Ao final, a formulação com 12 % de sólidos totais continha em base seca: 50 % de gelatina, 35 % de resíduo de amido e 15 % de glicerol. A cobertura à base de gelatina seguiu o método descrito por Benbettaieb et al., (2014), no qual a gelatina e glicerol foram adicionados em água destilada na temperatura de 70 °C sob agitação por 30 min. O preparo da solução à base do resíduo de cúrcuma seguiu o mesmo método descrito por Maniglia et al. (2015). Ao final as soluções com 12 % de sólidos totais continham em base seca: 85 % de resíduo de cúrcuma ou gelatina e 15 % de glicerol.

Para determinação das propriedades mecânicas e térmicas os filmes foram preparados por casting, a solução foi vertida em placas de acrílico mantendo uma massa de 0.2 g.m⁻². O filme foi seco por 8 horas em uma estufa com circulação de ar a 35 °C. Antes da caracterização, todos os filmes foram condicionados pelo menos 48 horas em um dessecador com solução de NaBr (58 % UR).

3.5. Caracterização das coberturas na forma de filme

3.5.1 Propriedades mecânicas dos filmes

Teste de tração foi realizado no texturômetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems), e a tensão de ruptura, o alongamento na ruptura e o módulo de Young foram determinados. Os filmes foram cortados em tiras (25 X 90 mm) e tiveram sua espessura medida em cinco pontos. Os testes foram realizados conforme o método D882-96 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM D882-12, 2001), com distância inicial das garras de 50 mm e velocidade de tração de 1 mm s⁻¹.

3.5.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A determinação da permeabilidade ao vapor de água foi realizada de acordo com o método ASTM E96-00 (ASTM E96M-10, 1995). O filme foi colocado em uma cápsula contendo CaCl_2 (UR-2 %), que foi selada e armazenada em câmara com umidade relativa de 75 % e temperatura de 25 °C. As cápsulas foram pesadas em uma balança analítica (AY 200, Shimadzu) em intervalos de 1 h durante 12 h e após 24 h. A PVA foi calculada pela equação 3.1:

$$\text{PVA} = \frac{w \cdot l}{A \cdot \Delta p} \quad 3.1$$

sendo l a espessura do filme (m), A a área de permeação (0.0031 m^2), Δp a diferença de pressão de vapor através do filme (Pa) e w a taxa de ganho de massa pela célula de difusão (g/h).

3.5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise em DSC dos filmes puros e da blenda foi realizada a fim de se obter o seu ponto de fusão. As amostras primeiramente foram condicionadas em câmara com pentóxido de fósforo com 0 % de umidade relativa durante dois dias a 25 °C. Após o condicionamento, as amostras de 6 mg \pm 1 mg foram fechadas em cápsulas de alumínio e analisadas em DSC Perkin-Elmer, Jade (Massachusetts, USA) previamente calibrado com Índio e Zinco, utilizando-se gás de arraste N_2 com vazão de 50 mL/min. Os termogramas dos materiais foram obtidos em uma faixa de temperatura de -50 a 200 °C, com velocidade de aquecimento de 10 °C/min. Os resultados foram analisados no software Pyris DSC.

3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório Central de Microscopia (LCME) da UFSC. Os filmes analisados foram liofilizados durante 24 horas para a remoção total da umidade. As amostras foram montadas em placas de alumínio e recobertas com ouro utilizando um metalizador LEICA (EM SDC 500). As amostras foram analisadas por um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390 LV (Japão) com um feixe de elétrons de 10

kV. As superfícies (em contato com a placa e com o ar de secagem) e a seção transversal (fraturada) foram avaliadas.

3.5.5 Espectro no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho (FTIR) foi realizada no dispositivo 16 PC Perkin-Elmer com resolução de 4 cm^{-1} na faixa de $4,000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Para o FTIR, as amostras foram acondicionadas em um dessecador com 54 % de umidade relativa por 48 h antes da análise. As amostras de filmes de 2 cm de diâmetro foram colocadas entre dois discos de KBr. O espectro obtido foi usado para determinar as interações entre o amido e a gelatina.

3.6. Elaboração da salsicha

As salsichas foram preparadas em uma planta piloto no Laboratório de Carne e Derivados-LCD-UNICAMP. A sua composição está apresentada na Tabela 3.1. Primeiramente, a carne bovina resfriada foi moída em disco com orifícios de 7 mm e a gordura (toucinho) em disco com orifícios de 3 mm. No *cutter* (Mado®), foram adicionados a carne bovina, a carne mecanicamente separada (CMS), sal refinado e 50 % do gelo a ser utilizado. Em seguida a mistura foi triturada por 3 a 4 min a baixa velocidade para extração das proteínas miofibrilares. Em seguida, foram adicionados os aditivos tripolifosfato e nitrito de sódio, triturando-se até a temperatura atingir $7 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, foram adicionados o restante do gelo, eritorbato de sódio, proteínas de soja a fécula de mandioca, e os demais condimentos. Por último o toucinho, num processo contínuo de cominuição por 4 min e temperatura da massa abaixo de $12 \text{ }^\circ\text{C}$.

A massa foi embutida em envoltórios artificiais impermeáveis (Viscase Nojax Clear EZP) (Mainca modelo EC-12,) e o produto foi submetido a tratamento térmico em estufa de cozimento marca ARPROTEC com o seguinte programa de cozimento: 30 minutos a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 minutos a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ com UR 85-90 %, 10 minutos a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ com UR 90-95 %, e $85 \text{ }^\circ\text{C}$ com UR 90-95 % até que a temperatura interna monitorada por um termopar inserido na parte central do produto atingisse $72 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o cozimento as salsichas foram resfriadas em banho de gelo, despeladas. 50% das salsichas foram embaladas a vácuo sem revestimento e outra metade foram revestidas com solução comestível à base de amido de cúrcuma e gelatina (conforme item 3.7) e armazenadas

a 5 °C e 10 °C. As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas a cada 10 dias durante o período de 30 dias.

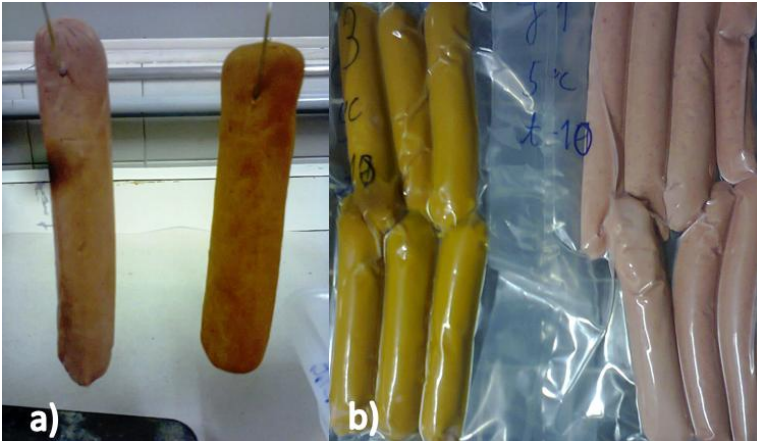
Tabela 3.1. Composição da salsicha.

Ingredientes	Composição (%)
Carne Bovina	14
CMS	60
Toucinho	5
Gelo/Água	10,5
Fécula de mandioca	5
Proteína concentrada de soja	1
Proteína isolada de soja	1
Sal	2,5
Tripollifosfato de sódio	0,35
Eitorbato de sódio	0,5
Nitrito de sódio	0,015

3.7. Aplicação do revestimento comestível na salsicha

O recobrimento da salsicha com solução comestível foi realizada em uma câmara fria a 8 °C. A temperatura da solução filmogênica foi mantida a 25 ± 1 °C para evitar gelificação da solução. As salsichas foram imersas na solução e suspensas em um suporte em aço inoxidável de um sistema móvel por 40 minutos na câmara fria a 8 °C para a adesão do revestimento. Em seguida foram embaladas a vácuo e armazenadas sob refrigeração. Os tratamentos foram separados em T1 e T2 para salsichas sem recobrimento armazenadas 5 °C e 10 °C respectivamente, e T3 e T4 para salsichas com recobrimento armazenadas a 5 °C e 10 °C respectivamente. A Figura 3.3.a representa como as salsichas foram presas em clips esterilizados e a Figura 3.3.b mostra as salsichas embaladas a vácuo para o armazenamento.

Figura 3.3. a) Foto do acondicionamento das salsichas no suporte inoxidável para aderência do revestimento comestível. b) amostra de salsicha com e sem revestimento comestível.



3.8. Análises físico-químicas e microbiológicas das salsichas

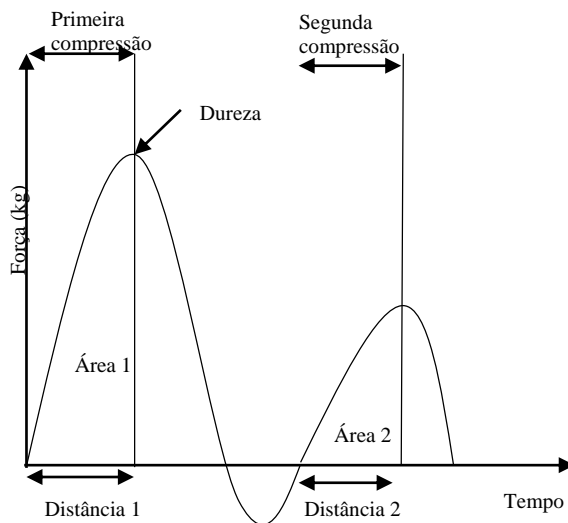
3.8.1 Análise de cor, atividade de água (Aa) and pH

O pH foi determinado com uma sonda de penetração (MA 130 Metler, Toledo). A atividade de água foi realizada no aparelho Aqualab- (Decagon Device INC., Pullman, USA). Este equipamento é um psicrômetro que mede a Aa por meio do ponto de orvalho em espelho resfriado, desse modo, o resultado apresentado é razão entre a pressão de vapor de saturação na temperatura do ponto de orvalho pela pressão de saturação na temperatura da amostra. A cor foi determinada com um espectrofotômetro Minolta (CM-5-Konica Minolta), pelo sistema padrão CIELAB, onde L^* (luminosidade), a^* (vermelhidão) e b^* (amarelecimento). Para análise de cor, as amostras sem revestimentos foram picadas e as amostras que continham revestimentos foram despeladas e em seguida picadas. A remoção do revestimento foi realizado para efeito de comparação com o controle. Todas as análises foram realizadas em triplicatas com três salsichas.

3.8.2 Análise do perfil de textura (TPA)

As análises do perfil de textura foram realizadas em um texturômetro TA-xT2i (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY). Para calibração do equipamento utilizou-se uma célula de 25 kg, e o teste foi realizado por dois sucessivos ciclos de compressão, considerando 5 s com o tempo entre as compressões. Utilizou dez amostras cilíndricas de salsicha, à temperatura ambiente, com diâmetro de 15 mm e altura de 20 mm. As amostras foram comprimidas na secção longitudinal a 30 % da sua altura inicial, com velocidade de 1 mm/s. O probe utilizado foi o P-35 (35 mm de diâmetro, aço inoxidável). Os parâmetros avaliados foram: dureza, elasticidade, coesividade e mastigabilidade (Figura 3.4). Dureza é a força máxima requerida para comprimir a amostra, expressa em N. Coesividade é a razão área durante a segunda compressão pela área da primeira compressão, A_2/A_1 . A elasticidade é a porcentagem de recuperação da amostra, sendo a razão entre as duas deformações, D_2/D_1 . Mastigabilidade é a energia requerida para mastigar os alimentos, no qual é o produto da dureza X coesividade X elasticidade, expressa em N.

Figura 3.4. Curva de análise de perfil de textura instrumental típica.



3.8.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas foram: contagem total de aeróbios mesófilos, bactérias lácticas e psicotróficas. Os métodos

utilizados para estes ensaios são descritos conforme *American Public Health Association* (A.P.H.A, 2001). Porções de 25 g de cada amostra foram homogeneizadas em *Stomacher Lad Blender* (Seward Laboratory, London, UK) com 225 mL de água peptonada 0,1 % e diluições decimais foram utilizadas para as análises microbiológicas.

Após diluições, alíquotas de 1 mL foram retiradas e inoculadas em placa de petri previamente esterilizadas. Em cada placa foi adicionado entre 15 e 20 mL de meio de cultura, previamente fundido e mantido a temperatura de 45 °C. O inóculo foi misturado ao meio com movimentos circulares em forma de oito. Após a completa solidificação do meio as placas foram invertidas e incubadas em estufa ou geladeira conforme cada bactéria: para as determinações de contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas (contagem padrão em placas) mantidas em estufa a temperatura de 35 °C por 48 h. A contagem de bactérias lácticas foi realizada em meio ágar MRS, mantida em estufa a temperatura de 37 °C por 72 h. A contagem de bactérias psicrotróficas foi realizada em meio ágar padrão, mantida em geladeira a 7 °C durante 10 dias. Para a contagem de colônias foram selecionadas as placas que continham entre 30 e 300 colônias.

3.9. Capítulo 5. Liberação da curcumina dos filmes comestível para fluido simulador de alimento e salsicha e análise de mobilidade da curcumina pela técnica FRAP.

A pesquisa apresentada nos capítulos 4 e 5 foram realizadas no departamento de Ciências e Tecnologias de Alimentos na Universidade da Califórnia, Davis, USA, sob a supervisão do professor Nitin Nitin, no período de setembro 2015 a agosto de 2016. Nesta seção serão descritos os materiais e métodos dos capítulos citados.

3.10. Materiais

O resíduo de cúrcuma utilizado é o mesmo descrito na seção 3.2. Amido de mandioca (Bob's red Mill (Milwaukei, OR, USA), óleo de oliva (Trader Joe's, Davis, California, USA) e as salsichas (Chicken Franks Foster Farms Livingston, CA, USA) foram compradas de um mercado local. As salsichas comerciais apresentam em sua composição 57 % água, 28 % de gordura total, 12,5 % de proteína e 1,78 % de carboidrato. Glicerol, fluoresceína, curcumina e gelatina foram comprados da Sigma-Aldrich (3050 Spice Street , St Louis, MO, USA).

Água ultrapura foi obtida usando um sistema de filtração Milli-Q (EDM Millipore; Billerica, MA, USA).

3.11. Extração da curcumina do resíduo de cúrcuma.

Extração do soluto, por processo convencional, foi realizada para determinar a concentração de curcumina no resíduo de cúrcuma. Utilizou-se metanol a 100 % e etanol/água nas concentrações de 100 %, 75 %, 50 % e 30 %, como solventes para extração. A escolha da utilização de etanol em diferentes concentrações foi devido aos experimentos realizados no presente trabalho de liberação da curcumina dos filmes comestíveis. Uma amostra de 0.1 ± 0.02 g de resíduo de cúrcuma foi misturada com 5 mL de solvente em um frasco de vidro âmbar sob agitação, a 23 °C por 48 horas. Após a extração, a solução foi centrifugada (centrifuge 5809, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 4300 xg por 5 min e o sobrenadante foi coletado e absorvância lida no espectrofotômetro (Spectra max 340, California, USA) a 425 nm. Concentração de curcumina foi baseada nas curvas padrões. 1 mg de curcumina / mL de etanol ou metanol foi usado como solução estoque. As curvas de calibração foram geradas nas concentrações de curcumina de 0.68 a 100 µg/mL em triplicata. Nas concentrações de 1.8 a 60 µg/mL, obteve-se uma boa linearidade ($R^2 \geq 0.99$). A Tabela 3.2 apresenta os valores dos parâmetros a e b para correlação linear das soluções de metanol e etanol.

Tabela 3.2. Valores dos parâmetros a e b para curva padrão para diferentes concentrações de etanol em diferentes temperaturas e metanol.

T (°C)	Parâmetros		
	Etanol em água (v/v)	a	b
23	100	27.04	-2.41
	90	20.82	-0.16
	75	18.48	0.87
	50	28.64	0.68
	30	30.19	-2.90
4	90	21.18	-0.01
	50	20.38	0.226
23	Metanol		
	100	7.54	-0.14

3.12. Preparação da solução para elaboração dos revestimentos e filmes

Às bases dos revestimentos comestível e filmes foram: blenda de gelatina e amido de mandioca adicionada de curcumina purificada e uma segunda blenda de resíduo de cúrcuma e gelatina.

3.12.1 Solução do resíduo de cúrcuma com gelatina.

A elaboração da solução para as coberturas e filme à base de resíduo de cúrcuma e gelatina foi descrita anteriormente na seção 3.3. Sendo denominados como TGF e TGC para o filme e revestimento, respectivamente.

3.12.2 Solução de amido de mandioca e gelatina adicionado de curcumina purificada

Soluções filmogênica de gelatina e amido de mandioca adicionadas de curcumina e fluoresceína foram realizadas separadamente. Uma suspensão aquosa de amido na concentração de 8.8 % (m/m) foi aquecida em um agitador magnético (IKA Works Inc., Wilmington, NC) até 71 °C e mantida sob agitação por 5 min (DE MORAES et al., 2013). Separadamente, uma solução aquosa de gelatina 12 % (m/m) foi aquecida até 70 °C até completa dissolução (BENBETTAÏEB et al., 2014). Subsequentemente, as soluções foram misturadas e glicerol (1.8 % m/m) foi adicionado. Em seguida, a solução foi novamente agitada para completar a miscibilidade por 30 min a 70 °C. Conforme cada ensaio, a curcumina foi adicionada em diferentes concentrações na solução. Para os ensaios de liberação e FRAP foi adicionado 300 µM e para o ensaio de migração foi adicionado 3 mM de curcumina. A concentração de fluoresceína (molécula hidrofílica) foi de 3 µM para o ensaio FRAP, para comparação com a curcumina que é uma molécula hidrofóbica. A concentração final da solução em base seca foi 50 % gelatina, 35 % amido e 15 % glicerol. Os filmes com curcumina e fluoresceína foram denominados CGC e CGF, respectivamente, enquanto o revestimento com adição de curcumina foi denominado CGH.

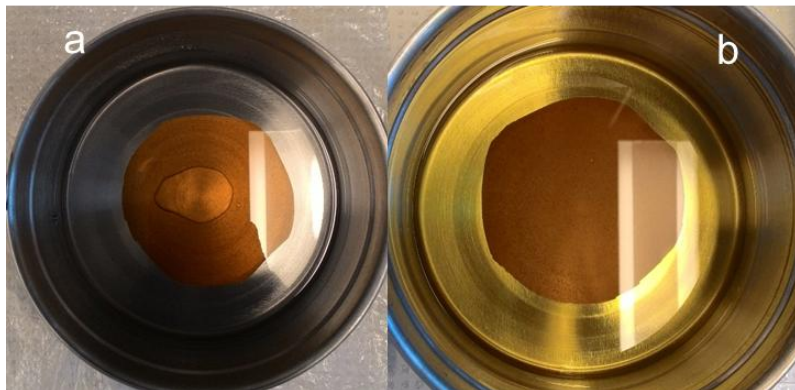
3.12.3 Preparação dos filmes

Os filmes foram preparados por *casting* a partir das soluções. As soluções foram vertidas em placas de acrílico mantendo uma massa de 0.2 g.m^{-2} e o filme foi seco por 16 horas em uma estufa a vácuo (Isotherm Vacuum Oven, Model 280 A, Fisher Scientific) a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. As amostras de filmes foram analisadas por FRAP nas seguintes condições: a) filme seco ($11 \pm 1.45 \%$ de umidade), b) filme coberto com óleo; c) filme úmido ($5.8 \pm 2.13 \%$ de umidade). Filmes úmidos foram mantidos em uma câmara com umidade relativa de 90% controlada por uma solução salina de cloreto de bário até atingirem o equilíbrio.

3.13. Liberação da curcumina do filme de resíduo de cúrcuma e gelatina (TGF) e filme de amido de mandioca e gelatina adicionado de curcumina (CGF) para fluido simulador de alimento.

Coefficientes de difusão da curcumina para ambos os filmes foram determinadas usando uma solução aquosa de etanol como simulador de alimento na concentração de 50% e 90% . Amostras de filmes foram cortadas em discos de 12 cm de diâmetros com massa de aproximadamente $1 \pm 0.05 \text{ g}$ e imersas em 55 mL de meio simulante num recipiente de alumínio de 250 mL (Figura 3.5). A razão volume/área de líquido foi 0.98 mL/cm^2 de acordo com ASTM D4754-98 (2006), que estabelece a taxa entre 155.0 e 0.31 mL/cm^2 . Os frascos de alumínio foram mantidos no escuro a temperaturas ambiente ($23 \text{ }^\circ\text{C}$) ou refrigerada ($4 \text{ }^\circ\text{C}$). Alíquotas da solução de etanol 50% foram coletadas nos tempos $1, 2, 4, 8, 12, 24$ e 48 horas. Para solução de 90% de etanol foram retiradas alíquotas diariamente por um período de 10 ou 12 dias. Cada ensaio foi realizado em triplicata e o volume de cada alíquota foi de 0.15 mL . A determinação da concentração de curcumina foi avaliada por espectrofotômetro (Spectra max 340, California, USA) a 425 nm com base nas curvas padrões realizados na seção 3.9.

Figura 3.5. Imagens do experimento de liberação de curcumina. a) Tempo inicial; b) tempo final do processo de difusão.



O processo de migração foi descrito de acordo com a cinética de difusão do migrante no filme e expresso pelo coeficiente de difusão (D). As considerações realizadas foram: 1) tanto difusão de água e o relaxamento da matriz macromolecular são mais rápidos que a difusão do composto ativo através da rede intumescida; 2) o aumento do filme devido ao intumescimento é desprezível; 3) a concentração inicial da solução simulante é zero; 4) o composto ativo está uniformemente distribuído e sua concentração está abaixo da concentração de saturação do sistema (volume infinito). Sob essas condições, a equação 3.2 seguindo a solução analítica da lei de Fick, foi considerado para determinar o coeficiente de difusão (D) (CRANK, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left[\frac{-D(2n+1)^2\pi^2 t}{4l^2}\right] \quad (3.2)$$

sendo M_t/M_∞ a razão entre curcumina liberada no tempo t e a liberada no equilíbrio, l é a espessura do filme, e D é a difusividade do migrante no filme. A função de regressão na linear (nlinfit) do MATALB R2012a (Mathworks Inc., USA) foi utilizada para determinar o coeficiente de difusão da equação 3.2.

3.14. Recuperação da Fluorescência após Fotodegradação (FRAP)

O FRAP é uma técnica que pode ser usada para determinar o coeficiente de difusão de pequenas moléculas fluorescentes em filmes comestíveis em um específico comprimento de onda (KARBOWIAK et al., 2009). Os coeficientes de difusão foram determinados em três condições para simular alimentos secos (filme seco), úmidos (filme armazenado em uma câmara com 90 % de umidade relativa) e oleosos (adição de óleo na superfície do filme). Os filmes foram cortados com 1 cm² e colocados em uma lâmina de vidro e coberto com outra lâmina fina de vidro. O FRAP foi realizado em um microscópio confocal (ZEISS LSM 510 META) usando uma lente objetiva de 25X de aproximação no ar. O raio da área de degradação foi de 9.8 µm e a fluorescência das amostras foram degradadas usando um laser de Argon com 6.1 mW (100 % da energia) em um comprimento de onda de 488 nm. O tempo utilizado para degradação da fluorescência foi até alcançar 50 % da intensidade inicial, com base em testes iniciais. As aquisições das imagens foram realizadas usando o tamanho de 256-256 com máxima velocidade de varredura. As imagens foram coletadas a cada 2 s de intervalo com 0.1% da máxima intensidade do laser, sendo que dependendo tempo de cada experimento modificou com as condições de cada filme até atingirem o equilíbrio. A abertura numérica foi 0.8 N.A e o experimento foi realizado a temperatura ambiente (~23 °C). Os dados foram ajustados usando a simples função exponencial (equação 3.3) (BONETTI; ROGER, 2013):

$$I(t) = (I_{\infty} - I_0) \times \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{diff}}}\right) \right\} + I_0 \quad (3.3)$$

sendo: I_0 e I_{∞} respectivamente: intensidade da fluorescência no tempo 0 depois da degradação e no tempo infinito, quando a concentração do composto é uniforme dentro da amostra; $I(t)$ é a intensidade ao longo do tempo de recuperação da fluorescência; τ_{diff} é definido como o tempo característico para molecular difundir através da área degradada ao longo de um comprimento característico. O tempo difusivo característico (τ_{diff}) é relacionado para o coeficiente de difusão pela equação 3.4:

$$D = \frac{R^2}{4\tau_{\text{diff}}} \quad (3.4)$$

sendo R é o comprimento característico no qual a difusão ocorre. Por uma regressão não linear usando a função `nlinfit` do `MATLAB R2012a` (Mathworks Inc., USA) foram ajustados os dados de intensidade pelo tempo com a equação 3.2.

A análise do FRAP também foi realizada nos polímeros separadamente, a fim de determinar qual matriz tem maior influência na difusão e mobilidade da curcumina. Os testes foram realizados nos filmes do resíduo de cúrcuma, gelatina adicionada de curcumina e amido de mandioca adicionado de curcumina, com os filmes secos e em contato com óleo. Não foram realizados os experimentos com os filmes úmidos, devido à baixa mobilidade demonstrada nos experimentos utilizados com as blendas. Resultados dessas análises estão apresentados no apêndice 1. Os experimentos foram realizados usando três filmes para cada condição e de cada filme realizou-se oito análises de recuperação da fluorescência.

3.15. Ensaio de migração da curcumina para salsicha

O experimento de migração de curcumina para salsicha foi realizado com revestimento e filme comestível, a fim de comparar diferentes métodos de aplicação. Testes preliminares realizados com os filmes de cúrcuma (TGF) e revestimento (TGC) apresentaram baixa liberação de curcumina para salsicha. Assim, foi adicionado uma solução etanólica de curcumina de 10 mg/mL na solução comestível à de amido de mandioca e gelatina para aumentar a liberação de curcumina para salsicha. As salsichas foram cortadas em cilindros com 2 cm de diâmetro e 5 cm de altura. Previamente preparados, os filmes TGF e CGC foram cortados em discos circular de 2 cm de diâmetro. Os pedaços de salsichas foram pressionados nos filmes em placas de petri de polipropileno, afim de garantir aderência da salsicha no filme. As soluções dos revestimentos (TGC e CGH) preparadas conforme descrito na seção 3.3, foram resfriadas até 50 °C. Em seguida, 0,5 mL foi colocada na superfície da salsicha. As amostras com os filmes e revestimentos aplicados nas salsichas foram armazenadas a 4 °C por 5 dias. Cada dia, nove pedaços de salsichas com filme ou revestimento foram coletadas da câmara de refrigeração e determinadas a quantidade de curcumina na superfície da salsicha. Os filmes ou revestimentos foram removidos da superfície da salsicha e pedaços de 1 mm de espessura foram fatiados e inseridos num tubo de PTE para extração com etanol 75 % por 24 horas. Após o período de extração, as salsichas foram retiradas dos tubos e a solução centrifugada a 6000 rpm por 5 min para precipitar as substancias

insolúveis. Em seguida, o sobrenadante era coletado e a concentração de curcumina era determinada pela curva padrão de acordo com o descrito na seção 3.9. A solução padrão para leitura da absorbância foi a partir da extração etanólica de um pedaço de salsicha que não ficou em contato com revestimento ou filme, pois salsichas comerciais geralmente tem compostos que podem ser extraídos pelo etanol, com isso para não superestimar uma leitura na concentração de curcumina esse procedimento foi realizado.

O teste de migração também foi realizado por um período de 25 dias de armazenamento, no qual as amostras foram retiradas a cada 5 dias e avaliadas a quantidade de curcumina na superfície. Esse experimento foi realizado somente com TGF, CGF e CGH. Além disso, foi determinada a quantidade de água transferida da salsicha para os filmes. Os filmes e pedaços das salsichas foram pesados inicialmente e depois de cada tempo de armazenamento, a diferença de massa foi contabilizada com ganho ou perda de água. Resultados dessas análises estão demonstrados no apêndice 1.

3.16. Capítulo 6: Atividade antimicrobiana da curcumina ativada pela luz UV-A em hidrogel

3.17. Materiais

Glicerol, curcumina e gelatina foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A cúrcuma foi fornecida pela Oficina de Ervas Farmácia de Manipulação Ltda (Ribeirão Preto, Brasil). Tampão fosfato salino (PBS), caldo de soja tríptico (TSB) e ágar de soja tríptico (TSA) foram adquiridos da Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Amido de mandioca comercial, água ultrapura e salsichas foram da mesma marca e composição utilizadas na seção 3.8.

3.18. Preparação dos hidrogéis

3.18.1 Solução à base de amido do resíduo de cúrcuma e gelatina e solução à base de amido de mandioca e gelatina adicionado curcumina.

As preparações das soluções foram realizadas como descrito nas seções 3.3 e 3.10.2. A concentração final de curcumina na solução de amido de mandioca e gelatina foi de 150 µg/mL.

3.18.2 Formação dos hidrogéis em placas.

Os hidrogéis foram preparados colocando 0.5 mL das soluções em individual poços em uma placa estéril de poliestireno de fundo plano (1.56 cm de diâmetro) de 24 poços e armazenadas numa câmara a 4 °C por 30 min para completa a formação do hidrogel. Os revestimentos dos hidrogéis resultantes de cúrcuma-gelatina e amido-gelatina foram denominados TGH e CGH, respectivamente. O hidrogel controle (K) foi preparado usando amido de mandioca e gelatina sem adição de curcumina. A composição dos hidrogéis foram 88 % (v/v) de água, 6% (v/v) gelatina, 1.8 % (v/v) glicerol e 4.2 % (v/v) do amido de cúrcuma ou de mandioca.

Os hidrogéis foram formados também na superfície das salsichas. As salsichas foram cortadas com perfeito ajuste com 1.85 cm de diâmetro e 0.5 cm de espessura para serem colocadas nos poços das placas, e em seguida, as soluções foram adicionadas nas superfícies das salsichas inseridas nos poços. Após isso, as placas contendo as salsichas foram armazenadas numa câmara a 4 °C por 30 min.

3.19. Caracterização dos hidrogéis

Os hidrogéis foram caracterizados em relação à espessura, concentração de curcumina final e intumescimento do hidrogel em água. As espessuras dos hidrogéis foram medidas usando um micrômetro digital manual (Mitutoyo Co, Japan) com precisão de 0.01 mm. As medidas das espessuras foram realizadas em seis locais do hidrogel e a média foi exibida. A concentração de curcumina nos hidrogéis foi avaliada através de espectrofotometria UV-Vis (Spectramax 340, CA, USA). A curcumina foi extraída dos hidrogéis (TGH e CGH) usando etanol 50 %, e a absorbância do extrato foi determinada a 425 nm e a concentração de curcumina foi determinada com base na curva padrão apresentada na seção 3.9. O comportamento de intumescimento dos hidrogéis em água foi avaliado pelo monitoramento do aumento da massa dos hidrogéis antes e depois do período em contato com água. Foram adicionados 4 mL de água nos hidrogéis preparados dentro dos poços das placas e mantidos em contato por 30 min. Após o período de intumescimento, a água foi retirada e um pedaço de papel folha foi colocado na superfície do hidrogel para absorção do excesso de água. O hidrogel foi pesado e o intumescimento foi expresso na porcentagem de

massa de água absorvida pelo hidrogel. Os testes de extração da curcumina do hidrogel e de intumescimento foram realizados em triplicata.

3.20. Cultura microbiana

Listeria innocua (ATCC 33090, Manassas, VA, USA) modificada com um plasmídeo resistente à Rifampicina foram fornecidos pelo Dr. Trevor Suslow do departamento de ciência e tecnologia de alimentos da Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA. Uma suspensão de *L. innocua* foi preparada antes de cada experimento. Primeiramente, as bactérias armazenadas em nitrogênio líquido foram espalhadas em placas de TSA e cultivadas durante a noite a 37 °C. Após isso, recolheu-se uma única colônia de *L. innocua* da placa e cultivou-se durante a noite em caldo TSB contendo Rifampicina 50 µg/mL a 37 °C e 150 rpm até alcançar a fase estacionária (aproximadamente 7×10^9 UFC/mL). Por fim, as suspensões bacterianas foram preparadas diluindo em série as bactérias de fase estacionária em água estéril até as concentrações finais de *L. innocua* de 2×10^4 e 2×10^6 UFC/mL.

3.21. Câmara de luz UV-A

A fonte de UV-A light consiste em 4 lâmpadas UV-A (320 – 400 nm; 18 W; Actinic BL, Philips, Holland) localizadas no topo de uma câmara de plástico. As amostras foram posicionadas no centro da câmara, a 8 cm das lâmpadas. A intensidade de luz média de UV-A no centro da câmara foi de 3.2 ± 0.2 mW/cm² medida pelo medidor de luz UV-A (Model UV-340A, Lutron Electronics, Taiwan).

3.22. Atividade antimicrobiana dos hidrogéis ativada pela luz UV-A

A atividade antimicrobiana do TGH e CGH em combinação com luz UV-A foi avaliada contra *L. innocua*. Os revestimentos TGH e CGH foram preparados em placas de poliestireno de 24 poços como descrito acima. Em seguida, 0,5 mL de nova suspensão de *L. innocua* foi adicionada nas placas contendo cada hidrogel, obtendo-se uma concentração final de bactéria de 1×10^6 UFC/mL. As placas foram colocadas no centro da câmara com luz UV-A e expostas à luz por até 30 min. Após cada ponto de tempo, as placas foram removidas da câmara e alíquotas da solução retiradas e diluídas em série de PBS estéril. As

diluições foram espalhadas em placas de TSA contendo Rifampicina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 48 horas. As populações de *L. innocua* foram determinadas pelo método padrão de contagem de placas e expressas em unidades formadoras de colônias UFC/mL. O revestimento do hidrogel controle (K) foi usado para avaliar o efeito somente da luz na inativação da bactéria. Além disso, *L. innocua* incubada em TGH e CGH e não expostas à luz UV-A foram analisadas como sendo o efeito da curcumina sem luz para inativação.

A atividade antimicrobiana dos hidrogéis ativada pela luz UV-A foi avaliada nas temperaturas de 23 °C e 4 °C. Quando o experimento foi realizado a 4 °C, os hidrogéis, a suspensão de bactérias e câmara de luz UV-A foram colocadas dentro de uma sala refrigerada a 4 °C uma hora antes de ser realizado o experimento, para adaptação das bactérias e resfriamento da câmara de luz UV-A. A exposição à luz e a quantificação bacteriana foi realizada como descrito anteriormente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.23. Atividade antimicrobiana dos hidrogéis ativadas pela luz UV-A na superfície da salsicha

Os revestimentos TGH e CGH foram também aplicados na superfície das salsichas e a atividade antimicrobiana dos hidrogéis ativadas pela luz UV-A foi avaliada à temperatura de refrigeração (4 °C). Os revestimentos de hidrogéis na salsicha e as suspensões bacterianas do trabalho foram mantidos a 4 °C durante uma hora antes do ensaio. Após o período de refrigeração, 0,5 mL de nova suspensão de *L. innocua* foi adicionada na superfície dos hidrogéis contendo a salsicha na base dos poços da placa de poliestireno. Duas concentrações iniciais de *L. innocua* foram avaliados 1×10^4 e 1×10^6 UFC/mL. As amostras foram então inseridas dentro da câmara a 4 °C e expostas à luz UV-A por até 30 min. Após a exposição à luz, a determinação de bactérias sobreviventes foi realizada conforme descrito na seção 3.19 e expressa em UFC/mL. Salsichas revestidas com hidrogel sem curcumina (K) foi utilizada como controle.

A capacidade de inativação bacteriana dos hidrogéis (TGH e CGH) na superfície das salsichas combinado com exposição à luz UV-A foram avaliadas para inativar bactéria com múltiplos ciclos de contaminação a 4 °C. A contaminação de *L. innocua* na superfície das salsichas revestidas com os hidrogéis foi realizada como descrito acima numa concentração inicial de bactéria de 1×10^4 UFC/mL. Em seguida, as amostras foram

expostas à luz UV-A por 5 e 20 min, para CGH e TGH, respectivamente. Uma das amostras foi retirada para determinação de contagem de bactérias sobreviventes, enquanto as outras amostras de salsichas revestidas foram recontaminadas com 5×10^5 UFC/mL de *L. innocua* e exposta novamente à luz UV-A no mesmo período de tempo. Um terceiro ciclo de contaminação e exposição à luz UV-A foi também realizado. As amostras de salsichas revestidas com hidrogéis foram então expostas a três ciclos de contaminação e descontaminação e após cada ciclo foi determinada a contagem de bactérias sobreviventes e iniciais, sendo expressa como descrito previamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.24. Atividade antimicrobiana ativada pela luz UV-A pela liberação da curcumina dos hidrogéis

A atividade antimicrobiana dos hidrogéis ativada pela luz UV-A foram avaliadas pelo teste de liberação da curcumina dos hidrogéis para solução aquosa. A liberação da curcumina foi realizada pela adição de 0,5 mL de água na superfície dos hidrogéis pelo tempo de 5 e 30 min. Após esse período, a água foi removida do topo dos hidrogéis e transferida para outro poço da placa e adicionado 0,5 mL de solução de bactéria para obter uma concentração de 1×10^6 UFC/mL. As amostras foram expostas à luz UV-A a 23 °C por 5 min e a contagem de bactéria foi determinada e expressa como descrito anteriormente. Além disso, a fim de inferir sobre a concentração de curcumina liberada a partir dos hidrogéis, foram preparadas soluções de curcumina com diferentes concentrações (0.05-10 µg/mL), combinadas com *L. innocua* (concentração final de 1×10^6 UFC/mL) e expostas à luz UV-A a 23 °C durante 5 min. Os testes foram realizados em triplicata.

3.25. Degradação da curcumina nos hidrogéis pela exposição à luz UV-A

A degradação da curcumina foi realizada pela exposição dos hidrogéis TGH e CGH à luz UV-A por 5, 15 e 30 min e determinado a concentração de curcumina antes e depois da exposição. A concentração de curcumina foi determinada pela extração da curcumina dos hidrogéis com etanol 50 %, lendo a absorbância a 425 nm com um espectrofotômetro UV-Vis e calculando a concentração utilizando as curvas de calibração. A degradação da curcumina foi expressa como

porcentagem de perda da curcumina em relação ao valor inicial. Os ensaios de degradação foram realizados em triplicatas.

3.26. Determinação do efeito antimicrobiano do filme de resíduo de cúrcuma e gelatina

O ensaio de zona de inibição em meio sólido foi utilizado para determinar os efeitos antimicrobiano do filme de resíduo de cúrcuma contra *L. innocua*. Em uma placa de TSA foi espalhado 0,1 mL de bactéria na concentração de 1×10^7 UFC/mL. Os filmes foram cortados com área de 1 cm² e colocados nas placas de TSA contendo a bactéria. As placas foram acondicionadas a 37 °C por 48 h. As placas foram analisadas pela zona de inibição dos filmes. Resultados dessa análise serão demonstrados no apêndice 1.

3.27. Análise Estatística

Todos os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), utilizando o software *Statistic* versão 6.0 (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA).

Referências

A.P.H.A. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In: **American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF)**. 20. ed. Maryland: Baltimore, 2001.

ASTM D882-12. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 2001.

ASTM D4754-98. **ASTM D4754 - 98 Standard Test Method for Two-Sided Liquid Extraction of Plastic Materials Using FDA Migration Cell. Annual Book of ASTM Standards.** [s.l.: s.n.].v. 8–2

ASTM E96M-10. Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 1995.

BENBETTAÏEB, N.; KUREK, M.; BORNAZ, S.; DEBEAUFORT, F. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2409–2419, 1 set. 2014.

BONETTI, M.; ROGER, M. Translational diffusion of probe molecules under high pressure: A study by fluorescence recovery after photobleaching technique. **Review of Scientific Instruments**, v. 84, n. 2, p. 23904, 1 fev. 2013.

CRANK, J. **THE MATHEMATICS OF DIFFUSION**. SECOND EDITION ed. London: CLARENDON PRESS, 1975.

DE MORAES, J. O.; SCHEIBE, A. S.; SERENO, A.; LAURINDO, J. B. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 800–808, dez. 2013.

FARIAS-CAMPOMANES, A. M.; A. MEIRELES, M. A. Pisco bagasse as a potential source of bioactive compounds – A Review. **Recent Patents on Engineering**, v. 7, n. 1, p. 41–50, 1 abr. 2013.

KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A.; TRYSTRAM, G. From macroscopic to molecular scale investigations of mass transfer of small molecules through edible packaging applied at interfaces of multiphase food products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 116–127, jan. 2009.

MANIGLIA, B. C.; DE PAULA, R. L.; DOMINGOS, J. R.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization of turmeric film plasticized with glycerol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1187–1195, dez. 2015.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; CARVALHO, P. I. N.; ROSTAGNO, M. A.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, nov. 2014.

CAPÍTULO. 4 ANTIMICROBIAL EFFECT OF EDIBLE COATING BASED ON TURMERIC STARCH RESIDUE AND GELATIN APPLIED ONTO FRESH PORK SAUSAGE

Juliano Vinícius Tosati^a; Vanessa, C. Messias^b, Pedro I. N. Carvalho^c, Marise A. Rodrigues Pollonio^b, M. Angela A. Meireles^c, Alcilene Rodrigues Monteiro^a.

^a Laboratory of Physical Properties (PROFI), Department of Chemical Engineering and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, CTC, PO box 476, Zip code 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Corresponding author: PHONE: +55-48-3721-2512; FAX: +55-48-3721-9687; EMAIL: alcilene.fritz@ufsc.br/alcilenemonteiro@gmail.com

^b Laboratory of Meat Science and Technology (LCD)/Department of Food Technology (School of Food Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, PO box 6121 Zip code 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

^cLASEFI/DEA/FEA (School of Food Engineering)/UNICAMP (University of Campinas); Rua Monteiro Lobato 80, Zip code 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

Abstract

Microbial and physicochemical properties of edible coatings blend based on turmeric starch and bovine gelatin on frankfurter sausage were studied during the product's shelf life. Three edible films were prepared and their thermal, mechanical, and barrier properties evaluated one with turmeric starch (TF), one with gelatin (GF) and one with a blend of turmeric-starch and gelatin. Physicochemical and bacteriostatic effects of the blend on the sausage were measured. Water vapor permeability ($8.01 \text{ g d}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ atm}^{-1}$) and tensile strength of the BF showed intermediate values (5 MPa) compared with results of the films containing turmeric ($5.88 \text{ g d}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ atm}^{-1}$; 4 MPa) or gelatin ($13.4 \text{ g d}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ atm}^{-1}$; 13 MPa) separately. Tensile strength was higher to GF (13 MPa), lower value (4 MPa) was obtained to TF and intermediate value to BF (5 MPa). Elastic modulus was lower to BF (85 MPa) when compared to TF (126 MPa) and GF (271 MPa). Elongation at break of BF (42%) was higher among the three edible films (TF 7% and GF 36%). Emulsion stability measured by thermal analysis in DSC showed complete miscibility to BF, observed through melting point of polymers. The effect of the turmeric-gelatin blend coating on sausages stored at 5 °C and 10 °C showed a significant ($p \leq 0.05$) positive effect on the inhibition of microbial growth over 30 days. Physicochemical characteristics such as pH, texture profile,

moisture, and color remained constant compared to control. Thus, the edible coating based on turmeric starch and gelatin blend is an alternative to replace the synthetic casing in frankfurter sausage.

Industrial Relevance

Nowadays, consumers have increasingly rejected food containing chemical ingredients added to prolong shelf life. Sausages typically use a synthetic casing and nitrite to extend shelf life. Thus, this study presents an alternative product formulated with a natural antimicrobial to improve nutritional quality that can be applied by food processing industries.

Keywords: edible coating; sausage; turmeric residue;

Highlights

- An edible coating based on turmeric starch and gelatin was applied onto sausages.
- The coated sausages showed lower microbial count over the storage period.
- Coated sausages maintained color, firmness, and pH characteristics for 30 days.
- Edible coating based on turmeric starch and gelatin was effective against microbial load and maintained the physicochemical characteristics of the sausage.

4.1. Introduction

In recent years, edible coating research has received great attention because it can extend the shelf life of foods due maintaining of their quality and to reduce the synthetic plastic on food packaging. The challenge in applying coatings or edible films is their composition, such as polysaccharides, proteins, and lipids, which aim to prevent moisture loss, gas exchange, oxidation, and degradation, in order to improve the appearance and mechanical integrity of foods (López de Lacey et al. 2014). Furthermore, the use of industrial residues to obtain biopolymers has become popular in recent years (Maniglia et al. 2014).

Edible films or coatings may serve as carriers of active compounds, such as antimicrobials, antioxidants, and texture enhancers. The incorporation of active compounds into edible films can prevent food

spoilage from food-borne bacteria and organoleptic deterioration by microorganism, further they can avoid food oxidation, the development of off-flavors, and nutritional losses, to extend food's shelf life (Mellinas et al. 2016).

Turmeric (*Curcuma longa* L.) belongs to the family Zingiberaceae, commonly found in South American countries (Jayaprakasha et al. 2005). It is mostly used to prepare foods and supplements and in medical treatment. Turmeric essential oil is obtained by conventional extraction, supercritical fluid extraction (SFE), or pressurized liquid extraction (PLE). SFE and PLE generate a clean turmeric residue containing starch, fibers, and traces of oleoresin and curcuminoids, which can be used to make edible coatings (Braga et al. 2006; Maniglia et al. 2014; Osorio-Tobón et al. 2014). Although biopolymers are good sources to make edible coatings or biodegradable films, mechanical and optical properties must be improved. Gelatin is a good option because it is biodegradable, biocompatible, has relatively low cost, and exhibits excellent film solution properties (Benbettaïeb et al. 2014; Gómez-Guillén et al. 2009; Nowzari et al. 2013) and provide mechanical stability.

Commercial Brazilian sausages are immersed in annatto (*Bixa orellana* L) solution encased or wrapped under vacuum using polymers plastic. Therefore, turmeric residue based dip coating should be an excellent alternative to improve sausage nutritional quality since turmeric contains curcuminoids naturally, with powerful anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties. In addition, fresh meat products have short shelf life because of lipid oxidation and microbial spoilage (Siripatrawan and Noipha 2012). Thus, an edible coating based on turmeric starch and gelatin was studied as an alternative to sausage casing and to evaluate the influence of curcumin in controlling microbial growth and physicochemical parameters over 30 days.

4.2. Material and Methods

4.2.1 Raw Materials

Turmeric was supplied by the Office Herbal Pharmacy Handling Ltda (Ribeirão Preto, Brazil). The turmeric residue was obtained by SFE (supercritical fluid extraction) and PLE (pressurized liquid extraction) according to Osorio-Tobón et al. (2014). Gelatin was purchased from a local market (Royal, Gelco Gelatinas Ltda, SP, Brazil); glycerol, used as a plasticizer, was purchased from Casa da Química Indústria e Comércio

(São Paulo, Brazil). The sausages were prepared using mechanically deboned poultry meat (MDPM - 67.89% moisture, 15.94% fat, and 12.17% protein) and pork back fat (14.35% moisture, 76.28 % fat, and 8.47% protein) obtained from an industrial supplier (JBS, Brazil).

4.2.2 Films from edible coating characterization

After extraction, the residue was ground and sieved (0.075 mm). The coating solution based on turmeric residue and gelatin was prepared following two steps: First, the turmeric solution was prepared following the methodology used by Maniglia et al. (2014) using a 5% (w/w) aqueous solution in which turmeric starch was homogenized for 30 min in a magnetic stirrer (Fisatom, 752A, São Paulo, Brazil) under heating at 85 °C for 4 h. Every hour, the solution was homogenized with an Ultra Turrax T25 dispersing instrument (IKA-Werke, Germany) for 2 min at 12,000 rpm. Gelatin was dissolved in water at room temperature, added with glycerol, and stirred for 30 min at 70 °C according to Benbettaïeb et al. (2014). Then, the gelatin was added to the turmeric solution and stirred for 30 min at the same temperature. The final solution contained, in dry basis, 50 % gelatin, 35% turmeric residue, and 15% glycerol. Blend (turmeric starch plus gelatin) was obtained to improve the adherence on the sausage surface. The turmeric and gelatin solutions were also prepared separately according the methodology describe early, in order to obtain the films control properties.

To characterize the coatings to mechanical, optical, and barrier properties, three films were performed by casting according to De Moraes, Scheibe, Sereno, & Laurindo (2013). Each solution (turmeric starch plus gelatin blend, turmeric starch or gelatin) was poured onto an acrylic plate maintaining a density of 0.2 g m⁻² and was dried for 8 h in an oven with forced circulation at 35 °C. Prior to characterization, all films were conditioned for at least 48 h in desiccators with a saturated solution of NaBr (58% RH).

4.2.2.1 Film Thickness and Mechanical Tests

Film thickness was measured using a manual digital micrometer (no. 293-561-30, Mitutoyo Co., Japan) to the nearest 0.01 mm. Measurements were made at a minimum of ten random points for each film and an average value was used. A texture analyzer (TA-XT2i, Stable Micro Systems) was used to determine tensile strength, elastic modulus,

and elongation at break according to method D882-95 of the American Society for Testing and Materials (ASTM D882-12 2001). The films were cut into strips (25 X 90 mm) and the thickness was measured at five points. The films were then placed between assembled to the grips of the device with a gap of 80 mm and the tests were performed at speed of 1 mm/s. Results are presented as the average of ten replicates.

4.2.2.2 Water Vapor Permeability (WVP)

The films' WVP was assessed gravimetrically according to ASTM E96-95 (ASTM E96M-10 1995). The film was assembled onto a capsule containing CaCl₂ (2% RH), which was locked and stored in a chamber at 75% RH and 25 °C. The capsules were weighed on an analytical balance (AY 200, Shimadzu) every hour for 12 h and after 24 h. WVP was calculated according to Equation 1:

$$WVP = \frac{w \cdot l}{A \cdot \Delta p} \quad 4.1$$

Where x is the film thickness (m), A is the permeation area (0.0031 m²), Δp is the difference in vapor pressure across the film (Pa), and w is the weight of water gained by the film in the capsule per hour (g h⁻¹).

4.2.2.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The thermal properties of the edible coating were measured by DSC using a Perkin-Elmer instrument (Jade, Massachusetts, USA). Six mg aliquots were sealed into hermetic aluminum pans at 10 °C/min from 0 °C to 200 °C in an inert atmosphere (50 mL/min of N₂). After the first scan, the test cell was quickly cooled with liquid nitrogen to a temperature below the first observed glass transition and then a second scan was started. The glass transition temperature (T_g) was calculated as the inflexion point of the base line, caused by the changed in specific heat of the sample.

4.2.2.4 Scanning Electron Microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) images of the film samples was obtained using a Philips XL-30 device (FEI, Hillsboro, Oregon,

USA). The samples were coated with a fine gold layer before micrographs were obtained of the surfaces and cross-section of the films previously fractured by immersion in liquid nitrogen. All samples were examined using an accelerating voltage of 10 kV. The analyses were performed in the Central Laboratory of Electron Microscopy, LCME, UFSC, Brazil.

4.2.2.5 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

Infrared spectroscopy (FTIR) was carried out in a 16PC Perkin-Elmer device with resolution of 4 cm^{-1} in the range of $4,000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. The film samples were conditioned in a desiccator at $54\% \pm 3\%$ RH for 48 h before analysis. Film samples of 2 cm in diameter were sandwiched between two KBr disks. The spectrum obtained was used to determine the interactions between starch and gelatin.

4.2.3 Sausage Processing

The sausages were mechanically prepared in a pilot meat plant of the meat science laboratory at the University of Campinas (UNICAMP, SP, Brazil) according to the ingredients shown in Table 1. 9.81 kg of lean pork shoulder, 42.05 kg of MDPM, 1.75 kg of salt, and 3.67 kg of ice were placed in a bowl chopper (Mado, model MTK 662, Germany) and comminuted for 3-4 min at 1,400 rpm to extract myofibrillar proteins. When the temperature reached 7-8 °C, the condiments and additives were added slowly, plus 3.67 kg of ice and 3.50 kg of fat. The final temperature of the ground meat was around 12 °C. Subsequently, the emulsion was mechanically injected (Mainca, model EC12, Spain) into permeable artificial cellulose casings (10 mm) (Nojax Clear E2P 24Bx84) to form the sausage. After that, the sausages were cooked in a steam oven (ARPROTEC, Brazil) using the initial temperature of 60 °C and relative humidity (RH) of 85-90% for 30 min followed by raising the temperature by 5 °C/10 min until reaching the final core temperature of 72 °C. Then, sausages were immediately refrigerated under ice bath and the coating was peeled off. From all the samples, 50% of sausage without coating were immersed in the turmeric-gelatin solution at 25 °C and kept at 5 °C for 40 min. All the samples (with and without coating) were vacuum packed in polyethylene bags, labeled, (Selovac, Minivac CU18) and stored at 5 °C and 10 °C (Fig 1). Physicochemical and microbiology analyses were performed every ten days for 30 days.

Table 4.1. Sausage composition.

Ingredients	Concentration (%)
Lean beef	14
MDPM	60
Pork back fat	5
Water/ice	10.5
Cassava starch	5
Concentrated soy protein	1
Isolated soy protein	1
Sodium nitrate	2.5
Sodium tripolyphosphate	0.35
Sodium erythorbate	0.5
Sodium nitrite	0.015

4.2.4 Sausage Analysis control

4.2.4.1 Color, Water Activity, and pH

Sausage pH was measured using a penetration probe with a MA 130 pHmeter (Mettler Toledo, USA). The samples' water activity was measured at 25 °C using an Aqualab water activity meter (Decagon Device INC., Pullman, USA).

The color of chopped sausages was measured with a Minolta spectrophotometer (CM 5, Konica Minolta, Japan) using the Hunter color parameters L*, a*, b*, chroma (C), and hue angle (h). The spectrophotometer was calibrated using a standard white plate. All analyses were performed in triplicate.

4.2.4.2 Texture Measurement

Compression force was measured in a TAXT2i texture analyzer (Stable Micro Systems, Texture Technologies Corp, Scarsdale, NY, USA) with a 250 N load cell equipped with a 35 mm diameter cylindrical probe (AP-35, stainless steel) and test speed of 1 mm/s. The strain used was 30% of sausage compression. Ten randomly selected samples were used from each treatment and the results were expressed as hardness (N/cm²), springiness (cm), cohesiveness (N/cm), and chewiness (N/cm).

4.2.4.3 Microbiological Analysis

Microbiological analyses were performed for the total count of mesophilic, lactic acid, and psychrotrophic bacteria. Twenty-five g of sausage were homogenized in 225 mL of 0.1% peptone buffer. Serial decimal dilutions were made with the same diluents. The samples were spread-plated on Plate Count Agar (PCA) and incubated at 35 °C for 48 h for aerobic mesophiles. For lactic acid bacteria, the samples were pour-plated on *Lactobacillus* MRS Agar and incubated at 37 °C for 72 h. For psychrotrophic bacteria, the samples were pour-plated on PCA and incubated at 7 °C for ten days. Bacteria populations were determined by standard plating count method and expressed as colony forming unit (CFU)/g. The sausages analyses were performed every ten days.

4.2.5 Statistical Analysis

The results were evaluated using analysis of variance (ANOVA) with the software Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) and the factors showing significant difference ($p \leq 0.05$) were submitted to Tukey's test.

4.3. Results and Discussion

4.3.1 Film Properties

4.3.1.1 Film Thickness and Mechanical Properties

The turmeric gelatin blend obtained an average film thickness of the $180 \pm 16 \mu\text{m}$. This value was higher than the films made separately. The starch and gelatin films from different sources showed lower values than those obtained by Al-Hassan and Norziah 2012; Hosseini et al. 2013; Liu et al. 2013) probably due to the higher amount of total solids used in this work. Mechanical and barrier properties of the BF, GF, and TF are shown in Table 2. Tensile strength (TS) indicates the maximum stress the film can withstand, percentage elongation at break (EAB) is the maximum length the film reaches before breaking, and Young's modulus (YM) is a measure of film stiffness (Pereda et al. 2012). Suitable mechanical properties are usually required for a packaging film to maintain its integrity and withstand external stress (Ma et al. 2012).

Significant differences ($p \geq 0.05$) were found for parameters EAB and YM of the BF and TF, but no significant difference ($p \geq 0.05$) was observed for the parameter TS. The GF showed significant difference ($p \geq 0.05$) for TS and YM and no significant difference ($p \geq 0.05$) for EAB. The lowest YM value was obtained to BF, which was less rigid than the TF and GF, probably because starch intramolecular hydrogen bonds rather than intermolecular hydrogen bonds were formed (Tongdeesoontorn et al. 2012).

The mechanical properties of edible films based on gelatin in the literature had the values of 6.10 MPa, 76.8 % and 81 MPa for TS, EAB and YM, respectively (Ma et al. 2012) and 35 MPa, 50 % and 698 MPa for TS, EAB and YM, respectively (Kanmani and Rhim 2014). In comparison, our work obtained gelatin film with intermediate resistance and malleability and lower elongation. The turmeric film values found in literature were 8.8 MPa, 2.3 % and 540 MPa for TS, EAB and YM respectively (Maniglia et al. 2015), this film showed lower elongation and malleability and higher resistance than our work. There is no work in the literature using blend of turmeric starch and gelatin.

Table 4.2. Mechanical properties, water vapor permeability, and melting temperature of turmeric, gelatin, and blend films.

Properties	Result		
	Blend film	Turmeric film	Gelatin film
TS (MPa)	5 ^a ±1	4 ^a ±1	13 ^b ±4
EAB (%)	42 ^b ±10	7 ^a ±3	36 ^b ±13
YM (MPa)	85 ^c ±20	126 ^b ±20	271 ^a ±103
WVP (g d ⁻¹ m ⁻² atm ⁻¹)	8.01 ^b ±0.03	5.88 ^a ±0.04 ^a	13.40 ^c ±0.03 ^c
MT (°C)	112.21	60.96	132.41
MC (g/100 g)	12.1 ^a ±0.9	17 ^b ±1 ^a	17 ^b ±1 ^b
T (µm)	180 ^c ±16	124 ^b ±6	89 ^a ±13

Tensile strength (TS), elongation at break (EAB), Young's modulus (YM), water vapor permeability (WVP), melting temperature (MT), moisture content (MC), and thickness (T).

4.3.1.2 Water Vapor Permeability (WVP)

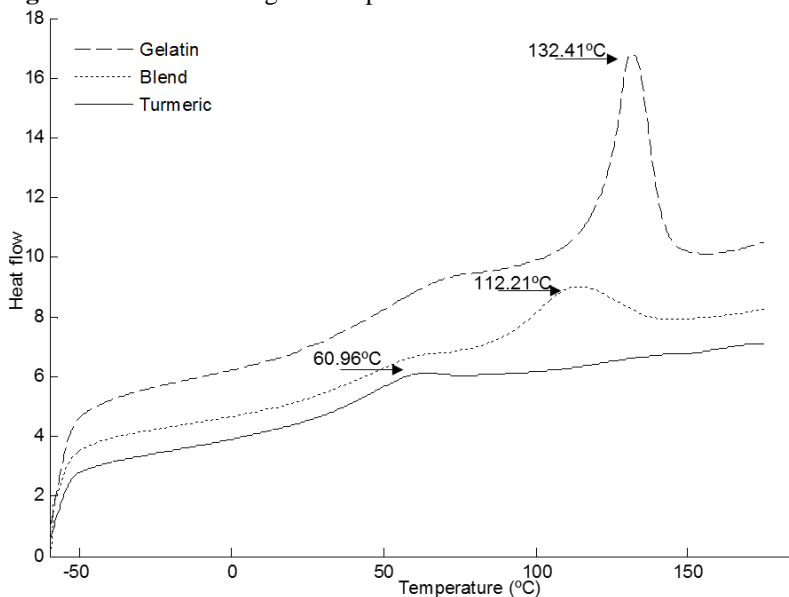
WVP it should be as low as possible (Jirukkakul 2013) because is an important parameter to control moisture transfer from the food to the environment. The results obtained for three films, showed intermediate value to BF between pure films from turmeric or gelatin. These results

agreed with the other data reported in the literature, since gelatin is more hygroscopic than starch, when gelatin is added in the starch solution the affinity for water molecules will be increased for BF and therefore resulting in higher water diffusion in the BF than TF and lower than GF. (Al-Hassan and Norziah 2012; Tongdeesoontorn et al. 2012). When covered on the sausage, WVP properties would be avoided to prevent spoilage and moisture change on the surface.

4.3.1.3 Thermal behavior of films

The analysis of thermal properties showed effective compatibility between biopolymers. According to Fig. 2, the melting point of the BF is 112.21 °C, between the melting points of the TF (60.96 °C) and GF (132.41 °C) films. Based on this result, it can be said that the blend favored the interactions between the hydroxyl group (OH) of starch and the amine group (NH) of gelatin. On the other hand, it weakened the intramolecular interaction of proteins, thus decreasing the melting point (Tongdeesoontorn et al. 2012). According to classical thermodynamics, the presence of a component of low molecular weight in a polymeric matrix allows the loss of configurational entropy in this system and the melting point to be located between the polymers' melting point (Thomazine et al. 2005). A similar result for the melting point of fish gelatin-chitosan blend film was reported by Hosseini et al. (2013).

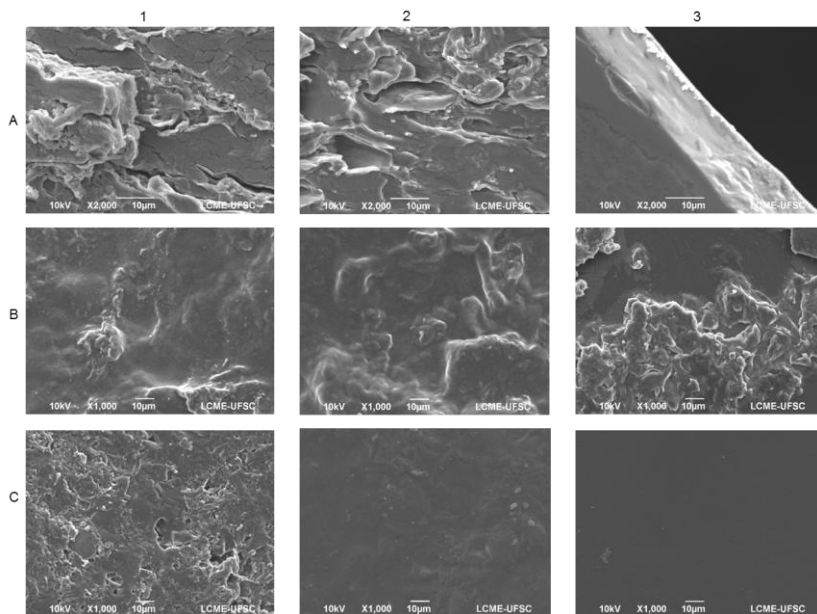
Figure 4.1. DSC thermograms of pure films and blend.



4.3.1.4 Morphology

Fig. 3 shows the photomicrograph by SEM of the TF, GF, and BF. The micrographs show the drying surface, cross-sectional area, and surface in contact with the plate. Some differences were observed in the surface and internal structure morphology. The micrograph of the TF (Fig. 3 A1) revealed a non-homogeneous structure with some denser regions and other regions containing fractures. The GF (Fig. 3. A3) showed a homogeneous structure without fractures, while the BF (Fig. 3. A2) had a non-homogenous structure with no fractures. The drying surface (Fig 3.B.1-3) had a rougher and more uneven surface with many spots for all films. The samples' surface in contact with the plate (Fig. 3. C1-3) was rougher in the TF and smoother in the GF and BF. These results for TF were similar to those by Maniglia, Domingos, de Paula, & Tapia-Blácido (2014). Al-Hassan & Norziah (2012) and Tongdeesoontorn et al. (2012) found a more compact and homogeneous surface for the blend of starch and gelatin, unlike this study.

Figure 4.2. (A). Film fracture of 2000X. (B) Surface contact drying air of 1000X. (C) Surface contact with the plate of 1000X. (1). Turmeric residue film. (2) Turmeric-residue and gelatin film. (3). Gelatin film.

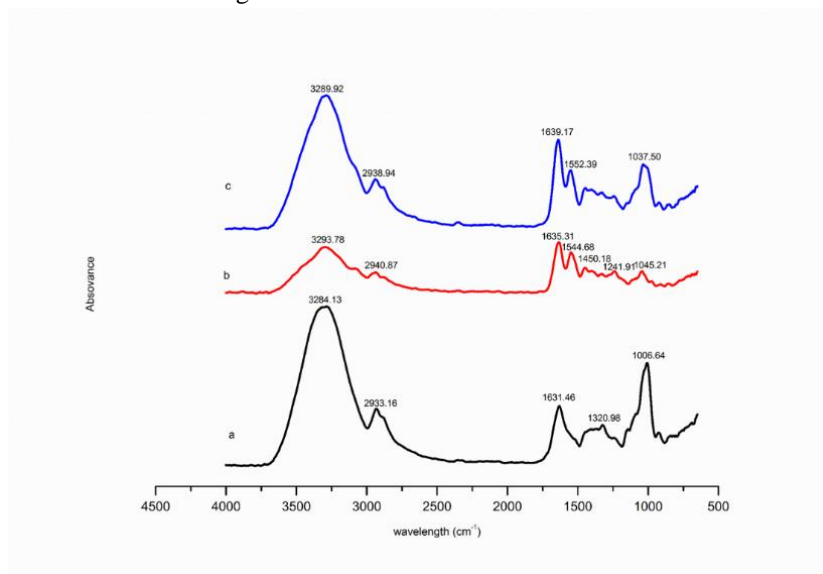


4.3.1.5 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

In order to elucidate potential interactions between turmeric starch and gelatin, FTIR spectra of the films were evaluated. These interactions are often reflected as specific band shifts when a new ingredient is added to the formulation. Fig. 4 shows the FTIR of GF, TF, and BF. All films exhibited a broad absorption band in the region between 3,000 and 3,600 cm^{-1} , which is associated with stretching free and bonded OH and NH groups (Barreto et al. 2003; Guerrero et al. 2011; Wang et al. 2014). The peaks in the 1,630-1,640 cm^{-1} range were assigned to stretching of the OH bond of water molecules (Xiao et al. 2014). Absorption peaks in the 2,930-2,940 cm^{-1} range are characteristic of CH bond stretching. When GF and TF were mixed, the peaks at 3,293 cm^{-1} and 3,284 cm^{-1} shifted to 3,289 cm^{-1} , suggesting interactions between starch and gelatin. These interactions probably contributed to their compatibility and influenced the physical properties of these films (Espinell Villacrés et al. 2014).

Films properties are influenced by composition of raw material based, method of preparation, and environmental conditions, what makes difficult the comparison with literature data. However, these properties are important to evaluate if the components used to prepare the solutions are compatible and interactions of polymers in the mixer. Beyond, how the coating would influence the food properties, how avoid the water lost from food to environment or maintaining of texture, in this study the tumeric blend coating also inhibited grown microbial.

Figure 4.3. FTIR spectra of (a) turmeric-residue film, (b) gelatin film e (c) turmeric-residue and gelatin film.



4.3.2 Sausage Analyses

4.3.2.1 Color, pH, and water activity (aw) Measurement.

Table 4.3 shows the pH and Aw values. Aw is one of the intrinsic food factors and measures the available water in the food. Aw values of CC and UC sausages ranged from 0.96 to 0.98. Results showed no significant difference ($p \geq 0.05$) among treatments or storage time. However, edible coatings from polymeric matrices (starch and gelatin) showed high hygroscopicity probably because of water migration from

food to film, thereby reducing the A_w values in sausages (Chiumarelli and Hubinger 2012; Fakhouri et al. 2015; Shih et al. 2011).

The pH obtained during storage at 10 °C ranged from 6.29 to 6.23 for UC and from 6.27 to 6.00 for CC sausages. This change might be caused by the growth of lactic acid bacteria (Shon and Chin 2008). On the 10th day of storage, a significant difference ($p \geq 0.05$) was found in pH between UC and CC sausage samples. For sausages stored at 5 °C over the same period, pH ranged from 6.47 to 6.24 and from 6.45 to 6.24 for UC and CC samples, respectively. At 5 °C, coated sausages showed no significant difference ($p \geq 0.05$). Regarding the storage period, no significant difference ($p \geq 0.05$) was found in pH for all treatments until the 20th day because the microbial count was within the limit established by the legislation. Similar results were found by Zamudio-Flores et al. (2015), who showed edible coating based on banana starch applied onto sausages caused the pH remained stable over 20 days of storage.

Table 4.3. pH and A_w of CC or UC sausages.

Temperature	5 °C		10 °C	
Treatment	UC	CC	UC	CC
Days	pH			
0	6.33 ^{aAB} (0.01)	6.31 ^{aA} (0.02)	6.29 ^{aA} (0.02)	6.27 ^{aA} (0.01)
10	6.24 ^{aA} (0.03)	6.24 ^{aA} (0.02)	6.23 ^{aA} (0.01)	6.18 ^{bA} (0.01)
20	6.31 ^{aA} (0.02)	6.31 ^{aA} (0.02)	6.27 ^{aA} (0.02)	6.19 ^{bA} (0.03)
30	6.47 ^{aB} (0.11)	6.45 ^{aB} (0.03)	6.23 ^{aA} (0.06)	6.00 ^{bB} (0.10)
	a_w			
0	0.97 ^{aA} (0.00)	0.97 ^{aA} (0.00)	0.96 ^{aA} (0.00)	0.98 ^{aA} (0.00)
10	0.97 ^{aA} (0.00)	0.98 ^{aA} (0.00)	0.97 ^{aA} (0.00)	0.97 ^{aA} (0.00)
20	0.97 ^{aA} (0.00)	0.98 ^{aA} (0.00)	0.97 ^{aA} (0.00)	0.98 ^{aA} (0.00)
30	0.97 ^{aA} (0.00)	0.97 ^{aA} (0.01)	0.97 ^{aA} (0.01)	0.97 ^{aA} (0.00)

UC: Uncoated; CC: Coated. Averages with the same small letter on the same row and at the same temperature do not significantly differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test. Averages with the same capital letter in the same column and at the same temperature do not statistically differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test.

Table 4.4 shows the results for the color parameters L (luminosity), a^* (red color intensity), and b^* (yellow color intensity) over storage (Horita et al., 2014). The UC and CC sausage samples showed a decrease in the L, a^* and b^* parameters until the 20th day and, thereafter, values significantly increased. An increase in those parameters indicate

discoloration, probably due to hydrogen peroxide produced by the lactic acid bacteria during storage or related to the rate of myoglobin oxidation induced by lipid oxidation (Cayré et al. 2005). UC and CC samples showed no significant difference ($p \geq 0.05$) over storage, matching the results presented by Antoniewski, Barringer, Knipe, & Zerby (2007); Shon & Chin (2008); and Siripatrawan & Noipha (2012).

Table 4.4. L*, a*, and b* values of the UC and CC sausages over storage.

Temperature	5 °C		10 °C	
Treatment	UC	CC	UC	CC
Days				
	L*			
0	56.45 ^{ab} (0.51)	56.11 ^{ab} (0.76)	57.56 ^{aA} (0.68)	56.27 ^{ab} (0.75)
10	56.05 ^{abc} (0.58)	55.03 ^{bb} (0.08)	55.76 ^{bb} (0.18)	56.38 ^{ab} (0.29)
20	55.20 ^{aC} (0.48)	55.64 ^{ab} (0.30)	55.42 ^{ab} (1.10)	56.12 ^{ab} (0.97)
30	58.76 ^{aA} (0.02)	58.54 ^{aA} (0.18)	58.38 ^{aA} (0.22)	59.23 ^{aA} (0.21)
	a*			
0	11.7 ^{ab} (0.21)	11.3 ^{ab} (0.31)	11.8 ^{aAB} (0.3)	11.1 ^{aA} (0.35)
10	11.1 ^{aC} (0.25)	10.6 ^{ab} (0.28)	11.3 ^{aAB} (0.15)	11.06 ^{abA} (0.17)
20	11.3 ^{abC} (0.18)	10.3 ^{bb} (0.1)	11.1 ^{aC} (0.05)	10.65 ^{bA} (0.46)
30	12.23 ^{aA} (0.1)	11.9 ^{aA} (0.25)	12.17 ^{aA} (0.2)	11.90 ^{ab} (0.2)
	b*			
0	11.52 ^{ab} (0.08)	11.66 ^{ab} (0.4)	12.1 ^{ab} (0.21)	11.44 ^{ab} (0.30)
10	11.28 ^{bb} (0.23)	11.93 ^{ab} (0.1)	11.9 ^{aA} (0.06)	11.95 ^{ab} (0.24)
20	10.81 ^{aC} (0.12)	10.67 ^{aC} (0.2)	10.9 ^{aC} (0.23)	10.75 ^{aC} (0.21)
30	12.42 ^{aA} (0.14)	12.4 ^{aA} (0.16)	12.4 ^{aA} (0.18)	12.54 ^{aA} (0.22)

UC: Uncoated; CC: Coated. Averages with the same small letter on the same row and at the same temperature do not significantly differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test. Averages with the same capital letter in the same column and at the same temperature do not statistically differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test.

4.3.2.2 Texture Profile Analysis

In the preparation of emulsified meat products, texture profile has been used to indicate the capacity of holding water and fat during the batter preparation stage and its stability during storage (Herrero et al. 2007; Horita et al. 2011). The salt content, type (calcium, sodium and potassium chloride) and the level of dissociated ions are responsible for

stability of texture profile due the amount of myofibrillar protein extracted from the raw meat during the batter preparation.

The texture profile for UC and CC sausages are shown in Table 4.5. The CC sausages showed significantly increased ($p \geq 0.05$) for hardness and chewiness at 5 °C and springiness at 10 °C over storage. The UC sausages showed significantly increased ($p \geq 0.05$) for hardness and significantly decreased ($p \geq 0.05$) for cohesiveness for both temperature. Furthermore, the UC samples stored at 10 °C was observed significantly increased ($p \geq 0.05$) for chewiness and significantly decreased ($p \geq 0.05$) for springiness. These results indicated the CC samples obtained less change in texture profile than UC samples during storage, suggesting the positive effect of edible coating on sausage surface.

There is no significant difference ($p \geq 0.05$) for UC and CC sausages comparing in the same day (0, 10th, 20th and 30th day). The lack of a significant change in the texture profile observed for UC and CC sausages in this study is probably because the 2.5 % NaCl added to the formulation resulted in a stable emulsion. Zamudio-Flores et al. (2015) applied an edible coating based on banana starch onto sausage stored for 20 days at 4 °C and reported that the texture profile was affected by the addition of 1 % sodium chloride (NaCl) to the formulation. Horita, Messias, Morgano, Hayakawa, & Pollonio (2014) showed that an emulsion containing NaCl at a concentration of 2 % is more stable than at 1 %.

Table 4.5. Texture profile analysis of UC and CC sausages over storage.

Temperature	5 °C		10 °C	
Treatment	UC	CC	UC	CC
Days	Hardness			
0	13.1 ^{aA} (0.76)	13.7 ^{aAB} (1.3)	14.62 ^{aA} (0.44)	15.71 ^{bA} (1.42)
10	13.78 ^{aAB} (0.64)	14.30 ^{aB} (1.13)	15.79 ^{aB} (1.26)	14.95 ^{aA} (0.86)
20	13.6 ^{aAB} (1.02)	12.8 ^{aA} (0.36)	14.0 ^{aA} (0.62)	13.56 ^{aB} (0.60)
30	14.78 ^{aB} (1.43)	15.7 ^{aC} (1.09)	16.2 ^{aB} (0.70)	15.60 ^{aA} (0.88)
	Springiness			
0	0.92 ^{aA} (0.01)	0.92 ^{aA} (0.02)	0.91 ^{aA} (0.01)	0.90 ^{aA} (0.03)
10	0.92 ^{aA} (0.01)	0.92 ^{aA} (0.01)	0.93 ^{aA} (0.01)	0.92 ^{aAB} (0.00)
20	0.90 ^{aA} (0.03)	0.90 ^{aA} (0.01)	0.93 ^{aA} (0.01)	0.9 ^{bA} (0.01)
30	0.90 ^{aA} (0.01)	0.90 ^{aA} (0.04)	0.89 ^{bB} (0.01)	0.94 ^{aB} (0.02)
	Cohesiveness			
0	0.83 ^{aA} (0.00)	0.82 ^{aA} (0.02)	0.83 ^{aA} (0.02)	0.83 ^{aA} (0.00)
10	0.83 ^{aA} (0.00)	0.83 ^{aA} (0.00)	0.83 ^{aAB} (0.01)	0.83 ^{aA} (0.00)
20	0.81 ^{bB} (0.00)	0.83 ^{aA} (0.00)	0.83 ^{aA} (0.00)	0.83 ^{aA} (0.01)
30	0.81 ^{aB} (0.01)	0.82 ^{aA} (0.00)	0.81 ^{aB} (0.01)	0.82 ^{aA} (0.03)
	Chewiness			
0	10.19 ^{aA} (0.64)	10.5 ^{aAB} (1.1)	11.25 ^{aA} (0.64)	11.90 ^{aA} (1.25)
10	10.59 ^{aA} (0.47)	11.0 ^{aBC} (0.9)	12.3 ^{aB} (0.93)	11.45 ^{aAB} (0.62)
20	10.13 ^{aA} (1.11)	9.67 ^{aA} (0.26)	10.9 ^{aA} (0.56)	10.28 ^{bB} (0.59)
30	10.87 ^{aA} (1.19)	11.7 ^{aC} (0.96)	11.9 ^{aAB} (0.59)	12.18 ^{aA} (1.12)

UC: Uncoated; CC: Coated. Averages with the same small letter on the same row and at the same temperature do not significantly differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test. Averages with the same capital letter in the same column and at the same temperature do not statistically differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test.

4.3.2.3 Microbiological count

The application of edible films and coatings onto meat products aims to inhibit microbial growth (Espitia et al. 2014). Food is considered inappropriate for consumption when the microbial count is higher than 10^6 CFU/g (ICMSF, 1984). Table 4.6 shows the results of the counts for coated (CC) and uncoated (UC) sausages. It is observed the count limit for UC sausages was reached on the 20th day, whereas for CC sausages, the limit was reached on the 30th day.

The period of 20 days of storage is used as reference, in which the microbial count for CC sausages is below 10^6 CFU/g. Microbial growth for the CC sausages stored at 5 °C reduced by 2.21, 1.01, and 1.65 log cycles for mesophilic, lactic acid, and psychotropic bacteria, respectively. Regarding the CC sausages stored at 10 °C, the reductions were by 1.57, 2.14, and 1.99 log cycles for mesophilic, lactic acid, and psychotropic bacteria, respectively. These results indicate that sausage coated with edible coating inhibited the microorganism growth, when to compare with the results of samples without coated, due to the presence of curcumin in the turmeric residue, which provided antimicrobial properties to the coating (Bhawana et al. 2011). In regards other works, where sausages were immersed in annatto solution and vacuum packed in polyethylene bags, the authors did not reported antimicrobial effect of annatto applied on sausage surface, because this substance is only used as natural alternative to replace synthetic food coloring compounds without protective function against microbial growth (Cavenaghi-Altemio et al. 2013; Luiz et al. 2004; Mercadante et al. 2010; Pereira et al. 2011). Studies in the literature on the application of edible coatings added active compound onto sausage surface with chitosan (Jirukkakul 2013; Ouattara et al. 2000; Siripatrawan and Noipha 2012) and whey protein isolate (Cagri et al. 2002, 2003; Gadang et al. 2008) also reported a decrease in microbial growth between 2 and 3 log CFU/g, but in our work the active compound was naturally present in turmeric residue without need to added it in the solution.

In order to effectively control spoilage of meat products, the antimicrobial coating should be decreased the growth of microorganism on the food surface, where the most spoilage bacteria are present. In this sense, coated-sausage based on turmeric-gelatin with curcumin (antimicrobial compound) naturally present slow down the growth of bacteria in 10 days, indicating that sausage could be storage at both temperature and increasing their shelf life. Moreover, the application of edible coated on sausage maintained the integrity of the sausages without alteration the physicochemical properties, because the BF exhibited good mechanical, thermal, structural properties, avoided the water loss from sausage, barrier properties important to maintain the physicochemical properties of sausage.

Table 4.6. Total count of mesophilic, lactic acid, and psychrotrophic bacteria (log CFU/g) of CC and UC sausages over storage.

Temperature	5 °C		10 °C	
Treatment	UC	CC	UC	CC
Days	Mesophilic bacteria			
0	<1	<1	<1	<1
10	4.36 ^{aA} (0.04)	3.94 ^{bA} (0.05)	3.93 ^{aA} (0.02)	3.98 ^{aA} (0.01)
20	6.44 ^{aC} (0.00)	4.13 ^{bA} (0.03)	6.22 ^{aB} (0.03)	4.65 ^{bB} (0.15)
30	6.3 ^{aB} (0.01)	5.09 ^{bB} (0.05)	7.09 ^{aC} (0.03)	6.35 ^{bC} (0.02)
	Lactic acid bacteria			
0	<1	<1	<1	<1
10	3.98 ^{aA} (0.01)	3.96 ^{aA} (0.01)	3.94 ^{aA} (0.02)	3.97 ^{aA} (0.03)
20	6.87 ^{aB} (0.12)	5.86 ^{bB} (0.01)	7.73 ^{aC} (0.05)	5.59 ^{bB} (0.27)
30	6.82 ^{aB} (0.04)	6.32 ^{bC} (0.03)	7.26 ^{aB} (0.01)	7.81 ^{bC} (0.02)
	Psychrotrophic bacteria			
0	<1	<1	<1	<1
10	3.84 ^{aA} (0.01)	3.23 ^{bA} (0.02)	3.69 ^{aA} (0.01)	3.44 ^{bA} (0.01)
20	6.9 ^{aB} (0.06)	5.25 ^{bB} (0.03)	7.39 ^{aC} (0.03)	5.4 ^{bB} (0.22)
30	7.38 ^{aC} (0.05)	5.6 ^{bC} (0.02)	7.21 ^{aB} (0.03)	6.3 ^{bC} (0.02)

UC: Uncoated; CC: Coated. Averages with the same small letter on the same row and at the same temperature do not significantly differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test. Averages with the same capital letter in the same column and at the same temperature do not statistically differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test.

4.4. Conclusion

The edible coating based on the blend of gelatin and turmeric starch residue showed suitable barrier permeability to water vapor. Mechanical properties indicated that the blend was more flexible and malleable than films made separately with only one polymer. DSC, FTIR and SEM analyses showed the excellent ionic interaction and completely miscibility among between the turmeric starch and gelatin. The antimicrobial effect of turmeric starch was observed through lower microbial count and better physicochemical properties of the coated sausages stored at 5 °C and 10 °C for 30 days. Microbiological analysis revealed out that control group sample had 10 days shelf life, whereas coated samples had a shelf life of 20 days. Thus, the use of an edible coating based on turmeric starch onto sausages could be useful for preserving sausage quality during cold storage with a shelf life extension about 10 days, and maintaining the adequate physicochemical properties. Moreover, the use of turmeric residue as based of edible solution is an

alternative for the food industry to prevent or minimize the cross-contamination process.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes) for the financial support.

4.5. Reference

- AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 108–117, jan. 2012.
- ANTONIEWSKI, M. n.; BARRINGER, S. a.; KNIPE, C. I.; ZERBY, H. n. Effect of a gelatin coating on the shelf life of fresh meat. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 6, p. E382–E387, 1 ago. 2007.
- ASTM D882-12. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 2001.
- ASTM E96M-10. Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 1995.
- BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, n. 1, p. 147–152, 2003.
- BENBETTAÏEB, N.; KUREK, M.; BORNAZ, S.; DEBEAUFORT, F. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2409–2419, 1 set. 2014.
- BRAGA, M. E. M.; MORESCHI, S. R. M.; MEIRELES, M. A. A. Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 340–346, 3 mar. 2006.
- CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; OSBURN, W.; RYSER, E. t. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on hot dogs using antimicrobial whey protein-

based edible casings. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 291–299, 1 jan. 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. t. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2317–2324, 1 ago. 2002.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. **Food Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 505–512, dez. 2005.

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

DE MORAES, J. O.; SCHEIBE, A. S.; SERENO, A.; LAURINDO, J. B. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 800–808, dez. 2013.

ESPINEL VILLACRÉS, R. A.; FLORES, S. K.; GERSCHENSON, L. N. Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 36, p. 108–117, 1 mar. 2014.

ESPITIA, P. J. P.; DU, W.-X.; AVENA-BUSTILLOS, R. de J.; SOARES, N. de F. F.; MCHUGH, T. H. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 287–296, mar. 2014.

FAKHOURI, F. M.; MARTELLI, S. M.; CAON, T.; VELASCO, J. I.; MEI, L. H. I. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 109, p. 57–64, nov. 2015.

GADANG, V. p.; HETTIARACHCHY, N. s.; JOHNSON, M. g.; OWENS, C. Evaluation of Antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, p. M389–M394, 1 out. 2008.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; PÉREZ-MATEOS, M.; GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-CABALLERO, E.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 1, p. 3–16, jan. 2009.

GUERRERO, P.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A.; DE LA CABA, K. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 65–72, jul. 2011.

HERRERO, A. M.; ORDÓÑEZ, J. A.; DE AVILA, R.; HERRANZ, B.; DE LA HOZ, L.; CAMBERO, M. I. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. **Meat Science**, v. 77, n. 3, p. 331–338, nov. 2007.

HORITA, C. N.; MESSIAS, V. C.; MORGANO, M. A.; HAYAKAWA, F. M.; POLLONIO, M. A. R. Textural, microstructural and sensory properties of reduced sodium frankfurter sausages containing mechanically deboned poultry meat and blends of chloride salts. **Food Research International**, v. 66, p. 29–35, dez. 2014.

HORITA, C. N.; MORGANO, M. A.; CELEGHINI, R. M. S.; POLLONIO, M. a. R. Physico-chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. **Meat Science**, v. 89, n. 4, p. 426–433, dez. 2011.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; GHAZI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, ASSET 2011. v. 136, n. 3–4, p. 1490–1495, 15 fev. 2013.

ICMSF. Microorganismos indicadores. In *Microorganismo de los Alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico*. p. 3, 1984.

JAYAPRAKASHA, G. K.; JAGAN MOHAN RAO, L.; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 12, p. 533–548, dez. 2005.

JIRUKKAKUL, N. A study of Mu Yor sausage wraps using chitosan films incorporating garlic oil, lemon grass oil and galangal oil. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 3, p. 1199–1204, 1 jan. 2013.

LIU, X.; WANG, Y.; ZHANG, N.; SHANKS, R. A.; LIU, H.; TONG, Z.; CHEN, L.; L. Y. Morphology and phase composition of gelatin-starch blends. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 32, n. 1, p. 108–114, 5 dez. 2013.

LÓPEZ DE LACEY, A. M.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 559–564, mar. 2014.

MANIGLIA, B. C.; DOMINGOS, J. R.; DE PAULA, R. L.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269–277, maio 2014.

MA, W.; TANG, C.-H.; YIN, S.-W.; YANG, X.-Q.; WANG, Q.; LIU, F.; WEI, Z.-H. Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 572–579, nov. 2012.

NOWZARI, F.; SHÁBANPOUR, B.; OJAGH, S. M. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1667–1672, 1 dez. 2013.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; CARVALHO, P. I. N.; ROSTAGNO, M. A.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, nov. 2014.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; PIETTE, G.; BÉGIN, A.; HOLLEY, R. A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1–2, p. 139–148, 5 dez. 2000.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1318–1325, 15 jan. 2012.

SHIH, F. F.; DAIGLE, K. W.; CHAMPAGNE, E. T. Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 118–121, 1 jul. 2011.

SHON, J.; CHIN, K. b. Effect of whey protein coating on quality attributes of low-fat, aerobically packaged sausage during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. C469–C475, 1 ago. 2008.

SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 102–108, maio 2012.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. E172–E176, 1 abr. 2005.

TONGDEESOONTORN, W.; MAUER, L. J.; WONGRUONG, S.; SRIBURI, P.; RACHTANAPUN, P. Mechanical and physical properties of cassava starch-gelatin composite films. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 61, n. 10, p. 778–792, 1 set. 2012.

WANG, Z.; ZHOU, J.; WANG, X.; ZHANG, N.; SUN, X.; MA, Z. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the water vapor barrier properties of soybean protein isolate-based oleic acid/stearic acid blend edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 51–58, mar. 2014.

XIAO, Q.; TONG, Q.; LIM, L.-T. Drying process of pullulan edible films forming solutions studied by ATR-FTIR with two-dimensional correlation spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 150, p. 267–273, 1 maio 2014.

ZAMUDIO-FLORES, P. B.; OCHOA-REYES, E.; ORNELAS-PAZ, J. D. J.; APARICIO-SAGUILÁN, A.; VARGAS-TORRES, A.; BELLO-PÉREZ, L. A.; RUBIO-RÍOS, A.; CÁRDENAS-FÉLIX, R. G. Effect of storage time on physicochemical and textural properties of sausages covered with oxidized banana starch film with and without betalains. **CyTA - Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 456–463, 3 jul. 2015.

CAPÍTULO. 5 RELEASE OF CURCUMIN FROM TURMERIC STARCH-GELATIN AND CASSAVA STARCH-GELATIN FILMS INTO A FOOD SIMULANT AND PORK SAUSAGE USING.

Juliano V. Tosati^a, José Vladimir de Oliveira^a, Nitin Nitin^{b, c}, Alcilene R. Monteiro^a #

^a Laboratory of Physical Properties (PROFI), Department of Chemical Engineering and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, CTC, PO box 476, Zip code 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. #Corresponding author: PHONE: +55-48-3721-2512; FAX: +55-48-3721-9687; EMAIL: alcilene.fritz@ufsc.br/alcilenemonteiro@gmail.com

^b Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, CA, USA.

^c Department of Biological and Agricultural Engineering, University of California, Davis, CA, USA.

ABSTRACT

This work used three methods to elucidate curcumin behavior in edible films and coating: release of curcumin in food simulant; analysis of diffusion by Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP); and curcumin migration from film or coating to sausage. Edible films or coatings were prepared with turmeric starch-gelatin and cassava starch-gelatin blends. By FRAP the films were analyzed under three conditions: dry, oil and wet. The food simulant test showed faster curcumin release from film in ethanol 50 % than 90 % due to the swelling by water. The temperature significantly decreased the diffusion coefficient for the 50 % ethanolic solution, while for 90 % ethanol no effect of temperature was observed. Applying FRAP analysis, curcumin showed low mobility for dry, in oil and wet films. When used as edible coating and film on sausage, curcumin release from coating to sausage was better. Thus, edible coatings and films with natural curcumin or added curcumin could be applied as primary packaging to provide protection against microbial cross contamination due to curcumin binding or entrapment in the polymers. It showed low mobility release and migration in the coatings and films.

Keywords: edible coatings; food simulant; FRAP; curcumin release

HIGHLIGHTS

- 1) Edible films showed similar diffusion coefficients of curcumin on food simulant
- 2) Curcumin release was faster in ethanol 50 % than 90 %
- 3) Frap test showed curcumin has low mobility in edible films
- 4) Curcumin did not diffuse into sausage
- 5) Coatings release more curcumin than films

5.1. INTRODUCTION

Curcumin is extracted from the rhizome of turmeric known as *Curcuma longa*. Curcumin is a yellow colored phytochemical polyphenol (MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016). This plant is a native and traditional spice in India and found in South America countries (BRAGA; MORESCHI; MEIRELES, 2006). Curcumin has a wide spectrum of biological activities, such as antioxidant (KUMAR et al., 2016), anti-cancer (SUNDAR; MARIAPPAN; PIRAMAN, 2014), anti-inflammatory (AGGARWAL et al., 2013), antibacterial (MUN et al., 2013) and antiviral (UMAR et al., 2016). Besides such beneficial properties it does not exhibit toxicity even in high concentrations. Thus the food industry has high interest to increase its use as a natural additive and preservative (BORRIN et al., 2016). However, the incorporation of the active compounds in food and drugs required control release to extend the effect in such products.

Edible coatings and films are used to control mass transfer of various molecules (of water, gases, lipids, flavor compounds or solutes) between the food and the surrounding environment (KARBOWIAK et al., 2009; BENBETTAÏEB et al., 2016b). Active edible packaging materials, in general contain antimicrobial substances. However, in this study, turmeric (*Curcuma longa* L.) starch obtained from essential oil extraction residue containing traces of oleoresin and curcuminoids, was used as an active packaging material containing curcumin naturally present (BRAGA; MORESCHI; MEIRELES, 2006; MANIGLIA et al., 2014; OSORIO-TOBÓN et al., 2014).

Migration test have been accomplished to determine how long the active compounds are kept in the polymer matrices and to determine the required concentration to keep antimicrobial efficacy (MIN; RUMSEY; KROCHTA, 2008). These tests are usually performed in food simulant (ethanolic solutions) in order to determine the active compound diffusion

coefficient in the polymeric matrix. Many papers report diffusion coefficient of the active compounds from bio-polymeric films to liquid media such as, α -tocopherol (GRANDA-RESTREPO et al., 2009; MANZANAREZ-LÓPEZ et al., 2011; HWANG et al., 2013), quercetin (BENBETTAÏEB et al., 2016b); thymol (MASTROMATTEO et al., 2009). However, no study comparing the release of curcumin in food simulants and real food comparing can be found. Especially comparing films based on polymers matrices containing natural curcumin in the matrix (turmeric) and coatings prepared with cassava starch added of curcumin.

Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) is one of the most versatile and simple techniques to determine diffusion coefficients. FRAP is combined with a confocal laser-scanning microscope (CLSM) to improve the investigation in the area of the micron-scale level (SILVA et al., 2015). This technique is based on irreversible photo-bleach in region of the fluorescently labelled sample. Used usually to study living cells (BRAGA; MCNALLY; CARMO-FONSECA, 2007), membrane (FENALTI et al., 2015) and other biological system such as food. Some works reported diffusion coefficient of small molecules in cheese (FLOURY et al., 2012), iota carrageenan films (KARBOWIAK et al., 2006) and starch systems (PERRY; FITZGERALD; GILBERT, 2006).

Mobility studies of curcumin in edible films under different environment, such as high humidity and oil, help to understand the behavior of the small hydrophobic molecule in the food. Thus, work aimed to study diffusion coefficient in food simulant, diffusion coefficient in film using FRAP technique and finally curcumin migration from film to real food.

Nomenclature: TGF- turmeric-gelatin film; CGC- cassava-gelatin film with added curcumin; CGF- cassava-gelatin film added of fluorescein; TGC- turmeric-gelatin coating; CGH- cassava-gelatin coating with added curcumin.

5.2. MATERIAL AND METHODS

5.2.1 Raw materials

Turmeric roots were supplied by Office Herbal Pharmacy Handling Ltda (Ribeirão Preto, Brazil). The turmeric residue was obtained from SFE (Supercritical Fluid Extraction) and PLE (Pressurized

Liquid Extraction) according to Osorio-Tobón et al. (2014). Cassava starch was purchased from a local market Bob's red Milk Natural Foods, INC, Milwaukie, Oregon, USA). Glycerol, fluorescein and gelatin were purchased for Sigma-Aldrich (3050 Spice Street, St Louis, MO, USA). Sausages containing 57 % water, 28 % fat, 12.5 % protein, 1.78 % carbohydrate were purchased from a local market Foster Farms (Davis, Ca, USA). Olive oil was purchased at Trader Joe's market (Davis, California, USA).

5.2.2 Curcumin extraction from turmeric residue

Conventional solvent extraction was performed to determine curcumin concentration in the turmeric residue starch. Different solvents and different concentration of solvent in water was used methanol (100 %) and ethanol (100 %, 75 %, 50 %, 30 %). The choice of different ethanol concentrations was due in the literature use as food simulant. A sample of 0.1 ± 0.02 g of turmeric residue starch was mixed with 5 mL of extraction solvent in a glass flask under stirring at 23 °C in dark environment. The extraction was carried out for 48 hours. Then, the extract was centrifuged (centrifuge 5809, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 6000 rpm for 5 min. The supernatant was taken and absorbance was read in a spectrometer (Spectra max 340, California, USA) at 425 nm. Curcumin concentration was assessed based on standard curves. A sample of 1 mg of curcumin /mL of ethanolic or methanolic was used in stock solutions. For each concentration of curcumin solution, a calibration curve was generated (0.68- to 100 µg/mL) at triplicates. A good linearity was obtained ($R = 0.99$) over the concentration range of 1.8 -60 µg/mL.

5.2.3 Film and coating solution preparation

Two blends were used to formulate film under study: a blend of turmeric starch-gelatin, a blend of cassava starch-gelatin.

5.2.3.1 Turmeric-gelatin solution

Turmeric starch residue was ground and sieved (mesh 0.075 mm). Film solution based on turmeric-gelatin was obtained following method described by MANIGLIA et al. (2014). An aqueous turmeric starch

solution (5 % w/w) was prepared by dispersing turmeric starch in hot water at 85 °C, homogenized for 4 h using magnetic stirrer (IKA Works Inc., Wilmington, NC). Solution was further homogenized (every hour) with a high-shear probe mixer for 2 min at 12000 rpm (Ultra Turrax T25 (IKA Werke, Germany)). Then, gelatin and glycerol were incorporated under stirring for 30 min at 70 °C. Final solution on a dry basis contained 50 % gelatin, 35 % residue turmeric and 15 % glycerol.

5.2.3.2 Cassava-gelatin solution

Filmogenic solutions from cassava-gelatin was added of curcumin and fluorescing were performed separately. 4.4 % (w/w) aqueous cassava starch suspension was heated at 71 °C for 5 min (Moraes, Scheibe, Sereno, & Laurindo, 2013). Then, 6 % (w/w) aqueous gelatin solution was heated at 70 °C until complete dissolution (Benbettaïeb et al., 2014), subsequently both solution were mixed. Glycerol (1.8% w/w) was added in the cassava-gelatin solution and mixed for 30 min at 70 °C. Fluorescein or curcumin was introduced in the solution at 3 µM and 300 µM, respectively. Thus, final solution composition on a dry basis was the same for the turmeric starch-gelatin solution.

5.2.3.3 Films preparation

Each film with density of 0.18 g m⁻² was obtained by pouring solutions onto acrylic plate (13 cm diameter) and drying it at 35 °C for 16 hours in an oven vacuum (Isotherm Vacuum Oven, Model 280 A, Fisher Scientific). Film samples were analyzed by FRAP under following conditions: a) dried film (11 ± 1.45 % of humidity), b) film covered on oil, c) wet film (58 ± 2.13 % of humidity). Wet film was stored in a 90 % relative humidity controlled chamber with barium chloride salt until equilibrium.

5.2.4 Diffusion of curcumin from turmeric-gelatin film (TF) and cassava-gelatin film added with curcumin (CF) in food simulant.

Curcumin diffusion coefficients for both films were determined using ethanol as food simulants at 50 % and 90 %. Film samples weighed approximately 1 ± 0.05 g. Samples were cut as discs (12 cm of diameter) then immersed in 55 mL food simulant in a 250 mL steel flask. The liquid

volume/area ratio was 0.98 mL.cm⁻² according to ASTM D4754-98, which establishes a ratio between 155.0 - 0.31 mL.cm⁻². Bottles were kept in the dark either at room temperature (23 °C) or refrigerated (4 °C). Aliquots of food simulants (ethanol 50%) were collected after 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 hours. For ethanol 90 %, aliquots were collected daily during 10 or 12 days. Each run was carried out in triplicate. Curcumin concentration was assessed by measuring the absorbance (Spectra max 340, California, USA) at 425 nm and concentration was calculated based on the calibration curve.

The migration process was described according to diffusion kinetics of migrant in the film and expressed by the diffusion coefficient (D). The initial antioxidant concentration in solution was equal to zero and in the film was assumed to be uniformly distributed. We also considered one dimensional, limited volume of film in finite and infinite volume of solution. Under those conditions, Equation 5.1 which follows analytical solution to Fick's second law, was considered to determine D (CRANK, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left[\frac{-D(2n+1)^2\pi^2t}{4l^2}\right] \quad (5.1)$$

Where M_t/M_∞ is the ration between curcumin released at time t and that released at equilibrium, l is the thickness of the film, and D is the diffusivity of the migrant into the film. The best fitting of the data to Eq. (1) was determined with the use of non-linear regression (nlinfit) function in MATALB R2012a (Mathworks Inc., USA).

5.2.5 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

The FRAP is a technique that can be used to determine the diffusion coefficients of the small fluorescence molecules at specific wavelength in edible films (KARBOWIAK et al., 2009). Diffusion coefficients was performed in three film conditions to simulate environment food package: dry film, film stored at 90 % of relative humidity and film exposed to olive oil on top. The edible films were cut at 1 cm², placed on the microscope glass slide and covered with a cover slip. FRAP experiment was carried out with a ZEISS LSM 510 META Confocal Microscope using a 25 X objective lens (air). The uniform

bleach disc radius was 9.8 μm and samples were bleached using a 6.1 mW argon ion laser (100 % power) at 488 nm. The bleach sequence was repeated until reaching 50 % of initial intensity. Frap image acquisition was performed using frame size 256x256 with maximum scan speed. A series of 100-200 single section images (range according the storage conditions of films), were then collected at 2 s intervals and with 0.1 % maximum laser intensity, to monitor the recovery process. The numerical aperture was 0.8 N.A; at room temperature (~ 23 $^{\circ}\text{C}$). Data were fitted using a single exponential function (Eq.(5.2)) (BONETTI; ROGER, 2013):

$$I(t) = (I_{\infty} - I_{in}) \times \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{diff}}\right) \right\} + I_{in} \quad (5.2)$$

where: I_{in} and I_{∞} are, respectively, the fluorescence intensities at time $t=0$ after photobleaching and at time $t=\infty$ when the dye concentration is uniform within the sample. τ_{diff} is defined as the characteristic time for curcumin or fluorescein to diffuse across the bleached spot. The characteristic diffusive time τ_{diff} is related to the diffusion coefficient D by equation (5.3):

$$D = \frac{R^2}{4\tau_{diff}} \quad (5.3)$$

where R is the characteristic length over which diffusion takes place. The MATLAB program was used to find the best fitting of the data to Eq. (5.2) by using the non-linear regression (nlinfit) function in MATAB R2012a.

5.2.6 Migration assay in sausage

In order to compare curcumin release from coating and film to food, sausages were used to test the curcumin migration using both matrices. The preliminary tested with turmeric film (TGF) and turmeric coating (TGC) showed low curcumin release. Therefore, ethanolic curcumin solution (10 mg/mL) was added in cassava-gelatin solution to obtain high curcumin concentration (1 mg/g of solution and 300 $\mu\text{g/g}$ film) and improve the release. The sausages were cut in cylinders pieces

(2 cm-diameter and 5 cm-height). Previously, prepared turmeric-gelatin film (TGF) and cassava-gelatin film added curcumin (CGC) were cut in circular disks (2 cm-diameter). The sausage pieces were pressed on film in petri dish. The solutions coating (TGC and CGH) were prepared according to section 5.2.3 and cooled until 50 °C. Then, 0.5 mL were placed on sausage. The film and coated samples were stored at 4 °C for 5 days. Each day, one sample was taken out from the chamber to determinate amount of curcumin on the surface. After storage, the coating or film were removed from the sausage surface, surface slices (1 mm thickness) were cut to determine the curcumin concentration. Extraction of curcumin from sausage were placed in PTE tube with ethanol 75 % for 24 h. Then, the solution was centrifuged at 6000 rpm for 5 min to precipitate the insoluble substances. Then, supernatant was taken from flask and the absorbance read according to protocol described in section 5.2.2.

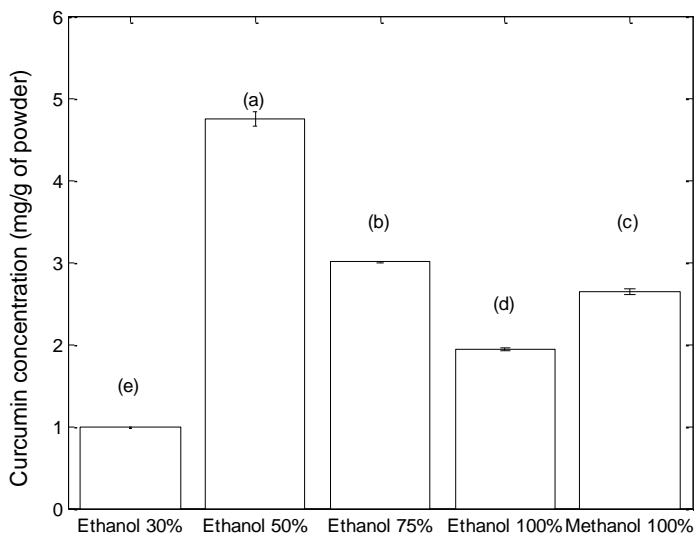
5.3. RESULT AND DISCUSSION

5.3.1 Curcumin extraction from turmeric residue

Figure 5.1 shows the yield of curcumin concentration obtained from turmeric waste in methanol and ethanol as solvent (100 %, 75 %, 50 % and 30 % ethanol/water. Methanol (100 %) was more efficient to extract curcumin than pure ethanol. However, due to the methanol toxicity ethanol was selected. The extractability of different solvents depends mainly on the solubility of the compound in the solvent, the mass transfer kinetics of the products, and the strength of the solute/matrix interaction. One explanation of why methanol extracts more curcumin than ethanol could be attributed to the small difference in the molecule polarity and molecule weight. The best concentration for ethanol to extraction of curcumin was at 50 %. This to change in relative polarity of the solution. Water content increase also increased polarity index, enhancing the solubility of curcumin in ethanol. Another possible reason for the increased efficiency with water presence might be due to the increase in swelling of plant material by water, which increased the contact surface area between the plant matrix and the solvent. However, although at 30 % ethanol it has high polarity, showed low yield of curcumin due probably the decreasing of affinity of solvent with the solute, in which the solution loses its ability to extract curcumin of the residue (HEMWIMON; PAVASANT; SHOTIPRUK, 2007). Results in

this study agree with other works, where extract other compound hydrophilic in the plant and the yield of compound extraction increased with ethanol/water 50 % (WANG; HELLIWELL, 2001; SUN; HO, 2005; DURLING et al., 2007; BIMAKR et al., 2011; ROBY et al., 2013).

Figure 5.1. Curcumin concentration from turmeric powder residue obtained by conventional extraction with solvent methanol (100%) and ethanol (100, 75, 50 and 30 %). Averages with the same letter do not differ statistically ($p \geq 0.05$) according Tukey's test.



5.3.2 Diffusion of curcumin from turmeric starch-gelatin and cassava starch-gelatin films in food simulant

Curcumin release from the TGF and CGC at 50 % and 90 % ethanol solution was studied at room temperature (23 °C) and at 4 °C, according habitual storage temperature for the refrigerated products. Results are presented as to the ratio between the amount of curcumin released into the ethanol solution at time t and at equilibrium (M_t/M_∞). Generally, when the hydrophilic film is exposed in the ethanolic solution, water molecules begin to penetrate in the polymer structure inducing swelling and polymer chain relaxation. Then, active compounds diffuse

from polymeric matrix (biofilm) to solution, because of the changes in the polymeric structure by water presence. The compounds diffuse through the matrix into the solution until a thermodynamic equilibrium between the two phases is reached (DEL NOBILE et al., 2008; PINHEIRO et al., 2013). Therefore, curcumin release kinetics depends on the following phenomena: swelling (water diffusion from solution into the film), macromolecular matrix relaxation, diffusion of the compounds through the swollen polymeric network. The two first phenomena are faster than the last one, in which the diffusion of curcumin showed a typical Fick's curve as can be seen in Figures 5.2 and 5.3. Furthermore, all tests provide similar profiles. Curcumin release kinetics exhibited the typical shape of non-time dependent and non-concentration dependent diffusion (MASTROMATTEO et al., 2009).

Figure 5.2. Diffusion kinetics in ethanol 50% a and b) TGF at 23°C and 4 °C, respectively. c and d) CGC at 23 °C and 4 °C, respectively. The line is model fit and the circle is release dates of curcumin in solution.

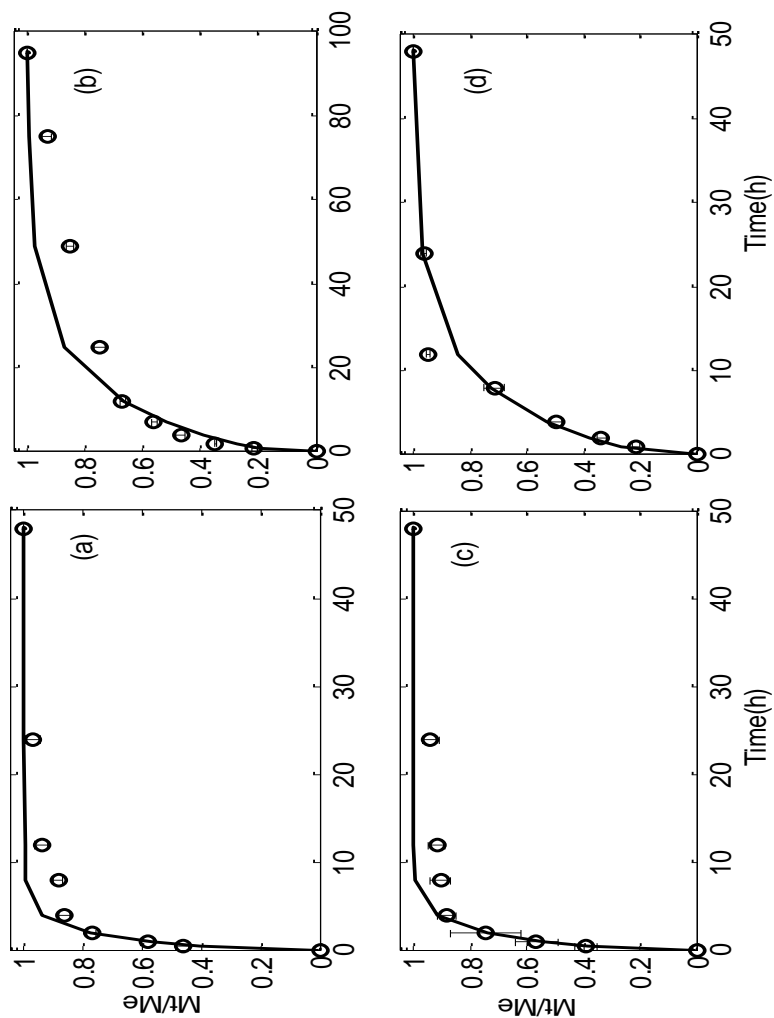
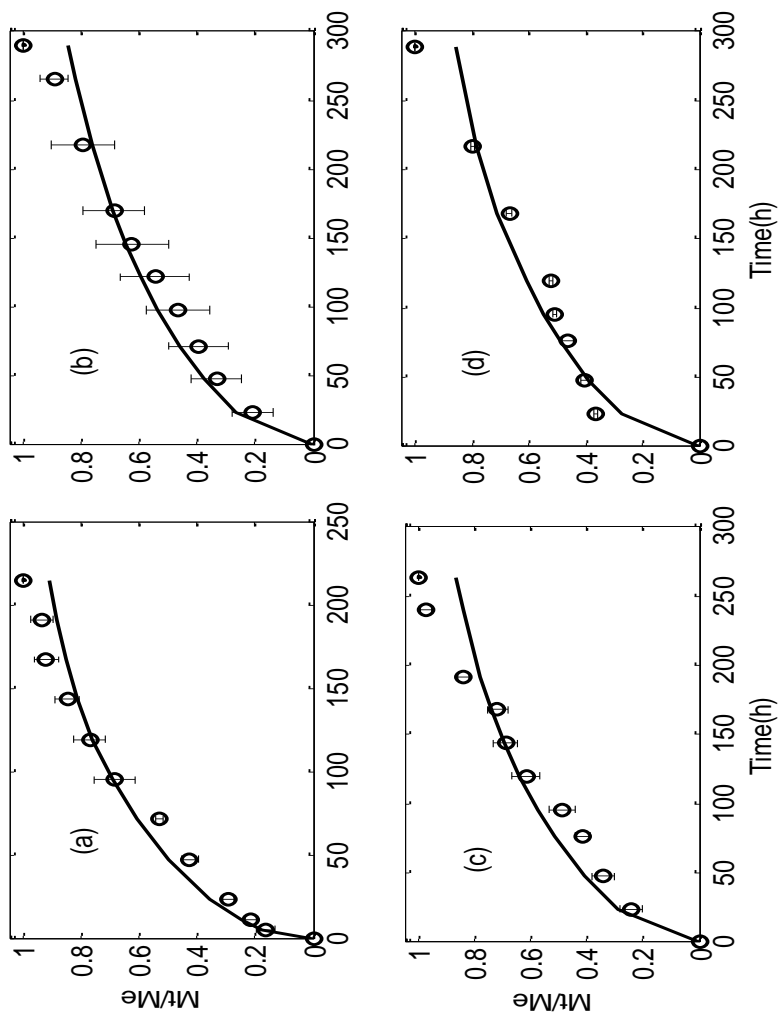


Figure 5.3. Diffusion kinetics in ethanol 90 %. a and b) TGF at 23 °C and 4 °C, respectively. c and d) CGC at 23 °C and 4 °C, respectively. The line is model fit and the circle is release dates of curcumin in solution.



Diffusion coefficients and percent of the curcumin release are shown in Table 5.2 where the values were in the range of $0.214-1.64 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ and $1.74-2.93 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ for 50 % and 90 % ethanol solution, respectively. The percent values of curcumin release range from 39.2 to 85.4 % for 50 % ethanol solution and from 10.42 to 42.81 % for 90 % ethanol solution. At low temperature, the diffusion coefficient for 50 % ethanol solution decreased 10 times. For 90 % ethanol solution, no

significant difference was obtained. Furthermore, the percent of curcumin release decreased in both solution, when the films were immersed at low temperature (KASHIRI et al., 2016) as expected. The decrease in release rate of curcumin at low temperature is attributed to the decrease of mobility of the curcumin molecules in the matrix that became more and more compact and dense (KUORWEL et al., 2013). Moreover, the low temperature decreased solubility of curcumin in solution (HEMWIMON; PAVASANT; SHOTIPRUK, 2007). The different matrix release (TGF and CGC) did not show significant differences. These results showed the curcumin added in cassava starch has a strong interaction with polymer. Similar behavior was observed for curcumin naturally contained in turmeric starch. In literature, there are many studies of migration of hydrophilic and hydrophobic molecules in edible films using food simulant as water, acetic acid, ethanol, fat, etc. (HIGUERAS et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; BENBETTAÏEB et al., 2016a; KASHIRI et al., 2016) (MANZANAREZ-LÓPEZ et al., 2011; BLANCO-FERNANDEZ et al., 2013; KUORWEL et al., 2013; BENBETTAÏEB et al., 2016b). Liu et al., (2016) studied the release of tea polyphenol from gelatin films in 50 % and 95 % of ethanolic solution. They observed that tea polyphenols was released faster in 50 % than in 95 % ethanolic solution, similar results were obtained in this study. Benbettaïeb et al., (2016b) studied release of quercetin from chitosan-fish gelatin edible films in 30 % ethanolic solution under stirring and obtained diffusion coefficient was estimated $2.40 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$. According to Yu et al. (2015) release of active compounds is related to the swelling of films due the relaxation of the polymeric matrices that facilitate their diffusion.

Table 5.1. Diffusion coefficients (m^2/s) of curcumin in different film matrices.

Matrix	23°C			
	ETOH 50% $\times 10^{-12}$	%Release	ETOH 90% $\times 10^{-14}$	%Release
TGF	1.41 ± 0.15^a	69.89	2.93 ± 0.28^a	42.81
CGC	1.64 ± 0.08^a	85.40	1.95 ± 0.23^b	32.15
4°C				
TGF	0.214 ± 0.1^a	48.41	2.05 ± 0.51^a	10.82
CGC	0.397 ± 0.09^a	39.23	1.74 ± 0.04^a	14.39

ETOH-Ethanol; TGF- turmeric-starch gelatin film; CGC: Cassava-starch gelatin film with curcumin. Averages with the same letter in the same column and at the same temperature do not statistically different ($p \geq 0.05$) according to Tukey's test.

5.3.3 Diffusion and mobility of curcumin by FRAP

The alternative approach of FRAP technique seems as a valuable tool to determine the curcumin and fluorescein diffusion in edible films exposed in different conditions (dry, oil and high humidity) (KARBOWIAK et al., 2008). Figure 5.4 shows the image of fluorescence intensity before, after bleach and at the end of recovery time. The bleach was performed in the marked area with a yellow circle. The images of TGF and CGC dry films and oil on the surface showed more intensity than cassava-gelatin film with fluorescein (CGF). On the other hand, CGF storage under 90 % of relative humidity showed more intensity than TGF and CGC. Also, the sample CGF stored under the same conditions (90 % RH) showed the best FRAP results, which can be easily visualized by difference between after bleach and end recovery time. The intensities of the images showed the affinity between the curcumin and oil (hydrophobic molecule) and fluorescein and water (hydrophilic molecule) due to high intensity displayed (KARBOWIAK et al., 2006; WU et al., 2011).

Figure 5.4. Images showing recovery of fluorescent intensity within the bleach disk.

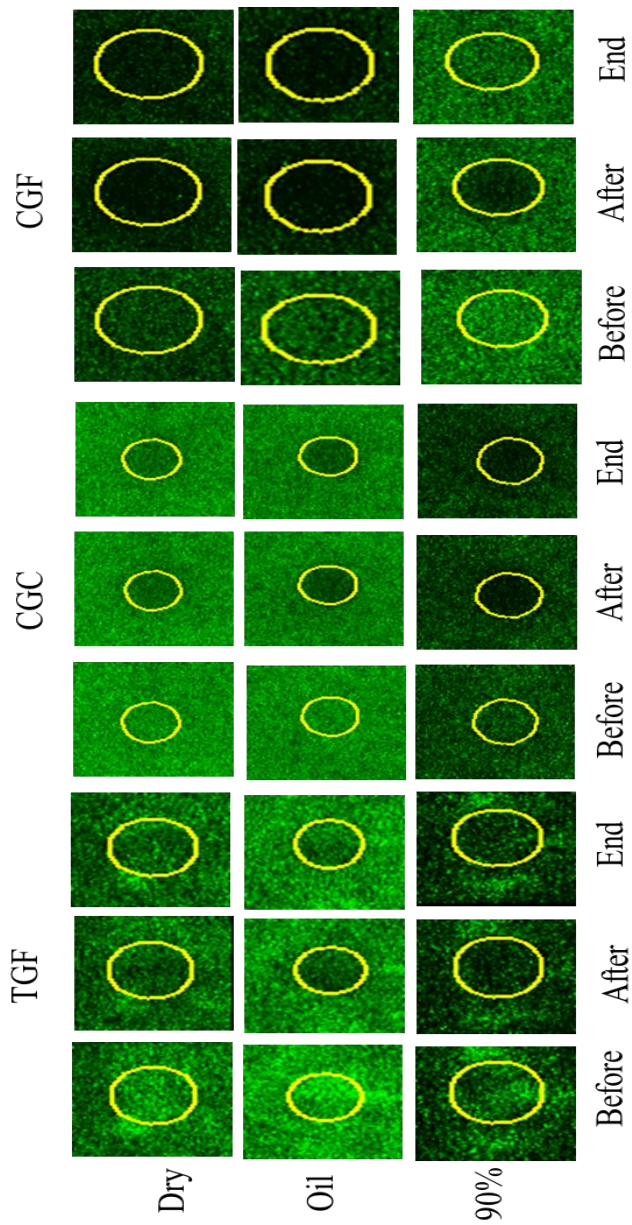


Figure 5.5 shows the normalized intensity of each film under different conditions. The bleach time for TGF and CGC were the same, meanwhile the CGF needed a different time to reach at least 50 % of the initial intensity. TGF and CGC dry or oil presence showed the exponential behavior. For TGF samples stored under 90 % RH a different is shown behavior when comparing to the other samples, probably due their composition. On the other hand, CGC showed a linear behavior. The dry films showed the same behavior: fast release after bleach and reaching the plateau quickly. The CGF was stored under 90 % RH was the best representation of recovery curve after bleach. On the other hand, the CGF content oil showed the similar behavior as the CGC stored under high humidity.

Figure 5.5. Normalized intensity vs. time curve for each film and conditions in a Frap experiment. Data represent the averaged FRAP data for 10 films from a representative experiment. a) 90% HR. b) oil c) dry.

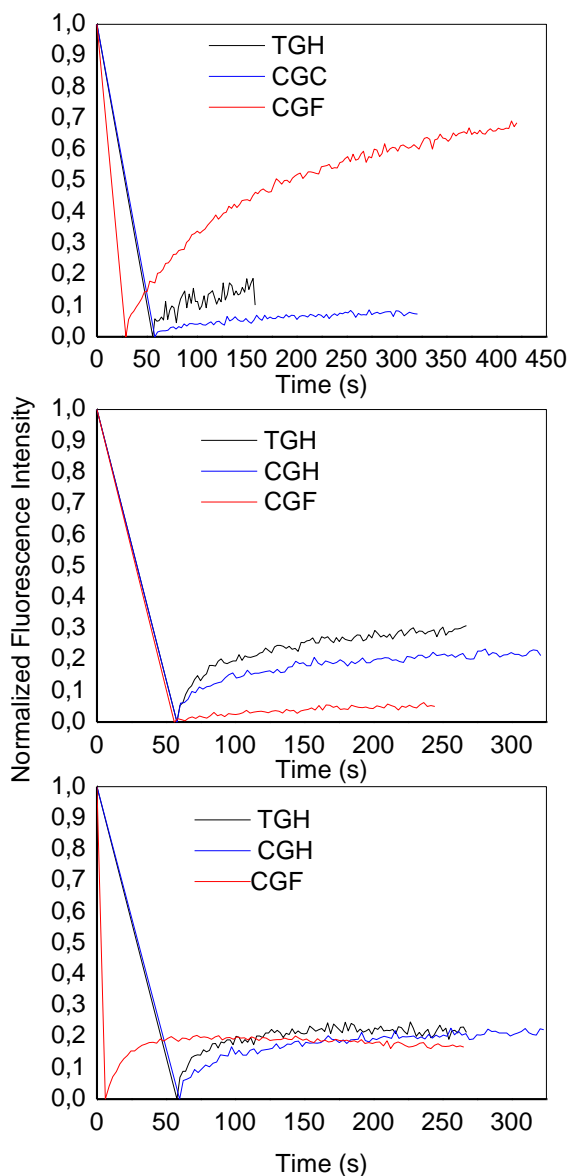


Table 5.3 shows the diffusion coefficient values of films range from 0.217×10^{-13} to 2.45×10^{-12} m/s² and the recovery was between 5 to 68 %. When comparing TGF and CGC in different conditions, it can be seen that TGF dry was faster than CGC and other two conditions have the same values. In other case, for with the same matrices but with different compounds (curcumin and fluorescein) the hydrophobic molecule (curcumin) was better recovered in presence of oil and hydrophilic molecule (fluorescein) was the best recovered in high humidity. On the other hand, the diffusion coefficients of curcumin and fluorescein in the film on wetted in oil (TGF) and the wet (CGF) were lower than those coefficients obtained in the dry films. In fact, when it added a solvent (water and oil) the compounds first need to solubilize and after that diffuse, decreasing diffusion coefficient. Moreover, the faster diffusion in dry films could be associated with the few molecules free closed the bleach part that diffuse quickly to recovery the intensity. For cassava film dry and under oil mobility and diffusion coefficient has the same value, probably because oil did not penetrate in the matrix to release of curcumin, as occurred between water and CF films samples. The distinct behavior of TF and CF in water and oil could be due the composition of TF as protein, fibers, oil residue that can improve the mobility in both conditions. These results can prove that curcumin was more trapped in the matrix than fluorescein and the curcumin has low mobility and diffusion in all conditions (VIMALA et al., 2011).

Any work could be found in literature using FRAP to analyze matching the hydrophobic molecules in edible films. Karbowski et al. (2006) studied the diffusion of fluorescein in edible film Iota-Carrageenan based and they found an increasing of diffusion coefficient and mobility in polymer high humidity. The mobility result is similar this work, but the diffusion coefficient is opposite. Payet et al. (2008) studied diffusion coefficient in dextran molecule in water and gel solution of chitosan by FRAP and observed that the diffusion coefficient of dextran decrease with increase in chitosan content.

Table 5.2. Diffusion coefficients by FRAP methods.

Film containing	TGF m²/s	Recover y (%)	CGC m²/s	Recover y (%)	CGF m²/s	Recover y (%)
Dry	1.03x10 ⁻¹²	23	5.48x10 ⁻¹³	22	2.45x10 ⁻¹²	16
Oil	5.39x10 ⁻¹³	30	5.29x10 ⁻¹³	22	3.96x10 ⁻¹³	5
90% Humidity	5.781x0 ⁻¹³	18	3.06x10 ⁻¹³	7	2.17x10 ⁻¹³	68

5.3.4 Release of curcumin into sausage

Migration process is the result of solubility, diffusion and equilibrium processes in the food and it is highly dependent on the properties of the system. Figure 5.6 shows curcumin concentration on sausage surfaces. The test was carried out using turmeric-gelatin film (TGF) and coating (TGC) with low concentration of curcumin (130 µg/mL solution), cassava-gelatin film (CGC) and coating (CGH) added with curcumin (1300 µg/mL solution) in order to determinate which film or coating release more curcumin to the foodstuff. The results showed that the coatings released more curcumin than films to sausage surface. In polymeric packaging film or coating, two sets of forces are involved: cohesion and adhesion. In this case, adhesion was the main force, since coating showed the best results for curcumin migration than films.

Comparing the release between turmeric starch where the curcumin is naturally present and cassava-gelatin where curcumin was added with tenfold the concentration found in the turmeric residue-gelatin, the results show curcumin release (7.49 %, 10.49 %, 1.11 % and 2.49 % for CGH, TGC, CGC and TGF respectively) was higher in TGF and TGC samples than cassava starch-gelatin samples. Probably because the curcumin equilibrium between sausage surface and coatings was reached stopping the migration process.

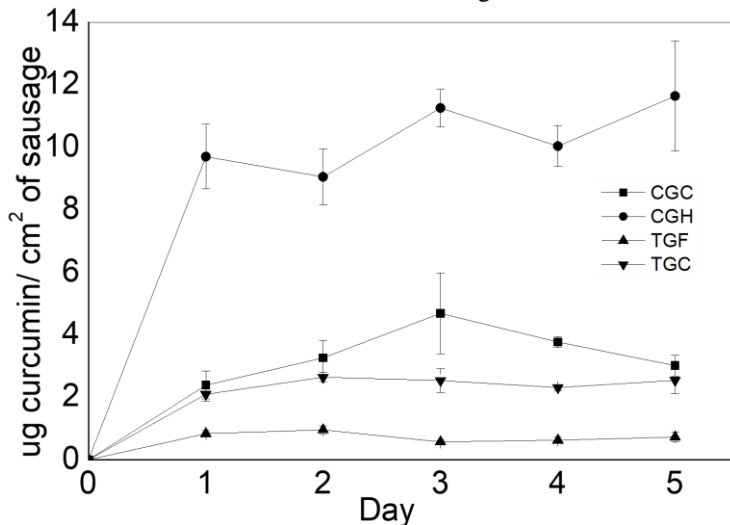
Equilibrium between films-sausage or coatings-sausage occurred in the first day. Then, curcumin concentration remained constant. In this case, there was only solubility of coating or film on sausage surface and the curcumin on surface not diffuse from sausage. Generally, starch and gelatin are used to make encapsulation of curcumin due crosslinking bonds between amine groups (NH₂) of gelatin or interaction via hydrogen bonding of starch. Thus, probably the coatings and films were solubilize

on sausage surface and the curcumin present in them is solubilized together on sausage surface. However, the curcumin on surface would be strongly bound with the polymers or it could not have enough interaction with the sausage compound to diffuse (PANG et al., 2014; MALACRIDA et al., 2015).

When compared with FRAP and food simulant experiments, FRAP showed low mobility of curcumin in the film with high humidity and for food simulant faster diffusion at 50 % ethanol solution. At 90 % Ethanol solution and FRAP using oil on film showed low diffusion coefficient and mobility. Mobility and diffusion coefficient are influenced by food composition. Sausages, for example, has 57 % of water in their composition, which is enough to relax the matrix. On the other hand, it has 28 % of fat which is not enough to contribute to diffusion of the curcumin, since sausage is an emulsified product, the fat is not totally available for curcumin diffusion. Furthermore, the best yield of extraction for curcumin from turmeric residue was at ethanol 50 % due to compound affinity.

Diffusion of hydrophilic compounds in foods has been studied elsewhere (MIN; KROCHTA; RUMSEY, 2007; MIN; RUMSEY; KROCHTA, 2008; LEE; KIM; MIN, 2015; LEE; OH; MIN, 2015). However, studies on migration of hydrophobic molecules in edible films or coatings into real food can not be found elsewhere.

Figure 5.6. Concentration of curcumin on sausage surface vs time.



5.4. Conclusion

Three methods were approached to understand the release of curcumin from films and coatings: food simulant, FRAP analysis and migration assay. All results showed that curcumin is trapped or has stronger binds in the polymeric matrix used in this work. The 50 % ethanol solution showed fastest release of curcumin than 90% ethanol solution. Curcumin showed lower mobility and diffusion coefficient in film in contact with oil or food simulant fat (90% ethanol). No difference in release was observed, either curcumin was naturally present or was added in edible film or coating. Edible coatings showed better curcumin migration than edible films in sausages. Thus, either edible film or coating could be applied as primary packaging to protect against microbial cross contamination, due maintenance of curcumin in the polymer with slow release for the foods. Film or coating should be selected according to food composition (high or low humidity, high or low fat content).

5.5. Reference

AGGARWAL, B. B.; YUAN, W.; LI, S.; GUPTA, S. C. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: identification of novel components of turmeric. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 9, p. 1529–1542, 1 set. 2013.

BENBETTAÏEB, N.; ASSIFAOU, A.; KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; CHAMBIN, O. Controlled release of tyrosol and ferulic acid encapsulated in chitosan–gelatin films after electron beam irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Ionizing Radiation and Polymers symposium, IRaP 2014. v. 118, p. 81–86, jan. 2016a.

BENBETTAÏEB, N.; CHAMBIN, O.; KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F. Release behavior of quercetin from chitosan–fish gelatin edible films influenced by electron beam irradiation. **Food Control**, v. 66, p. 315–319, ago. 2016b.

BIMAKR, M.; RAHMAN, R. A.; TAIP, F. S.; GANJLOO, A.; SALLEH, L. M.; SELAMAT, J.; HAMID, A.; ZAIDUL, I. S. M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.)

leaves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 1, p. 67–72, jan. 2011.

BLANCO-FERNANDEZ, B.; RIAL-HERMIDA, M. I.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Edible chitosan/acetylated monoglyceride films for prolonged release of vitamin e and antioxidant activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 2, p. 626–635, 15 jul. 2013.

BONETTI, M.; ROGER, M. Translational diffusion of probe molecules under high pressure: A study by fluorescence recovery after photobleaching technique. **Review of Scientific Instruments**, v. 84, n. 2, p. 023904, 1 fev. 2013.

BORRIN, T. R.; GEORGES, E. L.; MORAES, I. C. F.; PINHO, S. C. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physico-chemical stability. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 1–9, jan. 2016.

BRAGA, J.; MCNALLY, J. G.; CARMO-FONSECA, M. A Reaction-diffusion model to study rna motion by quantitative Fluorescence Recovery after Photobleaching. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 8, p. 2694–2703, 15 abr. 2007.

BRAGA, M. E. M.; MORESCHI, S. R. M.; MEIRELES, M. A. A. Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 340–346, 3 mar. 2006.

CRANK, J. **THE MATHEMATICS OF DIFFUSION**. SECOND EDITION ed. London: CLARENDON PRESS, 1975.

DEL NOBILE, M. A.; CONTE, A.; INCORONATO, A. L.; PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**, v. 89, n. 1, p. 57–63, nov. 2008.

DURLING, N. E.; CATCHPOLE, O. J.; GREY, J. B.; WEBBY, R. F.; MITCHELL, K. A.; FOO, L. Y.; PERRY, N. B. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1417–1424, 2007.

FENALTI, G.; ABOLA, E. E.; WANG, C.; WU, B.; CHEREZOV, V. Chapter Twenty - Fluorescence Recovery After Photobleaching in lipidic cubic phase (LCP-FRAP): A precrystallization assay for membrane proteins. In: SHUKLA, A. K. (Ed.). **Methods in Enzymology**.

Membrane proteins—engineering, purification and crystallization. Academic Press, 2015. 557p. 417–437.

FLOURY, J.; MADEC, M.-N.; WAHARTE, F.; JEANSON, S.; LORTAL, S. First assessment of diffusion coefficients in model cheese by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 551–556, 15 jul. 2012.

GRANDA-RESTREPO, D. M.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; GÁMEZ-MEZA, N.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z. Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1396–1402, dez. 2009.

HEMWIMON, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Separation and Purification Technology**, v. 54, n. 1, p. 44–50, 15 mar. 2007.

HIGUERAS, L.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R.; ROLLINI, M. Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-*N* α -dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 339–345, 1 ago. 2013.

HWANG, S. W.; SHIM, J. K.; SELKE, S.; SOTO-VALDEZ, H.; MATUANA, L.; RUBINO, M.; AURAS, R. Migration of α -tocopherol and resveratrol from poly(L-lactic acid)/starch blends films into ethanol. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p. 814–828, jun. 2013.

KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A.; TRYSTRAM, G. From macroscopic to molecular scale investigations of mass transfer of small molecules through edible packaging applied at interfaces of multiphase food products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 116–127, jan. 2009.

KARBOWIAK, T.; GOUGEON, R. D.; RIGOLET, S.; DELMOTTE, L.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. **Food Chemistry**, 4th International Workshop on Water in Foods. v. 106, n. 4, p. 1340–1349, 15 fev. 2008.

KARBOWIAK, T.; HERVET, H.; LÉGER, L.; CHAMPION, D.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Effect of plasticizers (water and glycerol) on the diffusion of a small molecule in iota-carrageenan biopolymer films for edible coating application. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 2011–2019, 1 jun. 2006.

KASHIRI, M.; CERISUELO, J. P.; DOMÍNGUEZ, I.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE). **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 547–554, dez. 2016.

KUMAR, A.; SINGH, M.; SINGH, P. P.; SINGH, S. K.; RAJ, P.; PANDEY, K. D. Antioxidant efficacy and curcumin content of turmeric (*Curcuma-longa* l.) Flower. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 112–114, 1 jul. 2016.

KUORWEL, K. K.; CRAN, M. J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S. W. Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 432–438, mar. 2013.

LEE, H.-B.; OH, Y. A.; MIN, S. C. Prediction of the coating requirements for smoked salmon protection against *Listeria monocytogenes* using a defatted mustard meal-based antimicrobial edible film containing thiocyanates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 231–237, abr. 2015.

LEE, H.; KIM, J. E.; MIN, S. C. Quantitative risk assessments of the effect of an edible defatted soybean meal-based antimicrobial film on the survival of *Salmonella* on ham. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 30–38, ago. 2015.

LIU, F.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; CHIOU, B.-S.; LI, Y.; MA, Y.; WILLIAMS, T. G.; WOOD, D. F.; MCHUGH, T. H.; ZHONG, F. Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. **Food Hydrocolloids**, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16303411>>. Acesso em: 9 ago. 2016.

MALACRIDA, C. R.; FERREIRA, S.; ZUANON, L. A. C.; NICOLETTI TELIS, V. R. Freeze-drying for microencapsulation of turmeric oleoresin using modified starch and gelatin. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1710–1719, 1 dez. 2015.

MANIGLIA, B. C.; DOMINGOS, J. R.; DE PAULA, R. L.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269–277, maio 2014.

MANZANAREZ-LÓPEZ, F.; SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R.; PERALTA, E. Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and

its effect on the oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 508–517, jun. 2011.

MASTROMATTEO, M.; BARBUZZI, G.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Controlled release of thymol from zein based film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 222–227, abr. 2009.

MIN, S.; KROCHTA, J. M.; RUMSEY, T. R. Diffusion of thiocyanate and hypothiocyanite in whey protein films incorporating the lactoperoxidase system. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 4, p. 1116–1124, jun. 2007.

MIN, S.; RUMSEY, T. R.; KROCHTA, J. M. Diffusion of the antimicrobial lysozyme from a whey protein coating on smoked salmon. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 39–47, jan. 2008.

MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, maio 2016.

MUN, S.-H.; JOUNG, D.-K.; KIM, Y.-S.; KANG, O.-H.; KIM, S.-B.; SEO, Y.-S.; KIM, Y.-C.; LEE, D.-S.; SHIN, D.-W.; KWEON, K.-T.; KWON, D.-Y. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 8–9, p. 714–718, 15 jun. 2013.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; CARVALHO, P. I. N.; ROSTAGNO, M. A.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, nov. 2014.

PANG, S. C.; TAY, S. H.; CHIN, S. F.; PANG, S. C.; TAY, S. H.; CHIN, S. F. Facile synthesis of curcumin-loaded starch-maleate nanoparticles, facile synthesis of curcumin-loaded starch-maleate nanoparticles. **Journal of Nanomaterials, Journal of Nanomaterials**, v. 2014, 2014, p. e824025, 3 fev. 2014.

PAYET, L.; PONTON, A.; LÉGER, L.; HERVET, H.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Self-diffusion in chitosan networks: from a gel–gel method to Fluorescence Recovery after Photobleaching by Fringe Pattern. **Macromolecules**, v. 41, n. 23, p. 9376–9381, 9 dez. 2008.

PERRY, P. A.; FITZGERALD, M. A.; GILBERT, R. G. Fluorescence Recovery after Photobleaching as a probe of diffusion in starch systems. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 2, p. 521–530, 1 fev. 2006.

PINHEIRO, A. C.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; QUINTAS, M. A. C. Transport mechanism of macromolecules on hydrophilic bio-polymeric matrices – Diffusion of protein-based compounds from chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 3, p. 633–638, jun. 2013.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A.-H.; KHALEL, K. I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827–831, maio 2013.

SILVA, J. V. C.; PEZENNEC, S.; LORTAL, S.; FLOURY, J. Flexibility and charge of solutes as factors that determine their diffusion in casein suspensions and gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 29, p. 6624–6632, 29 jul. 2015.

SUNDAR, S.; MARIAPPAN, R.; PIRAMAN, S. Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug. **Powder Technology**, v. 266, p. 321–328, nov. 2014.

SUN, T.; HO, C.-T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 743–749, maio 2005.

UMAR, S.; SHAH, M. a. A.; MUNIR, M. T.; YAQOUB, M.; FIAZ, M.; ANJUM, S.; KABOUDI, K.; BOUZOUAIA, M.; YOUNUS, M.; NISA, Q.; IQBAL, M.; UMAR, W. Synergistic effects of thymoquinone and curcumin on immune response and anti-viral activity against avian influenza virus (h9n2) in turkeys. **Poultry Science**, p. pew069, 4 mar. 2016.

VIMALA, K.; MOHAN, Y. M.; VARAPRASAD, K.; REDD, N. N.; RAVINDRA, S.; NAIDU, N. S.; RAJU, K. M. Fabrication of curcumin encapsulated chitosan-pva silver nanocomposite films for improved antimicrobial activity. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 55–64, 2011.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 34, n. 2–3, p. 223–227, 2001.

WU, X.; XU, J.; HUANG, X.; WEN, C. Self-microemulsifying drug delivery system improves curcumin dissolution and bioavailability. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 1, p. 15–23, 1 jan. 2011.

CAPÍTULO. 6 LIGHT-ACTIVATED ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TURMERIC RESIDUE EDIBLE COATINGS AGAINST CROSS-CONTAMINATION OF *LISTERIA INNOCUA* ON SAUSAGES

Juliano V. Tosati^a, Erick F. de Oliveira^{b, c}, José Vladimir de Oliveira^a, Nitin Nitin^{b, d}, Alcilene R. Monteiro^{a#}

^a Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, CA, USA.

^c CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília, DF, Brazil.

^d Department of Biological and Agricultural Engineering, University of California, Davis, CA, USA.

Address correspondence to Alcilene R. Monteiro, alcilene.fritz@ufsc.br

ABSTRACT

The high number of foodborne outbreaks in ready-to-eat (RTE) food as cooked sausages illustrate the importance of controlling microbial safety during post-processing stages of food products. Edible antimicrobial coatings can be applied to food after processing and sanitation with the goal of preventing microbial cross-contamination, decreasing the risk of foodborne illness and increasing the product shelf-life. In this study, edible hydrogel coatings that can present strong antimicrobial activity when combined with UV-A light were prepared. The hydrogels coatings were prepared using either turmeric residue and gelatin hydrogels (TGH) or cassava starch and gelatin hydrogels with added purified curcumin (CGH). The coatings were characterized regarding their thickness, encapsulated curcumin concentration and water swelling, in addition to their light-activated antimicrobial activity against different initial loads of *Listeria innocua* at different incubation temperatures. Additionally, the coatings were applied to the surface of cooked sausages and evaluated for their ability to prevent bacterial cross-contamination. It was observed that UV-A light-exposed hydrogel coatings could inactivate more than 5 log CFU/mL of *L. innocua* after

light treatments as short as 5 min. In addition, the light-activated antimicrobial activity of the hydrogel coatings were not affected by the incubation temperature. Hydrogel-coated sausages exposed to UV-A light experienced a reduction from 4 log CFU/mL of incubated bacteria to levels below the detection limit of 1 log CFU/mL after 5 and 15 min of light exposure, for CGH and TGH, respectively. Further mechanistic studies suggested that *L. innocua* inactivation was due to the photo-irradiation of low levels of curcumin released from the coatings to solution. Lastly, it was shown that the combination of curcumin-loaded hydrogels coatings and UV-A light have great potential as antimicrobial coatings to prevent cross-contamination of *L. innocua* in refrigerated sausages.

Keywords (max of 6): Antimicrobial, Curcumin, Hydrogel, Edible Coating, UV-A light, Photodynamic Inactivation

HIGHLIGHTS

- 1) Turmeric residue was used to prepare light-activated antimicrobial hydrogel coatings
- 2) Hydrogel coatings exposed to UV-A light can inactivate 5 log CFU/mL of *L. innocua*
- 3) The antimicrobial activity of the hydrogel coatings were independent of temperature
- 4) Light-exposed hydrogel coatings can prevent bacteria cross-contamination on sausages
- 5) Curcumin release from hydrogels is the main inactivation mechanism of *L. innocua*

6.1. INTRODUCTION

Food contamination continues to be a big concern for public health, consumer, regulatory agencies and food industries around the world (Giaouris et al., 2014). Read-to-eat (RTE) meat products are subject to a proper heat treatment for elimination of non-sporogenic pathogens (Brasileiro et al., 2016). Nevertheless, in America and in Europe, several outbreaks of foodborne diseases in RTE have been reported caused by *Listeria monocytogenes* contamination (Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson, & Whiting, 2017). The main factor responsible for their occurrence is cross-contamination during post processing operations (slicing, chopping, comminuting) and the potential of *L. monocytogenes*

to grow under various food handling conditions, such as the presence or absence of oxygen, over a large pH range (4.7 - 9.2) and at low temperature (Magalhães et al., 2016).

Post-processing protection using antimicrobial edible films or coatings has been proposed as a potential approach to prevent or minimize cross-contamination of sausages (Cagri, Ustunol, Osburn, & Ryser, 2003; Cagri, Ustunol, & Ryser, 2002; Gadang, Hettiarachchy, Johnson, & Owens, 2008; Marchiore et al., 2017; Nguyen, Gidley, & Dykes, 2008; Siripatrawan & Noipha, 2012). Natural biopolymers such as proteins, polysaccharides and lipids or mixture of them have been used to develop biodegradable coatings and films (Alemán et al., 2016). Furthermore, the use of industrial residues to form edible coatings has become popular in the recent years (Maniglia, Domingos, de Paula, & Tapia-Blácido, 2014). Turmeric (*Curcuma longa L.*) residue is a by-product obtained after supercritical fluid extraction (SFE) or pressurized liquid extraction (PLE) of curcumin and curcuminoids from turmeric rhizomes. The turmeric residue obtained is mostly composed of starch, fibers and traces of oleoresin and curcuminoids, which confers the turmeric residue great potential to be used in the preparation of edible coatings (Maniglia et al., 2014; Osorio-Tobón, Carvalho, Rostagno, Petenate, & Meireles, 2014). In Brazil, sausages are commonly wrapped using natural or artificial coatings and immersed in yellow colorant (MAPA, 2000). In that scenario, turmeric residue could be applied on sausage from an antimicrobial coating with the goal of preventing microbial cross-contamination during food handling (Maniglia et al., 2014).

During the last decade, food industries have explored the use of non-thermal processes such as ultraviolet irradiation (UV-C), ionizing radiation or hydrostatic high pressure to inactivate microorganisms or to reduce microbial cross-contamination on food, with minimal impacts on the sensorial properties of food (Bayındırlı, Alpas, Bozoğlu, & Hızal, 2006; Janisiewicz, Takeda, Glenn, Camp, & Jurick, 2015; Mukhopadhyay, Ukuku, & Juneja, 2015; Shahbaz et al., 2014; Sommers, Sheen, Scullen, & Mackay, 2017; Tawema, Han, Vu, Salmieri, & Lacroix, 2016). However, many of these non-thermal processes have disadvantages such as significant investment in specialized equipment that may limit their use on food. Thus, there is an unmet need for technologies which are safe, efficient, practical and preferably inexpensive for inactivating pathogenic microorganisms at a local food processing, handling and service facilities (Liu et al., 2016).

Among various technologies, light-mediated inactivation of microbes has emerged as a potential approach that could be implemented in various settings with low investment costs. One of the challenges with UV-C light-mediated approaches to inactivate microbes is the potential loss in organoleptic properties induced by oxidation processes triggered by UV-C radiation (Guerrero-Beltran & Barbosa-Canovas, 2004). To address this challenge few studies have evaluated the use of food grade compounds with longer wavelength light frequencies to inactivate a diversity of microorganisms (Cossu et al., 2016; Dovigo et al., 2011; Shirai, Kajjura, & Omasa, 2015; Yin et al., 2013). In this process, which is similar to the conventional photo-dynamic therapy (PDT) approach used in biomedical applications, food grade compounds such as organic acids, food grade dyes and polyphenolic compounds can generate oxidative stress species such as free radicals and singlet oxygen that can lead to microbial inactivation (Haukvik, Bruzell, Kristensen, & Tønnesen, 2009; Qian et al., 2016; Sarkar & Hussain, 2016). The use of longer wavelengths such as blue light or UV-A can reduce the photonic energy required for the light-mediated process and thus reduce any significant impact on the organoleptic properties of food (Liu et al., 2016). Many of the current studies using light-activated compounds have been conducted without the presence of food materials and are often conducted only in aqueous solutions. To the best of our knowledge, only purified food grade compounds have been used as photo-activated compounds in food-related applications (Buchovec, Lukseviciute, Marsalka, Reklaitis, & Luksiene, 2016; López-Carballo, Hernández-Muñoz, Gavara, & Ocio, 2008; Oliveira, Cossu, Tikekar, & Nitin, 2017; Penha et al., 2016; Temba, Fletcher, Fox, Harvey, & Sultanbawa, 2016; Tiwari et al., 2009; Wu et al., 2016). This could represent a potential limitation as purified compounds can add a significant cost to the process.

In this study, turmeric residue obtained after the combination of supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction processes was used to prepare antimicrobial hydrogels to inhibit bacterial cross-contamination in meat products (Maniglia, de Paula, Domingos, & Tapia-Blácido, 2015; Osorio-Tobón et al., 2014). The selection of curcumin as a photo-activated antimicrobial agent was inspired by photodynamic therapy (PDT) treatments used in oral or dental applications (Araújo, Fontana, Bagnato, & Gerbi, 2012; Dovigo et al., 2011; Paschoal et al., 2013). In contrast to biomedical applications, this study is focused on using a food-grade by-product of the curcumin extraction process for the inactivation of microorganisms on a meat surface (Sandikci Altunatmaz et al., 2016). Unlike previous studies with food-grade compounds in

aqueous solution, this study is focused on application of a photo-activated antimicrobial agent on a solid food product. To deliver curcumin from turmeric residue to a meat surface, the hydrogel was selected as a model delivery system. One of the potential advantages of the hydrogel approach are that this proposed antimicrobial treatment could be combined with edible coatings on food surfaces. These edible coatings can provide controlled release of encapsulated residual curcumin from the turmeric residue maintaining a significant concentration of the photo-activated antimicrobial compound on the surface of a meat product (Liu et al., 2016).

In this way, edible hydrogels of turmeric residue and gelatin that could be activated in combination with UV-A light, showing enhanced antimicrobial activity were prepared and characterized. In addition, hydrogels of cassava starch and gelatin supplemented with purified curcumin were prepared and characterized in order to compare with turmeric residue hydrogels which have residual curcumin naturally present. The hydrogels were used to form coatings and the UV-A light-activated antimicrobial activity of these coatings was assessed against *Listeria innocua*, a non-pathogenic surrogate for *L. monocytogenes*, at both 23°C and 4°C. The hydrogels were also applied on sausages and the ability of sausage-coated hydrogels to prevent *L. innocua* cross-contamination was evaluated. Furthermore, the possible light-mediated antimicrobial mechanisms of the hydrogel coatings were investigated by monitoring curcumin release from the hydrogels and UV-A light-mediated curcumin degradation within the hydrogels.

6.2. MATERIALS AND METHODS

6.2.1 Materials

Glycerol, curcumin and gelatin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Turmeric was supplied by Office Herbal Pharmacy Handling Ltda (Ribeirão Preto, SP, Brazil). Phosphate-buffered saline (PBS), Tryptic Soy Broth (TSB) and Tryptic Soy Agar (TSA) were obtained from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Commercial cassava starch (Bob's Red Mill[®], Milwaukie, OR, USA) and commercial sausages (Chicken Franks Foster Farms[®], Livingston, CA, USA) were purchased from local markets. The commercial sausages used in this study were 57 %, water, 28 % total fat, 12.5 % protein and 1.78 %

carbohydrate. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q filtration system (EDM Millipore; Billerica, MA, USA).

6.2.2 Hydrogel preparation

6.2.2.1 Turmeric-gelatin solution

Turmeric residue was obtained after curcuminoid extraction from turmeric by Supercritical Fluid Extraction followed by Pressurized Liquid Extraction as previously described (Osorio-Tobón et al., 2014). The resulting starch-rich turmeric residue was then ground, sieved (mesh 0.075 mm) and stored until further use. Turmeric-gelatin solution was prepared following the method described elsewhere (Maniglia et al., 2014). Firstly, aqueous starch-rich turmeric solution (5 w/w) was prepared by dispersing turmeric residue in hot water at 85 °C under magnetic agitation for 4 h (IKA Works, Wilmington, NC). During this time, the turmeric-starch solution was further homogenized every hour using a high-shear probe mixer (2 min at 12000 rpm; Ultra Turrax T25, IKA Werke, Germany). Gelatin and glycerol were then incorporated into the starch-rich turmeric solution and kept under magnetic agitation for 30 min at 70 °C. The resulting turmeric-gelatin solution was cooled down to 50 °C and further used to prepare turmeric-gelatin hydrogel coatings.

6.2.2.2 Cassava-gelatin hydrogel solution

The cassava-gelatin solution was prepared as follows. Firstly, cassava starch aqueous solution (8.4 w/w) and gelatin aqueous solution (12.0 w/w) were separately prepared at 71 °C under magnetic stirring until completely solubilized. Then, the cassava starch and the gelatin solutions were combined, glycerol was added and the mixture was homogenized at 70 °C under magnetic agitation for 30 min. The cassava-gelatin solution was cooled down to 50 °C, curcumin was added to a final curcumin concentration of approximately 150 µg/mL and the resulting cassava-gelatin solution was further used to prepare cassava-gelatin hydrogel coatings.

6.2.2.3 Turmeric-gelatin hydrogel and Cassava-gelatin hydrogel coatings

In order to prepare the hydrogel coatings, 0.5 mL of turmeric-gelatin solution or 0.5 mL of cassava-gelatin solution were placed in an individual well of a sterile 24-wells flat bottom polystyrene plate (1.56 cm of diameter) and stored at 4 °C for 30 min. The resulting turmeric-gelatin hydrogel coating and cassava-gelatin hydrogel coating were labeled TGH and CGH, respectively. Control hydrogels (K) were prepared using cassava-gelatin solutions without the addition of curcumin. The composition of the final hydrogels coatings was approximately 88 % (w/w) water, 6 % (w/w) gelatin, 1.8 % (w/w) glycerol and either 4.2 % (w/w) turmeric residue, for TGH, or 4.2 % (w/w) cassava starch, for CGH and K.

Turmeric-gelatin solution and cassava-gelatin solution were also applied on the surface of commercial sausages to produce TGH-coated sausages and CGH-coated sausages, respectively. Commercial sausages were cut to perfectly fit into an individual well from a 24-wells plate (1.85 cm of diameter and 0.5 cm of thickness). Then, the 24-wells plate containing sausages were used to prepare hydrogel-coated sausages following the same method as described above.

6.2.3 Hydrogels coatings characterization

The hydrogels coatings were characterized regarding the coating thickness, the concentration of curcumin in the final coating and the swelling behavior of the hydrogels in water. Hydrogel thickness were measured using a manual digital micrometer (Mitutoyo Co, Japan) to the nearest 0.01 mm. Thickness measurements were performed at different locations of the hydrogels and the average calculated. The concentration of curcumin in the hydrogels was evaluated through UV-Vis spectroscopy (Spectramax 340, CA, USA). Briefly, curcumin was extracted from TGH and CGH using ethanol (50 % v/v), the absorbance of the extract was determined at 425 nm and the curcumin concentration was inferred based on a standard calibration curve. The hydrogels swelling behavior in water was evaluated by monitoring the increase in hydrogel mass before and after incubation in water. Hydrogels coatings prepared inside individual wells from a 24-wells polystyrene plate were incubated with 4 mL of water for 30 min and the swelling behavior was expressed in percentage of mass increase due to water uptake.

6.2.4 Microbial culture

Listeria innocua (ATCC 33090, Manassas, VA, USA) modified with a Rifampicin resistant plasmid were supplied by Dr. Trevor Suslow from the Department of Food Science and Technology at University of California, Davis. Fresh *L. innocua* suspensions were prepared before each experiment as follows. Firstly, bacteria stored in liquid nitrogen were streaked onto TSA plates and grown overnight at 37°C. Then, a single colony of *L. innocua* was picked from the plate and cultured overnight in TSB broth containing Rifampicin 50 µg/mL at 37°C and 150 rpm until stationary phase was reached (around 7×10^9 CFU/mL). Lastly, working bacterial suspensions were prepared by serially diluting the stationary phase bacteria in sterile water to final *L. innocua* concentrations of 2×10^4 and 2×10^6 CFU/mL.

6.2.5 UV-A light chamber

The UV-A light source consisted of four UV-A lamps (320 – 400 nm; 18 W; Actinic BL, Philips, Holland) located on the inside-top of a plastic chamber. Samples were positioned at the center of the chamber, 8 cm away from the lamps. The average UV-A light intensity at the center of the chamber was 32 ± 0.2 W/m² as measured by an UV-A light meter (Model UV-340A, Lutron Electronics, Taiwan).

6.2.6 UV-A light activated antimicrobial activity of hydrogels coatings

The antimicrobial activity of TGH and CGH in combination with UV-A light were evaluated against *L. innocua*. TGH and CGH coatings were prepared on the surface of individual wells from a 24-wells polystyrene plate as described above. Then, half milliliter of a fresh *L. innocua* suspension was added to the wells containing each hydrogel coatings leading to a final bacteria concentration of 1×10^6 CFU/mL. The plate was then placed at the center of the UV-A light chamber and exposed to UV-A light for up to 30 min. After each time point, the plate was removed from the chamber, aliquots were withdrawn, serially diluted in sterile PBS and spread onto TSA plates containing Rifampicin (50 µg/mL). The plates were incubated at 37 °C for 48 h, before *L. innocua*

populations were determined by standard plating count method and expressed as colony forming unit CFU/mL. Control hydrogel coatings without curcumin (K) were used to evaluate the effect of UV-A light alone on bacterial inactivation. In addition, *L. innocua* incubated with TGH and CGH and not exposed to UV-A light were performed as dark controls.

The UV-A light activated antimicrobial activity of the hydrogels coatings was evaluated at both 23 °C and 4 °C. When the experiment was performed at 4 °C, the hydrogels and the bacterial suspension were pre-incubated at 4 °C for one hour before bacteria was added to the hydrogel coatings. The UV-A light chamber was placed inside a refrigerated room (T = 4 °C) and UV-A light exposure and further bacteria quantification was performed as described above.

6.2.7 UV-A light activated antimicrobial activity of hydrogel-coated sausages

The TGH and CGH coatings were also applied on the surface of commercial sausages and the UV-A light activated antimicrobial activity of TGH and CGH coated sausages were evaluated at 4 °C. Since UV-A light exposure of *L. innocua* suspensions on the surface of hydrogel-coated sausages were performed at refrigerated temperature, both hydrogel coatings and working bacterial suspensions were pre-incubated at 4 °C for one hour before the experiment. After pre-incubation, half milliliter of fresh *L. innocua* suspensions was added to individual wells from a 24-wells polystyrene plate containing the hydrogel-coated sausages. Two different initial bacterial loads of *L. innocua* were evaluated: 1×10^4 and 1×10^6 CFU/mL. The samples were then placed inside the UV-A light chamber at 4 °C and exposed to UV-A light for up to 30 min. After UV-A light exposure, bacterial populations were determined as described previously and expressed as CFU/mL. Sausage coated with hydrogel without curcumin (K) were used as control.

The ability of TGH and CGH coated sausages to inactivate bacteria after multiple cycles of bacterial contamination and UV-A light exposure was evaluated at 4 °C. *L. innocua* contamination of TGH and CGH coated sausages was performed as described above achieving an initial bacterial load of 1×10^4 CFU/mL. Next, the samples were exposed to UV-A light for 5 and 20 min, for CGH and TGH coatings respectively. The sample-coated sausages were then re-contaminated with 1×10^4 CFU/mL of *L.*

innocua and exposed again to UV-A light for the same period of time. A third cycle of bacterial contamination and UV-A light exposure were also performed. Sample-coated sausages were either exposed to one, two or three cycles of contamination-decontamination and bacterial count after each cycle was determined and expressed as previously described.

6.2.8 UV-A light activated antimicrobial activity of curcumin released from hydrogel coatings

The UV-A light activated antimicrobial activity of curcumin released from hydrogels were performed in order to evaluate the effect of curcumin release on the UV-A light activated antimicrobial activity of the hydrogels. Curcumin release was achieved by incubating 0.5 mL of water with either TGH or CGH for 5 and 30 min. After the incubation time, the water solution was removed from the top of the hydrogel coating and transferred to an individual well of a 24-well polystyrene plate. Half milliliter of a fresh bacterial solution was added to the solution containing curcumin released from the hydrogels giving an initial bacterial concentration of 1×10^6 CFU/mL. The samples were exposed to UV-A light at 23 °C for 5 min and the bacterial count was determined and expressed as previously described. In addition, in order to evaluate the impact of the concentration of curcumin released from the hydrogels, curcumin solutions with different concentrations were prepared, combined with *L. innocua* (final concentration of 1×10^6 CFU/mL) and exposed to UV-A light at 23 °C for 5 min.

6.2.9 Degradation of curcumin in hydrogel coatings by UV-A light irradiation

Degradation of curcumin was performed by exposing the TGH and CGH coatings to UV-A light for 5, 15 and 30 min and measuring the concentration of curcumin before and after UV-A light exposure. The concentration of curcumin was determined by extracting curcumin from the hydrogels with ethanol 50% (v/v), reading the absorbance at 425 nm with an UV-Vis spectrophotometer (Spectramax 340, CA, USA) and calculating the curcumin concentration based on a standard calibration curve. Degradation of curcumin was expressed as percentage loss of initial curcumin.


All experiments described were performed at least in triplicate and the results were evaluated using analysis of variance (ANOVA) by the software Statistic 6.0 (StatSoft Inc., USA) and the factors showing significant difference ($p \leq 0.05$) were submitted to Tukey's test.

6.3. RESULTS

6.3.1 Hydrogels characterization

In this study, the two model hydrogels were formed using turmeric residue-gelatin hydrogel (TGH) and cassava-gelatin hydrogel supplemented with purified curcumin (CGH). The physical properties of the TGH and CGH hydrogels are summarized in Figure 6.1. Curcumin concentration within the hydrogels was estimated based on the UV-VIS absorbance of the extraction solution at 425 nm and the estimated concentration varied between 129.37 ± 3.43 and 140.51 ± 3.21 $\mu\text{g/mL}$ for CGH and TGH, respectively. The hydrogels presented similar thickness, around 1.31 ± 0.14 and 1.33 ± 0.15 mm for TGH and CGH, and similar diameters, around 1.56 cm, reflecting the geometry of the mold used during preparation of both hydrogels. In addition, the hydrogels presented similar swelling in solution, where the uptake of water increased the hydrogels mass by 3.63 % and 1.08 % (w/w) for CGH and TGH, respectively.

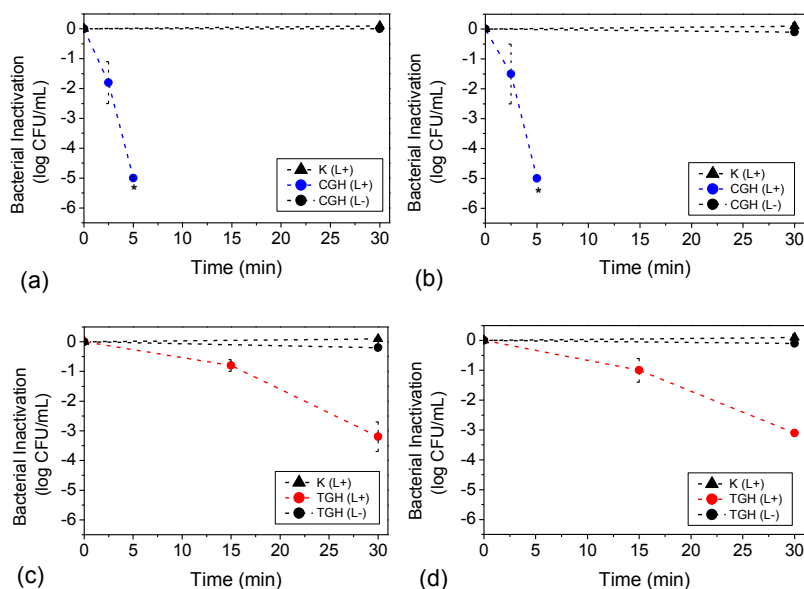
Figure 6.1. Physical properties (a) and optical images (b) of the Turmeric-Gelatin hydrogel (TGH) and the Cassava-Gelatin hydrogel (CGH). Control hydrogel (K) consists of Cassava-Gelatin hydrogel without the addition of curcumin.

(a)	TGH	CGH	(b)		K
Curcumin concentration ($\mu\text{g/mL}$)	140.51 ± 3.21	129.37 ± 3.43			TGH
Thickness (mm)	1.31 ± 0.14	1.33 ± 0.15			CGH
Diameter (cm)	1.56	1.56			
Swelling (%)	1.08 ± 0.17	3.63 ± 0.29			

6.3.2 UV-A light activated antimicrobial activity of hydrogel coatings

With the overall goal of reducing the risk of cross-contamination, this study is aimed at evaluating the UV-A light activated antimicrobial properties of CGH and TGH after coating on the surface of a sausage selected as a model system in this study. The first step was to evaluate the antimicrobial activity of the CGH and TGH without the sausage and then evaluate these materials in combination with the sausage. The antimicrobial activity of TGH and CGH against *L. innocua* under UV-A light exposure was evaluated at 23 °C and 4 °C, temperatures at which sausages are commonly stored, and the results were represented in Figure 6.2. Bacterial suspension incubated with CGH and exposed to UV-A light (L+) at 23 °C showed significant antimicrobial activity, where more than 5 log CFU/mL reduction in the initial bacterial suspension count was achieved after 5 min of UV-A light exposure (Fig. 6.2a). In contrast, bacteria incubated with TGH and exposed to UV-A light (L+) at the same temperature presented a significantly ($p < 0.05$) lower bacteria inactivation rate, where around 3 log CFU/mL reduction in the initial bacterial suspension count was observed after a considerably higher exposure time of 30 min (Fig. 6.2c). As shown in Figure 6.2b and 6.2d, the UV-A light activated antimicrobial activity of both CGH and TGH was not influenced by the temperature change from 23 °C to 4 °C, illustrating that this treatment process can be conducted both at room temperature and refrigerated conditions. When *L. innocua* were incubated with CGH and TGH without UV-A light exposure (L-), no bacterial inactivation was observed. In addition, there was no reduction in bacterial count for *L. innocua* cells incubated with curcumin-free hydrogels (K) and exposed to UV-A light (L+). These results suggest that both the presence of curcumin and UV-A light exposure are necessary to achieve rapid inactivation of *L. innocua*.

Figure 6.2. Inactivation of *Listeria innocua* incubated on Turmeric-Gelatin hydrogel (TGH) or on Cassava-Gelatin hydrogel (CGH) and exposed (L+) or not exposed (L-) to UV-A light at 23 °C and 4 °C. (a) and (b) represent CGH at 23 °C and at 4°C, respectively; (c) and (d) represent TGH at 23 °C and at 4 °C, respectively. Control hydrogel (K) consists of Cassava-Gelatin hydrogel without the addition of curcumin. Initial bacterial load was 6 log CFU/mL. * The limit of detection was 5 log CFU/mL of bacterial inactivation.

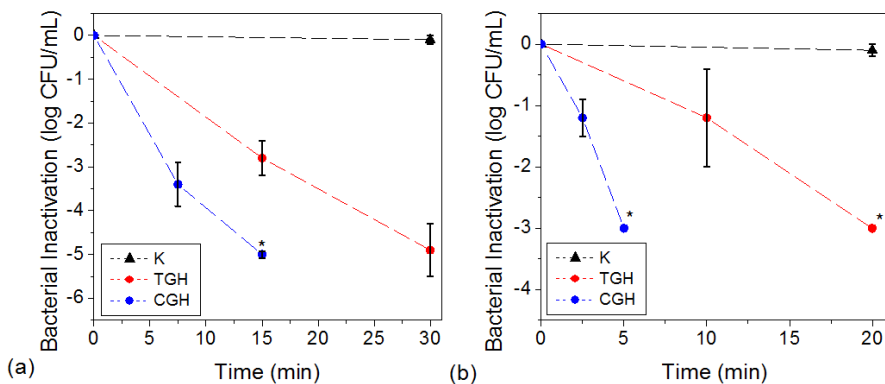


6.3.3 UV-A light activated antimicrobial activity of hydrogel-coated sausages

After validating antimicrobial activity of CGH and TGH, the hydrogels were coated on sausage samples and incubated with a bacterial suspension. Inactivation of incubated bacteria on coated sausage was evaluated using the experimental approaches described in the Materials and Methods (Section 6.2.6). UV-A light exposure reduced the initial load of bacteria on CGH coated sausage from 6 log CFU/mL and 4 log CFU/mL to below the detection limit (less than 1 CFU/mL) after 15 min and 5 min of treatment. In the case of TGH coated sausages, 30 min and

20 min of UV-A light reduced the initial load of bacteria on TGH coated sausage from 6 log CFU/mL and 4 log CFU/mL, respectively, to below the detection limit (less than 1 CFU/mL). Sausages coated with curcumin-free hydrogel (K) and exposed to UV-A light presented no reduction in the initial bacterial load of 6 log CFU/mL and 4 log CFU/mL.

Figure 6.3. Inactivation of *Listeria innocua* incubated on sausage-coated Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) or on sausage-coated Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) and exposed to UV-A light at 4 °C. Initial bacterial load was (a) 6 log CFU/mL and (b) 4 log CFU/mL. Control hydrogel (K) consists of Cassava-Gelatin hydrogel without the addition of curcumin. * The limit of detection was (a) 5 log CFU/mL of bacterial inactivation and (b) 3 log CFU/mL of bacterial inactivation.

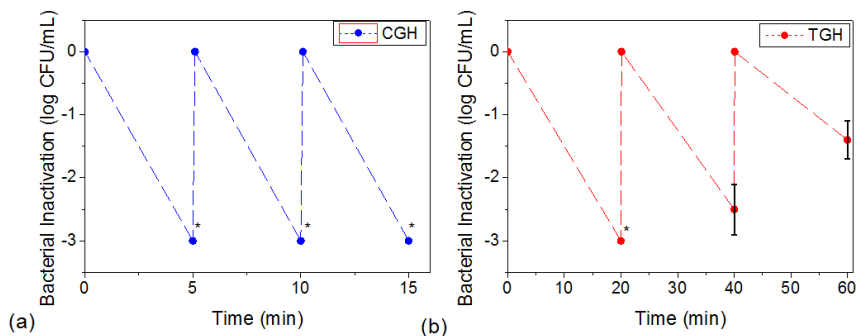


6.3.4 Antimicrobial activity of hydrogel-coated sausages exposed to multiple cycles of UV-A light

In the next step, our goal was to evaluate the potential of CGH and TGH coated sausages to inactivate *L. innocua* with multiple cycles of bacterial contamination in the presence of UV-A light (Fig. 6.4). CGH-coated sausages were able to inactivate more than 3 log CFU/mL of bacteria after each 5 min UV-A light exposure cycle, presenting excellent antimicrobial activity even after 3 cycles of bacterial suspension incubation with CGH coated sausage. In contrast, TGH-coated sausages presented a progressive decrease in antimicrobial activity after each 20 min UV-A light exposure cycle, achieving bacterial inactivation of more than 3 log CFU/mL after the first incubation cycle, 2.5 ± 0.3 log CFU/mL

after the second incubation cycle and 1.4 ± 0.3 log CFU/mL after the third incubation cycle.

Figure 6.4. Multiple inactivation cycles of *Listeria innocua* incubated on (a) sausage-coated Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) or (b) sausage-coated Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) and exposed to UV-A light at 4 °C. Initial bacterial load was 4 log CFU/mL. * The limit of detection was 3 log CFU/mL of bacterial inactivation.

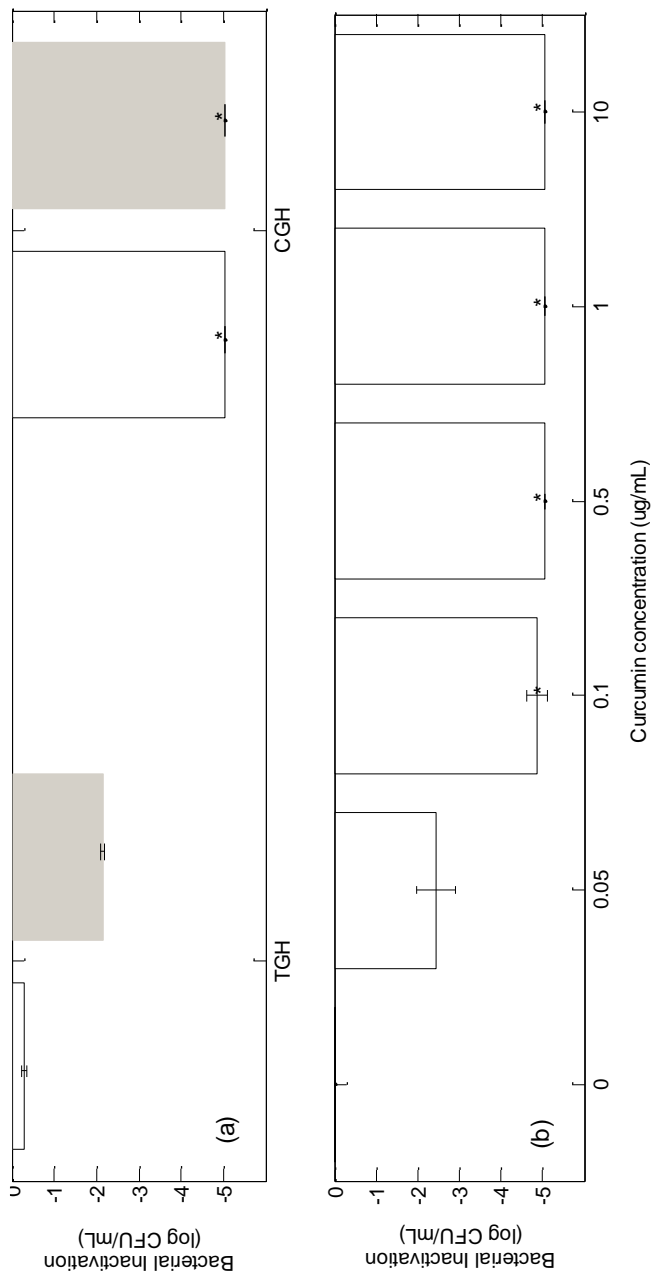


6.3.5 UV-A light activated antimicrobial activity of curcumin released from hydrogel coatings

One of the potential mechanisms for the antimicrobial activity of the hydrogel coatings could be related to the release of curcumin from the hydrogel upon contact with solution containing bacteria. CGH and TGH hydrogels were incubated with aqueous solution for fixed periods of time. The aqueous solutions were then incubated with bacteria (initial concentration of 6 log CFU/mL) and exposed to UV-A light as described in the Materials and Methods (Section 6.2.8) and the results were represented in Figure 6.5. In the case of CGH, fraction of curcumin released after 5 min of incubation of CGH with aqueous solution was sufficient to inactivate more than 5 log CFU/mL of *L. innocua* after UV-A light exposure. In the case of TGH, fraction of curcumin released from TGH to solution after 30 min of incubation was able to inactivate only 2.1 ± 0.2 log CFU/mL of bacteria after UV-A light exposure for the same time interval as in the case of CGH. The concentration of curcumin released from the hydrogels was also evaluated using UV-Vis spectroscopy. The concentration levels of curcumin released from CGH and TGH were lower than the detection limit of a UV-Vis spectrometer

(detection limit was around 50 $\mu\text{g/mL}$; data not shown). In order to overcome the detection limit issue and to infer on the concentration of curcumin released from both hydrogels, UV-A light-exposed curcumin solutions (0.05 to 10 $\mu\text{g/mL}$) were evaluated against 6 log CFU/mL of *L. innocua* and the results expressed in Figure 6.5b. It was observed that curcumin concentrations as low as 0.05 $\mu\text{g/mL}$ was enough to inactivate 2.4 ± 0.5 log CFU/mL of bacteria while more than 5 log CFU/mL reduction in bacterial count could be achieved by only 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of curcumin. It can be inferred that CGH releases at least 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of curcumin to solution after 5 min of release time, while curcumin released from TGH is not more than 0.05 $\mu\text{g/mL}$ even after 30 min of release time. Together, these results suggest that release of curcumin from the hydrogels can result in inactivation of bacteria in the presence of UV-A light and also that the CGH releases curcumin faster than TGH, resulting in the enhanced antimicrobial activity of CGH in the presence UV-A light as compared to TGH.

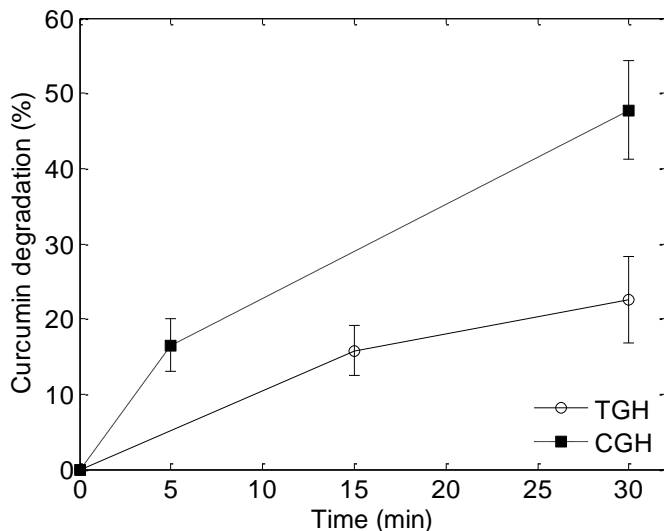
Figure 6.5. (a) Inactivation of *Listeria innocua* incubated with curcumin released from Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) and Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) and exposed to 5 min of UV-A light. Release of curcumin from hydrogels to water were conducted for 5 (white) and 30 (gray) min before *L. innocua* incubation and UV-A light exposure. (b) Inactivation of *Listeria innocua* incubated with different curcumin concentrations and exposed to 5 min of UV-A light. For (a) and (b) the initial bacterial load was 6 log CFU/mL and * the limit of detection was 5 log CFU/mL of bacterial inactivation.



6.3.6 Degradation of curcumin after hydrogel exposure to UV-A light

In order to evaluate the UV-A light oxidative effect on the curcumin encapsulated within the hydrogels, the degradation of curcumin from CGH and TGH after UV-A light exposure was monitored and the results are shown in Figure 6.6. CGH presented faster curcumin degradation than TGH, where 16 e 47 % of the initial curcumin concentration was degraded from CGH after 5 and 30 min of UV-A light exposure, respectively. In contrast, TGH exposure to UV-A light for 15 and 30 min led to curcumin degradation of 11 and 22 %, respectively, suggesting that TGH offers a protective effect against light mediated degradation of encapsulated curcumin as compared to CGH.

Figure 6.6. Degradation of curcumin present in the Cassava-Gelatin Hydrogel (CGH) and the Turmeric-Gelatin Hydrogel (TGH) after exposure to UV-A light for 5, 15 and 30 min.



6.4. DISCUSSION

6.4.1 CGH and TGH coatings act as a carrier for the delivery of curcumin

Light exposure of curcumin has been reported to present strong antimicrobial properties against a variety of microorganism, including bacteria, viruses, fungi and spores (Dovigo et al., 2011; Haukvik et al., 2009; Randazzo, Aznar, & Sánchez, 2016; Temba et al., 2016; Tortik, Spaeth, & Plaetzer, 2014). It has been suggested that curcumin acts a photosensitizer, which upon excitation by a light source can generate reactive oxygen species (ROS) in solution that can lead to microbial inactivation (Bernd, 2014; Haukvik et al., 2009). The results show that TGH and CGH coatings exposed to UV-A light could lead to rapid inactivation of *L. innocua* (Fig. 6.2). Furthermore, the results illustrate that exposure of bacterial cells to a combination of UV-A and curcumin released from the TGH or CGH (Fig. 6.5.6a) resulted in reduction of bacterial count similar to the UV-A light exposure of bacterial cells incubated directly on the surface of the hydrogels (Fig. 6.5.2a and 6.5.2c). This observation suggests that the observed antimicrobial activity of these hydrogels is due to the release of curcumin to solution from the hydrogels and subsequent UV-A light excitation of these molecules.

TGH and CGH coatings, despite having similar initial concentration of curcumin, presented very different light mediated antimicrobial activity against *L. innocua*. The higher antimicrobial efficacy of CGH over TGH could be attributed to differences in the release of curcumin from CGH and TGH over the same period of time. The observed differences in curcumin release between both matrices could be related to the structure of the hydrogels. While CGH was mainly consisted of cassava starch and gelatin with added purified curcumin encapsulated into the polymeric matrix, the turmeric residue used in the preparation of TGH consisted of a starch and cellulose-based fibrous array with residual curcumin naturally entrapped in the matrix (Kuttigounder, Lingamallu, & Bhattacharya, 2011; Leonel, Sarmiento, & Cereda, 2003). The starch turmeric residue have been reported to present a rough and porous structure with a higher degree of crystallinity after gelatinization than cassava starch (Hmar, Kalita, & Srivastava, 2017; Kuttigounder et al., 2011). These fibrous and crystalline starch domains present in the composition of TGH could strongly bind to curcumin and hinder the release of curcumin to solution. In addition, the compact structure of TGH could also be responsible for the lower swelling of TGH in water and for the lower light mediated degradation of curcumin as compared to CGH, highlighting the protective effect of the turmeric matrix on the entrapped curcumin molecules.

6.4.2 UV-A light exposure of sausages coated with CGH and TGH reduced cross-contamination load of bacteria

Edible antimicrobial coatings developed using natural sources and activated by physical stresses such as light and pressure could present a new and promising strategy to reduce microbial contamination in ready-to-eat foods (Acevedo-Fani, Salvia-Trujillo, Rojas-Graü, & Martín-Belloso, 2015; Alkan & Yemenicioğlu, 2016; Guo, Jin, Wang, Scullen, & Sommers, 2014). Chitosan coatings infused with mandarin essential oil and applied on green beans have been reported to present strong antimicrobial activity against *L. innocua* when combined with high pressure treatments, highlighting the potential of combining natural antimicrobial agents and physical stresses (Donsì et al., 2015). In addition to high pressure, some light-activated antimicrobial coatings have also been reported. Strawberries dip-coated with chitosan and chlorophyllin have been shown to inactivate up to 2.2 log CFU/g of gram-negative bacteria when exposed to LED light (Buchovec et al., 2016). In addition, chlorophyllin-based gelatin coatings on sausages were reported to inactivate between 1 and 2 log CFU/mL of *S. aureus* and *L. monocytogenes* after exposure to light (López-Carballo et al., 2008).

In this manuscript, we developed coatings entirely from natural materials (starch, turmeric residue and gelatin) that were successfully coated on the surface of ready-to-eat sausages. These coatings demonstrated significant light-activated antimicrobial activity against *L. innocua*, a surrogate of *L. monocytogenes*. CGH-coated sausages presented rapid inactivation of high loads of *L. innocua* where more than 5 log CFU/mL of bacterial inactivation were achieved after 15 min of UV-A light exposure at 4 °C. Such strong antimicrobial action at low temperature is very important due to the ability of *Listeria* to grow under refrigerated conditions (Buchanan et al., 2017). Furthermore, CGH-coated sausages were able to inactivate bacteria even after multiple cycles of bacterial contamination and UV-A light mediated decontamination, indicating that CGH-coated sausages presented sustainable release of curcumin to the bacterial suspension that could be activated via light exposure. Therefore, light-activated curcumin-loaded coatings may be an excellent alternative to rapid inactivate cross-contaminated bacteria at different stages of post processing handling of ready-to-eat sausage products.

6.4.3 Coated substrate influences the release of curcumin and the light-activated antimicrobial activity of CGH and TGH coatings

Interestingly, the light-mediated antimicrobial activity of the hydrogel coatings reported in this study varied depending on the coated surface. TGH-coated sausages presented higher light-activated antimicrobial activity than plastic-coated TGH, where the time required to inactivate 3 log CFU/mL of bacteria decreased from 30 to 15 min (Fig. 6.5.2d and Fig. 6.5.3a). On the other hand, CGH light-activated antimicrobial activity was reduced when CGH was coated onto sausage surfaces, in which 15 min of light treatment were required to inactivate more than 5 log CFU/mL of bacteria in contrast to 5 min of light treatment for sausage-free CGH (Fig. 6.5.3a and Fig. 6.5.2b). Those differences in light-activated antimicrobial activity are probably related on how the presence of sausage interferes with the release of curcumin to solution. From one viewpoint, the fat-rich sausage composition may present a more attractive environment for the diffusion of hydrophobic curcumin from the hydrogels, creating a balance between the release of curcumin to the aqueous solution and the release of curcumin to the sausage substrate. Although that hypothesis would help explain the decrease in light-activated antimicrobial activity of CGH-coated sausages, it does not explain the increase of bacterial inactivation by TGH-coated sausages. From another perspective, hydrophobic molecules (i.e. fatty acids) could be diffusing from the sausage surface into the TGH coating, permeating through the hydrophobic and crystalline domains of the turmeric-starch matrix and leading to the solubilization of curcumin molecules that were strongly bond to the compact turmeric residue structure. These freed curcumin molecules now present in an oil phase could be more easily released into the aqueous phase. This phenomena would not provide a sustainable release of curcumin to the aqueous phase since diffusion of curcumin to the sausage substrate would still be more favorable, but instead would lead to an initial burst release of curcumin that would explain the increase in light-activated antimicrobial activity of TGH-coated sausages. It is important to highlight that the concentration of curcumin in solution required to inactivate high loads of *L. innocua* is very small (less than 0.1 µg/mL; Fig. 6.5b) and therefore very small changes in released curcumin could present a strong effect on the light-activated antimicrobial activity of the hydrogels. In fact, the decrease in light-activated antimicrobial activity after the first cycle of bacterial

inactivation (Fig. 6.4b) suggests that the increased burst release of curcumin from TGH-coated sausages was very small and not constant over time. Overall, these results illustrate the importance of understating the surface properties of food substrates in order to design effective coatings.

6.4.4 Potential of turmeric residue-based antimicrobial coatings

Despite the inferior performance of TGH as compared to CGH regarding the rapid inactivation of high initial loads of bacteria, it is important to highlight the potential of using turmeric residue for the preparation of antimicrobial edible hydrogel coatings. Due to its complex and fibrous composition, turmeric residue may be used to develop coatings presenting desirable mechanical properties, lower water affinity and increased protective effects against light mediated degradation of curcumin. Furthermore, the compact structure of turmeric coatings could lead to a slow sustained release of curcumin and curcuminoids to solution. The described characteristics of turmeric residue suggest that it could be an excellent wall material alternative not only for the encapsulation of curcumin and curcuminoids but also for the encapsulation of other bioactive compounds, especially hydrophobic compounds (Malacrida, Ferreira, Zuanon, & Nicoletti Telis, 2015).

Another major advantage of turmeric residue-based coatings is the residual curcumin naturally present in turmeric, which could avoid encapsulation of additional curcumin into the coating. Turmeric residue-based coatings could be also further optimized by using turmeric residues with slightly higher concentrations of curcumin, since the residue used in this study was obtained after two consecutive extractions of curcuminoids and presented very low concentration of curcumin (Osorio-Tobón et al., 2014). In addition, different experimental strategies could be used during the preparation of turmeric-based coating in order to tweak the properties of the coatings for a desired application, such as the addition of surfactants and hydrophilic biopolymers to improve the release of curcumin (Paula, Oliveira, Carneiro, & de Paula, 2016; Ratanajijaroen, Watthanaphanit, Tamura, Tokura, & Rujiravanit, 2012).

Lastly, since turmeric and curcumin are natural food-grade compounds, curcumin-loaded turmeric residue-based antimicrobial coatings could meet the current and growing demand from consumers and food industries to replace synthetic-based preservatives for food-grade

natural antimicrobials in food systems (Oms-Oliu et al., 2010; Tiwari et al., 2009).

6.5. CONCLUSIONS

The present study demonstrated that the combination of UV-A light and curcumin-loaded edible coatings can be used as an antimicrobial approach to inactivate *L. innocua*, preventing cross-contamination on coated sausages. Although hydrogel coatings containing added purified curcumin (CGH) presented higher antimicrobial efficacy, turmeric residue-based coatings were also effective in reducing *L. innocua* load on the surface coated-sausages. Furthermore, the light-mediated antimicrobial activity of the hydrogels coatings was not affected at refrigerated temperature (4 °C), suggesting that the proposed antimicrobial coatings approach could be applied to refrigerated foods. Moreover, it was shown that light-activation of curcumin molecules released from the coatings to solution was the main mechanism behind bacteria inactivation and that the release of low concentrations of curcumin are sufficient to show antimicrobial activity against *L. innocua*. In conclusion, turmeric residue obtained after two extraction processes (SFE and PLE) can still be used to prepare hydrogels that can present high antimicrobial activity when combined with UV-A light, suggesting that these hydrogels can be applied as edible coatings to inhibit bacterial cross-contamination in sausages.

FUNDING INFORMATION

This project was supported by Agriculture and Food Research Initiative grant no. 2014-67017-21642 from the USDA National Institute of Food and Agriculture (USDA-NIFA) Program in Improving Food Quality (A1361) and grant no. 2015-68003-23411 from the USDA-NIFA Program Enhancing Food Safety through Improved Processing Technologies (A4131). CAPES/BR supported this work through the “Science without Borders” scholarship program (recipient n° 11897-13-9) for Erick F. de Oliveira. Scholarship was supported by CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasilia, DF, Brazil process number 99999.006818/2015-03 for Juliano V. Tosati.

6.6. Reference

ACEVEDO-FANI, A. et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168–177, maio 2015.

ALEMÁN, A. et al. Comparative study between film and coating packaging based on shrimp concentrate obtained from marine industrial waste for fish sausage preservation. **Food Control**, v. 70, p. 325–332, dez. 2016.

ALKAN, D.; YEMENICIOĞLU, A. Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 1–10, abr. 2016.

ARAÚJO, N. C. et al. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 7, p. 393–399, 13 jun. 2012.

BAYINDIRLI, A. et al. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. **Food Control**, v. 17, n. 1, p. 52–58, jan. 2006.

BERND, A. Visible light and/or UVA offer a strong amplification of the anti-tumor effect of curcumin. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 183–189, 1 mar. 2014.

BRASILEIRO, I. S. et al. Use of growth inhibitors for control of *Listeria monocytogenes* in heat-processed ready-to-eat meat products simulating post-processing contamination. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 7–13, dez. 2016.

BUCHANAN, R. L. et al. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1–13, maio 2017.

BUCHOVEC, I. et al. Effective photosensitization-based inactivation of Gram (–) food pathogens and molds using the chlorophyllin–chitosan complex: towards photoactive edible coatings to preserve strawberries. v. 15, n. 4, p. 506–516, 13 abr. 2016.

CAGRI, A. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on hot dogs using antimicrobial whey protein-based edible casings. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 291–299, 1 jan. 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2317–2324, 1 ago. 2002.

COSSU, A. et al. Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh produce wash water and biofilm. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 37, Part A, p. 44–52, out. 2016.

DONSÌ, F. et al. Green beans preservation by combination of a modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing. **Postharvest Biology and Technology**, v. 106, p. 21–32, ago. 2015.

DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 1 jul. 2011.

GADANG, V. P. et al. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and edta on a turkey frankfurter system. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, p. M389–M394, 1 out. 2008.

GIAOURIS, E. et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, Advancing Beef Safety through Research and Innovation: Prosafebeef. v. 97, n. 3, p. 298–309, jul. 2014.

GUERRERO-BELTRAN, J. A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Advantages and limitations on processing foods by UV light. **Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 10, n. 3, p. 137–147, 1 jun. 2004.

GUO, M. et al. Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. **Food Control**, v. 40, p. 64–70, jun. 2014.

HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 10, p. 666–673, 1 out. 2009.

HMAR, B. Z.; KALITA, D.; SRIVASTAVA, B. Optimization of microwave power and curing time of turmeric rhizome (*Curcuma Longa* L.) based on textural degradation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, Part A, p. 48–56, mar. 2017.

JANISIEWICZ, W. J. et al. Dark period following UV-C treatment enhances killing of *Botrytis cinerea* conidia and controls gray mold of strawberries. **Phytopathology**, v. 106, n. 4, p. 386–394, 29 dez. 2015.

KUTTIGOUNDER, D.; LINGAMALLU, J. R.; BHATTACHARYA, S. Turmeric powder and starch: selected physical,

physicochemical, and microstructural properties. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. C1284–C1291, 1 nov. 2011.

LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; CEREDA, M. P. New starches for the food industry: *Curcuma longa* and *Curcuma zedoaria*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 3, p. 385–388, nov. 2003.

LIU, F. et al. Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. **Food Hydrocolloids**, ago. 2016a.

LIU, F. et al. The effect of a novel photodynamic activation method mediated by curcumin on oyster shelf life and quality. **Food Research International**, v. 87, p. 204–210, set. 2016b.

LÓPEZ-CARBALLO, G. et al. Photoactivated chlorophyllin-based gelatin films and coatings to prevent microbial contamination of food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1–2, p. 65–70, 15 ago. 2008.

MAGALHÃES, R. et al. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. **Food Microbiology**, v. 57, p. 103–108, ago. 2016.

MALACRIDA, C. R. et al. Freeze-drying for microencapsulation of turmeric oleoresin using modified starch and gelatin. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1710–1719, 1 dez. 2015.

MANIGLIA, B. C. et al. Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269–277, maio 2014.

MANIGLIA, B. C. et al. Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization of turmeric film plasticized with glycerol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1187–1195, dez. 2015.

MAPA. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha (Instrução Normativa no. 04, de 31 março de 2000)**, 2000. Disponível em: <http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/carnes_salsicha.htm>. Acesso em: 31 out. 2016

MARCHIORE, N. G. et al. Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages. **LWT - Food Science and Technology**, SLACA 2015: “Food Science for quality of life and health ageing” Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. v. 76, Part B, p. 203–208, mar. 2017.

MUKHOPADHYAY, S.; UKUKU, D. O.; JUNEJA, V. K. Effects of integrated treatment of nonthermal UV-C light and different antimicrobial wash on *Salmonella enterica* on plum tomatoes. **Food Control**, v. 56, p. 147–154, out. 2015.

NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 471–478, maio 2008.

OLIVEIRA, E. F. DE et al. Enhanced antimicrobial activity based on a synergistic combination of sub-lethal levels of stresses induced by uv-a light and organic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM.00383–17, 31 mar. 2017.

OMS-OLIU, G. et al. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 139–148, set. 2010.

OSORIO-TOBÓN, J. F. et al. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, nov. 2014.

PASCHOAL, M. A. et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 313–319, set. 2013.

PAULA, H. et al. Matrix effect on the spray drying nanoencapsulation of lippia sidoides essential oil in chitosan-native gum blends. **Planta Medica**, 25 maio 2016.

PENHA, C. B. et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–5, 2016.

QIAN, T. et al. Transient spectra study on photo-dynamics of curcumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 166, p. 38–43, 5 set. 2016.

RANDAZZO, W.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of norovirus surrogates. **Food and Environmental Virology**, v. 8, n. 4, p. 244–250, 1 dez. 2016.

RATANAJAJAROEN, P. et al. Release characteristic and stability of curcumin incorporated in β -chitin non-woven fibrous sheet using Tween 20 as an emulsifier. **European Polymer Journal**, v. 48, n. 3, p. 512–523, mar. 2012.

SANDIKCI ALTUNATMAZ, S. et al. Antimicrobial effects of curcumin against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 pathogens in minced meat. **Veterinární Medicína**, v. 61, n. No. 5, p. 256–262, 15 jul. 2016.

SARKAR, T.; HUSSAIN, A. Photocytotoxicity of Curcumin and its Iron Complex. v. 5, n. 1, 2016.

SHAHBAZ, H. M. et al. Chemical and sensory quality of fresh pomegranate fruits exposed to gamma radiation as quarantine treatment. **Food Chemistry**, v. 145, p. 312–318, 15 fev. 2014.

SHIRAI, A.; KAJIURA, M.; OMASA, T. Synergistic photobactericidal activity based on ultraviolet-A irradiation and ferulic acid derivatives. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 6, p. 1422–1428, 1 nov. 2015.

SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 102–108, maio 2012.

SOMMERS, C. et al. Inactivation of *Staphylococcus saprophyticus* in chicken meat and purge using thermal processing, high pressure processing, gamma radiation, and ultraviolet light (254 nm). **Food Control**, v. 75, p. 78–82, maio 2017.

TAWEMA, P. et al. Antimicrobial effects of combined UV-C or gamma radiation with natural antimicrobial formulations against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and total yeasts/molds in fresh cut cauliflower. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 451–456, jan. 2016.

TEMBA, B. A. et al. Inactivation of *Aspergillus flavus* spores by curcumin-mediated photosensitization. **Food Control**, v. 59, p. 708–713, jan. 2016.

TIWARI, B. K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 22 jul. 2009.

TORTIK, N.; SPAETH, A.; PLAETZER, K. Photodynamic decontamination of foodstuff from *Staphylococcus aureus* based on novel formulations of curcumin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 10, p. 1402–1409, 17 set. 2014.

WU, J. et al. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 34–39, set. 2016.

YIN, R. et al. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 731–762, out. 2013.

CAPÍTULO. 7 CONCLUSÕES FINAIS

O resíduo de cúrcuma utilizado no presente trabalho, mostrou-se adequado para a produção de uma blenda de cúrcuma e gelatina em que apresentaram apropriadas características mecânicas e térmicas para revestimento em salsichas. O revestimento comestível quando aplicado em salsichas foi capaz de retardar o crescimento microbiano sem alterar as propriedades físico-químicas do produto quando comparado ao controle sem revestimento.

A liberação de curcumina naturalmente presente (resíduo de cúrcuma e gelatina), e à curcumina pura adicionada (amido de mandioca e gelatina) não mostraram diferenças no coeficiente de difusão nos meios simulantes testados. O resultado de liberação da curcumina nas soluções etanólicas foi o contrário do imaginado e de muitos trabalhos encontrados da literatura. O resultado esperado era que a liberação acontecesse mais rapidamente em solução etanólica 90% do que em 50%, devido a maior solubilidade da curcumina, porém mostrou-se à necessidade de uma maior concentração de água para ocorrer o intumescimento e enfraquecimento da matriz polimérica para liberar a curcumina.

Nos testes realizados pela técnica FRAP, à curcumina apresentou baixa mobilidade nos filmes secos, úmidos e em contato com óleo. Com isso, demonstra que à curcumina permanecerá no filme ou revestimento comestível, quando aplicado no alimento independente de sua característica (desidratado, oleoso e alto teor de água).

Nos ensaios de migração foram observados que os filmes comestíveis liberaram menos curcumina que os revestimentos comestíveis para salsicha. Além disso, a curcumina não apresentou perfil difusional na salsicha mesmo em altas concentrações utilizadas no trabalho. Isso sugere que no ensaio realizado somente aconteceu solubilidade da curcumina na superfície da salsicha, pois o óleo presente na salsicha está indisponível para difusão da curcumina para o interior do alimento, devido ao processo de emulsificação.

A aplicação da luz UV-A na superfície dos revestimentos comestíveis ativou a capacidade antimicrobiana da curcumina contra *L. innocua* tanto para curcumina naturalmente presente quanto adicionada quando aplicados nas salsichas e apresentaram equivalente efetividade na redução de *L. innocua*. A liberação de curcumina do revestimento para a solução foi sugerido como o principal mecanismo de inativação bacteriana independente da temperatura utilizada. Os resultados dos testes *in vitro* demonstraram que baixa concentração de curcumina foi suficiente

para alcançar significantes reduções da carga microbiana quando expostos à luz UV-A. Entretanto, quando incorporada ou naturalmente presente nos revestimentos comestíveis, a baixa concentração de curcumina não foi suficiente para inativar bactérias no interior do produto estudado apenas na superfície do mesmo.

Sendo assim, essa tese conclui que o revestimento comestível de resíduo de cúrcuma e gelatina não tem curcumina suficiente para inativar bactérias e que a desaceleração do crescimento microbiano na salsicha foi devido a propriedade de barreira do revestimento comestível. Com isso, uma alternativa para obter inativação bacteriana do revestimento foi a utilização de luz UV-A, que é capaz de ativar atividade antimicrobiana da curcumina, em baixas concentrações, para prevenir e reduzir a contaminação cruzada. Contudo, mais estudos devem ser realizados na área de tratamento fotodinâmico afim de compreender os parâmetros que tem maior influência.

7.1. Sugestões para trabalhos seguintes

- Utilizar sonda ultrassônica para reduzir o tempo de preparo da solução da cobertura do resíduo de cúrcuma, afim de manter uma maior concentração de curcumina;
 - Encapsular a curcumina para utilizar na elaboração de filmes ou revestimentos para obter uma maior difusão para o alimento;
 - Estudar a aplicação da terapia fotodinâmica para higienização de frutas e hortaliças ou eliminar tratamento térmico de algum processo para inativação microbiana;
 - Realizar estudo na área de tratamento fotodinâmico afim de compreender os parâmetros que tem maior influência no efeito antimicrobiano da curcumina.
- Controlar diferentes intensidades e tempos de exposição à luz para determinar qual o parâmetro de maior influência;

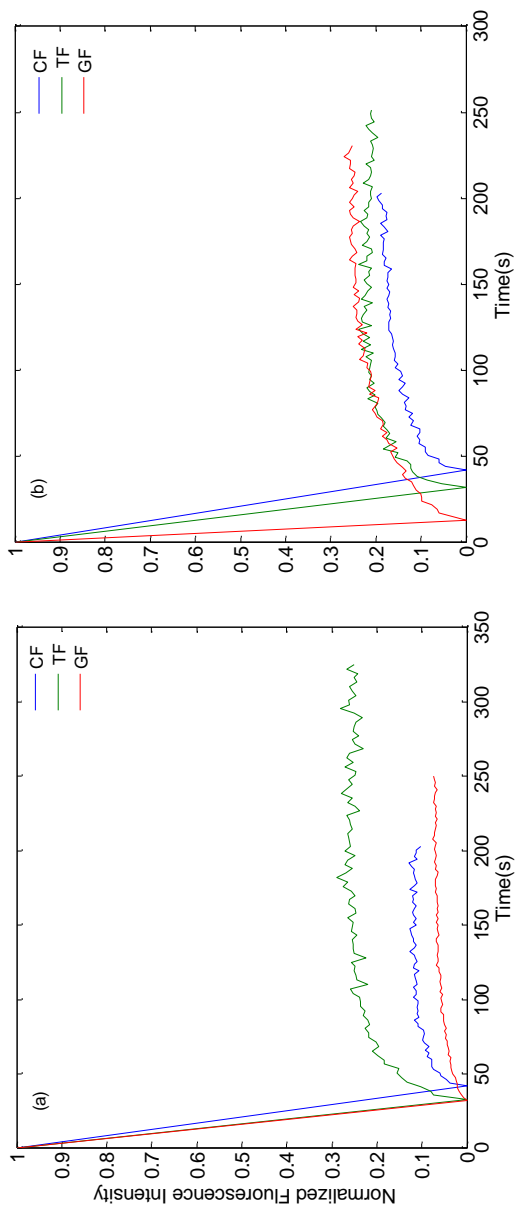
CAPÍTULO. 8 APÊNDICE 1

8.1. Resultados e discussão complementares

8.1.1 FRAP dos filmes em matriz polimérica elaborados separadamente.

Foi realizado a análise do coeficiente de difusão pela técnica FRAP dos polímeros produzidos separadamente, afim de compreender em qual das matrizes a curcumina tem maior mobilidade. A Figura 8.1 demonstra o gráfico da intensidade normalizada pelo tempo para os filmes secos e em contato com uma gota de óleo. Observa-se na Figura 8.1a que os filmes TF e CF têm um comportamento exponencial com rápida recuperação da fluorescência até alcançar o equilíbrio, enquanto o GF apresenta um comportamento linear. Além disso, o TF foi o que apresentou maior recuperação de intensidade. Com relação a Figura 8.2b nota-se que os três filmes exibem o mesmo comportamento exponencial quando em contato com a gota de óleo, obtendo quase os mesmos valores de recuperação de intensidade. Entretanto, os filmes adicionados de curcumina obtiveram uma melhor recuperação da intensidade quando adicionado óleo na superfície do que os filmes secos.

Figura 8.1. Curva de intensidade normalizada pelo tempo para os filmes em diferentes condições no experimento FRAP. a) seco; b) óleo.



CF- Filme de amido de mandioca adicionado curcumina; TF- Filme de cúrcuma- GF- Filme de gelatina adicionado de curcumina.

A Tabela 8.1 apresenta os resultados dos coeficientes de difusão e mobilidade da curcumina em cada um dos polímeros. A análise estatística apresenta que na condição dos filmes secos o coeficiente de difusão do amido tem diferença significativa ($p \leq 0.05$) com relação ao filme de gelatina, enquanto os filmes com óleo não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$). Para o resultado da porcentagem móvel da curcumina nas matrizes, observa-se que quando a curcumina é adicionada (CF e GF) ocorre um aumento da mobilidade, por outro lado, diminui na matriz aonde ela está naturalmente presente.

Tabela 8.1. Dados de coeficiente de difusão e mobilidade da curcumina dos filmes elaborados separadamente.

Filme Condiç ões	TF x 10 ⁻¹² m ² /s	Mobilid ade (%)	CF x 10 ⁻¹² m ² /s	Mobilid ade (%)	GF x 10 ⁻¹² m ² /s	Mobilid ade (%)
Seco	2.5 ^{aA} ±0.75	24.96	2.23 ^{aA} ±0.92	10.28	0.48 ^{bA} ±0.15	7.43
Óleo	1.07 ^{aB} ±0.37	21.04	0.89 ^{aB} ±0.27	18.64	0.60 ^{aA} ±0.26	25.15

CF- Filme de amido de mandioca adicionado curcumina; TF- Filme de cúrcuma- GF- Filme de gelatina adicionado de curcumina. Médias acompanhadas pela mesma letra em minúsculo, na mesma linha e pela mesma letra em maiúsculo na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

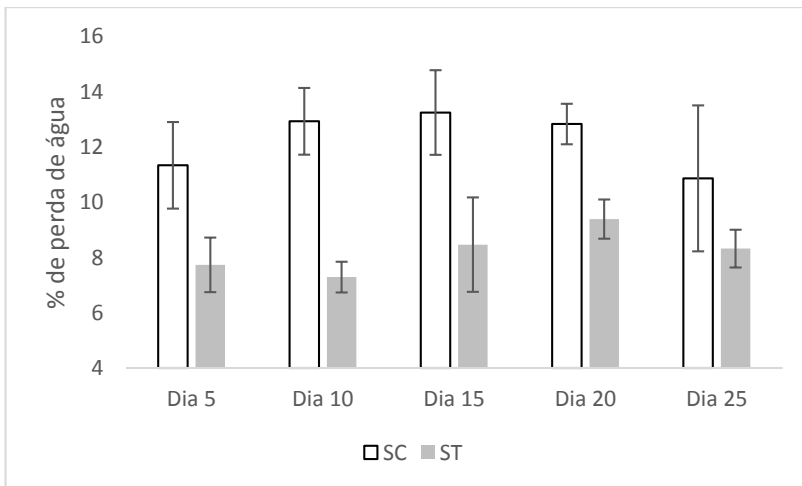
Os maiores valores encontrados para o coeficiente de difusão da curcumina dos filmes de amido em relação ao filme de gelatina podem ser devido a diferença de estrutural. A gelatina apresenta em sua estrutura grupamentos aminas (NH₂) e os amidos grupamentos hidroxilas (OH). Dessa maneira, durante o processo de secagem dos filmes, a curcumina pode ligar-se com os diferentes grupamentos pela ponte de hidrogênio. Entretanto, uma ligação com o grupamento amina é mais forte que com grupamento hidroxilo, pois a ligação covalente O-H é mais fraca que a ligação covalente N-H. Sendo assim, a ligação H₂N-H da gelatina é mais estável que a ligação R-CO-H do amido (WRIGHT; INGOLD, 2000; TONGDEESOONTORN et al., 2012; RATANAVARAPORN; KANOKPANONT; DAMRONGSAKKUL, 2013; PANG et al., 2014). Além disso, nos resultados apresentados no capítulo 3 das propriedades mecânicas dos filmes, a gelatina apresentou um maior valor no modulo

de Young, no qual caracteriza um filme com maior rigidez. Portanto, a curcumina ligada em uma matriz mais rígida tem menor mobilidade.

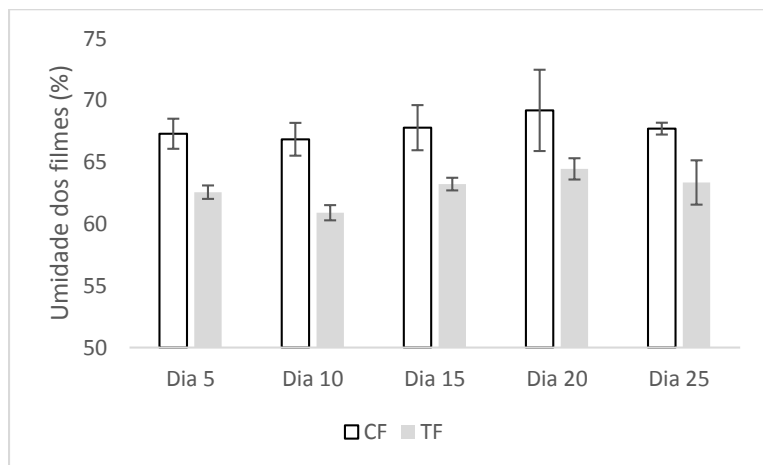
8.1.2 Migração da curcumina e perda de água

As Figuras 8.2 e 8.3 apresentam os testes de perda e ganho de água das salsichas e filmes, respectivamente. Observa-se que a umidade de equilíbrio do CF (66-69%) é maior que do TF (60-62%). Devido a maior absorção de água do filme CF, as salsichas em contato com esse filme também obtiveram uma maior perda de água de 10-15%, enquanto as salsichas em contato com TF perderam 7-9%. Esses resultados indicam que o filme produzido com amido de mandioca e gelatina é mais hidrofílico que o de resíduo de cúrcuma e gelatina. De acordo com a tese desenvolvida por Braga (2005), o resíduo de cúrcuma após os processos de extração, apresentam em sua composição certa de 1.5-3% de fibras. Portanto, no trabalho desenvolvido por Müller; Laurindo; Yamashita, (2009) apresentaram que adição de fibras em filmes de amido influencia na absorção de umidade, devido a uma menor higroscopicidade das fibras em relação aos amido.

Figura 8.2. Perda de água da salsicha para os filmes comestíveis.

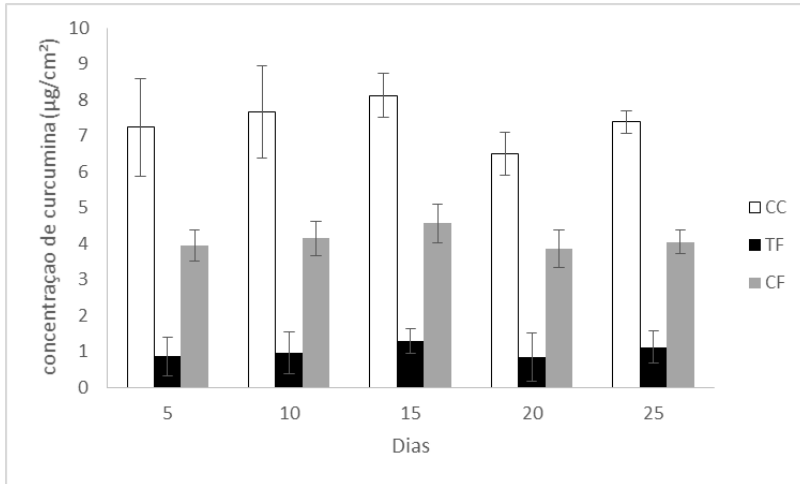


SC= salsicha revestida com filme de amido de mandioca- ST- salsicha revestida com filme de resíduo de cúrcuma.

Figura 8.3. Umidade final dos filmes.

A migração da curcumina para salsicha por um período de 25 dias está apresentada na Figura 8.4. Os resultados obtidos são semelhantes aos apresentados no capítulo 5, porém com maior tempo de contato das amostras. A concentração de curcumina na superfície da salsicha não aumenta após longo tempo de contato dos filmes (TF ou CF) ou revestimento (CC), indicando que não acontece difusão da curcumina para o interior da salsicha. O resultado do teste de migração mostrou que a concentração de 28% de gordura da salsicha não foi o suficiente para acontecer a difusão da curcumina. Isso, deve-se ao fato que a gordura presente na salsicha não está livre para que a curcumina solubilize, pois na etapa de emulsificação a gordura liga-se com as proteínas miofibrilares (HUI, 2012).

Figura 8.4. Migração da curcumina para salsicha.



CC e CF- revestimento e filme de amido de mandioca e gelatina adicionados de curcumina, respectivamente - TF- filme de resíduo de cúrcuma e gelatina.

8.1.3 Zona de inibição do filme de resíduo de cúrcuma e gelatina

O teste de zona de inibição foi realizado com propósito de avaliar se o filme produzido com resíduo de cúrcuma teria concentração suficiente de curcumina para efeito inibitório. Observa-se na Figura 8.5 que o filme elaborado com resíduo de cúrcuma não apresentou efeito inibitório contra *L. innocua*. Esse resultado pode ser explicado devido à baixa concentração de curcumina presente no filme ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$), que é insuficiente para inibir o crescimento microbiano. Sandikci Altunatmaz et al., (2016) encontraram que a concentração mínima inibitória para *L. monocytogenes* é de $125\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrando que necessitaria pelo menos 10 vezes mais curcumina para o filme obter um efeito antimicrobiano.

Figura 8.5. Teste de zona de inibição do filme de resíduo de cúrcuma contra *Listeria innocua*.

