

Denise Adamoli Laroque

**DESENVOLVIMENTO DE FILME ANTIMICROBIANO DE
ACETATO DE CELULOSE INCORPORADO COM
CARVACROL**

Tese de doutorado 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.

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coorientadores:

Prof. Dr. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Prof. Dr. Pedro Henrique H. de Araújo

Florianópolis
2018

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

Laroque, Denise Adamoli

Desenvolvimento de filme antimicrobiano de acetato de celulose incorporado com carvacrol / Denise Adamoli Laroque ; orientador, Bruno Augusto Mattar Carciofi, coorientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão, coorientador, Pedro Henrique H. de Araújo, 2018.

160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Embalagem antimicrobiana. 3. Caracterização polimérica. 4. Modelagem matemática de migração. 5. Cinética de crescimento bacteriano. I. Carciofi, Bruno Augusto Mattar. II. Aragão, Gláucia Maria Falcão de. III. Araújo, Pedro Henrique H. de IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

**“DESENVOLVIMENTO DE FILME ANTIMICROBIANO
DE ACETATO DE CELULOSE INCORPORADO COM
CARVACROL”**

Por

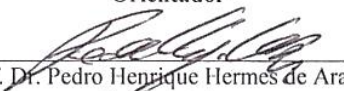
Denise Adamoli Laroque

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. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Orientador



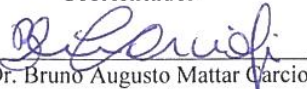
Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Coorientador



Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

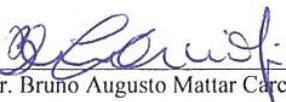
Coorientador



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coordenador

Banca Examinadora:



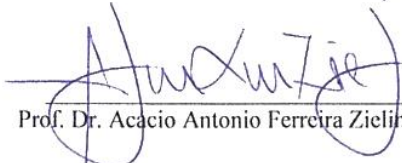
Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi



Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves



Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner



Prof. Dr. Acacio Antonio Ferreira Zielinski

Florianópolis, 30 de maio de 2018.

*Dedico esse trabalho
à minha mãe, Salma Adamoli Laroque e
ao meu amor, Ricardo Lemos Monteiro.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Bruno Carciofi, pela oportunidade e confiança depositada a mim, pelos ensinamentos, amizade, por toda contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação. Aos meus coorientadores, prof. Pedro Araújo e prof^ª. Glaucia Aragão, por todo o ensinamento e contribuição na elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade, avaliação e contribuição.

À UFSC e ao PPGEAL pela oportunidade. Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro. À empresa Rhodia Solvay pela oportunidade e financiamento de parte deste projeto.

Aos professores do PPGEAL pelos ensinamentos e contribuição na minha formação. Aos laboratórios PROFI, LCP e ENGEBIO e aos que neles trabalham, por terem fornecido estrutura e suporte para a realização deste projeto. Aos funcionários da UFSC, pelos serviços prestados. Ao técnico da Central de Análises, Leandro, e ao secretário do PPGEAL, Fernando, pelo apoio e disposição em sempre ajudar.

À Jaque e à Leidi por toda a contribuição, pelas horas de conversa, pela dúvidas tiradas, pelo ensinamento e amizade, vocês foram fundamentais na elaboração deste trabalho. Ao Cristian e à Camila que muito ajudaram e colaboraram no início desta pesquisa, e à Naomi, por toda a dedicação e as contribuições valiosas. A todos colegas de laboratório e do programa que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração desta pesquisa e com a minha formação.

Aos amigos feitos ao longo dessa jornada que colaboraram muito durante estes anos, tornando o dia a dia mais agradável.

À minha mãe, pelo amor e amizade, por toda a dedicação e esforço em sempre dar o melhor para mim e meus irmãos, por ser a mulher mais especial e guerreira que eu conheço.

Ao Ricardo, meu amor e companheiro, por todo amor, dedicação, por estar sempre do meu lado em todos os momentos. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus irmãos, Rafael e Giovanni, por sempre estarem presentes mesmo à distância, por saber que sempre posso contar com vocês e por me proporcionarem momentos de alegrias.

A todos da minha família, sejam Adamoli, Laroque, Lemos ou Monteiro, que sempre estiveram e estarão ao meu lado, que me apoiaram, se dedicaram e torceram por mim, dindos, avós, sobrinhos, afilhados, primos, tios. À minha sogra, Guete, por também ser minha mãe. A todos amigos que mesmo à distância sempre se fazem presentes, seja com alguma mensagem ou algum encontro esporádico.

“É um paradoxo, ainda verdadeiro, dizer que quando mais nós sabemos mais ignorantes nos tornamos no senso absoluto, pois é somente através da iluminação que nos tornamos conscientes de nossas limitações. Precisamente um dos resultados mais gratificantes da evolução intelectual é a abertura contínua de novas e maiores perspectivas”

Nikola Tesla

RESUMO

As embalagens antimicrobianas consistem em materiais incorporados com um agente ativo que reduz ou inibe o crescimento microbiano quando em contato com um alimento. Existe um interesse mundial em embalagens que sejam de origem natural e biodegradáveis, como, por exemplo, o acetato de celulose (AC), que é um biopolímero de baixo custo derivado da celulose e pode ser utilizado em contato com alimentos. O presente estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de filme antimicrobiano de AC incorporado com carvacrol. Os filmes foram obtidos pela técnica de *casting* utilizando soluções de AC em acetona ou butanona e caracterizados quanto às propriedades físicas, mecânicas, térmicas, morfológicas. As características dos filmes foram semelhantes, no entanto, a maior pressão de vapor da acetona permitiu a obtenção mais rápida dos filmes. O carvacrol, composto majoritário do óleo essencial do orégano, foi adicionado em até 10% em relação à massa do AC. Esse composto ativo ficou homogeneamente distribuído na matriz polimérica e promoveu poucas alterações nas propriedades dos filmes. A retenção total do carvacrol logo após a obtenção do filme e a perda inferior a 25% quando armazenado a 50 °C por até 22 semanas sugerem que há interação intermolecular entre o carvacrol e o AC. A migração em fluidos simulantes de alimentos demonstrou que é possível obter filmes com ação prolongada e migração lenta do carvacrol, com coeficiente de difusão entre 10^{-13} e 10^{-15} m²/s. A atividade bactericida do carvacrol contra as bactérias deteriorantes *Weissella viridescens* e *Pseudomonas fluorescens* foi de 488 µg/mL na fase líquida e de 384 µg/mL na fase vapor. O filme de AC com 10% de carvacrol apresentou atividade bactericida na fase vapor contra as duas bactérias estudadas. A eficácia antibacteriana do filme ativo foi comprovada em fatias de presunto a vácuo armazenados a 8 °C. A *P. fluorescens* não foi capaz de se desenvolver nas condições testadas. Para a *W. viridescens* o filme com 10% de carvacrol aumentou em 5 vezes a duração da fase de latência, diminuiu em 62% a velocidade de crescimento e reduziu em 1 log a população máxima bacteriana. O filme ativo obtido neste estudo demonstrou potencial para aplicação como embalagem para aumentar a vida útil de alimentos e ainda, possibilitar o uso de menor quantidade de conservantes tradicionais e colaborar para a diminuição do uso de polímeros de fonte petroquímica.

Palavras-chave: embalagem ativa, caracterização polimérica, migração, *W. viridescens*, *P. fluorescens*, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial packaging consists of materials incorporated with an active agent that reduces or inhibits microbial growth when in contact with a food. There is a global interest in packages that are biodegradable and natural origin, for example cellulose acetate (AC), which is a low cost biopolymer derived from cellulose and can be used in contact with food. The present study had as main objective the development of AC antimicrobial film incorporated with carvacrol. The films were obtained by the casting technique using AC solutions in acetone or butanone and characterized as to physical, mechanical, thermal and morphological properties. The characteristics of the films were similar, however, the higher vapor pressure of acetone allowed the films to be obtained faster. The carvacrol, major compound of the oregano essential oil, was added in up to 10% relative to the weight of the AC. This active compound was homogeneously distributed in the polymer matrix and promoted few changes on films properties. The carvacrol total retention immediately after obtaining the film and loss of less than 25% when stored at 50 °C for up to 22 weeks suggest that there is intermolecular interaction between carvacrol and AC. The migration in foods simulants fluids demonstrated that it is possible to obtain films with long-acting and slow migration of carvacrol, with diffusion coefficient between 10^{-13} e 10^{-15} m²/s. The bactericidal activity of carvacrol against spoilage bacteria *Weissella viridescens* and *Pseudomonas fluorescens* was 488 µg/mL in the liquid phase and 384 µg/mL in the vapor phase. The AC film with 10% carvacrol showed bactericidal activity in the vapor phase against the two bacteria studied. The antibacterial efficacy of the active film was demonstrated ham slices vacuum packed stored at 8 °C. The *P. fluorescens* was not able to grow under the conditions tested. For the *W. viridescens*, the film with 10% carvacrol increased 5 times the duration of the latency phase, decreased the growth rate by 62% and reduced the maximum bacterial population in 1 log. The active film obtained in this study demonstrated potential for application as packaging to increase shelf life and also enable the use of the smaller traditional preservatives amount and may contribute to decreasing the use of petrochemical polymers.

Keywords: active packaging, polymeric characterization, migration, *W. viridescens*, *P. fluorescens*, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Uso mundial de madeira para produtos de celulose.....	37
Figura 2.2. Fórmula estrutural da unidade básica de celulose.....	37
Figura 2.3. Reação para obtenção do acetato de celulose tri-substituído.	38
Figura 2.4. Parede celular das bactéria Gram-negativa e Gram-positiva.	43
Figura 2.5. Estrutura molecular do carvacrol	44
Figura 3.1. Câmara para secagem dos filmes de acetato de celulose. ...	52
Figura 3.2. Filmes de acetato de celulose obtidos pelos dois métodos de secagem: lenta (esquerda) e rápida (direita), e os solventes acetona (a), butanona (b) e acetato de etila (c).	60
Figura 3.3. Imagens por MEV da superfície (1) e fratura (2) dos filmes AC/Acet (a) e AC/But (b).	64
Figura 3.4. Termogramas de TGA dos filmes produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet), (---) perda de 10% da massa.	65
Figura 3.5. Termogramas de DSC da 1ª varredura do <i>pellet</i> (AC/ <i>pellet</i>) e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).	66
Figura 3.6. Termogramas de DSC da 2ª varredura do <i>pellet</i> (AC/ <i>pellet</i>) e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).	67
Figura 3.7. Transparência dos filmes de acetato de celulose sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.....	71
Figura 3.8. Imagens por MEV da superfície (1) e fratura (2) dos filmes sem carvacrol (a) e contendo 5% (b) e 10% (c) de carvacrol.....	73
Figura 3.9. Imagens por microscopia confocal de fluorescência dos filmes sem carvacrol (a) e contendo 5% (b) e 10% (c) de carvacrol.....	74
Figura 3.10. FTIR dos filmes sem carvacrol (AC/0), contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol e do carvacrol puro.	74

Figura 3.11. Termogramas de TGA dos filmes sem carvacrol (—) e contendo 5% (—) e 10% (—) de carvacrol, e temperatura correspondente a perda de 10% da massa (···).	76
Figura 3.12. Termogramas de DSC da 1ª varredura dos filmes sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol. 77	
Figura 3.13. Termogramas de DSC da 2ª varredura dos filmes sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol. 78	
Figura 3.14. Variação da T _g nos filmes de acetato de celulose em função da concentração de carvacrol.	79
Figura 4.1. Esquema da migração do carvacrol para o fluido/ar.....	86
Figura 4.2. Perfil de concentração de carvacrol durante a migração em fluido simulante para a abordagem analítica (a) e numérica (b).	87
Figura 4.3. Esquema da malha unidirecional construída para solução numérica da migração do carvacrol no filme para o fluido simulante. .	88
Figura 4.4. Migração de carvacrol em filmes contendo 10% de carvacrol acondicionados nas temperaturas de 25 °C(a) e 50 °C (b) e ajuste de modelo. As barras representam o desvio padrão das médias.	91
Figura 4.5. Migração de carvacrol no fluido simulante etanol 95% nas temperaturas 8 °C (cinza) e 25 °C (preto) para os filmes contendo 5% (triângulo, --) e 10% (Círculo, —) de carvacrol, dados experimentais e ajuste do modelo. As barras representam o desvio padrão das médias. 95	
Figura 4.6. Migração de carvacrol no fluido simulante água destilada nas temperaturas 8 °C (cinza) e 25 °C (preto) para os filmes contendo 5% (triângulo, --) e 10% (Círculo, —) de carvacrol, dados experimentais e ajuste do modelo por solução analítica (a) e solução numérica (b). As barras representam o desvio padrão das médias.....	96
Figura 5.1. Ilustração da adição de carvacrol no meio de cultura.	104
Figura 5.2. Ilustração da adição do inóculo na placa de Petri para determinação do MID e MBD.	105
Figura 5.3. Ilustração da adição do carvacrol no papel filtro para determinação do MID e MBD.	105
Figura 5.4. Ilustração da metodologia para obtenção do MID e MBD do filme de AC com carvacrol.	106
Figura 5.5. Presunto fatiado e cortado com molde.....	108

Figura 5.6. Fatia de presunto inculada com filme de acetato de celulose, embalagem de homogeneização e embalagem secundária a vácuo.....	109
Figura 5.7. Primeira diluição do presunto em sacos de homogeneização.	109
Figura 5.8. Cinética de crescimento das bactérias <i>W. viridescens</i> (símbolo vazio) e <i>P. fluorescens</i> (símbolo cheio) sem a presença (○●) e com 194 µg/mL (◆), 293 µg/mL (◻■) e 391 µg/mL (Δ) de carvacrol. As barras representam o desvio padrão das médias.	113
Figura 5.9. Crescimento bacteriano nas placas de Petri na fase vapor após incubação de 48 h, (a) <i>W. viridiscens</i> e (b) <i>P. fluorescens</i> , (1) 0, (2) 231, (3) 306, (4) 384 µg/mL de carvacrol.	115
Figura 5.10. Cinética de crescimento da <i>W. viridescens</i> em presunto a 8 °C, controle (○) e com filmes contendo (a) 5% (experimento 1(▲) e experimento 2 (Δ)) e (b) 10% (◻) de carvacrol. Modelo de Barayi e Roberts (—) ajustado aos dados experimentais. As barras representam o desvio padrão das médias.	120
Figura 5.11. Amostras embaladas de fatias de presunto ao longo da incubação com <i>W. viridescens</i> a 8°C, (a) controle, filme de acetato de celulose contendo (b) 5% de carvacrol e (c) 10% de carvacrol.....	125
Figura 5.12. Cinética da <i>P. fluorescens</i> incubada a 8°C no vácuo (branco) e em areobiose (preto) em presunto com o uso de filmes de acetato de celulose sem carvacrol (○●) e contendo 5% (Δ▲) e 10% de carvacrol (■◻).	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1. Características físico-químicas do carvacrol, a 25 °C.	44
Tabela 3. 1. Propriedades dos solventes utilizados para o preparo das SF.	51
Tabela 3. 2. Avaliação qualitativa dos filmes de acetato de celulose obtidos com os solventes acetona (AC/Acet), butanona (AC/But) e acetato de etila (AC/Etil).	59
Tabela 3. 3. Média e desvio padrão das características físicas, interação com a água e propriedades mecânicas e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).	61
Tabela 3. 4. Propriedades térmicas do <i>pellet</i> (AC/ <i>pellet</i>) e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).	66
Tabela 3. 5. Resumo da caracterização dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).	69
Tabela 3. 6. Média e desvio padrão das características físicas, interação com a água e propriedades mecânicas e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).	70
Tabela 3. 7. Atribuições das principais bandas de absorção do FTIR para o carvacrol os filmes sem carvacrol (AC/0) e com 5% (AC/5) e 10% de carvacrol.	75
Tabela 3. 8. Propriedades térmicas do <i>pellet</i> (AC/ <i>pellet</i>) e dos filmes sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.	77
Tabela 4. 1. Média e desvio padrão da concentração de carvacrol após obtenção dos filmes.	90
Tabela 4. 2. Coeficiente de difusão do carvacrol em filmes contendo 10% de carvacrol acondicionados nas temperaturas de 25 e 50 °C e parâmetros de ajuste do modelo.	92
Tabela 4. 3. Média e desvio padrão do coeficiente de partição (K_{FS}) do carvacrol entre o filme e o simulante de alimentos.	93

Tabela 4. 4. Média e desvio padrão do coeficiente de difusão do carvacrol de filmes para o fluido simulante de alimentos etanol 95% e parâmetros de ajuste do modelo.	95
Tabela 4. 5. Média e desvio padrão do coeficiente de difusão do carvacrol de filmes para o fluido simulante de alimentos água e parâmetros de ajuste do modelo obtidos pela solução analítica e solução numérica.....	97
Tabela 5. 1. Relação entre as quantidades de carvacrol.	112
Tabela 5. 2. MIC e MBC para o carvacrol.	113
Tabela 5. 3. Dose inibitória mínima (MID) e dose bactericida mínima (MBD) do carvacrol.	115
Tabela 5. 4. Dose inibitória mínima (MID) e dose bactericida mínima (MBD) dos filmes contendo carvacrol.	117
Tabela 5. 5. Média e desvio padrão da caracterização do presunto. ...	119
Tabela 5. 6. Parâmetros da cinética de crescimento da <i>W. viridescens</i> obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais em presunto a 8 °C na presença de filme de acetato de celulose incorporado com carvacrol.....	123
Tabela 5. 7. Dados estatísticos da cinética de crescimento da <i>W. viridescens</i> obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais em presunto a 8 °C na presença de filme de acetato de celulose incorporado com carvacrol.....	123
Tabela 5. 8. Média e desvio padrão concentração de carvacrol remanescente no filme e no presunto após o tempo de incubação.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acetato de celulose
Acet	Acetona
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Bactéria ácido láctica
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
But	Butanona
CCT	Coleção de Cultura Tropical
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EFSA	Agência Europeia de Segurança Alimentar
Etil	Acetato de etila
EVA	Acetato vinilo de etileno
EVOH	Etileno álcool vinílico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
GS	Grau de substituição
MAP	Embalagem com atmosfera modificada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
OE	Óleo essencial
PBAT	Polibutileno adipato tereftalato
PBS	Succinato de polibutileno
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCL	Policaprolactona
PDA	Potato Dextrose Agar
PE	Polietileno
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PET	Polietileno petro tereftalato
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHBV	Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
PLA	Ácido polilactida
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PUR	Poliuretanos

PVA	Álcool polivinílico
PVC	Policloreto de vinilo
R ²	Coefficiente de determinação
RMSE	raiz do quadrado médio do erro
SF	Solução filmogênica
TGA	Termogravimetria
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área de permeação	m^2
Abs_{600}	Absorvância a 600 nm	nm
aw_1	Atividade de água no exterior da cápsula	-
aw_2	Atividade de água no interior da cápsula	-
C_{carv}	Concentração de carvacrol no fluido simulante	kg/m^3
C_{Cl}	Concentração de cloreto	g/L
D	Coefficiente de difusão	m^2/s
$F(t)$	Medida do estado fisiológico das células	-
GI	Grau de intumescimento	%
h_0	Estado fisiológico inicial das células	-
K_{FS}	Coefficiente de partição carvacrol entre o filme e o fluido simulante	-
L	Espessura do filme	m
m	Massa de amostra	g
M_0	Massa inicial do filme	g
MBC	Concentração bactericida mínima	$\mu g/mL$
MBD	Dose bactericida mínima	$\mu g/mL$
M_{Cl}	Massa molar do cloreto	g/mol
M_f	Massa final do filme	g
MIC	Concentração inibitória mínima	$\mu g/mL$
MID	Dose inibitória mínima	$\mu g/mL$
M_{NaCl}	Massa molar do cloreto de sódio	g/mol
N	População microbiana	UFC/mL
N_0	População inicial microbiana	UFC/mL
$N_{máx}$	População máxima microbiana	UFC/mL
Op	Opacidade	%
P_s	Pressão de saturação do vapor de água	Pa
t	Tempo de migração do carvacrol	s
T_{amb}	Temperatura ambiente	$^{\circ}C$
T_f	Temperatura de fusão	$^{\circ}C$
T_g	Temperatura de transição vítrea	$^{\circ}C$
PVA	Permeabilidade ao vapor de água	
T_v	Temperatura de vaporização	$^{\circ}C$

UR	Umidade relativa	%
Ur_{amb}	Umidade relativa ambiente	%
V	Volume de solução	L
w	Taxa de permeação de água pela cápsula	g/h
x	Coordenada cartesiana	-
X_{NaCl}	Concentração de cloreto de sódio	g/100g
ΔH_f	Entalpia de fusão	J/g
ΔH_{fc}	Entalpia de fusão de um cristal perfeito do polímero	J/g
ΔH_v	Entalpia de vaporização	J/g
Δt	Variação do tempo	s
Δx	Variação da espessura	m
θ	Ângulo de contato	°
λ	Fase lag	h
μ	Velocidade específica máxima de crescimento	h ⁻¹
ρ	Concentração de carvacrol no filme	kg/m ³
$\rho_{F,\infty}$	Concentração de carvacrol no filme no equilíbrio	kg/m ³
ρ_i	Concentração inicial de carvacrol no filme	kg/m ³
$\rho_{S,\infty}$	Concentração de carvacrol no fluido simulante no equilíbrio.	kg/m ³
ρ_{sup}	Concentração de carvacrol na superfície do filme	kg/m ³

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
LISTA DE SÍMBOLOS	23
SUMÁRIO	25
DIAGRAMA CONCEITUAL DA TESE	29
ORGANOGRAMA DO DOCUMENTO DA TESE	31
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	31
1.1. OBJETIVOS	33
1.1.1 Objetivo Geral	33
1.1.2 Objetivos Específicos	33
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1. EMBALAGENS PLÁSTICAS E BIODEGRADÁVEIS	35
2.2. CELULOSE	36
2.2.1. Acetato de celulose.....	37
2.3. EMBALAGENS ATIVAS	39
2.3.1. Embalagem de liberação controlada.....	40
2.3.2. Embalagens antimicrobianas.....	40
2.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS	41
2.4.1. Ação antimicrobiana de óleos essenciais	42
2.4.2. Carvacrol	44
2.5. USO DE ACETATO DE CELULOSE COMO EMBALAGEM ATIVA	46
CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA ADIÇÃO DE CARVACROL NAS CARACTERÍSTICAS DOS FILMES DE ACETATO DE CELULOSE	49
3.1. INTRODUÇÃO	49
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	51

3.2.1. Materiais	51
3.2.2. Obtenção dos filmes	51
3.2.3. Caracterização qualitativa	52
3.2.4. Adição do carvacrol	53
3.2.5. Propriedades físicas.....	53
<i>Espessura e massa específica aparente</i>	53
<i>Opacidade</i>	53
3.2.6. Caracterização quanto a interação com a água.....	54
<i>Grau de intumescimento (GI)</i>	54
<i>Ângulo de contato</i>	54
<i>Permeabilidade ao vapor da água</i>	54
3.2.7. Propriedades Mecânicas.....	55
3.2.8. Propriedades morfológicas e estruturais	55
<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	55
<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier</i>	55
<i>Microscopia confocal por fluorescência</i>	56
3.2.9. Propriedades térmicas	56
<i>Análise termogravimétrica</i>	56
<i>Calorimetria exploratória diferencial</i>	56
3.2.10. Análise estatística.....	57
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.3.1. Análise qualitativa dos filmes	58
3.3.2. Caracterização dos filmes produzidos com os solventes butanona e acetona	61
<i>Características físicas</i>	61
<i>Interação com a água</i>	62
<i>Propriedades mecânicas</i>	62
<i>Morfologia por MEV</i>	63
<i>Propriedades térmicas</i>	65
3.3.3. Caracterização dos filmes com carvacrol.....	69
<i>Características físicas</i>	70
<i>Interação com a água</i>	71
<i>Propriedades mecânicas</i>	72
<i>Propriedades morfológicas e estruturais dos filmes</i>	72
<i>Propriedades térmicas</i>	75
3.4. CONCLUSÃO	80
CAPÍTULO 4: MECANISMO DE MIGRAÇÃO DE CARVACROL EM FILMES DE ACETATO DE CELULOSE.....	81

4.1. INTRODUÇÃO	81
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	83
4.2.1. Preparo dos filmes	83
4.2.2. Retenção e migração de carvacrol em filmes armazenados	83
4.2.3. Migração de carvacrol para fluido simulante de alimento	83
4.2.4. Coeficiente de partição	85
4.2.5. Modelo matemático	85
<i>Solução analítica</i>	87
<i>Solução numérica</i>	88
4.2.6. Análise estatística	89
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.3.1. Retenção e migração de carvacrol em filmes armazenados	90
4.3.2. Migração de carvacrol em fluidos simulantes de alimentos	92
4.4. CONCLUSÃO	99
CAPÍTULO 5: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO CARVACROL E APLICAÇÃO DE FILME Ativo EM PRESUNTO	101
5.1. INTRODUÇÃO	101
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	103
5.2.1. Material	103
5.2.2. Ativação das bactéria e preparo dos inóculos	103
5.2.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) na fase líquida	103
5.2.4. Determinação da dose inibitória mínima (MID) e dose bactericida mínima (MBD) na fase vapor	104
5.2.5. Atividade antimicrobiana do vapor de carvacrol incorporado nos filmes de acetato de celulose	106
5.2.6. Atividade antimicrobiana dos filmes ativos em presunto	106
5.2.7. Caracterização do presunto	107
<i>Atividade de água</i>	107
<i>pH</i>	107
<i>Concentração de cloreto de sódio</i>	107
5.2.8. Preparo e incubação do presunto com o filme ativo	108
5.2.9. Determinação do crescimento bacteriano	109
5.2.10. Modelagem matemática	110
<i>Análise estatística da predição</i>	111
5.2.11. Carvacrol remanescente	111
5.2.12. Correlação entre as quantidades de carvacrol	112
5.2.13. Análise estatística	112
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	113

5.3.1. Concentração inibitória mínima (MIC) e Concentração bactericida mínima (MBC) na fase líquida.....	113
5.3.2. Dose inibitória mínima (MID) e Dose bactericida mínima (MBD) na fase vapor	114
5.3.3. Atividade antimicrobiana na fase vapor do filme ativo	117
5.3.4. Ação antimicrobiana dos filmes ativos no presunto.....	118
5.4. CONCLUSÃO	130
CONCLUSÃO GERAL.....	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXO 1	149
ANEXO 2	155
ANEXO 3	157

DIAGRAMA CONCEITUAL DA TESE

Desenvolvimento de filme antimicrobiano de acetato de celulose incorporado com carvacrol

Por quê?

A embalagem ativa é uma tecnologia emergente, que permite a utilização de agentes antimicrobiano provenientes de fontes naturais e redução da quantidade de conservantes na matriz alimentícia.

O acetato de celulose é um polímero biodegradável derivado da celulose, que pode ser utilizado em embalagem de alimentos.

O carvacrol é o composto majoritário do óleo essencial de orégano e apresenta propriedades antimicrobianas.

O que já existe?

O acetato de celulose vem sendo extensivamente utilizado na área de membranas, e como filme ativo há trabalhos com adição dos compostos naturais, tais como timol e óleo essencial de orégano.

Há trabalhos que demonstram a eficácia do carvacrol como agente antimicrobiano em uma ampla gama de bactérias.

Hipóteses da pesquisa

Embalagens ativas antimicrobianas de acetato de celulose contendo carvacrol são factíveis, permitindo a migração do composto ativo que irá agir principalmente na superfície dos alimentos, onde a maior parte das reações ocorrem, prolongando a vida útil de alimentos.

Estratégia

Definir a metodologia para obtenção dos filmes e caracterizá-los com e sem a adição de carvacrol. Determinar a retenção e interação do carvacrol em filmes armazenados e a migração em fluidos simulantes de alimentos. Após, determinar a capacidade antibacteriana dos filmes ativos em bactérias deteriorantes de alimentos, *Pseudomonas fluorescens* e *Weissella viridescens*, e avaliar a capacidade de inibição dos filmes ativos no crescimento bacteriano em presunto embalado a vácuo.

Conclusões

Os filmes foram transparentes e com características adequadas para uso como embalagem de alimentos. A adição de até 10% de carvacrol não causou alterações consideráveis nas características dos filmes e apresentou interação com o acetato de celulose, permanecendo na matriz polimérica mesmo quando armazenado a 50 °C. A migração do carvacrol para fluidos simulantes de alimentos indica que em uma matriz alimentícia a sua migração poderá ser gradual. Os filmes ativos apresentaram atividade antibacteriana, e foram eficazes para inativar a *W. viridescens* em fatias de presunto embaladas a vácuo.

ORGANOGRAMA DO DOCUMENTO DA TESE

Capítulo 1:
Introdução e objetivos

Capítulo 2:
Revisão bibliográfica

Capítulo 3:
Influência do solvente e da
adição de carvacrol nas
características dos filmes de
acetato de celulose.

Variáveis: Solvente, concentração de acetato de celulose, volume de solução filmogênica, tipo de secagem e concentração de carvacrol.
Respostas: Propriedades físicas, mecânicas, morfológicas, estruturais e térmicas, e interação com a água

Capítulo 4:
Mecanismo de migração de
carvacrol em filmes de acetato
de celulose.

Variáveis: Temperatura de migração, armazenamento dos filmes, concentração de carvacrol, fluido simulante de alimento.
Respostas: Retenção e interação entre polímero e carvacrol, coeficientes de partição e difusão, mecanismo de migração.

Capítulo 5:
Atividade antimicrobiana do
carvacrol e aplicação de filme
ativo em presunto

Variáveis: Concentração de carvacrol, bactérias, ensaios na fase e líquida e vapor de carvacrol e filmes ativos em fatias de presunto.
Respostas: Concentração bactericida do carvacrol, ação antibacteriana do filme ativo em presunto, parâmetros das cinéticas de crescimento.

Conclusão geral

Referências bibliográficas

Anexos

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A procura crescente dos consumidores por produtos alimentícios minimamente processados, naturais, frescos e práticos, bem como mudanças contínuas à níveis industriais, varejo e distribuição associados à globalização, representam grandes desafios para a segurança e qualidade alimentar. A necessidade de aumentar a vida útil, minimizar o desperdício de alimentos e otimizar o uso de matérias-primas favorece a implementação de tecnologia de embalagem, tais como embalagens ativas e inteligentes, desempenhando um papel-chave nos setores de alimentos perecíveis (HAN, 2014; REALINI; MARCOS, 2014; ROBERTSON, 2009).

Aliado a isso, há um crescente interesse mundial em embalagens com menores quantidades de materiais e fáceis de serem reutilizadas, recicladas ou biodegradadas, favorecendo à inovação das tecnologias utilizadas para embalagem de alimentos (YAM; LEE, 2012).

Desta forma, o uso de polímeros de fontes naturais e biodegradáveis, aliado ao conceito de conservação de embalagens ativas, podem atuar estrategicamente sob diferentes aspectos: aumento da vida útil dos alimentos, segurança de alimentos e redução do consumo de polímeros não biodegradáveis e fontes não renováveis (VARGAS JR, 2014).

Embalagens ativas antimicrobianas apresentam como grande vantagem a possibilidade do uso de menor quantidade de conservante devido à liberação lenta do composto ativo, agindo principalmente na superfície do alimento, onde a maior parte das reações ocorrem.

Diversos princípios ativos podem ser incorporados às embalagens com o intuito de torná-las ativas. A crescente demanda por produtos seguros e naturais tem aumentado o interesse entre os pesquisadores nos óleos essenciais e seus compostos como aditivos naturais em alimentos em substituição aos aditivos químicos, além disso, a redução do consumo de sal, a fim de reduzir a incidência de doenças cardiovasculares, faz com que seja necessária a adição de outros compostos para manter a segurança dos alimentos (BURT, 2007).

Dentre os aditivos naturais, o carvacrol, componente majoritário dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (BURDOCK, 2010), apresenta atividade antimicrobiana contra diversas bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos (BEN ARFA et al., 2006; DU et al., 2015; LAMBERT et al., 2001; RAMOS et al., 2012; SILVA-ANGULO et al., 2014; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

Com relação aos polímeros biodegradáveis, a celulose é o polímero natural mais abundante e uma fonte importante de matéria-prima para a crescente demanda por materiais biocompatíveis, renováveis e ambientalmente amigáveis (WÜSTENBERG, 2015). Além disso, a celulose é um material versátil para funcionalização química, capaz de produzir fibras e filmes, bem como diversos derivados estáveis. São inúmeras as possibilidades de métodos para modificação da celulose, resultando em ampla gama de produtos por substituição dos grupos hidroxilas (WÜSTENBERG, 2015). Estas modificações na estrutura da celulose têm como vantagens a possibilidade de obtenção de compostos que possam produzir materiais moldáveis, e a alteração significativa de suas propriedades físico-química e mecânicas.

O acetato de celulose é um dos principais derivados da celulose, é produzido pela reação de esterificação da celulose através da substituição de grupos hidroxila (OH) por grupos acetila (COCH₃) (ENDRES; SIEBERT-RATHS, 2011). É utilizado principalmente na área das membranas, em processos de separação e filtração.

O acetato de celulose já é utilizado como embalagem de alimentos por algumas empresas e tem se mostrado promissor na área de embalagens ativas antimicrobianas. Na literatura, foram encontrados estudos de embalagens de acetato de celulose com a adição de sais de prata (NECULA et al., 2011), bacteriófago (GOUVÊA et al., 2015), aldeído cinâmico (LOPES et al., 2014), lisozima (GEMILI; YEMENICIOĞLU; ALTINKAYA, 2009), ácido ascórbico, tirosina (GEMILI et al., 2010) e óleo de orégano (PAGANINI, 2017; POLA et al., 2016).

Desta forma, esse projeto teve como objetivo a produção de filme ativo antimicrobiano de acetato de celulose incorporado com o composto carvacrol e aplicado em embalagens de presunto visando o aumento da vida útil.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver filmes ativos de acetato de celulose contendo carvacrol como agente antimicrobiano, avaliando a migração do carvacrol, seu efeito inibitório contra as bactérias deteriorantes de alimentos *Pseudomonas fluorescens* e *Weissella viridescens* e a aplicação destes filmes em fatias de presunto.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a metodologia para obtenção dos filmes de acetato de celulose pelo método de *casting* avaliando as características dos filmes produzidos a partir de solventes acetona e butanona sob diferentes condições de secagem;
- Caracterizar os filmes de acetato de celulose com a adição de carvacrol e determinar a retenção e interação do carvacrol no filme após evaporação do solvente e durante o armazenamento dos filmes em temperaturas de 25 e 50 °C;
- Determinar o mecanismo de migração do carvacrol em fluidos simulantes de alimentos nas temperaturas de 8 e 25 °C;
- Aplicar modelo matemático para obtenção dos parâmetros das cinéticas de migração;
- Determinar as concentrações bacteriostática e bactericida do carvacrol na fase líquida e de vapor contra as bactérias *P. fluorescens* e *W. viridescens*;
- Investigar a capacidade inibitória dos filmes ativos em fatias de presunto embalado;
- Aplicar modelo matemático para obtenção dos parâmetros das cinéticas de crescimento bacteriano no presunto.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. EMBALAGENS PLÁSTICAS E BIODEGRADÁVEIS

Os plásticos mais usados na indústria de embalagens são os de base petroquímica, tais como poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(cloreto de vinila) (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e poliamida (PA). Estes apresentam vantagens como baixo custo, boas propriedades mecânicas, barreira ao oxigênio e umidade, entre outras. No entanto, sua degradação é lenta, podendo causar efeito adverso para a saúde humana e/ou para o ecossistema, atribuído ao alto consumo de combustíveis fósseis (cerca de 99% dos plásticos são de origem de fósseis), poluição ambiental, esgotamento de aterros e elevada utilização de energia no processo de fabricação (MAHALIK; NAMBIAR, 2010).

Desta forma, há um crescente interesse na sociedade por embalagens com menor quantidade de material e fáceis de reutilizar, reciclar ou que sejam biodegradáveis. Esse interesse favorece as tecnologias emergentes de embalagem de alimentos, as quais podem ser definidas como as inovações nas embalagens, com desenvolvimento promissor para melhoria da qualidade e segurança dos alimentos e a sustentabilidade do sistema alimentar em geral (YAM; LEE, 2012).

Segundo o *European Bioplastics* (2016), os bioplásticos são plásticos com base biológica e/ou biodegradáveis, apresentam propriedades semelhantes aos plásticos convencionais, porém oferecem benefícios adicionais, tais como, melhor funcionalidade, reciclagem orgânica, redução do uso de recursos fósseis e redução de emissão de gases de efeito estufa. Os bioplásticos podem ser separados em 3 grupos:

i) Plásticos com base biológica (ou parcialmente biológica) não biodegradáveis, tais como o PE com base biológica, PA ou poliuretanos (PUR), sendo que os poliuretanos podem ser biodegradáveis dependendo da composição do polioli utilizado.

ii) Plásticos com base biológica e biodegradáveis, tais como poli(ácido láctico) (PLA), polihidroxialcanoatos (PHA), poli(succinato de butileno) (PBS) e misturas de amido, que é um polímero natural, com outros polímeros naturais ou sintéticos;

iii) Plásticos biodegradáveis produzidos a partir de recursos fósseis e biodegradáveis, como poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT), mas que futuramente poderão ser produzidos com base biológica.

Atualmente, os bioplásticos representam menos de 1% de 300 milhões de toneladas de plástico produzido anualmente. No entanto, a demanda está crescendo, devido à melhoria dos materiais e suas

aplicações, à crescente consciência ambiental dos consumidores, bem como ao conhecimento sobre a natureza finita dos recursos fósseis (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016).

Dentre as desvantagens do uso de biopolímeros biodegradáveis oriundos de recursos renováveis, destacam-se as propriedades físicas e mecânicas mais restritas em relação aos plásticos de origem petroquímica devido à menor possibilidade em se ajustar as propriedades físico-química destes compostos. A fim de contornar algumas deficiências dos materiais renováveis, tais como a celulose e o amido, que são os polímeros de origem vegetal mais abundantes no mundo, transformações físico-químicas têm sido realizadas através de misturas e reações, se mostrando alternativas promissoras e desempenhado um papel importante na melhoria da qualidade de embalagens utilizando estes compostos.

A presença de grupos hidroxila na estrutura química da celulose e do amido permite a alteração das propriedades através de derivação química, fornecendo oportunidade para melhorar as propriedades para uso em embalagens (IMAM; GLENN; CHIELLINI, 2012).

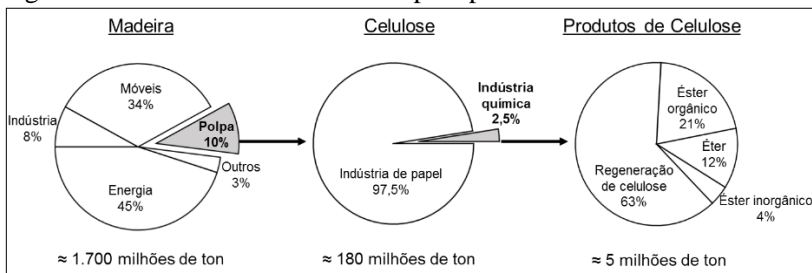
2.2. CELULOSE

A celulose é o biopolímero mais abundante do planeta e uma fonte muito importante de matéria-prima para a crescente demanda por materiais biodegradáveis e renováveis. A polpa de madeira é a principal fonte de matéria-prima para o processamento de celulose. Da polpa de madeira produzida, cerca de 97,5% é usada na produção de papel e 2,5% é utilizada na indústria química para a produção de fibras, filmes, e na síntese de diversos ésteres e éteres de celulose. A Figura 2.1 representa, esquematicamente, o uso global da madeira e seus derivados (KLEMM et al., 2005; WÜSTENBERG, 2015).

A celulose é um polímero linear, a unidade monomérica consiste em duas moléculas de glicose unidas por ligação glicosídica $\beta(1,4)$, com rotação de 180° uma contra outra. Cada unidade de glicose contém três hidroxilas livres ligadas aos carbonos 2, 3 e 6 (WÜSTENBERG, 2015). A fórmula química da celulose é $(C_6H_{10}O_5)_n$, onde n é o número de monômeros de glicose, e a fórmula estrutural pode ser visualizada na Figura 2.2.

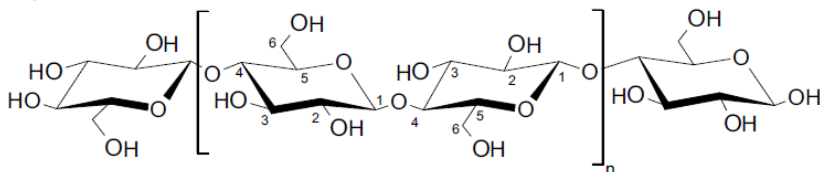
Ligações de moléculas de celulose são agregadas em forma de microfibrilas, constituídas de 55-75% de regiões cristalinas e 25-45% de regiões amorfas. Os grupos hidroxilas localizados na região amorfa são altamente acessíveis e reativos (KLEMM et al., 2005).

Figura 2.1. Uso mundial de madeira para produtos de celulose.



(Fonte: WÜSTENBERG, 2015)

Figura 2.2. Fórmula estrutural da unidade básica de celulose.



(Fonte: BAO, 2015)

A celulose é uma matéria-prima versátil para conversões químicas, podendo produzir fibras e filmes, bem como diversos derivados estáveis de celulose, usados em muitas áreas da indústria. São inúmeras as possibilidades de métodos para modificação da celulose, podendo ser produzido uma ampla gama de compostos por substituição dos grupos hidroxila com uso de agentes químicos, tais como ácidos, cloretos e óxidos, através de reações de esterificação ou eterificação (WÜSTENBERG, 2015). Produzindo, por exemplo, por esterificação, ácidos inorgânicos (nitrocelulose) e ácidos orgânicos (acetato de celulose) e, por eterificação, etilcelulose e cloreto de metila.

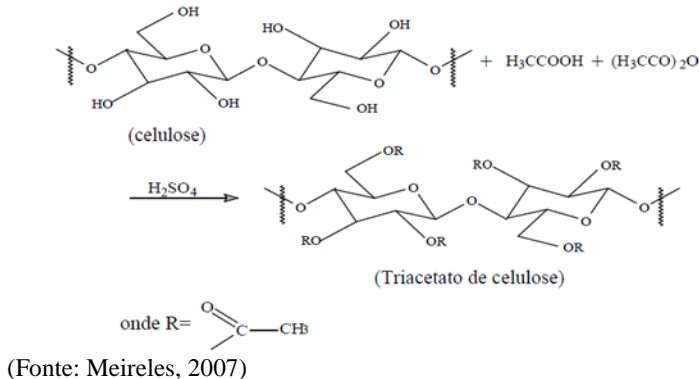
Celulose regenerada e derivados de celulose estão entre os biopolímeros fabricados em grande escala industrial. O material é resistente à radiação ultravioleta (UV), transparente e disponível em grande número de cores transparentes, translúcidas, com alto brilho superficial (ENDRES; SIEBERT-RATHS, 2011).

2.2.1. Acetato de celulose

O acetato de celulose (AC) é produzido através de reação de esterificação da celulose pela substituição dos grupos hidroxila (OH) por grupos acetila (COCH_3). O número médio de grupos acetila que

substituem as hidroxilas por unidade glicosídica é denominado grau de substituição (GS). O GS varia de 0 para a celulose a 3 (para um material tri-substituído) (Figura 2.3) (ENDRES; SIEBERT-RATHS, 2011; KLEMM et al., 2005).

Figura 2.3. Reação para obtenção do acetato de celulose tri-substituído.



As propriedades e aplicações de AC são determinadas pelo GS, o qual influencia principalmente a solubilidade e compatibilidade, influenciando as propriedades físicas, químicas e mecânicas. Embora AC possa ser produzido com diferentes GS, o nível comum é o 2,5, contendo cerca de 41% de grupo acetil, e apresenta boa solubilidade em solventes comuns, como a acetona (BAO, 2015; PULS; WILSON; HÖLTER, 2011).

O AC é classificado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), é um produto amorfo, disponível em forma de pó ou em flocos, não tóxico, inodoro, insípido, transparente, brilhante, não inflamável, resistente e apresenta alta resistência ao calor, a produtos químicos, gorduras e óleos (ENDRES; SIEBERT-RATHS, 2011).

Dentre os derivados da celulose, o AC é o de maior interesse comercial e ganhou atenção nos últimos anos em relação às suas potenciais aplicações de mercado em indústrias têxteis, alimentares e farmacêuticas (BAO; LONG; VERGELATI, 2015). O AC é usado principalmente como fibras para filtro de cigarro e indústrias têxteis, representando 91% do consumo mundial de acetato de celulose em 2016. O restante é moldado e utilizado na forma de folhas, filme fotográfico, embalagens, revestimentos, tintas e em monitores de cristais líquidos (IHS MARKIT, 2016).

É consenso em todos os trabalhos científicos que o AC é um biopolímero, no entanto há controvérsias em relação à biodegradabilidade. Segundo Endres e Siebert-Raths (2011) e Potts, Clendinning e Ackart (1972), a biodegradação do AC diminui à medida que o GS aumenta. No entanto, para Puls, Wilson e Hölter (2011), Gardner et al. (1994) e Buchanan et al. (1996), diferentemente da celulose que é prontamente biodegradada por organismos que utilizam enzimas celulase, o AC, devido aos grupos acetila, requer a presença de enzimas esterases (comuns em microrganismos) para o primeiro passo na biodegradação.

2.3. EMBALAGENS ATIVAS

A embalagem ativa de alimentos é uma inovação em resposta às contínuas mudanças dos consumidores e das tendências do mercado. Esta tecnologia baseia-se na incorporação de determinados compostos no sistema de embalagem que libera ou absorve substâncias do alimento ou do ambiente de modo a prolongar a vida útil e manter a qualidade, a segurança e as características sensoriais do alimento (REALINI; MARCOS, 2014).

O Regulamento 1935/2004 da União Europeia possibilita a utilização de embalagens ativas na Europa, permitindo a aplicação de materiais com agentes que podem entrar em contato e/ou migrar para os alimentos, contém disposições gerais sobre a segurança das embalagens ativas e inteligentes e define o quadro para o processo de avaliação da Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA). Porém, apenas em 2009, o Regulamento 450/2009/CE estabeleceu regras específicas para materiais e objetos ativos e inteligentes para aplicação segura dos requisitos gerais estabelecidos. No Japão, EUA e Austrália, os regulamentos foram mais adequados e flexíveis, permitindo há anos inovações tecnológicas no setor de embalagens de alimentos (RESTUCCIA et al., 2010). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) segue o regulamento da União Europeia.

Os sistemas mais conhecidos de embalagens ativas são as de: i) diminuição/eliminação de oxigênio e são comercializados na forma de sachês, impedindo a oxidação, o crescimento de bactérias aeróbias e fungos; ii) eliminação de dióxido de carbono que impedem as embalagens inflarem devido à formação de dióxido de carbono em produtos, tais como queijos ou café; iii) absorção de etileno para frutas frescas, retardando a maturação; iv) absorção de umidade, usados para embalar alimentos secos, sensíveis à umidade, produtos farmacêuticos e dispositivos

eletrônicos, inseridos nas embalagens na forma de sachê para manter a umidade (HAN, 2014; SARANTÓPOULOS; REGO, 2012).

Existem ainda as embalagens ativas emissoras de última geração, as quais liberam, durante a estocagem, os compostos ativos, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, realçadores de sabor, enzimas, compostos nutracêuticos, dentre outros (SARANTÓPOULOS; REGO, 2012).

Um dos grandes desafios para as embalagens ativas é preservar as suas propriedades mecânicas e de barreira originais. A adição de substâncias ativas puras, em vez do uso de extratos não purificados, ou o uso de compostos ativos sob a forma de nanopartículas podem reduzir a quantidade de substância ativa necessária e, portanto, contribuir para preservar as propriedades originais dos materiais (REALINI; MARCOS, 2014).

2.3.1. Embalagem de liberação controlada

As embalagens de liberação controlada são definidas como embalagens que podem liberar compostos ativos (exemplo: antimicrobianos e antioxidantes), com a finalidade de prolongar a vida útil de alimentos, melhorando a segurança e a qualidade dos mesmos (YAM; ZHU, 2012).

Tradicionalmente, compostos ativos são adicionados nas formulações dos alimentos. No entanto, estes compostos podem interagir com o alimento limitando a sua eficácia. As embalagens de liberação controlada podem suprir essa limitação, reabastecendo continuamente os compostos ativos através de liberação controlada, prolongando a proteção do alimento. Outra vantagem, é a necessidade de menor quantidade de compostos ativos a ser utilizada para proporcionar os mesmos ou melhores níveis de proteção comparado à adição direta no alimento (YAM; ZHU, 2012).

O termo “controlar” é usado no sentido de conhecer a quantidade de composto que está sendo liberado. A capacidade de controlar a liberação é conseguida quantificando as relações do sistema. De fato, controlar a liberação do composto ativo a taxas adequadas é um grande desafio, uma vez que não existe uma compreensão fundamental dos fatores que regem a liberação de compostos a partir dos materiais das embalagens.

2.3.2. Embalagens antimicrobianas

As embalagens antimicrobianas servem como transportadores de compostos para reduzir, inibir ou retardar o crescimento microbiano, liberando de forma eficaz os compostos nos alimentos para prolongar a

vida útil, qualidade e segurança (HAN, 2014; SOARES et al., 2009). O agente antimicrobiano pode estar contido na embalagem na forma de sachês ou incorporado no material da embalagem (LÓPEZ-CARBALLO et al., 2012).

Os sistemas de embalagens antimicrobianas podem ser classificados em duas categorias principais: i) liberação do agente antimicrobiano da embalagem para o alimento e ii) imobilização do agente antimicrobiano na embalagem, atuando na superfície do alimento (BRODY; STRUPINSKY; KLINE, 2001; HAN, 2014).

Uma das principais vantagens desse tipo de embalagem é a difusão dos compostos antimicrobianos para a superfície do alimento de maneira controlada. Com isso, podem estar presentes em menores quantidades e atuando principalmente na superfície do produto, onde a maior parte das reações de deterioração ocorrem. A adição do agente na embalagem é mais eficiente do que a adição direta no alimento, pois, devido à difusão lenta para o alimento, proporciona um efeito antimicrobiano contínuo durante períodos prolongados de exposição, reduzindo a perda da atividade antimicrobiana em virtude da afinidade ou inativação pelos componentes do alimento (MIRANDA et al., 2016; QUINTAVALLA; VICINI, 2002; SOARES et al., 2009).

As substâncias antimicrobianas incorporadas nas embalagens podem controlar a contaminação microbiana através da redução da velocidade de crescimento e o crescimento máximo da população, estender a fase de latência ou inativar os microrganismos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; QUINTAVALLA; VICINI, 2002; SOARES et al., 2009).

O antimicrobiano a ser incorporado no polímero deve ser selecionado com base na composição do alimento, espectro de atividade, modo de ação, composição química e velocidade de crescimento dos microrganismos alvo (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; HAN, 2014). Além disso, o efeito do antimicrobiano sobre as propriedades mecânicas, de barreira e ópticas do polímero também devem ser consideradas (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

2.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS

A seleção do agente antimicrobiano depende da atividade contra um microrganismo alvo. Devido às características dos produtos alimentares tais como pH, atividade da água, composição e temperatura de armazenamento, o crescimento de potenciais microrganismos que podem deteriorar determinado produto alimentício é previsível. O agente

antimicrobiano deve ser selecionado pela capacidade de inibição contra os potenciais microrganismos que podem crescer em condições ambientes em determinado alimento embalado (HAN, 2003).

Diversos tipos de agentes antimicrobianos podem ser incorporados ao sistema da embalagem, tais como:

i) Químicos, como os ácidos orgânicos ácidos (benzóicos, parabenos, sorbatos, ácido sórbico), os fungicidas (benomil e imazalil) e o álcool (etanol);

ii) Bacteriocinas produzidas por microrganismos, tais como nisina, lactinas, pediocina, diolococcina e propioninas;

iii) Enzimas, como a lisozima;

iv) Extratos naturais, como os óleos essenciais de plantas e seus compostos.

2.4.1. Ação antimicrobiana de óleos essenciais

A crescente demanda por produtos seguros e naturais tem aumentado o interesse entre os pesquisadores nos óleos essenciais como aditivos naturais em alimentos, em substituição aos aditivos químicos, além disso, a redução do consumo de sal, a fim de reduzir a incidência de doenças cardiovasculares, faz com que seja necessário a adição de outros compostos para manter a segurança dos alimentos (BURT, 2007).

A diversidade de óleos essenciais é muito grande e cada óleo apresenta ampla gama de compostos. O componente majoritário pode chegar a 90% da composição do óleo essencial, por exemplo, o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) pode conter até 80% de carvacrol e o de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) pode conter até 85% de eugenol (BURT, 2007).

A composição química dos óleos essenciais de uma determinada planta pode variar em função da época de colheita, origem geográfica e diferentes partes da planta (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011), sendo essa uma desvantagem do uso desses compostos na indústria alimentícia.

Vários estudos têm demonstrado os benefícios potenciais do uso de óleos essenciais como agentes ativos em embalagens, incluindo a manutenção das características iniciais dos alimentos, protegendo da deterioração microbiana e, portanto, estendendo a vida útil (BURT, 2004). No entanto, a maioria dos óleos essenciais apresentam aroma característico, nas embalagens ativas, o aroma/odor pode aumentar ou diminuir a preferência do alimento pelo consumidor. Como muitas vezes as alterações organolépticas são indesejáveis, a adição de pequenas

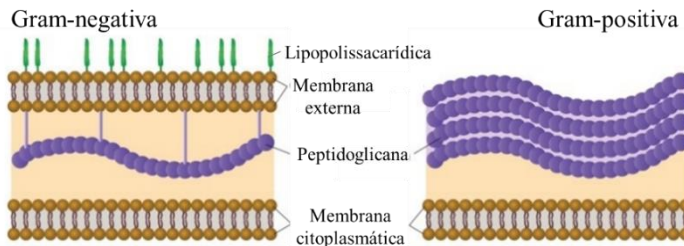
quantidades de óleos essenciais se faz necessária, podendo ser combinadas com o uso de outras tecnologias (JAYASENA; JO, 2013a).

Os componentes fenólicos são citados como os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas desses óleos, dentre os mais estudados estão o timol, carvacrol e eugenol.

Diversas propostas podem ser encontradas na literatura em relação ao mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre as bactérias. Uma importante característica dos óleos essenciais e seus constituintes é a hidrofobicidade, que lhes conferem capacidade para alterar a permeabilidade da membrana celular e mitocondrial, tornando-as mais permeáveis com consequentes perdas de íons e moléculas (BURT, 2004; GOÑI et al., 2009).

Existem contradições relacionadas à eficácia dos óleos essenciais contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Burt (2004); Mith et al. (2014) e Ouattara et al. (1997) relataram que óleos essenciais são mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas. As células Gram-positivas são mais rígidas devido à maior quantidade de peptidoglicano na parede, enquanto as Gram-negativas apresentam uma membrana externa envolvendo a parede celular que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura lipopolissacarídica. De acordo com Bouhdid et al. (2009), o óleo de orégano (rico em carvacrol) inativa as células de *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria Gram-negativa), interrompendo a permeabilidade e função da membrana, levando à perda de componentes citosólicos, com o vazamento de íons de potássio e redução da viabilidade celular. Ao contrário, no caso de bactérias Gram-positivas, como o *Staphylococcus aureus*, o potencial de membrana e a permeabilidade das células da membrana foram afetadas pela concentração de óleo e tempo de contato. A Figura 2.4 apresenta esquematicamente a parede celular das bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.

Figura 2.4. Parede celular das bactéria Gram-negativa e Gram-positiva.

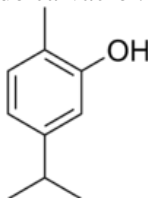


(Fonte: Desconhecido)

2.4.2. Carvacrol

O Carvacrol (Figura 2.5) é um monoterpreno fenólico, com característica pungente e odor picante, levemente amarelo, de baixa viscosidade, praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes como etanol e acetona. É encontrado naturalmente em plantas como orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*). É um aditivo alimentar geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (FDA, 2015). Em alimentos, foi reportado em bebidas alcoólicas e não alcoólicas, produtos de panificação, gomas de mascar, sorvetes, gelatinas, condimentos e doces (BURDOCK, 2010). A Tabela 2.1 apresenta algumas características físico-químicas do carvacrol.

Figura 2.5. Estrutura molecular do carvacrol.



(Fonte: de Vincenzi et al., 2004)

Tabela 2. 1. Características físico-químicas do carvacrol, a 25 °C.

Característica	
Massa molar (g/mol)	150,22
Pressão de vapor (Pa)	6,4
Coefficiente de partição (log P) (octanol/água)	3,52
Solubilidade em água (g/L)	0,11
Ponto de ebulição (°C)	238

(Fonte: Arfa et al., 2006)

Estudos realizados com o carvacrol mostraram amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BEN ARFA et al., 2006; LAMBERT et al., 2001; NOSTRO et al., 2009).

Arfa et al. (2006) estudaram o modo de ação do carvacrol através da comparação da estrutura química com a de outros compostos (eugenol, mentol, éter metil carvacrol e acetato de carvacrol), relacionando quanto à hidrofobicidade e à presença de grupo hidroxila desses compostos. O carvacrol apresentou maior efeito antibacteriano. Segundo os autores, os compostos lipofílicos possuem uma elevada afinidade pelas membranas

celulares e as suas inserções induzem alterações nas propriedades físico-químicas das membranas. Os compostos hidrofóbicos são relatados como os mais tóxicos e a membrana citoplasmática é frequentemente o local principal da ação. As interações entre os compostos antimicrobianos e as membranas celulares afetam tanto a ordenação de lipídeos e a estabilidade da bicamada, resultando na diminuição de integridade da membrana e aumento do fluxo de prótons através da membrana.

Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) sugerem que o grupo hidroxila e a presença de um sistema de ressonância de elétrons são importantes para a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, tais como o carvacrol e timol. Tal estrutura permite que o composto atue como permutador de prótons, reduzindo, assim, o gradiente através da membrana citoplasmática, resultando no colapso da força motriz do próton e esgotamento de ATP (adenosina trifosfato), ocasionando a morte celular.

Silva-Angulo et al., (2014) estudaram a cinética de crescimento de *Listeria innocua* e *L. monocytogenes* sob a exposição ao carvacrol (100 e 175 mg/L) em duas concentrações iniciais de inóculo (10^2 e 10^6 UFC/mL). Os autores observaram que o tamanho do inóculo afeta o efeito antibacteriano do carvacrol e deve ser levado em consideração nos estudos cinéticos de crescimento. A maior concentração de carvacrol reduziu em diferentes magnitudes a população bacteriana, a redução foi de aproximadamente 3 log e inferior a 1 log, para os inóculos iniciais de 10^2 e 10^6 UFC/mL, respectivamente.

Higueras et al. (2014) incorporaram carvacrol em filmes de quitosana/ciclodextrina para inibir o crescimento microbiano em filés de peito de frango embalados em PP/EVOH/PP (EVOH - Etileno álcool vinílico). Durante os 9 dias de armazenamento, a embalagem forneceu transporte infinito de carvacrol, sendo liberado rapidamente grande quantidade e absorvido principalmente pelos filés de frango, devido provavelmente à compatibilidade química entre proteínas do frango e carvacrol. Com o maior filme testado (24 cm²), a inibição microbiana variou de 0,3 log, para as bactérias ácido lácticas, a 1,8 log, para leveduras e fungos, no entanto a grande quantidade de carvacrol absorvida pelo filé de frango ocasionou em alteração sensorial inaceitável.

Belda-Galbis et al. (2014) determinaram a concentração inibitória mínima (MIC) do carvacrol em diferentes temperaturas (8 a 37 °C) de incubação contra as bactérias *Escherichia coli* K12 e *L. innocua*. A *E. coli* apresentou menor resistência ao antimicrobiano, para a maior temperatura o MIC foi de 0,14 µL/mL, e sem crescimento para a menor temperatura.

Para a *L. innocua*, o MIC foi de 0,20 e 0,50 $\mu\text{L/mL}$, com as temperaturas 37 e 8 °C, respectivamente.

Nair et al. (2015) avaliaram a eficácia antimicrobiana de diferentes concentrações de carvacrol em embalagem com atmosfera modificada (MAP) (alto teor de CO_2) contra bactérias ácido lácticas, *Salmonella* e *Campylobacter* em peito de peru armazenados por até três semanas sob refrigeração. A combinação de MAP com 0,25% e 1% de carvacrol resultou na redução de 1 e 2 log UFC/g, respectivamente, para ambas as bactérias *Salmonella* e *Campylobacter*, em 7 dias armazenamento a 4 °C, enquanto apenas o MAP não foi eficiente. Para as bactérias ácido lácticas, tanto o uso de MAP como a combinação com o carvacrol foram eficientes, com redução, após 21 dias de armazenamento, de 2 e 3 log UFC/g, para o MAP e para MAP com 1% de carvacrol, respectivamente. A cor e o pH da carne não foram alterados com os tratamentos.

2.5. USO DE ACETATO DE CELULOSE COMO EMBALAGEM ATIVA

A facilidade em alterar as características da matriz polimérica do acetato de celulose tem sido extensamente estudada na área de membranas e farmacêutica. Diversos estudos podem ser encontrados referentes a alterações nas propriedades do acetato de celulose, principalmente na área das membranas. Essas alterações foram demonstradas através de uso de diferentes solventes, não solventes (COWIE; RANSON, 1971; FERREIRA JÚNIOR et al., 2011; NOVIKOV; VARLAMOV; MNATSAKANOV, 2005), plastificantes (CERQUEIRA et al., 2008; AROUS; SAOUD; KERDJOU DJ, 2010; NOVIKOV; VARLAMOV; MNATSAKANOV, 2005; RODRIGUES FILHO et al., 2007), alterações na técnica de *casting* (como temperatura e tempo de secagem, espessura da solução filmogênica) (AROUS; SAOUD; KERDJOU DJ, 2010; PATEL; PATEL; PATEL, 1978; WALLNER et al., 2004), adição de argilas (RODRÍGUEZ et al., 2012b, 2012a; SENGUPTA et al., 2007) e nanopartículas, promovendo alterações nas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor da água e oxigênio, porosidade, tamanho dos poros, estabilidade térmica.

Em relação ao uso de acetato de celulose como embalagem ativa, os estudos são mais recentes, sendo encontrados a partir de 2009, os quais testaram a eficácia dos filmes apenas contra bactérias patogênicas, não sendo encontrado nenhum estudo de embalagem ativa de acetato de celulose contra bactérias deteriorantes de alimentos.

Gemili, Yemenicioglu e Altinkaya (2009) prepararam filmes antimicrobianos à base de acetato de celulose contendo lisozima. A fim de conseguir a liberação controlada de lisozima, a estrutura dos filmes foi alterada de altamente assimétrica e porosa para densa, através da alteração da composição da solução filmogênica. O aumento do teor de AC na solução filmogênica resultou na diminuição da taxa de liberação, da atividade máxima da lisozima liberada e da atividade antimicrobiana (*Escherichia coli* e *Bacillus amyloliquefaciens*), e aumento da resistência à tração. A incorporação de lisozima nas películas preparadas com soluções filmogênicas de 5 e 10% de AC, não provocou alterações nas propriedades mecânicas, no entanto, com 15% de AC essas propriedades foram diminuídas. Os resultados demonstraram que as estruturas dos filmes podem ser adaptadas alterando a composição da solução filmogênica.

Gemili Yemenicioglu e Altinkaya (2010) também estudaram a incorporação de antioxidantes ácido L-ascórbico e L-tirosina. Os filmes apresentaram estrutura assimétrica, parte densa e porosa. O aumento do teor do polímero na solução filmogênica formou filmes mais densos e reduziu a difusão dos antioxidantes através do polímero. O uso de diferentes antioxidantes causou diferentes alterações nas propriedades morfológicas e mecânicas dos filmes.

Uz e Altinkaya (2011) prepararam filmes mono e multicamadas à base de acetato de celulose incorporados com sorbato de potássio, como agente antimicrobiano, utilizando a técnica de *casting* por inversão de fase seca. Para conseguir a liberação controlada do agente, a estrutura dos filmes foi modificada alterando a composição da solução filmogênica, a espessura e a temperatura de secagem. A taxa de liberação diminuiu à medida que foi aumentado o teor de AC na solução filmogênica, a espessura e a temperatura de secagem dos filmes. Os filmes monocamadas apresentaram formação de cristais de sorbato de potássio induzido pela secagem, como consequência, ocorreu rápida liberação inicial, seguida por liberação mais lenta controlada pela dissolução de cristais. Em filmes multicamadas a taxa de liberação foi regulada apenas pela difusão do composto através do filme.

Gouvêa et al. (2015) avaliaram a eficiência de filmes de AC incorporados com até 5% de bacteriófago. A incorporação de bacteriófago não promoveu alterações drásticas nas propriedades físicas e mecânicas dos filmes e apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria *Salmonella Typhimurium*. Os bacteriófagos permaneceram viáveis durante 14 dias, após esse tempo, não foram mais detectados nos filmes.

Pola et al. (2016) produziram filmes ativos à base de AC incorporados com até 60% de óleo essencial de orégano e até 2,5% argila montmorilonita organofílica, para controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos. Os filmes ativos apresentaram alta atividade antifúngica, principalmente na fase vapor. A argila apresentou boa dispersão na matriz do filme, aumentou a rigidez e a resistência térmica e reduziu a permeabilidade ao oxigênio. O óleo atuou como plastificante, aumentou a elongação e reduziu a permeabilidade ao vapor da água. O óleo e a argila melhoraram a resistência térmica dos filmes.

Rodríguez et al. (2014) incorporaram organoargila e 2% de timol em filmes de AC, a argila aumentou a opacidade e atividade antimicrobiana (*Listeria innocua*) e timol apresentou efeito plastificante.

Espitia et al. (2013) estudaram o efeito da incorporação de pediocina em filmes de acetato de celulose e a aplicação na preservação de mortadela para inibição de *Listeria monocytogenes*. Foram testados filmes com até 50% de pediocina, o qual diminuiu a tensão na ruptura e a permeabilidade ao vapor da água, e reduziram o crescimento da bactéria em 1,2 ciclo log após nove dias, evitando a formação de biofilmes na superfície da embalagem e da mortadela.

Em um trabalho realizado no nosso grupo de pesquisa na UFSC, Paganini (2017) estudou o efeito do filme de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de orégano em presunto na presença da bactéria *W. viridescens*. O uso de 15% (m/m) do óleo essencial no filme ocasionou no aumento da vida útil do presunto de 9 para 16 dias.

CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA ADIÇÃO DE CARVACROL NAS CARACTERÍSTICAS DOS FILMES DE ACETATO DE CELULOSE

3.1. INTRODUÇÃO

A definição de uma metodologia para a obtenção de filmes com características adequadas para sua aplicação como embalagem deve ser investigada. O presente capítulo apresenta a escolha da metodologia para obtenção de filmes de acetato de celulose e a investigação dos efeitos da composição da solução filmogênica (SF) e da adição do composto antimicrobiano nas características dos filmes.

Através da adição de solventes e não-solventes é possível a alteração da porosidade, opacidade, densidade, permeabilidade, assimetria, além disso, a facilidade de distribuir compostos, como plastificantes, entre as cadeias poliméricas, leva a alterações significativas em sua estrutura (EDGAR et al., 2001; FERREIRA JÚNIOR et al., 2011; FISCHER et al., 2008; GUO, 1993; PELTZER; WAGNER; JIMÉNEZ, 2009).

A estrutura macromolecular dos polímeros proporciona-lhes características peculiares em termos de propriedades químicas, físicas e mecânicas. A condição de processamento é um fator importante para a obtenção de propriedades adequadas do produto final, pois afeta a estrutura molecular do produto. Portanto, a correlação entre o processamento, a estrutura e as propriedades do polímero é fundamental para dominar a tecnologia da transformação de materiais poliméricos (CANEVAROLO JR, 2004).

As propriedades dos materiais poliméricos podem ser alteradas pelo método utilizado para a obtenção do produto final, afetando a coesão da matriz polimérica formada que, por sua vez, está relacionada com a distribuição e a concentração de interações inter e intramoleculares na estrutura filmogênica. Em filme formado pelo método de *casting* a velocidade de evaporação do solvente e a adição de outros compostos (plastificantes, compatibilizadores, aditivos) são fatores que podem alterar as características do produto final (CANEVAROLO JR, 2004; WARD; SWEENEY, 2004; WASILKOSKI, 2006).

Compostos oleosos, como o carvacrol, podem agir como plastificante em polímeros. No acetato de celulose, plastificante interfere nas ligações de hidrogênio intermoleculares, alterando a densidade de energia coesiva e volume livre do sistema (BAO; LONG; VERGELATI, 2015; MEIER et al., 2004).

O objetivo desse capítulo foi a obtenção e caracterização de filmes de acetato de celulose ativo com carvacrol empregando a técnica de *casting*. Os filmes foram obtidos com diferentes metodologias, variando a concentração de acetato de celulose, o solvente e velocidade de secagem. Os filmes obtidos com solventes de diferentes taxas de evaporação foram avaliados quanto a morfologia, propriedades mecânicas, físicas e químicas. O carvacrol foi adicionado à solução filmogênica e os filmes foram caracterizados, afim de avaliar as alterações e interações entre o carvacrol e a matriz polimérica.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS


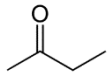
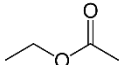
3.2.1. Materiais

Foram utilizados acetato de celulose (AC) com grau de substituição de 2,5 cedido pela empresa Rhodia de São Paulo, acetona (pureza: 99%, marca: Lafan), butanona (pureza: 99%, marca: Vetec), acetato de etila (pureza: 99%, marca: CRQ) e carvacrol (pureza: >98%, marca: Sigma).

3.2.2. Obtenção dos filmes

Para o preparo das soluções filmogênicas (SF) o acetato de celulose foi solubilizado acetona (AC/Acet), butanona (AC/But) e acetato de etila (AC/Eti). A Tabela 3.1 apresenta algumas propriedades dos solventes utilizados.

Tabela 3. 1. Propriedades dos solventes utilizados para o preparo das SF.

Solvente	Ponto de ebulição (°C)	Pressão de vapor (kPa) (20 °C)	Fórmula estrutural
Acetona	56	24,6	
Butanona	80	10,5	
Acetato de etila	77	9,8	

Fonte: (IFA, <http://www.dguv.de/ifa/index-2.jsp>)

O método utilizado para o preparo das SF e dos filmes foi baseado nos estudos de Altinkaya, Yenal e Ozbas (2005), Gemili et al. (2010) e Gouvêa et al. (2015).

As SF foram preparadas em duas concentrações de AC em relação ao volume de solvente 5 g/100mL (5%) e 10 g/100mL (10%). O AC foi adicionado ao solvente e mantido sob agitação mecânica em temperatura ambiente, até completa solubilização do polímero.

Os filmes foram produzidos pelo método de *casting*. Um volume pré-determinado (10, 20 ou 30 mL) de umas das SF foi espalhado em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro), mantidas niveladas em uma capela com temperatura ambiente (22-25 °C) e umidade relativa de 65-70%. Para garantir uma maior uniformidade da condição ambiente, durante a

evaporação do solvente (secagem dos filmes), foi utilizada uma câmara de vidro contendo sílica azul com abertura inferior para evitar a saturação do solvente internamente (Figura 3.1).

Figura 3.1. Câmara para secagem dos filmes de acetato de celulose.



Foram realizados 2 procedimentos para a evaporação do solvente, um com placa de Petri aberta (secagem rápida) e o outro com a placa fechada (secagem lenta). Após a secagem, os filmes foram removidos das placas e caracterizados qualitativamente, conforme descrito a seguir.

3.2.3. Caracterização qualitativa

A análise qualitativa dos filmes foi realizada logo após a secagem (evaporação do solvente) e baseou-se no método de Gontard (1991), com modificações. Foram verificados os seguintes atributos dos filmes:

- i) continuidade (ausência de ruptura após a secagem);
- ii) manuseabilidade (facilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura, dureza e/ou facilidade para rasgar);
- iii) uniformidade (ausência de partículas insolúveis, bolhas);
- iv) transparência (ausência de regiões opacas ou manchas);
- v) superfície lisa (ausência de ondulações, rugas).

Os filmes foram aprovados (SIM) ou reprovados (NÃO) em função das características qualitativas acima.

Nesta etapa, a metodologia e os solventes nos quais foram possíveis obter filmes com melhores características qualitativas, foram

selecionados para produção e caracterização dos filmes de acetato de celulose.

3.2.4. Adição do carvacrol

A concentração de carvacrol adicionada à SF foi definida a partir de um estudo prévio de atividade antimicrobiana. Foram adicionados à SF de acetona 0, 50 e 100 mg/g (miligramas de carvacrol por grama de acetato de celulose), correspondente a 0, 5 e 10% de carvacrol em relação ao polímero. A mistura foi mantida sob agitação por 10 min. Dez mililitros da SF contendo o carvacrol foram adicionados às placas de Petri (9 cm de diâmetro), mantidas niveladas em uma capela com temperatura e umidade relativa ambiente (22-25 °C e 65-70%, respectivamente) e com a placa fechada (secagem lenta). Os filmes foram mantidos nas placas de Petri até o momento da utilização.

Os filmes foram codificados da seguinte forma: AC/0, AC/5 e AC/10, para as porcentagens de 0, 5 e 10% de carvacrol, respectivamente.

3.2.5. Propriedades físicas

Espessura e massa específica aparente

A espessura dos filmes foi determinada com micrômetro digital (Mitutoyo Co., Japão) com sensibilidade de 0,001 mm. Foram realizadas medidas em três regiões de cerca de 20 amostra de cada filme.

A massa específica aparente foi calculada considerando a massa do filme (g) e o volume (cm³) ocupado pelo filme seco na placa de Petri de 9 cm de diâmetro.

Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada com base no método adotado por Tunç e Duman (2011) utilizando espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo, SP). Os filmes foram cortados e colocados no compartimento de amostra do espectrofotômetro, o compartimento vazio foi usado como branco. Foram realizadas as leituras de 5 filmes em triplicata no comprimento de onda de 600 nm. A opacidade (*Op*) dos filmes foi calculada pela Equação 3.1, na qual *Abs*₆₀₀ é o valor da absorvância em 600 nm e *L* é a espessura do filme (mm).

$$Op = \frac{Abs_{600}}{L} \quad (3.1)$$

3.2.6. Caracterização quanto a interação com a água

Grau de intumescimento (GI)

A determinação do GI foi baseada no método proposto por Xu, Bartley e Johnson (2003). Os filmes foram pesados e imergidos em Becker contendo 500 mL de água destilada, a 23 °C. A cada 15 min os filmes eram retirados, secados com papel toalha para remoção da água superficial e pesados, procedimento repetido até a massa dos filmes permanecerem constantes. O GI foi calculado pela Equação 3.2, onde M_f é a massa final do filme e M_0 a massa inicial do filme, o resultado é expresso em percentual de água absorvida. A análise foi realizada em triplicata.

$$GI(\%) = \frac{(M_f - M_0)}{M_f} \times 100 \quad (3.2)$$

Ângulo de contato

O ângulo de contato foi determinado através do método estático de gota séssil utilizando o goniômetro Ramé-Hart (modelo 250, Succasunna, EUA), a 20 °C. Uma gota de água de 2,5 µL, formada na ponta de uma microsseringa, foi colocada na superfície do filme e as imagens da gota foram capturadas por uma câmera (MORAES et al., 2013).

Os ângulos esquerdo e direito das imagens das gotas de água foram medidos utilizando o programa Ramé-Hart DROPimage Avançado (Succasunna, EUA). A análise foi realizada em duplicata em 5 filmes de cada amostra.

Permeabilidade ao vapor da água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi realizada por método gravimétrico, de acordo com a metodologia descrita na norma ASTM E96/E96M-10 (ASTM, 2010). Três filmes de cada amostra foram colocados em cápsulas de alumínio contendo CaCl₂ seco (cloreto de cálcio, UR = 2%) vedadas por *o-ring* e fechadas por parafusos e acondicionados em câmara a 25 °C e umidade controlada por NaCl (cloreto de sódio, UR = 75%).

O vapor de água permeado através do filme foi mensurado em intervalos pré-determinados a partir do ganho de massa do CaCl₂, calculado pela Equação 3.3.

$$PVA = \frac{wL}{AP_s(a_{w1} - a_{w2})} \quad (3.3)$$

na qual, w é a taxa de permeação de água pela cápsula (g/h), L a espessura do filme (m), A é a área de permeação (m²), P_s é a pressão de saturação do vapor de água a 25 °C (Pa) e a_{w1} e a_{w2} são as atividades de água no exterior e interior da cápsula.

A taxa de permeação da água para cada filme foi estimada pelo coeficiente angular da regressão linear massa de água (g) *versus* tempo (h).

3.2.7. Propriedades Mecânicas

A tensão de ruptura, a elongação na ruptura e o módulo de Young dos corpos-de-prova foram determinados com base no método da norma D882-12 (ASTM, 2012a). O teste foi realizado em texturômetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems) auxiliados pelo programa Texture Expert Exceed 2.61 (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra). Os filmes foram cortados em corpos-de-prova de 60x25 mm e fixados por garras a uma distância inicial de 40 mm. A velocidade de tração foi de 0,8 mm/s. A análise foi realizada em 20 amostras de cada filme.

3.2.8. Propriedades morfológicas e estruturais

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os filmes de acetato de celulose foram caracterizados utilizando o microscópio eletrônico de varredura (modelo JSM-6390LV, Jeol, USA) com fonte de elétrons de tungstênio e detector de elétrons secundários e retro-espalhados.

O preparo das amostras foi realizado com a fixação dos filmes em um suporte metálico (*stub*) por meio de uma fita adesiva dupla face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro, sob vácuo, utilizando um metalizador (Baltec SCD 0005).

Foram realizadas micrografias da superfície exposta ao ar durante a secagem e da fratura criogênica dos filmes, com ampliação de 50 a 4000 vezes e tensão de aceleração de 10 kV.

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

As alterações nas ligações químicas dos filmes foram avaliadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

(FTIR) utilizando o espectrômetro FTIR Spectrometer (Agilent Technologies, Cary 600 Series). As análises foram realizadas utilizando o acessório de refletância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance - ATR*) e um dispositivo que permitiu aplicar pressão sobre a amostra, a fim de melhorar o contato físico com a superfície do cristal (ZnSe) do equipamento. As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal. Os espectros foram com a média de 20 *scans* na faixa de número de onda de 4000-400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

Microscopia confocal por fluorescência

A presença e localização do carvacrol no filme foi visualizada por microscopia confocal por fluorescência, utilizando vermelho de Nilo como marcador fluorescente lipofílico. O carvacrol foi tingido com 0,1 g do marcador por 1 g de carvacrol.

Com o carvacrol tingido, foram preparados os filmes conforme metodologia descrita no item 3.2.4.

A análise foi realizada em microscópio confocal (CTR 6500, Leica Microsystems, Alemanha) e os espectros de emissão para o vermelho do Nilo foram detectados no comprimento de onda de 550 a 630 nm.

3.2.9. Propriedades térmicas

Análise termogravimétrica

A degradação térmica foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA) utilizando o equipamento NETZSCH (TG 449 F3 Jupiter). Aproximadamente 10 mg de amostra adicionada em uma panela de platina. Os termogramas foram obtidos em uma faixa de temperatura de 20 a 650 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Calorimetria exploratória diferencial

Os filmes e o *pellet* de AC foram analisados em calorímetro Perkin-Elmer, Jade (Massachusetts, USA), previamente calibrado com índio e zinco, de acordo com o método ASTM da D3418-12e1 (ASTM, 2012b). As amostras foram fechadas em cápsulas de alumínio. Os termogramas foram obtidos em uma faixa de temperatura de 0 a 250 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os resultados foram analisados com auxílio do programa Pyris DSC, onde mudanças de primeira ordem (entalpia de vaporização (ΔH_v) e fusão (ΔH_f)) foram calculadas pela variação de entalpia utilizando-se a integração da área do pico, obtidas no

primeiro aquecimento das amostras. As mudanças de segunda ordem (temperatura de transição vítrea (T_g)) foram detectadas no segundo aquecimento das amostras, e obtidas quando ocorria descontinuidade da linha base (descontinuidade do calor específico na amostra) e determinadas pela interseção da reta que extrapola a linha base com outra linha tangente ao ponto de inflexão da curva. Amostras de filmes contendo de 0 a 10% de carvacrol foram avaliados para determinar a influência do carvacrol na T_g do filme.

3.2.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente com o programa *Statistica 12* (Dell, USA). Para os filmes obtidos com os solventes acetona e butanona as médias foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), pelo teste de Tukey a 95% de confiança e para os filmes contendo carvacrol as médias foram comparadas utilizando o teste t a 95% de confiança.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Análise qualitativa dos filmes

O tempo para solubilização do acetato de celulose (AC) e obtenção das soluções filmogênicas (SF) contendo 5% AC foi de aproximadamente 24 h com os solventes butanona e acetato de etila e cerca de 2 h para a acetona. Devido à maior solubilidade do polímero em acetona, foi possível a obtenção de SF com concentração de 10% de AC.

O tempo de secagem dos filmes foram de aproximadamente 2 e 24 h para a acetona (AC/Acet) e de 12 e 72 h para butanona (AC/But) e acetato de etila (AC/Etil), comparando-se as placas abertas e fechadas, respectivamente. A avaliação qualitativa dos filmes está apresentada na Tabela 3.2 e na Figura 3.2.

Todas as SF foram capazes de formar filmes. No entanto, a alta viscosidade da SF de acetona com 10% de AC dificultou o espalhamento na placa de Petri. Além disso, os filmes obtidos ficaram enrugados e duros (linhas 1 e 2 da Tabela 3.2). Essa SF foi considerada inadequada para dar continuidade nesse estudo.

A SF contendo 5% de AC apresentou uma viscosidade ideal para o espalhamento nas placas de Petri. Os filmes não apresentaram rasgos após a secagem e se soltaram facilmente da placa de Petri. A adição de 20 e 30 mL de SF nas placas formaram filmes muito duros e com manchas brancas (linhas 5, 6, 9, 10, 13 e 14 da Tabela 3.2). A adição de 10 mL da SF formou filmes menos duros e com facilidade para rasgar.

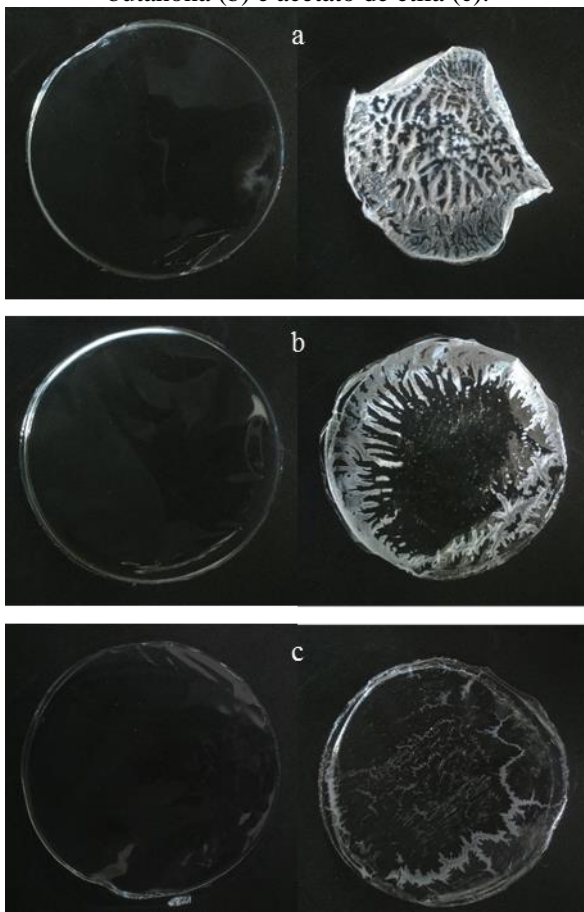
A secagem mais lenta, obtida com a placa de Petri fechada, melhorou a qualidade dos filmes (imagens da esquerda da Figura 3.2). Os filmes AC/Etil não apresentaram uniformidade, com a presença de bolhas e pequenas partículas não dissolvidas (linhas 11-14 da Tabela 3.2, Figura 3.2 c). Os filmes AC/Acet e AC/But ficaram uniformes, transparentes, e superfícies lisas (Figura 3.2 a e b).

Na secagem rápida, para os 3 solventes observou-se a presença de manchas brancas, superfície enrugada e encolhimento dos filmes (imagens da direita da Figura 3.2). As manchas brancas estão relacionadas com a secagem mais rápida da superfície dos filmes, aprisionando o solvente no interior. Enquanto o encolhimento está relacionado com a instabilidade do sistema devido à rápida evaporação do solvente, sem tempo suficiente para organização das cadeias poliméricas, ocasionado em maior tensão e formação de cadeias mais emaranhadas.

Tabela 3. 2. Avaliação qualitativa dos filmes de acetato de celulose obtidos com os solventes acetona (AC/Acet), butanona (AC/But) e acetato de etila (AC/Etil).

Filme	Nº da linha	AC (%)	VOLUME (mL)	Secagem	Continuidade	Manuseabilidade	Uniformidade	Transparência	Superfície lisa
AC/Acet	1	10	10	Rápida	Sim	Não	Sim	Sim	Não
	2	10	10	Lenta	Sim	Não	Sim	Sim	Não
	3	5	10	Rápida	Sim	Não	Sim	Não	Não
	4	5	10	Lenta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
	5	5	20	Rápida	Sim	Não	Sim	Não	Não
	6	5	30	Rápida	Sim	Não	Sim	Não	Não
AC/But	7	5	10	Rápida	Sim	Não	Sim	Não	Não
	8	5	10	Lenta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
	9	5	30	Rápida	Sim	Não	Sim	Não	Não
	10	5	30	Lenta	Sim	Não	Sim	Sim	Não
AC/Etil	11	5	10	Rápida	Sim	Não	Não	Sim	Não
	12	5	10	Lenta	Sim	Não	Não	Sim	Não
	13	5	30	Rápida	Sim	Não	Não	Não	Não
	14	5	30	Lenta	Sim	Não	Não	Sim	Não

Figura 3.2. Filmes de acetato de celulose obtidos pelos dois métodos de secagem: lenta (esquerda) e rápida (direita), e os solventes acetona (a), butanona (b) e acetato de etila (c).



Dessa forma, a partir da caracterização qualitativa dos filmes de AC, foram selecionados os solventes acetona e butanona, com a SF contendo 5% (m/v) de AC, adição de 10 mL da SF na placa de Petri e secagem lenta (placa de Petri fechada) (linhas 4 e 8 da Tabela 3.2, imagens da esquerda a e b da Figura 3.2), para serem avaliados quanto às alterações causadas nas características dos filmes.

3.3.2. Caracterização dos filmes produzidos com os solventes butanona e acetona

Na Tabela 3.3 estão apresentadas as características físicas (espessura, massa específica aparente e opacidade), interação com a água (grau de intumescimento e ângulo de contato) e propriedades mecânicas (tensão na ruptura, alongação e módulo de Young) dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).

Tabela 3. 3. Média e desvio padrão das características físicas, interação com a água e propriedades mecânicas e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).

Análise	AC/But	AC/Acet
Espessura (mm)	0,030 ± 0,004 ^b	0,038 ± 0,003 ^a
Massa específica (g/cm ³)	1,17 ± 0,04 ^a	1,08 ± 0,08 ^a
Opacidade (%)	1,45 ± 0,05 ^b	1,10 ± 0,03 ^a
Grau de intumescimento (%)	6,87 ± 0,18 ^a	6,71 ± 0,08 ^a
Ângulo de contato (°)	60,71 ± 0,64 ^a	66,80 ± 1,63 ^b
Tensão na ruptura (MPa)	71,58 ± 4,39 ^a	59,86 ± 2,95 ^b
Elongação (%)	4,42 ± 0,98 ^a	3,29 ± 0,67 ^a
Módulo de Young (MPa/%)	24,51 ± 0,64 ^a	21,70 ± 1,40 ^b

Letras iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa ($p \leq 0,05$) no t-teste.

Características físicas

Filmes formados com o solvente butanona (AC/But) apresentaram menor espessura ($0,030 \pm 0,004$ mm), quando comparados com os filmes obtidos com o solvente acetona (AC/Acet) ($0,038 \pm 0,003$ mm). A massa específica dos filmes AC/But foi maior do que para AC/Acet, com valores médios de 1,17 e 1,08 g/cm³, respectivamente (Tabela 3.3). Segundo Bao (2015), filmes produzidos com menores taxas de secagem são mais densos. Para os filmes AC/Acet, devido à evaporação mais rápida da acetona, as cadeias poliméricas não têm tempo suficiente para se organizarem, o que pode resultar em filmes com menor massa específica e estrutura mais amorfa.

A opacidade do filme AC/Acet foi ligeiramente menor do que para AC/But, os valores obtidos são característicos de filmes transparentes. Em geral, polímeros amorfos são transparentes, enquanto os cristalinos

podem ser translúcidos, opacos ou transparentes, dependendo do grau de cristalinidade, tamanho dos cristais e da posição entre eles (CANEVAROLO JR, 2004).

Interação com a água

O grau de intumescimento (Tabela 3.3) dos filmes foi menor que 7% e o tempo para atingir o equilíbrio foi de aproximadamente 90 min. Os filmes não apresentaram alterações visuais após o ensaio. O grau de intumescimento de um polímero está relacionado a sua solubilidade e a interação com o solvente (água). Baixo grau de intumescimento é uma característica desejável para embalagens de alimentos com alto teor de umidade. Para polímeros biodegradáveis, devido a solubilidade em água, muitas vezes a alteração da estrutura polimérica ou a mistura com outros polímeros se faz necessária. Kurek et al. (2014a) estudaram o grau de intumescimento de filmes de quitosana produzidos por diferentes métodos, em água os filmes intumescem rapidamente, porém quando exposto ao ar, o grau de intumescimento variou de 53 a 22%, dependendo do método utilizado para obtenção do filme.

O ângulo de contato (Tabela 3.3) foi maior para o filme AC/Acet. Esse resultado pode estar relacionado à secagem mais rápida do filme (principalmente da superfície), causando maior tensão na superfície devido ao menor tempo para organização das cadeias poliméricas, tornando o filme mais hidrofóbico. Além disso, segundo Wu (1982), polímeros mais amorfos apresentam maior ângulo de contato. Outro fato que pode estar relacionado, é que devido a maior organização das cadeias nos filmes AC/But, maior número de hidroxilas estão disponíveis para formar pontes de hidrogênio com a água, aumentando a hidrofiliabilidade. Além disso, as diferentes velocidades de evaporação do solvente podem levar a diferentes morfologias de superfície, alterando a rugosidade da superfície e o ângulo de contato com o material polimérico.

Propriedades mecânicas

Os valores das propriedades mecânicas (Tabela 3.3) foram maiores para AC/But, com diferença significativa para a tensão na ruptura e Módulo de Young.

A tensão na ruptura define a resistência máxima oferecida pelos filmes quando submetidos à tração. Os filmes com maior resistência foram os produzidos com o solvente butanona, com valor médio de 71,58 MPa, enquanto acetona, o valor médio foi de 59,86 MPa.

O Módulo de Young apresentou menores valores para AC/Acet, 21,70 MPa/%, enquanto que para AC/But o valor médio foi de 24,51 MPa/%. O Módulo de Young é uma medida da rigidez do material, portanto quanto maior o módulo mais rígido será o material (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Segundo Canevarolo Jr (2006), o Módulo de Young do polipropileno e de polietilenos aumenta linearmente com a densidade, portanto qualquer variação no procedimento de preparação, que proporcione o aumento na massa específica, também irá aumentar o módulo e a rigidez do polímero. Este mesmo efeito foi observado para os filmes de acetato de celulose, nos quais, aqueles com maior massa específica (AC/But), devido à menor taxa de evaporação do solvente, apresentaram maiores valores para os ensaios de tração, quando comparados aos filmes obtidos com o solvente acetona.

Segundo Sarantópoulos et al. (2002), em geral, os materiais mais rígidos apresentam menor elongação. Em estruturas poliméricas mais amorfas, as cadeias estão emaranhadas e aleatoriamente distribuídas. Em contrapartida, quando há tempo suficiente para as cadeias se tornarem ligeiramente ordenadas, os emaranhados ficam mais contraídos, o que torna a estrutura mais rígida e menos elástica (WARD; SWEENEY, 2004). No entanto, esse efeito não foi observado, os valores obtidos para Elongação de AC/But e AC/Acet não apresentaram diferença significativa, com valores médios de 4,42 e 3,29%, respectivamente.

Morfologia por MEV

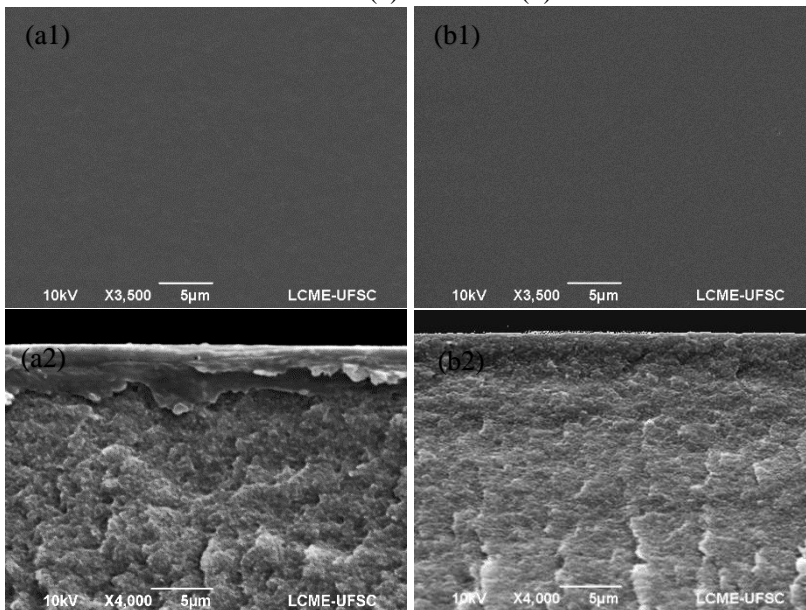
Na Figura 3.3 estão apresentadas as micrografias obtidas pelo MEV da superfície e da fratura dos filmes AC/Acet e AC/But. Para ambos os solventes utilizados é possível observar uma superfície lisa (Figura 3.3 (a1) e (b1)).

As superfícies das fraturas (Figura 3.3 (a2) e (b2)) são típicas de polímeros densos, semelhante ao observado por Ferrarezi et al. (2013) quando utilizado os solventes acetona e ácido acético. As imagens apresentam cavidades originadas durante a fratura dos filmes, essas cavidades são mais rugosas no filme AC/Acet, podendo ser um indicio de modificações na matriz polimérica. Oliveira Junior et al. (2012) também observaram alteração na rugosidade da fratura em filmes de acetato de celulose puro e modificados com metiltrimetoxissilano.

Além disso, é possível observar que a parte superior da fratura, que durante a secagem estava em contato com o ar, apresenta uma película

mais densa. Uz e Altinkaya (2011) também observaram uma assimetria na estrutura do filme de acetato de celulose obtido pelo método de *casting*.

Figura 3.3. Imagens por MEV da superfície (1) e fratura (2) dos filmes AC/Acet (a) e AC/But (b).



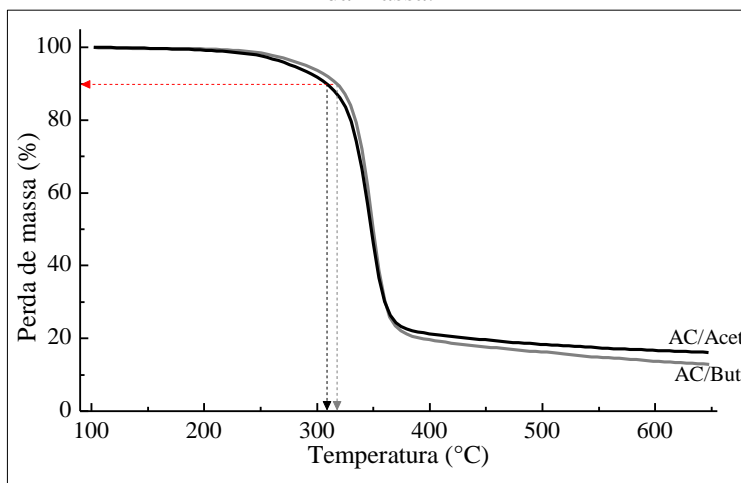
Segundo Wong, Altinkaya e Mallapragada (2005), conjuntamente à evaporação do solvente, ocorre a formação de uma película vítrea na superfície do polímero exposto ao ar, criando duas regiões no filme: i) região vítrea, próximo da interface polímero-ar, com diminuição na mobilidade do polímero e aumento na resistência de difusão do solvente; e ii) região elástica, abaixo da região vítrea, onde ocorre a formação de cristais devido aos espaços vazios formados durante a secagem, facilitando a mobilidade das cadeias poliméricas, e diminuindo a taxa de difusão do solvente, pois o solvente precisa difundir em torno dos cristais.

Dessa forma, devido à maior volatilidade da acetona, primeiramente ocorre a secagem da superfície, favorecendo a formação da película visível nas micrografias.

Propriedades térmicas

Os termogramas obtidos na análise de TGA para os filmes AC/But e AC/Acet estão apresentados na Figura 3.4. As curvas de TGA dos filmes praticamente se sobrepõem. AC/But e AC/Acet perderam 10% de massa nas temperaturas de 309 e 318 °C, respectivamente, a maior temperatura para os filmes pode estar relacionada à maior cristalinidade da matriz polimérica, pois quanto maior a cristalinidade, maior temperatura é necessária que ocorra a degradação.

Figura 3.4. Termogramas de TGA dos filmes produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet), (---) perda de 10% da massa.



Assim como o observado por Hanna et al. (1999), Moraes et al. (2015) e Oliveira Junior et al. (2012), a degradação do acetato de celulose ocorre em três estágios, o primeiro estágio, com pequena perda de massa, é decorrente da evaporação de matéria volátil, o segundo estágio que inicia até próximo a 250 °C e termina em aproximadamente 370 °C, corresponde a degradação térmica dos grupos acetila e das cadeias do acetato de celulose e o terceiro estágio, após 370 °C, corresponde a carbonização dos produtos em cinzas.

Os termogramas obtidos na primeira varredura da análise de DSC são mostrados na Figura 3.5, e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 3.4.

Figura 3.5. Termogramas de DSC da 1ª verredura do *pellet* (AC/*pellet*) e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).

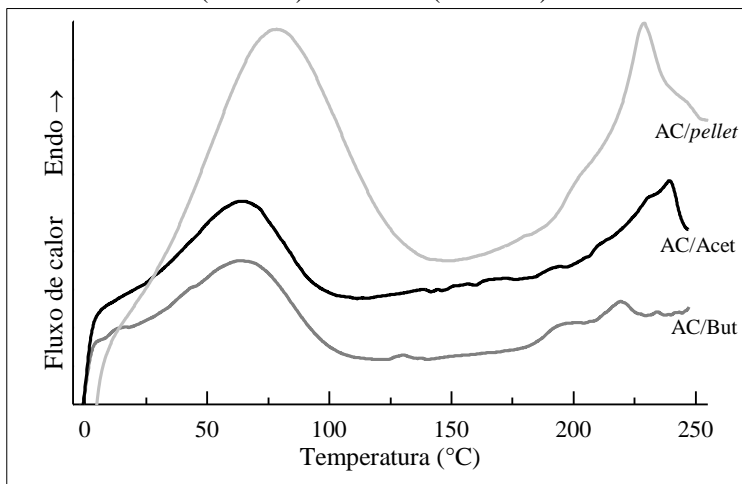


Tabela 3. 4. Propriedades térmicas do *pellet* (AC/*pellet*) e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).

Filme	ΔH_v (J/g)	T_v (°C)	ΔH_f (J/g)	T_f (°C)	T_g (°C)
AC/ <i>pellet</i>	78	77	10	229	184
AC/But	55	67	-	219	182
AC/Acet	54	65	-	239	187

ΔH_v , entalpia de vaporização; T_v , temperatura de vaporização; ΔH_f , entalpia de fusão; T_f , temperatura de fusão e; T_g , temperatura de transição vítrea.

As amostras apresentaram dois fenômenos de 1ª ordem. O primeiro correspondente a vaporização dos compostos retidos no material, como solvente e água (processo endotérmico), com pico de absorção de energia em temperaturas inferiores a 78 °C. O segundo corresponde à fusão do polímero (endotérmico), com pico de absorção de energia entre 219 e 239 °C.

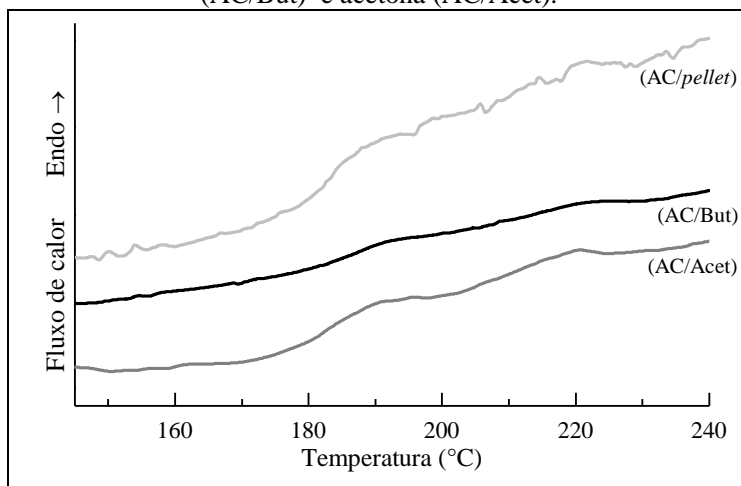
A fusão é um processo térmico que ocorre na parte cristalina do polímero, e quanto maior a cristalinidade maior a energia necessária para ocorrer esse fenômeno. No entanto, as entalpias envolvidas nas fusões dos filmes (ΔH_f) são difíceis de determinar e não foram calculadas. Esse

fenômeno sugere a formação de dois picos de fusão, devido a assimetria dos filmes observado nas micrografias de MEV (Figura 3.3), formando duas regiões cristalinas distintas, assim como relatado por Meier et al. (2004).

O ΔH_f do *pellet* de acetato de celulose foi de 10 J/g, a partir desse valor foi possível calcular a cristalinidade, sendo obtido um valor de 17% de cristalinidade. Para a obtenção da cristalinidade dos filmes AC/But e AC/Acet deverá ser empregado outra técnica. Bao (2015) obteve o grau de cristalinidade do AC variando entre 9 e 16%, através da análise por DRX (Difração de raios X). De fato, o GS 2,45 é composto de pelo menos 50% de monômero triacetato de celulose, devido a essa quantidade, podem ser formados sistemas micro-cristalinos, o que resulta num certo grau de cristalinidade.

Em relação a T_g obtida no termograma da 2ª varredura do DSC (Figura 3.6, Tabela 3.4), a amostra *pellet* e dos filmes apresentaram a T_g entre 182 e 187 °C, valor esses maiores que os obtidos por Oliveira Junior et al. (2012), de 161 °C, e próximos ao obtido por Meier et al. (2004), de 190 °C.

Figura 3.6. Termogramas de DSC da 2ª varredura do *pellet* (AC/*pellet*) e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).



Romero, Leite e Gonçalves (2009) compararam a T_g filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes acetona e ácido acético, obtendo temperaturas de 161 e 211°C, respectivamente. A presença de grupos acetila e hidroxilas promovem interações intra e intercelular nas cadeias de AC por ligações de hidrogênio. Estas ligações entre segmentos vizinhos tornam o polímero rígido, resultando em altas temperaturas de transição vítrea.

A Tabela 3.5 apresenta de forma simplificada os resultados da caracterização dos filmes obtidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet). Ao alterar a taxa de secagem é possível a obtenção de filmes com diferentes características. Com a maior taxa de secagem (uso de acetona como solvente) foi obtido filme mais espesso, menos opaco, mais hidrofóbico, menores propriedades mecânicas, resultados esses relacionados com a secagem mais rápida dos filmes, com formação de uma matriz polimérica mais emaranhada. Filme obtido com a secagem mais lenta (uso de butanona como solvente) tende à maior organização das cadeias poliméricas, apresentando estrutura mais cristalina, alterando as características dos filmes, pois devido à maior contração das cadeias o filme se torna menos espesso, mais denso e opaco, mais rígido e com maior resistência a ruptura. No entanto, os resultados obtidos com o DSC (temperatura de fusão e de transição vítrea), não corroboram com os demais resultados, pois quanto maior a cristalinidade de um polímero, maior devem ser esses dados térmicos.

Kundu et al. (2003) estudaram a influência no preparo de filmes de PEBD (polietileno de baixa densidade) quanto a diferença nas características devido ao resfriamento em diferentes temperaturas. A taxa de resfriamento e o procedimento de produção dos filmes têm grandes efeitos sobre as propriedades térmicas, morfológicas e mecânicas nos filmes de PEBD. Os filmes obtidos com resfriamento lento apresentaram maior cristalinidade do que com resfriamento rápido, 50 e 36%, respectivamente, no entanto, temperatura de fusão foi a mesma e a tensão na ruptura foi menor para os filmes obtidos pelo resfriado mais lentos.

Romero, Leite e Gonçalves (2009) avaliaram o efeito do solvente nas características dos filmes de acetato de celulose com argila natural. O solvente ácido acético se mostrou mais vantajoso que a acetona, pois promoveu melhor dispersão e esfoliação da argila na matriz do polímero. Segundo os autores a escolha do solvente é um fator importante que afeta a morfologia e propriedades dos filmes e pode ser um parâmetro de processo para produzir filmes com ampla gama de propriedades.

Tabela 3. 5. Resumo da caracterização dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).

Análise	AC/But	AC/Acet
Espessura	-	+
Massa específica aparente	=	=
Opacidade	+	-
Grau de intumescimento	=	=
Ângulo de contato	-	+
Tensão na ruptura	+	-
Elongação	=	=
Módulo de Young	+	-
Formação de película	-	+
Temperatura de fusão	-	+
Temperatura de transição vítrea	-	+

(+: maior valor obtido na análise; -: menor valor obtido na análise; =: valores sem diferença significativa)

Os resultados obtidos para as características dos filmes de acetato de celulose, ambos solventes apresentaram características adequadas, no entanto, a acetona apresenta como principal vantagem a maior pressão de vapor, e como consequência, a obtenção mais rápida dos filmes. Dessa forma, a acetona foi o solvente selecionado para dar continuidade a este estudo.

3.3.3. Caracterização dos filmes com carvacrol

Na Tabela 3.6 estão apresentadas as características físicas (espessura, massa específica aparente e opacidade), interação com a água (grau de intumescimento e ângulo de contato) e propriedades mecânicas (tensão na ruptura, alongação e módulo de Young) dos filmes de acetato de celulose produzidos com o solvente acetona sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

Tabela 3. 6. Média e desvio padrão das características físicas, interação com a água e propriedades mecânicas e dos filmes de acetato de celulose produzidos com os solventes butanona (AC/But) e acetona (AC/Acet).

Análise	AC/0	AC/5	AC/10
Espessura (mm)	0,038 ± 0,003 ^a	0,036 ± 0,004 ^a	0,037 ± 0,005 ^a
Massa específica(g/cm ³)	1,08 ± 0,08 ^a	1,21 ± 0,07 ^a	1,22 ± 0,04 ^a
Opacidade (%)	1,10 ± 0,03 ^b	2,19 ± 0,12 ^a	2,41 ± 0,14 ^a
Grau de intumescimento (%)	6,71 ± 0,08 ^a	6,14 ± 0,19 ^b	2,59 ± 0,17 ^c
PVA (g/mhPa) x10 ⁷	2,87 ± 0,19 ^a	2,48 ± 0,11 ^{ab}	2,17 ± 0,17 ^b
Ângulo de contato (°)	66,80 ± 1,63 ^b	64,52 ± 0,80 ^b	58,72 ± 0,49 ^c
Tensão na ruptura(MPa)	59,86 ± 2,95 ^a	50,71 ± 4,59 ^b	49,72 ± 5,45 ^b
Elongação (%)	3,29 ± 0,67 ^a	2,14 ± 0,63 ^b	2,92 ± 0,51 ^{ab}
Módulo de Young (MPa/%)	21,70 ± 1,40 ^a	21,24 ± 2,22 ^{ab}	19,42 ± 1,19 ^b

Letras iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey.

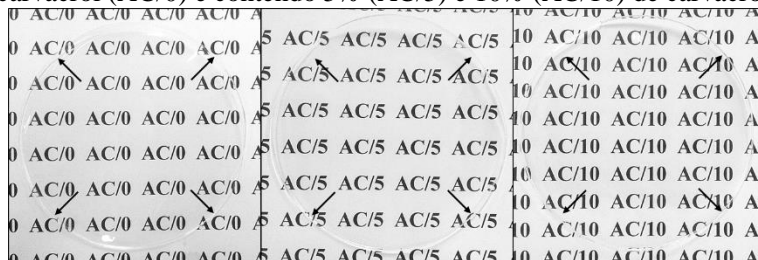
Características físicas

A presença de carvacrol não alterou a espessura dos filmes (Tabela 3.6). Espitia et al. (2011) também não observaram alteração na espessura ao adicionar 20% de óleo essencial em filmes de acetato de celulose. Uma tendência do aumento na massa específica foi observada, de 1,08 para 1,22 g/cm³ nos filmes AC/0 e AC/10, respectivamente. Meier et al. (2004) também obtiveram valores próximos da massa específica para filmes de acetato de celulose com adição de 0 a 10% de plastificante, variando de 1,10 a 1,20 g/cm³, respectivamente. O aumento da massa específica pode estar relacionado com a diminuição da velocidade de secagem na presença de carvacrol.

Na presença de carvacrol os filmes permaneceram transparentes (Figura 3.7, Tabela 3.6). A opacidade dos filmes aumentou de 1,10%, sem carvacrol para 2,41%, com 10% de carvacrol, essa alteração não é perceptível visualmente. A coloração amarelada característica do carvacrol, pode ser a responsável por esse aumento na opacidade. Os baixos valores de opacidade pode ser um indício da boa dispersão do carvacrol na matriz do polímero, pois a presença de uma fase dispersa,

não miscível, e o tipo de interação intermolecular podem promover a opacidade, alterando o índice de refração e a quantidade de luz que passa pelo filme (BASTOS et al., 2016; MONEDERO et al., 2009).

Figura 3.7. Transparência dos filmes de acetato de celulose sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.



Interação com a água

Os ângulos de contato (Tabela 3.6) dos filmes de AC foram menores quanto maior a quantidade de carvacrol, 66,80°, 64,52° e 58,72°, contendo 0, 5 e 10% de carvacrol, respectivamente. Apesar do carvacrol ser considerado hidrofóbico, ele também apresenta uma hidrofiliabilidade relativa (GRIFFIN et al., 1999). Nostro et al. (2012) também observaram diminuição do ângulo de contato com a adição de carvacrol em filmes de copolímero de etileno-acetato de vinila (EVA), a incorporação de carvacrol induziu o aumento da hidrofiliabilidade do material.

O grau de intumescimento (Tabela 3.6) dos filmes diminuiu com o aumento da concentração de carvacrol. A estrutura do acetato de celulose apresenta hidroxilas livres que podem interagir com a água, ocasionando o intumescimento do filme. Com a adição do carvacrol, pode estar havendo interação entre as estruturas dos dois materiais, ou ainda, o carvacrol pode ter preenchido espaços livres na matriz, impedindo que a água seja absorvida.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) (Tabela 3.6) diminuiu com a presença do carvacrol no filme. O carvacrol pode estar agindo como uma barreira adicional devido ao preenchimento dos espaços vazios, Bastos et al. (2016) também observaram diminuição da permeabilidade em filmes de acetato de celulose com até 20% de óleo essencial.

Propriedades mecânicas

A adição de carvacrol resultou em menores valores das propriedades mecânicas tensão na ruptura, alongação e rigidez dos filmes (Tabela 3.6), significando um baixo efeito plastificante.

Segundo Nostro et al. (2012) a incorporação de componentes de óleos essenciais pode reduzir a resistência à tração como resultado do desenvolvimento de uma estrutura heterogênea. Além disso, os compostos podem atuar como plastificante, reduzindo as forças intermoleculares das cadeias de polímero e, consecutivamente, aumentando a flexibilidade do filme.

A quantidade de carvacrol adicionada não resultou em grandes alterações macroscópicas das propriedades, sugerindo pouca alteração da estrutura da matriz polimérica. Se considerarmos que a migração do carvacrol ocorre durante a vida útil do filme, a pequena variação das propriedades mecânicas devido aos diferentes valores da concentração de carvacrol representa um material estável durante a utilização.

Propriedades morfológicas e estruturais dos filmes

Na Figura 3.8 estão apresentadas as micrografias dos filmes obtidas pelo MEV.

A adição de 5 e 10% de carvacrol nos filmes não alterou a superfície dos filmes, quando comparado ao filme sem adição de carvacrol, apresentando uma superfície lisa (Figura 3.8 (a1), (b1) e (c1)).

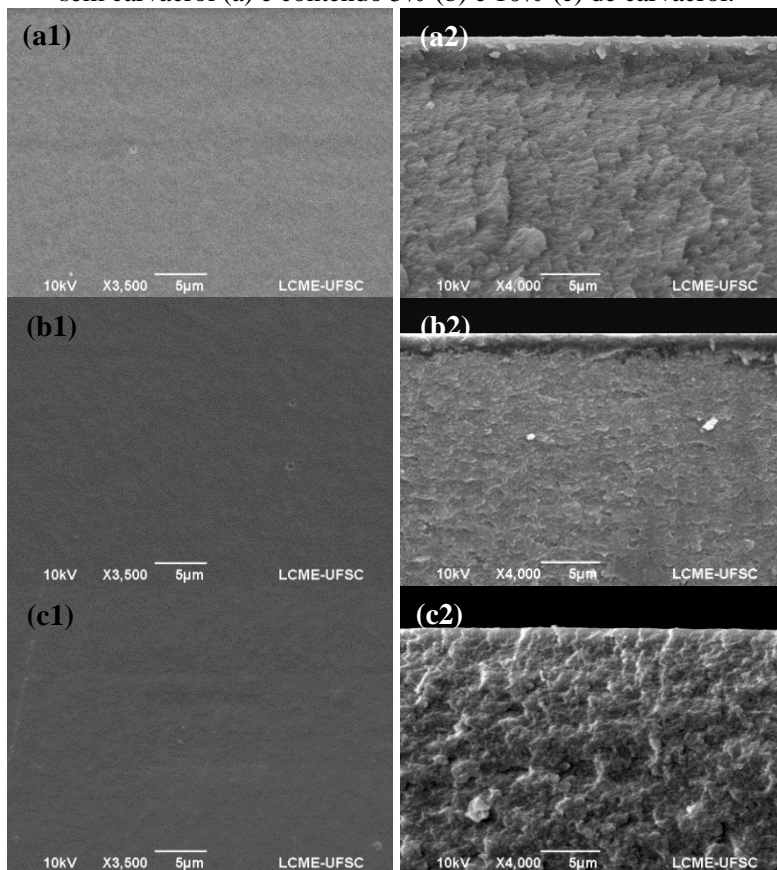
Nas imagens das fraturas (Figura 3.8 (a2), (b2) e (c2)) é possível observar uma estrutura densa dos filmes sem a formação de poros. Uma fina película na superfície, que fica em contato com o ar durante a secagem, pode ser observada no filme sem carvacrol, a qual diminuiu de espessura na presença do composto ativo, tornando o filme mais simétrico e homogêneo.

Rodríguez et al. (2012b), ao estudarem a modificação de filmes de acetato de celulose, também produziram filmes assimétricos, a morfologia do filme foi alterada com a adição de nanofibras montmorillonita, tornando a estrutura mais homogênea, sem a formação da película superficial.

Gemili, Yemenicioglu e Altinkaya (2009) observaram que a alteração na assimetria de filme de acetato de celulose ativo com lisozima afetou na estabilidade, migração da enzima e atividade antimicrobiana do filme, a superfície densa do filme foi capaz de manter a atividade da enzima, porém impediu a migração, em contrapartida, a superfície porosa

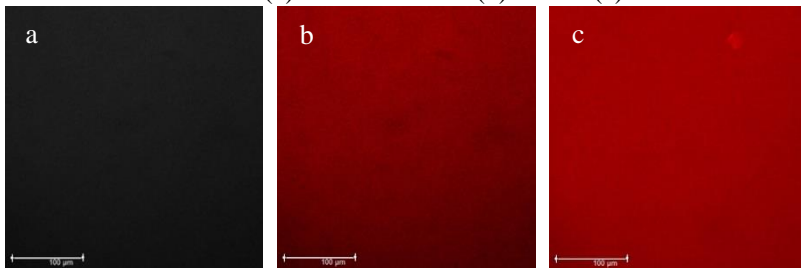
do filme permitiu que a enzima migrasse e apresentou maior atividade antimicrobiana.

Figura 3.8. Imagens por MEV da superfície (1) e fratura (2) dos filmes sem carvacrol (a) e contendo 5% (b) e 10% (c) de carvacrol.



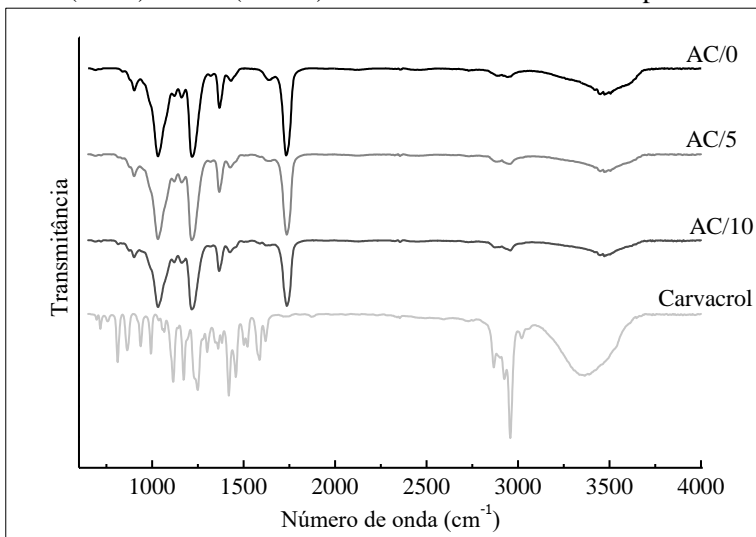
A Figura 3.9 apresenta as imagens da microscopia confocal de fluorescência dos filmes. Uma imagem totalmente escura pode ser observada para o filme sem carvacrol, os filmes com carvacrol, as imagens apresentam coloração vermelha que aumenta de a intensidade com o aumento da concentração de carvacrol. A homogeneidade da coloração sugere que o carvacrol está distribuído uniformemente em toda a matriz polimérica.

Figura 3.9. Imagens por microscopia confocal de fluorescência dos filmes sem carvacrol (a) e contendo 5% (b) e 10% (c) de carvacrol.



Na Figura 3.10 estão apresentados os espectros de FTIR dos filmes de acetato de celulose puro e com até 10% de carvacrol e do carvacrol puro.

Figura 3.10. FTIR dos filmes sem carvacrol (AC/0), contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol e do carvacrol puro.



Na Tabela 3.7 estão apresentadas as atribuições de algumas bandas no espectro de FTIR do carvacrol e dos filmes. Os espectros do acetato de celulose e do carvacrol são típicos dessas amostras. Os espectros dos filmes ativos são muito semelhantes ao filme puro, o que indica que o carvacrol está distribuído na matriz do polímero.

Tabela 3. 7. Atribuições das principais bandas de absorção do FTIR para o carvacrol os filmes sem carvacrol (AC/0) e com 5% (AC/5) e 10% de carvacrol.

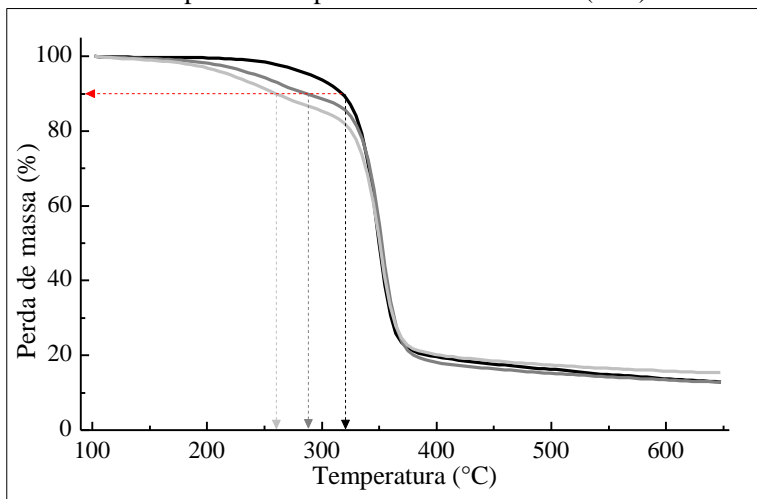
Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
903	Estiramento do grupo C – O
1032	C – O – C do anel pirano
1122	C – O – C estiramento assimétrico
1161	C – O – C estiramento assimétrico
1219	C – O estiramento do grupo acetil
1732	Estiramento do grupo C=O
2940	Estiramento do grupo C – H
3481	OH do fenólico e ligação de hidrogênio

Propriedades térmicas

Os termogramas obtidos na análise de TGA estão apresentados na Figura 3.11. O filme de acetato de celulose puro (AC/0) apresentou apenas um estágio de perda de massa, com início em aproximadamente 250 °C, o qual está relacionado com a degradação dos grupos acetila e das cadeias de celulose (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2012). Os filmes contendo carvacrol apresentaram duas etapas de perda de massa. A primeira com início em aproximadamente 200 °C, relacionada à degradação do carvacrol, que se sobrepôs à segunda etapa, que representa a degradação do acetato de celulose.

A adição de carvacrol diminuiu a estabilidade térmica dos filmes de acetato de celulose devido à volatilização do carvacrol, temperatura de ebulição é 238°C. A temperatura para atingir 10% de perda de massa é menor quanto maior a quantidade de carvacrol, sendo de 260, 286 e 318 °C para os filmes AC/10, AC/5 e AC/0, respectivamente. Na temperatura de 380 °C a perda de massa é de aproximadamente 80% para os filmes testados.

Figura 3.11. Termogramas de TGA dos filmes sem carvacrol (—) e contendo 5% (—) e 10% (—) de carvacrol, e temperatura correspondente a perda de 10% da massa (---).



Os termogramas de DSC estão apresentados na Figura 3.12, e os dados das propriedades térmicas são mostrados na Tabela 3.8.

O primeiro fenômeno observado, em temperatura abaixo de 84 °C, corresponde à vaporização de compostos retidos na estrutura polimérica (processo endotérmico), tais como a acetona residual e água.

O segundo processo endotérmico observado corresponde à fusão do domínio cristalino do polímero e ocorre mais nitidamente para os filmes de acetato de celulose sem carvacrol (AC/0), com pico de absorção de energia a 239 °C, temperatura próxima ao início do processo degradativo, observado no termograma de TGA (Figura 3.11).

É possível observar a magnitude do pico de fusão diminui com o aumento da concentração de carvacrol. Esse fenômeno quase desaparece para a concentração de 10% de carvacrol, o que sugere a diminuição do grau de cristalinidade do material polimérico. Alternativamente, o termograma apresenta o início do processo degradativo, assim como o apresentado pelo termograma de TGA (Figura 3.11). No termograma do filme contendo 5% de carvacrol, o pico de fusão é deslocado para uma temperatura inferior (212 °C) ao do filme sem carvacrol (239 °C), no entanto é difícil distinguir os limites desse pico através do termograma obtido.

Segundo Cruz et al. (2011), esta diminuição indica que o processamento leva a uma estrutura mais amorfa. A diminuição na cristalinidade é um dos fatores que pode ser favorável à liberação de compostos através da matriz polimérica.

Figura 3.12. Termogramas de DSC da 1ª varredura dos filmes sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

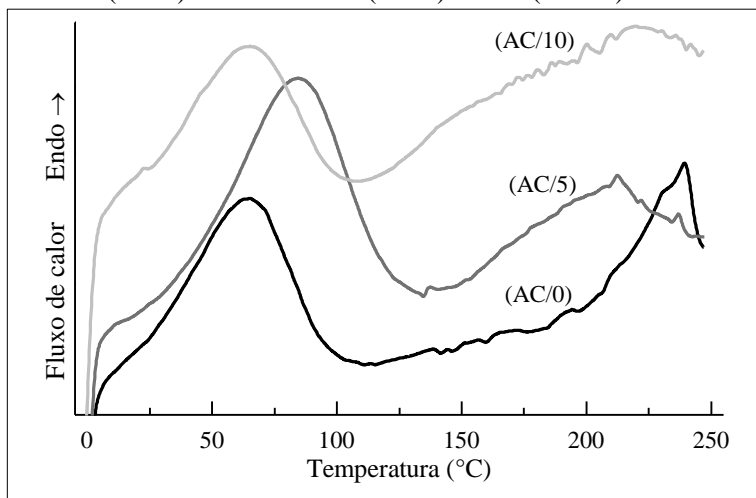


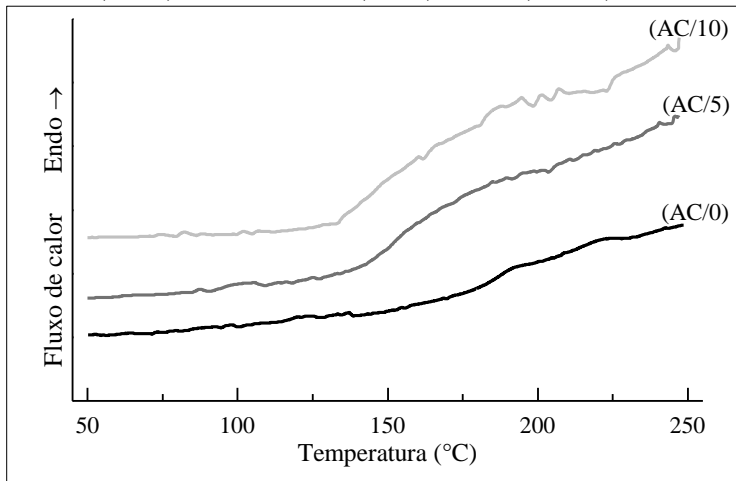
Tabela 3. 8. Propriedades térmicas do *pellet* (AC/*pellet*) e dos filmes sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

Filme	ΔH_v (J/g)	T_v (°C)	ΔH_f (J/g)	T_f (°C)	T_g (°C)
AC/0	54	65	12	239	187
AC/5	73	84	-	212	154
AC/10	30	65	-	-	123

ΔH_v , entalpia de vaporização; T_v , temperatura de vaporização; ΔH_f , entalpia de fusão; T_f , temperatura de fusão e; T_g , temperatura de transição vítrea.

Para a obtenção das temperaturas de transição vítrea (T_g) dos filmes, uma segunda varredura foi realizada, os termogramas estão apresentados na Figura 3.13, e os valores obtidos na Tabela 3.7. O aumento na quantidade de carvacrol deslocou a T_g para temperaturas mais baixas, de 184 °C para 123 °C, sem carvacrol e com 10% de carvacrol, respectivamente.

Figura 3.13. Termogramas de DSC da 2ª varredura dos filmes sem carvacrol (AC/0) e contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

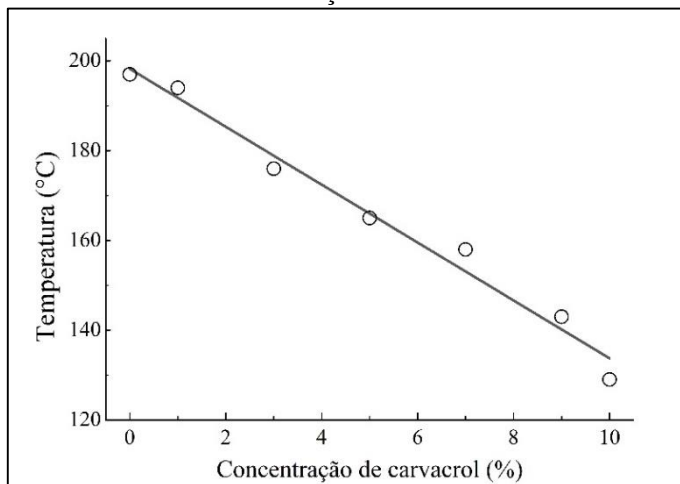


A Figura 3.14 demonstra como o carvacrol influencia na transição vítrea dos filmes de acetato de celulose, obtendo-se uma relação linear entre a diminuição da T_g com o aumento da concentração de carvacrol (Concentração de carvacrol = $198,2 - 6,4 T_g$, $R^2 = 0,980$), indicando que o carvacrol foi intercalado entre as cadeias de AC reduzindo a interação polímero-polímero, facilitando a mobilidade das cadeias de AC, agindo como plastificante.

A diminuição nos valores de T_g sugere que o carvacrol e o acetato de celulose interagem no nível molecular. A formação de ligações de hidrogênio entre os componentes foi considerada a interação mais provável, conforme o sugerido nos espectros de FTIR (Figura 3.10).

Segundo Manrich (2005) a adição de plastificante diminui a T_g pois interferem na densidade de energia coesiva e altera o volume livre do sistema. Meier et al. (2004), ao prepararem os filmes de acetato de celulose, também obtiveram filmes densos e transparentes e, ao adicionarem o plastificante policaprolactona triol, os filmes apresentaram estrutura mais densa e mais amorfa, obtendo uma relação linear entre a T_g e a concentração de plastificante, com diminuição da T_g de 190°C , para o filme sem plastificante, para 154°C com 10% de plastificante. Além disso, o ΔH_f e T_f também diminuíram linearmente com o aumento da quantidade de plastificante.

Figura 3.14. Variação da T_g nos filmes de acetato de celulose em função da concentração de carvacrol.



Bao (2015) estudou o efeito de plastificante na estrutura do acetato de celulose. O autor observou que a fase cristalina desaparece com o aumento da concentração de plastificante, pois o tamanho e blocos cristalinos, de escala manométrica, são muito mais fáceis de interromper do que um sistema cristalino completo. O papel do plastificante é romper as ligações intermoleculares de hidrogênio do acetato de celulose e interagir com sua estrutura.

3.4. CONCLUSÃO

A metodologia de *casting* sugerida neste capítulo permitiu a obtenção de filmes de acetato de celulose. Os filmes obtidos com acetona e com butanona na concentração de 5% de acetato de celulose foram transparentes e com as propriedades assumidas como mais adequadas para uma potencial aplicação como embalagem de alimentos. A menor quantidade de solução adicionada (menor espessura de espalhamento) e a menor velocidade de secagem (placa de Petri fechada) proporcionaram estas características para ambas as formulações. Entretanto, os filmes a partir da solução acetona foram menos densos e rígidos mecanicamente e mais hidrofóbicos. Ainda, este último solvente evapora mais rapidamente, resultando em menor tempo para obtenção dos filmes.

A adição de carvacrol de até 10% não alterou visualmente as características do filme e reduziu a temperatura de transição vítrea e a cristalinidade do filme. O carvacrol ficou disperso homogeneamente na matriz polimérica, resultante das interações entre as hidroxilas presentes em ambos os compostos. Entretanto, o carvacrol pouco alterou as propriedades mecânicas do filme, sugerindo estabilidade durante uma potencial aplicação com a liberação sustentada.

CAPÍTULO 4: MECANISMO DE MIGRAÇÃO DE CARVACROL EM FILMES DE ACETATO DE CELULOSE

4.1. INTRODUÇÃO

Uma das principais vantagens das embalagens ativas antimicrobianas é a liberação dos compostos antimicrobianos para a superfície do alimento ao longo do tempo de contato. Com isso, podem estar presentes em menores quantidades e atuando principalmente na superfície do produto, onde a maior parte das reações de deterioração ocorrem. A liberação sustentada para o alimento ao longo do tempo proporciona um efeito antimicrobiano contínuo durante a exposição, reduzindo a perda da atividade antimicrobiana em virtude da afinidade ou inativação pelos componentes no alimento (MIRANDA et al., 2016; QUINTAVALLA; VICINI, 2002; SOARES et al., 2009).

A eficácia de uma embalagem antimicrobiana está fortemente relacionada ao equilíbrio entre a migração do composto ativo e a cinética de crescimento microbiano. Assim, a inibição microbiana não pode ser conseguida se a taxa de migração do agente ativo não for suficiente para atingir a concentração inibitória mínima (MIC) do microrganismo alvo, por outro lado, se a migração do composto ativo for muito rápida a sua ação não será mantida (HAN, 2003).

A velocidade de migração de um composto irá depender do material de suporte (polímero), das interações do composto a ser migrado entre as fases envolvidas, bem como do método de preparação do filme e das condições ambientais (CERISUELO et al., 2012; COOKSEY, 2001; HAN, 2014; KUREK et al., 2012; TUNÇ; DUMAN, 2011). Dentre os fatores que devem ser considerados para a eficácia de uma embalagem ativa com compostos voláteis, é a quantidade do composto remanescente na matriz polimérica após a etapa de obtenção, pois a baixa compatibilidade com a matriz polimérica e/ou o uso de altas temperaturas podem levar a perdas drásticas do composto ativo.

O acetato de celulose foi empregado com sucesso em sistemas de liberação controlada de fármacos, devido à sua segurança, funcionalidade e facilidade de processamento. Duas características importantes desse material para o uso em sistemas de liberação controlada é a facilidade de controlar a porosidade da matriz e a distribuição do composto ativo entre as cadeias poliméricas (EDGAR et al., 2001). Na última década o acetato de celulose começou a ser empregado como embalagem ativa.

Para descrever o mecanismo da migração e obter respostas a respeito da velocidade de migração, modelos matemáticos podem ser

aplicados. Modelos matemáticos determinísticos da migração dos compostos da embalagem considerando o fluxo difusivo de massa descrita pela lei de Fick foram adotados pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA e pela Comissão União Europeia no Regulamento nº 10/2011 (EUROPEAN COMMISSION, 2011) como ferramentas adicionais para estimar os potenciais migrantes das embalagens e assim ajudar a tomar decisões reguladoras (POÇAS et al., 2008).

Dessa forma, este capítulo visa à determinação da retenção e interação do carvacrol nos filmes de acetato de celulose logo após a obtenção e durante o armazenamento dos filmes nas temperaturas de 25 e 50 °C e a cinética de migração em fluidos simulantes de alimentos, nas temperaturas de 8 e 25 °C. Modelo matemático foi aplicado determinar o coeficiente de difusão e o mecanismo de migração do carvacrol.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Preparo dos filmes

Os filmes foram produzidos conforme metodologia descrita no item 3.2.4, do Capítulo 3. Após a evaporação do solvente acetona, os filmes foram removidos das placas de Petri e armazenados em papel alumínio e filme de PVC à temperatura ambiente até o momento da análise.

4.2.2. Retenção e migração de carvacrol em filmes armazenados

Para determinar a migração de carvacrol para o ambiente durante o armazenamento, filmes de acetato de celulose contendo 10% de carvacrol (AC/10) foram pesados e armazenados em estufas à temperatura constante. Os ensaios foram realizados em duas temperaturas, 25 °C, simulando os filmes acondicionados em condições ambiente, e 50 °C, simulando condições extremas nas quais os filmes poderiam ser acondicionados.

A cinética de migração dos filmes acondicionados foi determinada a partir da quantificação de carvacrol remanescente no filme. Para isso, em tempos pré-determinados, um filme era removido da estufa, pesado, cortado, e adicionado em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de etanol (99,8% de pureza), mantidos sob agitação mecânica por 24 h à temperatura ambiente. Após, a solução alcoólica com o carvacrol extraído do filme, foi analisada por espectrofotometria UV-vis, a 272 nm, a concentração de carvacrol foi determinada utilizando curvas de calibração previamente obtidas de carvacrol em etanol 99,8%. A relação linear entre absorvância *versus* concentração de carvacrol foi determinada no intervalo de 0 a 60 µg/mL, obtendo coeficiente de determinação (R^2) de 0,999. Os ensaios foram realizados em duplicata de cada medida e duplicata de experimentos.

4.2.3. Migração de carvacrol para fluido simulante de alimento

Os fluidos simulantes de alimentos utilizados para migração do carvacrol foram baseados na resolução RDC nº 51 de 26 de novembro de 2010 regulamentada pela ANVISA (2010). Com o objetivo de simular um alimento, foram escolhidos os simulantes água destilada (simulante de alimentos aquosos não ácidos (pH > 4,5)) e etanol 95% (simulante de alimentos gordurosos).

Os ensaios foram realizados em filmes contendo 5 (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol. Os filmes foram cortados ao meio e determinou-se a massa e a espessura. Uma metade foi adicionada ao frasco com o fluido simulante e na outra realizou-se a quantificação inicial de carvacrol no filme.

Os ensaios de migração foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL à temperatura constante, sob agitação de mecânica.

A quantidade de meio simulante foi calculada considerando a menor concentração capaz de ser detectada para obtenção de uma curva padrão de carvacrol em espectrômetro UV-vis e que fosse suficientemente grande para manter a solução externa infinitamente diluída em carvacrol. Assim, o volume de simulante foi definido em 350 mL. Nesse volume, para um filme com 10% de carvacrol, se todo o composto for migrado, corresponderá a 6% da solubilidade do carvacrol em água a 25 °C (0,11 g/L).

Os ensaios de migração seguiram as condições de tempo e temperatura equivalentes as condições mais críticas em que a embalagem poderá ser mantida em contato com o alimento, conforme sugerido na resolução RDC nº 51 (ANVISA, 2010). Com a finalidade de simular a migração do carvacrol para um alimento que deva ser mantido sobre refrigeração, foram definidas duas temperaturas: 8 °C, temperatura máxima de refrigeração de um alimento, e 25 °C, condição ambiente à qual o alimento pode ser manuseado em momentos da sua vida útil.

A cinética de migração foi determinada a partir de alíquotas de 1 mL coletadas em tempos pré-determinados até que a condição de equilíbrio do sistema fosse atingida, de modo que a quantidade de alíquotas retiradas não ultrapassasse volume de 5% do total de fluido simulante, ou seja, 17 mL.

A concentração de carvacrol de cada alíquota foi quantificada em espectrofotômetro UV-vis, a 272 nm, utilizando curvas de calibração previamente determinadas de carvacrol no respectivo fluido simulante de alimento. A relação linear entre absorvância *versus* concentração de carvacrol foi determinada no intervalo de 0 a 40 µg/mL, obtendo coeficiente de determinação (R^2) de 0,999 para ambos os fluidos. Foram realizadas duplicatas dos ensaios e do experimento.

Após o ensaio, os filmes foram removidos e secados superficialmente, e determinou-se a massa e a espessura.

4.2.4. Coeficiente de partição

O coeficiente de partição do carvacrol entre o filme e o meio simulante (K_{FS}) foi determinado conforme a Equação 4.1 (HAMDANI; FEIGENBAUM; VERGNAUD, 1997).

$$K_{FS} = \frac{\rho_{F,\infty}}{\rho_{S,\infty}} \quad (4.1)$$

em que $\rho_{F,\infty}$ é a concentração mássica de carvacrol no filme no equilíbrio e $\rho_{S,\infty}$ é a concentração mássica de carvacrol no fluido simulante no equilíbrio.

4.2.5. Modelo matemático

A migração de carvacrol dos filmes para os fluidos simulantes de alimentos foram modeladas matematicamente. O processo de migração foi descrito por analogia à lei de difusão de Fick em soluções diluídas em combinação com a equação de continuidade para o componente ativo.

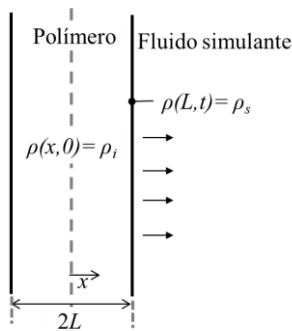
Considerando que o filme de acetato de celulose com carvacrol, com espessura constante L , está em meio perfeitamente agitado, na ausência de qualquer reação química, com transferência de massa apenas por difusão unidirecional em x . A difusão do carvacrol ocorre devido a um gradiente de concentração da superfície ao centro do filme. O coeficiente de difusão do composto ativo no filme, D , é assumido constante, independe da posição, do tempo e da concentração de carvacrol. Assim, mudança na concentração do carvacrol no filme em relação ao tempo em cada ponto no interior do filme é dada pela Equação 4.2.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} \right) \quad (4.2)$$

em que ρ é a concentração de carvacrol no filme, x é a coordenada cartesiana com origem no centro do filme, no qual ocorre a migração, t é o tempo de migração do carvacrol.

A migração do carvacrol presente no filme para o fluido/ar no ensaio de migração está esquematicamente representada na Figura 4.1.

Figura 4.1. Esquema da migração do carvacrol para o fluido/ar.



(Fonte: Autor)

Inicialmente ($t=0$) o carvacrol está distribuído uniformemente no filme (ρ_i) e não há carvacrol no fluido, condição inicial (Equação 4.3).

$$t = 0, 0 \leq x \leq L, \rho = \rho_i \quad (4.3)$$

Para a resolução da Equação 4.2, assume-se como condições de contorno ($t > 0$) a simetria axial no centro do filme ($x = 0$) (Equação 4.4) e que o potencial químico do carvacrol na superfície do filme está em equilíbrio com o fluido externo (Equação 4.5).

$$t > 0, x = 0, \frac{\partial \rho}{\partial x} = 0 \quad (4.4)$$

$$t > 0, x = L, \rho = \rho_{sup} \quad (4.5)$$

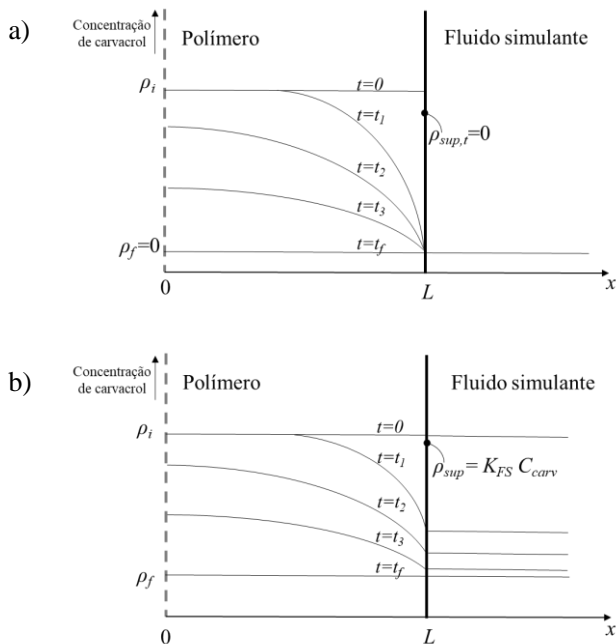
em que ρ_{sup} é a concentração de carvacrol na superfície do filme em equilíbrio com o fluido.

Para essa última condição de contorno, duas abordagens foram adotadas:

i) Ao longo do processo de migração, o meio é infinitamente diluído e a concentração de carvacrol no fluido simulante é muito baixa ($C_{carv} \rightarrow 0$). O carvacrol presente na superfície do filme migra imediatamente para o fluido ($\rho_{sup} = 0$). Solucionada por método analítico (Figura 4.2 a);

ii) A migração do carvacrol ocorre até o sistema entra em equilíbrio, havendo um coeficiente de partição (K_{FS}) de carvacrol entre o filme e o fluido ($\rho_{sup} = K_{FS} C_{carv}$). Solucionada por método numérico (Figura 4.2 b).

Figura 4.2. Perfil de concentração de carvacrol durante a migração em fluido simulante para a abordagem analítica (a) e numérica (b).



Em que ρ_i é a concentração inicial de carvacrol no filme, ρ_f é a concentração final de carvacrol, ρ_{sup} é a concentração de carvacrol na superfície do filme em equilíbrio com o fluido, t é o tempo de migração, L é a espessura do filme, K_{FS} é o coeficiente de partição e C_{carv} é a concentração de carvacrol no fluido simulante.

(Fonte: Autor)

Solução analítica

O modelo matemático (Equação 4.3) possui solução analítica (CRANK, 1975), conforme a Equação 4.6.

$$\frac{\rho - \rho_{sup}}{\rho_i - \rho_{sup}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(- (2n+1)^2 \frac{\pi^2 Dt}{4L^2}\right) \quad (4.6)$$

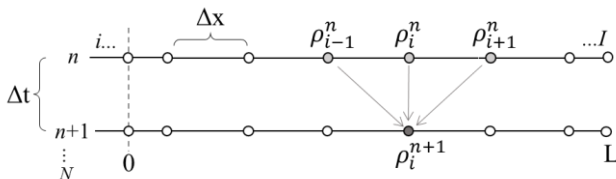
A Equação 4.6 foi ajustada aos dados experimentais de migração em rotina computacional desenvolvida no programa Matlab[®] versão R2017a (MathWorks, USA), minimizando a soma dos erros quadrados

(resíduos) entre os valores experimentais e preditos. Esse procedimento resultou na obtenção do valor otimizado do parâmetro do coeficiente de difusão do carvacrol do filme.

Solução numérica

A solução numérica utilizou o método de diferenças finitas explícito, baseado em Carciofi et al. (2002), Patankar (1980) e Porciuncula et al. (2013). Uma malha unidirecional do centro do filme até a superfície (de 0 a L) foi construída conforme representada na Figura 4.3.

Figura 4.3. Esquema da malha unidirecional construída para solução numérica da migração do carvacrol no filme para o fluido simulante.



(Fonte: Autor)

A espessura do filme foi dividida em i partes iguais finitas de espessura Δx por planos de referência de concentração de carvacrol pelo tempo, e n é o incremento do tempo Δt . A concentração de carvacrol foi avaliada em cada ponto i durante o incremento de n , levando a uma relação entre a nova concentração de carvacrol (ρ_i^{n+1}) após o Δt das concentrações anterior neste local (ρ_i^n) e locais adjacentes (ρ_{i-1}^n e ρ_{i+1}^n) (VERGNAUD, 1991). A Equação foi discretizada, obtendo-se a Equação 4.7.

$$\frac{\rho_i^{n+1} - \rho_i^n}{\Delta t} = D \left(\frac{\rho_{i+1}^n - 2\rho_i^n + \rho_{i-1}^n}{\Delta x^2} \right) \quad (4.7)$$

Os valores de Δt e Δx foram definidos para satisfazer o limite de convergência do modelo em que Fo (Equação 4.8) deve ser menor que 0,5.

$$Fo = D \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \quad (4.8)$$

Os valores da concentração de carvacrol no filme foram calculados no programa Excel variando o valor do coeficiente de difusão (D). O valor otimizado de D foi obtido comparando os valores experimentais e os preditos, obtendo-se um valor mínimo do erro entre esses valores, calculado pela raiz do quadrado médio do erro (RMSE). A solução numérica foi validada com a solução analítica.

4.2.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente com o programa *Statistica 12* (Dell, USA) através de análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey a 95% de confiança, no qual letras iguais ao lado das médias representam que não há diferença significativa em ter os dados. Junto às médias é apresentado o desvio padrão das médias.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Retenção e migração de carvacrol em filmes armazenados

Na Tabela 4.1 está apresentada a concentração de carvacrol quantificado logo após a produção do filme. A variação apresentada é esperada, uma vez que o preparo da solução filmogênica e a adição de carvacrol é obtida a partir da pesagem do material. O resultado obtido sugere uma boa afinidade do carvacrol pela matriz polimérica e que possivelmente não há perdas de carvacrol ao longo da obtenção do filme.

Tabela 4. 1. Média e desvio padrão da concentração de carvacrol após obtenção dos filmes.

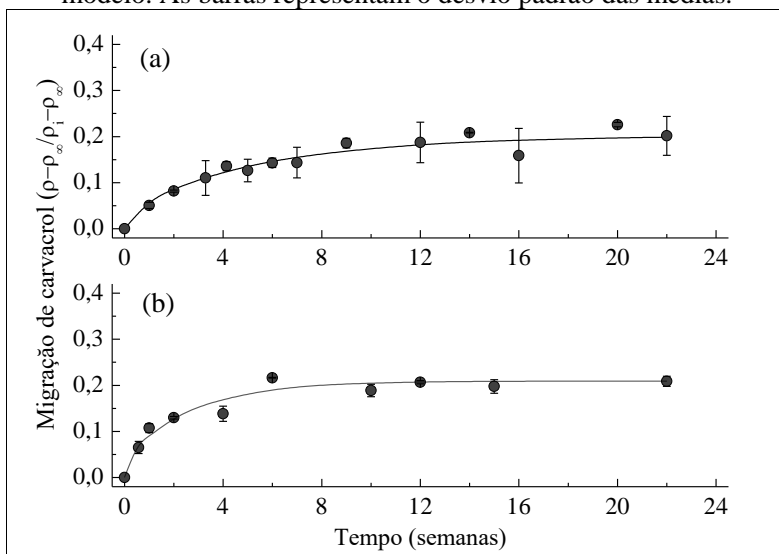
Filme	Concentração de carvacrol (%) (g/100g)
AC/5	5,5 ± 0,1
AC/10	10,7 ± 0,1

A aplicação da técnica de *casting* para a obtenção de filmes ativos com compostos voláteis tem a grande vantagem de não necessitar altas temperaturas, evitando perdas do composto ativo. Além disso a alta retenção do carvacrol na matriz do acetato de celulose reforça que há interações ligações intermoleculares entre as hidroxilas, impedindo que o carvacrol seja perdido ao longo da evaporação do solvente.

Kurek et al. (2012) investigou a retenção de carvacrol em filmes de quitosana. Devido à natureza hidrofílica do polímero e afinidade pelo solvente (etanol), mais de 80% da massa inicial do carvacrol foi volatilizada ao longo da obtenção dos filmes em temperatura ambiente. Segundo os autores, o mecanismo de perda de compostos voláteis durante a evaporação do solvente é complexo, pois existe simultaneamente alteração na viscosidade do polímero, mudança no estado físico de líquido para sólido, mudança de polaridade devido à taxa de evaporação diferencial entre voláteis, mudança na natureza e na força da interação. Suppakul et al. (2011) ao produzirem filme de PEBD com estragol e linalol por extrusão observaram mais de 66% de perda dos compostos ativos devido à alta temperatura de processamento. Requena, Vargas e Chiralt (2017) obtiveram retenção de 80% de carvacrol em filmes bicamadas de Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), a perda foi associada ao uso de alta temperatura (180 °C) durante a obtenção do filme em prensa hidráulica.

Os filmes contendo 10% de carvacrol permaneceram armazenados por 22 semanas com ambas as superfícies expostas nas temperaturas de 25 e 50 °C. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.4 juntamente ao ajuste do modelo pela solução analítica para descrever a migração de carvacrol.

Figura 4.4. Migração de carvacrol em filmes contendo 10% de carvacrol acondicionados nas temperaturas de 25 °C(a) e 50 °C (b) e ajuste de modelo. As barras representam o desvio padrão das médias.



O modelo matemático foi capaz de descrever satisfatoriamente a migração de carvacrol em filmes de acetato de celulose acondicionados em temperaturas constante de 25 e 50 °C, os valores obtidos pelo ajuste do modelo estão apresentados na Tabela 4.2. Os coeficientes de difusão para as duas temperaturas são na mesma ordem de grandeza, 10^{-14} m²/s. Esses valores são maiores do que os encontrados na literatura para o carvacrol em outros polímeros, 10^{-15} m²/s para filmes de PP-EVOH (CERISUELO et al., 2012) e entre 10^{-14} e 10^{-17} m²/s para filmes de quitosana, dependendo da umidade relativa que foram acondicionados (KUREK et al., 2014b).

A maior quantidade de carvacrol migrado foi na 1ª semana de armazenamento, correspondendo a 5 e 11% de carvacrol migrado, para as temperaturas de 25 e 50 °C, respectivamente. A migração de carvacrol ocorreu até 6 semanas para os filmes condicionados a 50 °C e 10 semanas

para os filmes condicionados a 25 °C, após esse tempo a concentração de carvacrol nos filmes permaneceu constante. A máxima migração obtida foi de aproximadamente 22%. A retenção do carvacrol na matriz polimérica reforça que há interação intermolecular entre eles. É importante ressaltar que ao longo do experimento o ar foi constantemente renovado, estabelecendo um meio infinito para a migração.

Tabela 4. 2. Coeficiente de difusão do carvacrol em filmes contendo 10% de carvacrol acondicionados nas temperaturas de 25 e 50 °C e parâmetros de ajuste do modelo.

Temperatura	D (m ² /s)	R ²	RMSE
25 °C	1,27 x 10 ⁻¹⁴	0,939	0,020
50 °C	2,52 x 10 ⁻¹⁴	0,950	0,015

Kamimura et al. (2014) estudaram a estabilidade da atividade antioxidante do carvacrol livre, após 15 dias de armazenamento na presença de luz à temperatura ambiente, a atividade do carvacrol não diminuiu significativamente, e permaneceu estável ao longo de todo o armazenamento de 90 dias.

Shemesh et al. (2015) incorporaram carvacrol com diferentes argilas e compatibilizadores em filmes PEBD. O PEBD não foi capaz de reter o carvacrol, enquanto que a adição dos outros compostos aumentou a retenção e a estabilidade do carvacrol na matriz polimérica. A atividade antimicrobiana do filme ativo foi analisada logo após a sua obtenção e após 100 dias de armazenamento em temperatura ambiente, os filmes com argila e compatibilizador mantiveram a atividade. Esses estudos demonstram que o carvacrol apresenta boa estabilidade, mesmo armazenado em condições ambientes por longo período, no entanto, quando incorporado em um polímero, sua ação prolongada irá depender da interação com a matriz polimérica.

4.3.2. Migração de carvacrol em fluidos simulantes de alimentos

O coeficiente de partição do carvacrol entre o filme de acetato de celulose e o simulante de alimento está apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3. Média e desvio padrão do coeficiente de partição (K_{FS}) do carvacrol entre o filme e o simulante de alimentos.

Simulante T (°C)	Filme	K_{FS}
Água 8	AC/5	783 ± 45 ^b
	AC/10	666 ± 67 ^{ab}
Água 25	AC/5	600 ± 36 ^a
	AC/10	555 ± 35 ^a
Etanol 95% 8	AC/5	-*
	AC/10	-
Etanol 95% 25	AC/5	-
	AC/10	-

Letras iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey.

*próximo a zero.

O coeficiente de partição pode ser muito pequeno, geralmente descrito como tendendo a zero, significando que o processo de migração atinge a extração praticamente completa do composto na fase polimérica (GARDE et al., 2001; GOYDAN et al., 1990; POÇAS et al., 2008). Para o etanol 95%, a solubilidade do carvacrol em etanol permitiu que todo o carvacrol fosse removido do filme, obtendo-se o valor de K_{FS} é próximo a zero.

Na migração para a água, o carvacrol apresentou K_{FS} acima de 550, justificado pela baixa solubilidade de carvacrol em água e pela afinidade do carvacrol com a matriz do acetato de celulose. A concentração de carvacrol no fluido simulante ao final de ensaio de migração corresponde a no máximo 5% da saturação de carvacrol em água, portanto a solubilidade do carvacrol nesse fluido não é o fator limitante para a migração, a quantidade máxima de carvacrol migrada é controlada pelo coeficiente de partição do carvacrol entre o filme e o fluido.

O coeficiente de partição é um indicio da interação e da capacidade de migração de um composto presente em uma embalagem ativa para um alimento, não há valores limites para esse parâmetro, o valor requerido para o coeficiente de partição irá depender da aplicação a que a embalagem se destina. Galotto et al. (2011) determinou o coeficiente de partição de um antioxidante em PEBD e fluidos simulantes, em etanol 10% não ocorreu a migração do antioxidante, em etanol 50% e 95% o K_{FS}

foi de 2460 e 35, respectivamente, demonstrando que o coeficiente de partição tem grande influência com o tipo de alimento que estará em contato com a embalagem. Alterações na produção de embalagens pode alterar a interação entre a embalagem ativa e o fluido simulante, assim como demonstrado por Rodríguez et al. (2012), que obtiveram valores aumentados de K_{FS} de 1,2 para 220 como resultado da modificação do filme de acetato de celulose com nanoargila incorporado timol, diminuindo significativamente a migração timol para o fluido.

Em geral, o coeficiente de partição diminui com o aumento da temperatura. Galotto et al. (2011) estudaram a migração de um antioxidante (I-1076) incorporado na matriz de PEBD para o fluido simulante etanol 95%, a migração do antioxidante apresentou grande dependência da temperatura, com K_{FS} variando de 183 a 0,3, para temperatura de 28 a 60 °C.

Para os filmes contendo 10% de carvacrol, o coeficiente de partição não foi alterado com o aumento da temperatura. Assim como o observado nos ensaios de migração dos filmes armazenados, a interação entre o carvacrol e a matriz polimérica impede que todo carvacrol migre para o fluido simulante.

Após os ensaios de migração, a espessura não foi alterada comparada ao início da análise, e a massa apresentou pequena diminuição, correspondente a migração de carvacrol. Logo, a consideração de que a espessura do filme é constante está de acordo com o proposto pelo modelo. Além disso, não foi observada alterações macroscópicas nas características dos filmes.

Os perfis da migração de carvacrol na matriz polimérica de acetato de celulose para o fluido simulante de alimento, etanol 95%, estão apresentados na Figura 4.5.

Os resultados obtidos para o coeficiente de difusão e os parâmetros de ajuste estão apresentados na Tabela 4.4. O modelo matemático descreveu satisfatoriamente a migração de carvacrol em filmes de acetato de celulose em ambos fluidos simulantes, no entanto, principalmente em etanol 95%, os valores foram superestimados em algumas regiões, resultando em menor R^2 e maior erro quadrático médio (RMSE), resultados que podem ser justificados pelo desvio do mecanismo difusional. Medeiros et al. (2018) também obteve valores superestimados para a migração de óleo essencial de cravo em filme de PEBD para o simulante etanol 95%.

Figura 4.5. Migração de carvacrol no fluido simulante etanol 95% nas temperaturas 8 °C (cinza) e 25 °C (preto) para os filmes contendo 5% (triângulo, ---) e 10% (Círculo, —) de carvacrol, dados experimentais e ajuste do modelo. As barras representam o desvio padrão das médias.

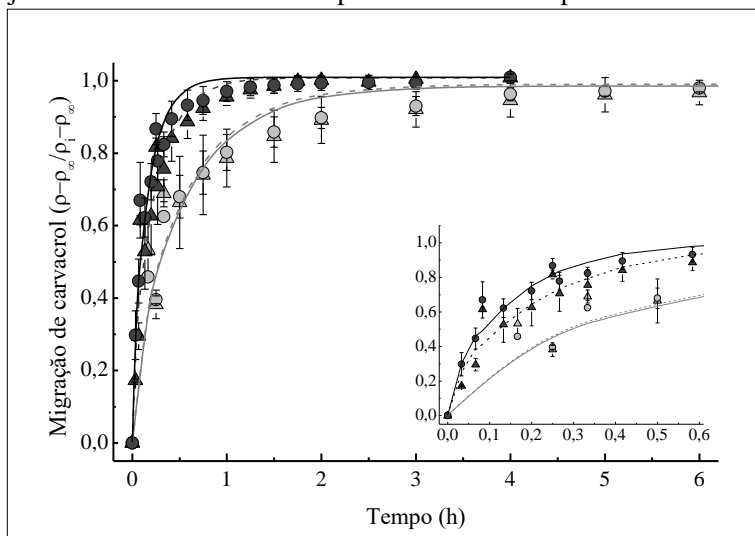


Tabela 4. 4. Média e desvio padrão do coeficiente de difusão do carvacrol de filmes para o fluido simulante de alimentos etanol 95% e parâmetros de ajuste do modelo.

T (°C)	Filme	D (m ² /s) (x10 ¹⁵)	R ²	RMSE
8	AC/5	128,5 ± 31,6 ^a	0,947	0,060
	AC/10	126,9 ± 41,4 ^a	0,979	0,040
25	AC/5	336,5 ± 87,5 ^b	0,992	0,025
	AC/10	362,4 ± 98,3 ^b	0,997	0,015

Letras iguais representam que não há diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey.

Os perfis da migração de carvacrol na matriz do acetato de celulose para o fluido simulante de alimento água, nas temperaturas de 8 e 25 °C, para as duas abordagens estudadas estão apresentados na Figura 4.6. Os resultados obtidos para o coeficiente de difusão e os parâmetros de ajuste estão apresentados na Tabela 4.6.

Figura 4.6. Migração de carvacrol no fluido simulante água destilada nas temperaturas 8 °C (cinza) e 25 °C (preto) para os filmes contendo 5% (triângulo, ---) e 10% (Círculo, —) de carvacrol, dados experimentais e ajuste do modelo por solução analítica (a) e solução numérica (b). As barras representam o desvio padrão das médias.

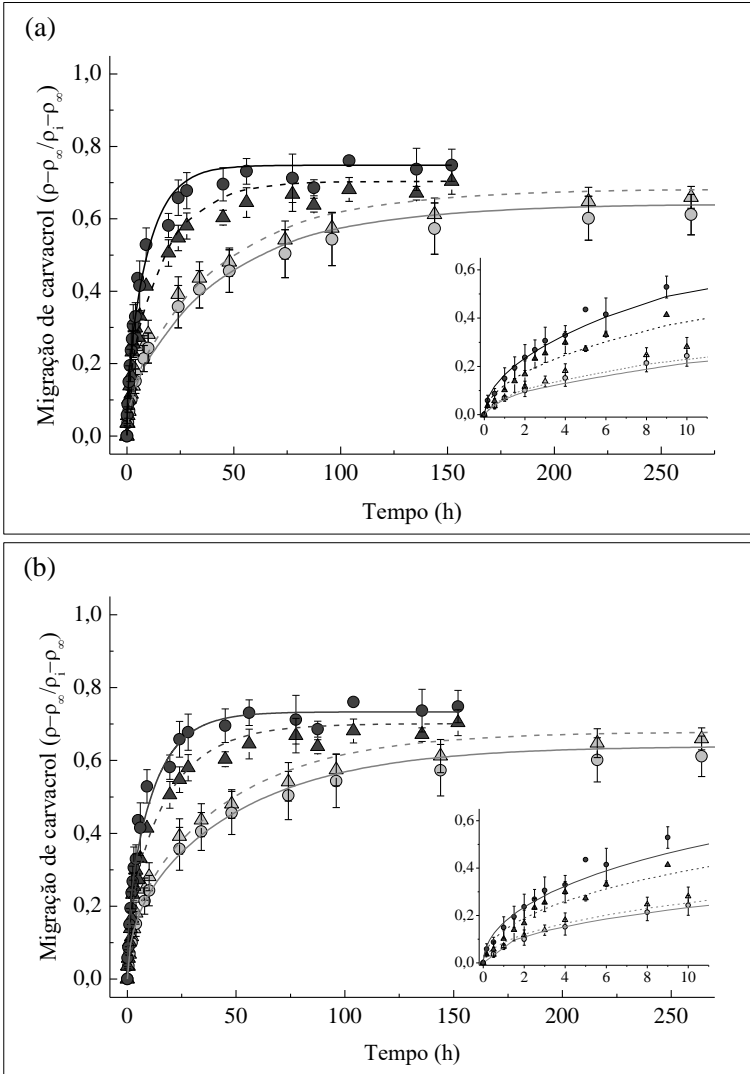


Tabela 4. 5. Média e desvio padrão do coeficiente de difusão do carvacrol de filmes para o fluido simulante de alimentos água e parâmetros de ajuste do modelo obtidos pela solução analítica e solução numérica.

T (°C)	Filme	D (m ² /s) (x10 ¹⁵)	R ²	RMSE
Solução analítica				
8	AC/5	1,84 ± 0,34 ^a	0,986	0,028
	AC/10	1,79 ± 0,47 ^a	0,989	0,023
25	AC/5	5,81 ± 0,44 ^b	0,981	0,032
	AC/10	6,72 ± 0,57 ^b	0,985	0,031
Solução numérica				
8	AC/5	1,27 ± 0,26 ^a	0,997	0,001
	AC/10	1,13 ± 0,32 ^a	0,998	0,002
25	AC/5	3,91 ± 0,41 ^b	0,996	0,001
	AC/10	4,79 ± 0,23 ^b	0,994	0,003

Letras iguais representam que não há diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey.

A solução analítica proposta para resolução do modelo matemático é muito utilizada para descrever a migração de compostos em embalagens ativas (BIERHALZ; DA SILVA; KIECKBUSCH, 2012; DIAS et al., 2018; GEMILI; YEMENICIOGLU; ALTINKAYA, 2009; TAWAKKAL; CRAN; BIGGER, 2016). Essa solução analítica considera que todo o composto que está na interface filme/fluido migra instantaneamente para um meio infinito, e a concentração deste soluto é sempre infinitamente diluída. No entanto, a migração do carvacrol para a água atingiu o equilíbrio. Desta forma, a solução numérica foi proposta para resolução do modelo matemático considerando que durante a migração o carvacrol está em equilíbrio na interface filme/fluido e que este valor é dependente do tempo, pois há aumento da concentração externa. A comparação entre as duas soluções demonstrou que não há diferença significativa do coeficiente de difusão, no entanto, a solução numérica descreveu melhor o ajuste do modelo matemático aos dados experimentais (menores valores de RMSE e R²).

A migração de carvacrol não apresentou dependência com a concentração inicial do composto. Medeiros et al. (2018) ao impregnar diferentes teores de óleo essencial de cravo por alta pressão em filmes de PELBD não obteve diferença significativa na migração do composto

ativo em etanol 10% e etanol 95%, os coeficientes de difusão foram na ordem de grandeza de 10^{-13} m²/s.

A temperatura influenciou na migração do carvacrol nos dois fluidos simulantes, os coeficientes de difusão obtidos foram maiores na temperatura de 25 °C. O aumento da temperatura aumenta a mobilidade das cadeias poliméricas, e a solubilidade do migrante no fluido favorecendo a migração.

Ao comparar os dois fluidos simulantes, a migração do carvacrol em etanol 95% foi mais rápida, todo o carvacrol foi migrado em apenas 1 h de ensaio para a temperatura de 25 °C e cerca de 2,5 h para a temperatura de 8 °C, já para a água o tempo para atingir o equilíbrio foi de cerca de 50 e 100 horas, para a temperatura de 25 e 8 °C, respectivamente. Obtendo coeficiente de difusão na ordem de 100 vezes maior para o etanol 95% do que para a água. Justificado pela maior solubilidade do carvacrol em etanol, o etanol pode penetrar na matriz polimérica ocasionando a relaxação e intumescimento das cadeias e dissolver o carvacrol, promovendo a migração.

É importante salientar que os dados de migração foram obtidos em meio simulante para migrações específicas regulatórias. No ensaio de migração, foram minimizadas limitações, como saturação do carvacrol no simulante e meio não homogêneo, além disso, as duas superfícies do filme estavam totalmente em contato com o simulante. Essas condições não representam a realidade de um filme em contato com o alimento, no entanto podem ser utilizados para compreender mecanismos e interações que levam a migração de um composto. Quando um filme é utilizado em um alimento, apenas uma das superfícies pode estar em contato com o alimento, nessa condição a migração do composto ativo é 4 vezes mais lenta quando comparada à migração com as duas superfícies do filme em contato com o alimento. A análise da migração em uma matriz alimentícia é muito complexa, por este motivo, o sistema é simplificado, considerando a embalagem homogênea, o alimento substituído por um simulante adequado, as condições ambientais são assumidas como constantes (GARDE et al., 2001).

Dias et al. (2018) estudaram em filmes de acetato de celulose incorporado com isotiocianato de alila, a migração em meio simulante de alimento, hexano, e em peito de frango. Em meio simulante obtiveram valores entre 10^{-10} e 10^{-13} m²/s, dependente da forma em que o composto foi incorporado. Em peito de frango, ao longo de 80 dias, a concentração do composto ativo no filme permaneceu praticamente constante. A natureza do meio em que ocorre a migração influencia diretamente na liberação do composto ativo.

4.4. CONCLUSÃO

O carvacrol apresentou compatibilidade com a matriz do acetato de celulose e não foi observada perdas desse composto por volatilização durante a obtenção do filme. Durante o armazenamento, a perda de carvacrol foi menor que 25% após 22 semanas de acondicionamento, sugerindo que a atividade do filme é mantida neste período.

No fluido simulante etanol 95% todo o carvacrol presente no filme foi migrado, na água o sistema entrou em equilíbrio atingindo a máxima migração de carvacrol em 75%. A migração do carvacrol não acarretou em modificações macroscópicas e na espessura. O modelo matemático apresentou bom ajuste aos dados experimentais, obtendo coeficiente de difusão na ordem de 10^{-13} e 10^{-15} m²/s, para o etanol 95% e água, respectivamente.

Os resultados obtidos para migração do carvacrol são promissores para aplicação do filme de acetato de celulose incorporado com carvacrol, e indicam que a migração do carvacrol no filme para o alimento será de forma gradual, podendo ser utilizado em contato com alimentos como embalagem ativa.

CAPÍTULO 5: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO CARVACROL E APLICAÇÃO DE FILME ATIVO EM PRESUNTO

5.1. INTRODUÇÃO

A carne e os produtos à base de carne são perecíveis e suscetíveis à contaminação microbiana, levando risco para a saúde dos consumidores, bem como à perda econômica na indústria da carne. Produtos cárneos contêm elevada atividade de água, grande quantidade de proteínas e nutrientes essenciais e pH favorável para o crescimento microbiano (JAYASENA; JO, 2013a; WORAPRAYOTE et al., 2016). Os microrganismos presentes na carne e seus produtos são de amplo espectro, porém as bactérias são as principais causadoras da deterioração. A refrigeração e as embalagens a vácuo são os métodos mais comuns para preservar as características desse tipo de alimento, em produtos cárneos processados também são utilizados conservantes, tais como nitritos, sulfitos, ácido sórbico. De acordo com uma percepção negativa aumentada em relação aos agentes químicos e altos teores de sais, os agentes antimicrobianos naturais vêm sendo amplamente testados quanto à sua eficácia em alimentos.

As embalagens/filmes ativos tem como principal vantagem a migração lenta do composto antimicrobiano para a superfície do alimento. Assim, uma vez que a maioria das reações de degradação ocorrem na superfície, a adição do agente antimicrobiano em embalagens pode ser mais eficiente, pois a migração prolongada do agente para a superfície do alimento ajuda a manter a eficiência do agente e menor quantidade pode ser requerida (MIRANDA et al., 2016; QUINTAVALLA; VICINI, 2002; SOARES et al., 2009; WORAPRAYOTE et al., 2016).

O objetivo desse capítulo é determinar a atividade antimicrobiana do carvacrol em contato direto com uma fase líquida e em contato na forma de vapor. Após, o filme de acetato de celulose incorporado com carvacrol será analisado quanto à capacidade para aumento da vida útil de presunto.

O carvacrol será testado contra duas bactérias deteriorantes, típicas de produtos cárneos, *Weissella viridescens* (Gram-positiva) e *Pseudomona fluorescens* (Gram-negativa).

A bactéria *W. viridescens* é capaz de crescer em condições de microaerofilia e anaerobiose, é uma das principais deteriorantes de produtos cárneos embalados a vácuo, utiliza como substrato peróxido de hidrogênio e óxido nítrico hemocromogênio, produzindo o pigmento

esverdeado porfirina, alterando a coloração do produto (NIVEN; EVANS, 1957; ALVES; SOUZA et al., 2014).

A bactéria *P. fluorescens* é uma deteriorante de produtos cárneos em temperaturas de refrigeração e, principalmente em condição de aerobiose, alteram a coloração da carne através da produção de pigmento verde com fluorescência, além de produzir proteases e lipases extracelulares responsáveis pelo odor e sabor desagradáveis (GENNARI; DRAGOTTO, 1992; LEBERT; BEGOT; LEBERT, 1998).

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material

Culturas puras liofilizadas de *W. viridescens* (Coleção de cultura tropical (CCT) 5843, *American Type Culture Collection* (ATCC) 12706, isolado de produtos de carne curada), e *P. fluorescens* (CCT 7393 ATCC 13525, origem: tanques pré-filtrados, Inglaterra) foram obtidas da Fundação Andre Tosello (SP, Brasil). Carvacrol com pureza de acima de 98% (Sigma-Aldrich) foi usado como potencial componente antimicrobiano. *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS), *Brain Heart Infusion* (BHI Broth), *Plate Count Agar* (PCA) e Agar foram utilizados para o crescimento microbiano (Sigma-Aldrich). Para acondicionar as fatias de presunto, embalagens próprias para produtos cárneos embalados a vácuo foram doadas pela empresa Spel (São Paulo, SP).

5.2.2. Ativação das bactéria e preparo dos inóculos

Para ativação, as bactérias liofilizadas foram hidratadas em água destilada esterilizada e adicionada em 5 mL de meio de cultura apropriado. Após o crescimento a 30 °C por 18 h, foram preparadas cepas repicadas, no qual 1 mL das cepas contidas no meio de cultura e 0,5 mL de glicerol foram adicionadas em microtubos e mantidos a -18 °C.

Os inóculos foram preparados com a adição de uma cepa repicada em 170 mL do meio de cultura adequado. Para *W. viridescens* e *P. fluorescens* foram preparados meios MRS e BHI, incubados a 30 °C por 18 h, atingindo concentração na ordem de 10^9 e 10^7 UFC/mL, respectivamente. O tempo de 18 h foram definidos previamente sendo eles o início da fase estacionária.

5.2.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) na fase líquida

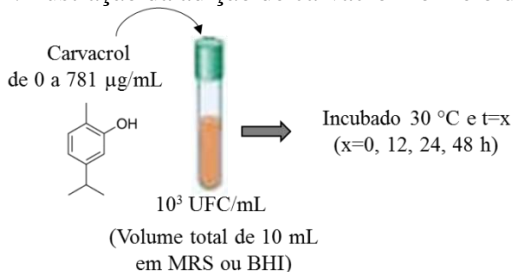
O procedimento adotado para a determinação do MIC e MBC baseou-se no método de diluição em série.

Os inóculos foram diluídos em água peptonada (1%) até a concentração na ordem de 10^4 UFC/mL, 1 mL do inóculo diluído foi adicionado em tubo de ensaio contendo 9 mL do meio de cultura, obtendo concentração inicial na ordem de 10^3 UFC/mL.

O carvacrol foi adicionado ao tubo de ensaio (contendo volume total de 10 mL de meio de cultura) nas concentrações de 0 a 781 µg/mL

(microgramas de carvacrol por mililitro de meio de cultura) e vigorosamente agitado em agitador de tubos (Vortex). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 30 °C. Amostras destrutivas foram analisadas nos tempos de 0, 12, 24 e 48 h (Figura 5.1).

Figura 5.1. Ilustração da adição de carvacrol no meio de cultura.



(Fonte: Autor)

Após a incubação em meio líquido, a concentração bacteriana de cada concentração de carvacrol foi determinada por diluição em série em 1% de água peptonada. Um mililitro de cada diluição foi transferido para placa de Petri estéril e misturado ao ágar e, após solidificação, uma segunda camada de ágar foi adicionado para *W. viridescens*. Após a solidificação final do ágar, as placas foram incubadas invertidas a 30 °C por 48 h. As placas de Petri contendo entre 30 e 300 colônias viáveis, foram contadas. Foram realizadas três repetições de cada análise, e cada repetição realizada em duplicada.

A MIC foi definida como a menor concentração de carvacrol que inibiu completamente o crescimento microbiano após 48 h de incubação. Já a MBC foi definida como a concentração que impediu totalmente o crescimento microbiano (MANN; MARKHAM, 1998).

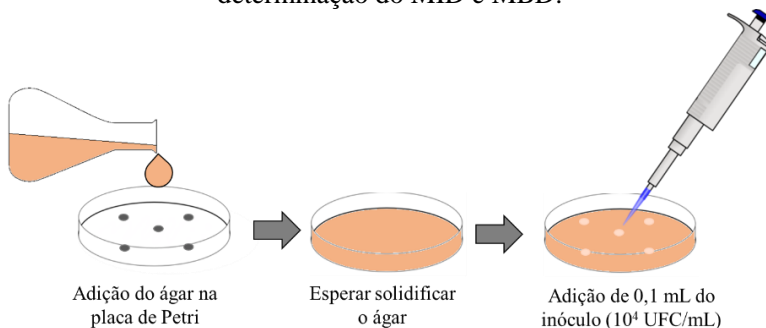
5.2.4. Determinação da dose inibitória mínima (MID) e dose bactericida mínima (MBD) na fase vapor

O procedimento para determinação do MID foi baseado na capacidade da atividade antimicrobiana do vapor do composto carvacrol, e o método foi adaptado de Ben Arfa et al. (2006) e Almeida (2017).

Nas placas de Petri esterilizadas, foram marcados 5 pontos que serviram como guia para adição do inóculo. Nas placas marcadas, foi adicionado o ágar e solidificados.

Os inóculos foram diluídos em água peptonada (1%) até a concentração na ordem de 10^4 UFC/mL. Aproximadamente 2 gotas do inóculo foram adicionadas em cada ponto marcado da placa, totalizando 0,1 mL na placa. A Figura 5.2 apresenta esquematicamente a placa contendo a marcação e adição do inóculo na superfície do ágar solidificado.

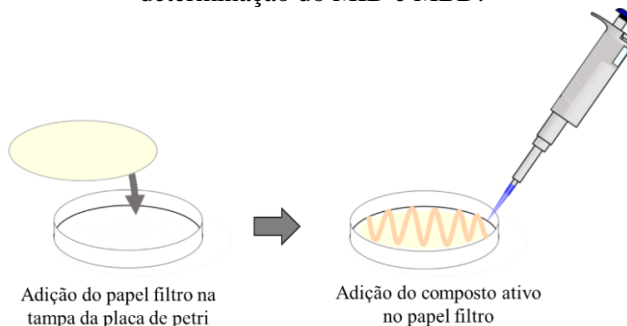
Figura 5.2. Ilustração da adição do inóculo na placa de Petri para determinação do MID e MBD.



(Fonte: Autor)

Na tampa de cada placa de Petri foi fixado um papel filtro esterilizado de 9 cm de diâmetro (dimensão aproximada para cobrir toda a área disponível no interior da tampa) e adicionados homogeneamente volumes de 0 a 50 μ L de carvacrol (Figura 5.3). Foram realizadas três repetições de cada análise, e cada repetição realizada em duplicada.

Figura 5.3. Ilustração da adição do carvacrol no papel filtro para determinação do MID e MBD.



(Fonte: Autor)

As placas foram fechadas, vedadas com *Parafilm* e incubadas em estufa bacteriológica por 48 h a 30 °C, sendo então analisadas visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento bacteriano. O MID foi definido como o menor volume de carvacrol capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano.

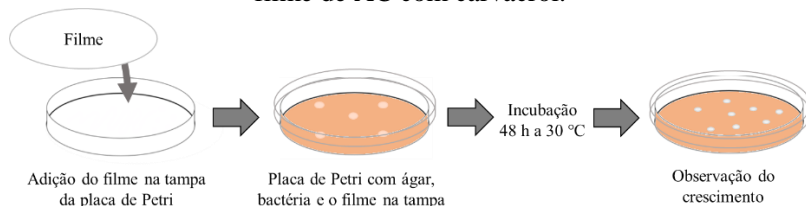
Para avaliar o efeito bactericida, para as placas em que não houve crescimento, o papel filtro contendo carvacrol foi removido e as placas foram incubadas novamente por mais 48 h a 30 °C, sendo então analisadas visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento bacteriano. O MBD foi definido como o menor volume de carvacrol capaz de inibir totalmente o crescimento das colônias de bactérias (sem crescimento de colônias mesmo após a retirada do papel filtro com carvacrol).

Os valores do MID e MBC, foi considerada a massa de carvacrol adicionado na placa de Petri de 9 cm de diâmetro. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ (micrograma de carvacrol por mililitro de *headspace*)

5.2.5. Atividade antimicrobiana do vapor de carvacrol incorporado nos filmes de acetato de celulose

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos filmes de AC ativos com carvacrol foi utilizada a metodologia descrita no item 3.2.4, sendo utilizado, no lugar do papel filtro, filmes de AC com adição de 0 a 10% de carvacrol, como ilustrado na Figura 5.4. Foram realizadas três repetições de cada análise, e cada repetição realizada em duplicada.

Figura 5.4. Ilustração da metodologia para obtenção do MID e MBD do filme de AC com carvacrol.



(Fonte: Autor)

5.2.6. Atividade antimicrobiana dos filmes ativos em presunto

Essa etapa tem como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de filmes ativos de acetato de celulose contendo carvacrol, em presunto

contaminado com as bactérias deteriorantes *P. fluorescens* e *W. viridescens*.

5.2.7. Caracterização do presunto

Peças inteiras de presunto foram adquiridas em comércio local, e foram caracterizadas quanto a atividade de água, pH e concentração de cloreto de sódio. Para isso, 3 amostras de diferentes partes da peça do presunto foram retiradas e armazenadas à 4 °C até o momento da análise.

Atividade de água

A atividade de água foi determinada em triplicata em higrômetro digital (Aqualab Modelo -Series 3 TE, Decagon Devices, Inc., Pullman, EUA).

pH

O pH foi medido em três pontos de cada amostra utilizando um pHmetro para sólidos (TESTO, modelo 205).

Concentração de cloreto de sódio

A concentração de cloreto de sódio (NaCl) foi determinada mediante análise da concentração total de cloretos e posterior conversão em NaCl, segundo metodologia proposta por Aliño et al. (2011). Amostras de presunto foram trituradas com água destilada em dispersor (Tecnal, modelo Te 147), transferida para um balão volumétrico de 100 mL completado com água destilada. A solução foi centrifugada e uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi analisada em analisador automático de cloretos (Cole Parmer, modelo 926). A partir dos resultados obtidos para os cloretos foi determinada a concentração de NaCl na amostra de acordo com a Equação 5.1.

$$X_{NaCl} = \frac{C_{Cl} \cdot V}{m} \cdot \frac{M_{NaCl}}{M_{Cl}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

na qual, X_{NaCl} é a concentração de cloreto de sódio ($g_{NaCl}/100g_{presunto}$), C_{Cl} é a leitura fornecida pelo equipamento da concentração de cloreto ($g_{Cl}/L_{solução}$), V é o volume (L) da solução (amostra e água destilada), m é a massa da amostra (g), M_{NaCl} é a massa molar do cloreto

de sódio (58,44 g/mol) e M_{Cl} é a massa molar do cloreto (35,45 g/mol). A análise foi realizada em triplicata.

5.2.8. Preparo e incubação do presunto com o filme ativo

Filmes de acetato de celulose contendo 0 (AC/0), 5 (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol foram preparados previamente conforme metodologia descrita no item 3.2.4, e armazenados em condições ambientes, embalados em papel alumínio e filme de PVC.

Primeiramente foi realizada a esterilização da câmara de fluxo e do o fatiador de frios (Metvisa, modelo CFIE 250) com álcool 70% e luz UV, para que toda a manipulação do presunto ocorresse em meio asséptico.

A embalagem externa e o presunto após a remoção da embalagem foram esterilizados com álcool 70% e secados com papel filtro esterilizado. O presunto foi cortado e 3 amostras foram separadas para a caracterização físico-química. As fatiadas foram obtidas utilizando um fatiador de frios com espessura de aproximadamente 1,5 mm, e estas cortadas com molde de 8 cm de diâmetro (Figura 5.5), as fatias foram pesadas e as massas anotadas.

Figura 5.5. Presunto fatiado e cortado com molde.



Para incubação a vácuo foram utilizadas as concentrações iniciais de 10^4 UFC/mL para a *W. viridescens* e 10^6 UFC/mL para a *P. fluorescens*, e a incubação em aerobiose foi realizada apenas para a *P. fluorescens* com concentração inicial de 10^4 UFC/mL.

Cem microlitros do inóculo com foi espalhado na superfície da fatia, e o filme foi colocado sobre a superfície inoculada, de forma que o inóculo ficasse entre o filme e a fatia de presunto. Amostras sem o filme foram preparadas como controle.

As amostras para incubação a vácuo foram embaladas diretamente em saco plástico estéril de homogeneização, conforme realizado por Silva (2015), e colocadas em uma segunda embalagem (Figura 5.6), para

permitir que a amostra fosse selada a vácuo sem o contato com o meio externo. E as amostras incubadas em aerobiose foram colocadas em placas de Petri estéreis.

As amostras foram armazenadas em estufa incubadora a 8 °C até o momento da análise microbiológica. A temperatura da estufa incubadora foi acompanhada por *datalogger* (Testo, modelo 174 H).

Figura 5.6. Fatia de presunto inculada com filme de acetato de celulose, embalagem de homogeneização e embalagem secundária a vácuo.



5.2.9. Determinação do crescimento bacteriano

A metodologia foi realizada conforme proposta por Silva (2015). Em tempos pré-determinados, nos sacos contendo as amostras foram adicionados água peptonada (1%) na proporção 9:1 (volume de água peptonada (mL)/massa de presunto (g)) e homogeneizadas em *Stomacher* (ITR, modelo 1204) por 1 min, para o preparo da primeira diluição (Figura 5.7).

Figura 5.7. Primeira diluição do presunto em sacos de homogeneização.



Foram preparadas diluições em série, 1 mL da diluição foi transferido para placa de Petri estéril e misturada ao ágar. As placas foram incubadas invertidas a 30 °C por 48 h, e então, realizada a contagem das colônias viáveis (N). Os resultados foram expressos em log UFC/g de presunto, a contagem das placas foi multiplicada pelo inverso da sua respectiva diluição. Os dados foram tratados e apresentados em gráficos de log UFC/g em função do tempo de incubação (h).

5.2.10. Modelagem matemática

O modelo matemático selecionado para descrever o crescimento microbiano no presunto em condições isotérmicas foi o de Baranyi e Roberts (1995). A escolha do modelo baseou-se na boa capacidade de predição obtidos para a *W. viridescens* em trabalhos realizados no grupo de pesquisa em Microbiologia Preditiva da UFSC (CAMARGO, 2015; PAGANINI, 2017; SILVA, 2015; SLONGO et al., 2009). A equação para a modelagem matemática para ser ajustada aos dados experimentais é dada pela Equação (5.2), tendo seus parâmetros estimados para a temperatura de 8 °C.

$$\log N = \log(N_0) + \mu F(t) - \log\left(1 + \frac{\exp(\mu F(t)) - 1}{\exp(\log(N_{m\acute{a}x}) - \log(N_0))}\right) \quad (5.2)$$

onde, N é a população microbiana em determinado tempo (t), N_0 é a população inicial, μ é a velocidade específica máxima de crescimento, $F(t)$ é a medida do estado fisiológico das células (Equação 5.3) e $N_{m\acute{a}x}$ é a população máxima atingida.

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu} \log(\exp(-\mu t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu t - h_0)) \quad (5.3)$$

onde h_0 é o parâmetro do estado fisiológico inicial da célula e está relacionada com a duração da fase lag (λ) através da Equação (5.4), o valor de h_0 é geralmente constante quando o ambiente e as condições de pré-inoculação das células são padronizadas.

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu} \quad (5.4)$$

O ajuste do modelo foi realizado no programa DMFit 3.5.

Análise estatística da predição

A avaliação da capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts foi realizada através de três índices estatísticos: fator bias (Equação 5.5), fator de exatidão (Equação 5.6) e RMSE (raiz quadrada do erro médio quadrático) (Equação 5.7).

$$fator\ bias = 10^{\left(\frac{\sum \log(valor_{predito}/valor_{observado})}{n}\right)} \quad (5.5)$$

$$fator\ de\ exatidão = 10^{\left(\frac{\sum |\log(valor_{predito}/valor_{observado})|}{n}\right)} \quad (5.6)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (valor_{predito}/valor_{observado})^2}{n}} \quad (5.7)$$

onde, $valor_{predito}$ é o valor obtido pelo modelo, $valor_{observado}$ é o valor obtido no experimento e n é o número de pontos do experimento.

Para bias igual a 1, a resposta observada é igual a resposta predita, para bias maior que 1, predito é maior que o observado e indica uma falha segura (*fail-safe*) do modelo, para bias menor que 1, predito é menor que o observado e é uma falha perigosa (*fail-dangerous*) do modelo.

O fator de exatidão é sempre maior ou igual a 1, sendo que quanto maior o seu valor, menor a exatidão da predição. O RMSE é uma medida da variabilidade residual e, quanto menor o seu valor, maior a capacidade do modelo de descrever os dados.

5.2.11. Carvacrol remanescente

Após o tempo de incubação dos ensaios de vida útil do presunto, filmes de acetato de celulose foram quantificados quanto à quantidade remanescente de carvacrol. Para isso, filmes que permaneceram em contato com o presunto foram removidos da embalagem, lavados com água destilada e com álcool 70%, os filmes foram secados superficialmente, e pesados.

A determinação do teor de carvacrol que permaneceu no filme ao longo da incubação foi determinado conforme metodologia descrita no item 4.22. Os resultados foram expressos em concentração de carvacrol remanescente no filme (% , g de carvacrol por 100 g de filme) e em concentração de carvacrol migrado para o presunto (% , g de carvacrol por

100 g de presunto), assumindo que a massa da fatia de presunto é 6,5 g, e que todo o carvacrol migrado do filme permaneceu no presunto.

5.2.12. Correlação entre as quantidades de carvacrol

Com o objetivo de estabelecer correlação entre os resultados da atividade antimicrobiana do carvacrol, foi elaborada a Tabela 5.1, a qual relaciona o volume e a massa de carvacrol com a concentração percentual de carvacrol adicionado aos filmes (g de carvacrol por g de acetato de celulose). A massa de carvacrol foi calculada a partir da massa específica do carvacrol ($0,977 \text{ g/cm}^3$) e a concentração de carvacrol no filme foi determinado considerando que a massa do filme é de 0,5 g.

Tabela 5. 1. Relação entre as quantidades de carvacrol.

Volume (μL)	Massa (mg)	Concentração no filme ($\text{g}_{\text{carv}}/100 \text{ g}_{\text{AC}}$) (%)
1	1,0	0,2
2	2,0	0,4
3	2,9	0,6
4	3,9	0,8
5	4,9	1,0
10	9,8	2,0
15	14,7	2,9
20	19,5	3,9
25	24,4	4,9
30	29,3	5,9
35	34,2	6,8
40	39,1	7,8
45	44,0	8,8
50	48,9	9,8

5.2.13. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente com o programa *Statistica* 12 (Dell, USA) através de análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey a 95% de confiança, no qual letras iguais ao lado das médias representam que não há diferença significativa entre os dados.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

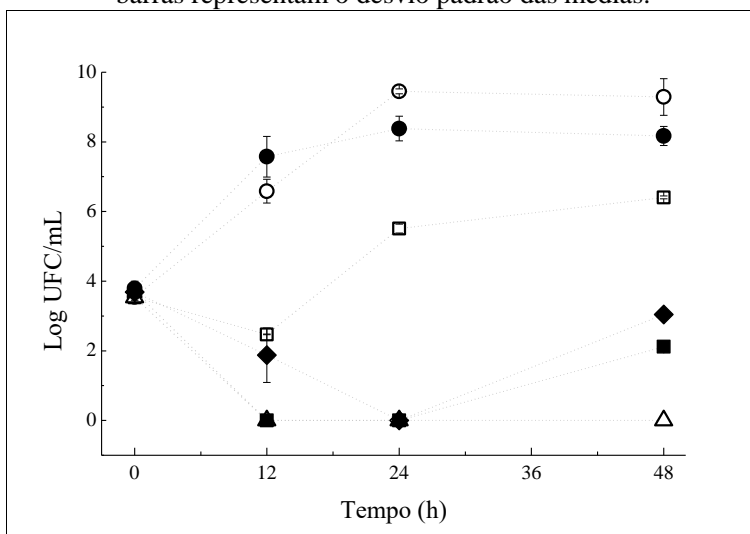
5.3.1. Concentração inibitória mínima (MIC) e Concentração bactericida mínima (MBC) na fase líquida

A bactéria ácido láctica *W. viridescens* apresentou maior resistência ao carvacrol (MIC de 293 $\mu\text{g/mL}$) quando comparada à *P. fluorescens* (MIC de 194 $\mu\text{g/mL}$). Para essas bactérias as concentrações para o MBC foram iguais, 488 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 5.2, Figura 5.8).

Tabela 5. 2. MIC e MBC para o carvacrol.

Bactéria	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>W. viridescens</i>	293	488
<i>P. fluorescens</i>	194	488

Figura 5.8. Cinética de crescimento das bactérias *W. viridescens* (símbolo vazio) e *P. fluorescens* (símbolo cheio) sem a presença (\circ ●) e com 194 $\mu\text{g/mL}$ (\blacklozenge), 293 $\mu\text{g/mL}$ (\square ■) e 391 $\mu\text{g/mL}$ (\triangle) de carvacrol. As barras representam o desvio padrão das médias.



Um efeito que pode ser observado na cinética para ambas bactérias na presença de carvacrol nas concentrações de 293 $\mu\text{g/mL}$ para a *W. viridescens* e, 194 e 293 $\mu\text{g/mL}$ para a *P. fluorescens*, as células sofreram

um *stress* acarretando na diminuição da contagem de células viáveis, seguida por um aumento dessas células. Podendo esse ser efeito conhecido como Fenômeno Fênix (*Phoenix Phenomenon*) e é causado pela inativação de uma grande proporção da população bacteriana inicial e um crescimento excessivo por células mutantes (KELLY et al., 2003). A inoculação num ambiente de *stress* (presença de carvacrol) dividiu as células em duas subpopulações: i) uma não cultivável e; ii) outra foi capaz de se multiplicar (BARANYI; METRIS; GEORGE, 2015).

A maior resistência de bactérias Gram-positivas com o uso de compostos fenólicos, também foi observada por Ben Arfa et al. (2006), Muriel-Galet et al. (2012), Puupponen-Pimia et al. (2001), Van Haute et al. (2016) e Veldhuizen et al. (2006). De acordo com Bouhdid et al. (2009), o óleo de orégano (rico em carvacrol) inativa as células de *P. aeruginosa* (Gram-negativa) interrompendo a permeabilidade e função da membrana, levando à perda de componentes citosólicos, com o vazamento de íons de potássio e redução da viabilidade celular. Para a bactéria Gram-positiva, *S. aureus*, o potencial de membrana e a permeabilidade das células são afetadas pela concentração de óleo e tempo de contato. As células Gram-positivas são mais rígidas devido à maior quantidade de peptidoglicano na parede.

Entretanto, outros autores relataram que os óleos essenciais são mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas (BURT, 2004; MITH et al., 2014; OUATTARA et al., 1997). A explicação apresentada pelos autores é que a membrana externa envolve a parede celular que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura lipopolissacarídica.

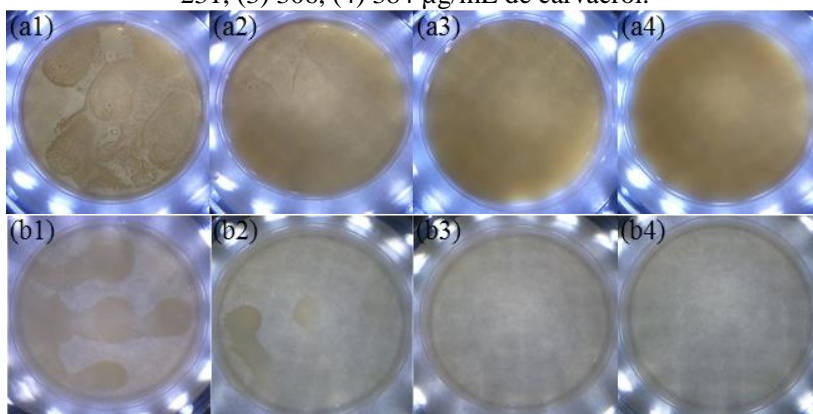
No entanto, esses trabalhos consideram apenas a natureza hidrofóbica do carvacrol, porém, segundo Nostro et al. (2009), considerando a natureza anfifílica do carvacrol, a parte hidrofílica pode permitir a difusão de carvacrol através da matriz polar de polissacarídeo, enquanto a parte hidrofóbica pode levar a interações específicas com a membrana da bactéria alterando suas propriedades estruturais e funcionais, com perda da integridade.

5.3.2. Dose inibitória mínima (MID) e Dose bactericida mínima (MBD) na fase vapor

A Figura 5.9 apresenta as imagens das placas de Petri incubadas para obtenção do efeito bacteriostático, com quantidades crescentes de carvacrol, nas quais é possível observar que, com 231 µg/mL de carvacrol (a2 e b2), ocorre grande diminuição das colônias quando comparado à

placa controle (0 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol, a1 e b1). Com a adição de 306 $\mu\text{g/mL}$ (a3 e b3), não foi observado crescimento (MID) para a *W. viridescens*, enquanto para a *P. fluorescens*, cresceram pequenas colônias (não visíveis nas imagens), nas placas com adição de 384 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol (a4 e b4), não foi observado crescimento de nenhuma colônia, sendo esse o MID para a *P. fluorescens*. Esses resultados reforçam o efeito inibidor do carvacrol sobre as bactérias testadas, e que devido à volatilidade do carvacrol é possível inibir o crescimento dessas bactérias.

Figura 5.9. Crescimento bacteriano nas placas de Petri na fase vapor após incubação de 48 h, (a) *W. viridescens* e (b) *P. fluorescens*, (1) 0, (2) 231, (3) 306, (4) 384 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol.



Das placas que continham massa de carvacrol igual e maior que 384 $\mu\text{g/mL}$, foram removidos o papel filtro e incubadas por mais 48 h para observação do efeito bactericida. MBD foi de 384 $\mu\text{g/mL}$, para as duas bactérias testadas. Ou seja, 306 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol apresenta efeito bacteriostático sobre a bactéria *W. viridescens* (inibição total do crescimento), e 384 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol o efeito é bactericida (morte de todas as colônias). A Tabela 5.3 apresenta os valores para o MID e MBD.

Tabela 5.3. Dose inibitória mínima (MID) e dose bactericida mínima (MBD) do carvacrol.

Bactéria	MID ($\mu\text{g/mL}$)	MBD ($\mu\text{g/mL}$)
<i>W. viridescens</i>	306	384
<i>P. fluorescens</i>	384	384

Ao contrário do resultado obtido para a atividade inibitória do carvacrol em fase líquida, na fase vapor, a *W. viridescens* apresentou menor resistência ao carvacrol quando comparada à *P. fluorescens*.

Este resultado pode estar relacionado a quantidade de oxigênio disponível nos dois métodos. Em meio líquido (sem agitação) é mais favorável para o crescimento da BAL, visto que há baixa concentração de oxigênio disponível. Em contrapartida, na fase vapor, a quantidade de oxigênio disponível é maior, sendo mais favorável ao crescimento da *Pseudomona*. Esses resultados são interessantes em virtude de que essas bactérias são deteriorantes de alimentos em diferentes atmosferas. Crowley et al. (2010) estudaram o crescimento de bactérias em carne bovina em diferentes condições de armazenamento, na embalagem a vácuo, após 22 dias o menor crescimento foi da *Pseudomonas* (2,46 log UFC), e para BAL foi de 6,47 log UFC. Enquanto na embalagem sem atmosfera modificada, após 10 dias de armazenamento o crescimento para a *Pseudomonas* foi de 7,33 log UFC e para BAL foi de 3,11 log UFC.

Um fato importante a ser considerado é a grande perda do composto devido à difusão através da placa de Petri. Mazidah et al. (2010) quantificaram o carvacrol no *headspace* em placas de poliestireno e observaram que a pressão parcial relativa de carvacrol atingiu em torno de 20% da pressão de vapor de saturação, enquanto em placas de alumínio esse valor foi de aproximadamente 100%. Sendo assim, devido as possíveis perdas os valores de MID obtidos podem ser superiores aos reais.

Além disso, o carvacrol difunde no ágar, podendo ser observado através do turvamento do ágar (Figura 5.9), havendo menor disponibilidade de carvacrol para agir contra as bactérias que estão na superfície. Segundo Mazidah et al. (2010), com a adição de ágar PDA (*Potato Dextrose Agar*) em placas de alumínio, a pressão parcial relativa de carvacrol atinge cerca de 35%, atribuindo à interação do composto com a água contida no ágar (97%). O coeficiente de partição do vapor de carvacrol em água foi estimado em 9×10^{-5} .

Nostro et al. (2009) compararam os resultados na fase líquida e na fase vapor da ação de carvacrol frente a bactérias patogênicas, observaram a necessidade de maior concentração de carvacrol na fase vapor. Os autores atribuíram esse resultado ao tempo para a absorção e difusão do carvacrol através do meio de cultura, resultando em tempo mais longo para obter efeito equivalente à fase líquida, juntamente com a perda de vapor através da placa.

5.3.3. Atividade antimicrobiana na fase vapor do filme ativo

Filmes contendo de 0 a 786 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol (até 10% de carvacrol), foram colocados nas tampas das placas de Petri, os resultados obtidos para inibição das bactérias pelo vapor do carvacrol estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5. 4. Dose inibitória mínima (MID) e dose bactericida mínima (MBD) dos filmes contendo carvacrol.

Bactéria	MID ($\mu\text{g/mL}$)	MBD ($\mu\text{g/mL}$)
<i>W. viridescens</i>	629	786
<i>P. fluorescens</i>	629	786

O efeito bacteriostático (MID) para as duas bactérias foi de 629 $\mu\text{g/mL}$ (8% de carvacrol no filme), valor 2 vezes e 1,5 vez maior que o MID no papel filtro, para a *W. viridescens* e *P. fluorescens*, respectivamente. O efeito bactericida (MBD) foi de 786 $\mu\text{g/mL}$ (10% de carvacrol no filme), valor 2 vezes maior que o MBD no papel filtro para as duas bactérias. Esses resultados confirmam a importância de se considerar as interações entre os compostos na avaliação dos resultados, uma vez que o carvacrol apresentou menor capacidade antimicrobiana nos filmes de acetato de celulose quando comparado ao seu estado livre.

Em quantidades menores que o MID, o carvacrol incorporado no filme apresentou inibição do crescimento das bactérias, com crescimento de pequenas colônias. Mudanças no tamanho das colônias expostas à óleos essenciais de orégano e canela, também foram observadas por Rodríguez, Batlle e Nerín (2007), o que poderia ser indicativo de danos celulares ou perturbações metabólicas.

A necessidade de maior quantidade de carvacrol para atingir a atividade antimicrobiana no filme de acetato de celulose depende da capacidade das moléculas se difundirem para a superfície pela matriz do polímero, que libera o carvacrol mais lentamente.

Segundo Royo, Fernández-Pan e Maté (2010) interações entre os óleos essenciais e os filmes têm um efeito crítico sobre a difusividade dos compostos ativos e, portanto, sobre a atividade antimicrobiana final. Os autores observaram, que o óleo essencial de sálvia em filmes de proteína de leite, não manifestou atividade antimicrobiana na concentração utilizada, o que se deve provavelmente, à baixa difusividade dos compostos ativos na matriz polimérica. Este resultado sugere que a atividade antimicrobiana de filmes ativos é função do tipo de composto e

do processo utilizado na sua produção, um óleo essencial pode ou não ter um efeito antimicrobiano, dependendo da matriz utilizada e da sua capacidade de liberar o composto ativo (ALMEIDA, 2017).

Rodríguez, Batlle e Nerín (2007) ao estudarem a atividade antimicrobiana de filmes de parafilme com óleo essencial de orégano e canela, não obtiveram inibição das bactérias Gram-positivas, segundo o estudo, a falta da inibição pode ser devido aos compostos ativos difundirem lentamente na matriz da parafina, impedindo que quantidades significativas sejam liberadas no *headspace* durante a fase de latência dos microrganismos, quando as bactérias são mais suscetíveis à inibição. Assim, apenas as moléculas dos compostos ativos próximas da interface ar/filme podem ser liberadas suficientemente rapidamente para que ocorra a inibição.

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que o carvacrol, tanto na forma livre ou incorporado no filme de acetato de celulose, é eficaz contra as duas bactérias testadas, *W. viridescens* e *P. fluorescens*. Dessa forma, os filmes contendo 0, 5 e 10% de carvacrol foram testados quanto sua capacidade antimicrobiana em fatias de presunto embalada a vácuo, e os resultados estão apresentados a seguir.

5.3.4. Ação antimicrobiana dos filmes ativos no presunto

A *aw*, pH e NaCl das peças de presunto utilizadas estão apresentados na Tabela 5.5. A sobrevivência e o crescimento de bactérias específicas para deterioração em alimentos podem ser afetados por vários fatores, os principais são temperatura, pH e atividade da água, os conservantes utilizados também podem ser incluídos nessa lista, tais como ácidos e sais (BLACKBURN, 2006; MODI, 2009). Portanto, conhecer as características intrínsecas do alimento é importante para determinar se o microrganismo de interesse é capaz de se desenvolver ou sobreviver a este meio.

Segundo a literatura, os valores de *aw*, pH e NaCl para o presunto são 0,970-0,980, 5,9-6,2 e 2-4%, respectivamente (AASLYNG; VESTERGAARD; KOCH, 2014; DE OLIVEIRA et al., 2015; FERNANDES, 2009), estando esses valores muito próximos aos obtidos no presente estudo.

Tabela 5. 5. Média e desvio padrão da caracterização do presunto.

Análise	Valor obtido
aw	0,980 ± 0,001
pH	6,30 ± 0,02
NaCl (% em massa)	1,99 ± 0,02

As bactérias ácido lácticas são capazes de se desenvolver em uma ampla variedade de condições, são resistentes a altos teores de sal, e a baixos valores de pH. No entanto, a maioria das BAL preferem pH inicial de 6 a 7 para o crescimento (EGAN, 1983). As espécies de *Weissella* crescem até 10% de NaCl (HARDIE; WHILEY, 1995), porém acima de 2,8% de sal o crescimento da *W. viridescens* pode ser prejudicado (FERREIRA, 2004).

As pseudomonas são mais frequentemente encontradas nas superfícies de carne fresca, peixe e vegetais com alta aw (0,99 ou superior). O valor mínimo de aw necessário para o seu crescimento está na faixa de 0,95-0,97, que irá depender do tipo de alimento ou dos sais e açúcares utilizados como solutos no meio (BLACKBURN, 2006). O mesmo ocorre para o pH. O uso de ácido cítrico, clorídrico ou fosfórico como acidulentes geralmente permite o crescimento a um pH relativamente menor em comparação com o uso de ácido acético ou láctico (JUVEN, 1976).

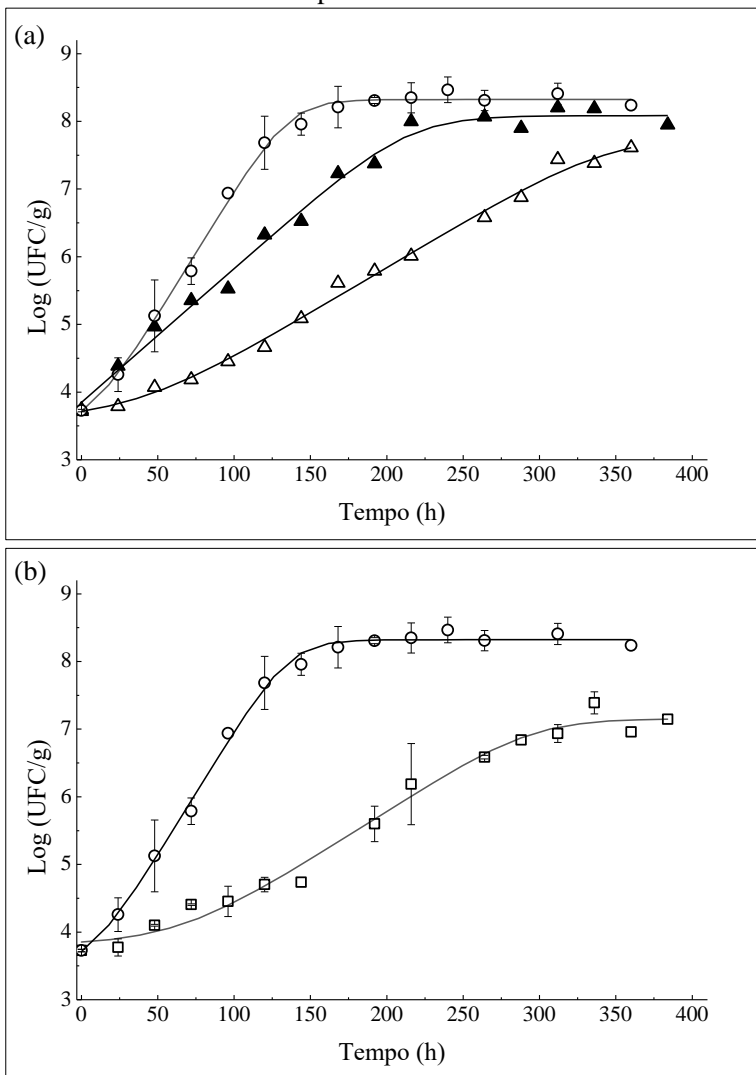
No entanto, o sal e o nitrito geralmente utilizados em presunto podem apresentar efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram-negativas e tornam mais favorável ao crescimento de bactérias Gram-positivas (EGAN, 1983).

Diante ao exposto, os valores obtidos para a aw, o pH e o NaCl das peças de presunto são adequados para o desenvolvimento das bactérias *P. fluorescens* e *W. viridescens*, sendo então, utilizados para o estudo de aumento de vida útil de presunto, com a utilização de filmes de acetato de celulose com carvacrol.

As cinéticas de crescimento da *W. viridescens* a 8°C em presunto inoculado com filme de acetato de celulose contendo 0, 5 e 10% de carvacrol, estão apresentadas na Figura 5.10.

Cinéticas utilizando o filme de acetato de celulose sem carvacrol (AC/0) também foram realizadas e não apresentaram diferença no crescimento da bactéria quando comparado à cinética das amostras sem o filme (dados experimentais no Anexo 2). O controle apresentado na Figura 5.10 refere-se às amostras inoculadas sem o uso do filme.

Figura 5.10. Cinética de crescimento da *W. viridescens* em presunto a 8 °C, controle (○) e com filmes contendo (a) 5% (experimento 1 (▲) e experimento 2 (Δ)) e (b) 10% (□) de carvacrol. Modelo de Barayi e Roberts (—) ajustado aos dados experimentais. As barras representam o desvio padrão das médias.



Com a finalidade de determinar que a flora natural do presunto tenha sido eliminada devido a esterilização da peça, amostras sem a adição do inóculo foram incubadas, não sendo observado o crescimento de colônia, ou seja, a esterilização inicial do presunto foi efetiva, e a carga microbiana ao longo da cinética se deve ao inóculo adicionado. Silva (2015) realizou a cinética de presunto esterilizado e não inoculado, e não observou crescimento bacteriano ao longo das 384 h de experimento.

Ao analisar a Figura 5.10 (a), é possível observar que ao utilizar filme de acetato de celulose contendo 5% de carvacrol (AC/5) o crescimento da bactéria apresentou grande variabilidade comparando os experimentos 1 e 2, o que não ocorreu com o uso de 10% de carvacrol (AC/10), Figura 5.10 (b). Devido a isso, o ajuste do modelo foi realizado separadamente para cada conjunto de dados experimentais, Experimento 1 (AC/5 – exp 1) e Experimento 2 (AC/5 – exp 2). Vale ressaltar que as médias apresentadas para o controle e AC/10 foram obtidas nos mesmos experimentos em que foram obtidos os dados para AC/5, o que não justificaria alguma alteração ao longo do experimento, tais como inóculo, temperatura ou demais materiais. Os dados experimentais das cinéticas de crescimento da *W. Viridescens* encontram-se no Anexo 3.

Na literatura pode ser encontrado diversos estudos relatando a variabilidade experimental, avaliando a variação dos dados utilizando as mesmas condições experimentais, no entanto estudos para avaliação da variabilidade com o uso de filmes antimicrobianos são escassos, ou inexistentes.

Baranyi, Csernus e Beczner (2014) avaliaram o erro da análise na predição de fungo em meio de cultura seletivo, o erro da replicata (dados obtidos paralelamente) foi de 5%, já da repetição (análises realizadas nas mesmas condições, mas em dias diferentes) foi de 17%.

Baranyi e Roberts (1995), ao proporem um modelo matemático para o crescimento bacteriano, relataram erro padrão de repetibilidade de aproximadamente 10% da taxa de crescimento estimada em meio de cultura, enquanto que Augustin et al. (2011) obtiveram erro de 20% em matriz alimentícia.

Segundo Den Besten et al. (2017), a concentração final de microrganismos no momento do consumo do alimento irá depender de diversas variabilidades, tais como tempo e temperatura de armazenamento e características do produto. Porém a variabilidade dos microrganismos também é relevante. Fatores de variabilidade de uma cepa (estado fisiológico, da história celular, da variabilidade genética e fenotípica) tem influência na cinética microbiana ao longo da cadeia de produção de alimentos e desafiam a previsão precisa do verdadeiro

comportamento dos microrganismos. Os autores determinaram que o aquecimento de cepas acarretou em variabilidade menos significativa da replicata do que na repetição experimental, e entre as variáveis estudadas, o aquecimento foi o principal responsável pela maior variabilidade na cinética bacteriana, quando comparado a atividade de água e pH.

Sendo assim, a ação de um antimicrobiano também pode apresentar um fator importante na variabilidade do crescimento de um microrganismo, principalmente quando incorporado em uma matriz. Apesar desse tipo de variabilidade ainda não ser estudada, é possível encontrar na literatura dados de cinéticas com o uso de filmes antimicrobianos com grande variação da média, como por exemplo o estudo de Santiago-Silva et al. (2009) com pediocina incorporado em PEBD para aumento da vida útil de presunto, a variação foi de cerca de 2,5 log UFC/g, com o uso do antimicrobiano, enquanto que o controle a variação foi menor que 1 log UFC/g. Park, Marsh e Dawson (2010) ao incorporar quitosana em PEBD também obtiveram variação de 2,5 log UFC/g na cinética bacteriana com o uso do composto ativo, no estudo *in vitro*. Para ambos os estudos, a maior variação ocorreu na presença da menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo.

Uma pequena variação na migração do carvacrol quando utilizado uma concentração menor, pode ter afetado significativamente a inibição da bactéria. Nas análises *in vitro* na fase vapor do carvacrol, o filme contendo 10% de carvacrol foi letal para as bactérias, enquanto que na presença de filme contendo 5% de carvacrol foi observado inibição do crescimento das colônias. Apesar da menor concentração de carvacrol apresentar efeito inibitório sobre a *W. viridescens*, a maior concentração demonstrou maior confiabilidade quando à previsão de crescimento microbiano.

A grande variabilidade nos dados obtidos utilizando o filme AC/5 pode estar relacionado não apenas com erros experimentais de repetição, mas também a fatores inerentes ao filme, tais como disponibilidade de carvacrol, principalmente na fase inicial, para agir sobre a bactéria. No entanto, mais estudos são necessários para definir os principais parâmetros que interferem na análise.

A Tabela 5.6 apresenta os valores dos parâmetros da cinética de crescimento da *W. viridescens* em presunto a 8 °C na presença de filmes de acetato de celulose incorporado com carvacrol, obtidos mediante ajuste demonstrado na Figura 5.10. Os índices estatísticos estão apresentados na Tabela 5.7, sendo possível observar o bom desempenho do modelo de Baranyi e Roberts ao ajustar-se aos dados experimentais, uma vez que os

valores de R^2 e fator de exatidão encontram-se próximos de 1. O fator bias para todas as amostras foram iguais a 1.

Tabela 5. 6. Parâmetros da cinética de crescimento da *W. viridescens* obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais em presunto a 8 °C na presença de filme de acetato de celulose incorporado com carvacrol.

Filme	μ (h ⁻¹)	λ (h)	$y_{\text{máx}}$
Controle	0,037	12	8,32
AC/5 – exp 1	0,020	0	8,08
AC/5 – exp 2	0,014	43	7,81
AC/10	0,014	66	7,15

Tabela 5. 7. Dados estatísticos da cinética de crescimento da *W. viridescens* obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais em presunto a 8 °C na presença de filme de acetato de celulose incorporado com carvacrol.

Filme	Exatidão	Bias	RMSE	R^2
Controle	1,010	1,000	0,109	0,996
AC/5 – exp 1	1,021	1,000	0,154	0,990
AC/5 – exp 2	1,013	1,000	0,111	0,994
AC/10	1,018	1,000	0,175	0,983

Com o uso de 5% de carvacrol, apesar da grande variabilidade, o filme apresentou efeito antimicrobiano, com diminuição de 46 e 62% da velocidade de crescimento quando comparado ao controle, para AC/5 – exp 1 e AC/5 – exp 2, respectivamente.

Com o uso de 10% de carvacrol, a atividade antimicrobiana foi mais pronunciada, com diminuição de 62% da velocidade de crescimento, fase lag 5,5 vezes menor, e crescimento máximo de aproximadamente 1 log UFC/g menor, quando comparado ao controle.

As bactérias ácido lácticas formam a microbiota de deterioração predominante em carnes embaladas a vácuo ou atmosfera modificada, causam alterações organolépticas, incluindo mudanças visíveis (como o esverdeamento), odores ruins ou formação de limo. As alterações detectáveis nos alimentos cárneos são resultados da decomposição e da subsequente formação de metabolitos causada pelo crescimento e atividade catabólica de microrganismos. A *W. viridescens* é uma das responsáveis pela produção de limo em produtos cárneos, são capazes de

produzir peróxido de hidrogênio e a reação entre o peróxido de hidrogênio e os pigmentos da carne resulta na formação de coeglobina, que é verde (EGAN, 1983). Essas alterações geralmente ocorrem quando a bactéria está próxima a fase estacionária. A deterioração por bactéria ácido láctica é muito mais lenta e a vida útil de um produto cárneo em embalagem anaeróbia é mais prolongada, em comparação com a taxa de deterioração aeróbica.

Na Figura 5.11 é possível observar as amostras embaladas das fatias de presunto no início, após 10 dias e no final da incubação. Na presença dos filmes AC/5 e AC/10, as fatias permaneceram com a coloração rosada ao longo de toda a incubação, enquanto que sem a presença do composto ativo é possível observar perda da coloração em 10 dias de incubação, e ao final a completa alteração de coloração.

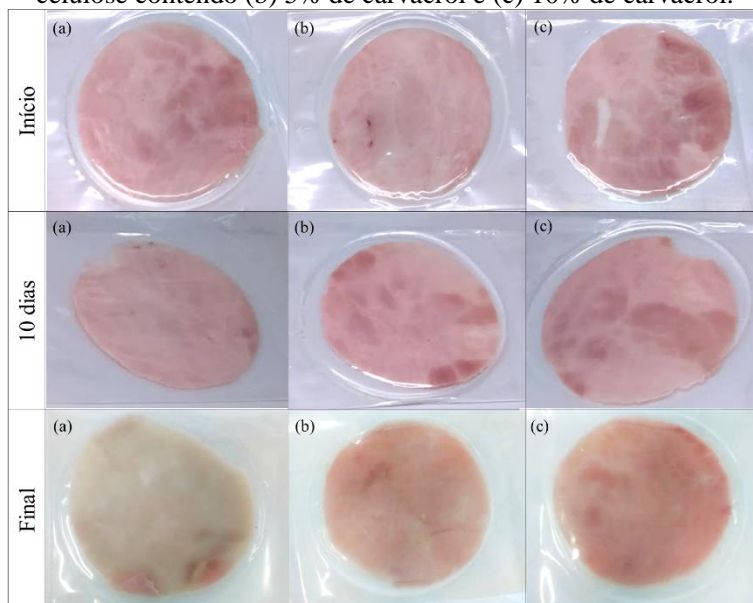
Nair et al. (2015) ao avaliarem a cor de fatias de peito de peru após 21 dias de incubação a 4 °C em embalagem com atmosfera modificada, observaram aumento da palidez na presença de carvacrol.

Níveis de contaminação iniciais em produtos cárneos é na faixa de 10^1 a 10^3 UFC/g, e atinge o máximo de 10^8 UFC/g, em embalagem a vácuo, e a deterioração sensorial devido ao crescimento das bactérias é detectável a partir de 10^7 UFC/g (7 log UFC/g), essa concentração é o critério para determinar a vida útil do produto (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000; SLOGO et al., 2009).

O tempo para atingir a vida útil foi de 102 h (aproximadamente 4 dias) para o controle, enquanto que com o filme AC/10 foi de 307 h (aproximadamente 13 dias), cerca de 200% maior que o controle, atingindo a população máxima de 7,14 log UFC/g em 15 dias, valor muito próximo ao limite da vida útil. Na presença do filme AC/5, o tempo para atingir a vida útil foi de 161 h (6,7 dias) e 290 h (12 dias), aumento de 58 e 184%, para os experimentos 1 e 2, respectivamente, quando comparado ao controle.

Em um estudo com a flora natural de presunto da mesma marca comercial do presente estudo, Menezes et al. (2018) obtiveram a concentração inicial de bactéria ácido láctica de $7,45 \times 10^2$ UFC/g. Na temperatura de 6 °C, o tempo para atingir a vida útil foi de 15 dias, enquanto que a 12 °C, foi de 9 dias. Com a adição de 0,4% (mL/100 g) de óleo essencial de orégano diretamente sobre a fatia de presunto, a 12 °C o tempo da vida útil passou para 16 dias, aumento de 78%, enquanto que a 6 °C não ultrapassou a contagem de 10^6 UFC/g.

Figura 5.11. Amostras embaladas de fatias de presunto ao longo da incubação com *W. viridescens* a 8°C, (a) controle, filme de acetato de celulose contendo (b) 5% de carvacrol e (c) 10% de carvacrol.



Após o tempo de incubação, os filmes foram quantificados quanto à concentração remanescente de carvacrol (Tabela 5.8), os quais permaneceram com cerca de 75,4 e 72,2% da concentração inicial, correspondendo a aproximadamente 0,09 e 0,21% de carvacrol no presunto, para AC/5 e AC/10, respectivamente. Estes valores são aproximados, visto que, para evitar manipulação dos filmes antes da inoculação, os filmes foram pesados somente após o ensaio de vida útil, e a massa pode variar devido ao intumescimento e migração de carvacrol ao longo do ensaio.

Tabela 5.8. Média e desvio padrão concentração de carvacrol remanescente no filme e no presunto após o tempo de incubação.

Filme	Concentração de carvacrol no filme (%)	Concentração de carvacrol no presunto (%)
AC/5 - exp 2	75,4 ± 1,4 ^a	0,09 ± 0,01 ^a
AC/10	72,2 ± 2,3 ^a	0,21 ± 0,02 ^b

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teste t.

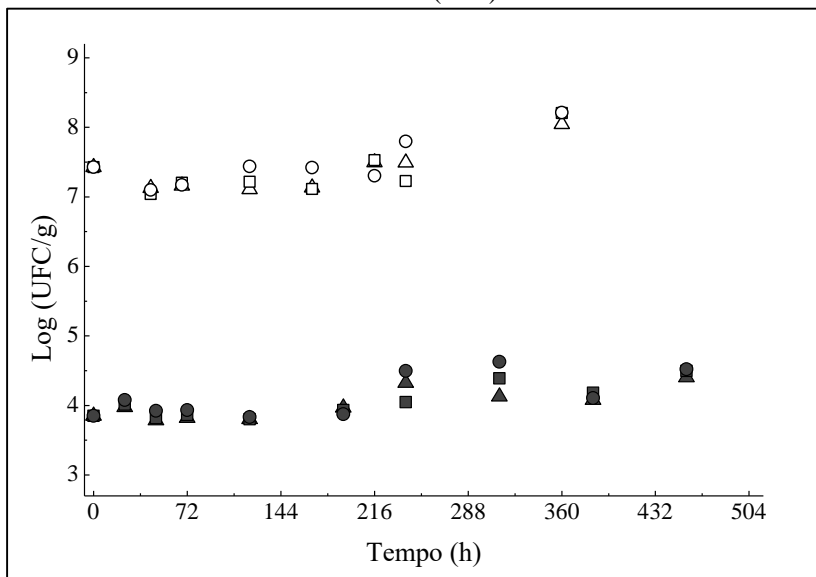
Ao comparar os resultados obtidos no presente estudo aos de Menezes et al. (2018), o uso do filme contendo carvacrol foi mais eficiente do que a adição direta de óleo essencial de orégano (rico em carvacrol), uma vez que ao final do ensaio a concentração de antimicrobiano no presunto foi de 4 e 2 vezes menor (AC/5 e AC/10, respectivamente) quando comparado ao adicionado sobre o presunto. Vale salientar que, a flora natural de um alimento o crescimento bacteriano é mais lento, visto que existe competição pelos nutrientes entre os microrganismos presentes. O tempo para atingir $7 \log \text{ UFC/g}$ obtido por Menezes et al. (2018) foi de 15 dias, e no presente estudo foi de 4 dias, na ausência do agente antimicrobiano.

Tradicionalmente, os compostos ativos são incorporados nas formulações alimentares iniciais. Uma limitação deste método tradicional é que, uma vez que os compostos ativos são consumidos em reação, a proteção cessa e a qualidade dos alimentos se degrada a uma taxa aumentada. Outra limitação é a sua incapacidade de segmentar seletivamente a superfície do alimento onde a maioria das reações de deterioração ocorrem; como resultado, uma quantidade extra de composto ativo também é adicionada desnecessariamente dentro do produto alimentar. A embalagem de liberação controlada pode superar estas duas limitações por reposição contínua de compostos ativos na superfície do alimento, compensando o consumo ou a degradação de compostos ativos, de modo que uma concentração predeterminada de composto ativo seja mantida no alimento para atingir a vida útil desejada (MASTROMATTEO et al., 2010).

Diferente das bactérias ácido lácticas, que apresentam um papel importante em alguns alimentos quando se trata de competição com outros microrganismos e que em níveis abaixo da deterioração a presença é importante, as demais bactérias apresentam presença indesejada, principalmente se tratando de patógenos. O antimicrobiano deve apresentar a capacidade não só de diminuir a velocidade de crescimento, mas de impedir o crescimento bacteriano, evitando assim surtos alimentares e deterioração acelerada de produtos alimentícios.

Com a finalidade de determinar se os filmes de acetato de celulose com carvacrol são capazes de inibir e diminuir uma população bacteriana quando embalado a vácuo, foi realizada a cinética da *P. fluorescens* partindo de uma concentração inicial elevada, 10^7 UFC/g . Em aerobiose a cinética foi realizada partindo de uma concentração inicial de 10^3 UFC/g . Os resultados estão apresentados na Figura 5.12. Os dados experimentais das cinéticas de crescimento encontram-se no Anexo 3.

Figura 5.12. Cinética da *P. fluorescens* incubada a 8°C no vácuo (branco) e em arebiose (preto) em presunto com o uso de filmes de acetato de celulose sem carvacrol (○●) e contendo 5% (△▲) e 10% de carvacrol (■□).



Os ensaios foram realizados a temperatura de 8 °C durante 15 e 20 dias, para a embalagem a vácuo e em aerobiose, respectivamente. Independente da atmosfera aplicada a concentração de *P. fluorescens* permaneceu constante ao longo de toda a incubação, tanto na ausência como na presença dos filmes com carvacrol. Entre os principais fatores que podem ter influenciado o desenvolvimento da bactéria estão a falta de oxigênio, a temperatura baixa e a composição do presunto. No entanto mais estudos são necessários para compreender esse resultado e o metabolismo da *P. fluorescens* quando exposta a essas condições.

Mellefont e Ross (2007) estudaram o efeito de lactato de potássio em *L. monocytogenes* em fatias de presunto embalados a vácuo, com população inicial de 10^1 e 10^3 UFC/g, na presença do antimicrobiano a bactéria permaneceu estática ao longo do experimento, e sem o antimicrobiano o crescimento foi de apenas 1,5 log UFC/g.

O uso de filmes de PEBD ativo com quitosana foi testado contra bactérias patogênicas por Park, Marsh e Dawson (2010), partindo da concentração de 10^7 UFC/mL, filmes contendo 0,3% de quitosana na

superfície não apresentou atividade antimicrobiana, necessitando de teor 3 vezes maior para que a população fosse próxima a zero após de 48 h de incubação a 37 °C. A ação antimicrobiana da quitosana envolve a cobertura de quitosana na superfície da parede celular para bloquear o suprimento nutricional e alterar a permeabilidade da parede celular. Dessa forma, quanto maior a concentração bacteriana, maior a quantidade requerida do antimicrobiano.

Silva-Angulo et al. (2014) estudaram o efeito de concentração subletal carvacrol na cinética de crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes* em diferentes populações iniciais, com uma população inicial de 10² UFC/mL, foi obtido redução de aproximadamente 3 log UFC/mL, enquanto que com a população inicial de 10⁶ UFC/g a redução foi menor que 1 log UFC/mL. Segundo os autores, em geral, a presença de agentes antimicrobianos naturais faz com que o crescimento microbiano se torne mais lento ou cesse, definir as condições limitantes para o crescimento é importante. No entanto, estudos em matriz alimentícia com alta população inicial de bactéria para avaliar o efeito de um antimicrobiano são escassos.

Quando se trata de embalagens com atmosfera modificada, a redução parcial de oxigênio em produtos cárneos desencadeia alterações importantes em sua flora microbiana e altera seu padrão de deterioração. Em geral, nos produtos cárneos refrigerados, a remoção do oxigênio ocasiona na inversão da flora deteriorante de bactérias Gram-negativas psicotróficas (predominantemente pseudomonadas) para bactérias Gram-positivas psicotróficas (principalmente ácido lácticas) (BLACKBURN, 2006).

Uma abordagem biológica de antagonistas microbianos, pode ser considerada, principalmente em embalagens com atmosfera modificada, uma vez que, estudos mostraram que a presença de bactérias ácido láticas em carne moída e em carne de frango inibiu o crescimento de espécies de *Pseudomonas* (RACCACH et al., 1979)

Estudos utilizando carvacrol como antimicrobiano em produtos cárneos demonstraram aumento da vida útil desses produtos testados grande variedade de microrganismos.

Ravishankar et al. (2012) ao estudarem a atividade antimicrobiana de carvacrol em filmes comestíveis à base de maçã, cenoura e hibisco em presunto obtiveram redução de 3 log UFC/g da *L. monocytogenes* com uso de 3% de carvacrol, após 7 dias de incubação a 4°C. A microbiota dos filés de frango frescos embalados foram analisadas ao longo do armazenamento por Higuera et al. (2014), e observaram inibição de todos os microrganismos testados, na presença de vapor de carvacrol

migrado de filmes de quitosana/ciclodextrina, sendo a maior redução em fungos e leveduras, de 1,8 log UFC/g. Nair et al. (2015) avaliaram a vida útil de peito de peru tratados por imersão por 30 s em soluções salinas contendo até 2% de carvacrol e embalados em atmosfera modificada, a eficácia foi comprovada com a redução das bactérias estudadas, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* e ácido lácticas, após 21 dias de incubação a 4 °C. Lim, Hong e Song (2010) aplicaram em presunto um filme comestível de alga incorporado com 1% de carvacrol, e após 9 dias de incubação a 4 °C, obtiveram diminuição de aproximadamente 1 e 2 log UFC/g dos patógenos *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*, além de reduzir significativamente a oxidação lipídica do presunto.

5.4. CONCLUSÃO

O carvacrol apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas (*P. fluorescens* e *W. viridescens*), apresentando eficiência nas fases líquida e vapor. Na fase vapor, filmes com 10% de carvacrol (786 µg/mL) foram capazes de inativar as duas bactérias testadas, essa concentração é duas vezes maior de carvacrol para obtenção da mesma atividade antimicrobiana quando comparado ao carvacrol livre.

Em fatias de presunto inoculadas a vácuo com *W. viridescens* o filme ativo com 10% de carvacrol acarretou no aumento da fase de latência e diminuição da velocidade de crescimento e população máxima final. A *P. fluorescens* não foi capaz de se desenvolver nas condições de incubação testadas.

Considerando que em embalagens a vácuo as bactérias ácido lácticas são as predominantes e que essas podem agir inibindo o crescimento das demais espécies de bactéria, o filme ativo de acetato de celulose com carvacrol foi capaz de preservar a qualidade de presunto.

Além disso, somada as boas características obtidas dos filmes, e as características inerentes do acetato de celulose (biopolímero e biodegradável) e do carvacrol (agente antimicrobiano natural e GRAS), o filme ativo obtido nesse estudo apresenta grande potencial para uso em escala industrial.

CONCLUSÃO GERAL

Os filmes de acetato de celulose obtidos com os solventes butanona e acetona apresentaram características distintas devido as diferentes velocidades de secagem, com butanona apresentaram maior rigidez, tensão na ruptura e hidrofobicidade, menor espessura, temperatura de fusão e de transição vítrea. Independente do solvente, os filmes obtidos foram transparentes e lisos, adequados para uso em embalagens alimentícias. A acetona apresentou como vantagem o menor tempo de secagem, portanto este solvente foi escolhido para continuidade do trabalho incorporando o carvacrol na solução filmogênica.

Os filmes de acetato de celulose com até 10% de carvacrol permaneceram transparentes, e com características semelhantes ao filme puro. O carvacrol apresentou boa compatibilidade com a matriz polimérica, permanecendo retido na matriz após evaporação do solvente, e quando armazenado por 22 semanas a 50 °C a perda foi de 25%. Em fluido simulante de alimentos a 8 e 25 °C, todo o carvacrol presente no filme difundiu para o etanol 95%, com coeficiente de difusão na ordem de 10^{-13} m²/s, para a água destilada a difusão não foi completa, atingindo o equilíbrio com cerca de 75% de carvacrol migrado, e o coeficiente de difusão foi na ordem de 10^{-15} m²/s. Dessa forma, em matriz alimentícia o carvacrol poderá agir por um período prolongado, com migração lenta e manutenção da concentração na superfície do alimento.

O carvacrol apresentou grande potencial para agir inibindo o crescimento de bactérias deteriorantes de alimentos, sendo a sua ação demonstrada contra as bactérias *P. fluorescens* e *W. viridescens* em *in vitro* e incorporado nos filmes de acetato de celulose, a aplicação dos filmes ativos com até 10% de carvacrol em fatias de presunto embaladas a vácuo inibiu o crescimento da *W. viridescens*.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o grande potencial de aplicação de filmes ativos de acetato de celulose incorporados com carvacrol para aumento da vida útil de alimentos, em particular o presunto. Podendo contribuir para a diminuição do uso de polímeros oriundos do petróleo, além da diminuição do desperdício de alimentos e da adição de conservantes químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASLYNG, M. D.; VESTERGAARD, C.; KOCH, A. G. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 47–55, 2014.
- ABEDINI, R.; MOUSAVI, S. M.; AMINZADEH, R. A novel cellulose acetate (CA) membrane using TiO₂ nanoparticles: Preparation, characterization and permeation study. **Desalination**, v. 277, n. 1–3, p. 40–45, 2011.
- ALIÑO, M. et al. Development of a low-sodium ready-to-eat desalted cod. **Journal of Food Engineering**, v. 107, n. 3–4, p. 304–310, 2011.
- ALMEIDA, P. A. **Desenvolvimento de embalagem ativa antimicrobiana para pães de forma**. Tese de doutorado, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- ALTINKAYA, S. A.; YENAL, H.; OZBAS, B. Membrane formation by dry-cast process: Model validation through morphological studies. **Journal of Membrane Science**, v. 249, n. 1–2, p. 163–172, 2005.
- ALVES CERQUEIRA, D. et al. Characterization of cellulose triacetate membranes, produced from sugarcane bagasse, using PEG 600 as additive. **Polymer Bulletin**, v. 60, n. 2–3, p. 397–404, 2008.
- ANVISA. Resolução-DOU n°- 228, de 30 de novembro de 2010. Regulamento técnico MERCOSUL sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 nov. 2010. p. 105. . 2010.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 113–126, 2002.
- AROUS, O.; SAOUD, F. S.; KERDJOUJ, H. Cellulose triacetate properties and their effect on the thin films morphology and performance. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 12, n. 1, 2010.
- ASTM. ASTM E96/E96M-10 Standard Test Methods for Water Vapor Transmission. . 2010.
- ASTM. ASTM D882-12 - Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. . 2012 a.
- ASTM. ASTM D3418-12e1 - Standard Test Method for Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry. . 2012 b.

AUGUSTIN, J. C. et al. Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 746–754, 2011.

BAO, C. **Cellulose acetate / plasticizer systems : structure , morphology and dynamics**. Tese de doutorado, França: Université Claude Bernard Lyon 1, 2015.

BAO, C. Y.; LONG, D. R.; VERGELATI, C. Miscibility and dynamical properties of cellulose acetate/plasticizer systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 95–102, 2015.

BARANYI, J.; CSERNUS, O.; BECZNER, J. Error analysis in predictive modelling demonstrated on mould data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 78–82, 2014.

BARANYI, J.; METRIS, A.; GEORGE, S. M. Bacterial economics: Adaptation to stress conditions via stage-wise changes in the response mechanism. **Food Microbiology**, v. 45, p. 162–166, 2015.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 199–218, 1995.

BASTOS, M. D. S. R. et al. Physical and mechanical testing of essential oil-embedded cellulose ester films. **Polymer Testing**, v. 49, p. 156–161, 2016.

BELDA-GALBIS, C. M. et al. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. **Journal of Food Engineering**, v. 141, p. 37–43, 2014.

BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149–154, 2006.

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, 2012.

BLACKBURN, C. W. Introduction. In: **Food Spoilage Microorganisms**. Inglaterra: Elsevier, 2006.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M. L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 103–120, 1996.

BOUHDID, S. et al. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by

origanum compactum essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1558–1568, 2009.

BRODY, A.; STRUPINSKY, E.; KLINE, L. **Active Packaging for food applications**. Duluth: CRC Press, 2002.

BUCHANAN, C. M. et al. The influence of degree of substitution on blend miscibility and biodegradation of cellulose acetate blends. **Journal of environmental polymer degradation**, v. 4, n. 3, p. 179–195, 1996.

BURDOCK, G. A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 6^a ed. New York: Taylor & Francis, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–53, 2004.

BURT, S. A. **Antibacterial activity of essential oils : potential applications in food**. Tese de doutorado, The Netherlands: Utrecht University, 2007.

CAMARGO, A. P. R. DA S. **Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo**. Tese de doutorado, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. 1^a ed. São Paulo: Artliber, 2004.

CARCIOFI, B. A. M. et al. Determination of thermal diffusivity of mortadella using actual cooking process data. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 1, p. 89–94, 2002.

CERISUELO, J. P. et al. Mathematical model to describe the release of an antimicrobial agent from an active package constituted by carvacrol in a hydrophilic EVOH coating on a PP film. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 1, p. 26–37, 2012.

COOKSEY, K. Antimicrobial food packaging materials. **Additives for Polymers**, v. 2001, n. 8, p. 6–10, 2001.

COWIE, J. M. G.; RANSON, R. J. The Dissolution and Stability of Cellulose Triacetate in Acetone. **Makromolekulare Chemie**, v. 143, p. 105–114, 1971.

CROWLEY, K. M. et al. The influence of storing beef aerobically or in vacuum packs on the shelf life of mince. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1319–1328, 2010.

DA CRUZ, A. C. et al. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de

sistemas microparticulados. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 385–389, 2011.

DE MORAES, A. C. M. et al. Fabrication of transparent and ultraviolet shielding composite films based on graphene oxide and cellulose acetate. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 217–227, 2015.

DE OLIVEIRA, T. L. C. et al. Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1297–1308, 2015.

DE OLIVEIRA JUNIOR, A. R. et al. Cellulose acetate/polysilsesquioxane composites: Thermal properties and morphological characterization by electron spectroscopy imaging. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, n. 4, p. 2027–2035, 2012.

DE VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7–8, p. 801–804, 2004.

DEN BESTEN, H. M. W. et al. Microbial variability in growth and heat resistance of a pathogen and a spoiler: All variabilities are equal but some are more equal than others. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 24–31, 2017.

DIAS, M. V. et al. Thermal and morphological properties and kinetics of diffusion of antimicrobial films on food and a simulant. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 15–22, 2018.

DU, E. et al. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 58, 2015.

EDGAR, K. J. et al. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1605–1688, 2001.

EGAN, A. F. Lactic acid bacteria of meat and meat products. v. 49, p. 327–336, 1983.

ENDRES, H.-J.; SIEBERT-RATHS, A. **Engineering biopolymers: markets, manufacturing, properties, and applications**. Munich: Hanser Publishers, 2011.

ESPITIA, P. J. P. et al. Effect of essential oils in the properties of cellulosic active packaging. **Macromolecular Symposia**, v. 299–300, n. 1, p. 199–205, 2011.

ESPITIA, P. J. P. et al. Packaging properties and control of *Listeria monocytogenes* in bologna by cellulosic films incorporated with pediocin.

Brazilian Journal of Food Technology, v. 16, n. 3, p. 226–235, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on Plastic materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**, v. 15, n. 1, p. 12–88, 2011.

EUROPEAN BIOPLASTICS. Bioplastics - facts and figures. **European Bioplastics**, 2016.

FERNANDES, R. **Microbiology Handbook: Meat products**. 1^a ed. Surrey, UK: Leatherhead Publishing, 2009.

FERRAREZI, M. M. F. et al. Investigation of cellulose acetate viscoelastic properties in different solvents and microstructure. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 9, p. 2730–2737, 2013.

FERREIRA, L. D. **Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado**. Dissertação de mestrado, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

FERREIRA JÚNIOR, M. F. et al. SEM study of the morphology of asymmetric cellulose acetate membranes produced from recycled agro-industrial residues: Sugarcane bagasse and mango seeds. **Polymer Bulletin**, v. 66, n. 3, p. 377–389, 2011.

FISCHER, S. et al. Properties and applications of cellulose acetate. **Macromolecular Symposia**, v. 262, n. 1, p. 89–96, 2008.

GALOTTO, M. J. et al. Experimental and theoretical study of LDPE: Evaluation of different food simulants and temperatures. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3072–3078, 2011.

GARDE, J. A. et al. Characterizing the migration of antioxidants from polypropylene into fatty food simulants. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 8, p. 750–762, 2001.

GARDNER, R. M. et al. Compostability of cellulose acetate films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 52, n. 10, p. 1477–1488, 1994.

GEMILI, S. et al. Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 3, p. 325–332, 2010.

GEMILI, S.; YEMENICIOĞLU, A.; ALTINKAYA, S. A. Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 3, p. 325–332, 2010.

GEMILI, S.; YEMENICIOĞLU, A.; ALTINKAYA, S. A. Development of

cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 453–462, 2009.

GENNARI, M.; DRAGOTTO, F. A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 4, p. 281–288, 1992.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982–989, 2009.

GOUVÊA, D. M. et al. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 85–91, 2015.

GOYDAN, R. et al. High-temperature migration of antioxidants from polyolefins. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, n. 3, p. 323–327, 1990.

GRIFFIN, S. G. et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 332, p. 322–332, 1999.

GUO, J. H. Effects of plasticizers on water permeation and mechanical properties of cellulose acetate: antiplasticization in slightly plasticized polymer film. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 13, p. 1541–1545, 1993.

HAMDANI, M.; FEIGENBAUM, A.; VERGNAUD, J. M. Prediction of worst case migration from packaging to food using mathematical models. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 5, p. 499–506, 1997.

HAN, J. H. **Novel Food Packaging Techniques**. Cambridge: Elsevier, 2003.

HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging**. 2^a ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014.

HANNA, A. A. et al. Thermal properties of cellulose acetate and its complexes with some transition metals. **Polymer Degradation and Stability**, v. 63, n. 2, p. 293–296, 1999.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Boston, MA: Springer US, 1995.

HIGUERAS, L. et al. Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 53–59, 2014.

IFA. **No Title**. Disponível em: <<http://www.dguv.de/ifa/index-2.jsp>>. Acesso em: 14 maio. 2017.

IHS MARKIT. **Cellulose Acetate Flake**. Disponível em: <<https://www.ihs.com/products/cellulose-acetate-flake-chemical-economics-handbook.html>>.

IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; CHIELLINI, E. Utilization of biobased polymers in food packaging: assessment of materials, production and commercialization. In: YAM, K.; LEE, D. S. (Eds.). . **Emerging Food Packaging Technologies**. 1ª ed. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 435–468.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 96–108, 2013.

JUVEN, B. J. Bacterial Spoilage of Citrus Products at pH Lower than 3.5. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 39, n. 147, p. 819–822, 1976.

KAMIMURA, J. A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 701–709, 2014.

KELLY, A. F. et al. Description of a “phoenix” phenomenon in the growth of *Campylobacter jejuni* at temperatures close to the minimum for growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4975–4978, 2003.

KERRY, J. P.; O’GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 113–130, 2006.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KUNDU, P. P. et al. Influence of film preparation procedures on the crystallinity, morphology and mechanical properties of LLDPE films. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 8, p. 1585–1593, 2003.

KUREK, M. et al. How composition and process parameters affect volatile active compounds in biopolymer films. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 646–656, 2012.

KUREK, M. et al. Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. **Food Chemistry**, v. 144, p. 9–17, 2014.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration

and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.

LEBERT, I.; BEGOT, C.; LEBERT, A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25 °C). **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, n. 1–2, p. 53–60, 1998.

LIM, G. O.; HONG, Y. H.; SONG, K. B. Application of gelidium corneum edible films containing carvacrol for ham packages. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 90–93, 2010.

LOPES, F. A. et al. Desenvolvimento e caracterização de filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 33–40, 2014.

LÓPEZ-CARBALLO, G. et al. Active antimicrobial food and beverage packaging. In: LEE, K. L.; D.S., Y. (Eds.). **Emerging Food Packaging Technologies**. 1ª ed. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 27–54.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. D. F.; BRUNO, L. M. Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos. **Embrapa**, 2011.

MAHALIK, N. P.; NAMBIAR, A. N. Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 3, p. 117–128, 2010.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538–544, 1998.

MANRICH, S. **Processamento de termoplásticos**. São Carlos: Altliber, 2005.

MASTROMATTEO, M. et al. Advances in controlled release devices for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 591–598, 2010.

MAZIDAH, A. R.; BRONLUND, J. E.; ROBERTSON, T. . **The dynamics of volatile release in petri dish based minimum inhibitory concentration measurements**. Chemeca 2012: Quality of life through chemical engineering. **Anais...Wellington: Barton, A.C.T.: Engineers Australia, 2010**Disponível em: <<http://search.informit.com.au/documentSummary;dn=860646551184349;res=IELENG>>

MEDEIROS, G. R. et al. Thermomechanical and transport properties of LLDPE films impregnated with clove essential oil by high-pressure CO₂. **The**

Journal of Supercritical Fluids, 2018.

MEIER, M. M. et al. Poly(caprolactone triol) as plasticizer agent for cellulose acetate films: Influence of the preparation procedure and plasticizer content on the physico-chemical properties. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 15, n. 10, p. 593–600, 2004.

MELLEFONT, L. A.; ROSS, T. Effect of potassium lactate and a potassium lactate-sodium diacetate blend on *Listeria monocytogenes* growth in modified atmosphere packaged sliced ham. **Journal Of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2297–2305, 2007.

MENEZES, N. M. C. et al. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, v. 139, p. 113–119, 2018.

MIRANDA, J. M. et al. Effect of Packaging Systems on the Inactivation of Microbiological Agents. In: BARROS-VELAZQUEZ, J. (Ed.). . **Antimicrobial Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 107–116.

MITH, H. et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food science & nutrition**, v. 2, n. 4, p. 403–16, 2014.

MODI, H. A. **Microbial Spoilage of Foods**. 1st ed. Jaipur, India: Pointer Publishers, 2009.

MONEDERO, F. M. et al. Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 4, p. 509–515, 2009.

MORAES, J. O. DE et al. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 800–808, 2013.

MURIEL-GALET, V. et al. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 195–201, 2012.

NAIR, D. V. T. et al. The combined efficacy of carvacrol and modified atmosphere packaging on the survival of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and lactic acid bacteria on Turkey breast cutlets. **Food Microbiology**, v. 49, p. 134–141, 2015.

NECULA, A. M. et al. Silver Nanoparticles in Cellulose Acetate Polymers: Rheological and Morphological Properties. **Journal of Macromolecular Science, Part B**, v. 50, n. 4, p. 639–651, 2011.

NIVEN, C. F.; EVANS, J. B. *Lactobacillus viridescens* nov. Spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. **Journal of bacteriology**, v. 73, n. 6, p. 758–759, mar. 1957.

NOSTRO, A. et al. *In vitro* activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 791–797, 2009.

NOSTRO, A. et al. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: Mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 1029–1038, 2012.

NOVIKOV, D. V; VARLAMOV, A. V; MNATSAKANOV, S. S. Cluster Structure of the Surface of Plasticized Cellulose Triacetate Films. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 301–304, 2005.

OUATTARA, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2–3, p. 155–162, 1997.

PAGANINI, C. C. **Ação antimicrobiana de filme ativo incorporado com óleo essencial de orégano no crescimento de *Weissella viridescens* e *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação de mestrado, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

PARK, S. IL; MARSH, K. S.; DAWSON, P. Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. **Meat Science**, v. 85, n. 3, p. 493–499, 2010.

PATANKAR, S. **Numerical heat transfer and fluid flow Hemisphere**, 1980.

PATEL, V. M.; PATEL, K. C.; PATEL, R. D. Diffusion of gases in cellulose triacetate. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 179, n. 10, p. 2531–2539, 1978.

PELTZER, M.; WAGNER, J.; JIMÉNEZ, A. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 26, n. 6, p. 938–946, 2009.

POÇAS, M. F. et al. A critical survey of predictive mathematical models for migration from packaging. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 10, p. 913–928, 2008.

POLA, C. C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf**

Life, v. 9, p. 69–78, 2016.

PORCIUNCULA, B. D. A. et al. Determining the effective diffusion coefficient of water in banana (*Prata variety*) during osmotic dehydration and its use in predictive models. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 3, p. 490–496, 2013.

POTTS, J. E.; CLENDINNING, R. A.; ACKART, W. B. **An investigation of the biodegradability of packaging plastics**. Washington, 1972.

PULS, J.; WILSON, S. A.; HÖLTER, D. Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, n. 1, p. 152–165, 2011.

PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 494–507, 2001.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 373–380, 2002.

RACCACH, M. et al. Potential Application of Microbial Antagonism To Extended Storage Stability of a Flesh Type Food. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 1, p. 43–46, 1979.

RAMOS, M. et al. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 513–519, 2012.

RAVISHANKAR, S. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on Ham and Bologna Using Pectin-Based Apple, Carrot, and Hibiscus Edible Films Containing Carvacrol and Cinnamaldehyde. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. 1–6, 2012.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 404–419, 2014.

REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Release kinetics of carvacrol and eugenol from poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) films for food packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 92, p. 185–193, 2017.

RESTUCCIA, D. et al. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**, v. 21, n. 11, p. 1425–1435, 2010.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science and**

Technology, v. 61, p. 132–140, 2017.

ROBERTSON, G. **Food Packaging and Shelf Life**. New York: CRC Press, 2009.

RODRIGUES FILHO, G. et al. Water flux, DSC, and cytotoxicity characterization of membranes of cellulose acetate produced from sugar cane bagasse, using PEG 600. **Polymer Bulletin**, v. 59, n. 1, p. 73–81, 2007.

RODRIGUES FILHO, G. et al. Synthesis and characterization of cellulose acetate produced from recycled newspaper. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 74–82, 2008.

RODRÍGUEZ, A.; BATLLE, R.; NERÍN, C. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. **Progress in Organic Coatings**, v. 60, n. 1, p. 33–38, 2007.

RODRÍGUEZ, F. J. et al. Modification of cellulose acetate films using nanofillers based on organoclays. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 262–268, 2012b.

RODRÍGUEZ, F. J. et al. Effect of organoclay content and molecular weight on cellulose acetate nanocomposites properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 10, p. 1996–2001, 2012a.

RODRÍGUEZ, F. J. et al. Development of an antimicrobial material based on a nanocomposite cellulose acetate film for active food packaging. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 31, n. 3, p. 342–53, 2014.

ALVES; R. S; SOUZA, A. S. Lactic acid bacteria. **Food science & nutrition**, v. 81, n. 4, p. 200–208, 2014.

ROMERO, R. B.; LEITE, C. A. P.; GONÇALVES, M. C. The effect of the solvent on the morphology of cellulose acetate/montmorillonite nanocomposites. **Polymer**, v. 50, n. 1, p. 161–170, 2009.

ROYO, M.; FERNÁNDEZ-PAN, I.; MATÉ, J. I. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2010.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329–340, 2000.

SANTIAGO-SILVA, P. et al. Antimicrobial efficiency of film incorporated

with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 85–89, 2009.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. 1ª ed., Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; REGO, R. A. **Brasil pack trends 2020**. 1ª ed. Campinas: CETEA/ITAL, 2012.

SENGUPTA, R. et al. A short review on rubber/clay nanocomposites with emphasis on mechanical properties. **Polymer Engineering & Science**, v. 47, n. 11, p. 1956–1974, 2007.

SHEMESH, R. et al. LDPE/clay/carvacrol nanocomposites with prolonged antimicrobial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 2, p. 1–8, 2015.

SILVA-ANGULO, A. B. et al. Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 336–342, 2014.

SILVA, N. B. DA. **Modelagem matemática do crescimento de Lactobacillus viridescens sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado a vácuo**. Dissertação de mestrado, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

SLONGO, A. P. et al. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 303–306, 2009.

SOARES, N. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 370–378, 2009.

SUPPAKUL, P. et al. Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 270–276, 2011.

TAWAKKAL, I. S. M. A.; CRAN, M. J.; BIGGER, S. W. Release of thymol from poly(lactic acid)-based antimicrobial films containing kenaf fibres as natural filler. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 629–637, 2016.

TUN??, S.; DUMAN, O. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 465–472, 2011.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation of active antimicrobial methyl

cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 465–472, 2011.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

UZ, M.; ALTINKAYA, S. A. Development of mono and multilayer antimicrobial food packaging materials for controlled release of potassium sorbate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2302–2309, 2011.

VAN HAUTE, S. et al. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. **Food Control**, v. 68, p. 30–39, 2016.

VARGAS JR, A. **Blendas de polietileno-amido duo-funcionais: ações antioxidante e antimicrobiana em produto cárneo**. Tese de doutorado, Florianópolis:Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

VELDHUIZEN, E. J. A. et al. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1874–1879, 2006.

VERGNAUD, J. M. Liquid transport processes in polymeric materials. **Macromolecular Symposia**. v. 391, p. 377–391, 1991.

WALLNER, G. M. et al. Development and application demonstration of a novel polymer film based transparent insulation wall heating system. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 84, n. 1–4, p. 441–457, 2004.

WARD, I. M.; SWEENEY, J. **An Introduction to the mechanical properties of solid polymers**. 2^a ed. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2004.

WASILKOSKI, C. M. **Comportamento mecânico dos materiais poliméricos**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006.

WONG, S. S.; ALTINKAYA, S. A.; MALLAPRAGADA, S. K. Understanding the effect of skin formation on the removal of solvents from semicrystalline polymers. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 43, n. 22, p. 3191–3204, 2005.

WORAPRAYOTE, W. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118–132, 2016.

WU, S. **Polymer interface and adhesion**. New York: Marcel Dekker, 1982.

WÜSTENBERG, T. **Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2015.

XU, J. B.; BARTLEY, J. P.; JOHNSON, R. A. Preparation and characterization of alginate-carrageenan hydrogel films crosslinked using a water-soluble carbodiimide (WSC). **Journal of Membrane Science**, v. 218, n. 1–2, p. 131–146, 2003.

YAM, K. L.; LEE, D. S. Emerging food packaging technologies: an overview. In: YAM, K. L.; LEE, D. S. (Eds.). . **Emerging Food Packaging Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 1–9.

YAM, K. L.; ZHU, X. Controlled release food and beverage packaging. In: YAM, K. L.; LEE, D. S. (Eds.). . **Emerging Food Packaging Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 13–26.

ANEXO 1

Dados experimentais da migração

Tabela A1.1. Média e desvio padrão (dp) dos dados experimentais da migração de carvacrol em filmes acondicionados.

Acondicionados a 25 °C			Acondicionados a 50 °C		
Tempo (semanas)	Fração migrada	dp	Tempo (semanas)	Fração migrada	dp
0	0	0	0	0	0
1	0,051	0,007	0,6	0,065	0,013
2	0,082	0,002	1	0,107	0,010
3,3	0,110	0,038	2	0,130	0,003
4,1	0,136	0,010	4	0,138	0,016
5	0,126	0,024	6	0,216	0,001
6	0,143	0,010	10	0,189	0,013
7	0,143	0,033	12	0,207	0,004
9	0,186	0,010	15	0,198	0,015
12	0,187	0,044	22	0,209	0,011
14	0,208	0,001	-	-	-
16	0,159	0,059	-	-	-
20	0,226	0,005	-	-	-
22	0,202	0,042	-	-	-

Tabela A1.2. Média e desvio padrão (dp) dos dados experimentais da migração de carvacrol em fluido simulante água a 8 °C para os filmes contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

Tempo (h)	AC/5*	dp	AC/10*	dp
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,5	0,0350	0,0049	0,0370	0,0122
1	0,0683	0,0124	0,0697	0,0048
2	0,1158	0,0233	0,0997	0,0249
3	0,1383	0,0221	-	-
4	0,1811	0,0300	0,1515	0,0341
8	0,2470	0,0303	0,2140	0,0360
10	0,2810	0,0386	0,2430	0,0418
24	0,3915	0,0482	0,3575	0,0587
34	0,4363	0,0452	0,4054	0,0520
48	0,4803	0,0393	0,4558	0,0590
74	0,5413	0,0528	0,5039	0,0661
96	0,5741	0,0439	0,5437	0,0729
144	0,6120	0,0456	0,5732	0,0708
216	0,6474	0,0396	0,6015	0,0607
264	0,6594	0,0300	0,6116	0,0556
312	0,6673	0,0256	0,6137	0,0548
360	0,6819	0,0277	0,6401	0,0735

*unidade dos dados $\text{conc}_{\text{tempo}}/\text{conc}_{\text{total}} = (\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{tempo}}/(\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{total}}$

Tabela A1.3. Média e desvio padrão (dp) dos dados experimentais da migração de carvacrol em fluido simulante água a 25 °C para os filmes contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

Tempo (h)	AC/5*	dp	AC/10*	dp
0	0	0	0	0
0,17	0,0359	0,0061	0,0580	0,0227
0,5	0,0568	0,0322	0,0874	0,0212
1	0,1019	0,0375	0,1495	0,0448
1,5	0,1386	0,0462	0,1947	0,0447
2	0,1672	0,0555	0,2367	0,0535
2,5	0,2324	0,0394	0,2683	0,0418
3	0,2542	0,0375	0,3058	0,0569
4	0,2988	0,0451	0,3294	0,0393
5	0,2732	0,0118	0,4357	-
6	0,3312	0,0084	0,4150	0,0689
9	0,4138	-	0,5289	0,0457
19,5	0,5058	0,0366	0,5817	0,0333
24	0,5473	0,0352	0,6583	0,0489
28	0,5801	0,0360	0,6776	0,0499
45	0,6032	0,0204	0,6954	0,0461
56	0,6449	0,0408	0,7311	0,0353
77,5	0,6682	0,0475	0,7121	0,0668
87,5	0,6378	0,0193	0,6858	0,0220
104	0,6810	0,0330	0,7601	-
135,5	0,6709	0,0188	0,7368	0,0584
152	0,7034	0,0356	0,7478	0,0444

*unidade dos dados $\text{conc}_{\text{tempo}}/\text{conc}_{\text{total}} = (\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{tempo}}/(\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{total}}$

Tabela A1.4. Média e desvio padrão (dp) dos dados experimentais da migração de carvacrol em fluido simulante etanol 95% a 8 °C para os filmes contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

Tempo (h)	AC/5*	dp	AC/10*	dp
0	0	0	0	0
0,17	0,5330	0,0870	0,4581	-
0,25	0,3825	0,0394	0,3953	0,0108
0,33	0,6894	0,0372	0,6246	-
0,5	0,6642	0,1273	0,6799	0,0588
0,75	0,7400	0,1095	0,7460	0,0598
1	0,7863	0,0798	0,8021	0,0495
1,5	0,8466	0,0723	0,8583	0,0419
2	0,8919	0,0648	0,8975	0,0291
3	0,9210	0,0491	0,9300	0,0262
4	0,9460	0,0464	0,9630	0,0185
5	0,9612	0,0474	0,9708	0,0132
6	0,9674	0,0339	0,9799	0,0107
7	0,9609	0,0328	0,9752	0,0070
8	0,9713	0,0233	0,9772	0,0163
10	0,9902	0,0284	0,9854	0,0096

*unidade dos dados $\text{conc}_{\text{tempo}}/\text{conc}_{\text{total}} = (\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{tempo}}/(\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{total}}$

Tabela A1.4. Média e desvio padrão (dp) dos dados experimentais da migração de carvacrol em fluido simulante etanol 95% a 25 °C para os filmes contendo 5% (AC/5) e 10% (AC/10) de carvacrol.

Tempo (h)	AC/5*	dp	AC/10*	dp
0	0	0	0	0
0,03	0,1722	0,0037	0,2976	0,0672
0,07	0,2950	0,0367	0,4468	0,0607
0,08	0,6148	0,0125	0,6699	0,1045
0,13	0,5281	0,1039	0,6220	0,0542
0,20	0,6269	0,1076	0,7210	0,0502
0,25	0,8165	0,0251	0,8668	0,0428
0,27	0,7073	0,1040	0,7781	0,0519
0,33	0,7558	0,0895	0,8240	0,0344
0,42	0,8410	0,0636	0,8947	0,0488
0,58	0,8868	0,0465	0,9323	0,0420
0,75	0,9235	0,0331	0,9455	0,0384
1	0,9552	0,0233	0,9703	0,0275
1,25	0,9750	0,0228	0,9823	0,0234
1,5	0,9849	0,0200	0,9872	0,0210
1,75	0,9986	0,0152	0,9912	0,0204
2	1,0011	0,0127	0,9933	0,0201
2,5	0,9965	0,0078	0,9949	0,0197
3	1,0042	0,0070	0,9938	0,0173
4	1,0083	0,0145	1,0092	0,0088

*unidade dos dados $\text{conc}_{\text{tempo}}/\text{conc}_{\text{total}} = (\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{tempo}}/(\text{g}_{\text{carv}}/\text{g}_{\text{filme}})_{\text{total}}$

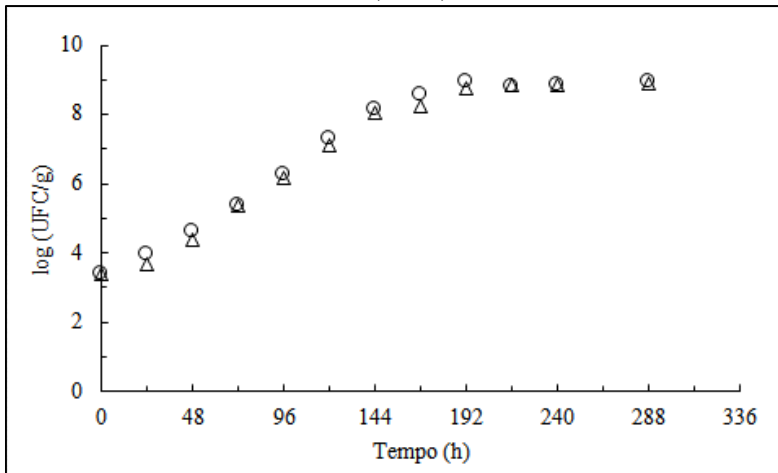
ANEXO 2

Dados experimentais do controle (sem o filme) e com o filme do crescimento da *W. viridescens* no presunto

Tabela A2.1 Dados experimentais da cinética de crescimento da *W. viridescens* em presunto a 8 °C inoculada sem filme e sem carvacrol (Controle) e do filme de acetato de celulose sem carvacrol (AC/0). Em que N é UFC/g.

Tempo (h)	Experimento 1		Experimento 2	
	AC/0 (log N)	Controle (log N)	AC/0 (log N)	Controle (log N)
0	3,24	3,24	3,59	3,59
24	3,99	3,79	3,90	3,61
48	4,48	4,57	4,73	4,21
72	5,53	5,27	5,22	5,44
96	6,74	6,12	5,77	6,19
120	7,48	6,99	7,08	7,19
144	8,12	7,83	8,12	8,25
168	8,62	8,40	8,54	8,07
192	9,24	8,81	8,65	8,72
216	9,18	9,05	8,42	8,68
240	9,02	9,02	8,66	8,68
288	9,28	9,04	8,62	8,75

Figura A2.1 Cinética de crescimento da *W. viridescens* em presunto a 8 °C inoculada (Δ) sem filme e sem carvacrol (Controle) e do (\circ) filme de acetato de celulose sem carvacrol (AC/0).



ANEXO 3

Dados experimentais do crescimento da *W. viridescens* e da *P. fluorescens* no presunto

Tabela A3.1. Dados experimentais da cinética de crescimento da *W. viridescens* em presunto a 8 °C do controle e dos filmes contendo 5% (AC/5) e 10% de carvacrol. Em que N é UFC/g.

Tempo (h)	Experimento 1			Experimento 2		
	AC/5 (log N)	AC/10 (log N)	Controle (log N)	AC/5 (log N)	AC/10 (log N)	Controle (log N)
0	3,71	3,71	3,71	3,74	3,74	3,74
24	4,38	3,68	4,43	3,79	3,86	4,08
48	4,97	4,09	5,50	4,07	4,11	4,75
72	5,35	4,40	5,93	4,18	4,41	5,65
96	5,52	4,30	6,94	4,45	4,61	-
120	6,32	4,63	7,96	4,66	4,78	7,41
144	6,52	4,74	8,07	5,09	-	7,84
168	7,23	-	8,43	5,61	-	7,99
192	7,37	5,41	8,34	5,79	5,79	8,28
216	8,00	5,76	8,51	6,01	6,61	8,19
240	-	-	8,60	-	-	8,33
264	8,07	6,57	8,41	6,58	6,61	8,20
288	7,90	6,84	-	6,88	-	-
312	8,20	7,03	8,30	7,44	6,84	8,52
336	8,19	7,27	-	7,38	7,51	-
360	-	7,15	-	7,61	6,77	8,24
384	7,95	7,15	-	-	-	-

Tabela A3.2. Dados experimentais da cinética de crescimento da *P. fluorescens* em presunto a 8 °C do controle e dos filmes contendo 5% (AC/5) e 10% de carvacrol. Em que N é UFC/g.

Vácuo				Aerobiose			
Tempo (h)	AC/5 (log N)	AC/10 (log N)	Controle (log N)	Tempo (h)	AC/5 (log N)	AC/10 (log N)	Controle (log N)
0	7,43	7,43	7,43	0	3,85	3,85	3,85
44	7,13	7,04	7,10	24	3,98	4,01	4,08
68	7,16	7,20	7,17	48	3,79	3,82	3,92
120	7,11	7,21	7,44	72	3,82	3,87	3,93
168	7,13	7,11	7,42	120	3,80	3,80	3,83
216	7,50	7,53	7,30	192	3,97	3,93	3,87
240	7,49	7,23	7,80	240	4,32	4,05	4,50
360	8,05	8,20	8,21	312	4,13	4,39	4,63
-	-	-	-	384	4,08	4,18	4,11
-	-	-	-	456	4,41	4,50	4,52