

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA – URI ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANE LOBO UGALDE

**BIOFILMES ATIVOS COM INCORPORAÇÃO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

ERECHIM – RS - BRASIL.

JUNHO DE 2014.

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA - URI ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**BIOFILMES ATIVOS COM INCORPORAÇÃO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

Mariane Lobo Ugalde

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, como pré requisito ao Título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Dr^a. Geciane Toniazzo Backes

Dr. Rogério Luis Cansian

ERECHIM –RS - BRASIL.

JUNHO DE 2014.

BIOFILMES ATIVOS COM INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

MARIANE LOBO UGALDE

Tese de doutorado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof^ª. Dr^ª. Geciane Toniazzo Backes
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Rogério Luis Cansian
Orientador

Prof. Dr. Elton Franceschi
UNIT - Aracajú

Prof^ª. Dr^ª. Sheila Mello da Silveira
IF Catarinense - Concórdia

Prof^ª. Dr^ª. Natália Paroul
URI Erechim

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Steffens
URI Erechim

ERECHIM –RS - BRASIL.
JUNHO DE 2014.

Esta página destina-se à inserção da ficha catalográfica.

AGRADECIMENTOS

À DEUS que me concedeu saúde para finalizar mais essa etapa da minha vida profissional.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal Farroupilha – Campus Júlio de Castilhos, pela licença capacitação e pela permissão de utilização de sua infraestrutura.

Aos meus orientadores, professores Rogério Luis Cansian e Geciane Toniazco Backes, pelos inestimáveis ensinamentos e tempo disponibilizados à mim para a concretização deste trabalho.

Aos bolsistas Aline Maria de Cezaro e Felipe Vedovatto pelo auxílio nas atividades laboratoriais. Às colegas Viviane Astolfi, Valéria Borszcz, Andréia Dalla Rosa, Simone Michelin, Rúbia Mores e Aline Cenci pela troca de ideias, sugestões, palavras amigas e amizade que muito ajudaram-me a superar os percalços do decorrer do caminho.

Às colegas do IFFarroupilha, Ana Denize Grassi Padilha, Greice Oliveira, Aline Bezerra, Jamila Kalil e Natiéli Piovesan pelo apoio e auxílio prestados.

À duas pessoas muito especiais, meu pai Paulo (*in memoriam*) e minha avó Judith (*in memoriam*), que no decorrer deste percurso nos deixaram e que, cada um do seu jeito, vibravam com minhas conquistas, por menores que fossem.

À minha família, em especial meu esposo Mauro, por ter realizado, com o auxílio de minha mãe Ilze e irmã Márcia, exemplarmente papel de pai e mãe da nossa filha Maria Cecília, nas inúmeras vezes que precisei ausentar-me de casa durante estes anos.

À luz e essência da minha vida, minha filha Maria Cecília.

Meus sinceros agradecimentos.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser. Mas graças a Deus, não somos o que éramos”

Martin Luther King

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

BIOFILMES ATIVOS COM INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Várias alternativas têm sido investigadas para minimizar o impacto ambiental dos polímeros convencionais, incluindo a utilização de polímeros biodegradáveis. Em comparação com os polímeros sintéticos, os polímeros naturais têm as vantagens da biodegradabilidade, obtenção a partir de recursos renováveis, serem potencialmente comestíveis além de poderem carrear compostos antimicrobianos e antioxidantes a alimentos embalados. O presente trabalho objetivou determinar a composição química, atividades antibacteriana e antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia sclarea*), visando identificar os que possuem maior potencial para uso em biofilmes ativos elaborados a partir de amido de milho, quitosana e acetato de celulose, para posterior aplicação em produtos cárneos. Os compostos voláteis majoritários identificados por cromatografia gasosa foram acetato de bornila (39,64 %), eugenol (89,58 %), carvacrol (60,71 %) e linalol (39,26 %) nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia, respectivamente. Nos OEs testados, para todas as concentrações utilizadas, houve um melhor desempenho frente às bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas, com exceção do OE de cravo-da-índia, o qual apresentou comportamento semelhante em ambas e do OE de alecrim que apresentou as maiores médias de halos formados frente às Gram-negativas. Com relação à concentração inibitória mínima (CIM), verificou-se um bom desempenho do OE de orégano em comparação aos demais, com médias de 0,016 mg.mL⁻¹ para bactérias Gram-positivas e 0,020 mg.mL⁻¹ para Gram-negativas. Houve sinergismo ao utilizar-se a combinação dos OEs de cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1, reduzindo a CIM do cravo-da-índia. A partir dos resultados obtidos utilizando-se o teste DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), pode-se concluir que o OE de cravo-da-índia tem excelente potencial para ser utilizado como antioxidante, com IC₅₀ (concentração de óleo necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH) de 11,79 µg.mL⁻¹. Da combinação dos OEs de cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1, obteve-se uma atividade antioxidante (AA) percentual máxima de 85,16 % na concentração de 100 µg.mL⁻¹ e um IC₅₀ de 6,40 µg.mL⁻¹. Para a elaboração de biofilmes ativos, foram utilizados os polímeros amido de milho, quitosana e acetato de celulose, sendo produzidos pela metodologia *casting*, incorporados com OEs de cravo-da-índia, orégano e da sua combinação binária 1:1. Os filmes foram avaliados subjetivamente quanto a sua continuidade, homogeneidade e manuseabilidade, e, de uma maneira geral, apresentaram-se incolores, translúcidos e com bom aspecto, não apresentando partículas insolúveis visíveis a olho nu. O amido de milho e a quitosana, mostraram nos testes *in vitro*, serem polímeros adequados para a produção de biofilmes com aditivos, possibilitando uma boa difusão dos OEs utilizados, com expressão da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos óleos testados. Os biofilmes de acetato de celulose apresentaram atividade antibacteriana, somente quando utilizou-se 5 % dos OEs. Matrizes poliméricas de amido de milho, incorporadas com 1 % de OE de cravo-da-índia, apresentaram rápida liberação inicial do OE (~30 % nas primeiras 24 horas) e posterior liberação de forma lenta e constante até os 30 dias. A presença do OE nos biofilmes interferiu negativamente na aceitação sensorial das salsichas envelopadas, com relação aos aspectos sabor e aroma. Foi observado efeito antioxidante do OE nos produtos, havendo diferença significativa (p<0,05) entre os tratamentos com relação aos valores de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) ao final dos 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

Palavras-chave: óleos essenciais, antimicrobiano, antioxidante, biofilmes.

Abstract of Doctoral Thesis submitted to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for the Degree of Doctor in Food Engineering.

BIOFILMS ASSETS WITH INCORPORATION OF ESSENTIAL OILS

Several alternatives have been investigated to minimize the environmental impact of conventional polymers, including the use of biodegradable polymers. Compared to synthetic polymers, natural polymers have the advantages of biodegradability obtained from renewable resources, in addition to being potentially edible can adduce antioxidants and antimicrobials packaged foods. This study aimed to determine the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities in vitro of essential oils (EOs) of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), clove (*Eugenia caryophyllata*), oregano (*Origanum vulgare*) and sage (*Salvia sclarea*) to identify those with the greatest potential for use in active biofilms made from corn starch, chitosan and cellulose acetate, for application in meat products. The major volatile compounds identified by gas chromatography were bornyl acetate (39.64%), eugenol (89.58 %), carvacrol (60.71 %) and linalol (39,26 %) in EOs of rosemary, clove, oregano and sage, respectively. In EOs tested for all concentrations, there was a better performance against the Gram-positive than Gram-negative, with the exception of EO clove, which showed similar behavior in both and the EO rosemary that had the highest means of halos formed in the face of Gram-negative. Regarding MIC (Minimal Inibitory Concentration), there was a good performance of EO oregano compared to the others, averaging 0.016 mg.mL^{-1} for Gram-positive and $0,020 \text{ mg.mL}^{-1}$ for Gram-negative bacteria. It was observed synergism when using the combination of the EOs of clove and oregano 1:1, reducing the MIC of clove. From the results obtained using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila) assay, we can conclude that the clove EO has excellent potential to be used as an antioxidant with IC_{50} (concentration of oil required to capture 50% of the DPPH free radical) of $11.79 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The combination of the EOs of clove and oregano 1:1 afforded a percent antioxidant activity of 85.16 % at the maximum concentration of $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ and an IC_{50} of $6.40 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. For the elaboration of active biofilms, were used corn starch, chitosan and cellulose acetate polymers, produced by casting method, incorporated with EOs of clove, oregano and their binary combination 1:1. The films were evaluated subjectively as its continuity, homogeneity and maneuverability, and, in general, had become colorless, translucent and good looking, showing no insoluble particles visible to the naked eye. Corn starch and chitosan have shown to be suitable polymers for the production of biofilms with additives in in vitro tests, providing a good diffusion of EOs used, with the expression of antioxidant and antimicrobial properties of the oils tested. Biofilms of cellulose acetate showed antibacterial activity, only when were used 5 % of the EOs. Polymer matrices of corn starch, incorporated with 1% of clove EO, showed rapid initial release of EO (~30 % in the first 24 hours) and subsequent slowly and steadily release up to 30 days. The presence of EO in biofilms interfered negatively with sensory acceptance of enveloped sausages with respect to flavor and aroma aspects. Was observed antioxidant effect of EO in the products, with significant difference ($p < 0.05$) between treatments with respect to the values of TBA (2-thiobarbituric acid) at the end of the 15 days of storage under refrigeration.

Keywords: essential oils, antimicrobial, antioxidant, biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – Biopolímeros de ocorrência natural com utilização em filmes e revestimentos biodegradáveis.....	18
Figura 2 – Representação das estruturas primárias da quitina e quitosana.....	22
Figura 3 - Aplicações da quitosana na indústria de alimentos.....	23
Figura 4 – Esquema da reação de produção do acetato de celulose.....	26
Figura 5 - Esquema de permeação de vapor d'água através de filmes poliméricos.....	35
Figura 6 - Diferentes modos de incorporação de aditivos nos produtos alimentares. Os pontos pretos correspondem a um composto antimicrobiano.....	40
Figura 7 – Fórmulas estruturais de alguns componentes presentes no OE de alecrim (a) α -pineno, (b) acetato de bornila, (c) cânfora, (d) 1-8 cineol, (e) limoneno, (f) borneol e (g) verbenona.....	46
Figura 8 – Fórmula estrutural do eugenol.....	47
Figura 9 – Fórmulas estruturais do carvacrol (a) e timol (b).....	48
Figura 10 - Fórmulas estruturais de alguns componentes presentes no OE de sálvia (a) α -tujona, (b) cariofileno, (c) 1,8-cineol, (d) α -humuleno e (e) cânfora.....	49
Figura 11 - Estruturas químicas de alguns constituintes dos OEs.....	51
Figura 12 – Representação esquemática do comportamento do radical DPPH utilizado na determinação da atividade antioxidante de OEs.....	56

Capítulo 3

Figura 1 - Espessura média* dos biopolímeros amido de milho, quitosana e acetato de celulose controle (BAC, BQC e BAC) e incorporados com OE de orégano (OEO), cravo-da-índia (OEC) e 1:1 orégano e cravo-da-índia (OEOC).....	113
Figura 2 - Atividade antioxidante (AA) dos biopolímeros amido de milho, quitosana e acetato de celulose controle (C), incorporados com diferentes % de OE de cravo-da-índia (OEC), OE de orégano (OEO) e OE cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1 (OECO).....	125

Capítulo 4

Figura 1 – Envelopamento prévio das salsichas.....	137
Figura 2 - Ficha utilizada para aplicação do teste diferença do controle.....	139

Figura 3 - Ficha utilizada para aplicação do teste de aceitação global.....	139
Figura 4 – Curva de liberação do OE de cravo-da-índia referente ao filme biopolimérico de amido com a concentração de 1%.....	141
Figura 5 – Histograma de frequência dos valores atribuídos a aceitação de salsichas envelopadas com amido, amido + 1 % de OE de cravo-da-índia e controle.....	144
Figura 6 - Resultados médios do índice TBARS (mg malonaldeído.Kg ⁻¹) das amostras de salsicha armazenadas sob refrigeração (5 °C).....	145
Figura 7 - Resultados médios de pH das amostras de salsicha armazenadas sob refrigeração (5 °C).....	147

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Materiais de embalagens comumente utilizados.	17
--	----

Capítulo 2

Tabela 1 – Principais compostos voláteis (% de área) encontrados nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano, sálvia e cravo-da-índia/orégano 1:1.	89
--	----

Tabela 2 – Halos médios (em mm) obtidos pelo método de difusão de placas dos OEs (5, 10 e 15 µL) de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>), cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>), orégano (<i>Origanum vulgare</i>) e sálvia (<i>Salvia officinalis</i>) frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	92
---	----

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) do OE de orégano (<i>Origanum vulgare</i>), cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>) e mistura de orégano e cravo-da-índia (1:1).....	93
---	----

Tabela 4 – Equações da reta e IC ₅₀ dos OEs testados.....	97
---	----

Capítulo 3

Tabela 1 - Valores L*, a*, b*, ΔE e opacidade (Y) médios dos biopolímeros de amido de milho, quitosana e acetato de celulose adicionados de OE de orégano, cravo e mistura de orégano e cravo-da-índia (1:1), em diferentes concentrações.....	115
---	-----

Tabela 2 - Halos médios* (mm) apresentados pelo biopolímero de amido controle (BAC) e incorporado com OEs de cravo-da-índia (BAOEC), orégano (BAOEO) e cravo-da-índia orégano 1:1 (BAOECO).....	119
--	-----

Tabela 3 - Halos médios* (mm) apresentados pelo biopolímero de quitosana controle (BQC) e incorporado com OEs de cravo-da-índia (BQOEC), orégano (BQOEO) e cravo orégano 1:1 (BQOECO).....	121
---	-----

Tabela 4 - Halos médios* (mm) apresentados pelo biopolímero de acetato de celulose controle (BA _C C) e incorporado com OEs de cravo-da-índia (BA _C OEC), orégano (BA _C OEO) e cravo orégano 1:1 (BA _C OECO).....	123
---	-----

Tabela 1 – Médias* das notas do teste de diferença do controle das amostras de salsicha controle (C), envelopadas com amido (A) e amido + 1 % de OE de cravo-da-índia (A1%).....	143
Tabela 2 – Médias* obtidas através de escala hedônica estruturada** no teste de aceitação global das amostras de salsichas controle (C), envelopadas com amido (A) e amido + 1 % de OE de cravo-da-índia (A1%).....	144
Tabela 3 – Resultados médios* dos cromas L*, a* e b* das amostras de salsicha armazenadas sob refrigeração (5 °C).....	149

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
Objetivo geral.....	15
Objetivos específicos.....	15

Capítulo 1

1.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1 Biofilmes.....	16
1.2 Polímeros biodegradáveis.....	19
1.2.1 Amido.....	19
1.2.1.1 Composição química.....	19
1.2.1.2 Gelatinização do grânulo e formação de pasta.....	20
1.2.1.3 Amido de milho.....	21
1.2.2 Quitosana.....	22
1.2.2.1 Atividade antimicrobiana.....	24
1.2.2.2 Atividade antioxidante.....	25
1.2.3 Acetato de celulose.....	26
1.3 Elaboração de filmes biodegradáveis.....	27
1.3.1 Plastificantes.....	28
1.3.1.1 Glicerol.....	29
1.3.2 Mecanismos de formação dos filmes.....	30
1.4 Métodos de avaliação dos filmes.....	31

1.4.1 Propriedades mecânicas.....	31
1.4.2 Propriedades térmicas.....	33
1.4.3 Propriedades de barreira	35
1.4.3.1 Permeabilidade ao vapor d'água.....	35
1.4.4 Propriedades óticas	36
1.4.5 Espessura	37
1.5 Biofilmes ativos.....	37
1.5.1 Biofilmes ativos antimicrobianos	39
1.5.2 Biofilmes ativos antioxidantes	42
1.6 Óleos essenciais.....	43
1.6.1 Óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	45
1.6.2 Óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>).....	46
1.6.3 Óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	47
1.6.4 Óleo essencial de sálvia (<i>Salvia sclarea</i>)	48
1.7 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	52
1.7.1 Testes <i>in vitro</i> de determinação da atividade antibacteriana	52
1.7.1.1 Método de difusão em ágar	53
1.7.1.2 Método de diluição	54
1.8 Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	54
1.8.1 Testes <i>in vitro</i> de determinação da atividade antioxidante.....	55
1.9 Produtos cárneos.....	57
1.9.1 Qualidade de produtos cárneos.....	59
1.9.1.1 Aspectos microbiológicos	59
1.9.1.2 Oxidação lipídica.....	60

1.9.1.3 Avaliação sensorial.....	62
2. REFERÊNCIAS.....	64

Capítulo 2

Atividade antibacteriana e antioxidante <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia.....	83
RESUMO.....	83
1 INTRODUÇÃO.....	84
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Composição química.....	85
2.2 Atividade antibacteriana.....	85
2.3 Atividade antioxidante pela captura de radicais livres com o teste de DPPH.....	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
3.1 Composição química.....	88
3.2 Atividade antibacteriana.....	90
3.3 Atividade antioxidante pela captura de radicais livres com o teste de DPPH.....	95
4 CONCLUSÕES.....	98
AGRADECIMENTOS.....	99
5 REFERÊNCIAS.....	99

Capítulo 3

Filmes biopoliméricos ativos – caracterização, atividades antibacterianas e antioxidantes <i>in vitro</i>	106
RESUMO.....	106
1 INTRODUÇÃO.....	107
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	108
2.1 Obtenção dos filmes biopoliméricos ativos.....	108
2.2 Espessura.....	109
2.3 Propriedades óticas - cor e opacidade.....	109

2.4 Atividade antibacteriana.....	110
2.5 Atividade antioxidante.....	111
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
3.1 Espessura.....	112
3.2 Propriedades óticas - cor e opacidade.....	114
3.3 Atividade antibacteriana.....	118
3.4 Atividade antioxidante.....	124
4 CONCLUSÕES	126
AGRADECIMENTOS.....	126
5 REFERÊNCIAS	126

Capítulo 4

Óleo essencial de cravo-da-índia em filme biopolimérico de amido – quantificação, ação antioxidante e aceitação sensorial	133
RESUMO	133
1 INTRODUÇÃO	134
2 MATERIAL E MÉTODOS	135
2.1 Elaboração dos filmes biopoliméricos.....	135
2.2 Quantificação do OE.....	136
2.3 Aplicação dos filmes biopoliméricos em salsichas.....	137
2.4 Avaliação dos produtos.....	137
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
3.1 Quantificação do OE.....	140
3.2 Avaliação dos produtos.....	142
<i>Avaliação sensorial</i>	142
<i>Oxidação lipídica</i>	144
<i>pH</i>	147
<i>Atividade de água</i>	148
<i>Parâmetros colorimétricos</i>	148
4 CONCLUSÕES	150
AGRADECIMENTOS.....	150
5 REFERÊNCIAS	150

6 CONCLUSÃO GERAL	155
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	157
Anexo A - Parecer consubstanciado do Comitê de ética.....	158

INTRODUÇÃO

O Brasil produz cerca de 240 mil toneladas de lixo por dia, número inferior ao produzido nos EUA (607 mil toneladas/dia), mas bem superior ao de países como a Alemanha (85.000 toneladas/dia) e a Suécia (10.400 mil toneladas/dia). Desse total, a maior parte vai parar nos lixões a céu aberto (Vilpoux e Averous, 2004), sendo que apenas 16,5 % do total de plásticos rígidos e filmes flexíveis produzidos são reciclados, o que equivale a 200.000 toneladas por ano (ABRE, 2011).

A produção de materiais biodegradáveis oferece uma solução interessante para os materiais plásticos, tendo em vista que os mesmos após passarem por um processo de compostagem resultam em compostos mineralizados, sendo redistribuídos no meio ambiente, através de ciclos elementares como o do carbono, nitrogênio e enxofre (Mali et al., 2005).

Dentre os materiais biodegradáveis que podem ser utilizados em substituição aos plásticos, na embalagem de alimentos, estão os de origem biológica como os polissacarídeos, proteínas, lipídios ou suas combinações. Dos polissacarídeos estudados, o amido é um dos que vem sendo explorados para a produção de materiais termoplásticos biodegradáveis, devido ao seu baixo custo, disponibilidade e produção a partir de fontes renováveis (Pelissari, 2009).

Outras opções são a quitosana, polissacarídeo derivado da quitina, e o acetato de celulose, obtido a partir da acetilação da celulose, os quais têm sido considerados excelentes materiais para a concepção de revestimentos de alimentos bem como estruturas de embalagens (Oliveira Jr., 2002; Caner, 2005; Silveira, 2005).

Nos últimos anos, os pesquisadores se dedicaram ao estudo de embalagens capazes não só de proteger, mas de interagir com o produto. As embalagens ativas são desenvolvidas para interagir de forma desejável com o produto, mudando as condições de acondicionamento para aumentar a vida de prateleira e melhorar a sua segurança ou as suas propriedades sensoriais. Os filmes que recebem aditivos e estão em contato com a superfície do produto liberam, de forma gradativa, o composto para a superfície do alimento, onde a maioria das reações químicas e microbiológicas ocorre (Soares et al., 2006). Uma opção seria a incorporação de óleos essenciais (OEs) à matriz polimérica utilizada para a produção dos

filmes, com o intuito de promover proteção antimicrobiana e antioxidante ao alimento em questão.

A utilização de temperos, condimentos e extratos vegetais, tende a ser uma alternativa aos aditivos químicos convencionais, principalmente quando empregados em combinação com outras tecnologias já existentes (Burt, 2004; Nazer et al., 2005; Dupont et al., 2006; Silva et al., 2010). Os óleos essenciais são substâncias naturais de origem vegetal voláteis classificados como GRAS (Generally Regarded As Safe), o que os torna atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (Pereira et al., 2006).

A família Lamiaceae consiste em aproximadamente 3.500 espécies que são nativas principalmente na área do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, no Sudoeste da Ásia e na América do Sul. São exemplos as espécies de alecrim (*Rosmarinus* sp.), sálvia (*Salvia* sp.), orégano (*Origanum* sp.), tomilho (*Thymus* sp.), manjeriço (*Ocimum* sp.), manjerona (*Marjorana* sp.), menta (*Mentha* sp.), segurelha (*Satureja* sp.), dentre outras, as quais são estudadas devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e medicinais (Mariutti e Bragagnolo, 2007).

Na indústria cárnea e pesqueira a aplicação de recobrimentos e películas comestíveis tem como finalidade reduzir a perda de umidade da superfície dos produtos, além de servir como um suporte para a introdução de agentes antimicrobianos e antioxidantes. As carnes e derivados constituem produtos altamente perecíveis. Cuidados muito especiais devem ser mantidos durante todas as operações. Os processos visam minimizar a deterioração e prolongar a vida de prateleira com níveis de qualidade aceitáveis. Dentre as várias matrizes alimentares de origem vegetal e animal, os embutidos cárneos representam um segmento de relevante comercialização por todo mundo. No Brasil, fazem parte dos hábitos alimentares de uma parcela considerável da população.

A vida de prateleira dos produtos depende dos seus parâmetros intrínsecos e extrínsecos, sendo que este período é estabelecido pelos produtores (Hoffmann, 2001). A presença de patógenos evidencia a necessidade de se investir em técnicas de descontaminação para garantir a segurança do alimento. Também há o interesse em reduzir ou eliminar os micro-organismos deteriorantes para aumentar a durabilidade do produto.

A oxidação lipídica e as alterações da cor são atributos importantes que podem estar relacionados à degradação e deterioração de produtos cárneos e que influenciam diretamente os aspectos sensoriais, a qualidade nutricional e a aceitação pelo consumidor. O rompimento

da integralidade das membranas musculares pela desossa mecânica, moagem, reestruturação ou cozimento alteram os compartimentos celulares com a liberação de ferro da mioglobina e de outras proteínas. A interação deste e de outros agentes pró-oxidantes com os ácidos graxos polinsaturados resulta na geração de radicais livres e na propagação de reações oxidativas (Olivo, 2006).

Os óleos essenciais de condimentos podem ter muitos componentes, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos mesmos. Os compostos fenólicos são hidrofóbicos e o seu sítio de ação é a membrana celular da célula microbiana, onde acumulam-se causando desarranjo na função e na estrutura da membrana e penetram a célula bacteriana, exercendo atividade inibitória no citoplasma celular, provocando lise e liberação do ATP intracelular (Walsh et al., 2003). Juntos, os diferentes compostos presentes nos OEs produzem um arranjo de antioxidantes que pode agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (Shahidi, 1997).

Os consumidores mais conscientes e informados tendem a demandar produtos seguros e de qualidade atestada, obtidos a partir de boas práticas de fabricação e controle de riscos. Nessa direção têm sido desenvolvidas pesquisas visando à substituição de aditivos sintéticos utilizados para auxiliar na preservação dos alimentos, seja de alterações químicas quanto microbiológicas, por elementos mais naturais, menos agressivos a saúde do consumidor e ao meio ambiente.

O desenvolvimento de biofilmes ativos vem de encontro com tais anseios, tendo em vista que preenche duas lacunas importantes, a utilização de embalagens biodegradáveis e a possibilidade de redução do uso de aditivos sintéticos, tendo em vista a inclusão na sua matriz de agentes com atividades antimicrobianas e antioxidantes, como os óleos essenciais.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver biofilmes de amido de milho, quitosana e acetato de celulose, contendo diferentes concentrações de óleos essenciais para aplicação em salsicha.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia sclarea*) *in vitro*, com relação a sua atividade antimicrobiana e antioxidante;
- Caracterizar quimicamente os óleos essenciais;
- Formular filmes de amido de milho, quitosana e acetato de celulose, com incorporação de diferentes concentrações dos óleos essenciais selecionados nas etapas anteriores;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro*, dos filmes formulados;
- Investigar o efeito dos filmes na conservação de salsicha realizando análises sensoriais e quantificando a oxidação lipídica durante o armazenamento sob refrigeração.

Esta Tese encontra-se dividida em Introdução, quatro Capítulos, sendo um destinado à Revisão Bibliográfica e os demais no formato de manuscritos visando publicação em três periódicos distintos, Conclusão geral e Sugestões para trabalhos futuros.

	Introdução
	Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica
	Capítulo 2 - Atividade antibacteriana e antioxidante <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia
	Capítulo 3 - Filmes biopoliméricos ativos – caracterização, atividades antibacterianas e antioxidantes <i>in vitro</i>
	Capítulo 4 - Óleo essencial de cravo-da-índia em filme biopolimérico de amido - quantificação, ação antioxidante e aceitação sensorial
	Conclusão Geral
	Sugestões para trabalhos futuros

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biofilmes

Embalagem para alimentos, de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (ANVISA, 2012) é o artigo que está em contato direto com alimentos, destinado a contê-los desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como de adulterações.

As embalagens plásticas produzidas com os polímeros convencionais de fonte petroquímica degradam-se muito lentamente no ambiente, pois são bastante resistentes às radiações, ao calor, ao ar, à água e ao ataque imediato de micro-organismos. Isso gera problemas ambientais, visto que a degradação desses materiais leva centenas de anos (Arvanitoyannis et al., 1999). Várias alternativas têm sido investigadas para minimizar o impacto ambiental dos polímeros convencionais, incluindo a utilização de polímeros biodegradáveis. Em comparação com os polímeros sintéticos, os polímeros naturais como materiais de embalagens de alimentos, têm as vantagens da biodegradabilidade, obtenção à partir de recursos renováveis e serem potencialmente comestíveis (Quintero et al., 2012).

O desenvolvimento de recobrimentos e películas comestíveis tem sido objeto de numerosos trabalhos de pesquisa nos últimos 20 anos. Sem dúvida, tanto o conceito quanto a prática de recobrir um alimento para melhorar sua qualidade e aumentar seu período de armazenamento é muito antigo. A aplicação direta de revestimentos em frutas cítricas para evitar sua desidratação e proporcionar brilho, é provavelmente a aplicação mais antiga dos recobrimentos comestíveis (Pan e Caballero, 2011).

Emulsões derivadas de óleos minerais têm sido empregadas desde o século 13 na China, para elevar a conservação de frutos cítricos e demais produtos perecíveis que eram transportados por longas distâncias, principalmente por via marítima. Na década de 1950, a cera de carnaúba foi amplamente empregada para esse fim, mas devido à aparência fosca resultante de sua aplicação, para melhor resultado visual, polietileno e parafinas foram

adicionados. À partir da década de 60, ceras e vernizes processados a partir de gomas solúveis em água se tornaram populares no revestimento de cítricos e frutas em geral (Assis, 2012).

Filmes são estruturas para envolver produtos. Quando são completamente degradados por micro-organismos são considerados biodegradáveis, sendo denominados biofilmes. Os biofilmes são materiais de fina espessura, preparados a partir de macromoléculas biológicas, que agem como barreira a elementos externos (umidade, gases e óleos), protegendo os produtos e aumentando sua vida de prateleira. Adicionalmente, podem carrear compostos antimicrobianos e antioxidantes, sendo denominados biofilmes ativos (Krochta e Mulder-Johnston, 1997).

Dentre os materiais pesquisados, os biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, são os mais promissores, devido ao fato de serem abundantes, renováveis, e capazes de formar uma matriz contínua (Gontard e Guilbert, 1993). Filmes obtidos a partir dessas matérias-primas são econômicos, devido ao baixo custo das mesmas e ao fato de serem biodegradáveis. Ainda apresentam outras vantagens, como poderem ser consumidos em conjunto com o produto, reterem compostos aromáticos, carrear aditivos alimentícios ou componentes com atividades antimicrobiana e/ou antioxidante (Pranotto et al., 2005).

O uso de polímeros à partir de fontes renováveis para embalagens de alimentos é crescente. No entanto, em comparação com os polímeros sintéticos termoplásticos, eles apresentam problemas quando processados com as tecnologias tradicionais e mostram desempenhos inferiores em termos de propriedades funcionais e estruturais (Nedi et al., 2011).

Os materiais de embalagens comumente utilizados em alimentos estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Materiais de embalagens comumente utilizados em alimentos.

Tipo de filme	Unidade monomérica	Características
Polietileno	Etileno	Propriedades mecânicas desejáveis, termoadesivo.
Polivinilideno	Vinilideno	Barreira água/O ₂ desejáveis, termoadesivo, não muito forte.
Poliéster	Etilenoglicol + ácido tereftálico	Propriedades mecânicas desejáveis, baixa barreira água/O ₂ , não termoadesivo.
Celofane	Glicose (celulose)	Barreira água/O ₂ desejáveis, não termoadesivo.

Fonte: Tharanathan, 2003 (adaptado).

De acordo com Kader (1989) um bom material de embalagem deve preencher alguns pré-requisitos:

- permitir uma troca gasosa lenta, mas controlada do alimento (reduzida absorção de O₂);
- propiciar barreira seletiva a gases (CO₂) e vapor d'água;
- criação de uma atmosfera modificada no que diz respeito à composição interna de gases, regulando assim o processo de amadurecimento de frutas e hortaliças, levando a um aumento da vida de prateleira;
- redução da migração de lipídios, em produtos de confeitaria;
- manutenção da integridade estrutural;
- servir como um veículo para incorporar aditivos alimentares (corantes, aromatizantes, antioxidantes, antimicrobianos, etc.) e,
- evitar ou reduzir a contaminação microbiológica durante armazenamento prolongado.

No entanto, as embalagens tradicionais necessitam de melhorias para estender a vida de prateleira dos produtos alimentícios e atender a demanda dos consumidores por produtos seguros, saudáveis, próximos ao natural e com menos conservantes (Soares et al., 2009).

Os diversos biopolímeros que ocorrem naturalmente e que, podem ser utilizados na produção de filmes e revestimentos estão ilustrados na Figura 1. Estas biomoléculas são compatíveis entre si e com outros hidrocolóides, surfactantes e aditivos. Os polissacarídeos são conhecidos pela sua complexidade estrutural e diversidade funcional (Tharanathan, 2003). Estruturas lineares de alguns polissacarídeos como, por exemplo, a celulose, amido, quitosana, originam filmes resistentes, flexíveis e transparentes.

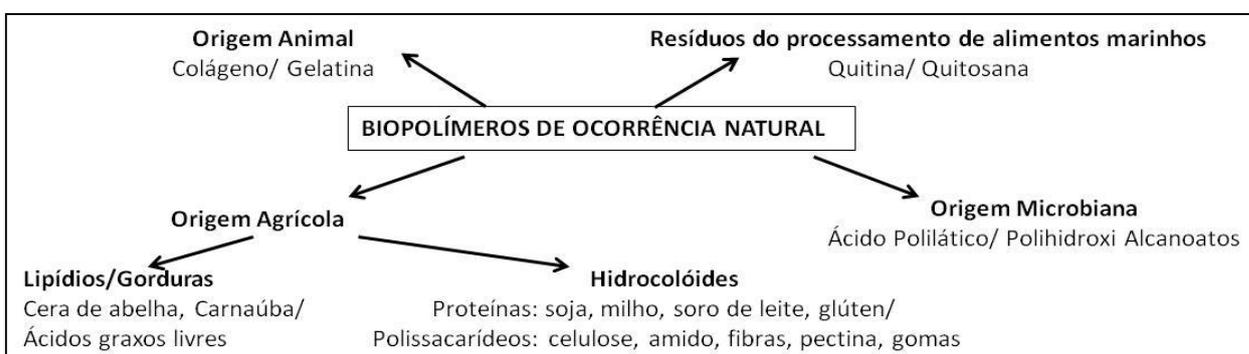


Figura 1 – Biopolímeros de ocorrência natural com utilização em filmes e revestimentos biodegradáveis.

Fonte: Tharanathan, 2003 (adaptado).

1.2 Polímeros biodegradáveis

1.2.1 Amido

As características químicas e físicas e os aspectos nutricionais do amido o destacam dos demais carboidratos. Ele é a reserva alimentar predominante das plantas, fornecendo 70-80% das calorias de consumo humano no mundo. Além disso, o amido é o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados, uma vez que contribui para diversas propriedades de textura em alimentos, possuindo aplicações industriais como espessante, estabilizador de colóides, agente gelificante e de volume, adesivo, na retenção de água, dentre outros (Singh et al., 2003).

Os amidos comerciais são obtidos a partir de sementes de cereais, principalmente de milho comum, milho ceroso, milho de alto teor de amilose, trigo, arroz, tubérculos e raízes, em especial batata e mandioca.

1.2.1.1 Composição química

O amido distingue-se entre os carboidratos por ocorrer, na natureza, em partículas características denominadas grânulos, os quais são insolúveis, hidratando-se muito pouco em água fria. O tamanho e a forma do grânulo são característicos de cada fonte vegetal, o que permite identificá-los microscopicamente (Weber et al., 2009).

A capacidade de aumento de viscosidade do amido é obtida apenas quando a suspensão é aquecida. Uma segunda particularidade é que a maioria dos grânulos é composta de dois polímeros: um polissacarídeo linear, chamado amilose, e um polissacarídeo ramificado, chamado amilopectina (Fennema et al., 2010).

Lansky et al. (1949) apud Denardin e Silva (2009) propuseram a existência de um terceiro componente no amido de milho normal, chamado de material intermediário, com propriedades diferentes da amilose e da amilopectina. Esse componente pode também apresentar papel importante na determinação das propriedades funcionais do amido, pois a presença de um grande número de cadeias ramificadas curtas nesse componente pode contribuir para a menor cristalinidade granular, a temperatura de gelatinização, a mudança na entalpia, a viscosidade, o grau de retrogradação e o maior grau de digestibilidade pelas enzimas que promovem a hidrólise. Por outro lado, moléculas ramificadas que apresentam longos comprimentos de cadeias e menores graus de ramificação podem contribuir para a

maior cristalinidade, a temperatura de gelatinização, o grau de retrogradação, a viscosidade e a firmeza de gel (Vandeputte et al., 2004). Com base em estudos de afinidades por iodo, esses pesquisadores sugeriram que o amido de milho normal, apresenta um teor entre 5 % e 7 % entre as frações estritamente lineares e altamente ramificadas.

No entanto, o conceito de material intermediário ainda é obscuro devido a dificuldades no seu isolamento e na purificação, sendo que o principal critério para classificação ainda é o grau de ramificação e o peso molecular (Denardin e Silva, 2009).

1.2.1.2 Gelatinização do grânulo e formação de pasta

O aquecimento contínuo dos grânulos de amido, em excesso de água, resulta em inchaço dos grânulos, lixiviação de compostos solúveis (principalmente amilose) e, ruptura total dos grânulos, principalmente com a aplicação de forças de cisalhamento. Esses fenômenos resultam na formação de uma pasta de amido, constituída de uma fase contínua de amilose solubilizada e/ou moléculas de amilopectina, e uma fase descontínua de grânulos remanescentes (Fennema et al., 2010).

Segundo Singh et al. (2003), quando as moléculas de amido são aquecidas em excesso de água, a estrutura cristalina é rompida, e as moléculas de água formam pontes de hidrogênio entre a amilose e amilopectina, expondo seus grupos hidroxil, o que causa um aumento no inchamento e na solubilidade do grânulo. Esse poder de inchamento e solubilidade varia de acordo com a fonte do amido, fornecendo evidências da interação entre as cadeias de amido dentro dos domínios amorfos e cristalinos. A extensão destas interações é influenciada pela proporção amilose:amilopectina e pelas características dessas moléculas (distribuição e peso molecular, grau e comprimento de ramificações e conformação) (Denardin e Silva, 2009).

A gelatinização ocorre numa ampla faixa de temperatura característica para cada fonte de amido (Eliasson, 1996; Singh et al., 2003). Existem muitos fatores que afetam essa temperatura de gelatinização, sendo o principal deles a presença de água. Isso ocorre porque a água atua como agente plastificante nos cristais de amido, além de exercer efeito na condução de energia. Com isso, sua presença diminuirá a temperatura de transição vítrea, diminuindo conseqüentemente, a temperatura de fusão (desorganização) dos cristais (Eliasson, 1996).

Quando a temperatura é reduzida à ambiente, ocorre um rearranjo das moléculas por ligações de hidrogênio, fenômeno denominado de retrogradação, havendo liberação de

moléculas de água anteriormente ligadas as cadeias de amilose (Bobbio e Bobbio, 2003). A taxa de retrogradação depende de muitas variáveis, inclusive da razão molecular entre a amilose e a amilopectina; da estrutura das moléculas de amilose e amilopectina, a qual é determinada pela origem botânica do amido; da temperatura; da concentração de amido; e da presença e concentração de outros ingredientes, principalmente surfactantes e sais (Fennema et al., 2010).

1.2.1.3 Amido de milho

O mercado mundial de amido está dividido em cinco matérias-primas, quatro delas de origem tropical (milho, batata, batata-doce e mandioca). Dessas, o milho (*Zea mays* L.) é a mais significativa, com 75 % da produção mundial. É a principal fonte de amido nos Estados Unidos, na Europa, na Ásia e no Brasil (ABAM, 2012). O amido é extraído do grão de milho e separado dos seus outros constituintes, proteína, gérmen e casca, por um processo denominado moagem úmida, que consiste numa série de etapas simples de separação física (moagem, crivagem, centrifugação) em meio aquoso. Após secagem obtém-se um pó fino e amarelado (COPAM, 2012). O amido nativo de milho é utilizado como agente espessante, agente ligante, agente de tratamento superficial e como polímero natural entre outras, tendo aplicações na indústria química fina, indústria farmacêutica, detergentes, fertilizantes, surfactantes, construção civil, tintas, têxtil, produção de papel e plásticos biodegradáveis.

Devido a sua abundância e degradabilidade, muitos pesquisadores tem utilizado o amido para a elaboração de filmes biodegradáveis (Pelissari, 2009). Segundo Shimazu et al. (2007), a aplicação do amido na preparação de biofilmes se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e filmes. As moléculas de amilose em solução, devido à sua linearidade, tendem a se orientar paralelamente, aproximando-se o suficiente para que se formem ligações de hidrogênio entre hidroxilas dos polímeros adjacentes. Como resultado, a afinidade do polímero por água é reduzida, favorecendo a formação de pastas opacas e filmes resistentes.

Os filmes, dependendo da fonte do amido, apresentam diferentes propriedades atribuídas ao conteúdo de amilose no amido, que varia entre 18 a 30 %. Quanto maior o teor de amilose, melhor será o filme formado. No entanto, devido ao caráter hidrofílico, estes filmes possuem baixas propriedades de barreira a vapores de água, porém, apresentam baixa permeabilidade a gases como CO₂ e O₂. As propriedades mecânicas também são um fator

limitante, tendo em vista que comparados à filmes sintéticos, possuem flexibilidade limitada, pois o amido gelatinizado apresenta fortes ligações polares que os tornam quebradiços (Lawton, 1996).

1.2.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose e de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose obtida pela desacetilação parcial da quitina (Figura 2), sendo também encontrada na parede celular de fungos (Fai et al., 2008). A quitina é sintetizada por um grande número de organismos vivos, encontrada no exoesqueleto dos artrópodes e insetos, na cutícula dos anelídeos e moluscos, nas paredes celulares de fungos e leveduras e na concha de crustáceos como camarão, lagosta e caranguejo (Kurita, 2006).

A utilização de massa micelial de fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana tem demonstrado grandes vantagens, tais como: extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala, sendo que a quantidade destes polissacarídeos extraídos da biomassa varia de acordo com a espécie de fungo e condições nutricionais, principalmente a fonte de carbono utilizada. Fungos da Divisão *Zygomycotina* apresentam simultaneamente quitina e quitosana em sua parede celular (Stamford et al., 2007).

A quitina passa a ser chamada de quitosana quando o grau de acetilação é menor que 50 % e esta torna-se solúvel em ácidos diluídos, como ácido acético, maleico e láctico (Dutta et al., 2011).

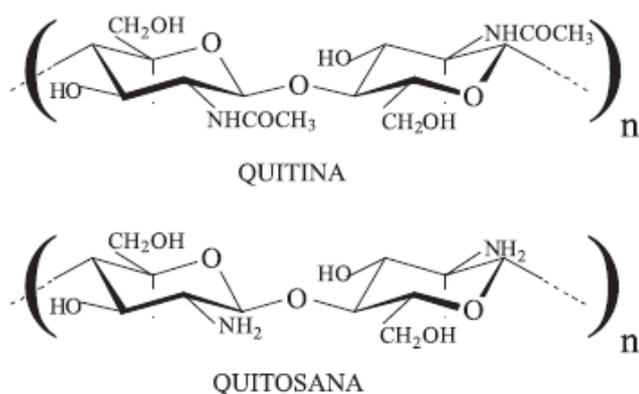


Figura 2 – Representação das estruturas primárias da quitina e da quitosana.

A quitosana vem sendo extensivamente estudada devido as suas propriedades, as quais lhes conferem aplicabilidade em diversas áreas: carreador de fármacos de liberação gradual, regeneração de tecidos epiteliais, confecção de membranas artificiais, absorção de gordura e redução do colesterol sérico, componente de cosméticos, agente flocculante no tratamento de efluentes, agente antimicrobiano, formação de biofilmes, etc. (Figura 3) (Fai et al., 2008).

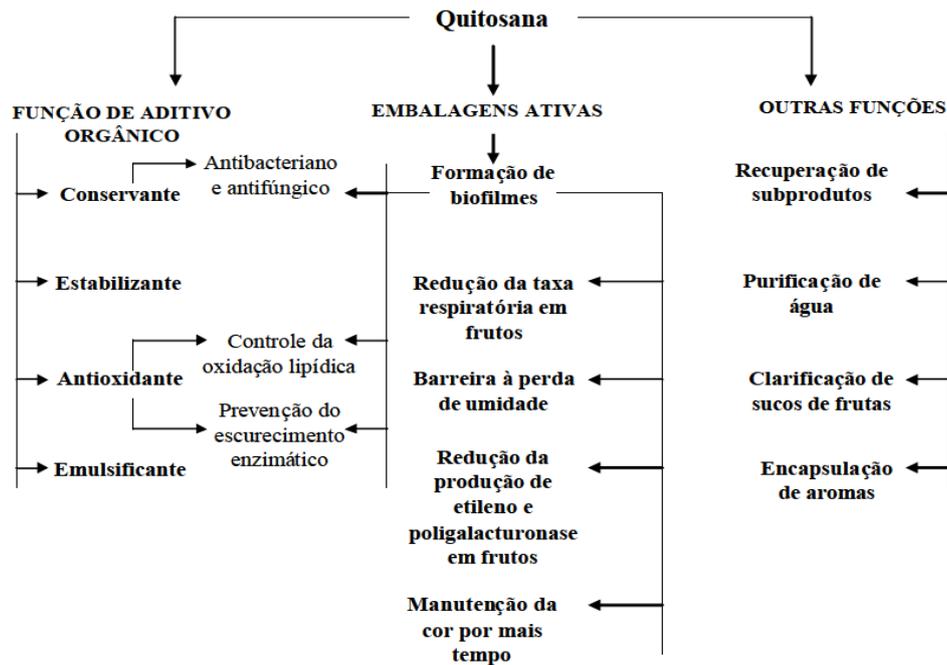


Figura 3 – Aplicações da quitosana na indústria de alimentos.

Fonte: Fai et al., 2008.

Dentre os vários materiais disponíveis para a formação de filmes biodegradáveis, a quitosana tem recebido atenção especial em função das excelentes propriedades de formação de gel, capacidade filmogênica e boa barreira ao oxigênio e dióxido de carbono (Pelissari, 2009), além de apresentar propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade (Fai et al., 2008).

1.2.2.1 Atividade antimicrobiana

A quitosana possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras, característica esta proposta inicialmente por Allen (Allan e Hardwiger, 1979 apud Kong et al., 2010).

As propriedades antimicrobianas da quitosana e seus derivados têm sido reportadas por diversos pesquisadores. Fernandez-Saiz et al. (2010), analisaram o efeito de filmes de quitosana no crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. em testes *in vitro* e em sopa de peixe, demonstrando do ponto de vista prático, importantes propriedades antimicrobianas, conduzindo a uma diminuição da taxa de crescimento e um aumento da duração da fase de latência. Chi et al. (2006) relataram efeito sinérgico sobre a propriedade bactericida de filmes de quitosana enriquecidos com óleo essencial de orégano, incorporadas em fatias de mortadela armazenada a 10 °C/5 dias, observando-se uma redução do número de células de *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 de aproximadamente 4 logs decimais, comparada com 1 a 3 logs quando aplicado somente o filme de quitosana, constatando ainda que este tipo de processo é aceito em termos sensoriais.

Coma et al. (2003), avaliando o potencial da quitosana como revestimento ativo antimicrobiano no desenvolvimento de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, identificaram que parâmetros como sensibilidade do micro-organismo, fase do crescimento microbiano, temperatura e peso molecular da quitosana interferem nos resultados.

O mecanismo de ação da quitosana sobre os micro-organismos não está completamente elucidado, mas várias propostas são sugeridas. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos micro-organismos, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e, conseqüente, inibição microbiana (Avadi et al., 2004; Yadav e Bhise, 2004).

Zheng e Zhu (2003), observaram comportamentos distintos da quitosana frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Para as bactérias Gram-negativas, a atividade antimicrobiana teve um incremento com o aumento do peso molecular da quitosana, formando um polímero na membrana celular, o que impediria a entrada de nutrientes para a célula. Já nas bactérias Gram-positivas, a atividade antimicrobiana aumentou com o decréscimo do peso molecular da quitosana, a qual penetra na célula por impregnação.

Características químicas tais como o grau de desacetilação e o peso molecular da quitosana são fatores cruciais, os quais determinam sua capacidade antimicrobiana (Avadi et al., 2004), bem como as propriedades físicas dos filmes obtidos (Chi et al., 2006).

Biofilmes obtidos a partir de quitosanas de alto peso molecular e baixo grau de desacetilação apresentam uma melhor resistência à umidade, porém com propriedades biocidas fracas (Fernandez-Saiz et al., 2008). O teor de umidade de biofilmes de quitosana apresentou efeito significativo sobre sua ação bactericida. A redução do teor de umidade dos biofilmes de 22 para 12 % (p/p), reduziu sua atividade bactericida em 2,5 vezes, o que foi representado pela redução no diâmetro dos halos de inibição (Buzinova e Shipovskaya, 2008). Este achado demonstra a potencialidade do uso de biofilmes à base de quitosana, como revestimento de produtos cárneos e lácteos, os quais apresentam umidade elevada, sendo susceptíveis à proliferação de bolores e bactérias patogênicas em sua superfície.

1.2.2.2 Atividade antioxidante

Diversos estudos têm reportado a habilidade antioxidante da quitosana, tendo sido avaliado seu uso em carnes e derivados e frutos do mar que contém quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, particularmente susceptíveis à oxidação lipídica durante seu processamento e armazenamento (Kanatt et al., 2008). Shahidi et al. (2002) e Darmadji e Izumimoto (1994), verificaram que a adição de quitosana mostrou-se eficiente como agente de controle da oxidação lipídica em bacalhau (*Gadus morhua*) e carne picada, respectivamente.

Rao et al. (2006), reportaram um aumento da capacidade antioxidante da quitosana como resultado da sua exposição à radiação, o que pode ser devido à reação entre os radicais livres e os resíduos amino, formando macromoléculas estáveis. Seu uso como antioxidante em produtos cárneos irradiados tem importância tecnológica, tendo em vista que a peroxidação lipídica é um fator limitante ao uso da irradiação em carnes (Kannat et al., 2004). A aplicação da irradiação despolimeriza a quitosana, expondo os grupamentos amino livres, com subsequente aumento da atividade sequestrante, eliminando radicais livres (Rao et al., 2006).

O mecanismo de ação antioxidante da quitosana é atribuído à sua capacidade de quelar íons metálicos, tais como o ferro, ligados às moléculas de hemoglobina e mioglobina, o qual age como catalisador da reação, razão pela qual a torna também um promissor agente de

controle do escurecimento enzimático em frutos e vegetais, visto que a polifenoloxidase, enzima responsável por este fenômeno, possui cobre no seu centro ativo e funciona como oxidase de função mista, atuando na hidroxilação de monofenóis para diidroxifenóis e em seguida oxidando estes últimos para o-quinonas (Kamil et al., 2002; Fai, 2008).

1.2.3 Acetato de celulose

A celulose é um homopolímero linear, insolúvel, de alta massa molecular, constituído de unidades repetidas de β -D-glicopiranosil, unidas por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4). Em função de sua natureza plana e linear, as moléculas de celulose podem associar-se umas às outras por meio de pontes de hidrogênio, ao longo de extensas zonas, formando maços fibrosos e policristalinos (Fennema et al., 2010).

A reação de acetilação da celulose pode produzir o acetato de celulose em que o grau de substituição (GS) pode variar de 0 a 3, dependendo da sua estrutura e das condições reacionais, sendo que os diferentes graus de acetilação afetam características como a solubilidade e a biodegradabilidade do composto (Melo, 2010). É um éster produzido pela reação da celulose com anidrido acético e ácido acético, tendo o ácido sulfúrico como catalisador da reação (Figura 4). Dentre os derivados da celulose, o acetato destaca-se devido as suas diferentes aplicabilidades, como fibra, filmes, e diversos tipos de filtros e membranas (Morgado et al., 2009).

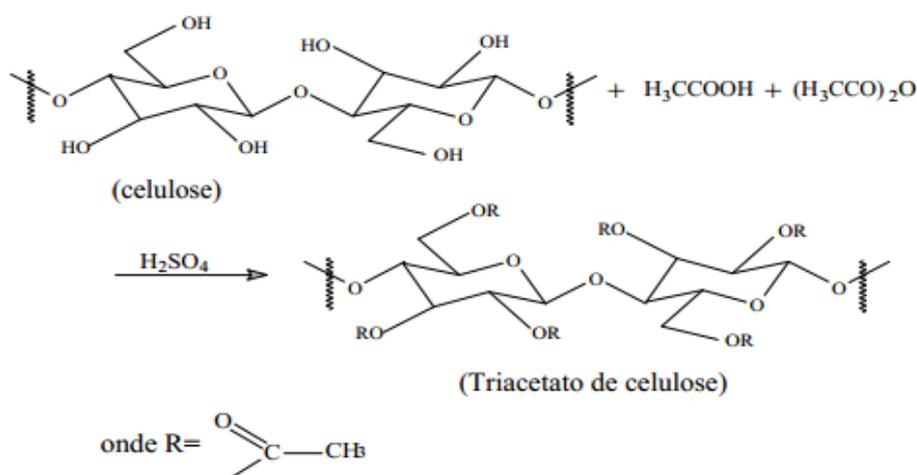


Figura 4 – Esquema da reação de produção do acetato de celulose.

Fonte: Meireles, 2007.

O polímero acetato de celulose é amorfo, não tóxico e inodoro, estável em óleos minerais, permeável ao vapor d'água e, dependendo do grau de substituição, solúvel em acetona (Oliveira, 2002). A partir deste polímero é possível formar filmes transparentes, essencialmente rígidos, ou seja, que suportam alta tensão a temperatura ambiente, e com certa flexibilidade (Cerqueira et al., 2010).

A obtenção de filmes a partir de celulose desperta grande interesse devido às excelentes propriedades mecânicas, estabilidade química, características de permeação e compatibilidade biológica apresentadas pela celulose, que são requisitos importantes para a indústria alimentícia, aplicações médicas, dentre outras (Morgado et al., 2009). Esses filmes a base de acetato de celulose têm sido produzidos e utilizados em alimentos, visto que já se mostraram eficientes na tecnologia de embalagem ativa.

Pires et al. (2008), avaliaram a eficácia de biofilmes à base de acetato de celulose contendo nisina, natamicina e a combinação de ambos, *in vitro* frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp., e em fatias de queijo musarela, com relação ao desenvolvimento de *S. aureus*, bolores e leveduras, ao longo de quinze dias. Os biofilmes contendo nisina, mostraram um efeito antimicrobiano *in vitro* contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, enquanto o biofilme contendo natamicina mostrou-se eficaz frente a *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp.. Os biofilmes contendo nisina + natamicina, prolongaram a vida-de-prateleira dos queijos por 6 dias, em comparação ao controle.

Estudos demonstram que películas à base de celulose aplicadas a produtos cárneos, podem reduzir a absorção de óleo durante a fritura, minimizar a perda de líquidos durante o cozimento e reduzir a perda de umidade quando aplicada na superfície de aves e frutos do mar (Cutter, 2006).

1.3 Elaboração de filmes biodegradáveis

Na literatura, os termos recobrimento (*coating*) e película (filme), são utilizados frequentemente como sinônimos, mas estritamente considera-se película comestível quando a mesma é pré-formada antes da sua aplicação, podendo ser utilizada para conter ou separar superfícies distintas (interfoliar fatias de queijo, por exemplo). Por outro lado, o recobrimento comestível se forma diretamente sobre a superfície do alimento, sendo considerado parte integrante do produto final (Pan e Caballero, 2011).

A elaboração de biofilmes envolve a utilização de diversos componentes, cada qual com sua finalidade específica. Tais formulações são constituídas de pelo menos um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, metanol, etanol, acetona, entre outros), plastificante (glicerol, sorbitol, etc.) e agente ajustador de pH (Bertan, 2003).

De acordo com o tipo de biopolímero utilizado (proteínas, polissacarídeos, lipídios) que compoem a película ou recobrimento, suas características e funções serão diferentes, já que estão ligadas à composição química e estrutural do mencionado biopolímero (Parzanese, 2011). Vários materiais podem ser incorporados nos filmes comestíveis para melhorar suas propriedades mecânicas, de proteção, sensoriais ou nutricionais. A influência de um aditivo nas propriedades do filme dependerá da concentração utilizada, da estrutura química, do seu grau de dispersão e da extensão desta interação com o polímero (Kester e Fennema, 1986).

A alta rigidez de filmes obtidos a partir de macromoléculas pode ser diminuída pela adição de um agente plastificante, o qual proporciona um aumento da flexibilidade do filme, em decorrência da maior mobilidade das macromoléculas (Horn, 2012).

1.3.1 Plastificantes

A União Internacional de Química Aplicada (IUPAC) define plastificante como uma substância incorporada em um material com o intuito de melhorar a sua flexibilidade e funcionalidade. Reduz a tensão de deformação, dureza, viscosidade, ao mesmo tempo em que aumentam a flexibilidade da cadeia do polímero e sua resistência à fratura (Horn, 2012).

A adição de plastificantes é necessária para melhorar a flexibilidade dos biofilmes. Diversos materiais plastificantes podem ser adicionados aos filmes, como os mono e oligossacarídeos (glicose, sacarose), lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e surfactantes) e os polióis (glicerol, sorbitol, eritritol). Destes, os polióis são os mais utilizados para filmes com polissacarídeos, melhorando sua flexibilidade pela redução das interações polímero-polímero (Horn, 2012).

Das teorias que explicam o efeito da plasticização, duas são particularmente úteis em se tratando de filmes comestíveis, a teoria gel e do volume livre. A teoria gel diz respeito à rígida estrutura tridimensional dos polímeros. As moléculas do plastificante ligam-se ao longo da estrutura do polímero, reduzindo a rigidez da estrutura por enfraquecer e/ou impedir ligações do tipo Van der Waals, pontes de hidrogênio, ligações covalentes, etc., além de facilitarem o movimento das moléculas do polímero, resultando em aumento da flexibilidade

do gel. A teoria do volume livre trata da capacidade do plastificante em ocupar os espaços intermoleculares livres do polímero, o que também resulta em uma maior flexibilidade do filme formado (Sothornvit e Krochta, 2005).

A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes deve ser realizada de acordo com a compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizados, isto é, deve ser miscível ao solvente e polímero, de forma a evitar a separação prematura no decorrer do processo de secagem, causando uma diminuição na flexibilidade do filme (Guilbert et al., 1986).

Os plastificantes, quando utilizados em quantidades muito pequenas, produzem o efeito denominado antiplastificante, o qual é atribuído a vários mecanismos tais como a redução do volume livre do polímero e a presença de moléculas plastificantes rígidas adjacentes aos grupos polares (Sothornvit e Krochta, 2005). O plastificante interage com a matriz polimérica, mas não está em quantidade suficiente para aumentar a mobilidade molecular, fenômeno também dependente das condições de armazenamento. Geralmente isto ocorre quando são empregadas quantidades abaixo de 20 g/100 g de matéria seca (Shimazu et al., 2007).

Os plastificantes são geralmente adicionados na proporção de 10 a 60 g/100 g de matéria seca, dependendo do grau de rigidez do material (Gontard et al., 1993).

1.3.1.1 Glicerol

O glicerol é um dos agentes plastificantes mais utilizados na composição de soluções filmogênicas, devido a sua estabilidade e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas dos biofilmes (Chillo et al., 2008). É um composto orgânico, pertencente à classe dos polióis. É líquido à temperatura ambiente, higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. Encontra-se presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal na sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido esteárico, oleico, palmítico, láurico formando a molécula de triacilglicerol (Bobbio e Bobbio, 2003).

Alves et al. (2007) avaliando os efeitos do glicerol e da amilose nas propriedades de filmes de amido de mandioca, verificaram que à medida que a proporção de glicerol foi aumentada, a permeabilidade ao vapor d'água, tensão de ruptura, módulo de Young e força de perfuração foram reduzidos.

Arrieta et al. (2011), pesquisando biofilmes ativos à partir de proteínas do leite, com diferentes concentrações de glicerol, verificaram através de microfotografias que, somente à

partir de 35 % de glicerol a aparência dos biofilmes ficou mais homogênea, além de produzir uma redução significativa no Módulo de Young, indicando uma diminuição na rigidez do material, comportamento esperado em um processo de plasticização.

Propriedades mecânicas são importantes para revestimentos e filmes comestíveis, pois refletem sua durabilidade e capacidade de melhorar a integridade mecânica do alimento. A adição de agentes plastificantes em biopolímeros tem um grande efeito sobre as propriedades mecânicas do filme, tais como a flexibilidade e o aumento da sua resistência (Sothornvit e Krochta, 2005).

1.3.2 Mecanismos de formação dos filmes

Os filmes biodegradáveis podem ser produzidos pelos processos de *casting* e extrusão, dependendo dos objetivos e recursos tecnológicos disponíveis. Independente do processo de produção do biofilme, a transformação da solução filmogênica é resultado de interações intermoleculares, que se traduz em forças estruturais (Carvalho, 1997).

O método de *casting* consiste no preparo de uma solução coloidal da macromolécula (solução filmogênica) adicionada ou não de aditivos, sua deposição em um suporte adequado e posterior secagem do solvente (Parzanese, 2011). Em algumas situações, como no caso dos recobrimentos comestíveis, o processo de secagem se dá no próprio alimento, no qual a solução foi aplicada por imersão ou spray. Estas macromoléculas devem possuir a capacidade de formar uma matriz contínua e coesa para que o filme possa ser formado.

Este modo de preparação de filmes tem sido usado intensivamente nas pesquisas sobre biofilmes, mas apresenta algumas desvantagens (Mali et al., 2010), como:

- i) dificuldade de incorporação de matérias de naturezas diferentes;
- ii) problemas de retirada do filme do suporte usado para o *casting*;
- iii) dificuldade de aumento de escala (*scale-up* para a escala industrial).

No método de extrusão, o biopolímero termoplástico é introduzido em um cilindro aquecido e o material amolecido é forçado, por um parafuso rotativo, a entrar através de uma abertura em uma matriz, para a obtenção de formas contínuas. Depois de sair do molde, a peça extrusada deve ser resfriada abaixo da temperatura de transição vítrea do material, de modo a assegurar a estabilidade dimensional requerida. O resfriamento é geralmente realizado com jato de ar ou com água (Smith, 1998).

A matriz da extrusora define a configuração geométrica desejada ao biopolímero fundido, ou seja, uma matriz cilíndrica produz um extrusado de forma tubular e uma matriz plana produz um extrusado em forma de folha (Crippa et al., 2006).

No caso do uso de extrusoras, os filmes à base de amido não precisam da pré-gelatinização, pois serão gelificados na máquina com o aquecimento, resultando em materiais rígidos, com boa resistência a permeabilidade de água (Fishman et al., 2000).

A formação de filmes inicia-se com a formação do gel, envolvendo ligações inter e intramoleculares cruzadas entre as cadeias de polímeros, formando uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente utilizado (Kester e Fennema, 1996). O grau de coesão vai depender tanto da estrutura dos polímeros utilizados, como da presença de outras moléculas como os plastificantes.

1.4 Métodos de avaliação dos filmes

Os métodos utilizados para avaliação dos filmes são derivados dos métodos clássicos, aplicados aos materiais sintéticos, os quais sofreram adaptações em função das características dos biofilmes como, por exemplo, sua sensibilidade à umidade relativa e temperatura.

A funcionalidade e a performance dos filmes biodegradáveis dependem de suas propriedades ópticas, térmicas, mecânicas e de barreira, e essas características por sua vez, são dependentes da composição do filme, do processo de formação e do alimento no qual serão aplicados (Pelissari, 2009).

1.4.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos recobrimentos e películas comestíveis dependem em grande parte do tipo de material empregado em sua elaboração, especialmente do seu grau de coesão, ou seja, a habilidade do polímero em formar pontes moleculares entre as cadeias poliméricas e que estas sejam estáveis (Rojas, 2010).

Determinam a resposta destes às influências mecânicas externas, estando associadas à capacidade de desenvolver deformações reversíveis e irreversíveis e de apresentar resistência à fratura. O teste mais utilizado para medir força mecânica é o teste de tração, onde podem ser derivadas as propriedades de resistência à tração, alongação, força resultante e módulo de elasticidade.

A resistência à tração é medida pela força máxima que o filme pode sustentar. A alongação geralmente é tirada do ponto de quebra e é expressa como porcentagem de aumento do comprimento original da amostra. Força resultante é a força de tração na qual ocorre o primeiro sinal de deformação não elástica. O módulo de elasticidade ou módulo de Young mede também a resistência do filme (Barreto, 2003).

A tensão (σ) é a razão entre a carga ou força de tração (F) e a área de seção transversal inicial do corpo de prova (A) (Equação 1), expressa em Pa.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (1)$$

Elongação (L) é o incremento do comprimento entre marcas produzido no corpo de prova pelo carregamento sob tração. Chamado também de extensão, sendo expresso em mm.

A deformação (ϵ) dos filmes é adimensional, sendo determinada pela equação abaixo:

$$\epsilon = \ln \left(\frac{L}{L_0} \right) \quad (2)$$

Onde: L e L_0 são os comprimentos de alongação do filme durante o experimento e o comprimento inicial do filme, respectivamente.

O módulo de elasticidade ou módulo de Young (E) é a razão entre a tensão e a deformação correspondente. Expresso em termos de força por unidade de área:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (3)$$

O módulo de Young é um indicador da rigidez do filme, sendo que, quanto maior o módulo mais rígido é o filme (Sarantópoulos et al., 2002). Materiais diferentes exibem padrões de tração diferentes. Por exemplo, um polissacarídeo possui alta resistência à tração e pouca alongação, enquanto que materiais proteicos apresentam moderada resistência à tração e longa alongação. Este comportamento pode ser explicado, pelas diferenças existentes na estrutura molecular destes materiais. A estrutura da cadeia polimérica de um polissacarídeo é linear, enquanto que as proteínas apresentam uma estrutura complexa devido às interações inter e intramoleculares dos grupos radicais (Chen, 1995).

As medidas de resistência à tração e alongação são geralmente conduzidas de acordo com o método padrão de propriedades de tração de filme plástico fino (ASTM, 1993), utilizando-se um instrumento universal de teste mecânico como o texturômetro.

As interações entre os biopolímeros e pequenas moléculas como água, plastificantes, lipídios e outros aditivos dispersos na matriz influenciam o comportamento mecânico dos filmes. Arvanitoyannis e Billiaderis (1999) estudaram o efeito dos plastificantes glicerol, sorbitol, e xilose sobre as propriedades mecânicas de filmes a base de amido e metilcelulose e observaram que, à medida que aumenta a concentração de plastificantes na composição do filme, diminui a força de tensão e aumenta a porcentagem de alongamento.

Rojas (2010), avaliando o efeito da incorporação de óleos essenciais nas propriedades mecânicas de biofilmes de zeína, verificou que à medida que a concentração de óleos essenciais aumentava, as películas apresentavam uma menor tensão máxima de ruptura e um aumento nos valores de alongação. De um modo geral, conclui-se que, com uma quantidade maior de óleos essenciais no filme, ele age como um plastificante, proporcionando maior mobilidade entre as cadeias poliméricas.

1.4.2 Propriedades térmicas

Análise térmica representa um conjunto de técnicas que permite medir as mudanças de uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação em função da temperatura e do tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. Com base nesta definição três critérios devem ser considerados para que a técnica seja considerada termoanalítica, primeiro que uma propriedade física deve ser medida, segundo, que a medida deve ser expressa em função da temperatura e, por último, que a medida deve ser realizada com um programa controlado de temperatura (Horn, 2012).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) e a Termogravimetria (TG) são as técnicas termoanalíticas mais difundidas.

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica térmica, na qual as diferenças no fluxo de calor na substância e referência são medidas como função da temperatura da amostra, enquanto as duas são submetidas a um programa de temperatura controlada. Nesta análise, amostra e referência são colocadas em cápsulas idênticas, posicionadas sobre um disco termoeletrico e aquecidas por uma única fonte de calor (Mota, 2010).

Os eventos térmicos que geram modificações em curvas DSC podem ser basicamente, transições de primeira e de segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variações de entalpia, endotérmica ou exotérmica, e dão origem à formação de picos. As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia, não gerando picos nas curvas de DSC, apresentando-se como um deslocamento da linha base (Canevarolo Jr., 2002).

A temperatura de transição vítrea (T_g) é o valor máximo da faixa de temperatura que, durante o aquecimento de um material polimérico, permite que as cadeias da fase amorfa adquiram mobilidade. Abaixo da T_g o polímero não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia em relação a outra por mudanças conformacionais. Dessa forma ele está no estado vítreo, onde se apresenta duro, rígido e quebradiço. Acima da T_g as cadeias poliméricas sofrem rotação e movimentos difusionais, estando o polímero no estado elastomérico (Canevarolo, 2002). Em geral a T_g depende da história térmica do material, do peso molecular das cadeias poliméricas, da presença de plastificantes, do grau de cristalinidade e da composição da amostra (Roos, 1995), sendo específica para cada material.

As propriedades mecânicas e de barreira dos polímeros estão relacionadas com a T_g . Dessa forma, o conhecimento da temperatura de transição vítrea dos filmes biodegradáveis ajuda na escolha das melhores condições de armazenamento, sendo esperado que a permeação a gases e ao vapor d'água através dos filmes seja maior acima da T_g , onde as cadeias do polímero estão em maior movimento (Rogers, 1985).

A termogravimetria (TGA) é uma técnica de análise térmica, na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que começam a se decompor, acompanhar o andamento da desidratação e de reações de oxidação, combustão, decomposição, etc. (Canevarolo Jr., 2002).

Em materiais poliméricos, a TGA tem sido largamente utilizada para avaliação da estabilidade térmica, determinação do conteúdo de umidade e aditivos, estudos de cinética de degradação, análise de sistemas de copolímeros, estabilidade à oxidação e temperaturas de degradação (Pelissari, 2009).

1.4.3 Propriedades de barreira

As propriedades de barreira são definidas como a capacidade do material em resistir à absorção ou à evaporação de gases e vapores, à permeação de lipídios e à passagem de luz (Sarantópoulos, 2002).

1.4.3.1 Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor de água (Pva) é considerada uma das propriedades de barreira de materiais. O seu conhecimento é imprescindível para eventuais aplicações dos filmes em embalagens, porém não é uma propriedade restritiva. Um material muito permeável ao vapor de água poderá ser indicado para embalagens de vegetais frescos, enquanto um filme pouco permeável poderá ser indicado para produtos desidratados, por exemplo (Sobral e Ocuno, 2000).

A permeabilidade através de um filme indica a facilidade com que um soluto migra de uma face em contato com uma parte do filme, em relação à outra face de contato com a outra parte do filme. A norma ASTM E-96 (*American Society for Testing and Materials*) define que a permeabilidade é a taxa de transmissão de vapor d'água por unidade de área através de um filme com espessura conhecida, induzida por uma diferença de umidade relativa. A transferência de água em filmes poliméricos ocorre por difusão molecular conforme apresentado na Figura 5 (Horn, 2012).

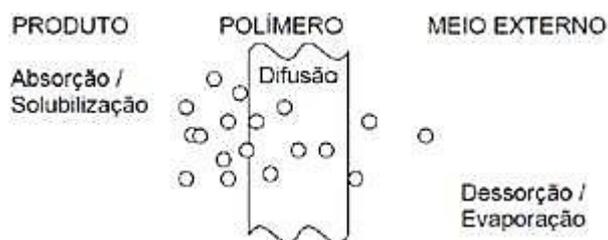


Figura 5 – Esquema de permeação de vapor d'água através de filmes poliméricos.

A eficiência funcional dos filmes e revestimentos comestíveis é dependente de sua composição. Muitos, por serem a base de polissacarídeos ou proteínas, possuem caráter hidrofílico apresentando, por isso, baixa ou moderada resistência a umidade (Villadiego et al., 2005).

Alguns fatores influenciam a permeabilidade dos filmes, como a concentração dos plastificantes, sua morfologia, característica das moléculas permeantes, além das interações entre as cadeias poliméricas. Outro fator que deve ser levado em consideração é a espessura dos filmes, devido a mudanças estruturais causadas pelo intumescimento do filme, que afeta a estrutura interna, podendo influenciar a permeação (Horn, 2012).

As propriedades de barreira à umidade de filmes comestíveis são influenciadas pela adição de compostos lipídicos, os quais reduzem o transporte de umidade. Gontard et al. (1993), estudaram a adição de várias concentrações de lipídios a filmes comestíveis de glúten e observaram que os efeitos dessa adição nas propriedades de barreira ao vapor d'água dependeram das características dos lipídios, particularmente a hidrofobicidade, organização do complexo proteína-lipídio, interação entre esses dois componentes e distribuição uniforme das substâncias hidrofóbicas na matriz.

Existem diversos métodos de determinação da Pva, dentre esses os mais utilizados em estudos com biofilmes são os métodos gravimétricos, provavelmente por serem de simples realização e baixo custo.

Um material pode ser considerado de alta barreira ao vapor d'água quando apresenta uma taxa de permeabilidade menor que $8 \text{ g/m}^2\cdot\text{dia}$ e de altíssima barreira, quando menor que $0,8 \text{ g/m}^2\cdot\text{dia}$ (Rigo, 2006).

1.4.4 Propriedades óticas

Para uma boa apresentação visual do produto, às vezes é necessário que os revestimentos apresentem elevado brilho e transparência. Entretanto, no acondicionamento de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz, a proteção contra incidência de luz se faz necessária (Rigo, 2006).

Dentre as propriedades óticas de biofilmes, destacam-se a cor e a opacidade. A cor pode ser considerada um importante parâmetro de caracterização dos biofilmes, pois está associada com a matéria-prima utilizada na elaboração dos mesmos (Vicentini, 2003), sendo normalmente avaliada por meio dos padrões CIE (Comission Internationale de l'Eclairage) Lab, L^* variando de 0 (branco) a 100 (preto), a^* do verde (-) ao vermelho (+) e b^* do azul (-) ao amarelo (+), utilizando-se um colorímetro.

A opacidade é uma propriedade de fundamental importância em filmes utilizados para recobrimento ou embalagem de alimentos (Pelissari, 2009), sendo que baixos valores de opacidade indicam transparência no filme.

Pelissari (2009), ao caracterizar filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol, obteve os maiores valores de opacidade em altas concentrações de quitosana, sugerindo que a presença desse biopolímero possa originar filmes mais opacos e escuros, possivelmente devido a sua coloração amarelada característica.

Sobral et al. (2004) estudando filmes com diferentes concentrações de plastificantes e de proteínas de músculo de tilápia-do-nilo, observaram que a opacidade dos filmes diminuiu com o aumento da concentração de glicerol, provavelmente pelo efeito de diluição provocado pelo glicerol, o qual é incolor e transparente.

1.4.5 Espessura

A espessura é definida como a distância entre as duas superfícies principais do material, sendo considerado um parâmetro importante. Conhecendo-se a espessura, é possível obter informações sobre a resistência mecânica e as propriedades de barreira a gases e ao vapor d'água do material, bem como fazer estimativas sobre a vida útil dos alimentos acondicionados nestes materiais (CETEA, 1996).

A espessura é um dos parâmetros que influencia as propriedades dos biofilmes, a qual geralmente não é considerada em diversos estudos (Sobral et al., 2000). O controle da espessura dos biofilmes é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting*, onde ocorre a secagem por evaporação do solvente. Quando se trabalha com soluções filmogênicas viscosas, este controle torna-se mais difícil ainda.

Rigo (2006), caracterizando biofilmes de amido, encontrou valores menores de espessura nos ensaios onde foram utilizadas as menores concentrações do polímero e do plastificante glicerol, além de uma quantidade menor de solução filmogênica nas placas.

1.5 Biofilmes ativos

Em filmes ou películas comestíveis, obtidos a partir de biopolímeros, diversos aditivos alimentares como conservantes, antioxidantes, aromatizantes, podem ser agregados visando melhorar a qualidade, aumentar a vida de prateleira dos alimentos e/ou suas características sensoriais (Coma, 2002).

No Brasil, o desenvolvimento de biofilmes e embalagens ativas ainda encontra-se em nível laboratorial (Soares et al., 2009). As principais técnicas existentes dizem respeito a substâncias que absorvem oxigênio, etileno, umidade e odor, e aquelas que emitem dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, antioxidantes e aromas (Vermeiren et al., 1999). Essas técnicas consistem na incorporação e, ou imobilização de certos aditivos à embalagem em vez da incorporação direta no produto (Kerry et al., 2006).

Revestimentos comestíveis e filmes obtidos a partir de biopolímeros oferecem inúmeras vantagens na conservação de carnes frescas e processadas, como comestibilidade, biocompatibilidade, aparência estética e propriedades de barreira (Han, 2002). Por ser considerado um componente alimentar, devem cumprir uma série de requisitos tais como, boas qualidades sensoriais, alta barreira e eficiência mecânica, estabilidade bioquímica, físico-química e microbiana, atóxico e não poluente, além de apresentar um baixo custo (Cutter, 2006).

Na indústria cárnea e pesqueira a aplicação de recobrimentos e películas comestíveis tem como finalidade reduzir a perda de umidade da superfície dos produtos, além de servir como um suporte para a introdução de agentes antimicrobianos e antioxidantes. Os benefícios destes tratamentos são os seguintes (Parzanese, 2012):

- a) Inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas;
- b) Ajudar a controlar a umidade do alimento, evitando alterações de textura, sabor, cor e peso do produto;
- c) Melhorar o aspecto do produto;
- d) Evitar ou diminuir a oxidação dos lipídios e da mioglobina;
- e) Manter a umidade e diminuir a absorção de óleo durante a fritura dos produtos cárneos.

A aplicação de películas comestíveis em produtos cárneos pode ser realizada de maneira direta e indireta. Para a aplicação direta certo número de métodos tem sido utilizados, como por exemplo, aplicação de espuma, pulverização, imersão. Na maioria dos casos, após a aplicação, o excesso de revestimento é eliminado por gotejamento, e o material remanescente solidifica-se envolvendo o produto, sendo necessário em algumas situações o uso de uma fonte de aquecimento para acelerar o processo (Cutter, 2006).

Quando se trabalha com aplicação indireta, tecnologias de moldagem podem ser utilizadas. Neste processo, soluções filmogênicas podem ser vertidas sobre uma superfície lisa, plana e horizontal, com ou sem molde, sendo submetida posteriormente a um processo de secagem. Quando obtidos dessa maneira, as películas devem ser firmes e flexíveis o

suficiente para serem envolvidas em torno da superfície do alimento (Cutter e Sumner, 2002). Quando aplicados na forma de películas sobre um produto, devem atender a alguns requisitos funcionais tais como barreira a umidade, cor, aparência, transparência, características mecânicas e reológicas adequadas (Guilbert et al., 1986). Estas propriedades podem ser influenciadas pela adição de compostos como os plastificantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, etc.

Os revestimentos podem atuar no alimento como carreadores de agentes com função específica como antioxidante, antimicrobiana, corante, aromática, entre outras. Inúmeras pesquisas em todo o mundo têm mostrado o potencial do uso dos revestimentos incorporados com agentes ativos na manutenção e prolongamento da vida útil de alimentos, sendo eles de origem vegetal ou animal (Soares et al., 2009).

1.5.1 Biofilmes ativos antimicrobianos

O uso de filmes a base de biopolímeros como sistema carreador de agentes antimicrobianos não é um conceito novo. Várias abordagens têm sido propostas e demonstram a utilização destas películas na superfície de diversos alimentos, incluindo-se aí os produtos cárneos (Cutter, 2006). Estes tipos de revestimento estão recebendo considerável atenção, uma vez que satisfazem a demanda dos consumidores por produtos obtidos a partir de materiais sustentáveis (Durango et al., 2006).

De acordo com Cooksey (2001), são basicamente três as categorias de filmes antimicrobianos:

- a) Substâncias antimicrobianas voláteis encontram-se em um sachê, sendo liberadas durante a armazenagem do produto. Podem ser utilizados materiais de embalagens comuns;
- b) Incorporação direta do agente antimicrobiano na película;
- c) A matriz do revestimento funciona como um veículo para o agente antimicrobiano.

Estas categorias de materiais podem liberar o agente antimicrobiano para a superfície do alimento através de evaporação no *headspace* (substâncias voláteis) ou migrar para dentro do alimento por difusão (Figura 6).

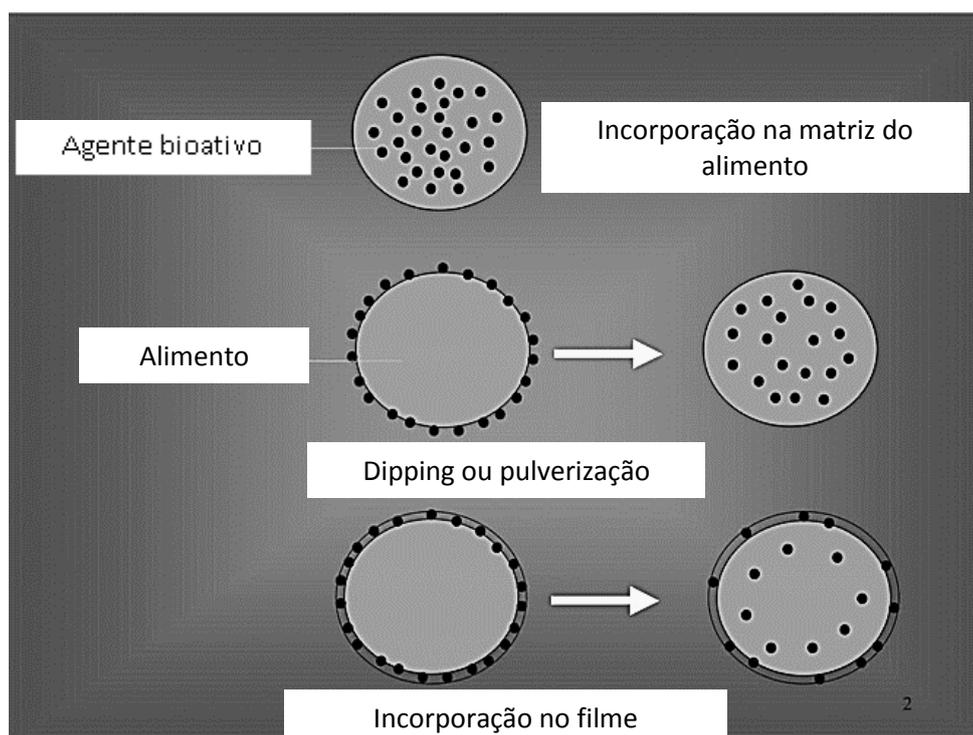


Figura 6 – Diferentes modos de incorporação de aditivos nos produtos alimentares. Os pontos pretos correspondem a um composto antimicrobiano.

Fonte: Coma, 2008.

Estes sistemas são mais eficientes do que uma aplicação direta na superfície do produto cárneo, uma vez que retarda a migração do agente para o interior, mantendo altas concentrações onde eles são necessários.

Além das três categorias descritas anteriormente, filmes antimicrobianos podem ser desenvolvidos a partir do uso de polímeros inerentemente antimicrobianos, exibindo as propriedades de formação de película como os amino-polissacarídeos catiônicos (Pen e Jiang, 2003) ou polímeros que são modificados quimicamente para produzir as propriedades bioativas. Uma limitação desse sistema é a necessidade do contato direto entre a película e o alimento (Coma, 2008), devendo o componente bioativo ser aprovado como aditivo alimentar.

Yingyuad et al. (2006) estudaram o efeito do revestimento de quitosana associado a embalagem a vácuo sobre a qualidade e vida de prateleira de carne suína resfriada, sendo que houve um efeito significativo sobre a contagem total em comparação com o controle (sem revestimento de quitosana). Nas condições utilizadas no estudo, estão favorecidas as bactérias

patogênicas psicrotróficas, sendo que as condições de microaerofilia também favorecem a proliferação das bactérias lácticas, o que resulta em um aspecto viscoso nos produtos.

Alguns fatores podem afetar a efetividade da embalagem antimicrobiana, como as características do antimicrobiano (solubilidade e tamanho da molécula) e do alimento, condições de estocagem e distribuição (tempo e temperatura), método de preparo do filme (extrusão ou *casting*) e interação entre antimicrobiano e polímero (Soares et al., 2009).

Numerosos estudos têm sido publicados sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de plantas e seus constituintes contra patógenos de origem alimentar. Pesquisas recentes focam na incorporação dos OEs em películas comestíveis, tornando-as um meio eficaz de controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, melhorando a segurança alimentar e aumentando a vida de prateleira dos produtos (Du et al., 2011).

Oussalah et al. (2004) avaliaram uma película comestível a base de proteínas do leite contendo 1 % de OE de orégano, pimenta e a mistura de ambos no controle do desenvolvimento de *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 na superfície da carne. A utilização da película contendo os OEs reduziu significativamente o nível de micro-organismos na carne, em comparação com o produto revestido somente com a película e o controle (sem película), sob refrigeração por sete dias.

Gómez-Estaca et al. (2010) relataram que, quando uma película a base de gelatina e quitosana incorporada com OE de cravo foi aplicada na superfície de bacalhau durante sua armazenagem refrigerada, o crescimento de bactérias Gram-negativas foi drasticamente reduzido, especialmente de enterobactérias.

Emiroglu et al. (2010) avaliando películas a base de proteína de soja incorporada com OEs de orégano (*Oreganum heracleoticum* L.) e de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) aplicadas em carne bovina resfriada, obtiveram uma redução significativa nas contagens de *Pseudomonas* spp. e coliformes durante seu armazenamento refrigerado. Os autores relatam que as películas nos testes *in vitro* apresentaram uma atividade antimicrobiana elevada frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *E. coli* O157:H7, sendo que este efeito não foi observado quando as películas foram aplicadas na carne, o que pode ser explicado pela complexidade da matriz cárnea.

O uso de películas a base de biopolímeros, como sistemas carreadores de agentes antimicrobianos apresenta sólida comprovação científica. Várias abordagens têm sido propostas e demonstram a utilização destes compostos em diversos alimentos, utilizando-se de substâncias antimicrobianas as mais variadas como, por exemplo, ácidos orgânicos

(acético, propiônico, benzoico, láctico, etc.), sorbato de potássio, bacteriocinas, extratos de especiarias (timol, *p* cimeno, cinamaldeído), antibióticos, fungicidas, agentes quelantes, etc. podem ser adicionados aos filmes comestíveis para reduzir micro-organismos (Dutta et al., 2011).

1.5.2 Biofilmes ativos antioxidantes

Revestimentos ativos com propriedades antioxidantes tem recebido especial atenção, uma vez que são uma das alternativas mais promissoras às embalagens tradicionais, nas quais os antioxidantes são incorporados ou adicionados para reduzir a oxidação do alimento, uma das principais causas de deterioração dos mesmos (López-de-Dicastillo et al., 2012). Esse sistema consiste na incorporação de substâncias antioxidantes em filmes, papéis ou sachês, de onde serão liberadas para proteger os alimentos da degradação oxidativa, inibindo as reações de oxidação ao reagirem com radicais livres e peróxidos e, conseqüentemente, estendendo a sua vida de prateleira (Tovar et al., 2005).

A oxidação lipídica é uma das mais importantes reações químicas, responsável pela deterioração da qualidade dos alimentos, estando relacionada com o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, causadas por complexas reações de oxidação, hidrólise, polimerização, pirólise, dentre outras, sofridas pelos ácidos graxos insaturados, resultando na formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos, impróprios para o consumo. Compromete ainda, a biodisponibilidade de vitaminas, proteínas e pigmentos, reduzindo o valor nutricional dos alimentos (Tawfik e Huyghebaert, 1997).

Atualmente, há uma tendência em reduzir o uso de aditivos sintéticos, substituindo-os por antioxidantes naturais, particularmente o tocoferol, extratos de plantas, OEs como os de alecrim, orégano, cravo-da-índia, os quais são mais seguros além de oferecerem benefícios à saúde.

Granda-Restrepo et al. (2009) desenvolveram películas de polietileno com múltiplas camadas incorporadas com tocoferol para embalagem de leite em pó, as quais retardaram a oxidação dos lipídios do produto. Gómez-Estaca et al. (2007) conseguiram retardar a oxidação lipídica de sardinhas defumadas a partir do uso de uma película a base de gelatina incorporada com extratos aquosos de alecrim e orégano.

López-de-Dicastillo et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante de uma película a base de um copolímero etileno-álcool vinílico incorporado com ácido ascórbico, ácido

ferrúlico, quercetina ou extrato de chá verde. A atividade antioxidante dos filmes foi testada contra a oxidação de lipídios de filés de sardinha, sendo que os filmes com extrato de chá verde foram os mais eficazes, tanto com relação aos valores dos índices de peróxido quanto a concentração de malonaldeído, durante o período de armazenamento.

Salmieri e Lacroix (2006) desenvolveram filmes à base de alginato e policaprolactona incorporados com OEs de orégano, segurelha e canela e avaliaram as suas propriedades antioxidantes por meio do teste colorimétrico do N, N-dietil-p-fenilenediamina (DPD). Os resultados demonstraram que os filmes à base de orégano exibiram as maiores propriedades antioxidantes.

Propriedades antioxidantes bem como de barreira à luz de um revestimento a base de gelatina, contendo extratos aquosos de orégano ou sálvia foram desenvolvidos por Gómez-Estaca et al. (2009). Yasin e Abou-Taleb (2007) avaliaram o efeito de revestimentos comestíveis a base de farinha de trigo e xantana incorporados com diferentes teores de tomilho e manjerona, na qualidade de filés de tainha semi-fritos durante o seu armazenamento refrigerado. Os revestimentos contendo 5 % de tomilho e manjerona foram os mais eficazes tratamentos antioxidantes, com relação às taxas de bases voláteis nitrogenadas totais, trimetilamina, ácido tiobarbitúrico, acidez (mg KOH) e índice de peróxidos.

Cardoso et al. (2010) avaliando a estabilidade oxidativa de carne bovina *in natura* refrigerada revestida com um biofilme a base de gelatina contendo extratos de alecrim e orégano, verificaram que os tratamentos apresentaram um efeito positivo na estabilidade do índice de TBARS (oxidação lipídica), sendo que os melhores resultados foram apresentados no tratamento alecrim + orégano.

A migração do antioxidante a partir da película do polímero para o alimento é um processo complexo, afetado principalmente pelas propriedades da matriz do polímero, da natureza da substância antioxidante e das características da superfície do produto (López-de-Dicastillo et al., 2012).

1.6 Óleos essenciais

A utilização de temperos, condimentos e extratos vegetais, é uma alternativa interessante principalmente quando empregados em combinação com outras tecnologias já existentes (Burt, 2004; Nazer et al., 2005; Dupont et al., 2006; Silva et al., 2010). Os óleos essenciais (OEs) são substâncias naturais voláteis de origem vegetal classificados como

GRAS (Generally Regarded As Safe), o que os torna atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (Pereira et al., 2006).

Os OEs são líquidos aromáticos e voláteis extraídos de componentes das plantas como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e da planta inteira (Sánchez et al., 2010). Têm sido utilizados há séculos na medicina, perfumaria, cosméticos, e adicionados aos alimentos na forma de ervas e especiarias. Em torno de 3000 OEs são conhecidos, sendo que aproximadamente 300 são usados comercialmente no mercado de sabor e fragrâncias (Burt, 2004).

Embora a indústria de alimentos utilize os OEs principalmente como aromatizantes, os mesmos representam uma fonte antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos. No entanto, a aplicação dos OEs na conservação de alimentos, requer conhecimentos detalhados sobre suas propriedades, ou seja, a concentração inibitória mínima (CIM), os micro-organismos envolvidos, modo de ação, além do efeito dos componentes da matriz do alimento sobre suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Hyldgaard et al., 2012).

No Brasil, OEs e extratos estão compreendidos dentro da classe de aditivos como aromatizantes naturais. No entanto, excluem-se do regulamento da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), as matérias de origem vegetal ou animal que possuam propriedades aromatizantes intrínsecas, quando não são utilizadas exclusivamente como fonte de aromas (ANVISA, 2007).

Na natureza, os OEs desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Atuam também na atração de insetos, os quais favorecem a dispersão de pólen e sementes. Como seus compostos ativos são originados nos metabólitos das plantas, sua composição química pode variar conforme a parte da planta, etapa do ciclo vegetativo, horário do dia e o ambiente onde tais plantas se encontram (Burt, 2004; Oussalah et al., 2007).

O metabolismo secundário é caracterizado por substâncias cuja produção e acúmulo estão restritos a um número limitado de organismos e, embora não necessariamente essenciais, garantem vantagens com relação à sobrevivência e perpetuação da espécie da planta em questão. A formação dos compostos dos OEs se dá a partir da derivação química de terpenóides originados a partir do ácido mevalônico, ou de fenilpropanóides, provindos do ácido chiquímico (Simões et al., 2007).

1.6.1 Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

A espécie *Rosmarinus officinalis* é uma planta da família Lamiaceae originária das áreas ao redor do mar Mediterrâneo, sendo atualmente cultivado em quase todo território brasileiro. O OE de alecrim normalmente é obtido das folhas da planta, variando de incolor a amarelo pálido, com odor bastante característico (Melo, 2010).

O óleo de alecrim tem importante papel como antimicrobiano e antifúngico devido a sua composição química (Angioni et al., 2004). Os principais componentes do OE de alecrim que apresentam ação antimicrobiana são o α -pineno, acetato de bornila, cânfora, 1-8 cineol, limoneno, borneol e verbenona (Figura 7) (Burt, 2004).

Santúrio et al. (2011) avaliando a atividade antimicrobiana de OEs de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos, constataram que os OEs de alecrim, sálvia, manjerição e gengibre não evidenciaram atividade antimicrobiana. Entretanto, Delamare et al. (2007) relataram atividade antimicrobiana dos OEs de alecrim e sálvia frente a *Staphylococcus* spp., *Enterobacter gergoviae*, *E. amnigenus*, *Lactobacillus sakei* e *L. curvatus*. Tais diferenças podem ser atribuídas à composição química dos óleos bem como às técnicas empregadas.

A atividade antioxidante do OE de alecrim é atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos, voláteis e não voláteis, como os flavonóides, os ácidos fenólicos e os diterpenos fenólicos, tais como o ácido carnósico e o carnosol (hidrofóbicos) e o ácido rosmarínico e o rosmanol (hidrofílicos), sendo que mais de 90 % desta atividade é atribuída aos compostos hidrofóbicos, principalmente ao ácido carnósico. Contudo, este ácido é bastante instável e sua degradação leva à formação de carnosol (metiléster do ácido carnósico), que se degrada, por sua vez, em rosmanol, epirosmanol e 7-metilrosmanol (Justo et al., 2008).

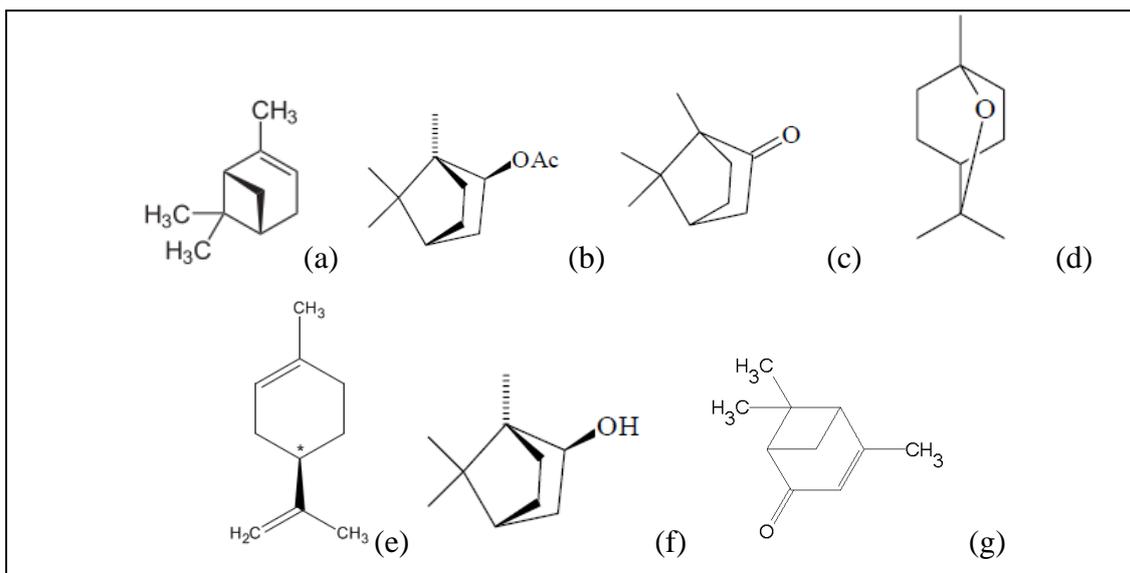


Figura 7 – Fórmulas estruturais de alguns componentes presentes no OE de alecrim (a) α -pineno, (b) acetato de bornila, (c) cânfora, (d) 1-8 cineol, (e) limoneno, (f) borneol e (g) verbenona.

Os extratos de folhas de alecrim obtidos com três diferentes solventes (hexano, acetona e metanol) apresentaram efeitos inibidores da oxidação lipídica quando avaliados pelo método Rancimat tendo banha suína como substrato, apresentando um período de indução até duas vezes superior ao do BHA (butil hidroxianisol), e até três vezes superior ao do BHT (butil hidroxitolueno) (Chen et al., 1992).

1.6.2 Óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*)

Eugenia caryophyllata (cravo-da-índia) é uma planta de porte arbóreo, de ciclo perene e que atinge cerca de doze metros de altura. A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são semelhantes às do louro, ovais, opostas e de coloração verde brilhante, com numerosas glândulas de óleo visíveis contra a luz. As flores são pequenas, branco amareladas, agrupadas em cachos terminais. O fruto é do tipo baga e de formato alongado, suculentos, vermelhos e comestíveis. Os cravos-da-índia usados na culinária são, na realidade, os botões florais (ainda não abertos) desta árvore (Martins et al., 1998).

O OE apresenta como substância majoritária o eugenol (Figura 8), responsável pela atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (Oliveira et al., 2009). O óleo de cravo-da-índia apresentou acentuada atividade antimicrobiana, quando testado para os micro-

organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes* (diminuindo significativamente a taxa de crescimento) e *Staphylococcus epidermidis* (Scherer et al., 2009).

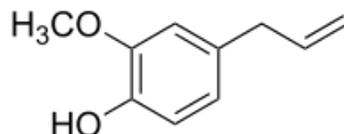


Figura 8 – Fórmula estrutural do eugenol.

Gülçin et al. (2012) à partir de diferentes testes *in vitro* avaliando a atividade antioxidante do OE de cravo-da-índia, verificaram que o mesmo foi eficiente em diferentes ensaios, incluindo redução dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS (2,2'-azinobis), índice de peróxidos, capacidade quelante de metais, comparado com os compostos antioxidantes convencionais como BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), α -tocoferol, podendo ser usado para minimizar ou evitar a oxidação lipídica em produtos alimentares.

1.6.3 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano é uma planta perene, cujo caule é ereto, geralmente com uma coloração vermelho pardo, ramificando-se nas extremidades superiores, formando touceiras. É um dos condimentos mais populares do mundo, possuindo um aroma característico, próprio, produzido por espécies de plantas que produzem OE com um conteúdo relativamente alto de carvacrol, sendo a maioria das espécies nativas da região do Mediterrâneo (Martins et al., 1998)

Baser et al. (1993) realizaram estudos com vinte e quatro amostras de orégano, provenientes de vinte e três localidades da Turquia, e constataram que o carvacrol era o composto de maior percentual de quase todas as amostras, variando de 23,43 a 78,73 %, o timol em segundo (Figura 9), com um máximo de 39,81%, seguidos do p -cimeno e γ -terpineno.

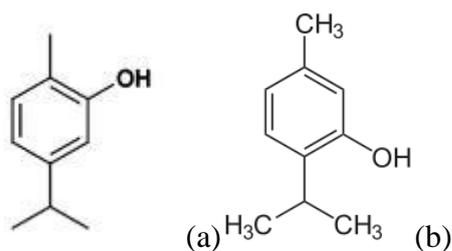


Figura 9 – Fórmulas estruturais do carvacrol (a) e timol (b).

O OE de orégano tem ganhado o interesse de muitos grupos de pesquisa em função da sua promissora atividade antioxidante para sistemas lipídicos. Pesquisas demonstraram que extratos de orégano são eficazes na prevenção de todas as fases do processo oxidativo, primeiro através da neutralização dos radicais livres, depois pelo bloqueio de peroxidação catalisada pelo ferro e, finalmente, pela interrupção do radical lipídico na cadeia de reações (Cervato et al., 2000). Os OEs de orégano, de tomilho e de outros condimentos, quando adicionados a azeite de oliva virgem e aquecidos a 180 °C por 10 minutos evitaram a degradação termoxidativa do α -tocoferol (Tomaino et al., 2005).

Devido à presença dos compostos fenólicos, o OE de orégano possui atividade antimicrobiana contra diversos micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (Ouattara et al., 1997). Kivanç et al. (1991) apud Silva et al. (2010), estudaram o efeito de cominho, orégano e seus OEs sobre o crescimento de *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, sendo que ambas as bactérias foram inibidas pelo orégano e seu OE, inclusive em concentrações menores que 0,5 %. Burt e Reinders (2003) observaram que os OEs de orégano e tomilho apresentaram atividade bacteriostática e bactericida significativa frente a *Escherichia coli* O157:H7, a qual é um importante patógeno com atividade entero-hemorrágica.

1.6.4 Óleo essencial de sálvia (*Salvia sclarea*)

A sálvia é uma planta herbácea, perene, de trinta a sessenta cm de altura, pertencente à família Lamiaceae, originária do Mediterrâneo e aclimatada na região Sul do Brasil. É considerada uma planta aromática e com propriedades medicinais, sendo usada como condimento e na medicina doméstica (Martins et al., 1998).

O OE de sálvia é obtido principalmente das folhas, extraído por arraste de vapor com rendimento variando de 0,5 a 1,1 %. Possui como principais componentes a α -tujona, cariofileno, 1,8-cineol, α -humuleno e cânfora (Figura 10). Os compostos presentes no OE são biologicamente ativos e possuem ação tóxica e farmacológica (Duke, 2002). A sálvia tem sido extensivamente estudada e reconhecida por sua capacidade antioxidante relacionada aos seus compostos fenólicos (Fasseas et al., 2007).

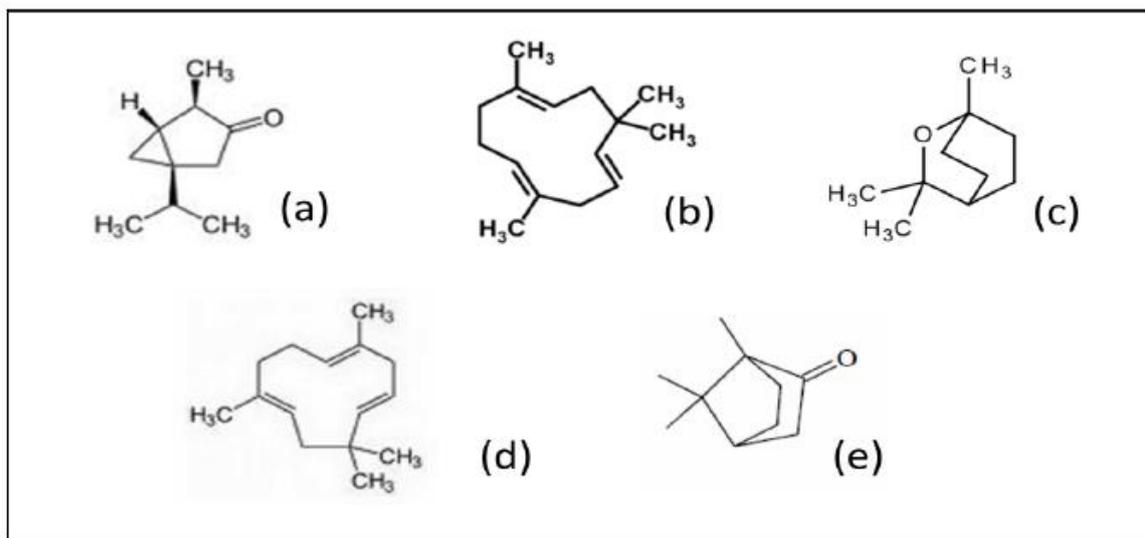


Figura 10 - Fórmulas estruturais de alguns componentes presentes no OE de sálvia (a) α -tujona, (b) cariofileno, (c) 1,8-cineol, (d) α -humuleno e (e) cânfora.

A adição de 0,1 % de OE de sálvia em uma formulação de patê de fígado suíno reduziu a degradação dos ácidos graxos poli-insaturados e a formação de compostos voláteis provenientes da oxidação lipídica durante o armazenamento a 4 °C por 90 dias (Estevez et al., 2007), enquanto 3 % de OE de sálvia adicionados a carne homogeneizada foram eficientes no controle da oxidação lipídica durante a cocção e armazenamento a 4 °C por 12 dias (Fasseas et al., 2007).

Há diversos trabalhos publicados a respeito da sálvia como antimicrobiano, atuando em bactérias diferentes. A pesquisa realizada por Pereira et al. (2004), com OE de sálvia, mostrou atividade contra *E. coli*, mas não contra *Pseudomonas aeruginosa*. Marangoni (2011) avaliando a capacidade antimicrobiana do OE de sálvia aplicado em salame italiano verificou que o mesmo apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de mesófilos e *Staphylococcus aureus*, mas não para clostrídios sulfito redutores e coliformes fecais. O OE de sálvia

apresentou uma pequena atividade frente a *E. coli* e *Salmonella Thyphimurium*, não apresentando atividade sobre os demais micro-organismos testados (Di Pasqua et al., 2005).

Os OEs são constituídos por diversos compostos orgânicos de baixo peso molecular, com atividades antimicrobianas e antioxidantes distintas, podendo ser divididos em quatro grupos de acordo com a sua estrutura química: terpenos, terpenóides, fenilpropenos e outros (Figura 11).

Terpenos são hidrocarbonetos produzidos pela combinação de várias unidades de isoprenos (C_5H_8), sendo sintetizados no citoplasma das células vegetais. Os principais terpenos são monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), mas cadeias maiores tais como diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triperpenos ($C_{30}H_{40}$), também existem. Exemplos de terpenos incluem ρ -cimoneno, limoneno, terpineno e pineno (Figura 11) (Caballero et al., 2003).

Terpenóides são terpenos os quais foram submetidos a modificações bioquímicas, com adição de moléculas de oxigênio e alterações ou remoções de grupos metil. Os terpenóides podem ser subdivididos em alcoóis, ésteres, aldeídos, fenóis, etc. Ex. timol, carvacrol, linalol, acetato de linalila, citronelal, piperitona, mentol e geraniol (Figura 11).

A atividade antimicrobiana dos terpenóides está relacionada aos seus grupos funcionais, e tem sido demonstrado que o grupo hidroxil dos terpenóides fenólicos e a presença de elétrons deslocalizados são importantes para a atividade antimicrobiana. Seus compostos antimicrobianos são ativos frente a um amplo espectro de micro-organismos, sendo carvacrol e o timol os monoterpenóides mais ativos identificados até o momento (Hyldgaard et al., 2012).

Fenilpropenos constituem uma subfamília entre os vários grupos de compostos orgânicos chamados fenilpropanóides, os quais são sintetizados a partir da fenilalanina nas plantas. Os fenilpropenos constituem uma fração relativamente pequena dos OEs, sendo os mais pesquisados o eugenol, isoeugenol, vanilina, safrol e o cinamaldeído (Figura 11). Comparando-se moléculas que são quimicamente similares ao eugenol e isoeugenol, verifica-se que os grupos hidroxila livres são importantes por sua atividade contra bactérias, mas não leveduras. No entanto, a atividade antimicrobiana dos fenilpropenos depende do número e tipo de substituintes no anel aromático, da cepa microbiana e dos parâmetros utilizados nos testes experimentais, como meio de crescimento, temperatura, etc. (Pauli e Kubeczka, 2010).

Os OEs contêm diferentes produtos de degradação originários de ácidos graxos insaturados, lactonas, terpenos, glicosídeos e compostos que contêm nitrogênio e enxofre,

como a alicina e o alil isotiocianato, os quais possuem atividade antimicrobiana conhecida (Figura 11) (Caballero et al., 2003).

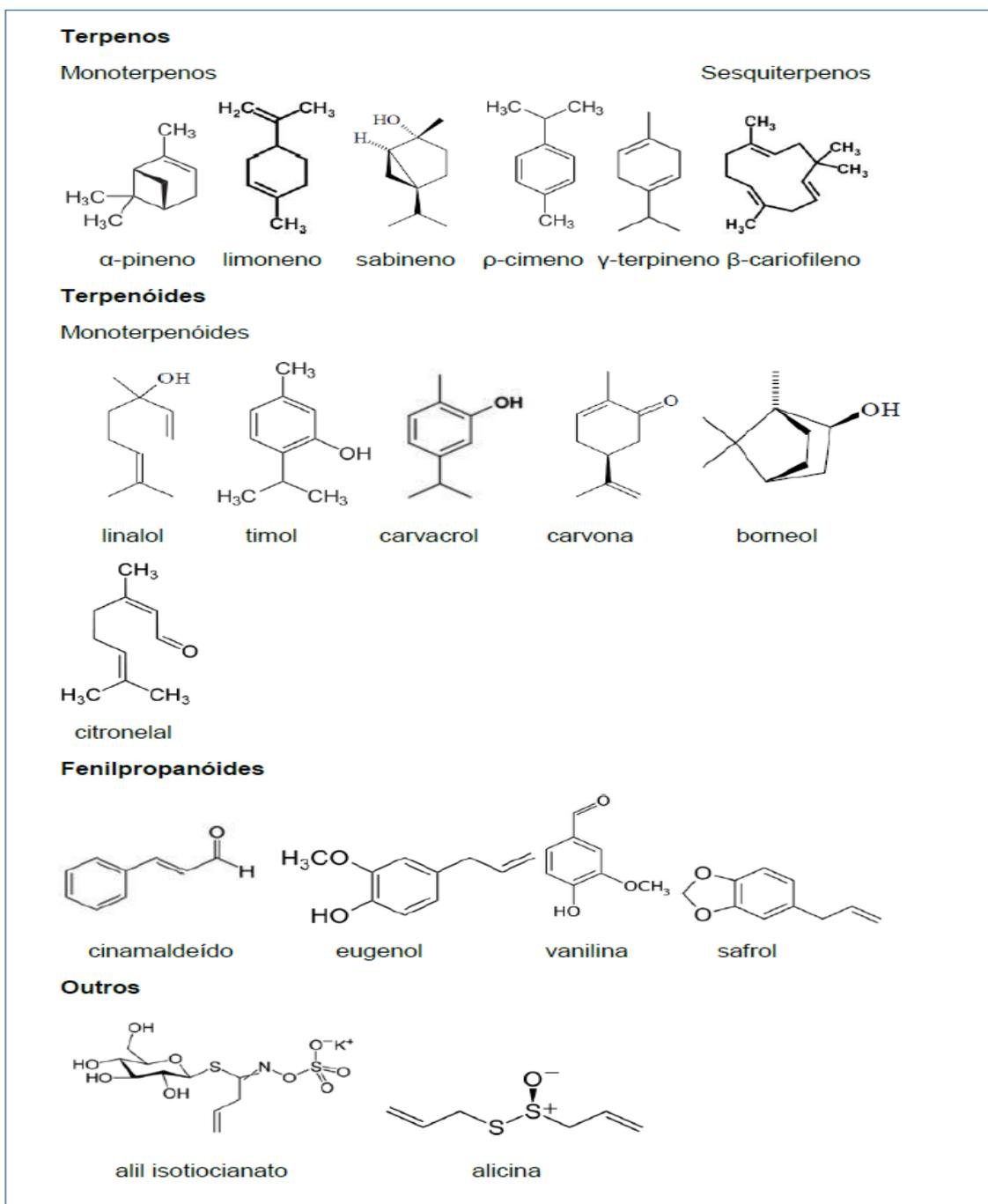


Figura11 - Estruturas químicas de alguns constituintes dos OEs.

Fonte: Hyldgaard et al., 2012 (adaptado).

1.7 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

As plantas produzem uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana. Destes, alguns estão sempre presentes, enquanto outros são produzidos em resposta ao ataque de micro-organismos ou devido a danos físicos. A identificação dos compostos antimicrobianos mais ativos presentes nos OEs é complexa, tendo em vista que, dependendo do óleo, pode haver a presença de mais de quarenta e cinco componentes diferentes, os quais sofrem variações percentuais de acordo com a época da colheita e o método utilizado para extrair o óleo, dentre outros fatores (Espina et al., 2011).

O mecanismo de ação dos OEs sobre os micro-organismos é complexo e ainda não foi totalmente elucidado. Já é bem conhecido o caráter hidrofóbico dos OEs e seus componentes, que permite a sua ligação aos lipídeos da membrana celular modificando sua estrutura e aumentando sua permeabilidade. Devido a esta permeabilidade alterada, podem ocorrer a passagem de íons e outros constituintes celulares provocando a morte da célula, sendo este o principal mecanismo pelo qual os OEs têm ações letais (Cox et al., 2000; Burt, 2004).

Outras ações dos OEs seriam danos às proteínas da membrana, interrupção da força motriz de prótons (Ultee e Smid, 2001), do fluxo de elétron, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (Burt, 2004). Por outro lado, os OEs em geral expressam baixa solubilidade aquosa, o que os impede de alcançar um nível tóxico em cito membranas (Cox et al., 2000).

1.7.1 Testes *in vitro* de determinação da atividade antibacteriana

Testes e avaliações da atividade antimicrobiana de OEs são complexos, devido à volatilidade dos mesmos, sua insolubilidade em água e complexidade, requerendo algumas modificações. Os OEs são de natureza hidrofóbica e alta viscosidade, o que pode reduzir a capacidade de diluição ou causar distribuição desigual do óleo através do meio, mesmo com o uso de emulsificantes (Kalemba e Kunicka, 2003). Por serem misturas complexas de compostos voláteis, longos períodos de incubação podem resultar na evaporação ou decomposição de alguns dos componentes durante o período de realização dos testes.

Os testes de atividade antimicrobiana podem ser classificados como de difusão, diluição ou bioautográficos (Burt, 2004). Os princípios e práticas destes métodos de ensaio são descritos na literatura, embora nenhum tenha sido padronizado para avaliar a atividade

antibacteriana de possíveis conservantes frente a micro-organismos relacionados com alimentos, embora a necessidade para tal tenha sido indicada (Davidson e Parish, 1998).

O método CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para testes de susceptibilidade antibacteriana (CLSI, 2009), o qual é utilizado para avaliar antibióticos, foi modificado para uso com OEs. No entanto, uma vez que o resultado de um ensaio pode ser afetado por fatores tais como o método utilizado na extração do óleo a partir do material vegetal, volume do inóculo, fase de crescimento do micro-organismo, meio de cultura utilizado, tempo de incubação e temperatura, etc. (Rios et al., 1988 apud Burt, 2004), a comparação dos dados publicados fica dificultada.

1.7.1.1 Método de difusão em ágar

O método de difusão em ágar é a técnica mais difundida de avaliação da atividade antimicrobiana de OEs, sendo reconhecido como preciso e confiável, embora produza resultados qualitativos e nem sempre reprodutíveis (Kalodera et al., 1995). De acordo com este método, placas de Petri de 5 a 12 cm de diâmetro são preenchidos com 10 a 20 mL de ágar, sendo inoculado com o micro-organismo a ser testado. Duas formas de incorporação do OE são possíveis, em disco de papel ou em poços perfurados no ágar.

Séries de placas de Petri com discos de papel ou poços contendo diferentes concentrações do OE são incubadas. A eficácia do OE é demonstrada pelo tamanho da zona de inibição do crescimento do micro-organismo em torno do disco ou poço, sendo usualmente expresso como o diâmetro dessa zona, em cm ou mm, podendo ou não ser incluída a área correspondente ao disco de papel ou poço. Basicamente, o OE é adsorvido na superfície do ágar, sendo que posteriormente esses compostos que foram adsorvidos se difundem no meio (Kalemba e Kunicka, 2003).

O método de difusão em ágar é considerado inapropriado para OEs, tendo em vista sua provável evaporação durante o período de incubação, assim como a difusão inadequada dos seus componentes pouco solúveis no ágar (Griffin et al., 2000). Apesar destes inconvenientes, esta ainda é a técnica mais utilizada, em função da facilidade de execução e de requerer pequenas quantidades de óleo, sendo recomendado como uma prévia de estudos mais detalhados (Burt, 2004).

1.7.1.2 Método de diluição

A atividade antimicrobiana dos OEs pode ser estimada pela sua diluição em ágar ou caldo, podendo ser utilizados diferentes solventes para incorporar o óleo no meio e diferentes volumes de inóculo (Burt, 2004). O efeito inibidor do crescimento pode ser calculado por diferenças na turbidez do líquido, avaliada por densidade ótica, sendo os resultados expressos de duas maneiras:

- a) Índice de inibição do crescimento, definido como a percentagem de inibição do crescimento em relação à cultura controle (sem adição de OE);
- b) Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo definida como a menor concentração do OE no caldo, o qual resulta na ausência de crescimento microbiano. O ponto final pode ser visualizado através da densidade ótica (turbidez). Existe a possibilidade de utilização da resazurina como indicador visual da CIM (Burt, 2004).

Uma característica dos métodos, a qual varia consideravelmente, é a utilização ou não de um agente emulsionante ou solvente, objetivando dissolver o OE ou estabilizá-lo no meio de cultura utilizado. Várias substâncias têm sido utilizadas para esse propósito, como o etanol, metanol, Tween 20, Tween 80, propilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), n-hexano, etc., enquanto alguns pesquisadores concluíram ser desnecessário o uso de um aditivo (Smith-Palmer et al., 1998; Lambert et al., 2001).

Alguns pesquisadores aplicam pelo menos dois métodos diferentes para avaliar a atividade antimicrobiana do mesmo óleo, sendo os mais frequentes os métodos de difusão em ágar e o de diluição. Correlações boas têm sido relatadas entre os resultados produzidos pelos dois métodos (Kalodera et al., 1995). As divergências observadas normalmente são principalmente relacionadas com a atividade dos componentes individuais do óleo (Kalemba e Kunicka, 2003).

1.8 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

A formação de odores e sabores estranhos em lipídeos e alimentos que os contêm, geralmente descrita como rancidez é seguramente uma das reações mais importantes de deterioração de qualidade destes alimentos. Existem basicamente dois tipos de rancidez, a hidrolítica e a oxidativa. A rancidez hidrolítica deve-se à ação de lipases, amplamente distribuídas nos alimentos e que catalisam a hidrólise dos ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis, com liberação de ácidos graxos. Oxidação lipídica é o termo geral utilizado para descrever uma sequência complexa de alterações químicas resultantes da interação de

lipídios com o oxigênio. A rancidez oxidativa pode ocorrer por via enzimática pela ação das enzimas lipoxigenases ou por via não enzimática, através da autooxidação ou da fotooxidação (Fennema et al., 2010). A oxidação lipídica pode levar à destruição de vitaminas, ácidos graxos, pigmentos e proteínas, mas a perda das qualidades sensoriais é o efeito mais visível decorrente deste processo. Além das perdas nutricionais e sensoriais, pode gerar compostos indesejáveis e até mesmo potencialmente prejudiciais à saúde humana (Mariutti e Bragagnolo, 2007).

Os mecanismos antioxidantes dos compostos que são usados para aumentar a estabilidade oxidativa de alimentos incluem o controle de radicais livres, pró-oxidantes e intermediários da oxidação, sendo o BHT (butil hidroxitolueno) e o BHA (butil hidroxianisol) antioxidantes sintéticos amplamente utilizados na indústria de alimentos (Mariutti e Bragagnolo, 2007), embora atualmente sua inocuidade tenha sido questionada, o que impulsiona a busca por compostos com esta função a partir de fontes naturais, particularmente aquelas de origem vegetal como os OEs (Sánchez, 2010).

A atividade antioxidante dos OEs está relacionada, principalmente, com a presença de compostos fenólicos. Compostos como o timol, carvacrol e eugenol, presentes nos OEs de cravo-da-índia e orégano tem conhecida atividade antioxidante. Teixeira et al. (2013) avaliando OEs comerciais, identificaram uma forte e moderada atividades antioxidantes em OEs de cravo-da-índia e orégano respectivamente, similares às encontradas em antioxidantes sintéticos como o BHT.

Cuvelier et al. (1994) identificaram os constituintes antioxidantes da sálvia como sendo carnosol, rosmadial, ácido carnosínico, rosmanol e epirosmanol, previamente encontrados em alecrim, e notadamente conhecidos por suas propriedades antioxidantes. A adição de 3% de OE de sálvia adicionados a carne homogeneizada foram eficientes no controle da oxidação lipídica durante a cocção e armazenamento a 4 °C por 12 dias (Faseas et al., 2007).

1.8.1 Testes *in vitro* de determinação da atividade antioxidante

Existe uma grande variedade de testes para verificar o potencial antioxidante dos componentes presentes nos condimentos e ervas aromáticas. Os métodos podem ser classificados em dois grupos: métodos que avaliam a habilidade de sequestrar radicais livres e métodos que testam a habilidade de inibir a oxidação lipídica. A quantificação do substrato,

do agente oxidante, dos produtos intermediários ou dos produtos finais da oxidação pode ser usada para medir a atividade antioxidante.

Embora vários métodos sejam sido utilizados para mensurar a capacidade antioxidante de suplementos alimentares e dietéticos, extratos de plantas medicinais e compostos puros, apenas alguns deles são eficientes devido às dificuldades encontradas ao se avaliar a capacidade antioxidante destas substâncias, em função de limitações associadas a questões metodológicas e de fontes de radicais livres (Gülçin et al., 2012).

Um dos métodos mais utilizados para verificar a atividade antioxidante de compostos puros consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R·), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (Oliveira et al., 2009) (Figura 12).

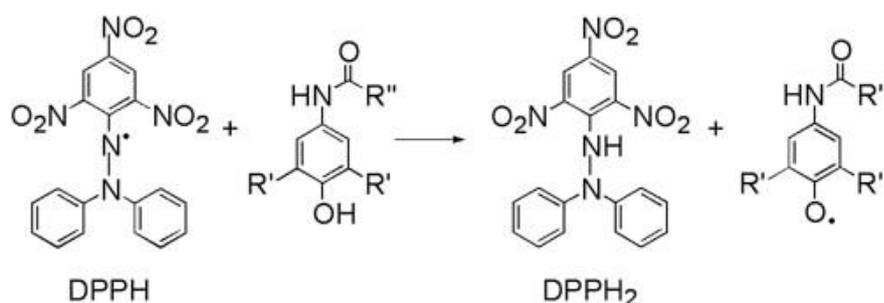


Figura 12 – Representação esquemática do comportamento do radical DPPH utilizado na determinação da atividade antioxidante de OEs.

Embora este radical tenha como limitação sua semelhança com radicais peroxila, este ensaio é comumente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de farelo e grãos de trigo, legumes, ácido linoleico conjugado, ervas, sementes comestíveis, óleos e farinhas, em diferentes sistemas de solventes incluindo etanol, solução aquosa de acetona, metanol, álcool e benzeno (Cheng et al., 2006). Comparado com outros métodos, o ensaio DPPH tem muitas vantagens tais como uma boa estabilidade, sensibilidade, simplicidade e viabilidade (Jin et al., 2006).

Os resultados do ensaio DPPH têm sido apresentados de diferentes maneiras. A maioria dos estudos exprime os resultados como o valor IC₅₀, definido como a quantidade de

antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 %, sendo utilizado para comparação da atividade antioxidante de diferentes compostos. Este valor é calculado através da representação gráfica da percentagem de inibição contra a concentração da substância utilizada (Deng et al., 2011).

O cálculo do valor IC₅₀ requer a determinação da cinética da reação entre o DPPH e diferentes concentrações do antioxidante, sendo que a reação deve ser monitorada até que a concentração do DPPH atinja um valor estacionário (Brand-Williams et al., 1995). A atividade antioxidante dos compostos é verificada medindo-se a concentração do DPPH no início da reação entre o composto/DPPH, e após um período de incubação o qual, de acordo com a literatura, pode variar de um a sessenta minutos. Deve-se salientar, no entanto, que um tempo de incubação curto frequentemente não é suficiente para atingir o estado de equilíbrio da reação (Dawidowicz et al., 2012).

A influência do tipo de solvente na estimativa das propriedades antioxidantes dos compostos geralmente é omitida. No entanto, a cinética da reação antioxidante/DPPH depende do solvente utilizado (Gülçin et al., 2012).

1.9 Produtos cárneos

O hábito de preservar alimentos é muito antigo, tendo surgido da necessidade do homem fazer seus estoques, possibilitando-o de ter reservas alimentares para os períodos de escassez. A industrialização da carne consiste na sua transformação em produtos cárneos, contemplando um ciclo o qual envolve várias etapas que vão desde o manejo prévio ao sacrifício dos animais até a comercialização dos produtos. Objetiva basicamente aumentar a vida útil, desenvolver diferentes sabores e utilizar partes do animal de difícil comercialização quando *in natura* (Terra, 1998).

As carnes e derivados constituem produtos altamente perecíveis. Cuidados muito especiais devem ser mantidos durante todas as operações. Os processos visam minimizar a deterioração e prolongar a vida de prateleira com níveis de qualidade aceitáveis. Dentre as várias matrizes alimentares de origem vegetal e animal, os embutidos cárneos representam um segmento de relevante comercialização por todo mundo. No Brasil, fazem parte dos hábitos alimentares de uma parcela considerável da população (Olivo, 2006; Ordóñez, 2005).

Entende-se por embutidos, os produtos constituídos a base de carne picada e condimentada, com forma geralmente simétrica, podendo ser frescos, secos ou cozidos (Terra,

1998). Dentre os embutidos cárneos cozidos, temos a categoria dos produtos emulsionados na qual estão incluídos os patês, salsichas e mortadelas. Entende-se por salsicha, o produto cárneo industrializado obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural, artificial ou por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado (BRASIL, 2000).

A vida de prateleira dos produtos depende dos seus parâmetros intrínsecos e extrínsecos, este período é estabelecido pelos produtores (Hoffmann, 2001). A salsicha deverá estar permanentemente submetida à ação do frio desde o fabrico até o consumo, a temperaturas entre 0 °C e 5 °C, para o produto refrigerado, e iguais ou inferiores a -18 °C, quando congelado. A RDC nº 12 de 2001 estabelece que o limite máximo de contaminação deste produto para Coliformes a 45°C é de 10³ UFC/g, para *Staphylococcus* coagulase positiva, o limite é 3x10³ UFC/g, 5x10² UFC/g para *Clostridium* sulfito redutor e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de alimento (BRASIL, 2001).

Em salsichas vendidas à granel a presença de micro-organismos patogênicos é superior ao embalado a vácuo, porém também há ocorrência de patógenos neste tipo de embalagens. *Staphylococcus* spp. coagulase positiva é o micro-organismo patogênico de maior ocorrência em salsichas do tipo hot dog, enquanto a *Salmonella* é pouco observada (Martins et al, 2008). Mrema et al. (2006) analisaram 120 salsichas e observaram que 26 % das amostras foram positivas para *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* foi encontrada por Wallace et al. (2003) em 532 de 32.800 embalagens para salsicha (1,6 %), isto indica que os produtos também podem estar sendo contaminados no pós-processamento.

A presença de patógenos evidencia a necessidade de se investir em técnicas de descontaminação para garantir a segurança do alimento. Também há o interesse em reduzir ou eliminar os micro-organismos deteriorantes para aumentar a durabilidade do produto. Como em muitos alimentos refrigerados, o crescimento microbiano é o principal responsável pela deterioração da carne e dos produtos cárneos, em conjunto com as alterações bioquímicas e enzimáticas (Devlieghere et al., 2004).

A oxidação lipídica e as alterações da cor são atributos importantes que podem estar relacionados à degradação e deterioração de produtos cárneos e que influenciam diretamente os aspectos sensoriais, a qualidade nutricional e a aceitação pelo consumidor. O rompimento da integridade das membranas musculares pela desossa mecânica, moagem, reestruturação ou cozimento alteram os compartimentos celulares com a liberação de ferro da mioglobina e de outras proteínas. A interação deste e de outros agentes pró-oxidantes com os ácidos graxos

polinsaturados resulta na geração de radicais livres e na propagação de reações oxidativas (Olivo, 2006).

Os consumidores mais conscientes e informados tendem a demandar produtos seguros e de qualidade atestada, obtidos a partir de boas práticas de fabricação e controle de riscos. Nessa direção têm sido desenvolvidas pesquisas visando à substituição de aditivos sintéticos utilizados para auxiliar na preservação dos alimentos, seja de alterações químicas quanto microbiológicas, por elementos mais naturais, menos agressivos a saúde do consumidor e ao meio ambiente.

1.9.1 Qualidade de produtos cárneos

Consideram-se produtos e derivados cárneos aqueles preparados total ou parcialmente com carnes, miúdos ou gorduras, e subprodutos comestíveis procedentes dos animais de abate ou outras espécies e, eventualmente, ingredientes de origem vegetal ou animal, como também condimentos, especiarias e aditivos autorizados (Ordóñez, 2005). Apresentam uma composição química a qual facilita a sua deterioração, sendo que cuidados desde a produção até o consumo são indispensáveis para garantir a qualidade dos mesmos.

1.9.1.1 Aspectos microbiológicos

Como na maioria dos alimentos, a carne e os produtos cárneos contém uma flora deteriorante podendo também apresentar algumas espécies de micro-organismos patogênicos. A microbiota da salsicha apresenta micro-organismos Gram-positivos como *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e leveduras (Jay, 2005). Também ocorre, em embutidos cárneos, a presença de patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e outros (Varnan e Sutherland, 1998).

Nas salsichas é comum que ocorram alguns defeitos causados pela proliferação microbiana. O estufamento da embalagem plástica, que ocorre com frequência, se deve à produção de gás resultante da multiplicação de bactérias heterofermentativas aderidas à superfície da salsicha. A formação de limosidade também é comum nesse tipo de produto e é originada, comumente, por bactérias lácticas. As bactérias lácticas estão presentes em quase todo tipo de produto cárneo fresco ou curado. Esses micro-organismos crescem também em temperaturas de refrigeração e por não serem patogênicos estão fora da imposição de análise

na legislação vigente, sendo considerados como os principais deteriorantes das salsichas (Battistella, 2008).

A matéria-prima empregada, as condições de elaboração, de maturação e armazenamento além de outros fatores, influenciam de modo marcante a ocorrência de alterações microbiológicas nos produtos cárneos.

Clostridium perfringens e *Bacillus cereus* são bactérias patogênicas responsáveis por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). A proliferação e/ou produção de toxinas por micro-organismos patogênicos podem provocar intoxicações alimentares, mesmo que os micro-organismos que lhes deram origem tenham sido eliminados (Oliveira et al., 2010).

Algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae* são indicadoras de higiene, como por exemplo, *Escherichia coli*, responsáveis pelas alterações dos produtos alimentares. A microbiota dos embutidos tem, por isso, influência na sua decomposição, afetando assim negativamente a qualidade deste tipo de produtos (Jay, 2005).

A presença de patógenos evidencia a necessidade de se investir em técnicas de descontaminação para garantir a segurança do alimento. Também há o interesse em reduzir ou eliminar os micro-organismos deteriorantes para aumentar a durabilidade do produto.

1.9.1.2 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é um importante fator limitador da qualidade da carne e produtos cárneos, e tem interferido na aceitabilidade dos consumidores. Este fenômeno causa desvalorização comercial e leva a indústria de produtos cárneos a adotar medidas que o limitem, pois este processo de oxidação, também chamado de rancificação, acarreta alterações organolépticas, da coloração da carne e da gordura, formação de compostos potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Guerreiro, 2011).

Dentre os fatores extrínsecos que contribuem para o desenvolvimento da oxidação lipídica em carnes estão as condições de processamento, como a moagem, o tratamento térmico, a aplicação de alta pressão, a adição de outros ingredientes à formulação do produto, a temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e a exposição à luz (Mariutti e Bragagnolo, 2009).

Antioxidantes sintéticos são utilizados para prevenir ou retardar a oxidação lipídica nos produtos. Todavia, observa-se uma demanda cada vez maior por produtos naturais, tendo

em vista a crescente preocupação dos consumidores com aspectos relacionados à sua saúde e questões ambientais.

O uso de condimentos como antioxidantes naturais tem sido objeto de estudo em pesquisas que empregam diversas matrizes alimentares como hambúrgueres, almôndegas, embutidos, desidratados e cortes marinados (Mariutti e Bragagnolo, 2009). Devido à crescente demanda de utilização dos antioxidantes naturais em nível industrial, a presença de compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada, pelo fato destes inibirem a oxidação lipídica, além de participarem de processos responsáveis pela cor, aroma e adstringência em vários produtos (Peleg et al., 1998), contudo há a necessidade de se buscar a melhor forma de utilização dos antioxidantes naturais para esta finalidade, haja vista que os extratos elaborados até então tem apresentado bons resultados quanto à atividade antioxidante, porém ainda detêm algumas interferências nas características sensoriais dos produtos aos quais são adicionados (Brum, 2009).

Os vegetais são fontes ricas em antioxidantes naturais como tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos. A maioria destes compostos antioxidantes possui uma base molecular semelhante, ou seja, pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os ácidos fenólicos, flavonóides e isoflavonas, ésteres de galato (taninos hidrolisáveis), ligninas, coumarinas, estilbenos, flavononas e protoantocianidinas oligoméricas. Juntos, estes compostos produzem um arranjo de antioxidantes que pode agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (Shahidi, 1997).

Testes como índice de peróxidos, ácidos graxos livres, anisidina, Kreis, Valor Tolox (valor total de oxidação) e compostos voláteis são utilizados no controle de qualidade de óleos, gorduras e produtos que a contenham, por fornecerem informações valiosas e essenciais a respeito do processo oxidativo na predição da rancidez do alimento analisado (Osawa et al., 2005).

O método mais usual para acompanhar a evolução da oxidação de lipídios em carnes e produtos cárneos é o teste de TBA (ácido tiobarbitúrico, que mede a formação de malonaldeído (MDA), um produto da lipoperoxidação provocada principalmente por radicais livres hidroxila, que são formados principalmente a partir de peróxido de hidrogênio catalisado pela reação ferro-Fenton ou pela reação Haber-Weiss (Rampelotto, 2012). A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído, produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda. Os

resultados são expressos em unidades de absorvância por unidade de massa de amostra, definido como a massa em mg de malonaldeído por Kg de amostra (Brum, 2009).

O valor de TBARS, substâncias reativas ao TBA, constitui-se numa outra maneira de expressar o valor obtido no teste de TBA, sendo atualmente mais utilizado e leva em consideração outras substâncias capazes de reagir com o ácido-2-tiobarbitúrico (Osawa et al., 2005). Na determinação da oxidação lipídica pelo teste de TBARS, todas as extrações devem ser feitas através de um único meio de extração. Assim, a mudança dos valores de TBARS para uma situação particular ou um determinado tipo de produto cárneo pode mostrar o comportamento da oxidação dos lipídios que ocorre durante o processamento e/ou armazenamento. Dessa maneira, pode-se, por exemplo, avaliar a eficácia de antioxidantes de diferentes fontes ou de diferentes embalagens, na estabilidade de um dado produto (Brum, 2009).

Em amostras cárneas, a oxidação da gordura é influenciada por muitos elementos, tais como a parte da carcaça, forma e tempo de armazenamento. Valor de pH, ácidos graxos livres e índice de peróxido também são afetados pelo tempo de armazenamento prolongado. Valores de TBARS se mostram superiores em carnes armazenadas embaladas com presença de ar em relação àquelas embaladas a vácuo. O tempo de armazenamento prolongado é outro fator que está relacionado com alta oxidação das gorduras (Ozkececi et al., 2008).

1.9.1.3 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial é aplicada pelas pessoas de maneira inconsciente, no momento que estas julgam e decidem sobre suas preferências. Atualmente o consumidor está ampliando sua consciência quanto às características dos alimentos que escolhe consumir, buscando maior diversificação, praticidade e, acima de tudo, qualidade.

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993), a análise sensorial é uma ciência que evoca, mede, analisa e interpreta as reações humanas frente às características dos alimentos e materiais, percebidas pelos cinco sentidos: paladar, olfato, tato, visão e audição.

Os testes utilizados são de grande importância na avaliação sensorial, pois a correta escolha e aplicação destes irão definir o sucesso ou não do estudo. Basicamente os métodos sensoriais são agrupados em dois grandes grupos, analíticos e afetivos. Os primeiros são utilizados em avaliações onde é necessária a seleção e/ou treinamento da equipe sensorial

sendo exigida uma avaliação objetiva, ou seja, na qual são consideradas as preferências ou opiniões pessoais dos membros da equipe (ABNT, 1993). Os testes afetivos, por sua vez, também se dividem em dois grupos, testes discriminativos (de preferência) e descritivos (Ferreira et al., 2000).

Os testes afetivos são usados para avaliar a preferência e/ou aceitação de produtos. Geralmente um grande número de julgadores é requerido para essas avaliações. Os julgadores não são treinados, mas são selecionados para representar uma população alvo (IFT, 1981). Os testes afetivos são uma importante ferramenta, pois acessam diretamente a opinião do consumidor já estabelecido ou potencial de um produto, sobre características específicas do produto ou idéias sobre o mesmo, por isso são também chamados de testes de consumidor (Ferreira et al., 2000). As principais aplicações dos testes afetivos são a manutenção da qualidade do produto, otimização de produtos e/ou processos e desenvolvimento de novos produtos.

Dentre os testes discriminativos, o teste de comparação múltipla é aplicado quando se tem mais de uma amostra a ser avaliada e comparada com um padrão, ou quando se precisa da magnitude e da direção da diferença. Neste teste avalia-se, portanto, a diferença e o grau dessa diferença segundo um atributo específico. Na dinâmica do teste, deve ser fornecida ao julgador uma amostra controle (padrão) e três ou mais amostras. É solicitado que ele as avalie em relação à amostra controle de acordo com um atributo específico, utilizando uma escala preestabelecida na qual possa ser medido o grau da diferença. Os dados obtidos podem ser avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e testes de comparação de médias (ABNT, 1995).

O teste por comparação múltipla pode também ser utilizado para indicar até qual concentração pode-se adicionar um determinado componente, sem alterar significativamente as propriedades sensoriais do produto (Teixeira, 2009).

O uso de óleos essenciais, nas concentrações necessárias para serem efetivos como conservantes em alimentos, desperta o interesse de adequação em relação às alterações nas propriedades sensoriais dos produtos, sendo a utilização de biofilmes ativos, na forma de películas e recobrimentos comestíveis, uma opção para evitar interferências maiores no sabor e aroma dos produtos.

2 REFERÊNCIAS

ABAM – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA. Disponível em <http://www.abam.com.br>. Acesso em 01 de outubro de 2012.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas**. Terminologia – NBR 12806. São Paulo: ABNT, 1993.

ABRE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMBALAGENS. Disponível em http://www.abre.org.br/meio_reci_brasil.php. Acesso em 10 de dezembro de 2011.

ALVES, V.D.; MALI, S.; BELÉIA, A.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of glycerol and amylose enrichment on cassava starch films properties. **Journal of Food Engineering**, vol. 78, n. 2, p. 941-946, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**. ASTM D882-91. Philadelphia, p. 316, 1993.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 3530-3532, 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes**. Resolução - RDC nº 2. Brasil, 2007.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/embalagens.htm>. Acesso em 11 de setembro de 2012.

ARRIETA, M.P.; PELTZER, M.A.; SELVA, M.C.G.; MIGALLÓN, A.J. Biopelículas activas obtenidas a partir de proteínas lácteas. **Seguridad y Medio Ambiente**, vol. 121, p. 46-56, 2011.

ARVANITTOYANNIS, I; BILLIADERIS, C.G. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methylcellulose and soluble starch. **Carbohydrate Polymers**, vol. 36, p. 105-119, 1999.

ASSIS, O.B.G. de. Revestimentos protetores comestíveis em frutas: uma tecnologia emergente. <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=14349>. Acesso em 08 de dezembro de 2012.

AVADI, M.R.; SADEGHI, A.M.M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K.H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M.J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: synthesis, characterization and antibacterial effects. **European Polymer Journal**, vol. 40, p. 1355-1361, 2004.

BARRETO, P.L.M. **Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificado com sorbitol**. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003. 114 p.

BASER, K .H. C.; OZEK, T.; TUMEN, G.; SEZIK, E. Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 5, n. 6, p. 619-623, 1993.

BATTISTELLA, P. M. D. **Análise de Sobrevivência Aplicada à Estimativa da Vida de Prateleira de Salsichas**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. 103 p.

BERTAN, L.C. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos a base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003, 188 p.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, vol. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 4, de 31 de março de 2000**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. Diário Oficial da União, Brasília 05/04/2000, Seção 1, p. 6-10, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Princípios Gerais para Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Resolução - RDC nº 12**, de 02/01/01. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRUM, E.B. de. **Antioxidante natural de marcela (*Achyrocline satureioides*) e de erva mate (*Ilex paraguayensis*) na elaboração de lingüiça Toscana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2009. 78 p.

BURT, S.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 36, p. 162-167, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, vol.94, p. 223–253, 2004.

BUZINOVA, D. A.; SHIPOVSKAYA, A. B. Sorption and bactericide properties of chitosan films. **Izvestya of Saratov University**, vol. 8, n. 2, 2008.

CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Amsterdam: Academic Press. 2003.

CANER, C. The effect of edible eggshell coatings on egg quality and consumer perception. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 85, p. 1897–1902, 2005.

CANEVAROLO JR., S.V. **Ciência dos Polímeros – Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Ed. Artliber, 183 p., 2002.

CARDOSO, G.P.; RAMOS, E.M.; FARIA, C.H.M.; RAMOS, A.L.S. Estabilidade oxidativa de carne bovina in natura refrigerada revestida em biofilme de gelatina contendo extratos de alecrim e orégano. XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA. **Anais**, 2010.

CARVALHO, R.A. de. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1997. 128 p.

CENTRO DE TECNOLOGIA DE EMBALAGENS – CETEA. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas, 1996. 219 p.

CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; CARVALHO, R. A.; VALENTE, A. J. M. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por HRMN. **Polímeros**, vol. 20, n. 2, p. 85-91, 2010.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, vol. 24, n. 6, p. 453-65, 2000.

CHEN, H. Functional properties and application of edible films made of milk protein. **Journal of Dairy Science**, vol.78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.

CHEN, Q.; SHI, H.; HO, C. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of the American Oil Chemists Society**, vol. 69, n. 10, p. 999-1002, 1992.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH_ radical assay. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, vol. 54, p. 7429–7436, 2006.

CHI, S.; ZIVANOVIC, S.; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna- active compounds and sensory attributes. **Food Science and Technology International**, vol. 12, n. 2, p. 111-117, 2006.

CHILLO, S.; FLORES, S.; MASTROMETTO, M.; CONTE, A.; GERSCHENSON, L.; DEL NOBILE, M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. **Journal of Food Engineering**, vol.88, p. 159-168, 2008.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Tenth Edition**. CLSI document M2-A10. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009.

COMA, V. A review: Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, vol. 78, p. 90–103, 2008.

COMA, V.; MARTIAL GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. **Journal of Food Science**, vol. 67, n. 3, p. 1162-1169, 2002.

COMA, V.; DESCHAMPS, A.; MARTIAL-GROS, A. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-antimicrobial activity assessment on dairy related contaminants. **Journal of Food Science**, vol. 68, n. 9, p. 2788–2792, 2003.

COOKSEY, K. Antimicrobial food packaging materials. **Additive Polymer**, vol. 8, p. 6-10, 2001.

COPAM – COMPANHIA PORTUGUESA DE AMIDOS S.A. Disponível em <http://www.copam.pt> Acesso em 01 de outubro de 2012.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R. The Mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* tea tree oil. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

CRIPPA, A.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; AMICO, S. C. The influence of the thermoforming process on co-extruded plastic films for sausage packaging. In: World Polymer Congress. 41st International Symposium on Macromolecules, **Anais**. Rio de Janeiro, 2006.

CUTTER, C.N. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. **Meat Science**, vol. 74, p. 131–142, 2006.

CUTTER, C.N.; SUMNER, S.S. Application of edible coatings on muscle foods. In A. *Gennadios* (Ed.), **Protein-based films and coatings** (p. 467–484). Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.

CUVELIER, M.E.; BERSET, H.; RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 42, p. 665-669, 1994.

DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, vol. 38, p. 243-254, 1994.

DAVIDSON, P.M.; PARISH, M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, vol. 43, p. 148–155, 1998.

- DAWIDOWICZ, A.L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH_method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, vol. 131, p. 1037–1043, 2012.
- DELAMARE, A.P.; PISTORELLO, I.T.M.; ARTICO, L.; SERAFINI, L.A.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, vol. 100, p. 603-608, 2007.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, vol.39, n. 3, p. 945-954, 2009.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, vol. 125, p. 1430–1435, 2011.
- DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, vol. 14, p. 273–285, 2004.
- DI PASQUA R.; de FEO, V.; VILLANI, F.; MAURIELLO, G. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Annals of Microbiology**, vol.55, n. 2, p. 139-143, 2005.
- DU, W.X.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; HUA, S.S.T.; McHUGH, T.H. Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. In **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 1124-1134, 2011.
- DUKE, J.A. Biologically: active compounds important spices. In: CHARALAMBOUS, G. Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevier Publishers, 1994. **Egyptian Journal Horticulture**, vol. 27, p. 459-478, 2002.
- DUPONT, S.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B.; DYKES, G. A. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food Control**, vol.17, n. 11, p. 929–932, 2006.
- DURANGO, A.M.; SOARRES, N.F.F.; BENEVIDES, S.; TEIXERIA, J.; CARVALHO, M.; WOBETO, C.; ANDRADE, N.J. Development and evaluation of an edible antimicrobial films based on yam starch and chitosan. **Packaging Technology & Science**, vol. 19, p. 55–59, 2006.

DUTTA, J.; TRIPATHI, S.; DUTTA, P.K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. **Food Science and Technology International**, vol. 18, n. 1, p. 3–34, 2011.

ELIASSON, A.C. **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker, 1996. 561p.

EMIROĞLU, Z.K.; YEMIŞ, G.P.; COŞKUN, B.K.; CANDOĞAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, vol. 86, p. 283–288, 2010.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; ANDPAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**. vol. 22, p. 896–902, 2011.

ESTEVEZ, M.; RAMIREZ, R.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Sage and Rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. **Lebensm Wiss Technology**, vol. 40, n. 1, p. 58-65, 2007.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, vol.9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FASSEAS, M.K.; MOUNTZOURIS, K.C.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; ZERVAS, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, vol. 106, n. 3, p. 1188-94, 2007.

FENNEMA, O.R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. **Química de alimentos de Fennema**. 4ª. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; LAGARON, J.M.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; OCIO, M.J. Characterization of antimicrobial properties on the growth of *S. aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 124, p. 13–20, 2008.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; OCIO, M.J.; LAGARON, J.M. Antibacterial chitosan-based blends with ethylene vinyl alcohol copolymer. **Carbohydrate Polymers**, vol. 80, n. 3, p. 874–884, 2010.

FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A. de; PETTINELLI, M. L. C. de V.; SILVA, M. A. A. P. da; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. de M. Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. **Manual: série qualidade**. Campinas, SBCTA, 2000. 127p.

FISHIMAN, M.L.; COFFIN, B.R.; KONSTANCE, C.I.; ONWULATA. Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. **Carbohydrate Polymers**, vol.41, p. 317-325, 2000.

GÓMEZ-ESTACA, J.; MONTERO, P.; GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLEN, M. C. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbiologic and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, vol. 105, p. 511–520, 2007.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LACEY, A. L.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, vol. 18, p. 46-52, 2009.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ DE LACEY, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatin chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, vol.27, p. 889-896, 2010.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, vol. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.

GRANDA-RESTREPO, D. M.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z. Migration of a-tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. **Food Research International**, vol. 42, p. 1396–1402, 2009.

GRIFFIN, S.G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 12, p. 249-255, 2000.

GUERREIRO, M. S.F.B. da E. **Estudo da microbiota de um produto cárneo cozido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011. 83 p.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. *In Food packaging and preservation: theory and practice* (Ed M. Mathlouthi), p. 371-394. London, UK: Elsevier Applied Science Publishing Co. 1986.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 5, p. 489–499, 2012.

HAN, J.H. Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. In Gennadios, A. **Protein-based Films and Coatings**. Boca Raton: Flórida, CRC Press, p. 485 – 499, 2002.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes a proliferação de micro-organismos em alimentos. *Revista Brasil Alimentos*, vol. 9, p. 23-30, 2001.

HORN, M. M. **Blendas e filmes de quitosa/amido: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – São Carlos, 2012. 147 p.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, vol. 3 (article 12), 2012.

IFT - INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. *Food Technology*, vol. 35, n. 11, p. 50-57, 1981.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JIN, J.; LI, Z.; ZHANG, F. Scavenging function of mulberry vinegar extractives for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, vol. 34, n. 3, p. 135–137, 2006.

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M.; BARRETO, G. P. de M.; MERCADANTE, A. Z.; ROSA, P. de T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. *Química Nova*, vol. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

KADER, A. A. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 28, p. 1-30, 1989.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 10, p. 813-829, 2003.

KALODERA, Z.; PEPELJNAK, S.; BLAZEVIC, N.; PETRAK, T. Chemical composition and microbial activity of *Tanacetum parthenium* essential oil. **Pharmazie**, vol. 52, p. 885-886, 1995.

KAMIL, J.Y.V.A.; JEON, Y.J., SHAHIDI, F. Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). **Food Chemistry**, vol. 79, p. 69-77, 2002.

KANATT, S.R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Effect of irradiated chitosan on the rancidity of radiation processed lamb meat. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 39, p. 997-1003, 2004.

KANATT, S.R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, vol. 107, p. 845–852, 2008.

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

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, vol. 40, n. 12, p. 47-59, 1996.

KONG, M.; GUANG, C.X.; XING, K.; JIN, P.H. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, vol. 51, n. 2, p. 60-74, 1997.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers of marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, vol. 8, p. 203-226, 2006.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, vol.91, p. 453–462, 2001.

LAWTON, J. W. Effect of starch type on the properties of starch containing filmes. **Carbohydrate Polymers**, vol. 29, p. 203-208, 1996.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; GÓMEZ-ESTACA, J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.; PILAR HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, vol. 131, p. 1376–1384, 2012.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; GARCÍA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKI, N.E. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, vol.19, n. 1, p. 157-164, 2005.

MALI, S.; DEBIAGI, F.; GROSSMANN, M. V.E.; YAMASHITA, F. Starch, sugarcane bagasse fibre, and polyvinyl alcohol effects on extruded foam properties: A mixture design approach. **Industrial Crops and Products**, vol. 32, p. 353–359, 2010.

MARANGONI, C. Avaliação da capacidade antimicrobiana do óleo de *Salvia officinalis* L. aplicado em salame italiano. **E-Tech: tecnologias para a competitividade industrial**, vol. 4, n. 1, p. 32-41, 2011.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família *Lamiaceae*. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, vol. 68, n. 1, p. 1-11, 2009.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. 220p.

MARTINS, L. L., SANTOS, I. F., FRANCO, R. M., OLIVEIRA, L. A. T., BEZZ, J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo hot dog comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, vol. 67, n. 3, p. 215-220, 2008.

MEIRELES, C. da S. **Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, e blendas de acetato de celulose com poliestireno**

de copos plásticos descartados. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2007. 67 p.

MELO, A. A. M. de. **Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010. 68 p.

MORGADO, D.L.; SATO, B.; EL SEOUD, O.A.; FROLLINI, E. Biofilmes a partir de acetatos de celulose reforçados com celulose de linter de algodão. **Anais**, 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009.

MOTA, R.D.P. **Elaboração e caracterização de filmes biodegradáveis através de blenda polimérica de amido de Lírio-do-Brejo (*Hedychium coronarium*) e de amido de Fruto-do-Lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hill.** Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Universidade Estadual de Goiás, 2010. 116 p.

MREMA, N.; MPUCHANE, S.; GASHE, B. A. Prevalence of Salmonella in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana. **Food Control**, vol. 17, p. 207-212, 2006.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J.L.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect? **Food Microbiology**. vol. 22, n. 4, p. 391-398, 2005.

NEDI, I.; OLIVIERO, M.; SANSONE, L.S. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 22, p. 72-80, 2011.

OLIVEIRA, A. B.; PAULA, C. M.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, Principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista do HCPA e Faculdade de Medicina da UFRGS**, vol. 30, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA Jr., A.R. **Obtenção e caracterização de acetato de celulose modificado com organossilano.** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002. 96 p.

OLIVEIRA, L. M. Filmes plásticos incorporados de agentes antimicrobianos. **Informativo CETEA: Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, vol. 14, n. 2, p. 1-4, 2002.

OLIVEIRA, A.C. de; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TERVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, vol. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC: Ed. Do Autor, 2006. Cap. 44, p. 533-542.

ORDOÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos**. Vol. 2 - Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

OSAWA, C.C., FELÍCIO, P.E., GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n.4, p. 655-663, 2005.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 37, p. 155-162, 1997.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 5598-5605, 2004.

OZKECECI, R.B.; KARAKAYA, M.; YILMAZ, M.T.; SARICOBAN, C.; OCKERMAN, H.W. The effect of carcass part and packaging method on the storage stability of mechanically deboned chicken meat. **Journal of Muscle Foods**, vol. 19, n. 3, p. 288-301, 2008.

PAN, I.F.; CABALLERO, J.I.M. Películas y recubrimientos comestibles como herramienta emergente para la industria alimentaria. In **Los retos actuales de la industria alimentaria**. Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz, p. 27-49, 2011.

PARZANESE, M. Películas y recubrimientos comestibles. www.alimentosargentinos.gob.ar
Acesso em 08 de dezembro de 2012.

PAULI, A.; KUBECZKA, K. H. Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. **Natural Products Communications**, v.5, p. 1387-1394, 2010.

PELEG, H.; BODINE, K.K.; NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, vol. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PELLISSARI, F. M. **Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol com incorporação de óleo essencial de orégano**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009. 124 p.

PEN, L. T.; JIANG, Y. M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, vol. 36, n. 3, p. 359-364, 2003.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R. COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICOLLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências e Agrotecnologia**, vol.30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, vol. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PIRES, A.C. dos S.; SOARES, N. de F.F.; ANDRADE, N.J. de; SILVA, L.H.M. DA; CAMILLOTO, G.P.; BERNARDES, P.C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology and Science**, vol. 21, p. 375–383, 2008.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT – Food Science and Technology**, vol. 38, p. 859-865, 2005.

QUINTERO, R. I.; GALOTTO, M. J.; GUARDA, A.; RODRÍGUEZ, F. J.; BRUNA, J.E. Preparation and characterization of cellulose acetate butyrate/organoclay nanocomposite with antimicrobial activity. **Anais**, Foz do Iguaçu: IUFOST, 2012.

RAMPELOTTO, C. **Pasteurização de salsichas com ultrassom e micro-ondas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012. 81 p.

RAO, M.S.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Radiation processed chitosan a potent antioxidant. **Barc Newsletter**, vol. 273, p. 188-194, 2006.

RIGO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, campus de Erechim, 2006. 130 p.

ROGERS, C. E.; **Permeation of gases and vapors in polymer**, 4th ed., Elsevier Appl. Sci. Publ.: London, 1985. p. 11-73.

ROJAS, A. T. **Guía de procesos para la elaboración de productos cárnicos** (5 ed.). Bogotá: Siglo Del Hombre Editores S.A, 32 p., 2003.

ROJAS, I.M. **Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas em zeína**. Trabajo Fin de Carrera (Ingeniero Agrícola en Industrias Agrarias y Alimentarias) – Departamento de Química Aplicada – Universidad Publica de Navarra, 2010. 171 p.

ROOS, Y. Characterization of food polymers using state diagrams. **Journal of Food Engineering**, vol. 24, n. 3, p. 339-360, 1995.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, p.10205–10214, 2006.

SÁNCHEZ, A.A.; ESPINOSA, M.E.; VÁSQUEZ, E.N.O.; CAMBEROS, E.P.; VÁSQUEZ, R.S.; CARVANTES, E.L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 50, p. 585-590, 2010.

SANTURIO, D.F.; COSTA, M.M.; MABONI, G.; CAVALHEIRO, C.P.; SÁ, M.F.; POZZO, M.D.; ALVES, S.H.; FRIES, L L.M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Revista Ciência Rural**, vol. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. 1. ed. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. 267p.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SHAHIDI, F. **Natural Antioxidants - Chemistry, Health Effects and Applications**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1997. 414 p.

SHAHIDI, F.; KAMIL, J.; JEON, Y. J. Antioxidant role of chitosan in a cooked cod (*Gadus morhua*) model system. **Journal of Food Lipids**, vol. 9, n 1, p. 57–64, 2002.

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

SILVA, J.P.L.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PEREZ, D.V.; FRANCO, B.D.G. DE M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à *Salmonella enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.30, p. 136-141, 2010.

SILVEIRA, M.F.A. **Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005. 64 p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G.; MELLO, J.C.P. DE; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 1102 p.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources – A review. **Food Chemistry**, vol. 81, p. 219-231, 2003.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**, vol. 26, p. 118–122, 1998.

SMITH, W.F. **Princípios de ciência e engenharia dos materiais**. 3ª ed. Portugal: McGrall-Hill, 1998.

SOARES, N. de F.F.; PIRES, A.C. dos S.; ENDO, É.; VILELA, M. A. P.; SILVA, A.F. da; FONTES, E. A. F.; MELO, N.R. de. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo na conservação de batata minimamente processada. **Revista Ceres**, vol.53, n. 307, p. 387-393, 2006.

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

SOBRAL, P. J. do A.; OCUNO, D. Permeabilidade ao vapor de água de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de carne. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 3, n. 3, p. 11-16, 2000.

SOBRAL, P.J.A; GARCIA, F.T; HABITANTE, A. M. Q. B; MONTERREY- QUINTERO, E. S. Propriedades de filmes comestíveis produzidos com diferentes concentrações de plastificantes e de proteínas do músculo de tilápia-do-nilo. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 39, n. 3, p. 255-262, 2004.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J.M. Plasticizers in edible films and coatings. In **Innovations in Food Packaging**. Academic Press. 403-433 p., 2005.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Electronic Journal of Biotechnology**, 10(1), Disponível em:

<<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue1/full/1/>> (2007) Acesso em: 17 de novembro de 2012.

TAWFIK, M.S.; HUYGHEBAERT, A. Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. **Food Chemistry**, vol. 64, p. 451- 459, 1997.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N.R.; NOGUEIRA, J.M.F.; SARAIVA, J.A.; NUNES, M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidante properties of comercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, vol. 43, p. 587-595, 2013.

TEIXEIRA, L.V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista Instituto Laticínios “Cândido Tostes”**, vol. 366, n. 64, p. 12-21, 2009.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinos, 1998. 216 p.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 14, p. 71-78, 2003.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, vol. 89: 549–554, 2005.

TOVAR, L.; SALAFRANCA, J.; SÁNCHEZ, C.; NERÍN, C. Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, p. 5270-5275, 2005.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Microbiology**, vol. 64, n. 3, p. 373-378, 2001.

VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, vol. 58, p. 245-266, 2004.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos cárnicos: química y microbiología**. Zaragoza, Espanha: Editora Acribia, S.A., 1998. 423 p.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; VAN BEEST, M.; DEVEBERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 10, p. 77-86, 1999.

VICENTINI, N.M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu/SP, 2003. 198 p.

VILLADIEGO, A.M.D.; SOARES, N.F.F.; ANDRADE, N.J.; PUSCMANN, R.; MINIM, V.P.R.; CRUZ, R. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, vol. 52, p. 221-244, 2005.

VILPOUX, O.; AVEROUS, L. Plásticos a base de amido. In **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, Vol. III, Cap. 18, p. 499 – 529. 2004.

WALSH, S.E.; MAILLARD J.-Y.; RUSSELL, A.D.; CATRENICH, C.E.; CHARBONNEAU, D.L., BARTOLO, R.G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 94, p. 240-247, 2003.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; CHANG, Y.K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

YADAV, A.V.; BHISE, S.B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, vol. 87, n. 9, p.1176-1178, 2004.

YASIN, N.M.N.; ABOU-TALEB, M. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, vol. 2, n. 1, p. 01-09, 2007.

YINGYUAD, S.; RUAMSIN, S.; REEKPRKHON, D.; DOUGLAS, S.; PONGAMPHAI, S.; SIRIPATRAWAN, U. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. **Packaging Technology and Science**, vol. 19, p. 149–157, 2006.

ZHENG, L.Y.; ZHU J.F. Study of antimicrobial activity of chitosan with different molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, vol. 54, n. 4, p. 527–530, 2003.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALECRIM, CRAVO-DA-ÍNDIA, ORÉGANO E SÁLVIA

Mariane L. Ugalde^{a,b}, Aline M. de Cezaro^b, Aline Cenci^b, Rogério L. Cansian^b, Geciane Toniazzo^b, Juliana Steffens^b

^a Instituto Farroupilha Federal - Campus Júlio de Castilhos – São João do Barro Preto s/n - Caixa Postal 38 - CEP 98130-000 – Júlio de Castilhos – RS, Brasil.

^b URI Erechim, Departamento de Ciências Agrárias, Av. Sete de Setembro, 1621- CEP 99700-000, Erechim – RS, Brasil.

RESUMO - O presente trabalho objetivou determinar a composição química, atividade antibacteriana e antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia sclarea*). Os compostos voláteis majoritários identificados foram acetato de bornila (39,64 %), eugenol (89,58 %), carvacrol (60,71 %) e linalol (39,26 %) nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia, respectivamente. No teste de difusão em ágar, o OE de orégano apresentou os maiores halos de inibição, embora não tenha sido efetivo frente à bactéria *Klebsiella pneumoniae*. O OE de cravo-da-índia apresentou ação sobre todas as bactérias testadas, com a maior atividade observada (33,33 mm) sobre *K. pneumoniae*. Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o OE de orégano obteve os melhores desempenhos sendo efetivo frente a todos os micro-organismos avaliados, atingindo uma média de 0,016 mg.mL⁻¹ para bactérias Gram-positivas e 0,020 mg.mL⁻¹ para Gram-negativas. À partir dos parâmetros Atividade Antioxidante (AA) (%) e IC₅₀ obtidos utilizando-se o teste DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), pode-se concluir que o OE de cravo-da-índia tem excelente potencial para ser utilizado como antioxidante, com IC₅₀ de 11,79 µg.mL⁻¹. Os OEs de orégano e alecrim, apesar de apresentarem AA (%) e IC₅₀ menores, tem potencial como antioxidantes naturais. Da combinação binária dos OEs de cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1, obteve-se uma melhora na CIM do óleo de cravo-da-índia e do IC₅₀ de ambos os óleos puros. Os resultados demonstraram potencial antibacteriano e antioxidante dos OEs de orégano e cravo-da-índia.

Palavras – chave: atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, óleos essenciais.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos aromáticos e voláteis extraídos de componentes das plantas como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e da planta inteira (Sanches et al., 2010). São considerados metabólitos secundários das plantas, tendo função relevante na sua defesa, atuando como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Embora a indústria de alimentos os utilize principalmente como aromatizantes, os mesmos representam uma fonte antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos. No Brasil, OEs e extratos estão compreendidos dentro da classe de aditivos como aromatizantes naturais. No entanto, excluem-se do regulamento da ANVISA, as matérias de origem vegetal ou animal que possuam propriedades aromatizantes intrínsecas, quando não são utilizadas exclusivamente como fonte de aromas (ANVISA, 2012).

Os OEs são constituídos por diversos compostos orgânicos de baixo peso molecular, com atividades biológicas distintas, podendo ser divididos em três grupos de acordo com a sua estrutura química: terpenos, terpenóides, fenilpropenos e outros (Hyldgaard et al., 2012). Devido ao caráter hidrofóbico dos OEs e seus componentes, os mesmos ligam-se aos lipídios da membrana celular microbiana, modificando sua estrutura o que ocasiona alterações na sua permeabilidade, levando à morte da célula. A atividade antioxidante dos OEs está relacionada principalmente com a presença de compostos fenólicos. Juntos, os diferentes compostos presentes nos OEs produzem um arranjo de antioxidantes que pode agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (Shahidi, 1997).

Os OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia possuem atividades antimicrobiana e antioxidante descritas na literatura (Angioniet al., 2004, Burt, 2004; Chenet al., 1992; Oliveira, 2009; Scherer et al., 2005; Duke, 1994; Fasseas et al., 2007). Entretanto, existem poucos trabalhos comparando estes efeitos, principalmente com OEs comerciais, os quais podem mais facilmente serem utilizados na indústria de alimentos.

Em virtude da importância da busca de antimicrobianos e antioxidantes naturais com aplicação na indústria de alimentos, o presente trabalho objetivou determinar comparativamente a composição química, atividade antibacteriana e antioxidante *in vitro* de OEs comerciais de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a determinação da composição química, atividades antibacterianas e antioxidantes *in vitro* foram utilizados OEs comerciais (Ferquima[®]) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo-da-índia botão (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia sclarea*).

2.1 Composição química

Amostras dos OEs em estudo foram preparadas pela sua diluição em hexano (Merck[®]) (10.000 mg/mL). Para identificação dos compostos voláteis dos óleos essenciais foram realizadas análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Shimadzu QP5050 A), usando uma coluna capilar DB-WAX (30m, 0,25mm, 0,25 μ m). A temperatura da coluna foi programada a 50 °C por 3 minutos, aumentando 5 °C/minutos a 130 °C e depois 1 °C/minutos a 210 °C por 5 minutos. Hélio foi usado como gás de arraste e as temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C. Este dispositivo operou com uma taxa de fluxo de 1 mL/minuto com um impacto eletrônico de 70eV e no modo split (razão split 1:3). O volume injetado foi de 1,0 μ L. Os picos foram integrados de modo manual, sendo os compostos identificados pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroteca Willey 330.000 e pela comparação dos tempos de retenção de compostos padrões (eugenol e linalol). Adotou-se um percentual mínimo de 90% de similaridade entre os espectros de massa dos compostos das amostras e da biblioteca do equipamento para identificação dos mesmos.

2.2 Atividade antibacteriana

Foram selecionados doze micro-organismos para a análise da atividade antibacteriana, sendo eles bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644)) e Gram-negativas (*Aeromonas* sp. (micro-organismo obtido a partir do Instituto Biológico, Campinas – São Paulo), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 107008), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933)), crescidos previamente em meio Lúria Bentani (LB) (10 g.L⁻¹ de tripton, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl) durante 24 horas a 36 \pm 1°C.

Para avaliar a atividade antimicrobiana pela formação de halo de inibição, empregou-se placas de Petri, com meio de cultura Ágar Müeller-Hinton (Merck®) e discos de papel Whatmann nº3, com 7 mm de diâmetro (Silvestri et al., 2011). As culturas das bactérias foram inoculadas por espalhamento nas placas com auxílio de uma alça de Drigalski, num volume de 200 µL (10^8 UFC.mL⁻¹). Para cada micro-organismo e óleo testado, foi preparada uma placa na qual foram depositados três discos com o volume a ser testado (5, 10 ou 15 µL de óleo puro), um disco controle negativo (branco) e um disco controle positivo (30 µg do antibiótico cloranfenicol). Estes volumes foram determinados à partir de testes prévios, sendo que o volume máximo de OE usado foi o que o disco de papel absorveu sem transbordar. Após a incubação das placas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas, os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel.

Os resultados foram expressos em milímetros pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições (por volume utilizado), sendo as médias submetidas a Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa ASSISTAT®.

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o método indireto de crescimento bacteriano, mediante a densidade ótica em meio de cultura líquido (Pierozan et al., 2009). Após os resultados obtidos das análises do antibiograma em meio sólido, onze bactérias selecionadas foram cultivadas em meio de cultura caldo LB à temperatura de 37°C durante 24 horas. A bactéria *E. faecalis* não foi utilizada nesta etapa tendo em vista a impossibilidade de reativação da mesma. Após o período de crescimento das culturas, foram inoculados, em micro tubos (eppendorf) 10 µL de pré-inóculo (10^8 UFC.mL⁻¹), 1 mL de caldo LB, acrescido de 1% do emulsificante dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear®), contendo diferentes concentrações dos OEs (0,01 a 2,5 mg.mL⁻¹) e o controle, sem óleo essencial. Todas as concentrações de cada OE, com as diferentes bactérias, foram avaliadas em triplicata. Posteriormente ao processo de inoculação, os micro tubos foram incubados em agitador eletromagnético (60 Hz), por um período de 24 horas, em sala climatizada à temperatura de 32°C . Antes e após o período de incubação, 0 e 24 horas respectivamente, foram transferidas alíquotas de 100 µL da cultura bacteriana para microplacas de fundo chato, realizando-se três leituras para cada repetição.

Ocorreram problemas de turbidez da amostra apenas com o OE de orégano na concentração de 2,5 mg.mL⁻¹, a qual não pode ser utilizada.

Para avaliar o crescimento bacteriano (densidade ótica) e para determinar a CIM do OE sobre determinada bactéria, realizou-se a leitura da microplaca, utilizando-se o leitor automático de microplacas (Bio-Tec Instruments Inc., modelo EL800), acoplado em computador com programa Kcjunior, com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. A inibição do crescimento foi determinada pela diferença entre as leituras realizadas em 24 e 0 horas. Os valores médios de densidade ótica foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), para determinar a CIM, usando o programa ASSISTAT®.

2.3 Atividade antioxidante pela captura de radicais livres com o teste de DPPH

A metodologia para avaliação da atividade antioxidante, baseada na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm, foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico (Kulisic et al., 2004). A técnica consistiu na incubação, por 30 minutos, de 500 μL de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM, com 500 μL de soluções, contendo concentrações crescentes dos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia (1,0; 2,5; 7,5; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500; 750 e 1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em etanol. Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada “controle”, substituindo-se, 500 μL da amostra por 500 μL de etanol. A solução denominada “branco” foi preparada com as soluções em diferentes concentrações dos OEs e etanol, sem DPPH. O composto antioxidante BHT (butil-hidroxi-tolueno) foi utilizado como controle positivo.

O percentual de captura do radical DPPH foi calculado em termos da percentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 1.

$$AA\% = 100 - \{[(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100] \div \text{Abs. controle}\} \quad (1)$$

A concentração de OE necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC_{50}) foi calculada por análise de regressão linear dos pontos plotados graficamente (Carbonari, 2005). Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas das triplicatas realizadas para cada uma das concentrações. O poder antioxidante foi calculado de acordo com a equação da curva da atividade antioxidante, onde Y é substituído por 50 e x representa o valor do IC_{50} . Os resultados foram expressos pela média aritmética dos valores obtidos nas três repetições, sendo as médias analisadas estatisticamente por Análise de Variância

(ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa ASSISTAT®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química

A composição química dos OEs é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/micro-organismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita (Morais, 2009).

Várias publicações têm apresentado dados sobre a composição química de diferentes OEs, podendo compreender mais de sessenta componentes individuais (Burt, 2004). Os compostos majoritários podem constituir até 85 % do OE, ao passo que outros estão presentes apenas como elementos traço, tendo estes últimos um papel fundamental a desempenhar nas atividades biológicas, possivelmente produzindo um efeito sinérgico entre os demais componentes (Bauer et al., 2001; Sánches et al., 2010). Os teores dos principais componentes encontrados nos OEs avaliados, incluindo a combinação binária 1:1 dos OEs de cravo-da-índia e orégano, determinados através da análise por CG-EM, estão apresentados na Tabela 1.

Pesquisas relatam o isolamento e identificação de diferentes compostos com atividade antioxidante e antimicrobiana presentes no OE de alecrim, o qual é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3- octanona e acetato de isobornila, dentre outros compostos (Alonso Junior, 1998). No presente estudo, foi identificado como composto majoritário o acetato de bornila (39,64 %) (Tabela 1). Dafedera et al. (2000) e Pintore et al. (2002) identificaram para o OE de alecrim, percentuais que variaram entre 3-89 % de acetato de bornila, 2-25 % de 1,8 – cineol, 2-14 % de cânfora e 2-25 % de α -pineno.

O OE de cravo-da-índia apresentou o fenilpropeno eugenol como composto volátil majoritário (89,58 %) (Tabela 1), sendo que resultado semelhante foi obtido por Silvestri et al., (2010) com o eugenol representando 90,3 % dos compostos voláteis. Arenas et al. (2011)

analisaram OE de cravo-da-índia, o qual teve o eugenol como principal componente, mas em percentagens menores (60,5 %).

O monoterpênóide fenólico carvacrol foi o componente majoritário encontrado no OE de orégano (60,71 %) (Tabela 1), o qual apresenta conhecida atividade antimicrobiana (Burt, 2004). Silva et al., (2010) avaliaram OEs de orégano de cinco marcas comerciais distintas, sendo que todos os cromatogramas apresentaram um único grande pico em um mesmo tempo de retenção que, comparado a um padrão, foi identificado como carvacrol, em percentagens que variaram entre 61,7 e 93,4 % do total de voláteis detectados em cada óleo. Percentuais bem inferiores de carvacrol (11,67 %) foram encontrados por Bussata et al., (2007) avaliando OE de orégano obtido a partir de folhas oriundas do Chile.

Tabela 1 – Principais compostos voláteis (% de área) encontrados nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano, sálvia e cravo-da-índia/orégano 1:1.

Composto	I.K.*	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Cravo-da-índia (botão) (<i>Eugenia caryophyllata</i>)	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Sálvia (<i>Salvia sclarea</i>)	Orégano / Cravo-da-índia 1:1
<i>p</i> -cimeno	1026	-	-	10,06	-	2,98
1,8 cineol	1033	22,52	-	-	0,25	-
γ -terpineno	1062	-	-	6,73	-	3,34
Linalol	1098	-	-	3,57	39,26	1,73
Cânfora	1143	16,72	-	0,94	0,15	2,03
α -terpineol	1189	7,21	1,12	0,54	16,14	1,03
Acetato de linalila	1257	-	7,75	-	26,17	2,22
Acetato de bornila	1285	39,64	-	-	-	-
Timol	1290	-	-	4,50	-	2,79
Carvacrol	1298	-	-	60,71	-	15,39
Eugenol	1356	-	89,58	-	-	56,42
Acetato de geraniol	1383	-	-	-	1,65	-
Trans-cariofileno	1404	-	-	4,35	1,67	3,80
Total (%)		86,10	98,45	91,40	85,29	91,73

I.K.* = índice de Kováts tabelado (Adams, 2007).

O OE de sálvia teve como composto volátil principal o linalol (39,26 %) (Tabela 1). Povh e Ono (2007) avaliaram a composição química do OE de sálvia e obtiveram como compostos majoritários 1,8-cineol, α -tujona, β -tujona, cânfora, borneol e α -humuleno.

Pierozan et al., (2009) determinaram a composição química de diferentes espécies de sálvia, sendo que os compostos voláteis majoritários obtidos foram o α -tujona (40,37 %) na *Salvia officinalis*, β -tujona (19,96 %) na *S. lavandulifolia*, linalol (29,36 %) na *S. sclarea* e α -tujona (22,39 %) na *S. triloba*.

3.2 Atividade antibacteriana

Os valores médios obtidos na difusão em ágar (mm) estão apresentados na Tabela 2. O OE de cravo-da-índia apresentou ação sobre todas as bactérias testadas, com a maior atividade observada (33,33 mm) sobre *K. pneumoniae*. O OE de cravo-da-índia apresentou acentuada atividade antimicrobiana, quando testado para os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *C. jejuni*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* e *S. epidermidis* (Scherer et al., 2005).

A bactéria *K. pneumoniae* mostrou-se não sensível ao OE de orégano, sendo a maior atividade observada sobre *S. mutans* (47,33 mm). Busatta et al., (2007) obtiveram halos médios de 19,5 mm do OE de orégano frente a *K. pneumoniae*. Segundo Martino et al., (2009) o OE de orégano mostrou ação principalmente contra as bactérias Gram-positivas, entre as quais *S. epidermidis* foi a mais inibida. Entre as bactérias Gram-negativas, apenas *E. coli* foi inibida pelo óleo. Sahin et al., (2004) avaliando OEs de plantas de orégano oriundas da Turquia, utilizando 10 μ L por disco, também não obteve ação do mesmo frente a bactéria *K. pneumoniae*.

O OE de alecrim não apresentou ação sobre *P. aeruginosa*, quando utilizado o volume de 5 μ L, tendo a maior atividade sobre *K. pneumoniae* (31,33 mm). Foi observada alta sensibilidade de bactérias Gram-positivas aos OEs de alecrim e sálvia, provenientes do Egito, incluindo *S. aureus*, *Micrococcus* sp. e *Sarcina* sp., bem como a levedura *S. cerevisiae*. Entretanto, nenhum ou muito pouco efeito foi verificado contra as bactérias Gram-negativas *P. fluorescens*, *E. coli* e *S. marcescens* (Frag et al., 1989).

O OE de sálvia apresentou o menor desempenho dentre os óleos testados, com atividade apenas sobre *S. choleraesuis*, entre as espécies Gram-negativas. Pozzo et al. (2011), avaliando a atividade antimicrobiana de OEs de condimentos frente a *Staphylococcus* spp., não verificaram atividade antibacteriana dos OEs de gengibre, manjeriço, alecrim e sálvia. De modo contrário a esses autores, Delamare et al. (2007), observaram atividade do OE de sálvia frente a alguns isolados de *Staphylococcus* spp..

Houve uma tendência de aumento na eficiência dos OEs à medida que se aumentou o volume usado de 5 para 15 μL , mas tal efeito não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$) para todos os micro-organismos e OEs testados (Tabela 2).

Embora haja exceções na literatura, em geral os OEs são mais efetivos contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas, o que pode ser atribuído à maior complexidade da dupla parede celular destas (Burt, 2004). Tal fato pôde ser observado nos OEs de orégano e sálvia testados no presente estudo, para todas as concentrações utilizadas. O OE de cravo-da-índia apresentou comportamento semelhante frente às bactérias Gram-positivas e negativas, enquanto que o OE de alecrim foi mais efetivo frente às Gram-negativas.

Cristani et al., (2007) relataram a eficácia antimicrobiana de quatro monoterpenos (timol, carvacrol, p -cimeno e γ -terpineno) frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *E. coli*, levando em conta os danos causados sobre biomembranas. Ficou evidente que o efeito antimicrobiano destes compostos é resultado, ao menos parcialmente, de uma alteração da fração lipídica da membrana plasmática dos micro-organismos. Além disso, os compostos podem atravessar as membranas celulares, penetrando assim para o interior da célula, interagindo com os locais críticos para a atividade bacteriana (Burt, 2004).

Tabela 2 - Halos médios (em mm)* obtidos pelo método de difusão em ágar dos OEs (5, 10 e 15 µl) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia sclarea*) frente Bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Bactérias	Halo de inibição OE Cravo da Índia (mm)**			Halo de inibição OE Orégano (mm)**			Halo de inibição OE Alecrim (mm)**			Halo de inibição OE Sálvia (mm)**		
	5 µL	10 µL	15 µL	5 µL	10 µL	15 µL	5 µL	10 µL	15 µL	5 µL	10 µL	15 µL
Gram-positivas												
<i>E. faecalis</i>	11,0±1,0 ^a	11,33±0,58 ^a	11,33±1,15 ^a	15,33±0,58 ^c	19,67±0,58 ^b	23,33±0,58 ^a	9,0±1,0 ^a	9,67±0,58 ^a	11,33±1,53 ^a	23,33±1,53 ^b	27,00±0 ^a	29,0±1,73 ^a
<i>M. luteus</i>	18,62±0,58 ^c	25,33±0,58 ^b	27,67±0,58 ^a	NS	9,33±0,58 ^b	11,0±0 ^a	8,67±0,58 ^c	10,0±0 ^b	11,33±0,58 ^a	NS	NS	NS
<i>L.monocytogenes</i>	13,67±1,15 ^b	15,0±0 ^{ab}	17,33±1,15 ^a	11,67±1,53 ^c	17,33±0,58 ^b	23,0±1,0 ^a	9,0±0 ^a	9,33±0,58 ^a	10,67±1,15 ^a	10,67±0,58 ^b	13,00±1,0 ^{ab}	15,0±1,73 ^a
<i>S. aureus</i>	17,0±1,0 ^b	19,33±0,58 ^b	23,67±1,15 ^a	26,67±0,58 ^b	30,33±0,58 ^a	31,0±0 ^a	8,33±1,15 ^a	9,0±0 ^a	10,0±1,0 ^a	16,67±1,15 ^c	23,67±1,53 ^b	27,0±0 ^a
<i>S. epidermidis</i>	11,0±1,0 ^c	13,0±0 ^b	15,33±0,58 ^a	28,33±1,15 ^c	32,33±1,15 ^b	37,33±1,15 ^a	8,67±0,58 ^b	11,0±1,73 ^{ab}	12,67±1,53 ^a	10,67±1,15 ^b	13,00±1,0 ^{ab}	15,0±2,0 ^a
<i>S. mutans</i>	11,33±0,58 ^b	13,67±0,58 ^a	14,0±1,0 ^a	27,0±1,0 ^c	37,67±2,08 ^b	47,33±1,15 ^a	9,0±0 ^b	10,33±0,58 ^{ab}	12,0±1,73 ^a	NS	NS	NS
Média	13,77	16,28	18,22	18,17	24,44	28,83	8,78	9,89	11,33	10,22	12,78	14,33
Gram-negativas												
<i>Aeromonas</i> sp.	11,0±1,0 ^a	13,0±0 ^a	13,0±1,0 ^a	18,67±0,58 ^c	25,33±1,53 ^b	30,0±1,73 ^a	13,33±2,05 ^a	15,0±1,41 ^a	17,0±1,41 ^a	NS	NS	NS
<i>E. coli</i>	13,0±1,73 ^b	15,0±1,0 ^{ab}	16,67±1,15 ^a	17,0±1,0 ^a	17,0±1,0 ^a	19,33±1,53 ^a	12,67±0,94 ^b	16,67±1,25 ^a	19,33±1,25 ^a	NS	NS	NS
<i>K. pneumoniae</i>	25,0±0 ^b	27,33±0,58 ^b	33,33±1,53 ^a	NS	NS	NS	18,67±0,94 ^b	21,33±0,47 ^b	31,33±1,25 ^a	NS	NS	NS
<i>P. aeruginosa</i>	11,0±1,0 ^b	15,0±0 ^a	15,0±1,0 ^a	9,0±1,0 ^b	11,0±1,0 ^{ab}	12,67±1,15 ^a	NS	9,0±0 ^b	10,67±0,47 ^a	NS	NS	NS
<i>P. mirabilis</i>	11,0±0 ^b	13,33±0,58 ^b	17,67±1,53 ^a	24,67±1,53 ^b	27,0±0 ^{ab}	30,67±2,52 ^a	10,67±0,47 ^c	13,67±0,94 ^b	19,33±1,25 ^a	NS	NS	NS
<i>S. choleraesuis</i>	13,33±0,58 ^b	14,67±0,58 ^a	15,0±0 ^a	12,67±1,15 ^b	13,0±1,0 ^b	17,67±1,53 ^a	13,0±0 ^b	15,33±1,25 ^b	18,67±0,94 ^a	8,0±0 ^a	8±1,0 ^a	9,33±1,15 ^a
Média	14,05	16,39	18,44	13,67	15,55	18,39	11,39	15,17	19,39	1,33	1,33	1,55

NS = não sensível; * média das triplicatas, incluindo o diâmetro de 7 mm do disco de papel ** Médias seguidas da mesma letra na mesma linha para o mesmo OE, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A metodologia dos discos tem como importância maior fornecer dados iniciais da ação antimicrobiana de produtos naturais, pela facilidade e rapidez de execução (Klancnik et al., 2010). Porém, considera-se fundamental a continuidade dos estudos para obtenção de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), o que foi realizado na segunda parte desta pesquisa.

Na avaliação dos resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM), observou-se que o OE de orégano apresentou o melhor desempenho dentre os óleos testados, sendo efetivo frente a todos os micro-organismos avaliados (Tabela 3), atingindo uma média de 0,016 mg.mL⁻¹ para bactérias Gram-positivas e 0,020 mg.mL⁻¹ para Gram-negativas. Busatta et al., (2007), avaliando a atividade antimicrobiana *in vitro* do OE de orégano, encontrou valores médios para a CIM de 0,46 mg.mL⁻¹, ou seja, um desempenho bem inferior ao encontrado no presente estudo.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) do OE de orégano (*Origanum vulgare*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e mistura de orégano e cravo-da-índia (1:1).

Bactérias gram-positivas	CIM mg.mL ⁻¹		
	Orégano	Cravo-da-índia	Orégano/cravo 1:1
<i>Micrococcus luteus</i>	0,010	0,5	0,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,025	0,75	0,075
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,010	0,75	0,075
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,010	0,75	0,025
<i>Streptococcus mutans</i>	0,025	0,75	0,5
Média	0,016	0,7	0,23
Bactérias gram-negativas	CIM mg.mL ⁻¹		
<i>Aeromonas sp.</i>	0,010	0,75	0,5
<i>Escherichia coli</i>	0,025	0,75	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,025	0,1	0,075
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,025	0,75	0,075
<i>Proteus mirabilis</i>	0,025	0,5	0,075
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0,010	0,1	0,025
Média	0,020	0,49	0,21

Há relatos de que os componentes carvacrol e timol são os principais constituintes e os responsáveis pela atividade antimicrobiana do OE de orégano (Silva et al., 2010) Além disso, há evidências de que alguns componentes presentes em menor quantidade

que os compostos fenólicos, como o p-cimeno, interferem na atividade antimicrobiana por produzirem efeito sinérgico entre os demais componentes (Paster et al., 1995).

O OE de cravo-da-índia também foi eficiente na inibição de todos os micro-organismos (Tabela 3), com médias de 0,7 mg.mL⁻¹ para bactérias Gram-positivas e 0,49 mg.mL⁻¹ para Gram-negativas. Silvestri et al., (2010), obtiveram valores de CIM semelhantes para o OE de cravo-da-índia, 0,5 mg.mL⁻¹ para bactérias Gram-positivas e 0,58 mg.mL⁻¹ para bactérias Gram-negativas. O OE de cravo-da-índia apresenta como substância majoritária o eugenol, responsável pela atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (Duke, 1994). Em estudo realizado por Scherer et al. (2005), apresentou acentuada atividade antimicrobiana, quando testado para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* (diminuindo significativamente a taxa de crescimento) e *Staphylococcus epidermidis*.

Os OEs de alecrim e sálvia, apresentaram os piores desempenhos, com CIM média de 2,5 mg.mL⁻¹ para todos os micro-organismos utilizados no estudo (dados não mostrados). Fu et al., (2007) verificaram atividade do OE de alecrim frente a *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *S. aureus* (ATCC 6538). Delamare et al., (2007), observaram atividade do OE de sálvia frente a alguns isolados de *Staphylococcus* spp. Extratos metanólicos e OEs de alecrim oriundos de diferentes localidades e obtidos em distintas épocas do ano apresentaram uma moderada atividade antibacteriana, sendo que *E. faecalis* e *P. vulgaris* foram os micro-organismos mais sensíveis frente aos OEs de três diferentes regiões.

Tendo em vista o melhor desempenho dos OEs de cravo-da-índia e orégano na avaliação da CIM, optou-se por realizar uma combinação binária de ambos, na proporção 1:1, frente aos mesmos micro-organismos. Houve redução da CIM apresentada pelo OE de cravo individualmente para todas as bactérias testadas, com exceção do *M. luteus*, a qual permaneceu igual (Tabela 3). Avaliando-se a composição química da combinação binária 1:1 dos OEs de cravo-da-índia e orégano (Tabela 1), pode-se observar que, dos componentes majoritários, três são os mesmos quantificados no OE de orégano, o que justifica a melhora da CIM quando compara-se o OE de cravo-da-índia com a da mistura dos óleos (Tabela 3).

O OE de *Origanum vulgare* tem demonstrado boa atividade bactericida e fungicida contra diferentes patógenos, sendo esta atribuída aos compostos carvacrol e

timol, que são os componentes fenólicos presentes em maior quantidade (Kocic-Tanackou et al., 2012; Kacaniova et al., 2012). Ao testarem a suscetibilidade de *Listeria innocua* frente aos compostos carvacrol, timol e eugenol, García-García et al. (2011), obtiveram melhores resultados com o primeiro composto. Entre as combinações binárias, carvacrol+timol, em diferentes concentrações, foram as que mais alcançaram atividade bactericida, evidenciando atividade sinérgica.

A atividade antimicrobiana de um OE pode depender de apenas um ou dois dos componentes majoritários que o formam. No entanto, uma quantidade crescente de evidências indica que a atividade inerente dos OEs, pode ser função da interação entre seus constituintes menores. Diversas atividades antimicrobianas sinérgicas foram relatadas para componentes ou frações de OEs, utilizando-se combinações binárias ou ternárias (Burt, 2004).

Fazendo-se um paralelo entre os resultados obtidos na difusão em ágar e na CIM, dos OEs testados, pode-se observar que permaneceram os melhores desempenhos para os OEs de cravo-da-índia e orégano, embora com algumas particularidades. Na difusão em ágar, o OE de orégano foi ineficaz frente à bactéria *K. pneumoniae*, enquanto que ao realizar sua CIM, obteve-se um valor de 0,025 mg.mL⁻¹ (Tabela 3). Isso que pode ser devido à uma possível dificuldade do óleo em migrar para o ágar no teste da difusão em ágar, enquanto que quando realiza-se a determinação da CIM, o mesmo encontra-se em contato direto com o micro-organismo.

3.3 Atividade antioxidante pela captura de radicais livres com o teste de DPPH

Um dos métodos mais utilizados para verificar a atividade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 516 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R·), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (Oliveira et al., 2009).

A partir do percentual de captação do radical DPPH, foi calculada a atividade antioxidante (AA) dos óleos testados. O OE de cravo-da-índia foi o que apresentou a maior AA (%), 89,38 % na concentração de 50 µg.mL⁻¹, seguido dos óleos de alecrim

(77,90 % na concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e OE de orégano (75,11 % na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Da combinação binária cravo-da-índia/orégano 1:1 chegou-se a uma AA de 85,16 % com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Também foi verificada a AA (%), nas mesmas condições descritas anteriormente, de um produto químico de referência, no caso o BHT (butil hidroxitolueno), obtendo-se atividade de 89,92 % na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Silvestri et al., (2010) avaliando OE de cravo-da-índia em diferentes concentrações, obteve uma AA (%) máxima de 95,6 % na concentração de 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Scherer et al. (2009), obtiveram um IC_{50} de 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para OE comercial de cravo-da-índia, sendo que identificaram o eugenol como composto majoritário, com 83,75% da área total, o mesmo observado na presente pesquisa (Tabela 1), o qual é um composto fenólico de forte ação antioxidante, já comprovada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Ito e Yoshino, 2005). Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (Ramalho e Jorge, 2006). Pérez-Rosés et al. (2007) chegaram a um IC_{50} de 13,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o OE de cravo-da-índia obtido das folhas da planta.

Dentre as ervas da família Labiatae, o alecrim é o mais extensivamente estudado e seus extratos são os mais conhecidos como antioxidantes naturais, sendo sua atividade atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos, voláteis e não voláteis, como os flavonóides, os ácidos fenólicos e os diterpenos fenólicos, tais como o ácido carnósico e o carnosol (hidrofóbicos) e o ácido rosmarínico e o rosmanol (hidrofílicos), sendo que mais de 90% desta atividade é atribuída aos compostos hidrofóbicos, principalmente ao ácido carnósico (Justo et al., 2008).

O OE de sálvia foi o que apresentou o menor desempenho dentre os óleos analisados, com uma atividade antioxidante de 19,70 % na concentração de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, embora este condimento seja extensivamente estudado e reconhecido por sua capacidade antioxidante relacionada aos seus compostos fenólicos (Cuppet e Hall, 1998). Cuvelier et al. (1994) identificaram os constituintes antioxidantes da sálvia como sendo carnosol, rosmadial, ácido carnósico, rosmanol e epirosmanol, previamente encontrados em alecrim, e notadamente conhecidos por suas propriedades antioxidantes.

A partir da correlação entre a atividade antioxidante (AA %) e a concentração dos óleos utilizados, foram obtidas as equações da reta, as quais fornecem os dados para

calcular o IC₅₀, o qual corresponde à amostra necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH (Tabela 4).

Tabela 4 – Equações da reta e IC₅₀ dos OEs testados.

Óleo essencial	Equação da reta	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Cravo-da-índia	$y = 933,93x + 38,99$ ($R^2 = 0,76$)	11,79
Orégano	$y = 306,5x - 2,853$ ($R^2 = 0,98$)	172,44
Alecrim	$y = 99,899x + 2,5384$ ($R^2 = 0,98$)	475,14
Sálvia	$y = 14,414x + 2,9161$ ($R^2 = 0,87$)	3.267,45
Cravo-da-índia/orégano 1:1	$y = 7954,9x + 0,9575$ ($R^2 = 0,96$)	6,40
BHT	$y = 501,4x + 45,63$ ($R^2 = 0,8577$)	8,0

Como pode-se verificar na Tabela 4, o OE de cravo-da-índia apresentou um IC₅₀ de 11,79 µg.mL⁻¹, o qual pode ser considerado bom se comparado com antioxidantes por excelência como o ácido ascórbico (IC₅₀ = 2,15 µg.mL⁻¹) e o BHT (IC₅₀ = 5,37 µg.mL⁻¹) (Cansian, 2010). Sahin et al. (2004), avaliando OEs de orégano obtido de plantas da Turquia, obtiveram valores IC₅₀ superiores aos obtidos no presente estudo, com médias de 8.900 µg.mL⁻¹, sendo que os compostos majoritários presentes nos óleos foram o cariofileno (14,4 %) e o espatulenol (11,6 %). Zaouali et al. (2010), avaliando OEs de alecrim provenientes da Tunísia, obtiveram valores de IC₅₀ variando entre 6 e 28,5 µL.mL⁻¹, superiores aos encontrados na presente pesquisa, sendo essa atividade associada aos teores elevados de cânfora, acetato de linaliol e α-tujeno encontrados nos mesmos. Para o BHT, o IC₅₀ obtido foi de 8 µg.mL⁻¹.

Como foi realizada a avaliação da CIM da combinação binária dos OEs de cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1, procedeu-se da mesma forma com relação à atividade antioxidante, visando aplicação futura em produtos alimentícios. Desta combinação obteve-se uma AA (%) máxima de 85,16 % na concentração de 100 µg.mL⁻¹ e um IC₅₀ de 6,40 µg.mL⁻¹ (Tabela 4), atividade esta superior à obtida para a substância de referência, o BHT, utilizada na presente pesquisa, bem como para ambos os OEs quando utilizados em isolado, resultado possivelmente da composição química diferenciada obtida desta combinação (Tabela 1). Juntos, os diferentes compostos presentes nos OEs, produzem um arranjo de antioxidantes que pode agir por diferentes

mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (Shahidi, 1997).

O BHT é uma substância de referência, utilizada nas pesquisas que fazem uso do método DPPH. Os valores de IC₅₀ desta molécula apresentam uma ampla gama de variação de acordo com a literatura, indo de 19,4 µM até 393 µM, diferenças estas devidas principalmente a uma não padronização das técnicas utilizadas, o que dificulta a comparação entre os resultados (Zaouali et al., 2010; Scherer et al., 2005; Mishra et al., 2012).

Os compostos fenólicos possuem uma potente ação antioxidante, apesar de ainda não haver um esclarecimento com relação ao seu mecanismo *in vivo*. O eugenol, composto majoritário do OE de cravo-da-índia, possui capacidade inibitória da peroxidação lipídica na fase de iniciação e propagação através da interferência nas reações em cadeia, sequestrando o O₂ ativo e, ao ser metabolizado em um dímero (dieugenol), inibe a peroxidação propriamente dita em nível de propagação da reação em cadeia de radicais livres com o α-tocoferol, demonstrando potente ação antioxidante e aplicabilidade estratégica na indústria (Affonso et al., 2012).

A atividade antioxidante de 33 fito constituintes presentes na noz-moscada, pimenta preta, cravo-da-índia, gerânio e melissa foi avaliada, sendo que as maiores atividades foram observadas para os constituintes eugenol, carvacrol e timol, em comparação aos demais (Jukicet al., 2007). O eugenol e o carvacrol foram os compostos voláteis majoritários encontrados na combinação binária 1:1 dos OEs de cravo-da-índia e orégano (Tabela 1), o que justifica o IC₅₀ obtido da mistura (Tabela 4).

4 CONCLUSÕES

Os compostos voláteis majoritários identificados foram acetato de bornila (39,64 %), eugenol (89,58 %), carvacrol (60,71 %) e linalol (39,26 %) nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia, respectivamente.

Os OEs de orégano e sálvia testados no presente estudo, em todas as concentrações utilizadas, foram mais efetivos contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. O OE de cravo-da-índia apresentou comportamento semelhante frente a ambas, enquanto que o OE de alecrim foi mais efetivo contra às Gram-negativas.

Houve uma tendência de aumento na eficiência dos OEs à medida que se aumentou o volume usado de 5 para 15 μL , mas tal efeito não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$) para todos os micro-organismos e OEs testados.

Com relação à CIM, verificou-se um bom desempenho do OE de orégano em comparação aos demais, com médias de $0,016 \text{ mg.mL}^{-1}$ para bactérias Gram-positivas e $0,020 \text{ mg.mL}^{-1}$ para Gram-negativas. Houve sinergismo ao utilizar-se a combinação dos OEs de cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1, reduzindo a CIM do cravo-da-índia.

A partir dos parâmetros AA (%) e IC_{50} obtidos utilizando-se o teste DPPH, pode-se concluir que o OE de cravo-da-índia tem excelente potencial para ser utilizado como antioxidante, com IC_{50} de $11,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Da combinação dos OEs de cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1, obteve-se uma AA máxima de 85,16 % na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e um IC_{50} de $6,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, superior ao do BHT e de ambos óleos quando na forma pura.

Avaliando-se o desempenho global obtido pelos OEs nos testes *in vitro* pode-se inferir que os mesmos apresentam-se como uma alternativa promissora na conservação de alimentos, podendo, por exemplo, serem utilizados na composição de embalagens bioativas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FAPERGS e SC&T-RS pelo suporte financeiro.

5 REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4^o Ed., Allured Publ. Corp, Carol Stream, 2007.

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da índia. **Revista Virtual de Química**. v.4, n.2, p.146-161, 2012.

ALONSO JUNIOR, R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones. SRL, 1998.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 3530-3532., 2004.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Resolução - RDC nº 2. Brasil, 2007.

ARENAS, D.R.M.; ACEVEDO, A.M.; MÉNDEZ, L.Y.V.; KOUZNETSOV, V.V. Scavenger activity evaluation of the clove bud essential oil (*Eugenia caryophyllus*) and eugenol derivatives employing ABTS⁺ decolorization. **Science Pharmaceutics**. v.79, p. 779–791, 2011.

ASSITAT®. Software Assistência Técnica. Universidade Federal de Campina Grande. www.assistat.com Download em abril de 2012.

BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**. Wiley-VCH, Weinheim, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BUSATTA, C.; MOSSI, A.J.; RODRIGUES, A.R.M.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p. 610-616, 2007.

CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, D.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, N.; ASTOLFI, V.; SERAFINI, L.A. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linalo oriferafujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p. 378-384, 2010.

CARBONARI, K. A. **Avaliação do Potencial Antioxidante (In vitro e In vivo) e Antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. 132 p.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus*

officinalis, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**. v.100, p.553–559, 2007.

CHEN, Q.; SHI, H.; HO, C. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v.69, n.10, p. 999-1002, 1992.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007, v.55, n.15, p. 6300–6308, 2007.

CUPPETT, S.L.; HALL, C.A. Antioxidant activity of the Labiatae. **Advances in Food Nutrition Research**. v.42, p.245-71, 1998.

CUVELIER, M.E.; BERSET, H.; RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.42, p.665-669, 1994.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, p. 2576–2581, 2000.

DELAMARE, A.P.L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I.T.; ARTICO, L. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v.100, p.603-608, 2007.

DUKE, J.A. **Biologically-active compounds in important spices**. In: CHARALAMBOUS, G. Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevier Publishers, 1994.

FARAG, R.S.; BADEL, A.Z.M.A.; HEWEDI, F.M.; EL-BAROTY, G.S.A. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.66, n.6, p.792-799, 1989.

FASSEAS, M.K.; MOUNTZOURIS, K.C.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; ZERVAS, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v.106, n.3, p.1188-94, 2007.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, vol. 21, p. 989-994, 2007.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**. v.76, n.2, p. 95-100, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4^a. Ed. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**. 2012.

ITO, M.M.K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food Chemistry Toxicology**, v.43, p. 461-466, 2005.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MILO, M. Chemical composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil. **Croatica Chemica Acta**. v.79, n.2, p.209-214, 2007.

JUSTO, O.R.; MORAES, A.M.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z.; ROSA, P.T. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**. v. 31, n.7, p.1699-705, 2008.

KAČÁNIOVÁ, M.; VUKOVIČ, N.; HLEBA, L.; BOBKOVÁ, A.; PAVELKOVÁ, A.; ROVNÁ, K.; ARPÁŠOVÁ, H. Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. v.2, n.1, p. 263-271, 2012.

KLANCNIK, A., PISKERNIK, S., JERSEK, B.; MOZINA, S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbioly Methods**. v.81, p.121-126, 2010.

KOCIĆ-TANACKOV, S. D.; DIMIĆ, G. R.; TANACKOV, I. J.; PEJIN, D. J.; MOJOVIĆ, L. V.; PEJIN, J. D. Antifungal activity of Oregano (*Origanum vulgare* L.)

extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. **Hemjska Industrija**. v.66, n.1, p. 33–41, 2012.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**. v. 85, p.633-640, 2004.

MARTINO, L.D.; VINCENZO, D.F.; FORMISANO, C.; MIGNOLA, E.; SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). **Molecules**. v.14, n.8, p. 2735-46, 2009.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N.C. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH_ assay: A critical review and results. **Food Chemistry**. v.130, p. 1036–1043, 2012.

MORAIS, L.A.S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, (Suplemento - CD Rom),2009.

OLIVEIRA, A.C. de; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TERVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. v.32, n.3, p. 689-702, 2009.

PASTER, N.; MENASHEROV, M.; RAVID, U.; JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**. v.58, p.81-85, 1995.

PÉREZ-ROSÉS, R.; RISCO, E.; VILA, R.; PEÑALVER, P.; CAÑIGUERAL, S. Antioxidant and complement modulating activities of five essential oils. **Anais 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research**, Graz, Austria, 2007.

PIEROZAN, M.K.; PAULETTI, G.F.; ROTA, L.; SANTOS, A.C.A dos; LERIN, L.A.; DI LUCCIO, M.; MOSSI, A.J.; ATTI-SERAFINI, L.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, V. J. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.764-770, 2009.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R., CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial

activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**. v.17, p.15– 19, 2002.

POVH, J.A.; ONO, E.O. Efeito do ácido giberélico na composição do óleo essencial de *Salvia officinallis* L. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13(1/2), 2007.

POZZO, M.D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D.F.; ROSSATO, L.; SOARES, I.H.; ALVES, S.H.; COSTA, M.M. da. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**. v.41, n.4, p. 667-672, 2011.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. v.29, n.4, p. 755-760, 2006.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare*ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**. v.15, p.549-557, 2004.

SÁNCHEZ, A.A.; ESPINOSA, M.E.; VÁSQUEZ, E.N.O.; CAMBEROS, E.P.; VÁSQUEZ, R.S.; CARVANTES, E.L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens*H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p. 585-590, 2010.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p. 442-449, 2009.

SHAHIDI, F. **Natural Antioxidants - Chemistry, Health Effects and Applications**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1997.

SILVA, J.P.L.; ALMEIDA, J.M.D.; PEREZ, D.V.; FRANCO, B.D.G. de M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.136-141, 2010.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**. v.57, n.5, p. 589-594, 2010.

TOMAINO, A., CIMINO F., ZIMBALATTI V., VENUTI V., SULFARO V., PASQUALE A., SAIJA A Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v.89, n.4, p. 549-554, 2005.

TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C. Biotransformation of (-) β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.121-124, p. 837-844, 2005.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINE, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**. v.48, p. 3144–3152, 2010.

**FILMES BIOPOLIMÉRICOS ATIVOS – CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADES
ANTIBACTERIANAS E ANTIOXIDANTES *IN VITRO***

Mariane L. Ugalde^{a,b}, Aline M. de Cezaro^b, Felipe Vedovatto^b, Helen Treichel^c, Juliana Steffens^b, Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira^b, Geciane Toniazzo^b, Rogério L. Cansian^b

^a Instituto Farroupilha Federal - Campus Júlio de Castilhos – São João do Barro Preto s/n - Caixa Postal 38 - CEP 98130-000 – Júlio de Castilhos – RS, Brasil.

^b URI Erechim, Departamento de Ciências Agrárias, Av. Sete de Setembro, 1621- CEP 99700-000, Erechim – RS, Brasil.

^c Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus de Erechim, Av. Dom João Hoffman, 313 CEP 99700-000, Erechim – RS, Brasil.

RESUMO - Foram desenvolvidos filmes biopoliméricos à base de amido de milho, quitosana e acetato de celulose, pela metodologia *casting*, incorporados com óleos essenciais (OEs) de cravo-da-índia botão e orégano (1,0; 2,5 e 5,0 % v/v) isoladamente e na combinação binária 1:1, os quais foram testados frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pelo método de difusão em ágar. Os maiores halos ($p < 0,05$) foram observados no filme biopolimérico ativo de amido de milho na concentração 5 % do OE de orégano (26,67 mm \pm 1,15 frente à bactéria *Listeria monocytogenes*). A atividade antioxidante (AA) foi determinada pelo método espectrofotométrico DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), sendo que o biopolímero controle (sem OEs) de quitosana apresentou uma pequena AA (13,34 %), além de formação de halos frente à todas as bactérias testadas. Os biopolímeros ativos contendo OE de cravo-da-índia, apresentaram atividade antioxidante (%) superior aos demais já nas menores concentrações utilizadas. O amido de milho e a quitosana, mostraram nos testes *in vitro*, serem biopolímeros adequados para a produção de filmes para aplicação em alimentos, nas quais serão adicionados aditivos, possibilitando uma boa difusão dos OEs utilizados no teste de difusão em ágar e a expressão da capacidade antioxidante dos óleos testados.

Palavras-chave – filmes, biopolímeros, *casting*, óleos essenciais.

1 INTRODUÇÃO

Filmes poliméricos são estruturas para envolver produtos. Quando são completamente degradados por micro-organismos são considerados biodegradáveis, sendo denominados filmes biopoliméricos. Os filmes biopoliméricos são materiais de fina espessura, preparados a partir de macromoléculas biológicas, que agem como barreira a elementos externos (umidade, gases e óleos), protegendo os produtos e aumentando sua vida de prateleira. Adicionalmente, podem carrear compostos antimicrobianos e antioxidantes, sendo denominados filmes biopoliméricos ativos (Krochta e Mulder-Johnston, 1997).

Dentre os materiais pesquisados, os biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, são os mais promissores, devido ao fato de serem abundantes, renováveis, e capazes de formar uma matriz contínua (Gontard e Guilbert, 1993). Estruturas lineares de alguns polissacarídeos como, por exemplo, celulose, amido e quitosana, originam filmes resistentes, flexíveis e transparentes. Ainda apresentam outras vantagens, como poderem ser consumidos em conjunto com o produto, reterem compostos aromáticos, carrear aditivos alimentícios ou componentes com atividades antimicrobiana e/ou antioxidante (Pranotto et al., 2005).

A incorporação de substâncias antimicrobianas e/ou antioxidantes em materiais de embalagem, tem se destacado em virtude do papel das alterações microbianas e oxidativas na qualidade dos produtos alimentares (Siripatrawan e Harte, 2010). Esta abordagem pode reduzir a adição de grandes quantidades de aditivos alimentares que são geralmente incorporados em alimentos. Devido ao potencial risco para a saúde causado por compostos ativos sintéticos (Gómez-Estaca et al., 2009), diversas pesquisas são conduzidas com compostos ativos naturais como alternativa à aditivos sintéticos, incluindo a incorporação de óleos essenciais (Oussalah et al., 2004; Gómez-Estaca et al., 2010; Du et al., 2011).

Os OEs são líquidos aromáticos e voláteis extraídos de componentes das plantas como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e da planta inteira (Sánchez et al., 2010), sendo classificados como GRAS (Generally Regarded As Safe), o que os torna atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (Pereira et al., 2006). Quimicamente, em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides,

acrescidos de moléculas menores como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta.

O objetivo da presente pesquisa foi desenvolver filmes biopoliméricos de amido de milho, quitosana e acetato de celulose pela metodologia *casting*, incorporados com diferentes concentrações de OEs de cravo-da-índia botão (*Eugenia caryophyllata*) e orégano (*Origanum vulgare*), caracterizá-los e testá-los *in vitro* quanto a sua capacidade antioxidante e antibacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos filmes biopoliméricos ativos

Os filmes biopoliméricos de amido de milho, quitosana e acetato de celulose foram obtidos pela técnica *casting*, a qual consiste na desidratação de uma solução coloidal, denominada solução filmogênica (SF). Os filmes biopoliméricos de quitosana foram preparados de acordo com Siripatrawan e Harte (2010), com modificações, à partir de uma solução contendo 2 % de quitosana (p/v) (Polymar[®], Fortaleza, Ceará, Brasil), 30 % de glicerol (p/p) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) como agente plastificante, suspensos em uma solução de ácido acético 1 % (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). A SF foi submetida ao processo de esterilização em autoclave à 121 °C/10 minutos, sendo posteriormente filtrada.

Os filmes biopoliméricos de amido de milho foram obtidos à partir de uma solução contendo 3 % de amido de milho (p/v), 30 % de glicerol (p/p) (Proton Química[®]) como agente plastificante, suspensos em água destilada. Os componentes foram misturados e aquecidos gradualmente sob agitação em banho-maria, até atingir a temperatura de 80 °C sendo a mesma mantida por 10 minutos.

As soluções filmogênicas (SF) eram resfriadas até a temperatura de 40 °C para então ser feita a adição dos OEs comerciais de cravo-da-índia, orégano (Ferquima[®], São Paulo, Brasil) e da combinação binária 1:1 de ambos, nas proporções 1,0 %, 2,5 % e 5,0 % (v/v), sendo posteriormente submetidas à agitação em equipamento turrax (Multitec[®], Canoas, RS, Brasil) por três minutos. Manteve-se uma SF sem a adição de OE, a qual foi denominada de controle. 90 g de SF foram vertidas em placas de acrílico de 15 x 15 cm previamente higienizadas com álcool 70 %, objetivando a formação de filmes com espessura homogênea, sendo posteriormente submetidas à secagem em estufa com

circulação de ar à uma temperatura de 40 °C por 24 horas. Passado este período, os filmes eram retirados das placas e armazenados em recipientes lacrados à temperatura de 4 °C até as análises posteriores.

Os filmes biopoliméricos de acetato de celulose foram produzidos à partir de uma solução contendo 10 % de acetato de celulose (p/v) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), suspenso em acetona P.A. (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). A SF era agitada periodicamente até a completa dissolução do acetato, sendo feita então a inclusão dos OEs, nas concentrações de 1,0 %, 2,5 % e 5,0 % (v/v). Manteve-se uma SF sem a adição de OE, a qual foi denominada de controle. As SF eram vertidas em placas de vidro de 15 x 15 cm previamente higienizadas com álcool 70 %, em um volume médio de 10 mL, o qual era espalhado com o auxílio de um bastão de vidro. A secagem ocorria, em condições ambientais, pela evaporação da acetona. Posteriormente, os filmes eram retirados das placas e armazenados em recipientes lacrados à temperatura de 4 °C até as análises posteriores.

2.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada de acordo com Monterrey e Sobral (1999) onde se fixou o peso da SF depositada em cada placa, como descrito anteriormente. Após a secagem das SF, mediu-se a espessura dos filmes com um micrômetro digital (Mitutoyo[®], Suzano, SP, Brasil) com precisão de 0,001 mm, em cinco pontos diferentes, sendo um no centro e outros quatro no perímetro. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, sendo as médias analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa ASSISTAT[®].

2.3 Propriedades óticas

Cor e opacidade

A cor dos filmes foi determinada através da média de 5 determinações, sendo uma no centro e as outras quatro no perímetro, utilizando um colorímetro CR-400 Minolta Chromameter (Konica Minolta, São Paulo, SP, Brasil), sendo as médias analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey

($p < 0,05$), utilizando-se o programa ASSISTAT[®]. Os filmes foram colocados em uma placa branca definida como padrão e a escala CIE (Comisión Internacionale de l'Eclairage) -LAB e luz do dia (D_{65}) foram usadas para medir a cor dos filmes. O L^* indica a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco), a^* do verde (-) ao vermelho (+) e b^* do azul (-) ao amarelo (+) (Vicentini, 2003). A diferença da cor total (ΔE) foi calculada através da equação 1,

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0,5} \quad (1)$$

Onde:

$$\Delta L = L_{\text{padrão}} - L_{\text{amostra}}$$

$$\Delta a = a_{\text{padrão}} - a_{\text{amostra}}$$

$$\Delta b = b_{\text{padrão}} - b_{\text{amostra}}$$

Foram considerados valores padrões, os filmes biopoliméricos de amido de milho, quitosana e acetato de celulose os quais não sofreram a adição de OEs, denominados de controle. As determinações foram realizadas através da média de 5 pontos, um no centro e os outros quatro no perímetro, utilizando-se um colorímetro CR-400 Minolta Chromameter.

A opacidade dos filmes foi determinada pelo método Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, 1997), utilizando-se o mesmo aparelho das medidas de cor. Por esse método, a opacidade (Y) da amostra é calculada como a relação entre a opacidade da amostra colocada sobre o padrão preto (Y_p) e a opacidade da amostra colocada sobre o padrão branco (Y_b), segundo a equação 2:

$$Y = (Y_p / Y_b) \times 100 \quad (2)$$

As médias foram analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa ASSISTAT[®].

2.4 Atividade antibacteriana

O método de difusão em ágar foi executado como teste qualitativo para verificar a atividade antibacteriana dos filmes. Esta análise foi conduzida segundo Rojas-Graü et al. (2006) com algumas adaptações. Foram assepticamente cortados discos de 7 mm de diâmetro e submetidos a radiação UV por 30 minutos de cada lado, sendo posteriormente

colocados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) inoculadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 107008) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), previamente crescidos em meio Lúria Bentani (LB)/24 horas a 36 ± 1 °C.

Os resultados foram expressos em milímetros pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições, sendo as médias analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa ASSISTAT[®].

2.5 Atividade antioxidante

A metodologia para avaliação da atividade antioxidante dos filmes biopoliméricos, baseada na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm, foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico de acordo com Siripatrawan e Harte (2010), com algumas modificações. Amostras de 25 mg de cada filme foram deixadas em repouso, durante 12 horas, em tubos de ensaio lacrados contendo 3 mL de metanol. Após este período adicionava-se 1 mL de uma solução metanólica 0,1 mM de DPPH. A absorbância a 515 nm era medida após repouso das amostras por 30 minutos no escuro. Durante este período, as mesmas eram submetidas a agitações periódicas em vortex. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da percentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Eq. 1.

$$AA\% = 100 - \{[(Abs. DPPH - Abs.amostra) \times 100] \div Abs. DPPH\} \quad (1)$$

Os resultados foram expressos pela média aritmética dos valores obtidos em triplicata, sendo as médias analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa ASSISTAT[®].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espessura

A espessura dos filmes formados é um parâmetro que influencia suas propriedades (Cuq et al., 1996). O controle da espessura é importante para se avaliar a uniformidade desses materiais, a repetitividade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre filmes, sendo difícil sobretudo nos processos de produção do tipo *casting* (Sobral, 1999). Os resultados da determinação da espessura dos biofilmes estão dispostos na Figura 1.

Os filmes produzidos à partir da quitosana apresentaram valores de espessura maiores que os de amido de milho e acetato de celulose, sendo que o biopolímero utilizado foi a única fonte de variação entre eles. Mohammad et al. (2012) pesquisando blendas poliméricas de quitosana e amido pelo método *casting*, obtiveram valores médios de espessura de 0,20 mm, enquanto Bangyekan et al. (2006) encontraram valores médios de 0,10 mm para filmes produzidos com quitosana também pelo método *casting*. Abdollahi et al. (2012) obtiveram valores entre 0,049 e 0,052 mm para filmes de quitosana incorporados com OE de alecrim e nanoargila.

Observando-se a Figura 1, é possível verificar que houve uma tendência de aumento da espessura dos filmes de quitosana e amido de milho, na medida em que foram incorporadas maiores quantidades de OEs, embora nem sempre significativa estatisticamente ($p > 0,05$). Moradi et al. (2012) caracterizando filmes de quitosana incorporados com OE de tomilho e extrato de semente de uva encontraram valores de espessura estatisticamente iguais para todos os tratamentos, entre 0,07 e 0,08 mm. Comportamento semelhante foi observado por Arce (2011), pesquisando a influência da introdução de OEs nas propriedades de películas comestíveis à base de quitosana.

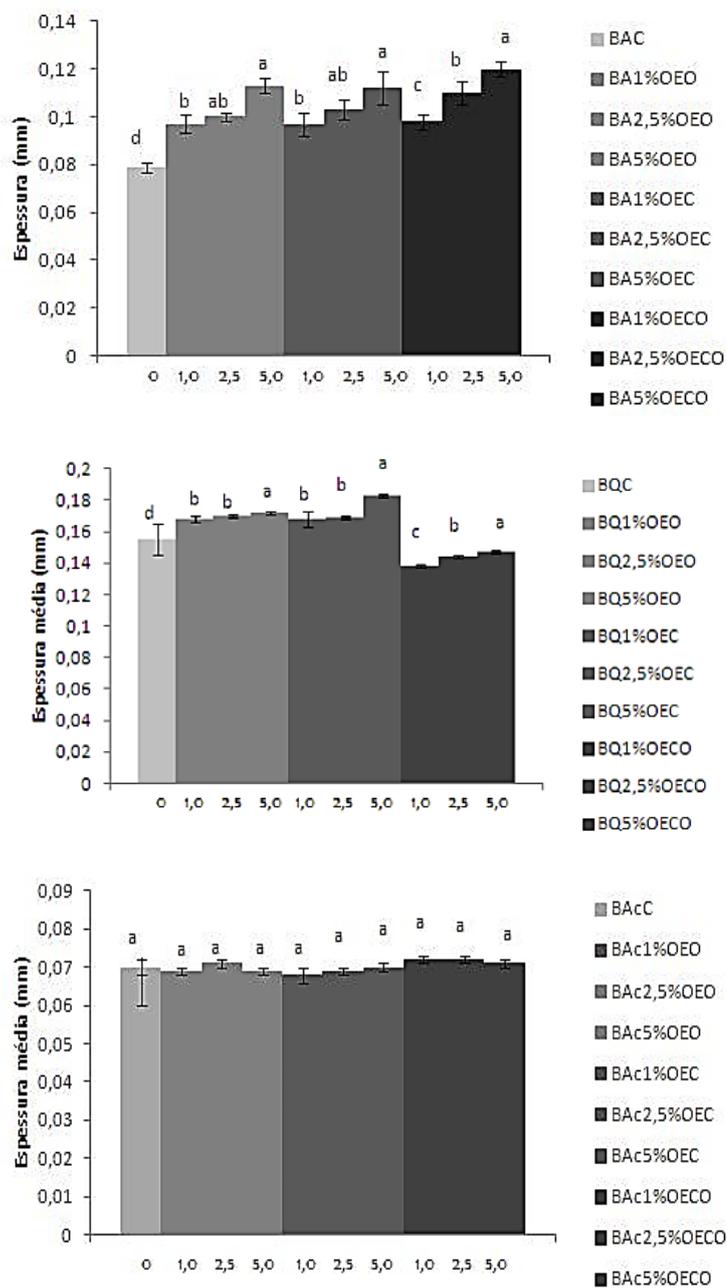


Figura 1 - Espessura média* dos filmes biopoliméricos de amido de milho, quitosana e acetato de celulose controle (BAC, BQC e BA_c) e incorporados com diferentes percentuais de OE de orégano (OEO), cravo-da-índia (OEC) e 1:1 orégano e cravo-da-índia (OEOC).

*Médias com letras iguais na mesma série e controles, indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

Dentre os filmes avaliados, os obtidos à partir do acetato de celulose foram os que se apresentaram mais homogêneos com relação a sua espessura, com valores entre 0,068 e 0,072 mm (Figura 1), o que pode ser explicado pelo método diferenciado pelo qual a SF é aplicada no suporte.

Espitia et al. (2011) encontraram valores entre 0,040 e 0,045 mm para filmes de acetato de celulose incorporados com 20 % de OEs de canela, orégano ou capim-limão. Pires et al. (2008) desenvolveram uma embalagem ativa à base de acetato de celulose incorporado com nisina, natamicina e a combinação de ambas, sendo que os valores de espessura foram muito variáveis entre os tratamentos (0,022 a 0,162 mm). Os filmes foram obtidos de maneira semelhante ao da presente pesquisa.

3.2 Propriedades óticas

Cor e opacidade

Atributos de cor são de primordial importância, pois influenciam diretamente a aceitação dos produtos por parte do consumidor. Os valores obtidos para as coordenadas L^* , a^* e b^* , diferença total de cor (ΔE) e opacidade (Y) dos filmes estão apresentados na Tabela 1.

Os valores de L^* apresentados pelos filmes de amido de milho variaram entre 88,66 e 99,45, o que indica assim uma boa transparência, pois quanto mais próximo de 100 mais clara é a superfície. Nos filmes de quitosana, L^* variou entre 46,34 e 67,98, o que indica assim uma transparência razoável, o que pode ser explicado pela cor amarelada característica do polímero. Em ambos biopolímeros, houve uma tendência, nem sempre estatisticamente significativa, de redução da luminosidade na medida em que maiores quantidades de OEs foram incorporados, provavelmente pela cor característica dos mesmos.

Tabela 1 – Valores L*, a*, b*, ΔE e opacidade (Y) médios dos filmes biopoliméricos de amido de milho, quitosana e acetato de celulose adicionados de OE de orégano, cravo e mistura de orégano e cravo-da-índia (1:1), em diferentes concentrações.

Biopolímero		Parâmetros Colorimétricos**				
		L	a*	b*	ΔE	Y
Óleo essencial de Orégano						
Amido de Milho	C	98,20 ±0,84 ^a	-14,84 ±0,25 ^d	1,86 ± 0,36 ^e	ND	50,07 ±0,32 ^d
	1,0%	99,45 ±0,28 ^a	-15,98 ±0,48 ^e	10,88 ±1,33 ^d	9,18 ±1,54 ^b	50,71 ±0,25 ^c
	2,5%	98,10 ±0,3 ^a	-15,71 ±0,39 ^e	11,07 ±0,24 ^d	9,27 ±0,53 ^b	52,07 ±0,17 ^b
	5,0%	93,74 ±0,29 ^b	-15,79 ±0,24 ^e	14,06 ±0,26 ^c	13,03 ±0,51 ^a	54,62 ±0,34 ^a
Quitosana	C	59,51±3,51 ^{de}	2,58 ±0,51 ^{ab}	16,56 ±1,34 ^c	ND	27,43 ±0,17 ^g
	1,0%	61,42 ±0,27 ^d	2,70 ±0,38 ^{ab}	16,17 ±1,89 ^c	4,28 ±0,52 ^c	27,99 ±0,08 ^{fg}
	2,5%	61,76 ±0,82 ^d	2,49 ±0,26 ^{abc}	22,98 ±2,86 ^b	7,17 ±2,08 ^b	28,40 ±0,35 ^f
	5,0%	58,11 ±2,48 ^e	2,96 ±0,29 ^a	27,65 ±0,88 ^a	12,24 ±2,12 ^a	31,46 ±0,20 ^e
Acetato de Celulose	C	71,00 ±0,52 ^c	2,35 ±0,08 ^{bc}	-10,96 ±0,18 ^f	ND	15,91 ±0,34 ^{hi}
	1,0%	71,71 ±0,48 ^c	2,52 ±0,09 ^{abc}	-11,23 ±0,12 ^f	0,90 ±0,42 ^d	15,43 ±0,31 ⁱ
	2,5%	71,84 ±0,19 ^c	2,41 ±0,13 ^{bc}	-11,55 ±0,24 ^f	1,12 ±0,43 ^d	15,72 ±0,19 ⁱ
	5,0%	73,00 ±0,11 ^c	2,04 ±0,20 ^c	-11,55 ±0,24 ^f	2,17 ±0,52 ^{cd}	16,46 ±0,28 ^h
Óleo essencial de Cravo-da-índia						
Amido de Milho	C	94,54 ±2,04 ^a	-14,86 ±0,07 ^e	1,81 ±0,05 ^d	ND	52,21 ±0,81 ^b
	1,0%	93,45 ±2,02 ^a	-14,73 ±0,05 ^e	1,80 ±0,12 ^d	2,42 ±2,08 ^d	51,89 ±0,70 ^b
	2,5%	90,83 ±0,74 ^a	-14,74 ±0,05 ^e	2,25 ±0,07 ^d	3,99 ±2,68 ^d	52,78 ±0,44 ^b
	5,0%	87,17 ±1,21 ^b	-15,38 ±0,04 ^d	2,66 ±0,26 ^d	9,43 ±1,99 ^{bc}	58,94 ±0,21 ^a
Quitosana	C	56,09 ±1,28 ^e	4,18 ±0,42 ^b	22,54 ±3,34 ^c	ND	18,31 ±0,22 ^e
	1,0%	53,70 ±1,88 ^e	3,30 ±0,21 ^{bc}	22,88 ±2,67 ^c	5,84 ±2,0 ^{bcd}	19,50 ±0,56 ^e
	2,5%	48,65 ±3,68 ^f	6,32 ±0,45 ^a	29,53 ±1,47 ^b	10,83 ±3,19 ^{ab}	28,09 ±0,68 ^d
	5,0%	46,34 ±3,06 ^f	6,79 ±1,33 ^a	33,65 ±4,37 ^a	15,95 ±3,66 ^a	29,29 ±0,26 ^c
Acetato de Celulose	C	79,74 ±1,16 ^c	2,79 ±0,10 ^c	-12,39 ±0,31 ^f	ND	14,72 ±0,10 ^f
	1,0%	77,79 ±1,09 ^{cd}	2,76 ±0,04 ^c	-11,60 ±0,32 ^{ef}	2,30 ±1,12 ^d	14,98 ±0,21 ^f
	2,5%	74,10 ±2,85 ^d	2,67 ±0,21 ^c	-10,85 ±0,91 ^e	5,98 ±1,76 ^{bcd}	15,61 ±0,35 ^f
	5,0%	74,95 ±0,96 ^d	2,70 ±0,20 ^c	-10,95 ±0,49 ^e	5,08 ±1,63 ^{cd}	15,57 ±0,28 ^f
Óleo essencial de Orégano e Cravo-da-índia (1:1)						
Amido de Milho	C	96,02 ±1,92 ^a	-15,12 ±0,38 ^d	1,78 ±0,25 ^e	ND	48,81 ±0,08 ^d
	1,0%	93,6 ±1,95 ^{ab}	-15,06 ±0,18 ^d	6,77 ±0,31 ^d	5,76 ±0,93 ^b	48,17 ±0,61 ^c
	2,5%	88,66 ±3,54 ^b	-14,93 ±0,46 ^d	7,22 ±0,30 ^d	7,48 ±3,26 ^b	51,47 ±0,16 ^b
	5,0%	89,91 ±0,16 ^b	-15,23 ±0,5 ^d	7,46 ±0,18 ^d	6,36 ±1,81 ^b	54,13 ±0,36 ^a
Quitosana	C	67,98 ±3,40 ^d	1,77 ±0,23 ^c	10,64 ±0,50 ^c	ND	22,60 ±0,36 ^g
	1,0%	63,09 ±2,27 ^d	2,72 ±0,49 ^b	12,33 ±1,43 ^b	6,29 ±3,47 ^b	22,88 ±0,46 ^g
	2,5%	54,07 ±4,19 ^e	4,95 ±0,42 ^a	17,93 ±1,68 ^a	16,14 ±5,96 ^a	35,61 ±0,41 ^f
	5,0%	51,46 ±0,99 ^e	4,88 ±0,20 ^a	19,33 ±0,52 ^a	18,92 ±3,14 ^a	36,83 ±0,34 ^e
Acetato de Celulose	C	75,85 ±2,16 ^c	2,53 ±0,08 ^b	-11,49 ±0,30 ^g	ND	14,95 ±0,31 ^j
	1,0%	74,57 ±2,32 ^c	2,51 ±0,06 ^b	-11,16 ±0,19 ^g	2,94 ±1,56 ^b	17,29 ±0,21 ⁱ
	2,5%	76,15 ±1,57 ^c	2,56 ±0,10 ^b	-11,50 ±0,15 ^g	1,40 ±0,87 ^b	18,60 ±0,24 ^h
	5,0%	74,66 ±1,08 ^c	2,38 ±0,15 ^b	-10,35 ±0,21 ^f	2,17 ±1,14 ^b	18,78 ±0,37 ^h

** Médias seguidas de mesma letra nas colunas, para cada óleo essencial, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05). Obs. Para os biopolímeros controle não foi determinada a diferença total de cor (ΔE), por estes terem sido utilizados como padrão para o cálculo dos demais. C = Controle sem óleo essencial.

Mehdizadeh et al. (2012) verificaram que em filmes comestíveis produzidos com amido e quitosana, a adição de OE de tomilho (*Thymus kotschyanus*) afetou a cor e a transparência dos mesmos. Observações semelhantes foram obtidas em outras pesquisas

com filmes incorporados com OEs (Ojagh et al. 2010, Pranoto et al., 2005). Arce (2011) observou o mesmo efeito em películas comestíveis à base de quitosana incorporadas com OEs de alecrim e tomilho. Moradi et al. (2012) caracterizando filmes de quitosana incorporados com OE de tomilho e extrato de semente de uva, encontrou valores de L^* entre 35 e 77, nos diferentes experimentos realizados. Rotta (2008) encontrou valores médios de 48,39 para o parâmetro L^* em filmes elaborados à partir de SF contendo 1 a 3,5 % de quitosana.

Os valores de L^* apresentados pelos filmes de acetato de celulose variaram entre 71,00 e 79,74 (Tabela 1), indicando uma boa transparência. Diferentemente do que ocorreu nos filmes à base de amido de milho e quitosana, não houve influência da adição dos OEs nos parâmetros avaliados. Lúcio et al. (2011) avaliando filmes de acetato de celulose incorporados com OE de orégano, obteve valores maiores de L^* , média de 92,51, sendo que este parâmetro foi afetado significativamente pela adição do OE. Cabe salientar que foram utilizados proporções de OE superiores as utilizadas no presente estudo (60 %).

Os dados do croma a^* , apresentaram-se negativos (-14,74 a -15,98) nos filmes de amido de milho, indicando a presença do componente verde, enquanto que os dados do croma b^* apresentaram valores positivos (1,78 a 14,06) (Tabela 1), indicando o componente amarelo. Houve pouca variação do croma a^* comparando-se o filme controle com os incorporados com OEs, enquanto que o croma b^* variou significativamente, em especial nos filmes nos quais o OE de orégano estava presente.

Nos filmes de quitosana, os dados do croma a^* , apresentaram-se positivos (1,67 a 6,79) (Tabela 1), indicando a presença do componente vermelho, da mesma forma que os dados do croma b^* (10,64 a 33,65), indicando o componente amarelo, os quais tiveram uma tendência, nem sempre significativa de aumento na medida em que maior proporção de OEs foi incorporada. Abdollahi et al. (2012) relataram que as coordenadas de cor a^* e b^* aumentaram significativamente à medida em que incorporou-se OE de alecrim em filmes à base de quitosana e argila, além de ocasionar redução nos valores de L^* . Pereda et al. (2011), obtiveram valores médios superiores que os encontrados na presente pesquisa, para os parâmetros L^* e b^* em filmes com 2 % de quitosana, 80,39 e 44,67, respectivamente. A presença da cor amarelada, característica dos filmes de quitosana, pode ser interessante se o mesmo for utilizado com o objetivo de proteger alimentos sensíveis à reações de deterioração catalisadas pela luz.

Quando foi utilizado o acetato de celulose, os dados do croma a^* , apresentaram-se positivos (2,04 a 2,79), indicando a presença do componente vermelho, enquanto que os dados do croma b^* apresentaram valores negativos (-10,35 a -12,39) (Tabela 1), indicando o componente azul. Houve pouca variação dos valores entre os diferentes tratamentos, não tendo sido identificado um padrão de comportamento com relação à adição de OEs. Takeuchi et al. (2011) avaliando as propriedades óticas e mecânicas de filmes ativos a base de acetato de celulose adicionados de curcumina, obtiveram valores médios de 93,6; 140 e 1,39 e para os parâmetros L^* , a^* e b^* respectivamente, nos filmes controle (sem curcumina), observando-se uma grande diferença em relação ao presente estudo, em particular para o croma b^* .

Os valores do parâmetro diferença total de cor (ΔE) (Tabela 1), nos filmes foram maiores à medida que se incorporou mais OEs aos mesmos, em função das diferenças existentes entre estes e os biofilmes controle, principalmente nos valores dos cromas L^* , a^* e b^* . Comportamento semelhante foi observado por Abdollahi et al. (2012) e Moradi et al. (2012). Yoshida e Antunes (2009) verificaram que filmes emulsionados apresentaram uma diferença total de cor (ΔE) mais acentuada em relação ao filme padrão, relacionada à incorporação de lipídios, o que promoveu um aumento no parâmetro b^* e uma redução nos parâmetros a^* e L^* , semelhante ao que ocorreu no presente estudo. Lúcio et al. (2011) observaram este mesmo comportamento em pesquisa com filmes de acetato de celulose incorporados com OE de orégano.

Em relação à opacidade dos filmes, a mesma apresentou-se mais elevada à medida que maiores concentrações de OEs foram adicionadas, coincidindo com a redução dos valores de L^* , variando entre 48,17 e 58,94 %, 18,31 a 36,83 % e 14,72 e 18,78 %, respectivamente nos filmes de amido de milho, quitosana e acetato de celulose (Tabela 1).

As diferenças observadas para os filmes controle de quitosana nos parâmetros L^* , a^* e b^* e opacidade nos diferentes experimentos (Tabela 1), podem ser devidas à presença de substâncias insolúveis na SF, embora a mesma tenha sido submetida à processo de filtração.

3.3 Atividade antibacteriana

Como pode ser observado na Tabela 2, o filme de amido de milho apresentou halos maiores, na medida em que uma maior percentagem de OEs foi incorporada ao mesmo, para todas as bactérias testadas. Comportamento semelhante foi observado por Pelissari et al. (2009) avaliando a atividade antimicrobiana de filmes de amido de mandioca e quitosana incorporados com OE de orégano e por Mehdizadeh et al. (2012), em películas comestíveis a base de amido e quitosana, incorporadas com OE de tomilho. O OE de cravo-da-índia não apresentou efeito antibacteriano, para nenhuma das bactérias testadas, quando utilizado na percentagem de 1 %. Na combinação binária 1:1 dos OEs testados, nas concentrações de 1,0 e 2,5 %, o desempenho dos OEs de cravo-da-índia e orégano, foi estatisticamente igual ou superior do que quando utilizados isoladamente. Este comportamento não se repetiu quando foi utilizada a concentração de 5 %, tendo o OE de orégano obtido os maiores halos, para todas as bactérias testadas, alcançando 26,67 mm frente à bactéria *L. monocytogenes*.

Tabela 2 – Halos médios* (mm) apresentados pelo biopolímero amido controle (BAC) e incorporado com OEs de cravo-da-índia (BAOEC), orégano (BAOEO) e cravo-da-índia orégano 1:1 (BAOECO).

	<i>S.aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
BAC	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^e
BAOEC 1%	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^e
BAOEO 1%	9,33 ± 0,57 ^{cd}	7,67 ± 0,57 ^c	7,33 ± 0,57 ^d	10,67 ± 0,57 ^d	7,00 ± 0,57 ^e	7,67 ± 0,57 ^d
BAOECO 1:1 1%	10,33 ± 1,53 ^{cd}	2,67 ± 4,62 ^d	11,00 ± 1,00 ^c	10,67 ± 1,15 ^d	10,33 ± 0,57 ^c	10,33 ± 0,57 ^c
BAOEC 2,5%	7,67 ± 0,76 ^d	7,33 ± 0,58 ^c	8,33 ± 0,58 ^d	7,67 ± 0,47 ^e	8,00 ± 0,5 ^{de}	7,33 ± 0,58 ^d
BAOEO 2,5%	11,33 ± 0,57 ^c	9,33 ± 0,57 ^{bc}	12,33 ± 1,15 ^c	11,33 ± 0,57 ^d	9,66 ± 0,57 ^{cd}	10,33 ± 0,57 ^c
BAOECO 1:1 2,5%	10,33 ± 0,57 ^{cd}	11,33 ± 0,57 ^{bc}	11,67 ± 0,57 ^c	11,67 ± 1,15 ^{cd}	10,67 ± 0,57 ^c	12,00 ± 1,00 ^c
BAOEC 5%	11,67 ± 0,76 ^c	11,67 ± 0,58 ^{bc}	11,67 ± 0,58 ^c	13,67 ± 0,58 ^{bc}	14,33 ± 0,58 ^b	12,33 ± 0,58 ^c
BAOEO 5%	21,67 ± 1,53 ^a	22,67 ± 0,57 ^a	26,67 ± 1,15 ^a	25,67 ± 1,53 ^a	21,33 ± 1,53 ^a	21,33 ± 2,08 ^a
BAOECO 1:1 5%	15,33 ± 1,15 ^b	12,67 ± 0,57 ^b	16,67 ± 0,57 ^b	15,33 ± 0,57 ^b	13,67 ± 0,57 ^b	15,67 ± 1,15 ^b

*Está incluso o diâmetro de 7 mm dos discos. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O filme de quitosana controle, ou seja, sem adição de OEs, apresentou formação de halos frente a todas as bactérias testadas (Tabela 3). Há diversos relatos na literatura da atividade antimicrobiana deste polímero (Fernandez-Saiz et al. 2010, Kong et al., 2010, Mehdizadeh et al., 2012), a qual é atribuída à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos micro-organismos, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e, conseqüente, inibição microbiana (Avadi et al., 2004; Yadav e Bhise, 2004).

Frente às bactérias *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*, somente houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os filmes controle de quitosana e os crescidos de OEs, na concentração 5% dos óleos de orégano e da combinação binária cravo-da-índia/orégano 1:1. Nas demais situações, não pode-se afirmar se os halos formados foram função da atividade da quitosana em si ou dos óleos utilizados.

Para o OE de cravo-da-índia, somente houve diferença significativa ($p < 0,05$) no tamanho dos halos formados, quando o mesmo foi utilizado na concentração de 5,0 %, alcançando 10,67 mm frente à bactéria *L. monocytogenes*. A quitosana pode formar ligações do tipo pontes de hidrogênio com os grupamentos hidroxila do eugenol, dificultando a liberação do mesmo para o ágar. O OE de cravo-da-índia tem demonstrado excelente potencial antibacteriano (Burt, 2004), tendo sua eficácia associada ao composto eugenol, o qual representou 89,58 % dos compostos majoritários do óleo utilizado na presente pesquisa.

O OE de orégano não diferiu significativamente ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações utilizadas, frente às bactérias *L. monocytogenes*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Quando testado frente a *S. aureus*, *M. luteus* e *S. choleraesuis*, os halos formados diferiram significativamente ($p < 0,05$) somente na concentração 5,0 %. A atividade antimicrobiana do OE de orégano é devida, principalmente, à presença do composto fenólico carvacrol na sua constituição (Burt, 2004), o qual representou 60,71 % dos compostos voláteis do óleo utilizado.

Tabela 3 - Halos médios* (mm) apresentados pelo biopolímero quitosana controle (BQC) e incorporado com OEs de cravo-da-índia (BQOEC), orégano (BQOEO) e cravo orégano 1:1 (BQOECO).

	<i>S.aureus</i> *	<i>M. luteus</i> *	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>E. coli</i> *	<i>S. choleraesuis</i> *	<i>P. aeruginosa</i> *
BQC	8,67±0,58 ^{def}	7,67±0,58 ^c	8,67±1,15 ^{cde}	8,67±0,58 ^{cd}	9,33±0,58 ^{cd}	8,33±1,15 ^c
BQOEC 1%	7,67±0,58 ^f	7,33±0,58 ^c	7,33±0,58 ^e	7,67±1,15 ^d	8,67±0,58 ^d	8,33±1,15 ^c
BQOEO 1%	10,33±0,58 ^c	8,33±0,58 ^c	9,67±0,58 ^{bcd}	10,67±0,58 ^{bc}	9,67±1,15 ^{cd}	10,33±0,58 ^{bc}
BQOECO 1:1 1%	9,33±0,58 ^{cde}	10,67±0,58 ^b	9,33±0,58 ^{bcd}	11,67±0,58 ^b	10,0±0 ^{cd}	10,67±1,15 ^{bc}
BQOEC 2,5%	8,33±0,58 ^{ef}	7,67±0,58 ^c	8,33±0,58 ^{de}	10,0±1,0 ^{bcd}	9,33±0,58 ^{cd}	9,67±0,58 ^{bc}
BQOEO 2,5%	10,67±0,58 ^c	8,67±0,58 ^c	10,0±0 ^{bcd}	11,33±0,58 ^b	10,0±1,0 ^{cd}	11,33±0,58 ^b
BQOECO 1:1 2,5%	10,0±0 ^{cd}	11,0±0 ^b	9,67 ±0,58 ^{bcd}	12,0±0 ^b	10,67±0,58 ^{cd}	11,67±1,15 ^b
BQOEC 5%	8,67±0,58 ^{def}	8,33±1,15 ^c	10,67±0,58 ^b	10,33±1,15 ^{bc}	11,0±1,0 ^{bc}	10,67±0,58 ^{bc}
BQOEO 5%	12,33±0,58 ^b	11,33±0,58 ^b	10,33 ±0,58 ^{bc}	11,67±1,15 ^b	12,67±0,58 ^b	12,0±1,0 ^b
BQOECO 1:1 5%	14,33±0,58 ^a	12,67±0,58 ^a	14,67±0,58 ^a	15,33±0,58 ^a	14,67±0,58 ^a	16,33±0,58 ^a

* Está incluso o diâmetro de 7 mm dos discos. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quando foi feita a combinação binária 1:1 dos OEs de cravo-da-índia e orégano, os halos formados diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), na concentração 5,0 %, para todas as bactérias testadas, sendo que os maiores halos foram observados para a bactéria *P. aeruginosa* (16,33 mm).

Na Tabela 4 podem ser observados os resultados do teste de difusão em ágar para os filmes produzidos à base de acetato de celulose. Na concentração 1 % dos OEs de cravo-da-índia, orégano e sua combinação binária 1:1, não houve formação de halo frente a nenhuma das bactérias testadas. Quando foi utilizada a concentração 2,5 %, o OE de orégano formou halos frente às bactérias *M. luteus*, *E. coli* e *S. cholerasuis*, não sendo observados halos para o OE de cravo-da-índia e combinações. Somente na concentração 5,0 % houve formação de halos para todas as bactérias testadas, nos OEs utilizados. Para a bactéria *S. aureus* não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os OEs utilizados na concentração 5,0 %, sendo este comportamento também observado para as bactérias *M. luteus* e *S. cholerasuis*. *L. monocytogenes*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram mais sensíveis ($p < 0,05$) aos filmes de acetato de celulose incorporados com 5,0 % de OE de orégano.

No processo de obtenção dos filmes de acetato de celulose, o qual diferiu dos demais filmes produzidos na presente pesquisa, pode-se observar a alta capacidade que este polímero possui de incorporar os OEs os quais a ele são adicionados, não necessitando da etapa de homogeneização. Relacionando este fato com o baixo desempenho obtido pelos OEs testados em comparação aos demais filmes produzidos, pode-se inferir que o polímero dificulta a liberação dos princípios ativos para o ágar, não ocorrendo conseqüentemente inibição microbiana, quando os OEs foram utilizados em concentrações mais baixas.

Por estes resultados, não se pode afirmar que não houve atividade antimicrobiana, já que esta pode ocorrer sem migração dos compostos ativos, resultando em uma inibição dos micro-organismos em contato direto com a superfície do filme (Pranoto et al., 2005). Segundo Cagri et al. (2001), uma interação entre grupamentos do polímero e os compostos ativos do agente incorporado pode reduzir ou até impedir a migração de compostos ativos para o sistema.

Tabela 4 - Halos médios* (mm) apresentados pelo biopolímero acetato de celulose controle (BA_CC) e incorporado com OEs de cravo-da-índia (BA_COEC), orégano (BA_COEO) e cravo orégano 1:1 (BA_COECO).

	<i>S.aureus</i> *	<i>M. luteus</i> *	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>E. coli</i> *	<i>S. choleraesuis</i> *	<i>P. aeruginosa</i> *
BA _C C	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^d	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^d
BA _C OEC 1%	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^d	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^d
BA _C OEO 1%	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^d	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^d
BA _C OECO 1:1 1%	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^d	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^d
BA _C OEC 2,5%	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^d	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^d
BA _C OEO 2,5%	0±0 ^b	8,0±1,0 ^a	9,0±0 ^b	10,33±0,58 ^a	9,33±0,58 ^a	10,0±0 ^{ab}
BA _C OECO 1:1 2,5%	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^d	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^d
BA _C OEC 5%	8,33 ±0,58 ^a	8,67 ±0,58 ^a	8,0±0 ^c	9,0±0 ^b	9,67±0,58 ^a	9,33±0,58 ^{bc}
BA _C OEO 5%	8,33 ±0,58 ^a	9,0±0 ^a	10,0±0 ^a	10,33±0,58 ^a	9,33±0,58 ^a	10,67±0,58 ^a
BA _C OECO 1:1 5%	7,67±0,58 ^a	8,0±0 ^a	8,33±0,58 ^{bc}	8,67±0,58 ^b	8,33±0,58 ^a	8,33±0,58 ^c

* Está incluso o diâmetro de 7 mm dos discos. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) dos filmes está apresentada na Figura 2. Nos biopolímeros à base de amido de milho, na concentração 1,0 % dos OEs e sua combinação, o OE de cravo-da-índia teve uma AA significativamente maior ($p < 0,05$) que os demais, tendo um desempenho semelhante à combinação binária com o OE de orégano na proporção 1:1, nas concentrações 2,5 e 5,0 %. Na concentração 5,0 % os desempenhos foram estatisticamente iguais para todos os OEs e combinações utilizadas.

Comportamento semelhante foi observado nos filmes de quitosana e acetato de celulose (Figura 2), com a diferença de que, nos de quitosana houve AA no tratamento controle (sem a adição de OEs). Diversos estudos têm reportado a habilidade antioxidante da quitosana, tendo sido avaliado seu uso em carnes e derivados e frutos do mar, os quais contêm quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, particularmente susceptíveis à oxidação lipídica durante seu processamento e armazenamento (Darmadji e Izumimoto, 1994; Shahidi et al. 2002; Kanatt et al., 2004; Fai et al., 2008).

O mecanismo de ação antioxidante da quitosana é atribuído à sua capacidade de quelar íons metálicos, tais como o ferro, ligados às moléculas de hemoglobina e mioglobina, o qual age como catalisador da reação (Fai et al., 2008). Yen et al. (2008) avaliaram a AA da quitosana pela atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), obtendo valores entre 7,44 – 22,4 %. Moradi et al. (2012), avaliaram a atividade antioxidante de filmes de quitosana incorporados com OE de tomilho e extrato de semente de uva, sendo que as películas que não foram suplementadas apresentaram uma AA de 12 %.

Scherer et al. (2009), ao analisarem a composição volátil do OE de cravo-da-índia por cromatografia gasosa, identificaram o eugenol como composto majoritário, com 83,75 % da área total, semelhante ao encontrado na presente pesquisa (89,58 %), atribuindo a ele forte ação antioxidante, já comprovada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Ito e Yoshino, 2005).

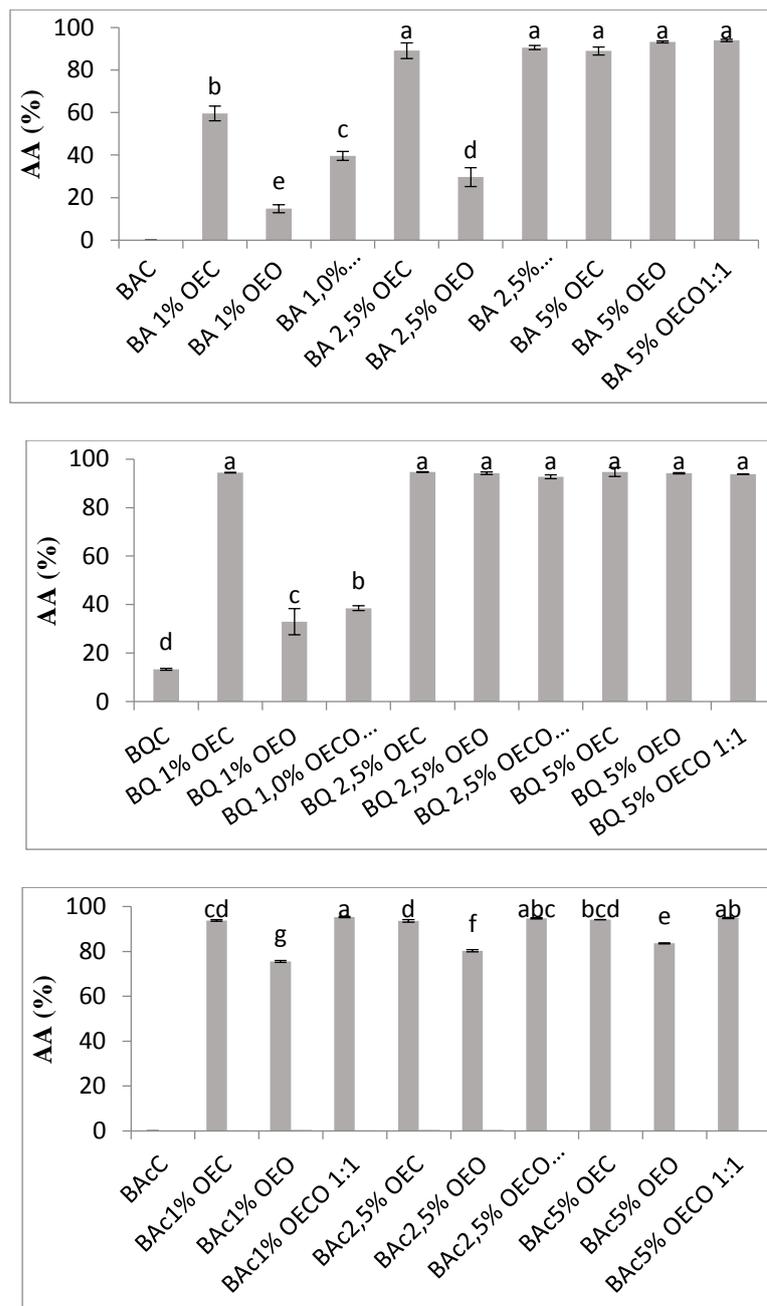


Figura 2 - Atividade antioxidante (AA) (%) dos biopolímeros amido de milho (BA), quitosana (BQ) e acetato de celulose controle (BAc) (C) e incorporados com diferentes % de OE de cravo-da-índia (OEC), OE de orégano (OEO) e OE cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1 (OECO).

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As diferenças observadas na atividade antioxidante entre os filmes produzidos à partir dos três polímeros, amido de milho, quitosana e acetato de celulose, para os mesmos OEs utilizados, nas suas diferentes concentrações, podem ser devidas a estrutura química dos mesmos. Como foi utilizado o metanol como solvente na realização do teste DPPH, dependendo da estrutura química do polímero, o mesmo extrai compostos ativos do filme em maior ou menor quantidade, o que conseqüentemente afetaria a AA.

4 CONCLUSÕES

O amido de milho e a quitosana, mostraram nos testes *in vitro*, serem biopolímeros adequados para a produção de filmes nos quais serão adicionados aditivos, possibilitando uma boa difusão dos OEs utilizados, no teste de difusão em ágar e a expressão da capacidade antioxidante dos óleos testados. Os filmes de acetato de celulose apresentaram formação de halos, para todas as bactérias avaliadas, somente quando utilizou-se 5 % dos OEs e combinações testadas. Os biopolímeros ativos contendo OE de cravo-da-índia, apresentaram atividade antioxidante (%) superior aos demais já nas menores concentrações utilizadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FAPERGS e SC&T-RS pelo suporte financeiro.

5 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, vol. 111: 343–350, 2012.

ARCE, C.C.A. **Caracterización de películas comestibles de quitosano y la afectación de las propiedades por aplicación de aceites esenciales**. Trabajo de grado (Especialista

en Ciencia y Tecnología de Alimentos) – Departamento de Química – Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2011. 33 p.

ASSISTAT[®]. Software Assistência Técnica. Universidade Federal de Campina Grande. www.assistat.com Download em abril de 2012.

AVADI, M.R.; SADEGHI, A.M.M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K.H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M.J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: synthesis, characterization and antibacterial effects. **European Polymer Journal**, vol. 40, p. 1355-1361, 2004.

BANGYEKAN, C.; AHT-ONG, D.; SRIKULKIT, K. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. **Carbohydrate Polymers**, vol. 63, p. 61–71, 2006.

BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. **Wiley-VCH**, p. 293, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, vol.94, p. 223–253, 2004.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. **Journal of Food Science**, vol. 66, n. 6, p. 865–870, 2001.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as effected by film thickness. **Journal of Food Science**, vol. 61, n. 3, p. 580-584, 1996.

DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, vol. 38, p. 243-254, 1994.

DU, W.X.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; HUA, S.S.T.; MCHUGH, T.H. Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. In **Science against microbial**

pathogens: communicating current research and technological advances, p. 1124-1134, 2011.

ESPITIA, P.J.P.; SOARES, N. DE F.F.S.; BOTTI, L.C.M.; SILVA, W.A. Effect of essential oils in the properties of cellulosic active packaging. **Macromolecular Symposia**, vol. 299/300, p. 199–205, 2011.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, vol.9, n. 5, p. 435-451, 2008.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LACEY, A. L.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, vol. 18, p. 46-52, 2009.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; OCIO, M.J. & LAGARON, J.M. Antibacterial chitosan-based blends with ethylene vinyl alcohol copolymer. **Carbohydrate Polymers**, vol. 80, n. 3, p. 874–884, 2010.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ, A.L.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatine chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, vol.27, p. 889-896, 2010.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, vol. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.

HUNTER ASSOCIATES LABORATORY. **Universal software versions 3.2 and above**: User's manual: manual version 1.5. Reston, 1997.

ITO, M.M.K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food Chemical Toxicology**, vol. 43, p. 461-466, 2005.

KANATT, S.R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Effect of irradiated chitosan on the rancidity of radiation processed lamb meat. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 39, p. 997-1003, 2004.

KONG, M.; GUANG, C.X.; XING, K.; JIN, P.H. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, vol. 51, n. 2, p. 60-74, 1997.

LÚCIO, L.M. de F.; SILVEIRA, M.F.A.; GERALDINE, R.M.; TAKEUCHI, K.P.; TORRES, M.C.L.; MOURA, C.J. de. Uso de filmes ativos antimicrobianos incorporados com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) na conservação de massa fresca. **Anais: 63ª Reunião Anual da SBPC**. Goiânia: UFG. 2011.

MEHDIZADEH, T.; TAJIK, H.; ROHANI, S.M.R.; OROMIEHIE, A.R. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. **Veterinary Research Forum**, vol. 3, n. 3, p. 167 – 173, 2012.

MOHAMMAD, O.; TUHIN, N.R.; HAQUE, M.E.; RUHUL, A.K.; DAFADER, N.C.; ISLAM, R.; NURNABI, M.; TONNY, W. Modification of mechanical and thermal property of chitosan-starch blend films. **Radiation Physics and Chemistry**, Manuscript. 2012. 43 p.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ROHANI, S.M.R.; OROMIEHIE, A.R.; MALEKINEJAD, H.; ALIAKBARLU, J.; HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 46, p. 477-484, 2012.

MONTERREY, E.S.; SOBRAL, P.J. do A. Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo usando uma

metodologia de superfície-resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 19, n. 2, p. 294-301, 1999.

OJAGH, S.M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S.H; HOSSEINI, S.M. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, vol. 120, p. 193–198, 2010.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 5598-5605, 2004.

PELLISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with orégano essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 57, p. 7499-7504, 2009.

PEREDA, M.; PONCE, A.G.; MARCOVICH, N.E.; RUSECKAITE, R.A.; MARTUCCI, J.F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, vol. 25, p. 1372-1381, 2011.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R. COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICOLLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências e Agrotecnologia**, vol.30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PIRES, A.C. dos S.; SOARES, N. de F.F.; ANDRADE, N.J. de; SILVA, L.H.M. DA; CAMILLOTO, G.P.; BERNARDES, P.C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology and Science**, vol. 21, p. 375–383, 2008.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT – Food Science and Technology**, vol. 38, p. 859-865, 2005.

ROJAS-GRAU, M.A.; SOBRINO-LOPEZ, A.; TAPIA, M.S.; MARTIN-BELLOSO, O. Browning inhibition in fresh-cut 'Fuji' apple slices by natural antibrowning agents. **Journal of Food Science**, vol. 71, p. 59-65, 2006.

ROTTA, J. **Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de quitosana e hidroxipropilmetilcelulose**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. 128 p.

SÁNCHEZ, A.A.; ESPINOSA, M.E.; VÁSQUEZ, E.N.O.; CAMBEROS, E.P.; VÁSQUEZ, R.S.; CARVANTES, E.L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 50, p. 585-590, 2010.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SHAHIDI, F.; KAMIL, J.; JEON, Y. J. Antioxidant role of chitosan in a cooked cod (*Gadus morhua*) model system. **Journal of Food Lipids**, vol. 9, n. 1, p. 57–64, 2002.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, vol. 24, p. 770-775, 2010.

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

TAKEUCHI, A.P.; GERALDINE, R.M., SILVEIRA, M.F.A.; MOURA, C.J. de. Efeito de diferentes concentrações de curcumina nas propriedades ópticas e mecânicas de filmes ativos de acetato de celulose. **Anais: 63^a Reunião Anual da SBPC**. Goiânia: UFG. 2011.

YADAV, A.V.; BHISE, S.B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, vol. 87, n. 9, p.1176-1178, 2004.

YEN, M.; YANG, J.; MAU, J. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, vol.74, p. 840-844. 2008.

YOSHIDA, C.M.P.; ANTUNES, A.J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 29, n. 2, p. 420-430, 2009.

ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA EM FILME BIOPOLIMÉRICO DE AMIDO – QUANTIFICAÇÃO, AÇÃO ANTIOXIDANTE E ACEITAÇÃO SENSORIAL

Mariane L. Ugalde^{a,b}, Aline M. de Cezaro^b; Felipe Vedovatto^b, Juliana Steffens^b, Geciane Toniazzo^b, Rogério L. Cansian^b

^a Instituto Farroupilha Federal - Campus Júlio de Castilhos – São João do Barro Preto s/n - Caixa Postal 38 - CEP 98130-000 – Júlio de Castilhos – RS, Brasil.

^b URI Erechim, Departamento de Ciências Agrárias, Av. Sete de Setembro, 1621- CEP 99700-000, Erechim – RS, Brasil.

RESUMO – Foram desenvolvidos filmes biopoliméricos de amido de milho incorporados com 1 % de óleo essencial (OE) de cravo-da-índia botão (*Eugenia caryophyllata*) objetivando seu uso no envelopamento de salsichas para avaliá-los enquanto embalagem ativa. O eugenol foi identificado como composto volátil majoritário (89,58 %) do OE. Na concentração de 1 % do OE no filme, o mesmo apresentou rápida liberação inicial do OE (~30 % nas primeiras 24 horas) e posterior liberação de forma lenta e constante até os 30 dias. A presença do OE nos filmes interferiu negativamente na aceitação dos produtos na análise sensorial, com relação aos aspectos sabor e aroma. Foi observado efeito antioxidante do OE nos produtos, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com relação aos valores de TBA ao final dos 15 dias de armazenamento refrigerado. Não ficou evidente uma relação entre oxidação lipídica e os parâmetros de cor dos produtos.

Palavras-chave – óleo essencial, biopolímeros, antioxidante, salsicha.

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental, devido ao descarte de filmes plásticos de polímeros sintéticos sem nenhum controle é um grande problema mundial. Película é um filme fino preparado a partir de materiais biológicos, o qual age como barreira a elementos externos e, conseqüentemente, pode proteger o produto embalado de danos físicos e biológicos e aumentar a sua vida útil (Henrique et al, 2008). Devido a sua abundância e degradabilidade, muitos pesquisadores tem utilizado o amido para a elaboração de películas biodegradáveis (Pelissari, 2009). Segundo Shimazu et al. (2007), a aplicação do amido na preparação de películas se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e filmes.

Pesquisas atuais se dedicam ao estudo de embalagens capazes não só de proteger, mas de interagir com o produto. As embalagens ativas são desenvolvidas para interagir de forma desejável com o produto, mudando as condições de acondicionamento para aumentar a vida de prateleira e melhorar a sua segurança ou as suas propriedades sensoriais. Os filmes que recebem aditivos e estão em contato com a superfície do produto liberam, de forma gradativa, o composto para a superfície do alimento, onde a maioria das reações químicas e microbiológicas ocorrem (Soares et al., 2006).

Os consumidores mais conscientes e informados demandam produtos seguros e de qualidade atestada, obtidos a partir de boas práticas de fabricação e controle de riscos. Nessa direção têm sido desenvolvidas pesquisas visando a substituição de aditivos sintéticos utilizados para auxiliar na preservação dos alimentos, seja de alterações químicas quanto microbiológicas, por elementos mais naturais, menos agressivos a saúde do consumidor e ao meio ambiente. Uma opção seria o uso de óleos essenciais (OEs), substâncias naturais voláteis de origem vegetal classificados como GRAS (Generally Regarded As Safe), o que os torna atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (Pereira et al., 2006).

Os OEs são líquidos aromáticos e voláteis extraídos de componentes das plantas como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e da planta inteira (Sanches et al., 2010). São considerados metabólitos secundários das plantas, tendo função relevante na

sua defesa, atuando como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Embora a indústria de alimentos os utilize principalmente como aromatizantes, os mesmos representam uma fonte antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver filmes biopoliméricos à base de amido de milho incorporados com OE comercial de cravo-da-índia botão (*Eugenia caryophyllata*), quantificar sua incorporação e determinar atividade antioxidante e aceitação sensorial quando utilizados no envelopamento de salsichas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Elaboração dos filmes biopoliméricos

Os filmes foram preparados à partir de uma solução contendo 3 % de amido de milho (p/v), 30 % de glicerol (p/p) (Proton Química[®]) como agente plastificante, suspensos em água destilada, pela metodologia *casting*. Os componentes foram misturados e aquecidos sob agitação gradualmente em banho-maria em aquecedor magnético até atingir a temperatura de 80 °C/10 minutos. A solução filmogênica (SF) foi resfriada até a temperatura de 40 °C para ser feita a adição do OE comercial de cravo-da-índia botão (*Eugenia caryophyllata*) (Ferquima[®]), na proporção de 1,0 % (v/v), sendo posteriormente submetida à agitação em equipamento turrax por três minutos. Manteve-se uma SF sem a adição de OE.

Posteriormente as SF eram vertidas em placas de acrílico de 15 x 15 cm previamente higienizadas com álcool 70 % até um peso de 90 g, objetivando a formação de filmes com espessura homogênea, sendo submetidas à secagem em estufa com circulação de ar à uma temperatura de 40 °C por 24 horas. Passado este período, os filmes eram retirados das placas e armazenados em recipientes lacrados à temperatura de 4 °C até as análises posteriores.

2.2 Quantificação do OE

A quantificação do OE efetivamente incorporado nos filmes foi determinada por cromatografia gasosa. 10 g de filme foram diluídas em 40 mL de água destilada e mantidas sob agitação a 4 °C por 6 horas. Posteriormente foi feita uma separação líquido/líquido com adição de 10 mL de hexano, em funil de separação. O OE recuperado na fase orgânica foi analisado por cromatografia gasosa e a área do pico majoritário foi comparada à área do mesmo pico cromatográfico de 10 mL de uma solução contendo 10.000 ppm do OE em análise. A concentração de OE efetivamente incorporado foi obtida pela seguinte equação:

$$[\] \text{ incorporada} = \frac{[\] \text{ óleo} \times \text{Área filme}}{\text{Área óleo}} \quad (1)$$

Onde:

[] incorporada = concentração de óleo efetivamente incorporada (mg/10 g de filme)

[] óleo = concentração do óleo essencial em 10 mL de hexano (10.000 ppm convertido para mg/10mL);

Área filme = Área do pico majoritário de 10g do filme em 10 mL de hexano;

Área óleo = Área do pico majoritário do óleo essencial em 10 mL de hexano (10.000 ppm convertido para mg/10mL).

A análise cromatográfica foi feita em equipamento Shimadzu GC-2010. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30m x 250µm i.d.), 0,25µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180 °C (3 °C/min), 180-230 °C (20 °C/min), 230 °C (20min), temperatura do injetor 250 °C, detector a 275 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H₂ (56 KPa), volume injetado de 1,0 µL de amostra diluída em n-hexano (1:10) (Merck®).

Foram feitas avaliações nos tempos 0 dia, 1 dia, 7 dias, 15 dias, 21 dias e 30 dias, considerando-se a massa de 10 g de filme, com a concentração de 1% de OE de cravo-da-índia, o qual foi o mesmo utilizado no envelopamento das salsichas. Durante os diferentes tempos, os filmes foram mantidos em contato com papel filtro umedecido (0,3

mL de água/g de papel filtro m/m), visando simular a liberação gradual do óleo essencial para o produto.

2.3 Aplicação dos filmes biopoliméricos em salsichas

Filmes de amido de milho incorporadas com 1 % de OE foram aplicados em salsichas, avaliando-se sua efetividade enquanto embalagem ativa. Optou-se por esta percentagem, em função da mesma ter apresentado atividade antioxidante alta em testes *in vitro* realizados previamente. As salsichas foram adquiridas no comércio local, todas de um mesmo lote, transportadas refrigeradas até o local dos experimentos, onde foram envelopadas com os filmes de amido (sem OE) (A) ou amido + 1% de OE de cravo-da-índia) (A1 %) (Figura 1) e armazenadas sob refrigeração 2 ± 2 °C, para as análises posteriores. Para fins comparativos, manteve-se um tratamento no qual as salsichas não sofreram o envelopamento (controle) (C).

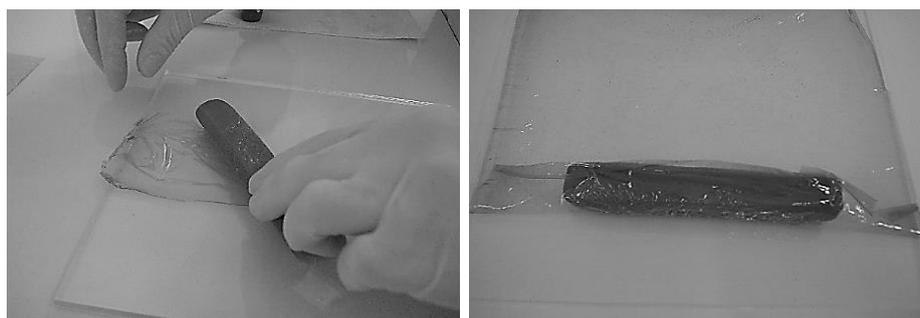


Figura 1 – Envelopamento prévio das salsichas com filmes de amido.

2.4 Avaliação dos produtos

As salsichas foram avaliadas durante sua vida de prateleira, com relação aos seguintes aspectos: oxidação lipídica, características sensoriais, pH, atividade de água e parâmetros colorimétricos (L^* , a^* , b^*). Para definir este período, levou-se em consideração a validade estipulada pela indústria após abertura da embalagem pelo consumidor, a qual é de 8 dias.

No quinto dia após o envelopamento das salsichas, com o objetivo de verificar a aceitabilidade dos produtos, foi realizada uma avaliação sensorial dos mesmos, utilizando-se os testes de diferença do controle (Figura 2), o qual é aplicado quando se tem mais de uma amostra a ser avaliada e comparada com um padrão, obtendo-se a diferença e o grau dessa diferença segundo um atributo específico (Minin, 2006) e de aceitação global (Figura 3). A avaliação foi conduzida com quarenta pessoas de ambos os sexos, não treinadas, pertencentes à instituição onde a mesma foi realizada (alunos, professores e demais servidores), as quais foram convidadas a fazer parte do teste.

Para efeito de análise estatística, as categorias da escala foram convertidas em valores numéricos, sendo atribuído o valor 0 para "nenhuma diferença" e 8 para "extremamente diferente" no teste de diferença do controle. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Dunnet a 5 % de significância, o qual é indicado para comparar os tratamentos em relação a um tratamento testemunha (controle) (Banzato e Kronka, 2006), utilizando-se o Software ASSISTAT®.

Atribuiu-se 9 para "gostei muitíssimo" e 1 para "desgostei muitíssimo" no teste de aceitação global. Os resultados do teste de aceitação global foram avaliados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e comparação entre as médias através do teste de Tukey, utilizando o Software ASSISTAT®.

TESTE DIFERENÇADO CONTROLE

Data: ___/___/___
 Faixa etária: até 20 anos () até 30 anos () acima de 30 anos ()
 Escolaridade.....

Você está recebendo uma amostra **padrão (P)** e três amostras codificadas de **SALSICHA**. Prove a amostra padrão e em seguida prove cada uma das amostras codificadas e avalie na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em termos de **COR, SABOR e AROMA** da amostra padrão.

0 Nenhuma diferença
1
2 Ligeiramente diferente
3
4 Moderadamente diferente
5
6 Muito diferente
7
8 Extremamente diferente

Amostra	Diferença (COR)	Diferença (SABOR)	Diferença (AROMA)
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

Comentários:.....

Figura 2 - Ficha utilizada para aplicação do teste diferença do controle.

TESTE DE ACEITAÇÃO SENSORIAL GLOBAL

Data: ___/___/___ Faixa etária: até 20 anos () até 30 anos () acima de 30 anos ()
 Escolaridade.....

Avalie cada uma das amostras de salsicha codificadas da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra.

9-gostei muitíssimo
 8-gostei muito
 7-gostei moderadamente
 6-gostei ligeiramente
 5-nem gostei/nem desgostei
 4-desgostei ligeiramente
 3- desgostei moderadamente
 2- desgostei muito
 1-desgostei muitíssimo

Amostra	Valor
.....
.....
.....

Comentários:.....

Figura 3 - Ficha utilizada para aplicação do teste de aceitação global.

Para a avaliação da oxidação lipídica, foi utilizado o método de quantificação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), segundo metodologia descrita por Sorensen e Jorgensen (1996), em intervalos de tempo pré-estabelecidos, durante o *shelf life* dos produtos.

O pH dos produtos foi determinado de acordo com Terra e Brum (1985). A atividade de água (Aa) foi obtida com o equipamento Aqualab® e os parâmetros de cor L*, a* e b* através do uso de colorímetro Minolta®, no início e fim dos experimentos.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo que os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparação entre as médias dos resultados ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para tratamento dos dados foi utilizado o Software ASSISTAT®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação do OE

Neste trabalho o óleo essencial de cravo-da-índia, o qual apresentou o eugenol como composto volátil majoritário (89,58 %), foi incorporado em filmes biopoliméricos de amido de milho visando uma liberação prolongada do óleo em produtos alimentícios. A cinética de liberação do óleo foi investigada em um sistema visando simular um produto cárneo embutido. Os experimentos foram conduzidos nos tempos de 0 a 30 dias em triplicata, obtendo-se uma liberação final de aproximadamente 78% do óleo incorporado. Os dados experimentais de cinética de liberação do óleo essencial de cravo-da-índia estão apresentados na Figura 4.

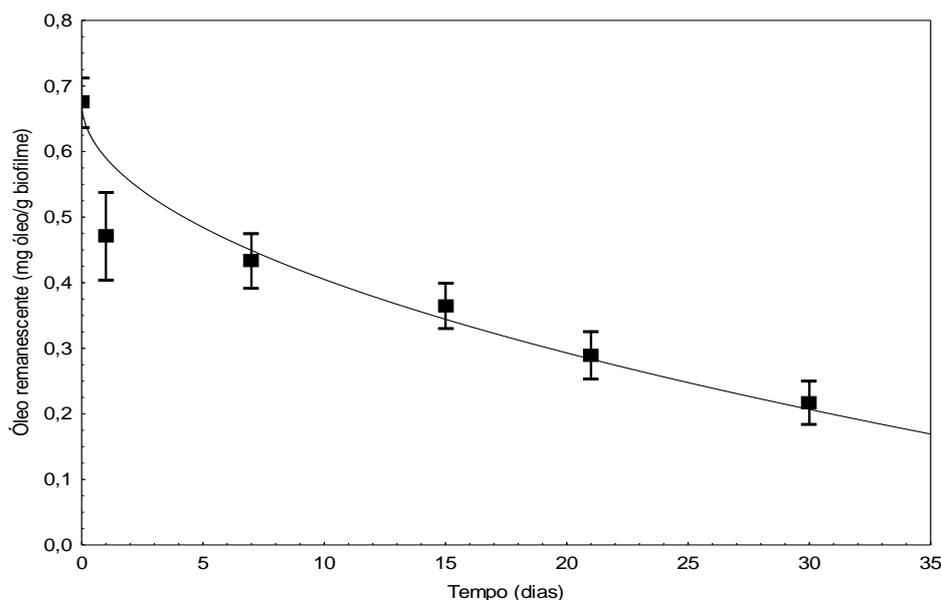


Figura 4 – Curva de liberação do OE de cravo-da-índia referente ao filme de amido de milho com a concentração de 1%.

Os resultados experimentais mostram o decréscimo da concentração do OE presente nos filmes nos tempos de 0, 1, 7, 15, 21 e 30 dias, cuja concentração para cada tempo foi de $0,68 \pm 0,04$; $0,47 \pm 0,07$; $0,43 \pm 0,04$; $0,36 \pm 0,03$; $0,29 \pm 0,04$ e $0,22 \pm 0,03$ mg de óleo/g de filme, respectivamente. A curva de liberação do óleo essencial apresentada na Figura 4 apresenta um comportamento que corrobora com resultados apresentados na literatura acerca de liberação de óleos essenciais e princípios ativos a partir de matrizes poliméricas (Sansukcharearnpon et al., 2010; Sánchez-González et al., 2011; Beirão da Costa et al., 2013).

Segundo a literatura, a liberação de óleos essenciais a partir de matrizes poliméricas é constituída de duas fases diferentes. Na primeira fase ocorre uma liberação rápida do óleo essencial (*burst effect*) devido à expansão volumétrica do polímero em função da difusão das moléculas de solvente para o interior da rede polimérica, quando em contato com um meio aquoso, causando a hidratação do polímero (Sánchez-González et al., 2011; Beirão da Costa et al., 2013). No presente estudo, acredita-se que este efeito tenha sido o principal responsável pela rápida liberação inicial de óleo essencial (~30%

nas primeiras 24 horas) através do filme para o meio aquoso. Já na segunda fase, vários são os efeitos combinados que tornam a cinética de liberação praticamente de ordem zero. O principal deles é o aumento do caminho da difusão do óleo essencial do interior da matriz polimérica para o meio aquoso externo associado à interações físicas e químicas do óleo essencial com a estrutura da matriz polimérica. Assim, a liberação do óleo essencial nesta etapa (em tempos mais longos) acontece de maneira lenta e constante (Beirão da Costa et al., 2013).

Filmes comestíveis podem reduzir a difusão, uma vez que o OE faz parte da sua estrutura, interagindo com o polímero e o plastificante. A capacidade de liberação do princípio ativo depende de muitos fatores, incluindo interação eletrostática entre o agente e o polímero corrente, osmose, as alterações estruturais e ambientais. Giménez et al. (2013) avaliaram a cinética de liberação de compostos ativos a partir de filmes produzidos com ágar e ágar-gelatina incorporados com chá verde. A presença de gelatina na matriz do filme impediu a liberação dos compostos fenólicos totais em água, com consequente redução da capacidade antioxidante do mesmo.

Comparado com a aplicação direta do agente, seriam necessárias menores quantidades de agentes ativos quando filmes comestíveis são utilizados, a fim de conseguir uma vida útil específica devido a uma liberação gradual em superfícies alimentares (Ponce et al., 2008; Sebtí et al., 2005).

3.2 Avaliação dos produtos

Avaliação sensorial

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias obtidas pelos produtos no teste de diferença do controle, com relação aos parâmetros cor, sabor e aroma. Com relação à cor não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, sendo que as maiores médias (0,77) foram atribuídas aos produtos envelopados com amido acrescido de 1 % de OE de cravo-da-índia. Este mesmo tratamento foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos demais nos parâmetros sabor e aroma, com médias de 4,02 e 3,3, respectivamente, evidenciando o efeito negativo da adição do OE nos produtos.

Embora os OEs tenham suas ações antimicrobianas e antioxidantes documentadas (Caballero et al., 2003; Burt, 2004; Hyldgaard et al., 2012; Shahidi, 1997; Miguel, 2010), uma das maiores limitações ao seu uso como conservante em alimentos é o efeito negativo na qualidade sensorial dos produtos. Como na presente pesquisa o óleo não foi incorporado diretamente na matriz do alimento, mas sim nos biofilmes, esperava-se que esse efeito fosse menos pronunciado.

Krkić et al. (2013) ao avaliarem salames fermentados envelopados com filmes compostos de quitosana + 0,2 % de óleo essencial de orégano, observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) favoráveis nos parâmetros sabor e odor dos produtos após sete meses de estocagem, em comparação ao grupo controle. Li et al. (2013) observaram um aumento do período de aceitação sensorial de filés de peixe envelopados com quitosana + 0,2 % de extrato de semente de uva ou polifenóis de chá, de 6 a 8 dias em comparação com as amostras controle.

Tabela 1 – Médias* das notas do teste de diferença do controle das amostras de salsicha controle (C), envelopadas com amido (A) e amido + 1 % de OE de cravo-da-índia (A1%).

Amostras	Médias ± Desvio padrão		
	Cor	Sabor	Aroma
C	0,45±0,78 ^a	1,15±1,09 ^b	0,7±0,91 ^b
A	0,75±1,19 ^a	1,47±1,32 ^b	1,2±1,32 ^b
A1%	0,77±1,31 ^a	4,02±2,23 ^a	3,3±2,29 ^a
d.m.s.**	0,59	0,81	0,86

* médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Dunnet. Escala estruturada de 8 pontos, sendo 0 para "nenhuma diferença" e 8 para "extremamente diferente". ** diferença mínima significativa.

No teste de aceitação global das amostras, as salsichas envelopadas com amido acrescido de OE obtiveram as menores médias (Tabela 2 e Figura 5), alcançando uma média de 4,92 na escala hedônica estruturada, confirmando assim uma possível rejeição do consumidor frente ao produto avaliado.

Tabela 2 – Médias* obtidas através de escala hedônica estruturada** no teste de aceitação global das amostras de salsichas controle (C), envelopadas com amido (A) e amido + 1 % de OE de cravo-da-índia (A1%).

Amostras	Médias ± Desvio padrão
C	7,87±1,21 ^a
A	7,65±1,66 ^a
A1%	4,92±2,64 ^b
d.m.s.	1,00

* médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

**9=gostei muitíssimo, 8=gostei muito, 7=gostei moderadamente, 6=gostei ligeiramente, 5=nem gostei/nem desgostei, 4=desgostei ligeiramente, 3=desgostei moderadamente, 2=desgostei muito, 1=desgostei muitíssimo.

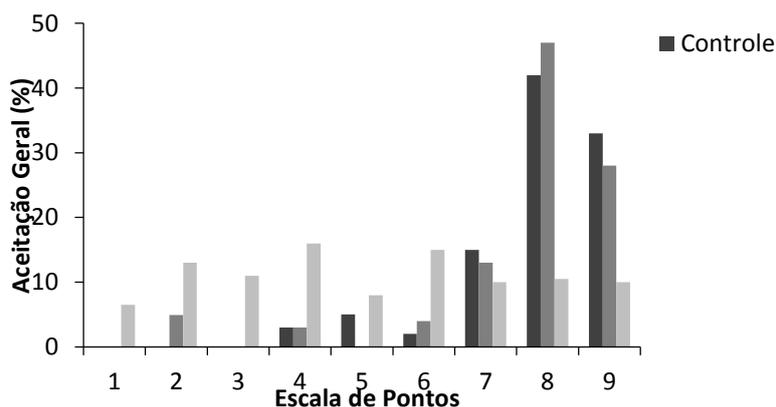


Figura 5 – Histograma de frequência dos valores atribuídos a aceitação de salsichas envelopadas com amido, amido + 1 % de OE de cravo-da-índia e controle.

Oxidação lipídica

O teste de TBARS quantifica o malonaldeído, um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formado durante o processo oxidativo.

Os valores médios de TBARS, obtidos durante a armazenagem refrigerada das salsichas estão apresentados na Figura 6. No dia 0, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$), com valores de TBARS oscilando entre 0,057 e 0,075 mg malonaldeído.Kg⁻¹. Após 7 dias de armazenagem, as maiores médias foram observadas nos tratamento controle e amido com 1% de OE de cravo-da-índia (valores entre 0,069 e 0,092) e as menores nas salsichas envelopadas apenas com filme de amido de milho (0,058).

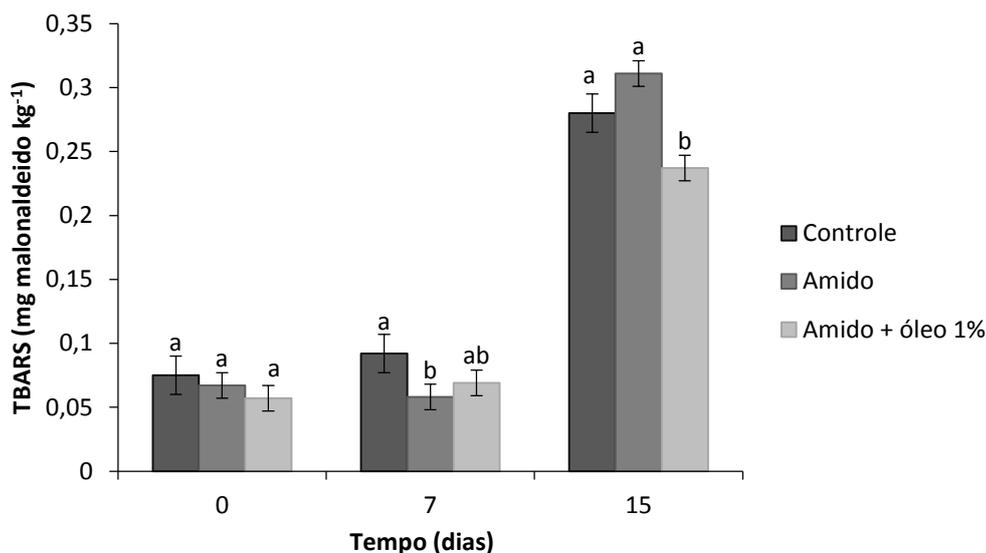


Figura 6 - Resultados médios do índice TBARS (mg malonaldeído.Kg⁻¹) das amostras de salsicha armazenadas sob refrigeração (5 °C).

*médias com letras diferentes no mesmo dia de análise são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No 15° dia de armazenagem, o tratamento com as amostras de salsicha envelopadas com filme de amido de milho contendo 1 % de óleo essencial, diferiu significativamente ($p < 0,05$) das amostras controle e somente envelopadas com filme de amido de milho, alcançando um valor de 0,237 mg de malonaldeído.Kg⁻¹. De acordo com Gadekar et al. (2008), o limite aceitável de oxidação lipídica é 1 mg de malonaldeído.Kg⁻¹, valor o qual não foi alcançado por nenhuma das amostras durante o período de armazenamento.

Gülçin et al. (2012) a partir de diferentes testes *in vitro* avaliando a atividade antioxidante do OE de cravo-da-índia, verificaram que o mesmo foi eficiente em diferentes ensaios, incluindo redução dos radicais DPPH e ABTS, índice de peróxidos, capacidade quelante de metais, comparado com os compostos antioxidantes convencionais como BHA, BHT, α -tocoferol, podendo ser usado para minimizar ou evitar a oxidação lipídica em produtos alimentares. Apresenta como substância majoritária o eugenol, responsável pela atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (Oliveira et al., 2009), o qual representou 89,52 % dos compostos voláteis majoritários do óleo utilizado.

No presente estudo evidenciou-se a ação antioxidante do OE de cravo-da-índia, sendo que a curva de liberação do filme de amido com 1 % do óleo (Figura 3) mostra que a máxima liberação do mesmo ocorre até o 15º dia, havendo após um decréscimo da mesma (comportamento exponencial).

Acín (2011) avaliou a cinética de liberação dos compostos eugenol e carvacrol (1 %) à partir de uma película produzida com proteínas isoladas do soro de leite em três simuladores de alimentos, azeite de oliva, água e solução aquosa de etanol 10 % (v/v). A difusão do composto ativo foi mais rápida nos simuladores polares, chegando a 90 % após duas horas de contato, do que no azeite de oliva apolar, com uma percentagem de 32 %.

Filmes ativos antioxidantes foram produzidos pela incorporação de ácido ascórbico, ácido ferrúlico, quercetina e extrato de chá verde em matriz à base de um copolímero de etileno álcool vinílico (EVOH). Na exposição das películas a vários simuladores de alimentos, ficou evidente que a liberação das substâncias ativas era dependente do meio e tipo de antioxidante utilizado (López-de-Dicastillo et al., 2012).

A migração do antioxidante à partir do polímero para o alimento é um processo complexo, afetado principalmente pelas propriedades da matriz do polímero, da natureza da substância antioxidante e das características da superfície do produto (López-de-Dicastillo et al., 2012).

Os teores e o comportamento de substâncias ativas incorporadas em materiais de embalagens dependem em parte da natureza do polímero e das características químicas

do migrante, incluindo polaridade, solubilidade, grupos funcionais e hidrofobia (Terhany e Desobry, 2007).

pH

Os resultados obtidos na determinação do pH das amostras podem ser acompanhados na Figura 7. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes tratamentos durante o armazenamento refrigerado dos produtos, com valores entre 5,97 e 6,07. Alguns pesquisadores relatam uma tendência de queda dos valores de pH de salsichas durante sua estocagem, provavelmente em decorrência do desenvolvimento de bactérias lácticas, importante grupo de micro-organismos deteriorantes de embutidos cozidos (Ferraccioli, 2012). Em contrapartida, bactérias Gram-negativas como *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, bem como bolores e leveduras, degradam proteínas e aminoácidos resultando na formação de amônia com conseqüente incremento do pH (Nychas et al., 1998).

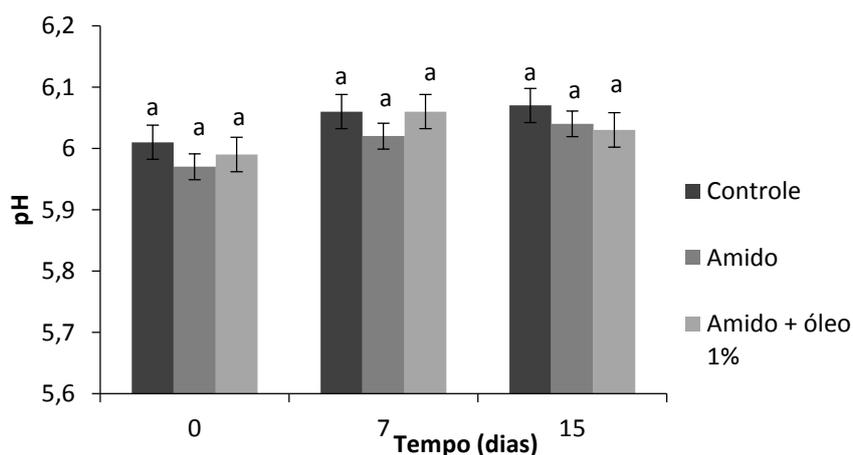


Figura 7 - Resultados médios de pH das amostras de salsicha armazenadas sob refrigeração (5 °C).

*médias com letras diferentes no mesmo dia de análises são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Atividade de água (Aa)

A Aa é um dos fatores mais relevantes para a multiplicação microbiana e consequentemente para a estabilidade dos alimentos. No dia 0, houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos tratamentos controle e amido (0,98) em relação ao tratamento com 1% de óleo essencial (0,97). No último dia de análises (15 dias), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, com valores de atividade de água de $0,97 \pm 0,001$. A maioria dos micro-organismos, incluindo as bactérias patogênicas, desenvolvem-se em uma faixa de Aa entre 0,98 e 0,99, denotando a importância de serem adotadas medidas preventivas adicionais para assegurar a segurança microbiológica de produtos como as salsichas.

A mobilidade dos compostos ativos em redes poliméricas ativas é decisiva para garantir a liberação dos mesmos para o alimento sendo que, somente em produtos com alta atividades de água, a aplicação de películas isso é conseguido satisfatoriamente. A falta de hidratação do filme, que pode ocorrer em alimentos de baixa atividades de água ou gordurosos, pode inibir o efeito da liberação do composto e a preservação ativa do filme pode não ser observada (Beirão-da-Costa et al. 2013).

Parâmetros colorimétrico (L^* , a^* , b^*)

Atributos de cor são de primordial importância, pois influenciam diretamente a aceitação dos produtos por parte do consumidor. Neste sentido, mesmo não havendo parâmetros para cor de salsichas, foram mensuradas, a partir do espectro de reflexão das amostras, as coordenadas L^* , a^* e b^* do espaço CIE (Comission Internationale de L'Éclairage), L^* a^* b^* , os quais estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados médios* dos cromas L*, a* e b* das amostras de salsicha armazenadas sob refrigeração (5 °C).

Parâmetro	Tempo (dias)	Controle	Amido	Amido 1% OE cravo-da-índia
L*	0	41,65 ± 4,62 ^a	49,73 ± 1,99 ^a	42,55 ± 4,89 ^a
	15	42,24 ± 2,48 ^a	42,9 ± 3,33 ^a	43,97 ± 0,71 ^a
a*	0	18,89 ± 1,69 ^b	23,41 ± 1,64 ^a	20,39 ± 1,36 ^{ab}
	15	19,82 ± 0,70 ^{ab}	20,49 ± 1,01 ^a	17,43 ± 2,19 ^b
b*	0	11,58 ± 1,04 ^b	14,53 ± 1,17 ^a	12,80 ± 0,76 ^{ab}
	15	12,94 ± 0,57 ^a	12,76 ± 0,64 ^a	9,86 ± 1,80 ^b

*médias com letras diferentes no mesmo dia de análises são significativamente diferentes (p<0,05) pelo teste de Tukey.

O atributo L* (luminosidade) não sofreu alterações significativas (p>0,05) em nenhum dos tratamentos durante o período de avaliação, apresentando valores entre 41,65 e 49,73 no dia 0 e 42,24 e 43,97 no 15° dia de avaliação. Alterações na luminosidade de produtos cárneos podem estar relacionadas com a oxidação lipídica dos produtos pois, durante o armazenamento, os peróxidos ou produtos da sua degradação podem interagir com as proteínas e aminoácidos e formar pigmentos escuros (Araújo, 2011).

O croma a* apresentou valores positivos em todas as amostras avaliadas, indicando a presença da cor vermelha. No dia 0 os valores ficaram entre 18,89 e 23,41 sendo que as maiores médias foram observadas nas amostras envelopadas com biofilme de amido. No 15° dia de análises, os valores ficaram entre 17,43 e 20,49, havendo diferença significativa (p<0,05) entre as salsichas envelopadas com amido + 1% de OE de cravo-da-índia das demais.

Os valores do croma b* ficaram entre 11,58 e 14,53 no dia 0, com as maiores médias observadas nas salsichas envelopadas com biofilme de amido. Após 15 dias de armazenamento refrigerado, as médias ficaram entre 9,86 e 12,94, sendo que somente as salsichas envelopadas com amido + 1% de OE diferiram significativamente das demais (p<0,05).

Assim, pode-se verificar que em ambos os parâmetros, croma a^* e b^* , as amostras envelopadas com amido + 1 % de OE de cravo-da-índia, diferiram significativamente das demais, evidenciando despigmentação dos produtos, embora a mesma não foi observada visualmente. Não ficou evidente uma relação entre oxidação lipídica (Figura 8) e os parâmetros de cor (Tabela 3).

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que, com uma concentração de 1 % do OE de cravo-da-índia no filme de amido de milho, a mesma apresentou uma rápida liberação inicial do OE (~30 % nas primeiras 24 horas) e posterior liberação de forma lenta e constante até os 30 dias.

A presença do OE de cravo-da-índia nos filmes interferiu negativamente na aceitação das salsichas na análise sensorial, com relação aos aspectos sabor e aroma. Foi observado efeito antioxidante do OE nos produtos, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com relação aos valores de TBA ao final dos 15 dias de armazenamento refrigerado. Não ficou evidente uma relação entre oxidação lipídica e os parâmetros de cor dos produtos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FAPERGS e SC&T-RS pelo suporte financeiro.

5 REFERÊNCIAS

ACÍN, J.M.O. **Estudio de la difusión del carvacrol y el eugenol desde películas de proteína de suero lácteo a diferentes simulantes alimentarios**. Máster Tecnologías y calidad en las industrias agroalimentarias). Departamento de Tecnología de los Alimentos, Universidad Pública de Navarra. 2011. 65 p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos** - Teoria e Prática. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 478 p.

ASSISTAT[®]. Software Assistência Técnica. Universidade Federal de Campina Grande. www.assistat.com Download em abril de 2012.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4^a ed. Funep: Jaboticabal, 2006. 237 p.

BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. **Wiley-VCH**, p. 293, 2001.

BEIRÃO-DA-COSTA, S.; DUARTE, C.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; SERRA, A.T.; MARTINS, M.M.; JANUÁRIO, M.I.N.; VICENTE, A.A.; DELGADILLO, I.; DUARTE, C.; BEIRÃO DA COSTA, M.L. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. **Journal of Food Engineering**, vol. 110, p. 190–199, 2012.

BEIRÃO-DA-COSTA, S.; DUARTE, C.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; JANUÁRIO, M.I.N.; VICENTE, A.A.; BEIRÃO-DA-COSTA, M.L.; DELGADILLO, I. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. **Food Hydrocolloids**, vol. 33, p. 199-206, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, vol.94, p. 223–253, 2004.

FERRACCIOLI, V. R. **Avaliação da qualidade de salsichas do tipo hot dog durante o armazenamento**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2012. 116 p.

GADEKAR, Y.P.; ANJANEYULU, A.S.R.; KANDEEPAN, G.; MENDIRATTA, S.K.; KONDAIAH, N. Safe pickle with improved sensory traits. **Fleischwirtschaft International**, vol. 4, p. 56-63, 2008.

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

GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, vol. 5, p. 489–499, 2012.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, vol. 3 (article 12), 2012.

KRKIĆ, N.; ŠOJIĆ, B.; LAZIĆ, V.; PETROVIĆ, L.; MANDIĆ, A.; SEDEJ, I.; TOMOVIĆ, V. Lipid oxidative changes in chitosan-oregano coated traditional dry fermented sausage Petrovskáklobása. **Meat Science**, vol. 93, p. 767–770, 2013.

LI, T.; LI, J.; HU, W.; LI, X. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. **Food Chemistry**, vol. 138, p. 821–826, 2013.

LIU, D. C.; TSAU, R.-T.; LIN, Y.-C.; JAN, S.-S.; TAN, F.-J. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. **Food Chemistry**, vol. 117, p. 106-113, 2009.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; GÓMEZ-ESTACA, J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.; PILAR HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, vol. 131, p. 1376–1384, 2012.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, vol. 15, p. 9252-9287, 2010.

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial – estudos com consumidores**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 225 p.

NYCHAS, G.-J. E.; DROSINOS, E. H.; BOARD, R. G. Chemical changes in stored meat. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.). **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, p. 288-326, 1998.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

PELLISSARI, F. M. **Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol com incorporação de óleo essencial de orégano**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009. 124 p.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R. COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICOLLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências e Agrotecnologia**, vol. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PONCE, A.G.ROURA, S. I. VALLE, C. E. del.MOREIRA, M. R. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 294-300, 2008.

SÁNCHEZ, A.A.; ESPINOSA, M.E.; VÁSQUEZ, E.N.O.; CAMBEROS, E.P.; VÁSQUEZ, R.S.; CARVANTES, E.L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 50, p. 585-590, 2010.

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

SANSUKCHAREARNPON, A.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.; LEEPIPATPAIBOON, N.; KERDCHAROEND, T.; ARAYACHUKEAT, S. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: Preparation and release behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 391, p. 267–273, 2010.

SEBTI, I. MARTIAL-GROS, A. CARNET-PANTIEZ, A. GRELIER, S. COMA, V. Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. 100-104, 2005.

SHAHIDI, F. **Natural Antioxidants - Chemistry, Health Effects and Applications**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1997. 414 p.

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

SOARES, N. DE F.F.; PIRES, A.C. DOS S.; ENDO, É.; VILELA, M. A. P.; SILVA, A.F. DA; FONTES, E. A. F.; MELO, N.R. DE. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo na conservação de batata minimamente processada. **Revista Ceres**, vol. 53, n. 307, p. 387-393, 2006.

SORENSEN, G.; JORGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A**, vol. 202, p. 205–210, 1996.

TEHRANY, E.A.; DESOBRY, S.; Partition coefficient of migrants in food simulants/polymers systems. **Food Chemistry**, vol. 101, p. 1714-1718. 2007.

TERRA, N.N.; BRUM, M.A.R. **Carne e seus derivados: técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1985 121 p.

TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C. Biotransformation of (-) β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 121-124, p. 837-844, 2005.

5 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os compostos voláteis majoritários identificados foram o acetato de bornila (39,64 %), eugenol (89,58 %), carvacrol (60,71 %) e linalol (39,26 %) nos OEs de alecrim, cravo-da-índia, orégano e sálvia, respectivamente;
- No teste de difusão em ágar e na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) os OEs de orégano e de cravo-da-índia foram os mais efetivos frente às bactérias testadas;
- A partir dos parâmetros AA (%) e IC₅₀ obtidos utilizando-se o teste DPPH, pode-se verificar que o OE de cravo-da-índia tem excelente potencial para ser utilizado como antioxidante, com IC₅₀ de 11,79 µg.mL⁻¹, sendo que este índice foi ainda melhor quando da sua utilização na combinação binária 1:1 com o OE de orégano, chegando a 6,40 µg.mL⁻¹;
- Da combinação binária dos OEs de cravo-da-índia e orégano na proporção 1:1, obteve-se uma melhora na CIM do óleo de cravo-da-índia e do IC₅₀ de ambos os óleos puros;
- Os resultados demonstraram potencial antibacteriano e antioxidante dos OEs de orégano e cravo-da-índia, justificado pelos seus compostos voláteis majoritários, constituindo-os como uma opção de aditivos naturais a serem empregados em embalagens bioativas;
- As películas de amido de milho, quitosana e acetato de celulose, de uma maneira geral, apresentaram-se incolores, translúcidos e com bom aspecto, não apresentando partículas insolúveis visíveis a olho nu;
- A incorporação do teor de 5 % dos OEs nas soluções filmogênicas resultou na presença de zonas de opacidade nos filmes, além de dificultar sua retirada das placas;
- À medida que maiores percentagens de OEs foram utilizadas, houve uma tendência, nem sempre significativa ($p > 0,05$), de aumento na espessura dos filmes de amido de milho (0,078 a 0,120 mm) e quitosana (0,135 a 0,183 mm). Nos filmes de acetato de celulose não foi observada esta influência;

- De uma maneira geral, a adição dos OEs às soluções filmogênicas afetou as propriedades óticas dos filmes produzidos, com exceção do polímero acetato de celulose;
- O filme de quitosana controle, ou seja, sem adição de OEs, apresentou formação de halos frente a todas as bactérias testadas, bem como uma pequena AA (13,34 %);
- O amido de milho e a quitosana, mostraram nos testes *in vitro*, serem polímeros adequados para a produção de filmes nos quais serão adicionados aditivos, possibilitando uma boa difusão dos OEs utilizados, no teste de difusão em placas e a expressão da capacidade antioxidante dos óleos testados;
- Os filmes de acetato de celulose apresentaram formação de halos, para todas as bactérias avaliadas, somente quando utilizou-se 5 % dos OEs e combinações testadas;
- A película de amido incorporada com 1 % de OE de cravo-da-índia, apresentou rápida liberação inicial do OE (~30 % nas primeiras 24 horas) e posterior liberação de forma lenta e constante até os 30 dias;
- A presença do OE de cravo-da-índia nas películas interferiu negativamente na aceitação das salsichas envelopadas na análise sensorial, com relação aos aspectos sabor e aroma;
- A aplicação da película de amido de milho incorporada com 1 % de OE de cravo-da-índia em salsicha, apresentou efeito antioxidante nos produtos, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com relação aos valores de TBARS ao final dos 15 dias de armazenamento refrigerado. O que dificultaria a viabilidade da aplicação seria a interferência do óleo nas características sensoriais do produto.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- . Em função das dificuldades enfrentadas com a técnica *casting* para a produção das matrizes poliméricas, com relação à retirada das mesmas das placas, substituí-la pelo processo de extrusão;
- . Avaliar a influência dos óleos essenciais nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira dos biofilmes;
- . Realizar testes *in vitro* com os componentes majoritários identificados nos óleos com maiores atividades antioxidantes e antimicrobianas, isoladamente e em conjunto, visando sua futura utilização em biofilmes ativos, com o intuito de eliminar a interferência sensorial do óleo nas matrizes poliméricas;
- . Quantificar a liberação dos óleos essenciais nas demais matrizes poliméricas e em diferentes concentrações;
- . Testar os biofilmes em outros produtos alimentícios.

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais

Pesquisador: Mariane Lobo Ugalde

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11392312.1.0000.5351

Instituição Proponente: Universidade Reg. Int. do Alto do Uruguai e das Missões - URI - Campus

Patrocinador Principal: Universidade Reg. Int. do Alto do Uruguai e das Missões - URI - Campus Erechim

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 240.459

Data da Relatoria: 01/04/2013

Apresentação do Projeto:

Em virtude da importância da busca de antimicrobianos e antioxidantes naturais com aplicação na indústria de alimentos, o presente trabalho objetiva determinar a atividade antibacteriana e antioxidante in vitro dos óleos essenciais (OEs) de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia officinalis* L.). Os óleos utilizados serão adquiridos da empresa Ferquima®. Tem como hipótese: Desenvolver biofilmes ativos de amido, quitosana e acetato de celulose, incorporados com óleos essenciais, capazes de prolongar a vida-de-prateleira de salsichas, em função das características antimicrobianas e antioxidantes dos óleos essenciais. Os biofilmes selecionados serão aplicados em salsichas, avaliando-se sua efetividade enquanto embalagem ativa. Quanto a determinação da atividade antioxidante in vitro dos óleos essenciais - a atividade antioxidante in vitro dos OE será realizada por método espectrofotométrico (Miranda & Fraga, 2006), em triplicata. Para a determinação da atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais - serão testados pelo método de difusão em placas, micro-organismos passíveis de serem encontrados em produtos cárneos, através do antibiograma em meio sólido. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) será utilizado o método indireto de crescimento bacteriano através da densidade ótica em meio de cultura líquido. Antes e após o período de incubação, 0 e 24 horas respectivamente, será avaliada a densidade ótica através do leitor automático de microplacas, em comprimento de onda de 490 nm, em triplicata. Para a caracterização química do óleo essencial - os OE, que se apresentarem

Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621, prédio 12, sala 12.31.3

Bairro: CEP: 99.700-000

UF: RS **Município:** ERECHIM

Telefone: (543)520-9000 **Fax:** (543)520-9090

E-mail: eticacomite@uri.com.br; roman@uri.com.br

mais ativos com relação à atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*, serão caracterizados quimicamente por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas CG-EM. A produção e avaliação dos biofilmes - serão testados biofilmes desenvolvidos com diferentes teores de amido, acetato de celulose, quitosana, e OE, os quais serão obtidos pelo método casting. Será utilizado um colorímetro para a determinação da opacidade aparente, valores L^* , a^* e b^* sob ângulo visual de 10° e iluminante D65 (luz do dia). Para verificação da espessura dos biofilmes, será utilizado um micrômetro digital. Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos biofilmes, será utilizado o ensaio de zona de inibição em disco conforme Rojas-Graü et al. (2006) e a atividade antioxidante será analisada pelo método da captura de radicais DPPH (Miranda & Fraga, 2006), com adaptações. Utilização dos biofilmes - os biofilmes selecionados serão aplicados em salsichas, avaliando-se sua efetividade enquanto embalagem ativa. As salsichas serão adquiridas de um frigorífico, no dia da sua fabricação, transportadas refrigeradas até o local dos experimentos, sendo posteriormente mergulhadas na solução filmogênica e postas para secar sob-refrigeração, embaladas com filme de PVC (policloreto de vinila) $15 \mu\text{m}$, termo seladas e armazenadas sob-refrigeração $2 \pm 2^\circ\text{C}$, para as análises posteriores. Para a avaliação dos produtos - as salsichas serão avaliadas durante sua vida de prateleira, com relação a três aspectos principais: oxidação lipídica (método de quantificação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), segundo metodologia descrita por Sorensen & Jorgensen (1996)), qualidade microbiológica (serão pesquisados os micro-organismos definidos pelo Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos: Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus coagulase positiva*, clostrídios sulfito redutores a 46°C e pesquisa de *Salmonella sp.* (BRASIL, 2001)). Para verificar a aceitabilidade dos produtos em relação à percepção do OE presente no biofilme, será realizada uma avaliação sensorial dos mesmos em períodos pré-determinados, pelo teste de diferença do controle (Minin, 2006). A avaliação será conduzida com, no mínimo, quarenta provadores. Para efeito de análise estatística, as categorias da escala serão convertidas em valores numéricos, sendo atribuído o valor 8 para extremamente diferente e 0 para nenhuma diferença. Todas as análises serão realizadas em triplicata, sendo que os resultados serão submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparação entre as médias dos resultados ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para tratamento dos dados será utilizado o Software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc®, USA). Com o objetivo de verificar a aceitabilidade dos produtos em relação a percepção do óleo essencial presente no biofilme, será realizada uma avaliação sensorial dos mesmos no primeiro dia de produção. Para tanto, será utilizado o Teste de Diferença do Controle (NBR 13526) (ABNT, 1995), o qual é aplicado quando se tem mais de uma amostra a ser avaliada e comparada com um padrão, obtendo-se a diferença e o grau dessa diferença segundo um atributo específico (Minin, 2006). A

Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621, prédio 12, sala 12.31.3
Bairro: CEP: 99.700-000
UF: RS **Município:** ERECHIM
Telefone: (543)520-9000 **Fax:** (543)520-9090 **E-mail:** eticacomite@uri.com.br; roman@uri.com.br

análise sensorial dos produtos será realizada com pessoas de ambos os sexos, não treinadas, pertencentes à instituição onde a mesma será realizada (alunos de ensino médio, graduação e pós-graduação, professores e demais servidores), as quais serão convidadas a fazer parte do teste. Cabe salientar que as avaliações serão conduzidas em local apropriado (laboratório de análise sensorial), respeitando as condições ideais de preparo bem como apresentação das amostras aos avaliadores. Todos os dados obtidos na presente pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador principal e dos seus orientadores pelo período de 5 anos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

- Desenvolver biofilmes de acetato de celulose, amido e quitosana, contendo diferentes concentrações de óleos essenciais, para aplicação em salsicha.

Objetivos Específicos:

- Avaliar os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia officinalis*) in vitro, com relação a sua atividade antimicrobiana e antioxidante;
- Caracterizar quimicamente o óleo essencial mais ativo;
- Formular filmes de acetato de celulose, quitosana e de amido, com incorporação de diferentes concentrações do óleo essencial selecionado nas etapas anteriores;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante in vitro, dos filmes formulados;
- Avaliar o efeito dos filmes na conservação de salsicha, quantificando oxidação lipídica e realizando análises microbiológicas e sensoriais, durante o armazenamento, sob refrigeração.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora, o projeto não apresenta riscos, pois os produtos serão submetidos a análises físico-químicas e microbiológicas prévias a análise sensorial, sendo que todas as substâncias utilizadas na elaboração dos biofilmes são de grau alimentício. E quanto aos benefícios, cita-se a futura utilização dos biofilmes para prolongar a vida de prateleira de produtos alimentícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho com questão de pesquisa e objetivos claros. Sua metodologia apresenta detalhadamente os procedimentos para coleta e análise dos dados. O cronograma bem apresentado com etapas e datas para o desenvolvimento. O orçamento tem os custos no valor de R\$ 4.000,00 para o desenvolvimento da pesquisa, que serão custeados pela acadêmica pesquisadora.

Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621, prédio 12, sala 12.31.3

Bairro: CEP: 99.700-000

UF: RS **Município:** ERECHIM

Telefone: (543)520-9000 **Fax:** (543)520-9090 **E-mail:** eticacomite@uri.com.br; roman@uri.com.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O trabalho apresenta o modelo de questionário anônimo para a avaliação sensorial da pesquisa e que possui as informações necessárias para o participante da pesquisa.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta condições de ser desenvolvido e atende as exigências da Res. CNS 196/96. Sendo assim, o CEP-URI do Campus de Erechim, de acordo com as atribuições definidas manifesta-se pela aprovação deste trabalho.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto está apto para ser executado. Ao término do projeto, o relatório deve ser inserido na Plataforma Brasil.

ERECHIM, 08 de Abril de 2013

Assinador por:

CLAODOMIR ANTONIO MARTINAZZO
(Coordenador)

Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621, prédio 12, sala 12.31.3

Bairro: CEP: 99.700-000

UF: RS **Município:** ERECHIM

Telefone: (543)520-9000 **Fax:** (543)520-9090 **E-mail:** eticacomite@uri.com.br; roman@uri.com.br