



**GISELLE PEREIRA CARDOSO**

**REVESTIMENTO COMESTÍVEL PARA  
COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE BOVINA  
REFRIGERADA**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**GISELLE PEREIRA CARDOSO**

**REVESTIMENTO COMESTÍVEL PARA COMERCIALIZAÇÃO DE  
CARNE BOVINA REFRIGERADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Eduardo Mendes Ramos

Coorientador

Dra. Alcinéia de Lemos Souza Ramos

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Cardoso, Giselle Pereira.

Revestimento comestível para comercialização de carne bovina  
refrigerada / Giselle Pereira Cardoso. – Lavras: UFLA, 2015.  
129 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Eduardo Mendes Ramos.

Bibliografia.

1. Gelatina. 2. Quitosana. 3. Oxidação lipídica. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

**GISELLE PEREIRA CARDOSO**

**REVESTIMENTO COMESTÍVEL PARA COMERCIALIZAÇÃO DE  
CARNE BOVINA REFRIGERADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 01 de junho de 2015.

Dr. Alcinéia de Lemos Souza Ramos	UFLA
Dra. Cintia Nanci Kobori	UFSJ
Dr. Cleube Andrade Boari	UFVJM
Dr. Paulo Rogério Fontes	UFV

Dr. Eduardo Mendes Ramos  
Orientador

**LAVRAS - MG**  
**2015**

*A Deus, por tudo.*

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse.

Agradeço à Tida e ao Cardoso, meus pais, meu alicerce, por sempre proporcionarem um ambiente de respeito e educação, por sempre estarem comigo, mesmo nos momentos mais difíceis, por sempre estarem na torcida!!!

Ao meu irmão, Túlio, pela grande amizade, por ser meu maior incentivador para as coisas mais difíceis!

Ao meu orientador, professor Eduardo, por ser este grande exemplo de professor e orientador! Levarei seus ensinamentos por toda a vida.

À Alcinéia, por todo o apoio, pelas suas correções e seu estímulo.

À Capes e à Fapemig, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora, Cintia, Cleube e Paulo Rogério, pelo paciente trabalho.

A todos os amigos do LabCarnes, por todos estes 10 anos de convivência e aprendizado!

À UFLA e à UFVJM, por todas as oportunidades.

## RESUMO

Estudou-se o efeito da aplicação de revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana em mono e dupla camada, para a manutenção da qualidade de carne bovina estocada sob refrigeração ( $4\pm 1$  °C, por 8 dias), simulando-se as condições de estocagem em balcão de atendimento. A cada dois dias, ao longo do tempo de estocagem, foram realizadas análises de perda de peso, pH, índice de peróxidos (IP), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pigmentos relativos da mioglobina ( $O_2Mb$ ,  $Mb+$  e  $MMb$ ), taxa de consumo de oxigênio (TCO), atividade da metamioglobina redutase (MRA), análises microbiológicas e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a caracterização sensorial foi utilizado o método de perfil descritivo otimizado (PDO), sendo avaliada a percepção das cores vermelha e marrom. Pôde-se observar que os revestimentos tinham uma superfície homogênea, densa, sem fissuras e sem apresentação de poros. Os bifes revestidos apresentaram menor perda de peso quando comparados com o controle. A média de pH para o controle (5,96) foi superior ( $P < 0,05$ ) à das amostras tratadas com mono (5,67) e dupla camada (5,66). Observou-se que a aplicação dos revestimentos foi efetiva na diminuição da oxidação lipídica (avaliado pelo IP e TBARS). Verificou-se maior decréscimo de  $O_2Mb$  (%) para o controle e a maior conversão deste pigmento a  $Mb+$  e  $MMb$  com o tempo. A cor da carne foi favorecida pela aplicação de ambos os revestimentos mono e dupla camada. O controle apresentou ( $P < 0,05$ ) maior TCO (26,9%) e menor MRA (15,7%), quando comparado aos tratamentos mono (15,8% e 25,1%) e dupla camada (11,8% e 22,8%), respectivamente. Para microrganismos psicotróficos, os revestimentos em mono (média de  $3,6 \log_{10}$  UFC/g) e dupla camada ( $3,4 \log_{10}$  UFC/g) exerceram efeito antimicrobiano semelhante durante o tempo de estocagem, e as contagens das amostras revestidas foram inferiores ( $p < 0,05$ ) ao controle ( $4,2 \log_{10}$  UFC/g). O revestimento em dupla camada diminuiu em até  $3,4 \log_{10}$  UFC/g de microrganismos mesófilos, quando comparado com o controle. No PDO, as amostras diferiram quanto à cor vermelha e quanto à cor marrom. As amostras mono e dupla camada apresentaram os maiores valores de vermelho, enquanto o controle apresentou maior teor de marrom a partir do sexto dia de armazenamento. Conclui-se que a utilização de revestimentos comestíveis para a conservação de carne bovina é uma alternativa viável para a manutenção de parâmetros de qualidade da carne estocadas em sistemas simples de embalagem, com alta permeabilidade ao oxigênio e armazenadas sob refrigeração.

Palavras-chave: Gelatina. Quitosana. Oxidação lipídica. Cor.

## ABSTRACT

The aim of this work was study and evaluate the effects of applying edible coatings based on gelatin and chitosan in mono and double layers for maintaining the quality of beef stored under refrigeration ( $4 \pm 1$  °C for 8 days) to simulate the storage conditions in the counter service. In every two days throughout the duration of storage, tests were carried out in weight loss, PH, peroxide value, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), relative myoglobin pigments ( $O_2Mb$ ,  $Mb^+$  and  $MMb$ ), oxygen consumption rate (OCR), metmyoglobin reductase activity (MRA), microbiological analysis and scanning electron microscopy (SEM/EDS). For sensorial characterization, Profile Description Optimized (PDO) was used to evaluate the red and brown color. It can be observed that the coating had a homogeneous, dense, crack-free surface, without pores. The coated beef had less weight loss when compared to the control. The medium pH for the control (5.96) was greater ( $P < 0.05$ ) than the samples treated with mono (5.67) and bilayer (5.6). It was observed that the application of the coatings was effective in reducing lipid oxidation (evaluated by PV and TBARS). It was verified a largest decrease of  $O_2Mb$  (%) for control and higher conversion of this pigment to  $Mb^+$  an  $MMb$  with storage time. The color of the meat was favored by applying coatings both mono and double layers. The control presented ( $P > 0.05$ ) greater OCR (26.9 %) and lower MRA (15.7 %) when compared to mono treatments (15.8 and 25.1 %) and double layers (11.8 and 22.8 %), respectively. For psychotropic microorganisms, coatings mono (average 3.6 log<sub>10</sub> CFU / g ) and bilayer (3.4 log<sub>10</sub> CFU / g ) exerted similar antimicrobial effect during the storage time , and the scores of the coated samples were lower ( $p < 0.05$ ) than the control (4.2 log<sub>10</sub> CFU / g). The bilayer coating decreased to 3.4 log<sub>10</sub> CFU / g of mesophilic microorganisms when compared with the control. In the PDO, the samples differed in red and brown tons. The mono and bilayers samples showed the highest values of red, while the control showed higher brown color from the sixth day of storage. It was concluded that the use of edible coatings for beef conservation is a viable alternative to maintaining quality parameters of the meat stored in plain packaging systems with high oxygen permeability and stored under refrigeration.

Keywords: Gelatin. Chitosan. Lipid oxidation. Color.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da mioglobina.....	18
Figura 2	Esquema de interconversão da mioglobina na carne fresca (MANCINI; HUNT, 2005).....	19
Figura 3	Ilustração esquemática da concentração de oxigênio e cor da carne exposta ao ar: carne fresca avermelhada (YOUNG; WEST, 2001).....	21
Figura 4	Representação esquemática da influência do consumo de oxigênio e da atividade da metamioglobina redutase na carne. ....	24
Figura 5	Etapas da autooxidação lipídica.....	28
Figura 6	Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo “n” o grau de polimerização.....	45
Figura 7	Aleatorização dos bifes obtidos da peça de contrafilé para a realização dos tratamentos controle, mono e dupla camada.....	55
Figura 8	Imagens de microscopia eletrônica de varredura. (a) superfície do revestimento, (b) superfície da carne controle sem revestimento, (c/d) seção de carne revestida em mono camada e (e/f) seção de carne revestida em dupla camada.....	69
Figura 9	Imagens de microscopia eletrônica de varredura. (a) seção de carne revestida em monocamada, em que espessura do filme = 20,34 $\mu\text{m}$ e (b) seção de carne revestida em dupla camada, em que espessura do filme = 54,89 $\mu\text{m}$ .....	71
Figura 10	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre a perda de peso de bifes armazenados por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	72
Figura 11	Efeito do tempo sobre o pH de bifes armazenados por 8 dias sob refrigeração a 4 °C.....	75
Figura 12	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre índice de peróxidos (IP) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	76
Figura 13	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o índice de TBARS de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	78
Figura 14	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o teor de oximioglobina ( $\text{O}_2\text{Mb}$ ) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	83
Figura 15	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o teor de de oximioglobina ( $\text{Mb}^+$ ) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	84

Figura 16	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o teor de metamioglobina (MMb) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C .....	85
Figura 17	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos valores de L* de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	87
Figura 18	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos valores de L* de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	89
Figura 19	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camadas no parâmetro de amarelo (b*) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C .....	92
Figura 20	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos parâmetros de saturação (C*) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	94
Figura 21	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos parâmetros da tonalidade (h*) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C.....	95
Figura 22	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na taxa de consumo de oxigênio (TCO) de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C .....	98
Figura 23	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na atividade redutora da mioglobina (MRA) de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C .....	99
Figura 24	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na contagem de microrganismos psicotróficos de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C .....	101
Figura 25	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na contagem de microrganismos mesófilos de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C .....	102
Figura 26	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na contagem fungos e leveduras de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C .....	103
Figura 27	Imagens dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C .....	105
Figura 28	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na percepção da cor vermelha de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C. ....	106
Figura 29	Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na percepção da cor marrom de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C. ....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Possíveis utilizações dos filmes de acordo com a sua natureza .....	43
Tabela 2	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de perda de peso ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	72
Tabela 3	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de pH ( $Y_i$ ) dos tratamentos durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C .....	75
Tabela 4	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para o índice de peróxidos ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	77
Tabela 5	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para o índice de TBARS ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	79
Tabela 6	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para teor de oximioglobina – O <sub>2</sub> Mb ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	83
Tabela 7	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de deoximioglobina – Mb+ ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	84
Tabela 8	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de metamioglobina – MMb ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	85
Tabela 9	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de L ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	88
Tabela 10	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de a* ( $Y_i$ ) dos tratamentos bcontrole, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	90
Tabela 11	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de b* ( $Y_i$ ) dos tratamentos bcontrole, mono e dupla	

	camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	92
Tabela 12	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de $C^*$ ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	94
Tabela 13	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de $h^*$ ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	95
Tabela 14	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de cor vermelha ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	106
Tabela 15	Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de cor marrom ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.....	108

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1	Carne <i>in natura</i> .....	16
2.1.1	Cor da carne.....	17
2.1.2	Taxa de consumo de oxigênio e atividade da metamioglobina redutase .....	22
2.1.3	Oxidação lipídica .....	26
2.1.4	Microrganismos em carnes .....	30
2.2	Sistemas de embalagens para carne <i>in natura</i> .....	32
2.2.1	Revestimentos comestíveis .....	36
2.2.1.1	Formas de obtenção de revestimentos comestíveis .....	38
2.2.1.2	Compostos filmogênicos .....	41
2.2.1.2.1	Gelatina .....	44
2.2.1.2.2	Quitosana.....	45
2.2.1.3	Plastificantes .....	47
2.3	Aplicação de revestimentos em carnes.....	48
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	53
3.1	Revestimento .....	54
3.2	Obtenção e porcionamento dos bifes .....	54
3.3	Aplicação dos revestimentos .....	55
3.4	Armazenamento e amostragem .....	56
3.5	Análises físicas e bioquímicas na carne .....	57
3.5.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	57
3.5.2	Perda de peso .....	57
3.5.3	pH.....	58
3.5.4	Índice de peróxidos (IP) .....	58
3.5.5	Índice de TBARS .....	58
3.5.6	Pigmentos relativos da mioglobina .....	59
3.5.7	Análise objetiva da cor .....	60
3.5.8	Determinação da Taxa de Consumo de Oxigênio (TCO).....	61
3.5.9	Atividade redutora da metamioglobina (MRA).....	62
3.6	Análises microbiológicas .....	62
3.6.1	Microrganismos psicrotróficos .....	63
3.6.2	Microrganismos mesófilos .....	63
3.6.3	Fungos filamentosos e leveduras .....	64
3.7	Análise sensorial – perfil descritivo otimizado.....	64
3.8	Análise estatística.....	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68
4.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	68

4.2	Perda de peso .....	71
4.3	pH.....	74
4.4	Oxidação lipídica .....	76
4.4	Pigmentos relativos da mioglobina .....	82
4.5	Análise objetiva da cor .....	86
4.6	Determinação da taxa de consumo de oxigênio e da atividade da metamioglobina redutase.....	97
4.7	Análises microbiológicas .....	100
4.8	Análise sensorial – perfil descritivo otimizado.....	104
5	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS .....	111
	ANEXOS .....	128

## 1 INTRODUÇÃO

Os consumidores demandam, atualmente, alimentos que apresentem melhor manutenção de indicadores de qualidade, como cor, textura, sabor e qualidade nutricional. Essa necessidade tem provocado o desenvolvimento de novas tecnologias, como o uso de sistemas de embalagens com capacidade de retardar as principais alterações que ocorrem em alimentos.

Considerando-se a função de proteção, o desenvolvimento de um sistema de embalagem para a carne bovina fresca deve, prioritariamente, relacionar os principais aspectos, como perda da cor vermelha, crescimento microbiano, desenvolvimento de aroma e odor desagradáveis e desidratação superficial, indicando depreciação da qualidade da carne.

No Brasil, é altamente difundido o sistema que utiliza bandejas de poliestireno expandido, envoltas por filmes esticáveis de alta permeabilidade a gases, como o policloreto de vinila (PVC), para a comercialização de carne refrigerada. A vida útil do produto acondicionado neste sistema é de 2 a 3 dias, devido, principalmente, à oxidação de mioglobina e ao rápido crescimento de bactérias deteriorantes.

Uma alternativa para retardar a deterioração e aumentar a vida útil de carnes armazenadas em sistemas simples de embalagens é a utilização de revestimentos comestíveis, associada a embalagens secundárias simples, que são capazes de manter a qualidade com mínima alteração de suas propriedades intrínsecas.

Entre as propriedades funcionais dos filmes biodegradáveis podem ser mencionados a barreira ao vapor de água, o transporte de gases (oxigênio e gás carbônico) e de solutos, a retenção de compostos aromáticos e a possibilidade de incorporação de aditivos. Muitas substâncias têm propriedades adequadas para uso como revestimento ou filme. A atividade antimicrobiana é outro fator

extremamente importante; o revestimento com esta capacidade é de interesse considerável.

A utilização de gelatina apresenta boa aplicação como revestimento devido à sua viabilidade econômica aliada ao seu baixo custo. A cobertura de gelatina em carnes frescas pode auxiliar a redução da deterioração, ao atuar como barreira ao oxigênio. A quitosana tem sido muito utilizada na composição de filmes e revestimentos antimicrobianos porque, além de ter boas propriedades formadoras de filmes, apresenta ação antibacteriana. Esta ação é devido à sua capacidade de ligar-se às moléculas de água, inativar as enzimas microbianas e absorver os nutrientes usados pelos microrganismos.

Com base no exposto, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar um revestimento comestível à base de gelatina, quitosana e glicerol, aplicado em uma ou duas camadas, para a conservação de carne bovina refrigerada.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

A vida útil de carnes é influenciada por vários fatores, entre eles a temperatura de estocagem, o oxigênio atmosférico, as enzimas do próprio tecido animal, a umidade, a luz e, principalmente, a atuação de microrganismos. Entre estes fatores, a presença do oxigênio atmosférico é extremamente importante, devido ao seu efeito químico sobre a oxidação do pigmento de mioglobina e sobre a rancificação da gordura, e ao favorecimento do crescimento de microrganismos deterioradores aeróbios na superfície, uma vez que o tecido interno do músculo é considerado estéril até o momento do corte. Estes fatores, individualmente ou em associação, causam mudanças no odor, no sabor, no aroma, na cor e na textura da carne, levando à deterioração da sua qualidade. Essa deterioração pode ser detectada por aumento da microbiota, descoloração, rancificação e desidratação do produto (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Portanto, carnes frescas são produtos de alto valor agregado que requerem sistemas de embalagem, distribuição e estocagem capazes de garantir que o produto chegue ao consumidor sem perda significativa da qualidade. A qualidade desses produtos pode ser garantida por longos períodos, em embalagens que retardam a deterioração microbiológica, a perda de umidade e a oxidação de gorduras, ao mesmo tempo em que mantenham a cor desejável (COELHO, 2008).

### **2.1 Carne *in natura***

A cor é um aspecto importante de aceitabilidade pelos consumidores, que julgam a qualidade da carne no ponto de venda pela sua cor, a quantidade de gordura visível e seu odor (BEKHIT; FAUSTMAN, 2005).

A cor e a descoloração da carne fresca não necessariamente refletem seus valores nutricionais, organolépticos, funcionais ou seu estado de conservação. No entanto, é relatado que as preferências do consumidor baseiam-se na aparência do produto. Ou seja, os consumidores necessitam, primeiramente, estar totalmente satisfeitos com as propriedades sensoriais dos produtos, antes que outras características sensoriais se tornem relevantes. Em carnes vermelhas, os consumidores relacionam o vermelho brilhante à cor de carne fresca, enquanto rejeitam carnes que se tornaram marrons (BOWERS, 1993).

### **2.1.1 Cor da carne**

A base bioquímica da cor vermelha em carnes é bem estabelecida e depende da concentração e do estado de redução da mioglobina, da hemoglobina e dos citocromos na carne. A mioglobina é o pigmento primário associado com a cor vermelha da carne odor (BEKHIT; FAUSTMAN, 2005).

A mioglobina facilita a difusão do oxigênio do meio extracelular para a mitocôndria; é uma proteína solúvel em água, responsável pela cor da carne. Ela tem 8  $\alpha$ -hélices (geralmente rotulados A-H) de mioglobina, um grupo heme prostético contendo um átomo central de ferro. Das seis ligações associadas com o átomo de ferro, quatro ligam o ferro ao anel heme; na 5ª posição liga-se à histidina-93 e a 6ª é disponível para ligações, entre as quais se incluem o oxigênio, o monóxido de carbono, a água e o óxido nítrico (Figura 1) (AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION - AMSA, 2012).

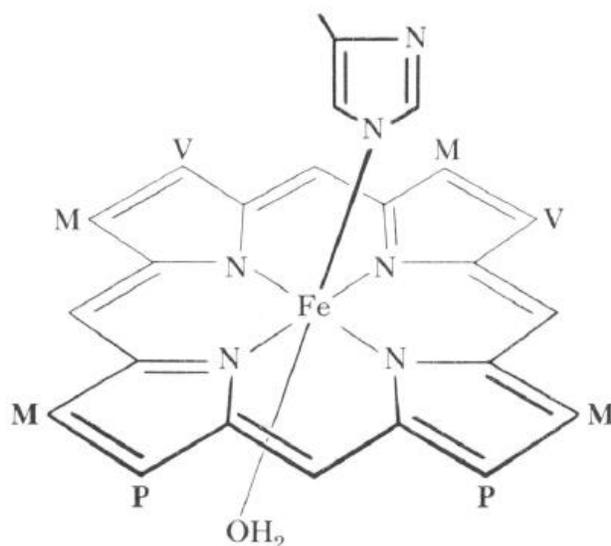


Figura 1 Estrutura química da mioglobina

O ligante presente na 6<sup>a</sup> posição e a valência do ferro determinam a cor da carne fresca. São três as formas de mioglobina na carne fresca: a deoximioglobina (Mb<sup>+</sup>), a oximioglobina (O<sub>2</sub>Mb) e a metamioglobina (MMb) (Figura 2) (RAMOS e GOMIDE, 2007). Estes três pigmentos coexistem e a proporção relativa de cada um deles determina a cor da carne fresca. É raro quando apenas uma destas formas químicas se encontra presente na superfície da carne. Geralmente, duas ou mais formas estarão presentes, mas a cor resultante será aquela característica da forma química predominante. Por exemplo, a carne fresca exposta ao oxigênio, usualmente, tem as três formas químicas principais (O<sub>2</sub>Mb, MMb e Mb<sup>+</sup>), mas, enquanto a O<sub>2</sub>Mb predominar na superfície, a cor da carne será vermelho-brilhante. Entretanto, se 60% dos pigmentos de uma área particular se oxidarem a MMb, esta área aparecerá marrom (SEIDEMAN et al., 1984).

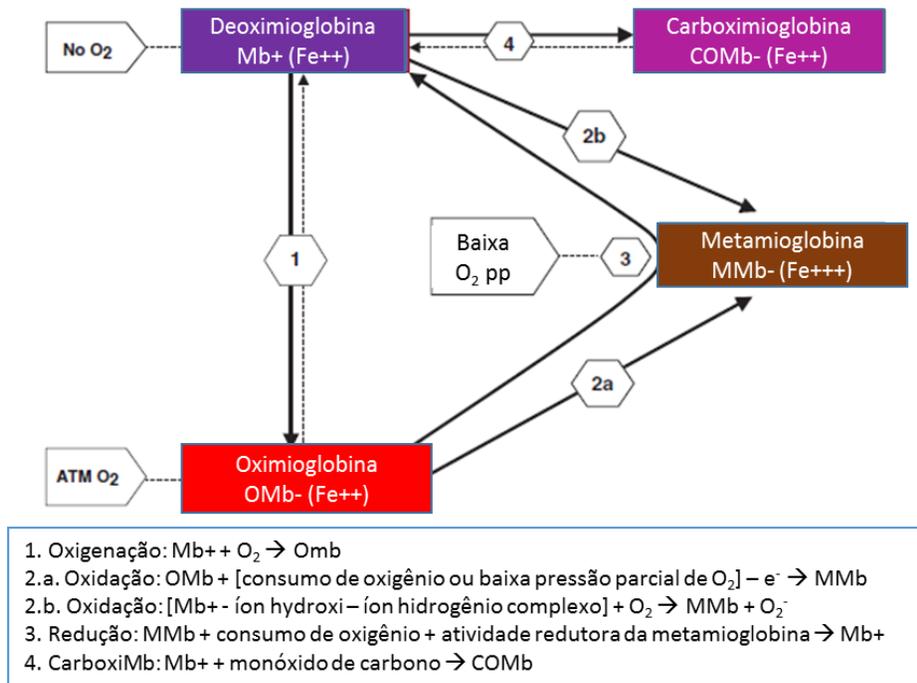


Figura 2 Esquema de interconversão da mioglobina na carne fresca (MANCINI; HUNT, 2005)

Quando não há ligante presente na sexta posição e o ferro heme está na forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ), ocorrendo o pigmento de  $Mb^{+}$ , essa cor resulta no vermelho púrpura, tipicamente associado com embalagem a vácuo, ou com a cor do músculo imediatamente após o corte (MANCINI; HUNT, 2005). Quando a carne é exposta a baixas tensões de oxigênio ( $PPO_2 < 0,1$  mmHg) e os sistemas redutores ainda estão ativos, forma-se a  $Mb^{+}$ , não apreciada pelos consumidores (RAMOS; GOMIDE, 2007).

A oxigenação (quando a mioglobina é exposta ao oxigênio) é caracterizada pelo desenvolvimento de uma cor vermelho-brilhante, ou vermelho-cereja (MANCINI e HUNT, 2005). Quando a carne é submetida a ambientes que apresentem alta pressão parcial de oxigênio ( $PPO_2 > 40$  mmHg)

(com os sistemas redutores ainda presentes) é gerado o pigmento de O<sub>2</sub>Mb, preferido pelos consumidores.

A conversão da Mb<sup>+</sup> a O<sub>2</sub>Mb é causada pela oxigenação que é, simplesmente, a ligação covalente do oxigênio (O<sub>2</sub>) atmosférico no sítio livre (sexta posição) do ferro da mioglobina (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Porém, quando a carne é exposta a pressões parciais intermediárias de oxigênio (PPO<sub>2</sub> entre 1 e 20 mmHg), ocorre, ao invés da oxigenação, uma oxidação do pigmento, formando o pigmento marrom de MMb. Neste caso, o ferro está oxidado (+3) e tem como sexto ligante a água (GILL; MCGINNIS, 1995).

A descoloração da carne é resultado da oxidação da Mb<sup>+</sup> ou da O<sub>2</sub>Mb a MMb. Além da quantidade da área superficial coberta pela MMb, a forma química da mioglobina no interior do músculo também afeta a coloração da carne, já que a luz é refletida não somente da camada externa, mas também de dentro do tecido muscular (SWATLAND, 2004).

A conversão da mioglobina em MMb envolve a transferência de um elétron do ferro heme para um agente oxidante. Na O<sub>2</sub>Mb os elétrons da órbita externa do ferro heme estão envolvidos nas ligações coordenadas e, assim, estão indisponíveis para participar das reações de transferência de elétrons, sendo, portanto, mais resistente à oxidação. Assim, a Mb<sup>+</sup>, por ser mais instável, é mais susceptível a se oxidar a MMb (MANCINI; HUNT, 2005).

A oxigenação da mioglobina (ou *blooming*) (reação 1 na Figura 2) depende do tempo, da temperatura, do pH e da competição pelo oxigênio com a mitocôndria. Especificamente, a competição pelo oxigênio entre mioglobina e mitocôndria determina a penetração de oxigênio abaixo da superfície da carne, o que afeta significativamente a cor superficial da carne. Pressões parciais de oxigênio maiores que a atmosférica facilitarão a formação de uma camada mais espessa de O<sub>2</sub>Mb na superfície e logo abaixo desta (Figura 3). Quando exposto

ao CO, Mb+ retorna ao vermelho (reação 4 da Figura 2). A redução de O<sub>2</sub>Mb a Mb+ é favorecida em condições de baixa pressão parcial de oxigênio, que ocorre também quando o oxigênio presente no tecido muscular é consumido em muitas reações, incluindo a respiração mitocondrial (AMSA, 2012).

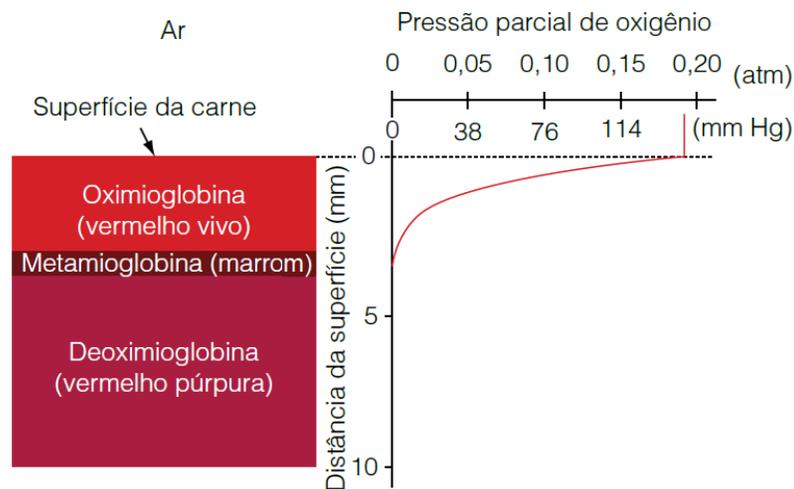


Figura 3 Ilustração esquemática da concentração de oxigênio e cor da carne exposta ao ar: carne fresca avermelhada (YOUNG; WEST, 2001)

A relação direta entre acúmulo de metamioglobina e rejeição da carne pelos consumidores indica que as reações de maior importância na química de cor dos derivados de mioglobina são a oxidação da forma ferrosa nativa à forma férrica e sua redução novamente à forma ferrosa (RAMOS; GOMIDE, 2007). O pigmento de MMb é utilizado como um indicador de aceitabilidade da carne, que é rejeitada pelos consumidores quando a MMb compreende 20% ou 40% do total de pigmentos na carne (GREENE; HSIN; ZIPSER, 1971; HOOD; RIORDAN, 1973).

Processos enzimáticos e não enzimáticos podem reduzir MMb a Mb+ e esta reação é fundamental para a estabilidade de cor. Inúmeros fatores intrínsecos e extrínsecos afetam essa reação, mas a taxa de consumo de oxigênio

(TCO), a atividade da metamioglobina redutase (MRA) e a queda *post mortem* de NADH são as variáveis mais significativas na extensão da cor da carne fresca (JEONG; CLAUS, 2010).

### **2.1.2 Taxa de consumo de oxigênio e atividade da metamioglobina redutase**

O acúmulo de metamioglobina na carne é afetado por fatores extrínsecos, como luz, temperatura, pressão parcial de oxigênio, assim como fatores inerentes ao próprio músculo, como pH, oxidação lipídica, sistemas redutores de metamioglobina e taxa de consumo de oxigênio no músculo *post-mortem* (RENERRE, 1990).

Dos fatores intrínsecos, as características bioquímicas de atividade de metamioglobina redutase (MRA) e taxa de consumo de oxigênio (TCO) no músculo *post-mortem* são tidas como as maiores responsáveis pela estabilidade da cor da carne fresca (RENERRE; LABAS, 1987), tendo em vista que a maioria dos outros fatores intrínsecos, como o pH, afeta a estabilidade da cor por modificar as funções da TCO e MRA (ZHU; BREWER, 1998).

A redução da MMb no músculo *post mortem* pode ser considerada o fator primário e determinante na estabilidade de cor de carnes durante o armazenamento. Os sistemas enzimáticos indicados como responsáveis pela redução da MMb são referidos como atividade da metamioglobina redutase (MRA) (MCKENNA et al., 2005). Esses sistemas enzimáticos atuam na redução do pigmento oxidado de MMb de volta à sua forma reduzida (Mb+) (MADHAVI; CARPENTER, 1993).

A NADH-citocromo b5 redutase é a principal enzima envolvida no processo de redução do pigmento de MMb nos tecidos. Essa redução é fundamental no metabolismo oxidativo de produção de energia, já que a MMb não tem capacidade de se ligar ao oxigênio. A NADH-citocromo b5 redutase

atua em dois sistemas citocromo (citocromo b5, localizado no retículo sarcoplasmático e citocromo b, localizado na parte externa da mitocôndria - OM citocromo b) e pode reduzir tanto a MMb como a meta-hemoglobina (MHb) (ARIHARA et al., 1995). Bekhit e Faustman (2005) apresentam outros sistemas redutores não específicos, em conjunto denominados de diaforases, capazes de reduzir a MMb a Mb+.

A função da NADH-citocromo b5 redutase, que apresenta pH ótimo de 6,5, é transferir dois elétrons do NADH para duas moléculas de citocromo b5 e/ou OM citocromo b. Por sua vez, o citocromo b5 reduzido transfere os elétrons para uma variedade de aceptores, incluindo a MMb, reduzindo-os (Figura 4). Dessa forma, o processo enzimático de redução de MMb à Mb+ envolve a enzima (NADH-citocromo b5 redutase), os intermediários (citocromo b5 e/ou OM citocromo b) e o cofator NADH (BEKHIT; FAUSTMAN, 2005).

O músculo não pode manter a capacidade redutora por muito tempo e, à medida que o pH muscular cai, ocorre um aumento na concentração de MMb na carne. Este aumento ocorre, possivelmente, devido à redução da atividade das enzimas MRA presentes na carne e à redução na geração de coenzimas redutoras (NADH e NADPH), responsáveis pela redução da MMb a Mb+ e sua posterior oxigenação a O<sub>2</sub>Mb (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

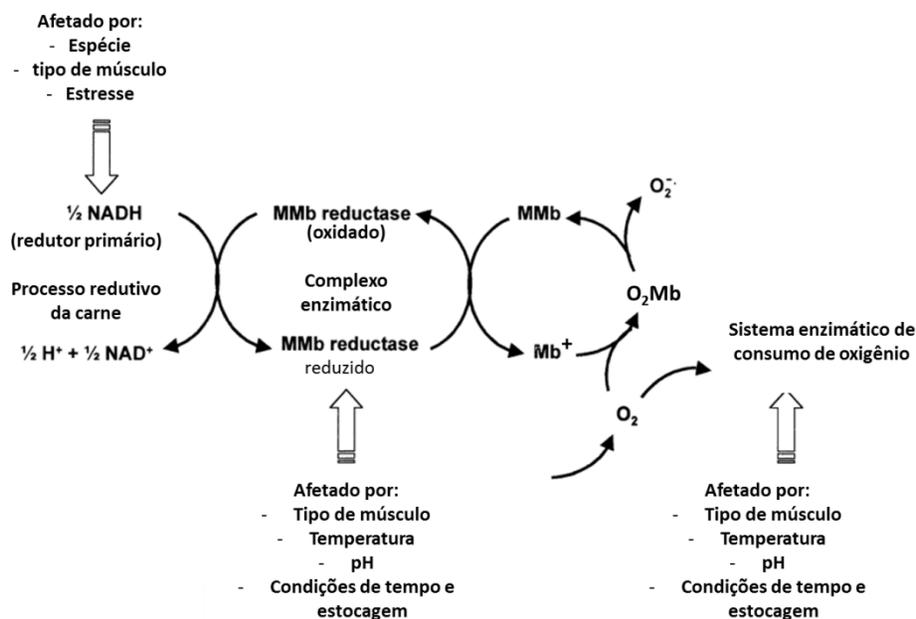


Figura 4 Representação esquemática da influência do consumo de oxigênio e da atividade da metamioglobina redutase na carne.

Mb<sup>+</sup>= deoximioglobina; O<sub>2</sub>Mb=oximioglobina; MMb=metamioglobina (ROSENVOLD; ANDERSEN, 2003)

Segundo Zhu e Brewer (1998), a perda de atividade do sistema MRA durante o armazenamento é acentuada quando a carne é mantida exposta à luz. Quando o potencial de oxirredução da carne é esgotado, a descoloração torna-se irreversível.

Dessa forma, quando a carne é armazenada refrigerada (2 °C), porém exposta a altos níveis de oxigênio, sua vida útil torna-se limitada a menos do que duas semanas. Neste período, se não houver uma ação microbiana, haverá, seguramente, uma conversão do pigmento de O<sub>2</sub>Mb a MMb, devido à perda dos sistemas redutores da carne, ocasionando sua descoloração (SØRHEIM; NISSEN; NESBAKKEN, 1999).

O consumo de oxigênio pelo músculo tem sido identificado como um fator importante na determinação da estabilidade da cor. O consumo de oxigênio

*post mortem* é relatado com a atividade mitocondrial residual no músculo. A mitocôndria mantém sua capacidade oxidativa por seis dias *post mortem*, sendo que a taxa de consumo de oxigênio decresce exponencialmente neste período. Altas taxas de consumo de oxigênio impedem o desenvolvimento de O<sub>2</sub>Mb (McKENNA, 2005).

A taxa de consumo de oxigênio (TCO) influencia a estabilidade da cor da carne por alterar a profundidade na qual se forma a camada de metamioglobina (MMb). Altas TCOs diminuem a penetração de oxigênio no tecido muscular, favorecendo a formação do pigmento de Mb<sup>+</sup> próximo à superfície da carne, a qual é mais susceptível à oxidação que a O<sub>2</sub>Mb. Assim, o maior consumo de oxigênio no tecido muscular é responsável por uma descoloração mais rápida da carne (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Está bem definido que existem grandes diferenças na taxa de descoloração da carne de diferentes músculos, de diferentes espécies e de animais com dietas diferenciadas (TROUT, 2003). O'Keefe e Hood (1982) verificaram que músculos mais oxidativos, como o *M. psoas major* (filé mignon), têm maior TCO e apresentam-se mais propensos à descoloração do que músculos menos oxidativos, como *M. longissimus dorsi* (contrafilé), mais estáveis. Mesmo observando uma maior atividade de MRA no músculo *longissimus dorsi*, estes autores postularam que a alta TCO em músculos mais oxidativos acarreta maior conversão de O<sub>2</sub>Mb a Mb<sup>+</sup> e, uma vez que este último pigmento é mais propenso à oxidação, o maior consumo de oxigênio é responsável pela descoloração mais rápida da carne.

Além disso, o maior consumo de oxigênio em músculos oxidativos implica na formação de maiores quantidades de espécies de oxigênio reativas (ROS) que, de princípio, iniciam a oxidação lipídica, acelerando a oxidação da mioglobina (TROUT, 2003).

De forma geral, a MRA e a TCO podem contribuir para maior estabilidade da cor de carnes, por promoverem, respectivamente, redução do pigmento oxidado de MMb de volta à forma reduzida (Mb+) e permitir maior penetração de oxigênio no interior da carne, o que favorece a formação do pigmento de O<sub>2</sub>Mb, que é menos susceptível à oxidação (MADHAVI; CARPENTER, 1993).

Dos fatores intrínsecos, as características bioquímicas de MRA e TCO no músculo *post mortem* são tidas como as maiores responsáveis pela estabilidade da cor da carne fresca (RENERRE e LABAS, 1987), tendo em vista que a maioria dos outros fatores intrínsecos, como o pH, afeta a estabilidade da cor por modificar as funções da TCO e MRA (ZHU; BREWER, 1998).

### **2.1.3 Oxidação lipídica**

Sabores desagradáveis e ranço resultam da geração de compostos voláteis, como pentanal, hexanal e heptanal, dentre outros, oriundos da degradação de ácidos graxos e fosfolipídios provenientes dos depósitos de gordura inter e intramusculares e associados às membranas musculares. A oxidação lipídica está na origem do desenvolvimento do ranço, da produção de compostos responsáveis por sabores e odores desagradáveis, da reversão e da ocorrência de um elevado número de reações de polimerização e de cisão. Estes tipos de reações não só diminuem o tempo de vida e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como também podem gerar compostos nocivos, como cetonas, aldeídos, alcoóis, hidrocarbonetos e epóxidos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Comprometem, ainda, a biodisponibilidade de vitaminas, proteínas e pigmento, reduzindo o valor nutricional dos alimentos (TAWFIK et al., 1997).

A oxidação lipídica influencia o processo pelo qual ocorre perda de qualidade da carne e seus produtos. Além da alteração de odor e gosto, ela está relacionada também com a oxidação dos pigmentos da carne, provocando perda de cor. Alguns fatores afetam o processo de oxidação, entre eles fatores ambientais (umidade, temperatura, luz e oxigênio), presença de metais (cobre, ferro e manganês), enzimas e pigmentos (PINO, 2005).

A oxidação lipídica é fator crucial em carnes embaladas sob condições aeróbicas, uma vez que ocorre na mesma taxa que a descoloração e mais rapidamente do que a ação microbiana (JAKOBSEN; BERTELSEN, 2000). Segundo Montgomery et al. (2003), as maiores causas da descoloração e da rancidez oxidativa na carne vermelha são a oxidação da mioglobina e a autooxidação da gordura. Minimizando a taxa da oxidação lipídica, reduz-se a deterioração da cor da carne, uma vez que estas reações estão interligadas.

A autooxidação lipídica em produtos cárneos envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados, em particular dos associados com fosfolipídios localizados nas membranas celulares. A susceptibilidade ao processo oxidativo depende da capacidade de os ácidos graxos doarem um átomo de hidrogênio com produção de um radical livre que, por sua vez, reage com oxigênio molecular para formar um radical peróxi. Assim, os átomos de carbono adjacentes às duplas ligações tendem a doar um átomo de hidrogênio, levado à formação de radicais estabilizados por ressonância (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). As reações de autooxidação são divididas em três fases (Figura 5).

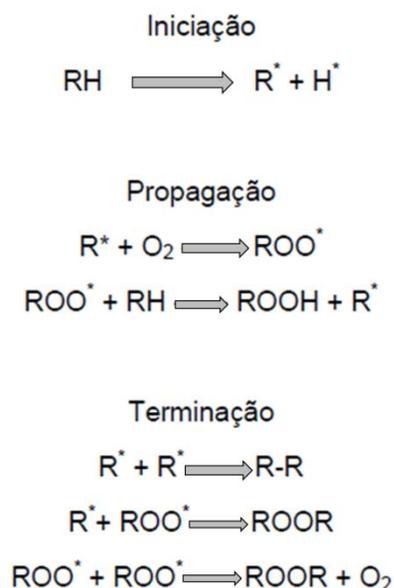


Figura 5 Etapas da autoxidação lipídica  
 Fonte: SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999

Na iniciação ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo, devido à retirada de um hidrogênio do carbono na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas pela luz e o calor. Na propagação, os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Por fim, na terminação, dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os produtos primários da autoxidação lipídica são hidroperóxidos, os quais não causam problemas no flavor e de ranço. Entretanto, a decomposição de tais hidroperóxidos em produtos secundários, como hidrocarbonetos, álcoois,

cetonas e aldeídos, influenciam significativamente o *flavor* e o sabor das carnes. Dependendo da composição de ácidos graxos nos lipídios, a proporção dos produtos de oxidação pode variar extensivamente (GRAY, 1978).

O processo de oxidação em carnes é intensificado por cocção, moagem, reestruturação, emulsificação ou qualquer outro tratamento que leve à ruptura de membranas e exponha os lipídios ao oxigênio e aos catalisadores da oxidação, quando mecanismos protetores, como vitamina E, doadores de prótons e elétrons das membranas e dos citoplasmas, são destruídos. Este conjunto de circunstâncias leva à aceleração do processo oxidativo e produz a oxidação ou, quando carnes são pré-aquecidas e depois resfriadas ou congeladas, ao fenômeno conhecido como *warmed-over flavor* (WOF) (GRAY; PEARSON, 1987).

A oxidação proteica é relacionada a fatores pró-oxidativos, como oxidação de lipídios, radicais livres, pigmentos heme e enzimas oxidativas. O malonaldeído é um dos substratos que reagem com derivados de proteína para formar carbonilas (cetonas e aldeídos) (XIONG, 2000).

As oxidações lipídica e proteica são inevitavelmente interligadas. A oxidação proteica em carnes pode diminuir a qualidade devido à redução da maciez e à perda por exsudação, da deterioração de *flavor* e descoloração (ROWE et al., 2004). Essas mudanças são parcialmente devido à formação de agregados proteicos com ligações intermoleculares não covalentes e covalentes, como as espécies reativas ao oxigênio que atacam as proteínas. Outras modificações comuns na oxidação de proteínas incluem destruição de aminoácidos, aumento da hidrofobicidade superficial e fragmentação de proteínas. Todas essas modificações levam à formação de carbonilas (XIA et al., 2009).

#### 2.1.4 Microrganismos em carnes

A carne é um alimento altamente perecível que, devido à sua composição química, favorece o crescimento microbiano, contribuindo significativamente para a sua deterioração ou contaminação (NYCHAS et al., 2008). Condições incorretas de estocagem, processamento, embalagem e distribuição favorecem essa deterioração. A microbiota que se desenvolve durante o armazenamento depende das condições de estocagem e características intrínsecas da carne. A intensidade da descoloração da carne é decorrente do número de bactérias aeróbias presentes, responsáveis pela redução da tensão de oxigênio sobre sua superfície (DOULGERAKI et al., 2012).

Os diferentes grupos que podem, potencialmente, contribuir para a contaminação da carne dependem das condições de estocagem e da sua forma de competição (ERCOLINI et al., 2010). O desenvolvimento de associações entre microrganismos tem efeito significativo no tipo de deterioração. Duas situações distintas são possíveis: uma quando bactérias gram-positivas anaeróbicas facultativas ou anaeróbicas determinam as mudanças no sistema (carne estocada em baixa concentração de oxigênio ou sem a presença de gases antimicrobianos) e quando gram-negativas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas dominam a sucessão microbiana (carne estocada exposta ao ar ou em altas pressões de oxigênio) (DOULGERAKI et al., 2013).

As bactérias que se desenvolvem na carne em temperaturas de refrigeração são, no geral, psicrotróficas, e incluem *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, bactérias lácticas e diferentes gêneros da família *Enterobacteriaceae* (DOULGERAKI et al., 2012). Apesar do grande número de microrganismos, apenas algumas espécies têm maior proliferação, porque a temperatura, o tempo de estocagem e a atmosfera da embalagem

podem afetar o crescimento microbiano e as espécies são selecionadas durante a estocagem de carne fresca (ERCOLINI et al., 2010).

Microrganismos psicrófilos e psicrotróficos são confirmados como agentes causadores de deterioração em carne refrigerada (NYCHAS et al., 2008). Dentre eles destacam-se *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp. e bactérias lácticas. A maior fração da microflora de carnes embaladas com filmes altamente permeáveis ao oxigênio é composta, principalmente, por *Pseudomonas* sp., limitando a vida de prateleira do produto de 2 a 4 dias, dependendo da temperatura de refrigeração. Esses organismos limitam a vida útil de carnes frescas pela produção de compostos de odores desagradáveis provenientes da metabolização de aminoácidos (VENTURINI, 2009).

Entre os patógenos, destacam-se *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. coli* 0157:H7, que podem causar doenças pela ingestão das próprias células bacterianas ou das toxinas produzidas (McDONALD; SUN, 1999). Entretanto, a *Salmonella* ainda ocupa lugar de destaque nas estatísticas de doenças transmitidas por alimentos (SANTOS et al., 2003).

Os grupos de microrganismos mesófilos e psicrotrófilos são utilizados para avaliar bacteriologicamente o alimento, com o objetivo de se estimar sua qualidade higiênico-sanitária, fazendo uma verificação da eficiência do sistema de limpeza e desinfecção na indústria para avaliar o tempo de vida útil dos produtos, entre outros parâmetros. Confirmado o número elevado de bactérias desses grupos, há um forte indício de produto alterado, independente do seu efeito sobre a saúde do consumidor (ROITMAN; TRAVESSOS; AZEVEDO, 1987).

## 2.2 Sistemas de embalagens para carne *in natura*

As condições de armazenamento e embalagem da carne fresca formam um sistema complexo e dinâmico em que vários fatores interagem para a manutenção da qualidade do produto (VENTURINI, 2009).

A escolha da embalagem é uma estratégia importante, que pode ser decisiva como vantagem competitiva na indústria de alimentos. Portanto, há constante desafio visando atender às exigências dos consumidores, fornecendo embalagens modernas, práticas, que preservem os alimentos e sejam viáveis ambiental e economicamente (SOARES et al., 2009).

A embalagem influencia a qualidade e a durabilidade de carnes frescas e de derivados, pois altera o ambiente ao redor do produto, criando condições que retardam as reações de deterioração, prevenindo a evaporação da umidade do produto, evitando perdas de peso e alterações de aparência, textura e aroma. Contudo, a maior alteração no ambiente que circunda o produto, provocada pela embalagem, é quanto à composição gasosa. Esta atmosfera irá determinar a cor do produto, o tipo, a extensão da deterioração microbiológica e a velocidade de oxidação dos seus componentes (SARANTÓPOULOS; ANTÔNIO, 2006).

A vida útil de um produto cárneo pode ser maximizada pela criação de novo meio ambiente para o produto, ou seja, pela modificação da atmosfera em que está contido, em sistemas conhecidos como atmosfera modificada (MAP). Para isso, são necessárias duas condições importantes: a primeira, criar barreira apropriada ao redor do produto que seja efetiva em restringir o meio ambiente interno e a segunda, estabelecer, dentro da embalagem, condições desejáveis que estabilizem as propriedades do produto (SEBRANEK, 1986).

Há duas maneiras comumente utilizadas pela indústria alimentícia para modificar a atmosfera gasosa no interior de um produto embalado: a primeira, e mais simples, é a aplicação de vácuo e a segunda, a introdução de gases

desejados, após evacuação e antes do fechamento da embalagem. A embalagem a vácuo consiste em envolver o produto em um filme de baixa permeabilidade ao oxigênio, com remoção do ar da embalagem, e aplicação de uma selagem hermética (SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990). A embalagem a gás é uma extensão deste processo, envolvendo a remoção do ar da embalagem e sua substituição por gases específicos, um único gás ou a combinação deles (CHURCH; PARSONS, 1995).

Embalagem a vácuo é a forma mais comum de MAP, sendo utilizada tanto para carnes processadas como em cortes primários e secundários frescos. Quando a carne é estocada sob refrigeração, o sistema a vácuo tem a capacidade de preservar a carne fresca em condições anaeróbicas, nas quais as bactérias são severamente ou totalmente inibidas pelo baixo pH (menor que 5,8) do tecido muscular. Este sistema inibe o crescimento de espécies de *Pseudomonas*, enquanto espécies de *Lactobacillus* ou bactérias aeróbicas facultativas, como *Brochothrix thermosphacta* e enterobactérias psicrotróficas, têm o seu crescimento favorecido (LAMBERT; SMITH; DOODS, 1991). Além da ação sobre a microbiota aeróbica, a remoção do oxigênio retarda a oxidação da mioglobina, permitindo estender a vida útil de cortes primários de carne fresca em até cinco vezes, embora a vida útil de cortes pequenos seja apenas duplicada (ROBERTSON, 1992).

A grande categoria de MAP utilizada em carnes é a embalagem com atmosfera controlada (CAP), na qual a composição da atmosfera utilizada não se altera durante a estocagem do produto. Isto pode ser obtido pelo uso de altas concentrações de CO<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>, isoladamente ou em conjunto, em uma embalagem com um espaço livre adequado (HOLLEY; GILL, 2005). O CO<sub>2</sub> é o componente mais importante das misturas gasosas utilizadas na embalagem de alimentos em razão da sua atividade antimicrobiana (FARBER, 1991). Em embalagens com 100% de CO<sub>2</sub> e mantidas a 4 °C, a vida útil da carne pode chegar a 45 dias. No

entanto, da mesma forma que no sistema a vácuo, a forma dominante do pigmento da carne no sistema CAP é a Mb<sup>+</sup> de cor vermelho-púrpura, pouco atrativa para o consumidor. Pode-se utilizar o O<sub>2</sub> em uma variedade de combinações para se obter a cor vermelho-brilhante desejada. As combinações de gases utilizadas podem ter altas (80%) ou baixas (16%) concentrações de oxigênio, nas quais o N<sub>2</sub> é empregado como gás inerte de enchimento combinado com determinada proporção de CO<sub>2</sub> (menor que 20%) que retarda a deterioração microbiana, conferindo maior estabilidade ao produto. (SARANTÓPOULOS; ANTÔNIO, 2006).

No Brasil, a Portaria nº. 145, de 1º de setembro de 1998, do Ministério da Agricultura, tornou obrigatória a distribuição refrigerada das peças desossadas de carne em embalagens a vácuo. Porém, a grande desvantagem na aceitação da carne a vácuo é a alta rejeição da cor vermelho-púrpura da Mb<sup>+</sup>, devido à ausência de oxigênio, apesar do considerável investimento comercial na educação dos consumidores para a aceitação desta cor. Daí a necessidade de duas etapas de embalagem para a exposição de carne ao varejo: a pré-embalagem das peças a vácuo para a manutenção da conservação e a reabertura dessas embalagens e reembalagem em condições aeróbicas, permitindo a conversão da cor vermelho-púrpura à atrativa cor vermelho-brilhante, resultante da oxigenação dos pigmentos superficiais da carne (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001).

Comercialmente, no Brasil, a embalagem mais utilizada para carnes frescas é a de filmes plásticos de altíssima permeabilidade ao oxigênio e baixa permeabilidade ao vapor de água, que podem manter a coloração vermelha, ao mesmo tempo em que protegem o produto da desidratação superficial. Utilizam-se filmes de alta permeabilidade a gases, mas que não exercem controle sobre a deterioração microbiana. Para carne *in natura*, têm sido utilizados filmes de policloreto de vinila (PVC) ou poliolefinicos coextrusados, esticáveis ou

encolhíveis, com permeabilidade na faixa de 8.000 a 20.000 cm<sup>3</sup> (CNTP) O<sub>2</sub>/(m<sup>2</sup>/dia), a 25 °C e 1 atm (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001).

No entanto, a microbiota deteriorante, composta, principalmente, por *Pseudomonas* sp., e a oxidação da O<sub>2</sub>Mb a MMb limitam a vida útil da carne na bandeja em cerca de 2 a 3 dias, dependendo da temperatura de refrigeração e do tipo de corte. Comercialmente, este período é muito curto para permitir a centralização das operações de embalagens em bandejas, uma vez que o tempo estimado entre a embalagem nas plantas processadoras e sua exposição ao varejo, considerando as flutuações de demanda, é de cerca de três semanas (JAYASINGH et al., 2001).

A indústria de carnes dos Estados Unidos está apresentando um grande crescimento das carnes do tipo *case-ready* nos estabelecimentos de varejo. Essas carnes são processadas (cortadas em bifês, moídas) e os cortes finais embalados no próprio frigorífico, reduzindo a necessidade de que esse trabalho seja realizado nas lojas de varejo. Para manter a qualidade dessas carnes, têm sido utilizados sistemas Masterpack com baixa concentração de oxigênio (LIMBO, et al, 2013).

As tendências atuais relacionadas às embalagens incluem o desenvolvimento de materiais de embalagem que interajam com o ambiente e com o alimento, desempenhando papel ativo na preservação (LÓPEZ-RUBIO; GAVARA; LAGARON, 2006). Esses novos sistemas de embalagens têm sido a resposta para as preferências de consumidores, aumentando a vida de prateleira, melhorando as características sensoriais, evitando as deteriorações química e microbiológica, garantindo a segurança dos alimentos e inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (SOARES et al., 2009).

As embalagens ativas se referem a todas as tecnologias e têm como objetivo interagir com a atmosfera ou diretamente com o produto, a fim de gerar

um efeito benéfico. Alguns exemplos de sistemas de embalagens ativas incluem absorvedores de oxigênio, emissores ou absorvedores de dióxido de carbono, absorvedores ou controladores de umidade, absorvedores de etileno, emissores/absorvedores de aroma, sistemas enzimaticamente ativos e sistemas antimicrobianos (LÓPEZ-RUBIO; GAVARA; LAGARON, 2006).

A crescente preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos tem aumentado o interesse pelos filmes e os revestimentos antimicrobianos. A embalagem antimicrobiana é um tipo promissor de embalagem ativa que apresenta substância antimicrobiana incorporada e, ou imobilizada no material da embalagem e é capaz de eliminar ou inibir microrganismos deterioradores e, ou patogênicos. O princípio básico de atuação dessa embalagem é a adição de uma barreira extra (microbiológica) às barreiras físicas (oxigênio e umidade) (HAN, 2003).

### **2.2.1 Revestimentos comestíveis**

Os filmes e os revestimentos comestíveis são uma tecnologia emergente, capaz de aumentar a vida útil de alimentos (FERNÁNDEZ-PAN; ROYO; MATÉ, 2012). De acordo com este conceito de embalagens ativas, eles têm sido desenvolvidos com o objetivo de diminuir a perda de umidade, reduzir a oxidação lipídica e a descoloração, melhorar a aparência de alimentos em embalagens individualizadas, eliminar exsudação, conter aromas, carrear aditivos, como antimicrobianos e antioxidantes, além de reduzir perdas durante a fritura.

Coberturas e filmes comestíveis apresentam numerosas vantagens sobre a embalagem polimérica não comestível convencional. Além de apresentarem uma alternativa para a redução da complexidade das embalagens para alimentos, se não forem consumidas com o produto embalado, podem contribuir para a

redução da poluição ambiental devido à sua natureza biodegradável (HAN, 2005).

As pesquisas em relação às embalagens têm sido enfocadas em filmes e revestimentos comestíveis à base de biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos e lipídios, que podem ser completamente biodegradados em compostos naturais, como CO<sub>2</sub>, água, metano, hidrogênio e biomassa, dentro de um período consideravelmente curto de tempo (KROCHTA; DEMULDER-JOHNSTON, 1997).

Recentemente, pesquisas neste campo têm se intensificado, devido a fatores como a demanda de alimentos de alta qualidade pelo consumidor, o fato de as indústrias de alimentos precisarem de novas técnicas de estocagem, os conceitos ambientais sobre disposição de matérias renováveis para embalagem e as oportunidades para criar novos mercados por meio do uso de resíduos agrícolas (GENNADIOS; HANNA; KURTH, 1997).

A utilização de filmes e coberturas comestíveis está relacionada com a sua capacidade de agir como um adjunto para promover maior qualidade, estendendo a vida de prateleira e possibilitando a economia com materiais de embalagem final (KESTER; FENNEMA, 1986).

Os filmes e revestimentos apresentam um conjunto de vantagens que são importantes para aplicação industrial (KHAN et al., 2013):

- a) barreira à umidade: diminuição na perda de peso por evaporação;
- b) diminuição de exsudação: revestimentos seguram a exsudação, prevenindo gotejamento, melhorando a apresentação do produto e eliminando a necessidade de incorporação de sachês absorventes no fundo das embalagens;
- c) uso de revestimentos com baixa permeabilidade ao oxigênio permite a diminuição da oxidação lipídica (rancidez);

- d) revestimentos que são aquecidos antes da aplicação podem reduzir a contagem de microrganismos deterioradores e patogênicos e inativar parcialmente enzimas proteolíticas na superfície dos alimentos;
- e) diminuição da perda de aromas e de absorção de aromas indesejáveis;
- f) podem carrear antioxidantes e antimicrobianos;
- g) melhorar valor nutricional: diminuição de perdas durante fritura.

### **2.2.1.1 Formas de obtenção de revestimentos comestíveis**

Em relação à nomenclatura, a maioria dos pesquisadores utiliza os termos “filme” e “cobertura” indiscriminadamente. No entanto, a cobertura é uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto o filme é pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto. Podem ser classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para a sua produção e da quantidade das substâncias empregadas (CARDOSO, 2011).

Os biopolímeros são um tipo especial de polímero que envolve organismos vivos no processo de síntese (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2006). Têm, portanto, parcial ou totalmente, origem bioquímica, podendo ser parcial ou totalmente produzidos a partir de materiais naturais, renováveis (biomassas) e podem ser biodegradáveis, atendendo à norma ASTM D6400-04 (ASTM, 2004) ou não ser biodegradáveis. Portanto, conforme a definição, os biopolímeros podem ser classificados em:

- a) polímeros extraídos diretamente de biomassas, com ou sem modificação. Ex: polímeros derivados de amido e polímeros derivados de celulose;

- b) polímeros produzidos diretamente por microrganismo, no seu estado natural ou geneticamente modificado. Exemplo os PHAs que são poli-hidroxicanoatos;
- c) polímeros produzidos com a participação de biointermediários, esses produzidos com matérias-primas renováveis. Exemplos: (PLA) poli (ácido láctico), bio-PE obtido da polimerização de etileno produzido a partir do bio-etanol; bionáílon obtido via diácidos oriundos de biomassas e biopoliuretanos obtidos via polióis de origem vegetal (FAKHOURI, 2009).

Na indústria alimentícia são utilizados, principalmente, os revestimentos, os quais podem ser aplicados nos alimentos por diferentes métodos, seguidos de uma etapa de secagem para revestimentos hidrocoloidais ou esfriamento para revestimentos à base de lipídeos (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998).

Os filmes desenvolvidos de acordo com as técnicas citadas podem ser aplicados utilizando-se os métodos *dipping*, *spraying* e *casting*. *Dipping* e *spraying* baseiam-se na formação do filme no próprio produto que será recoberto. No primeiro caso, devido a um prévio mergulho na solução formadora de filme e no segundo, devido à aspersão desta solução sobre o produto. Já a técnica *casting*, útil por formar filmes não fixos, é baseada em métodos desenvolvidos para filmes não comestíveis e, por isso, representa menor investimento em pesquisas, além de ser a mais utilizada para analisar as propriedades filmogênicas dos biomateriais. Ela consiste na aplicação da solução formadora de filme em moldes, permitindo o controle da espessura dos filmes por meio da quantidade de matéria seca depositada nos suportes (GONTARD, 1994) e da variação da “espessura aparente” das soluções, quando acondicionadas nos moldes (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995).

Os filmes compostos podem ser formados por dupla camada ou somente por uma única camada homogênea e são formulados para combinar as vantagens das substâncias lipídicas com as hidrocoloidais, diminuindo as desvantagens que cada um apresenta separadamente (FAKHOURI, 2009).

A metodologia que vem sendo utilizada atualmente para o desenvolvimento de filmes compostos é a *layer-by-layer* (camada por camada). Neste método, os filmes são formados depositando-se camadas no alimento desejado. Essa técnica tem inspiração na natureza, onde existem estruturas formadas por camadas ordenadas de compostos, os quais, separadamente, apresentam baixa resistência, enquanto associados apresentam características mecânicas melhores. É uma técnica de baixo custo operacional, simples e com maior facilidade na manipulação das características da membrana, tais como funcionalidade e espessura (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2009).

Para aplicação de múltiplas camadas, no primeiro passo, há um substrato sólido sendo imerso em uma solução. No passo seguinte, o substrato contendo a primeira camada é subsequentemente imerso numa segunda solução (podendo ser a mesma da primeira, ou uma solução diferente). Podem ser formadas inúmeras camadas sucessivamente por este processo (IOST; CRESPILO, 2012).

Segundo Kester e Fennema (1986), dentre os principais mecanismos de formação de filmes mencionam-se:

1. **fusão e solidificação**, utilizadas para gorduras sólidas e ceras;
2. **coacervação simples**, que consiste na precipitação do hidrocoloide que está disperso em solução aquosa. Esta precipitação pode ser obtida pela evaporação do solvente (secagem), pela adição de soluto não eletrólito e no qual o hidrocoloide não é solúvel (por exemplo, etanol), pela adição de eletrólito que induz precipitação ou cruzamento dos componentes, ou pela modificação do pH da solução;

3. **coacervação complexa**, que consiste em se obter a precipitação pela mistura de duas soluções de hidrocoloides com cargas elétricas opostas que interagem, formando o polímero complexo;

4. **gelificação ou coagulação térmica**, que consiste no aquecimento das macromoléculas que envolvem desnaturação, formação de gel e precipitação. Isto ocorre, por exemplo, quando a proteína ovoalbumina é aquecida. A gelificação também pode ser obtida pelo resfriamento rápido de uma solução hidrocoloide que se encontra aquecida. Por exemplo, o ágar a 95 °C está líquido e, quando resfriado a abaixo de 45 °C, forma gel, solidificando-se.

#### **2.2.1.2 Compostos filmogênicos**

Com relação ao preparo, as formulações de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis devem incluir pelo menos um componente capaz de formar uma matriz adequada, contínua, coesa e aderente, envolvendo a utilização de diversos componentes, cada qual com sua finalidade específica: agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, etanol, água/etanol, entre outros), plastificante (glicerol, sorbitol), agente reticulante (cloreto de cálcio) e agente ajustador de pH (ácido acético, NH<sub>4</sub>OH) (BERTAN, 2003).

Os biopolímeros mais utilizados na elaboração de filmes e coberturas comestíveis são as proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína, proteínas do leite e proteínas miofibrilares), os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato, carragena, quitosana) e os lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo, ceras) ou a combinação dos mesmos (KHAN et al., 2013).

Os filmes elaborados a partir de polissacarídeos ou proteínas têm excelentes propriedades mecânicas, ópticas e sensoriais, porém, são sensíveis à

umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água. Ao contrário, as coberturas compostas de lipídios apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor d'água, mas são opacas e pouco flexíveis, além de apresentarem sabor residual, o que pode influenciar as características sensoriais do alimento. A combinação dos biopolímeros tem como vantagem agregar os pontos positivos de cada um dos constituintes utilizados (GALLO et al., 2000).

Alguns dos principais compostos utilizados na formação de revestimentos comestíveis são descritos a seguir (KHAN et al., 2013):

a) Lipídeos, óleos e gorduras

Ceras são mais resistentes ao transporte de vapor que outros revestimentos lipídicos ou não lipídicos.

Problemas de aplicação: espessura, homogeneidade, superfície gordurosa, rachamento, problemas oranolepticos: gosto de gordura e rancidez.

b) Glicerídeos e glicerídeos acetilados

Mono, di e triacilgliceróis e glicerídeos acetilados podem ser utilizados como revestimentos.

c) Polissacarídeos – amidos e seus derivados, alginatos, carragena, ágar, dextranas, celulose e quitosana.

Devido à sua natureza hidrofílica, os polissacarídeos apresentam barreira limitada a vapor de água. Alguns polissacarídeos controlam a perda de água quando são incorporados na forma de gel e agem como agentes sacrificantes (perdem água no lugar do alimento) (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994). Na Tabela 1 apresentam-se as possíveis utilizações dos filmes, de acordo com a sua natureza.

Tabela 1 Possíveis utilizações dos filmes de acordo com a sua natureza

<b>Uso</b>	<b>Tipo de filme apropriado</b>
Retardar migração de umidade	Lipídio, composto*
Retardar migração de gás	Hidrocoloide, lipídio ou composto
Retardar migração de óleo e gordura	Hidrocoloide
Retardar migração de soluto	Hidrocoloide, lipídio ou composto
Fornecer integridade estrutural ou propriedades de manuseio	Hidrocoloide, lipídio ou composto
Retardar compostos voláteis (flavor)	Hidrocoloide, lipídio ou composto
Carregar aditivos alimentícios	Hidrocoloide, lipídio ou composto

\*um filme composto consiste de componentes combinados de lipídios e hidrocolóides para formar uma bicamada ou conglomerado

Fonte: Donhowe e Fennema (1994)

Por estarem em contato com os alimentos, é desejável que os filmes e as coberturas comestíveis apresentem propriedades sensoriais neutras (transparente, inodoro e insípido), de modo a não alterar a qualidade dos alimentos. Os filmes e os revestimentos comestíveis podem ser heterogêneos em natureza, consistindo de misturas de polissacarídeos, proteínas e ou lipídios. Esta aproximação permite utilizar vantajosamente as distintas características funcionais de cada classe de filme formado, como propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas (cor e opacidade), propriedades de barreira (permeabilidade ao vapor de água, ao O<sub>2</sub> e ao CO<sub>2</sub>), solubilidade em água e propriedades sensoriais (KESTER; FENNEMA, 1986).

Os filmes e os revestimentos comestíveis, contudo, apresentam algumas desvantagens. Entre elas, as reações alérgicas e a intolerância a seus componentes, apresentadas por alguns consumidores, como as proteínas do glúten de trigo ou as do leite (GENNADIOS; HANNA; KURTH, 1997; KROCHTA; DEMULDER-JOHNSTON, 1997). Apresentam, ainda, modificação de suas propriedades mecânicas e óticas em altas umidades

relativas (GONTARD et al., 1996), alta permeabilidade ao vapor de água, no caso dos filmes e revestimentos hidrocoloidais (CHEN, 1995), e susceptibilidade à oxidação, no caso daqueles produzidos à base de lipídeos (GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1996).

#### **2.2.1.2.1 Gelatina**

A gelatina é uma proteína de origem animal solúvel em água para temperaturas acima de 50 °C, resultante da hidrólise ácida ou básica controlada (65 °C a 68 °C) do colágeno. A conversão do colágeno em gelatina é feita, geralmente, em cinco etapas: lavagem, extração, purificação, concentração e secagem. Sendo um hidrocoloide extremamente versátil, produzido em abundância, de baixo custo e que forma filmes flexíveis, a gelatina está sendo alvo de inúmeras pesquisas voltadas para a produção de filmes e revestimentos comestíveis para alimentos (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001). As principais matérias-primas da indústria de colágeno e gelatina são a pele suína, o couro bovino e os ossos. As gelatinas comerciais podem ser divididas em dois grupos: gelatina do tipo A, obtida por pré-tratamento ácido, apresentando ponto isoelétrico entre 7,0 e 9,0, e gelatina do tipo B, obtida por pré-tratamento básico, com ponto isoelétrico situado entre 4,6 e 5,2 (GENNADIOS et al., 1994).

A gelatina é classificada e comercializada de acordo com sua força de geleificação, o *bloom*. O *bloom* e a viscosidade são as principais características reológicas da gelatina e, geralmente, são resultantes do tipo do processo de fabricação. As propriedades viscoelásticas estão relacionadas com a composição de aminoácidos, a massa molecular média e o grau de polimerização da cadeia (FAKHOURI, 2009).

De modo geral, os filmes à base de gelatina apresentam boa resistência mecânica, porém, reduzida barreira ao vapor de água. Por outro lado, devido às características hidrofílicas da gelatina, esses filmes apresentam elevada susceptibilidade às condições ambientais, o que dificulta sua aplicação como embalagem. Na tentativa de melhorar estas características, diversas alternativas têm sido estudadas, tais como modificação química e enzimática da gelatina, utilização de blendas de plastificantes (THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2005), avaliação do efeito de diferentes plastificantes com diferentes graus de hidrofobicidade e incorporação de lipídios (BERTAN, 2005), dentre outros.

#### 2.2.1.2.2 Quitosana

O termo quitosana refere-se a copolímeros em diferentes graus de polimerização, constituídos de  $\beta(1-4)$  2-acetamida-2-deoxi-D-glicose (ou D-glucosamina) dispostos em uma cadeia linear. Sua fórmula molecular genérica pode ser expressa como  $(C_6H_{11}O_4N)_n$  e ilustrada conforme a Figura 6. A quitosana é derivada da desacetilação parcial ou total da quitina, um componente presente na carapaça de crustáceos como carangueijo, siri, camarão e lagostas (KARDAS et al., 2012).

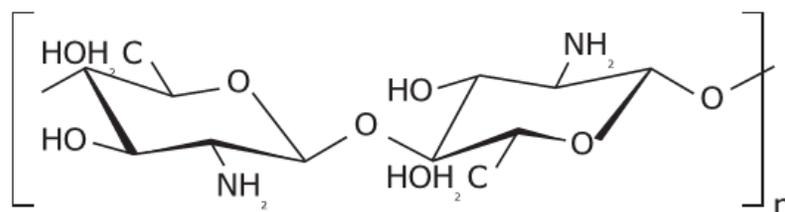


Figura 6 Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo “n” o grau de polimerização

Quitina só passa a ser considerada quitosana quando o grau de desacetilação se torna igual ou superior a 60%. A massa relativa da quitosana varia de acordo com a metodologia empregada em sua preparação e, de forma geral, está representada entre  $10^4$  e  $10^6$  g. mol<sup>-1</sup> (ROBERTS, 1992).

A quitosana é insolúvel em água, porém, dissolve-se em soluções aquosas de alguns ácidos inorgânicos e orgânicos. A quantidade de grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) é que determina a solubilidade da quitosana: quanto menor a quantidade destes grupos, menor a repulsão eletrostática, conseqüentemente menor será a solvatação em água (BARIKANI et al., 2014).

Dentre as inúmeras características que distinguem quitina e quitosana dos demais polissacarídeos destaca-se a atividade antimicrobiana. Estudos recentes revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado com as propriedades físico-químicas do polímero e as características da membrana do microrganismo. A atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias gram-negativas, quanto menor a massa molecular da quitosana, maior a atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: no caso das gram-positivas, a hipótese é a de que quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula, que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto quitosana de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (ZHANG et al., 2009).

O fator limitante dos filmes de quitosana é a sua hidrofiliabilidade. Na quitosana há a predominância dos grupos amino caracterizados por ligações covalentes (N-H), em que a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade, tornando favorável o rearranjo de moléculas e água em torno desses sítios. Essa característica estrutural, associada aos grupos acetamido, que

também são polares e estão presentes na cadeia polimérica, caracteriza um material com alto grau de afinidade e retenção de água (LAMBERTUS et al., 2015).

### 2.2.1.3 Plastificantes

Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade. Quando adicionados a outro material provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos mesmos (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994). Além disso, em sua maioria, apresentam caráter hidrofílico e, por serem normalmente moléculas pequenas, são facilmente acoplados entre as cadeias poliméricas devido à sua habilidade em reduzir a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997).

Vários plastificantes vêm sendo utilizados na elaboração de filmes e coberturas. Entre eles, podem ser encontrados mono, di e oligossacarídeos (glicose, sacarose), polióis (glicerina, sorbitol, derivados da glicerina e gliceróis) e lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e derivados de éster, fosfolipídios e surfactantes) (GUILBERT; CONTARD; GORRIS, 1986).

Para filmes de gelatina, os plastificantes mais comumente utilizados são o sorbitol, a glicerina e a triacetina (FAKHOURI, 2002).

Desde 1959, o glicerol é reconhecido como uma substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos e também como substância *generally regarded as safe*, ou GRAS, pela agência Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos. No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de nº 386, de 5 de agosto de 1999 (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2006).

O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados que, normalmente, contêm quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol. Vários tipos de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, como cor, odor e teor de impurezas (KNOTHE et al., 2006).

A glicerina tem efeito plastificante por sua habilidade em reduzir as pontes de hidrogênio, enquanto aumenta os espaços intermoleculares, e em diminuir as interações entre as cadeias de polímeros, aumentando a flexibilidade e diminuindo as propriedades de barreiras dos filmes. Thomazine, Carvalho e Sobral (2005) observaram que, com o aumento na concentração de plastificante (glicerol), em filmes de gelatina, ocorre aumento da permeabilidade ao vapor d'água e da flexibilidade do filme.

### **2.3 Aplicação de revestimentos em carnes**

Blendas de gelatina e quitosana têm sido utilizadas extensivamente na produção de filmes de duplas camadas (*by-layers*) para aplicações biomédicas. Rivero, García e Pinotti (2009) desenvolveram compósitos, dupla camada e películas biodegradáveis à base de gelatina e quitosana para determinar a barreira dos filmes, as propriedades mecânicas e caracterizaram a microestrutura. As blendas de gelatina com quitosana em forma de gel têm sido materiais empregados na cicatrização de feridas, na área médica (YANG; PAULSON, 2000).

Assim, o uso de filmes e revestimentos comestíveis nos alimentos tem diversos objetivos, dos quais os mais importantes são: reduzir a perda de umidade, controlar a permeabilidade aos gases, controlar a atividade microbiana, preservar a integridade estrutural dos produtos e possibilitar a liberação gradual

do sabor e de antioxidantes em alimentos (ARVANITOYANNIS; PSOMIADOU; NAKAYAMA, 1996). O fino recobrimento sobre o produto alimentício age como barreira aos elementos externos, como umidade, óleo e vapor orgânico, protegendo-o e estendendo sua vida de prateleira (GUILBERT; CONTARD; GORRIS, 1996; KROCHTA; DEMULDER-JOHNSTON, 1997).

O uso de películas com esse propósito constitui vantagem econômica, evitando a necessidade de estocagem em atmosfera controlada que implicaria em custos operacionais e de equipamento. A função a ser desempenhada pelo filme depende do produto alimentício e, principalmente, do tipo de deterioração a que este produto está submetido (MAIA; PORTE; SOUZA, 2000).

Oussalah et al. (2004) estudaram o efeito antioxidante de filmes comestíveis à base de proteína do leite contendo OE de orégano e pimenta na preservação de carne bovina. A oxidação lipídica da carne foi avaliada por meio do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), e os resultados demonstraram que os filmes de orégano estabilizaram a oxidação nas amostras testadas.

Sathivel et al. (2007) avaliaram o efeito da aplicação de revestimentos de quitosana (1% e 2%) na conservação de filés de salmão. Eles foram mantidos congelados (-20 °C) durante três meses. Em comparação com o tratamento controle, houve diminuição significativa da perda de massa e da oxidação lipídica dos filés. Além disso, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os valores de cor  $L^*a^*b^*$  dos tratamentos com quitosana.

Cardoso, Ramos e Ramos (2009a, 2009b) estudaram os efeitos da aplicação de revestimento à base de gelatina e glicerina, adicionado de diferentes concentrações de ácido ascórbico, na formação e na manutenção da cor da carne armazenada em sistema aeróbico. Seus resultados evidenciaram o potencial de uso deste sistema na conservação da carne *in natura* refrigerada.

O uso de revestimento à base de gelatina contendo misturas de óleo essencial (OE) favorece a estabilidade da cor da carne embalada em condições

aeróbias e a melhora na cor vermelha dos produtos pode ser atribuída à ação do óleo essencial de orégano (CARDOSO; RAMOS; RAMOS, 2009b).

Filmes e revestimentos à base de quitosana e blendas de gelatina e quitosana têm sido citados como efetivos agentes antimicrobianos (FERNÁNDEZ-SAIZ et al., 2009; JEON; KAMIL; SHAHIDI, 2002; LÓPEZ-CABALLERO et al., 2004). No entanto, sabe-se que a capacidade antimicrobiana da quitosana contra diversos microrganismos depende das condições e dos métodos de obtenção dos filmes e revestimentos de quitosana, assim como da forma como os procedimentos experimentais são conduzidos (FERNÁNDEZ-SAIZ et al., 2009).

Gomez-Estaca et al. (2009) testaram revestimentos à base de gelatina, blendas de gelatina e quitosana incorporados ou não com óleo essencial de cravo, para aplicação como agente antimicrobiano para a preservação de carne de pescado. Os autores testaram o filme de gelatina (6%) e quitosana (2%) contra as bactérias *P. fluorescens*, *L. acidophilus*, *L. innocua* e *E. coli*, e não encontraram nenhuma atividade antimicrobiana para o filme sem adição de óleo essencial.

Celis, Enrione e Matiacevich (2011) testaram filmes à base de gelatina extraída de salmão e quitosana de baixo peso molecular contra crescimento de *E.coli*. Concentrações de 1% de quitosana inibiram o crescimento de 100% de *E.coli*, durante as primeiras 24 horas de incubação. Cardoso (2011) otimizou revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana para a conservação de bifês de carne bovina (lagarto). A concentração otimizada do revestimento foi de 3% de gelatina e 1,5% de quitosana.

Perdones et al. (2012) testaram revestimentos à base de quitosana adicionados de óleo essencial de limão e obtiveram redução na contagem de *Botrytis cinerea* em morangos. Liu, Kerry e Kerry (2012) estudaram o efeito do peso molecular e do grau de desacetilação nas propriedades físico-químicas de

filmes à base de gelatina e quitosana. As propriedades viscoelásticas das soluções para a formação de filme revelaram que as interações entre gelatina e quitosana são muito fortes nas blendas produzidas a partir de quitosana com alto peso molecular ou com alto grau de desacetilação.

A adição de gelatina melhora as propriedades físicas de filmes de quitosana. Os dados de Gomez-Estaca et al. (2011) revelaram que as interações entre gelatina obtida de pele de atum e quitosana são mais fortes e menos solúveis do que filmes obtidos a partir de gelatina bovina e quitosana. Neste mesmo trabalho, as blendas de gelatina e quitosana foram efetivas contra *Staphylococcus aureus*. Os autores concluíram que a blenda entre gelatina e quitosana pode ser um meio para melhorar o desempenho físico-químico dos filmes de quitosana, sem alterar suas propriedades antimicrobianas.

Nowzari, Sha'Banpour e Ojagh (2013) compararam os efeitos de revestimentos mono e dupla camada na rancidez oxidativa de filés de truta refrigerados a 4 °C, por 26 dias. Os resultados demonstraram que revestimentos à base de gelatina e quitosana mantiveram as características de qualidade do pescado e estenderam a vida útil das amostras durante o tempo de estocagem. O revestimento foi melhor que o filme na redução de oxidação lipídica.

Pereda et al. (2011) estudaram filmes compostos de gelatina e quitosana e dupla camada, em que uma camada era composta por gelatina e a outra por quitosana. Os filmes apresentaram boas propriedades de barreira e boa compatibilidade de componentes. Os filmes de duas camadas apresentaram maior alongação (40%), quando comparados com os compostos. Os autores observaram que a solução filmogênica foi efetiva contra *E. coli* e *L. monocytogenes*. No entanto, os filmes foram apenas efetivos contra *E.coli*, resultado que não era esperado por eles.

Azevedo et al. (2014) utilizaram o método de superfície de resposta para desenvolver revestimentos comestíveis à base de quitosana, amido de mandioca

e óleo essencial de alecrim-de-tabuleiro. Os autores testaram o revestimento na inibição de quatro microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* e *Salmonella Enteritidis*. O filme com melhor atividade antimicrobiana foi formulado com 1,6% de amido, 0,6% de quitosana e 2,4% de óleo essencial. No entanto, o tratamento que não continha óleo essencial não foi efetivo na inibição de bactérias.

Alguns trabalhos apresentam resultados de aplicação de revestimentos à base de gelatina e/ou quitosana; a maioria dos artigos encontrados até o presente momento é de caracterização de filmes e revestimentos. Grande parte das aplicações tem sido reportada em frutas e hortaliças (pimenta, uvas, morangos, tomates e peras minimamente processadas) e em pescados (truta, linguado) (AZEVEDO et al., 2014). Além destes trabalhos, incluem-se: aplicação de revestimento de quitosana (2%) para aumento da vida útil de produtos cárneos prontos para cozimento (*ready-to-cook*) (KANATT et al., 2012), revestimentos de quitosana e glutamato, sulfito para a preservação de linguiças de suínos (ROLLER et al., 2002) e aplicação de quitosana adicionada de extrato de alecrim para diminuir a oxidação lipídica em linguiças de carne suína (GEORGENTELIS et al., 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Tecnologia de Carnes e Derivados (LabCarnes), no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

Na pesquisa de Cardoso (2011) foi otimizado um revestimento comestível para conservação de carne bovina (lagarto, *M. semitendinosus*) armazenada sob refrigeração a  $4\pm 1$  °C. As análises foram conduzidas no tempo zero e no sexto dia de armazenamento. Foi observado que o revestimento composto por 3% de gelatina, 1,5% de quitosana e 6% de glicerol em relação ao conteúdo de gelatina + quitosana foi o mais eficaz na inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica enteritidis*. Os resultados de índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor também indicaram que a concentração ótima do filme para conservação dos bifes de carne bovina foi de 3% de gelatina, 1,5% quitosana e 6% de glicerol em relação ao conteúdo de gelatina + quitosana.

Portanto, neste experimento, foi utilizada a concentração otimizada por Cardoso (2011) para acompanhamento da vida útil de bifes de carne bovina revestidos em mono e dupla camada de revestimento. Sendo assim, foram conduzidos três tratamentos que são: controle, bife revestido com uma camada de revestimento comestível (mono camada) e bife revestido com duas camadas do mesmo revestimento (dupla camada).

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, num fatorial em esquema 3 x 5, em que os fatores foram tratamentos (controle, mono camada e dupla camada) e 5 tempos (0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento), conduzido em 3 repetições.

### 3.1 Revestimento

No preparo dos revestimentos, utilizou-se gelatina em pó do tipo B, com *bloom* de 250, Gelita (São Paulo, SP) e quitosana (densidade de 0,30g/mL, grau de desacetilação >85,0%) adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, CE).

As soluções do filme de revestimento foram obtidas hidratando-se a gelatina em pó em água destilada, por 30 minutos, com posterior solubilização, a 70 °C, em banho-maria, por 10 minutos, quando foram adicionados a quitosana e o glicerol (Merck). O pH natural das soluções foi mantido (próximo a 5,4).

A quitosana foi previamente solubilizada em solução de ácido acético glacial (Merck) a 0,4% (VILLADIEGO, 2004) e adicionada a cada mistura de revestimento. As soluções foram homogeneizadas em Politron (Tecnal), a 10.000 rpm, por 1 minuto.

### 3.2 Obtenção e porcionamento dos bifes

Foram utilizadas três peças de contrafilé (*Longissimus thoracis*) de diferentes animais, adquiridas diretamente em matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Federal (SIF), sendo desossadas após 24 horas de abate e conduzidas em caixas térmicas ao Laboratório de Processamento de Carnes e Derivados da UFLA. Foi feita limpeza prévia nas carnes.

Foi realizado porcionamento no sentido transversal das peças com o auxílio de moldes, sendo obtidos bifes de 25 mm de espessura.

Os bifes foram aleatorizados de acordo com a Figura 7. Os bifes cortados foram colocados em sequência de tratamentos, sendo: controle, mono e dupla camada, e, em seguida, o próximo corte era colocado novamente para controle e assim sucessivamente.

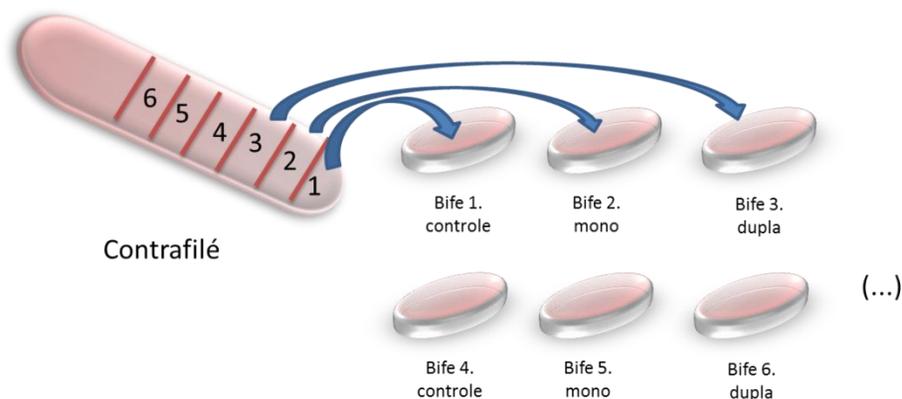


Figura 7 Aleatorização dos bifos obtidos da peça de contrafilé para a realização dos tratamentos controle, mono e dupla camada

Para as análises de cor e pigmentos relativos da mioglobina foram selecionados três bifos de cada peça de contrafilé, um para cada tratamento e estes bifos acompanhados com o tempo.

Para as outras análises, foi selecionado um bife para cada tratamento, para cada dia de análise, e os tratamentos realizados em triplicata.

### 3.3 Aplicação dos revestimentos

A técnica utilizada para a aplicação dos revestimentos foi por imersão na solução filmogênica para polimerização dos filmes no próprio bife.

Os bifos (a 4 °C), imediatamente após o preparo, foram imersos nas soluções de revestimento (que se encontravam a 40 °C), por 5 segundos e, em seguida, pendurados por ganchos em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab), a 4 °C, por 30 minutos, até a secagem do revestimento. Os filmes de dupla camada foram imersos novamente na solução filmogênica e, em seguida, pendurados novamente por 30 minutos, até a secagem da nova camada.

Os bifos foram pesados e acondicionados em bandejas de poliestireno e envoltos por filme plástico transparente de PVC.

Como controle, bifos foram imersos em água destilada à temperatura ambiente (25 °C), pendurados por ganchos em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab), a 4 °C, por 30 minutos e embalados da mesma forma que os bifos com revestimento.

### **3.4 Armazenamento e amostragem**

As amostras foram armazenadas em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab), à temperatura controlada de  $4 \pm 0,5$  °C, com exposição a fotoperíodo de 12 horas (12 horas sob luz e 12 horas sob escuro). A câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab) tem quatro lâmpadas GE Universal Duramax 20W (superluz do dia), com intensidade variando de 1.800 a 2.000 lux, a 50 cm de distância.

As análises foram realizadas nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento, exceto para as análises de atividade redutora de metamioglobina (MRA) e taxa de consumo de oxigênio (TCO), que foram conduzidas nos tempos 0, 2 e 6 de armazenamento.

Para a realização da análise sensorial, foi mantido o bife controle armazenado nas mesmas condições até o tempo 10 de estocagem. Este bife foi utilizado posteriormente como padrão para cor marrom.

### **3.5 Análises físicas e bioquímicas na carne**

Os revestimentos comestíveis foram mantidos nas amostras tratadas para a realização de todas as análises.

#### **3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise da microscopia eletrônica de varredura, os três tratamentos (controle, mono e dupla camada) foram recortados em cubos de 0,4 cm<sup>3</sup> por meio de criofatura, utilizando-se o nitrogênio líquido; em seguida, foram tratados em solução Karnovsky. A seguir, os cubos com corte longitudinal, transversal e com a vista da superfície foram colocados com fita de carbono de dupla face sobre um suporte de alumínio (stubs), recobertos com ouro em um evaporador (Bal-tec - SCDA50, Balzers, Liechtenstein) e visualizados em um microscópio eletrônico de varredura (Mevleo-Evo40xvp - Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), a uma tensão de aceleração de 20 KV. As eletromicrografias foram processadas utilizando o software Corel Draw Photo Paint X5.

#### **3.5.2 Perda de peso**

Para o acompanhamento da perda de peso durante a estocagem, os bifes foram retirados da bandeja e novamente pesados em balança semianalítica. O resultado foi expresso em porcentagem de perda de massa em relação à massa inicial (tempo zero).

### **3.5.3 pH**

O pH foi determinado com potenciômetro digital, modelo Quimis, tipo Q-400 A, utilizando eletrodo tipo penetração (para alimentos sólidos), calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7. Foram conduzidas três leituras por amostra.

### **3.5.4 Índice de peróxidos (IP)**

O índice de peróxido (IP) foi determinado por modificações do método de PCA-FOX proposto por Gay e Gebicki (2002). Brevemente, 6 g da amostra foram homogeneizadas em 25 mL de metanol refrigerado (-18 °C), por 30 segundos e centrifugados, a 1.400 g, por 3 minutos. Uma alíquota do sobrenadante (suficiente para conter até 75 µM de hidroperóxidos) foi adicionada de 200 µL de solução analítica (2,5 mM de alaranjado de xilenol tetrassódico e 2,5 mM de sulfato ferroso de amônio em solução de ácido perclórico 1,10M) e o volume completado para 2 mL com água destilada. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, foi lida a absorbância a 560 nm.

A concentração de hidroperóxidos foi determinada a partir de curva analítica de calibração feita com hidroperóxido de cumeno (CHP) e os resultados expressos em mg de CHP/kg de amostra.

### **3.5.5 Índice de TBARS**

A oxidação lipídica foi avaliada pelo índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo metodologia proposta por Raharjo et al. (1992), com modificações.

Cerca de 70 g de cada bife foram triturados em miniprocessador para alimentos. Porções de 10 g de cada amostra triturada foram coletadas. As 10 g de amostra foram adicionados 40 mL de ácido tricloroacético (TCA), a 5% e 1 mL de BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol) 0,15% (em etanol) e homogeneizadas em politron, por 5 minutos. Em seguida, o homogenato foi filtrado em filtro de papel e o volume do filtrado ajustado com TCA 5% para 50 mL, em balão volumétrico. Alíquotas de 2 mL dos balões foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 2 mL de TBA (2-ácido tiobarbitúrico) 0,08 M (diluído em ácido acético glacial 50%). Os tubos foram levados ao banho-maria, por 5 minutos e as leituras foram realizadas, a 531 nm, em espectrofotômetro tipo CARY 50 *Varian*.

Para cada repetição, as médias foram obtidas considerando-se as médias de três replicatas. Os valores de TBARs foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg MDA/kg), por meio de curva analítica, utilizando 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) em ácido tricloroacético 20% como padrão.

### **3.5.6 Pigmentos relativos da mioglobina**

As curvas de reflectância foram obtidas com um colorímetro espectrofotométrico CM-700D (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm, sendo estabelecidos o iluminante A, o ângulo de 10° para o observador, a luz especular incluída (RSIN) e o sistema de cor CIELAB.

Os valores intermediários (473, 525 e 572 nm) de reflectância foram calculados por interpolação linear. O conteúdo relativo dos pigmentos heme, expressos como oximioglobina (O<sub>2</sub>Mb), mioglobina reduzida (Mb+) e metamioglobina (MMb), na superfície dos bifés, foi calculado segundo o método

matemático de Krzywicki (1979 citado por RAMOS; GOMIDE, 2007), de acordo com as seguintes equações:

$$MMb = 1,395 - [(A^{572} - A^{730})/(A^{525} - A^{730})];$$

$$Mb^+ = 2,375 * [1 - (A^{473} - A^{730})/(A^{525}/A^{730})]; \text{ e}$$

$$O_2Mb = 1 - (MMb + Mb^+)$$

em que  $A^{572}$ ,  $A^{730}$ ,  $A^{525}$  e  $A^{473}$  são as reflectâncias obtidas a 572, 730, 525 e 473, respectivamente.

Os mesmos bifes (selecionados para análise de cor e pigmentos relativos da mioglobina) foram avaliados em todos os tempos de estocagem. Para cada repetição, as reflectâncias foram obtidas considerando-se o valor médio de três leituras realizadas em diferentes pontos da superfície dos bifes.

### 3.5.7 Análise objetiva da cor

A avaliação objetiva da cor foi realizada diretamente na superfície dos bifes, utilizando-se um colorímetro espectrofotométrico CM700-D (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm. Para o cálculo dos índices de cor foram estabelecidos o iluminante A, o ângulo de  $10^\circ$  para o observador, a reflectância especular excluída (RSEX) e o sistema de cor CIELAB, segundo sugerido por Ramos e Gomide (2007) para carnes *in natura*.

Os índices de cor luminosidade ( $L^*$ ), o índice de vermelho ( $a^*$ ) e o índice de amarelo ( $b^*$ ) foram obtidos, para cada repetição, considerando-se o valor médio de três leituras realizadas em diferentes pontos da superfície do bife. A partir dos índices de cor, também foram calculadas as coordenadas polares

(RAMOS; GOMIDE, 2007): índice de saturação [ $C^* = (a^*2 + b^*2)^{1/2}$ ] e ângulo de tonalidade [ $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ ], expresso em graus.

Os mesmos bifes (selecionados para análise de cor e pigmentos relativos da mioglobina) foram avaliados em todos os tempos de estocagem.

### 3.5.8 Determinação da Taxa de Consumo de Oxigênio (TCO)

A taxa de consumo de oxigênio (TCO) foi avaliada pela conversão da oximioglobina (O<sub>2</sub>Mb) a metamioglobina (MMb) na superfície dos cortes sob vácuo, segundo o procedimento descrito por Madhavi e Carpenter (1993), com pequenas modificações. Amostras de tamanho 5 x 5 cm foram cortadas ao meio, expostas ao ar por 30 minutos em ambiente refrigerado (4 °C) para completo *blooming*, sendo, a seguir, embalados a vácuo (-0,8 bar, 50 segundos) em sacos de náilon-polietileno (PA/PE) e o espectro de reflectância (420 a 780 nm, em intervalos de 10 nm) imediatamente medido na parte interna (sem a presença do revestimento), sendo referido como tempo zero. A seguir, as amostras foram armazenadas em BOD, a 4 °C, sem a incidência de luz, por 10 minutos, quando nova leitura do espectro foi conduzida.

A concentração relativa dos pigmentos de mioglobina (OMb, Mb+ e MMb) foi calculada pelo método matemático de Krzywicki (1979, citado por RAMOS; GOMIDE, 2007) no tempo inicial e final, e a TCO foi expressa como a percentagem de O<sub>2</sub>Mb do tempo zero (%OMbi), consumida após 10 minutos sob vácuo (%OMbf), ou seja,

$$TCO = [(\% O_2Mbi - \% O_2Mbf) \div \% O_2Mbi] \times 100$$

### 3.5.9 Atividade redutora da metamioglobina (MRA)

A atividade metamioglobina redutase (MRA) foi avaliada de acordo com procedimento descrito por SAMMEL et al. (2002), com pequenas modificações. Amostras de tamanho 5 x 5 cm foram cortadas ao meio, imersas numa solução de nitrito de sódio 0,3% por 20 minutos à temperatura ambiente, para facilitar a formação de metamioglobina (MMb). As amostras foram, então, removidas da solução, secas em papel toalha, embaladas a vácuo em filme de náilon-polietileno (PA/PE) e o espectro de reflectância (420 a 780 nm, em intervalos de 10 nm) imediatamente obtido na parte interna (sem a presença do revestimento), sendo referido como tempo zero. A seguir, as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (25 °C), por 2 horas, para induzir a redução da MMb a deoximioglobina (Mb+). Após este período, foram novamente coletados os dados espectrofotométricos de reflectância na superfície dos cortes.

A concentração relativa dos pigmentos de mioglobina (OMb, Mb+ e MMb) foi calculada pelo método matemático de Krzywicki (1979 citado por RAMOS; GOMIDE, 2007) no tempo inicial e final, e a MRA foi expressa como a percentagem de MMb do tempo zero (%MMbi) reduzido após 3 horas sob vácuo (%MMbf), ou seja,

$$\text{MRA} = [(\% \text{MMbi} - \% \text{MMbf}) \div \% \text{MMbi}] \times 100$$

### 3.6 Análises microbiológicas

Quantificaram-se os microrganismos psicrotróficos, aeróbios mesófilos e fungos filamentosos e leveduras. Foi utilizado o procedimento para pesagem e preparo das amostras segundo a metodologia descrita na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003).

### 3.6.1 Microrganismos psicrotróficos

Foram retirados, aleatoriamente, 25 g da amostra e homogeneizados com 225 mL (para preparo da primeira diluição:  $10^{-1}$ ) de água peptonada BWT (1%). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em *bag mixer*. As diluições subsequentes foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente para a obtenção das concentrações  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . De cada diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) transferiram-se alíquotas de 1 mL em uma placa de Petri, sendo, em seguida, inoculadas em profundidade em ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram invertidas e incubadas em estufa para demanda biológica de oxigênio (BOD), em temperatura de  $7\pm 1$  °C, por 10 dias. As colônias nas placas foram contadas e os resultados expressos em UFC.g<sup>-1</sup>.

### 3.6.2 Microrganismos mesófilos

Foram retirados, aleatoriamente, 25 g da amostra que foram homogeneizados com 225 mL (para preparo da primeira diluição:  $10^{-1}$ ) de água peptonada BWT (1%); em seguida, as amostras foram homogeneizadas em *bag mixer*. As diluições subsequentes foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente, para a obtenção das concentrações  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . De cada diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) transferiram-se alíquotas de 1 mL em uma placa de Petri, sendo, em seguida, inoculadas em profundidade em ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram invertidas e incubadas em estufa para demanda biológica de oxigênio (BOD), em temperatura de  $36\pm 1$  °C, por 48 horas. As colônias nas placas foram contadas e os resultados expressos em UFC.g<sup>-1</sup>.

### 3.6.3 Fungos filamentosos e leveduras

Foram retirados, aleatoriamente, 25 g da amostra que foram homogeneizados com 225 mL (para preparo da primeira diluição:  $10^{-1}$ ) de água peptonada BWT (1%). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em *bag mixer*. As diluições subsequentes foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente para a obtenção das concentrações  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . De cada diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) transferiram-se alíquotas de 0,1 mL em uma placa de Petri, nas quais foram vertidos cerca de 15 mL do meio ágar batata dextrose (ABD) acidificado com o ácido tartárico a 10%. Após a homogeneização e a solidificação do meio, com o auxílio de alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado cuidadosamente por toda a superfície do meio, até a sua completa absorção. As placas foram invertidas e incubadas em estufa para demanda biológica de oxigênio (BOD), em temperatura de  $25 \pm 1$  °C, por 7 dias. As colônias nas placas foram contadas e os resultados expressos em UFC.g<sup>-1</sup>.

### 3.7 Análise sensorial – perfil descritivo otimizado

Como o objetivo do estudo foi caracterizar a cor de carnes bovinas, foram utilizadas fotografias das carnes nos diferentes tempos de armazenagem.

Em cada tempo de amostragem, os bifos sem o filme de PVC foram fotografados em estúdio fotográfico Photosimile 100 (Photo Studio, Ortery; Figura 1), constituído de quatro lâmpadas (Philips Ecotone PL-L 865/4p; 18W, 6500 K, 1200 lm e 80 Ra), por uma câmara fotográfica Canon PowerShot SX120 IS, de 12 megapixels, posicionada a 34 cm da amostra e programada para foco automático e velocidade ISO 80.

As fotos foram feitas nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 de armazenamento, totalizando cinco fotos para cada tratamento de carne. Para o padrão de marrom,

foi tirada foto do bife controle no tempo 10 de armazenamento. Posteriormente, foi feita formatação das imagens no programa Corel Draw 10.0, em que foram obtidas seções retangulares de 50 x 130 mm dos bifos, coladas em fundo preto e reveladas em papel fotográfico tipo Glossy Glacé Brilhante, 250 g/m<sup>2</sup>, tamanho 102 x 152 mm.

As etapas do perfil descritivo otimizado (SILVA et al., 2012) foram as descritas a seguir.

a) Recrutamento dos julgadores

Foram selecionados 30 julgadores dispostos a participar da pré-seleção, sendo recrutados aqueles que apresentaram disponibilidade de tempo, afinidade pelo produto, habilidade em trabalhar com escala não estruturada, conhecimento sobre termos descritivos e condições de saúde que não comprometessem as análises.

b) Pré-seleção

Na pré-seleção, os 30 julgadores foram submetidos a uma série de quatro testes triangulares, com o objetivo de verificar a facilidade de discriminação de amostras com a aparência sensorialmente semelhantes. As duas amostras utilizadas para a avaliação pelo teste triangular foram carne bovina no tempo 0 dia e no tempo 2 dias de armazenamento.

Para a avaliação das amostras, os candidatos receberam uma ficha resposta em cada sessão, as quais foram separadas e organizadas por candidato, para a quantificação das respostas corretas. Foram selecionados os candidatos que acertaram, no mínimo, 75% dos testes.

Para a determinação da terminologia descritiva e a definição e a familiarização com os materiais de referência, os 19 julgadores selecionados na pré-seleção participaram de uma sessão realizada por um moderador, para a determinação dos atributos e a definição dos materiais de referência. Os atributos avaliados foram cor vermelha e cor marrom para carne bovina. Nesta

etapa, realizou-se também a familiarização dos julgadores com os materiais de referência e com a ficha do teste. Como referência para cor vermelha da carne foi utilizada a foto do controle no tempo 0, para vermelho extremo e do controle no tempo 10, para nenhum vermelho. Para a cor marrom, foi utilizada a foto do controle no tempo 10, para marrom extremo e do controle no tempo 0, para nenhum marrom.

c) Avaliação das amostras

Na avaliação dos produtos utilizando o perfil descritivo otimizado, os materiais de referência foram apresentados durante a avaliação final dos produtos. Assim, os julgadores puderam comparar as amostras com os materiais de referência, facilitando a alocação das intensidades dos atributos na escala não estruturada (SILVA, 2010).

O protocolo atributo por atributo foi utilizado na avaliação das amostras para evitar fadiga sensorial. Somente um atributo foi avaliado por sessão. Os julgadores receberam todas as amostras de uma só vez e foram solicitados a comparar os produtos com os materiais de referência, indicando a intensidade do atributo para cada amostra na escala não estruturada (de 9 centímetros). Foram realizadas três repetições de cada sessão realizada. As 15 amostras foram apresentadas segundo o delineamento de blocos completos, em que cada julgador avaliou todas as amostras.

### **3.8 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e, quando necessário, as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. O efeito do tempo de estocagem foi avaliado por regressão.

Para verificar se existe correlação linear entre os parâmetros avaliados, foi realizada uma análise de correlação de Pearson, considerando-se um nível de significância  $p < 0,05$ .

Para a análise do perfil descritivo otimizado (PDO), os escores sensoriais obtidos para cada atributo de cor foram analisados por meio da ANOVA, com as fontes de variação: amostra, julgador e interação amostra\*julgador. No caso de F (amostra x julgador) significativo, o efeito principal (amostra) foi recalculado utilizando-se o quadrado médio da interação como denominador. O efeito do tempo de armazenamento foi avaliado por análise de regressão simples, regredindo-se as variáveis respostas em função dos tempos em seus componentes lineares e quadráticos, para a escolha do modelo de regressão que melhor descrevesse as variações, de acordo com o teste t de Student, avaliando-se também a falta de ajuste. Por último, foi calculado o coeficiente de exatidão ( $R^2$ ).

Posteriormente, foi realizada a análise de correlação entre as características avaliadas em todo o experimento, cujos coeficientes foram testados pelo teste t de Student.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa estatístico *Statistical Analysis Systems*, versão 9.2, licenciado para a Universidade Federal de Lavras.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A micrografia obtida da superfície do revestimento mostrou superfície homogênea e sem fissuras (Figura 8a), sugerindo uma matriz coesa. Observou-se uma matriz fina e compacta que pode, inclusive, explicar as propriedades de permeabilidade ao vapor de água e a gases. A estrutura externa do revestimento mostrou-se homogênea e densa. Não se observou separação de fases, não houve presenças de poros e foi encontrada excelente integridade estrutural, comparável com a de outros revestimentos comestíveis, como compósitos de proteína de leite e gelatina (JIANG et al., 2010) e proteína de quinoa e quitosana (ABUGOCH et al., 2010).

A superfície do revestimento apresentou alguns pontos em alto relevo (Figura 8a), que pode ser o glicerol incorporado ao revestimento. Sendo assim, esta característica indica alto grau de incorporação do plastificante aos componentes na matriz. Fakhouri, Batista e Grosso (2003) observaram que o ácido láurico utilizado estava fortemente ligado à matriz filmogênica de gelatina quando a morfologia do filme foi observada por MEV. Gelatina e quitosana são biopolímeros hidrofílicos, com boa afinidade e compatibilidade, então, é esperado que formem blendas poliméricas com boas propriedades (SIONKOWSKA et al., 2004).

A superfície da carne controle, não revestida, pode ser observada na Figura (8b), em cujo corte longitudinal são visíveis as fibras da carne.

Na Figura 8(c) é apresentado corte de carne com tratamento monocamada. Pode-se observar que o revestimento aderiu à superfície da carne.

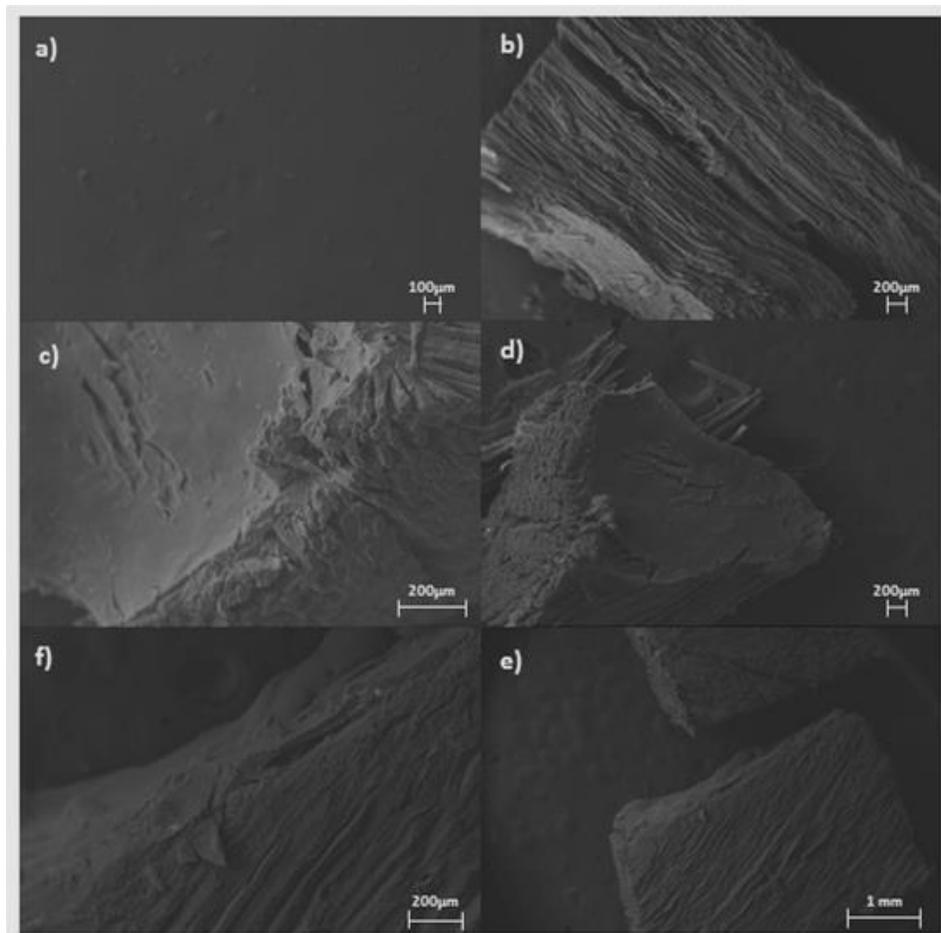


Figura 8 Imagens de microscopia eletrônica de varredura. (a) superfície do revestimento, (b) superfície da carne controle sem revestimento, (c/d) seção de carne revestida em mono camada e (e/f) seção de carne revestida em dupla camada

É possível identificar algumas descontinuidades na parte superior do revestimento, que podem ser visíveis no detalhe da Figura 8 (d). Essas fendas devem ter sido ocasionadas pelo tratamento de vácuo aplicado à amostra, no preparo para a microscopia, que pode ter eliminado o glicerol livre. A presença de fendas e poros na estrutura dos filmes pode comprometer a integridade estrutural do filme e, conseqüentemente, provocar modificações nas suas propriedades funcionais (SOUZA et al., 2004). Estas mesmas fendas foram observadas em outros trabalhos, como em filmes de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000) em filmes à base de proteínas miofibrilares de carne bovina adicionadas de glicerol (SOUZA et al., 2004). Cortes longitudinais de bifes revestidos em dupla camada são apresentados nas Figuras 8 (e) e 8 (f), sendo possível observar uma camada mais espessa de filme, com algumas regiões com maior relevo.

Foi possível realizar a medição da espessura dos revestimentos, sendo a espessura do tratamento de monocamada próxima de 20,34  $\mu\text{m}$  (Figura 9a) e o de dupla camada, cerca de 54,89  $\mu\text{m}$  (Figura 9b). A espessura da dupla camada é cerca de 2,5 vezes a espessura da monocamada, indicando maior aderência do revestimento à primeira camada do que à carne.

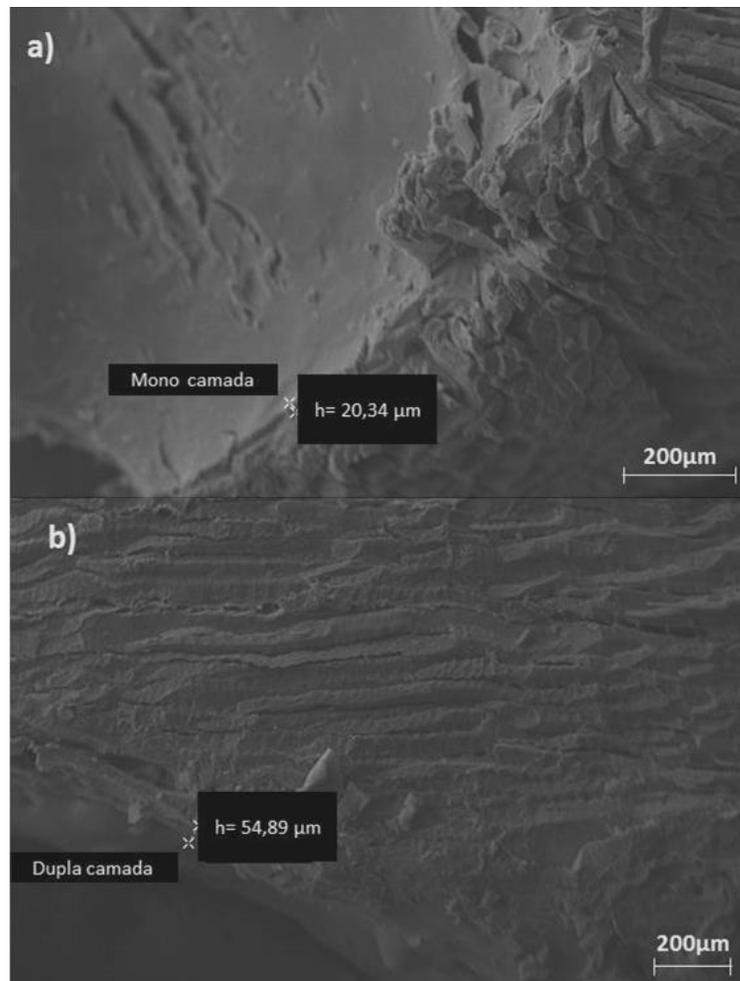


Figura 9 Imagens de microscopia eletrônica de varredura. (a) seção de carne revestida em monocamada, em que espessura do filme = 20,34  $\mu\text{m}$  e (b) seção de carne revestida em dupla camada, em que espessura do filme = 54,89  $\mu\text{m}$

#### 4.2 Perda de peso

A perda de peso foi influenciada ( $p < 0,05$ ) pelo tratamento e pelo tempo de estocagem. Pôde-se observar que a aplicação do revestimento comestível

tanto em mono quanto em dupla camada favoreceu a redução na perda de peso dos bifés (Figura 10). No oitavo dia de estocagem, os revestimentos possibilitaram a redução em até 1% na perda de peso. As equações e os coeficientes de inclinação das curvas de regressão ajustadas são descritos na Tabela 2.

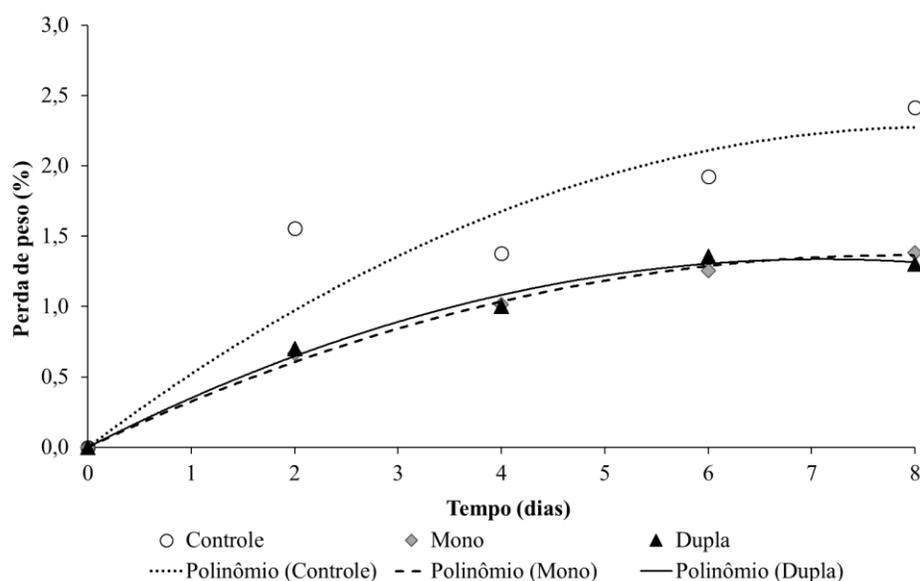


Figura 10 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre a perda de peso de bifés armazenados por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 2 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de perda de peso ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2(\%)$
Controle	$Y_i = 0,55 X_i - 0,03 X_i^2$	0,85
Mono	$Y_i = 0,20 X_i$	0,82
Dupla	$Y_i = 0,17 X_i + 0,17 X_i^2$	0,79

Os bifes controle apresentaram exsudação aparente, enquanto os bifes revestidos não apresentaram perda de água visível. A presença de exsudado não é atrativa ao consumidor, portanto, embalagens em que os bifes não apresentem exsudação aparente são interessantes, do ponto de vista comercial (LAGERSTEDT et al. 2011).

A menor perda de peso ocorreu nos bifes revestidos. Este fato se deve, provavelmente, à permeabilidade dos filmes, uma vez que biopolímeros à base de gelatina têm como propriedade uma alta barreira a gases e ao vapor de água (PEREDA et al., 2011), o que pode ter dificultado a perda de água dos bifes por evaporação ou exsudação. A baixa solubilidade da blenda de gelatina e quitosana pode também ter contribuído para a formação de barreira à água (ZHANG et al., 2002).

Uma vez que a solução filmogênica é uma solução gelatinosa, a menor perda de peso pelos bifes pode ser também devido à alta umidade dos filmes, que pode funcionar como agente sacrificante, ou seja, o revestimento perde sua umidade antes da perda de umidade pelos bifes. Assim, a perda da umidade dos bifes pode ser retardada até que a umidade contida no polímero em fase gel tenha evaporado (KESTER; FENNEMA, 1986).

A permeabilidade ao vapor de água de revestimentos comestíveis depende diretamente de sua espessura. O efeito da espessura é explicado pela natureza hidrofílica de muitos biopolímeros, sendo a difusividade do vapor de água nestes materiais dependente do teor de umidade presente (RIVERO, 2009). Neste experimento, ao contrário do esperado, a maior espessura do revestimento dupla camada não interferiu na perda de peso dos bifes, sendo a perda de peso dos bifes revestidos, tanto em mono quanto em dupla camada, semelhante.

Wu e Weller (2001) estudaram a perda de umidade de bifes de carne bovina envoltos por cinco tipos de biopolímeros diferentes e constataram que a amostra envolta por filme de quitosana (na concentração de 2%) perdeu 66% de

umidade a menos que o controle. Antoniewski et al. (2007) avaliaram a perda por exsudação de carnes bovina, suína, de aves e de filés de salmão cobertos por biofilme à base de gelatina, na concentração de 20%. Todos os tipos de carnes estudados apresentaram menor perda por exsudação que o controle, quando adicionados do filme de gelatina.

Cardoso (2011) avaliou o efeito de revestimentos à base de gelatina e quitosana na perda de peso de bifes de lagarto bovino. Em relação à amostra controle, que apresentou perda de peso de 21,45%, a aplicação dos filmes foi eficiente, permitindo redução média da perda de peso dos bifes de 8,52%, em cinco dias de estocagem, o que representou redução de 12,93% em relação ao controle.

### **4.3 pH**

Foram observados efeitos ( $p < 0,05$ ) de tempo e tipo de tratamento isolados para a variável pH (Figura 11). Os valores de pH da amostra controle foi superior ao dos bifes revestidos em mono e dupla camada. A equação e os coeficientes de regressão dos tratamentos no tempo são apresentados na Tabela 3.

O aumento do pH das amostras controle foi evidenciado a partir do quarto dia de estocagem, o que condiz com trabalho de Cardoso (2011), que analisou o efeito do tempo de estocagem sobre a estabilidade da carne bovina refrigerada durante oito dias.

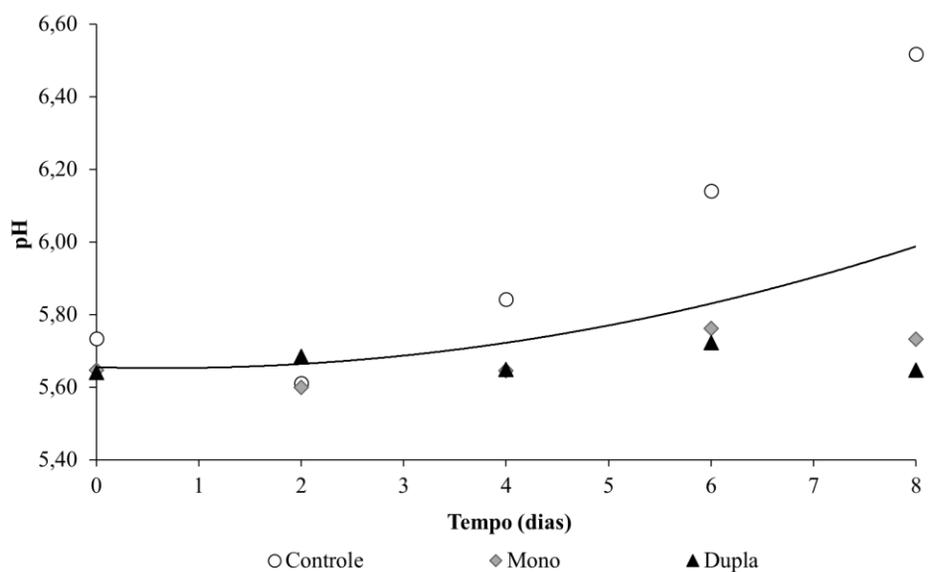


Figura 11 Efeito do tempo sobre o pH de bifes armazenados por 8 dias sob refrigeração a 4 °C

Tabela 3 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de pH ( $Y_i$ ) dos tratamentos durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

	Equação	$R^2$
Tratamentos	$Y_i = 5,60 + 0,04 X_i$	0,56

O aumento do pH pode ser indicativo de crescimento microbiano, pois, em alimentos armazenados sob aerobiose e ricos em proteínas ou aminoácidos livres, como a carne bovina, é comum o aumento no valor de pH à medida que aumenta a contagem de microrganismos deteriorantes (NTZIMANI et al., 2008), ou, então, de proteases endógenas da carne, cuja atividade proteolítica resulta em compostos de caráter básico (VINCI e ANTONELLI, 2002). A correlação ( $p < 0,05$ ) de pH com microrganismos psicrotóxicos ( $p < 0,001$  e  $r = 0,353$ ) e

mesófilos ( $p < 0,05$  e  $r = 0,359$ ) explica o aumento da contagem microbiana com aumento dos valores de pH dos tratamentos com o passar do tempo.

#### 4.4 Oxidação lipídica

O índice de peróxidos (IP) é um indicador sensível da oxidação lipídica apenas no estágio inicial de oxidação, uma vez que, ao atingir certo nível de concentração, mudanças complexas ocorrem, degradando os hidroperóxidos e formando compostos de baixo peso molecular, como aldeídos, que podem ser mensurados pelo índice de TBARS (ARAÚJO, 2006).

Houve efeito significativo da interação tempo e tratamentos para o índice de peróxidos (Figura 12). Foi possível ajustar curvas de regressão ( $p < 0,05$ ) para os valores de IP (Tabela 4).

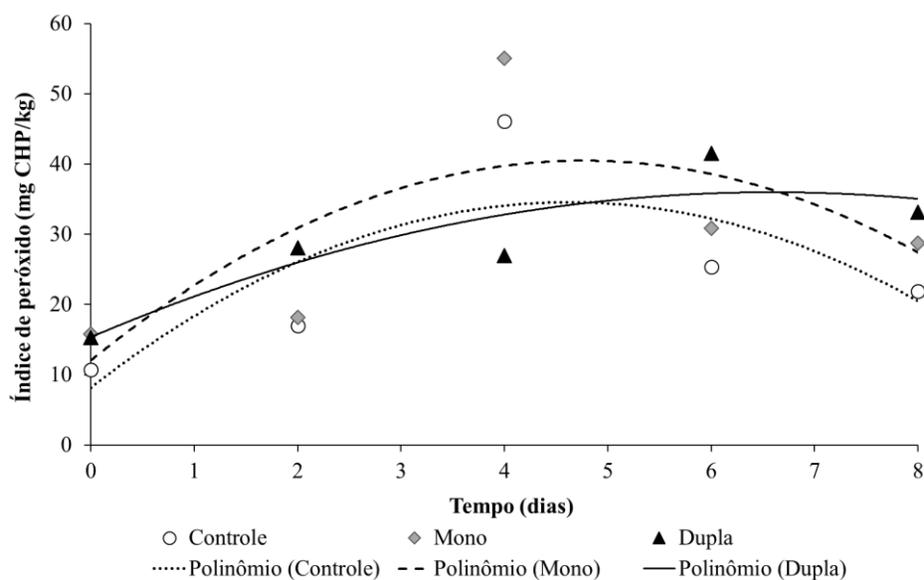


Figura 12 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre índice de peróxidos (IP) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 4 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para o índice de peróxidos ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 8,18 + 11,41 X_i - 1,23 X_i^2$	0,75
Mono	$Y_i = 12,05 + 11,92 X_i - 1,25 X_i^2$	0,45
Dupla	$Y_i = 15,36 + 6,26 X_i + 0,16 X_i^2$	0,71

Durante os primeiros quatro dias de armazenamento, os tratamentos apresentaram aumento no índice de peróxidos, tendo os valores máximos de IP sido encontrados para controle (46,078 mg de CHP/kg) e monocamada (55,109 mg de CHP/kg), evidenciando comportamento semelhante no aumento dos peróxidos para estes dois tratamentos. Foi possível observar que o valor máximo de IP do tratamento revestido por dupla camada (41,531 mg de CHP/kg) ocorreu no sexto dia de armazenamento, sendo inferior ao máximo dos outros tratamentos, observados no quarto dia de armazenamento.

De forma geral, o revestimento em dupla camada retardou em pelo menos dois dias a produção máxima de peróxidos. Produção de peróxidos foi retardada pelo revestimento dupla camada, o que pode ser comprovado pelos menores valores de malonaldeído no índice de TBARS. Os pontos de inflexão das curvas podem indicar o tempo em que a quantidade máxima de produção de peróxidos ocorreu e, posteriormente, começou a diminuir. Para o controle, o ponto de máximo da curva aconteceu em 4,62 dias, enquanto para mono, 4,77 dias e dupla camada, em 19,20 dias, aproximadamente.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com Jeon, Kamil e Shahidi (2002), que reportaram que coberturas à base de quitosana foram efetivas, retardando a produção de produtos primários de oxidação em filés de peixe, estocados a 4 °C. Ojagh et al. (2010) observaram que revestimentos à base de

quitosana foram efetivos, diminuindo a produção de peróxidos em filés de truta estocados sob refrigeração (4 °C).

Os peróxidos são produtos primários da oxidação e são intermediários instáveis. No decorrer da sua decomposição, geram-se compostos de natureza muito diversa, os quais são designados como produtos secundários (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). O parâmetro geralmente utilizado para medir a extensão da oxidação nesta fase é o número de TBARS.

Os valores de TBARS dos bifes foram influenciados pela interação tratamento e tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ). Conforme observado na Figura 13, todos os tratamentos revestidos apresentaram valores estatisticamente menores durante os oito dias, quando comparados aos resultados encontrados para o controle ( $p < 0,05$ ). Os coeficientes de regressão de cada interação são apresentados na Tabela 5.

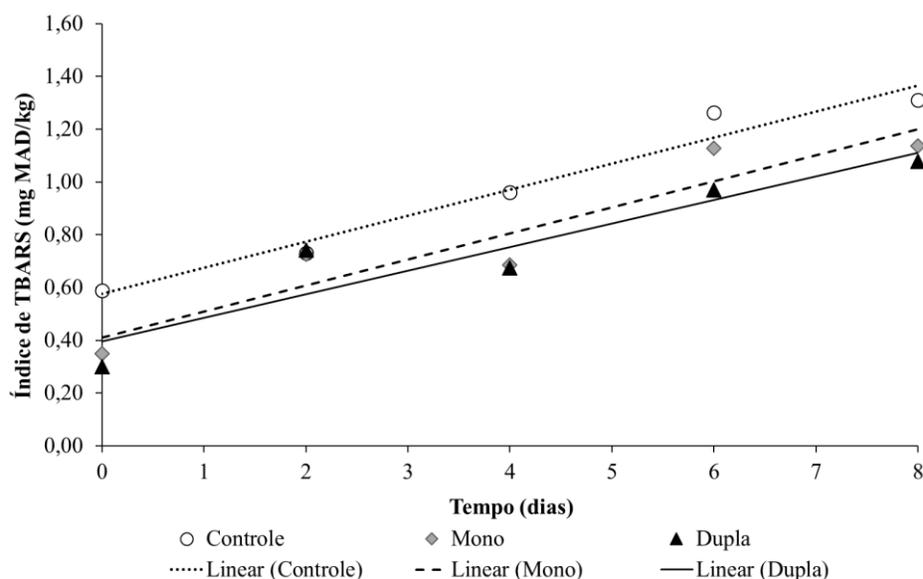


Figura 13 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o índice de TBARS de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 5 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para o índice de TBARS ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C.

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 0,57 + 0,10 X_i$	0,90
Mono	$Y_i = 0,41 + 0,10 X_i$	0,86
Dupla	$Y_i = 0,40 + 0,09X_i$	0,85

No quarto dia de armazenamento, a amostra controle apresentou índices de TBARS acima do limiar de percepção de sabor estranho e rancidez oxidativa (1 mg malonaldeído/kg) reportado por McKenna et al. (2005) para carne bovina. Os bifes tratados com mono (1,12 mg MDA/kg) e dupla camada (0,97 mg MDA/kg) atingiram este limiar posteriormente, no sexto dia de armazenamento. Sendo assim, pode-se deduzir que a aplicação de revestimento é efetiva na prevenção da oxidação lipídica.

Segundo Araújo (2006) e Silva, Borges e Ferreira (1999), a formação de produtos secundários pode ser percebida com a diminuição dos valores de peróxidos. No sexto e no oitavo dia de estocagem, quando os valores de peróxidos diminuíram, o índice de TBARS aumentou. Quando relacionados os valores de TBARS aos resultados de índice de peróxidos, observou-se correlação ( $p > 0,05$ ) entre os dados.

É possível que as blendas poliméricas adicionadas na forma de revestimentos comestíveis reduzam o acesso do oxigênio até a superfície da carne e, sendo assim, retardam o processo de oxidação lipídica. De acordo com Krochta and De Mulder-Johnson (1997), devido às boas propriedades de barreira ao oxigênio, os revestimentos à base de gelatina são mais eficientes na redução da oxidação lipídica, quando comparados com filmes à base de polissacarídeos. Associado a isso, os revestimentos à base de quitosana exibem uma ótima

barreira ao oxigênio e, quando aplicados diretamente sobre a superfície da carne, podem agir como barreira entre a carne e o ambiente externo, retardando, assim, a difusão de oxigênio para a superfície da carne bovina (JEON; KAMIL; SHAHIDI, 2002). Neste trabalho, supõe-se que as blendas tenham reduzido o acesso de oxigênio na superfície da carne, retardando o processo de oxidação lipídica nos revestimentos adicionados. O revestimento de dupla camada pode ter sido mais efetivo na inibição da oxidação devido à maior espessura e, conseqüentemente, à menor permeabilidade ao oxigênio (RIVERO, 2009).

Os menores valores de TBARS encontrados para bifes de carne bovina, durante o período de armazenamento, podem ser também resultado da propriedade antioxidante da quitosana. Kamil, Jeon and Shahidi (2002) demonstraram que a quitosana pode ser considerada um antioxidante natural, estabilizando os lipídios contidos em alimentos. A quitosana pode também diminuir a oxidação lipídica, devido à sua propriedade quelante ou de complexação com lipídios (ALISHAHI; AİDER, 2012), fazendo que estes componentes não estejam disponíveis para reações oxidativas. A quelação de íons metálicos é uma das razões pelas quais a quitosana pode ser considerada um antioxidante natural (MOHAN et al., 2012).

Darmadji e Izumimoto (1994) relataram que a adição de quitosana em 0,2%, 0,5% e 1,0% resultou em diminuição de 10%, 25% e 40%, respectivamente, nos valores de TBARS, no tempo zero de armazenamento de bifes de carne bovina. Ainda segundo estes autores, após três dias de estocagem a 4 °C, a quitosana causou redução de 70% do valor de TBARS. Angelo e Vercellotti (1989) também relataram que a n-carboximetilquitosana foi eficaz no controle de 93% de oxidação de carne moída.

Em contrapartida, Wu et al. (2000) relataram que bifes envoltos por filmes de quitosana no tempo zero apresentaram maiores índices de TBARS que o controle. Segundo os autores, isso, provavelmente, ocorreu devido à alta

permeabilidade ao oxigênio da quitosana em sua forma gelatinosa. Assim, no momento da imersão, houve um favorecimento da oxidação dos bifes no tempo inicial.

López-Caballero et al. (2005) revestiram filés de bacalhau com revestimentos à base de gelatina e quitosana e estocaram por 15 dias, a 2 °C. Não foi encontrado efeito significativo dos tratamentos para a prevenção da oxidação lipídica.

Antoniewski et al. (2007) reportaram que a aplicação de revestimentos à base de gelatina não apresentou diferenças nos valores de TBA de carne bovina, suína, salmão e frangos, comparado com os respectivos controles. Jeon, Kamil e Shahidi (2002) reportaram que revestimentos à base de quitosana foram efetivos na redução do conteúdo de TBARS de bacalhau revestido.

A taxa de oxidação lipídica muscular também pode atuar como indicativo de grau de susceptibilidade à oxidação dos pigmentos cárneos, tendo em vista a estreita relação entre esses dois processos oxidativos (MCKENNA et al., 2005).

De acordo com Faustmann et al. (1989), o acúmulo de compostos de carbonila pela insaturação de ácidos graxos e fosfolipídeos é correlacionado com a oxidação da mioglobina nas carnes frescas.

Descalzo et al. (2008) e Esmer et al. (2011) demonstraram a alta correlação entre a perda de estabilidade oxidativa e a formação de metamioglobina. Greene (1971) e Renerre (1990) encontraram que a oxidação lipídica e a oxidação do pigmento na carne fresca ocorrem simultaneamente, o que foi confirmado neste experimento, devido à alta correlação entre teor de MMb e índice de TBARS ( $p < 0,001$  e  $r = 0,693$ ), assim como a correlação negativa de TBARS com O2Mb ( $P < 0,001$  e  $r = -0,637$ ), indicando que o aumento de oxidação se correlaciona fortemente com a diminuição do pigmento vermelho-brilhante da carne.

#### 4.4 Pigmentos relativos da mioglobina

A aplicação do revestimento comestível em mono e dupla camada influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) o teor de pigmentos relativos da mioglobina oximioglobina ( $O_2Mb$ ) (Figura 14), deoximioglobina ( $Mb^+$ ) (Figura 15) e metamioglobina ( $MMb$ ) (Figura 16), comparado com o controle, durante todo o tempo de estocagem. Os coeficientes de regressão das interações para  $O_2Mb$ ,  $Mb^+$  e  $MMb$  estão representados na Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

A descoloração da carne é resultado da oxidação da  $Mb^+$  ou da  $O_2Mb$  a  $MMb$  (SWATLAND, 2004). Para o tratamento controle, o teor de  $O_2Mb$  declinou muito mais rapidamente, quando comparado aos bifes tratados com mono e dupla camada.

A conversão de  $O_2Mb$  a  $MMb$  no controle foi evidenciada a partir do segundo dia de estocagem, indicando escurecimento mais rápido da carne não revestida. O tratamento monocamada apresentou ligeira conversão se  $O_2Mb$  a  $MMb$ , durante o tempo de estocagem, sendo os teores de  $Mb^+$  mantidos em 6,92% durante este período.

Durante os oito dias de estocagem, não foi observado efeito do tempo para o tratamento de dupla camada. Sendo assim, este tratamento manteve o teor de  $O_2Mb$  na média de 65,03%, o teor de  $Mb^+$  em 6,07% e o teor de  $MMb$  em 28,88%, indicando favorecimento da estabilidade da cor dos bifes tratados com duas camadas durante a estocagem (Figuras 14, 15 e 16 e Tabelas 6, 7 e 8).

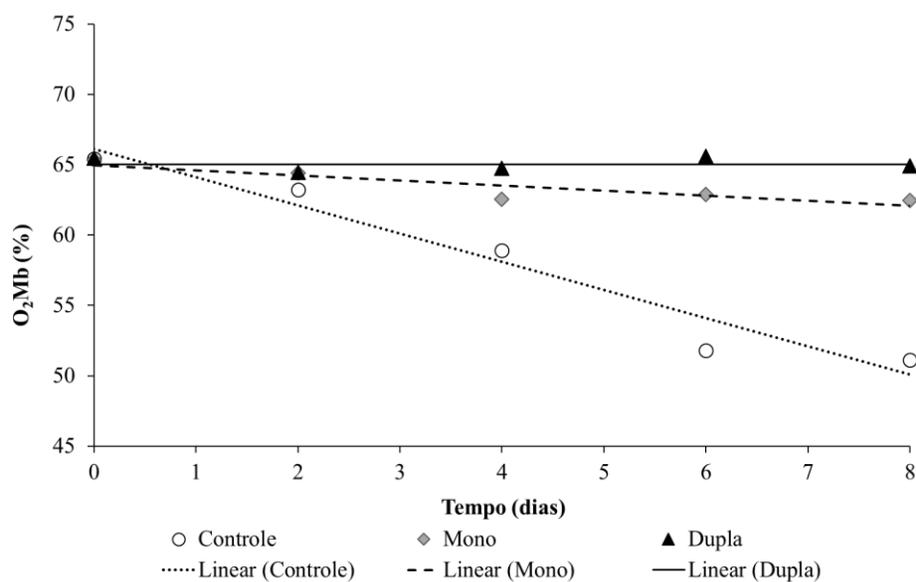


Figura 14 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o teor de oximioglobina (O<sub>2</sub>Mb) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 6 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão (R<sup>2</sup>) para teor de oximioglobina – O<sub>2</sub>Mb (Y<sub>i</sub>) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento (x, em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	R <sup>2</sup>
Controle	$Y_i = 66,12 - 2,00 X_i$	0,83
Mono	$Y_i = 64,98 - 0,36 X_i$	0,52
Dupla	$Y_i = 65,03$	-

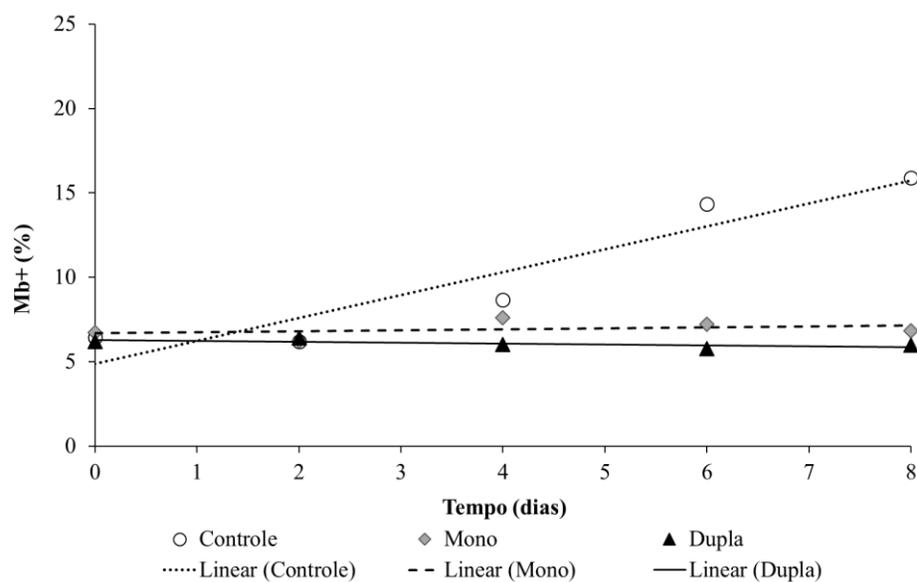


Figura 15 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o teor de de oximioglobina (Mb+) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 7 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de deoximioglobina – Mb+ ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 4,89 + 1,35 X_i$	0,68
Mono	$Y_i = 6,92$	-
Dupla	$Y_i = 6,07$	-

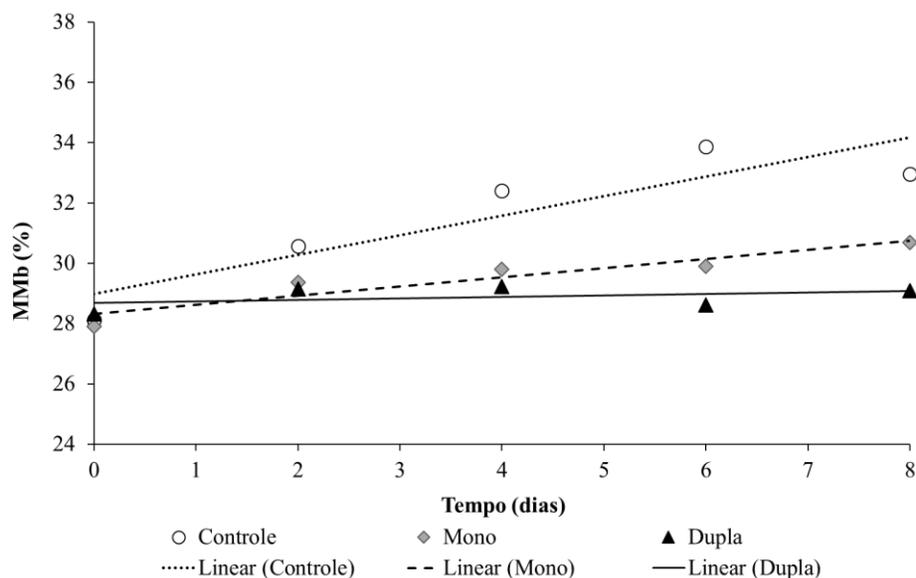


Figura 16 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada sobre o teor de metamioglobina (MMb) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 8 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de metamioglobina – MMb ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 28,98 + 0,64 X_i$	0,73
Mono	$Y_i = 28,31 + 0,30 X_i$	0,79
Dupla	$Y_i = 28,88$	

O acúmulo de MMb, pigmento de coloração marrom, promove a depreciação do produto pela perda da coloração característica da carne fresca. Segundo Renner e Labas (1987), os consumidores tendem a perceber diferença

entre carnes quando aproximadamente 20% de MMb estão presentes, enquanto há a tendência da rejeição de carnes em que o teor de MMb esteja acima de 40% (GREENE; HSIN; ZIPSER, 1971). Baseado nas equações de MMb, foi evidenciado que bifes revestidos em mono e dupla camada apresentaram maior estabilidade de cor, quando comparados com o controle; no entanto, nenhuma das amostras testadas atingiu o limiar de rejeição proposto por Greene, Hsin e Zipser (1971).

Sistemas de embalagem com alto teor de oxigênio, por um lado, permitem maior oxigenação do pigmento de mioglobina, conferindo-lhe maior estabilidade de cor (MANCINI; HUNT, 2005); por outro lado, talvez se torne mais provável a formação de espécies reativas de oxigênio a partir da radiação UV, as quais poderiam induzir reações oxidativas, dentre essas, dos pigmentos de cor.

Manicini e Hunt (2005) concluíram que tanto a atividade enzimática quanto o teor de NADH decaem continuamente com o aumento do tempo *post mortem*. Portanto, carne estocada durante longos períodos de tempo poderia, potencialmente, acumular MMb a uma taxa mais rápida, durante exposição em balcões e descolorir mais rapidamente.

Neste experimento, o pH apresentou altas correlações com os valores de MMb ( $p < 0,001$  e  $r = 0,4971$ ), Mb+ ( $p < 0,001$  e  $r = 0,4971$ ) e correlação negativa com O<sub>2</sub>Mb ( $p < 0,001$  e  $r = -0,6001$ ), indicando que o aumento do pH é relacionado à diminuição de O<sub>2</sub>Mb e, conseqüentemente, à diminuição da cor vermelho brilhante da carne.

#### **4.5 Análise objetiva da cor**

A formação da MMb reduz os valores de a\* e b\* (MCKENNA; LUNDSTROM; TORNERG, 2005), com perda da coloração vermelha, e de

$L^*$  (LINDAHL et al., 2001), o que torna a carne escura e pouco atrativa para os consumidores. Portanto, a cor da carne será favorecida quando os índices de cor forem elevados e assim se mantiverem durante o período de armazenagem (CARDOSO; RAMOS; RAMOS, 2009b).

A luminosidade é considerada o parâmetro de cor que governa a qualidade da carne e de produtos cárneos (GARCIA-ESTEBAN et al., 2003). Segundo McKenna et al. (2005), carnes expostas como no varejo são mais susceptíveis a mudanças na luminosidade. Segundo Ramos e Gomide (2007), altos valores de luminosidade são indicativos de carne mais clara.

No tempo zero de estocagem (Figura 17), o controle apresentou maior decréscimo dos valores de  $L$ , quando comparado com os tratamentos mono e dupla camada (Tabela 9).

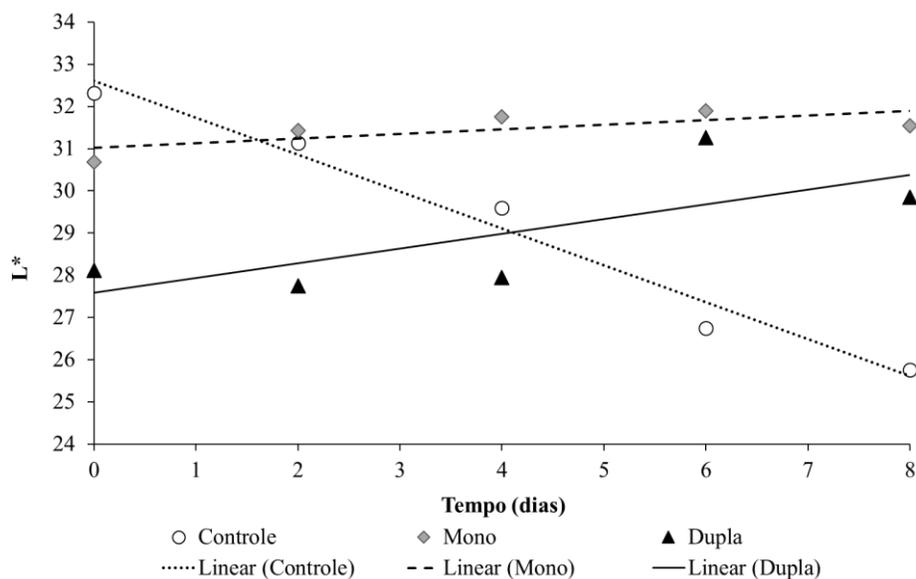


Figura 17 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos valores de  $L^*$  de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 9 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de L ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 32,61 - 0,87 X_i$	0,91
Mono	$Y_i = 31,46$	-
Dupla	$Y_i = 27,58 + 0,35 X_i$	0,32

De imediato, a aplicação dos filmes pode ter reduzido a luminosidade da carne. No entanto, a partir do quarto dia de estocagem, a dupla camada apresentou evolução dos valores de  $L^*$ , indicando um clareamento da carne. O revestimento monocamada apresentou os maiores valores de  $L^*$  em todos os tempos de estocagem.

Com a maior perda de peso, e conseqüentemente perda de água do controle, este apresentou maior escurecimento durante o tempo de estocagem. A baixa perda de água do tratamento monocamada pode explicar a manutenção no valor de  $L^*$  com o tempo. O incremento dos valores de  $L^*$  do revestimento dupla camada pode ser explicado pelas duas camadas distintas do revestimento: a hidratação dessas camadas pode ter aumentando o espalhamento e a dispersão de luz, conseqüentemente aumentado os valores de  $L^*$  (SWATLAND, 2004).

McKenna et al. (2005) observaram pequeno incremento na luminosidade de bifes de *M. semitendinosus* envoltos apenas por filmes de PVC, durante 5 dias de estocagem. Suman et al. (2010) encontraram, em carne moída embalada por biofilme de quitosana e filme de PVC, menor luminosidade que os bifes embalados somente em PVC, em todos os tempos analisados (0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias).

O índice de vermelho ( $a^*$ ) é, principalmente, relacionado à carne vermelha (RAMOS; GOMIDE, 2007). Segundo McKenna et al. (2005), há forte relação entre os valores de  $a^*$  e o grau de oxigenação do pigmento ( $O_2Mb$ ).

Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para a interação tratamentos e tempo para o índice de  $a^*$  (Figura 18). Durante o período de estocagem, observou-se ( $p < 0,05$ ) um decréscimo nos valores de  $a^*$  do controle, enquanto os valores de  $a^*$  do revestimento em monocamada mantiveram-se estáveis (média = 20,846) e o revestimento em dupla camada apresentou incremento dos valores de  $a^*$  com o tempo (Tabela 10). A diminuição dos valores de  $a^*$  do controle devido à conversão do pigmento de  $O_2Mb$  para de  $MMb$ , durante o período de estocagem (McKENNA et al., 2005), que ocorreu devido à menor oxigenação da carne, ou, ainda, pela foto-oxidação do pigmento, que favorece o aumento da  $MMb$ , conferindo a coloração marrom à carne (ROBIN et al., 2014).

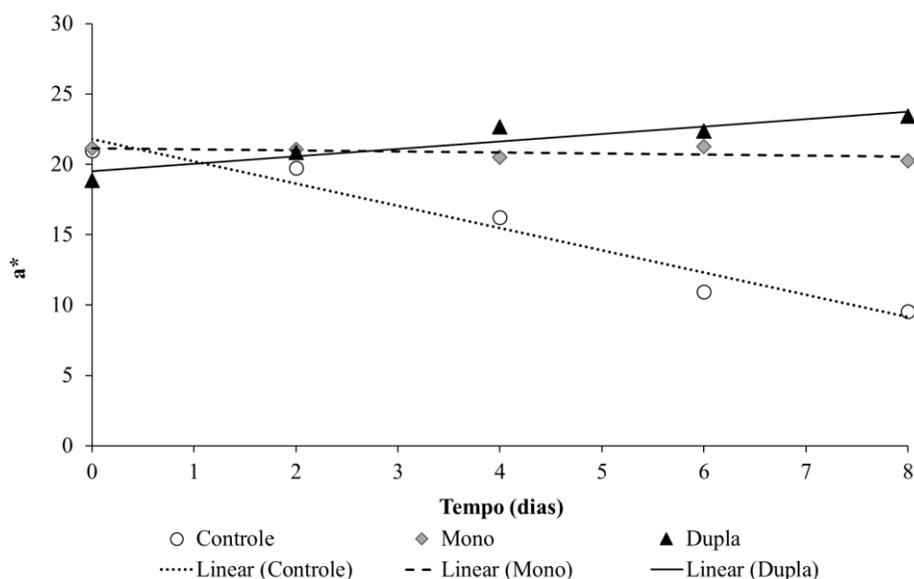


Figura 18 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos valores de  $L^*$  de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 10 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de  $a^*$  ( $Y_i$ ) dos tratamentos bcontrole, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 21,82 - 1,58 X_i$	0,88
Mono	$Y_i = 20,84$	-
Dupla	$Y_i = 19,51 - 0,94 X_i$	0,37

A manutenção dos valores de  $a^*$  pelos revestimentos mono e dupla camada pode estar relacionada à maior barreira ao oxigênio, o que dificulta a penetração de oxigênio na carne e reduz, conseqüentemente, a TCO da carne, prolongando a atividade das metamioglobina redutase (MRA) e favorecendo a manutenção da cor vermelha, ou seja, os valores de  $a^*$ . Como a espessura do filme dupla camada foi maior, este revestimento teve maior efeito na diminuição da TCO e, conseqüentemente, foi observado o incremento da cor vermelha dos bifes.

Uma das causas pela qual a quitosana contida nos revestimentos pode ter contribuído para a manutenção da coloração vermelha da carne pode ser a sua capacidade quelante. Segundo Muzzarelli et al. (1985), a quitosana é um agente quelante para inúmeros íons metálicos, devido ao seu grupo amina e hidroxilas que atacam os doadores de elétrons. Knorr (1991) relatou que o íon férrico ( $Fe^{3+}$ ), componente da metamioglobina, pode ser absorvido pela quitosana a uma taxa de 17,6mg/g de quitosana em 30 minutos. O ferro é conhecido como promotor de oxidação via geração de radicais livres e sua interação com a quitosana pode estabilizar a cor da superfície da carne.

Suman et al. (2010) encontraram maior índice de vermelho em carne moída envolta por filmes de quitosana, estocada por 3, 4 e 5 dias, quando comparada com o controle. Os pesquisadores concluíram que a adição de filmes

de quitosana estabilizou a coloração vermelha da carne moída. Georgantelis et al. (2007) observaram que, durante seis meses de estocagem sob congelamento, bolos de carne moída adicionados de quitosana (individualmente ou adicionados de alecrim ou de  $\alpha$ -tocoferol) apresentaram maior intensidade da cor vermelha do que os controles, inclusive de controles contendo apenas alecrim ou  $\alpha$ -tocoferol. As carnes moídas que não continham quitosana foram consideradas inaceitáveis após 120 dias de armazenamento, em embalagem sob condição aeróbica.

No trabalho de Descalzo et al. (2008) descreve-se a relação entre a deterioração da cor durante o envelhecimento e os níveis de TBARS no músculo *Longissimus dorsi*. As mudanças principais foram decréscimo nos parâmetros de vermelho ( $a^*$ ) e amarelo ( $b^*$ ). Neste experimento, os valores de  $a^*$  correlacionaram-se positivamente com  $L^*$  ( $p < 0,001$  e  $r = 0,6326$ ) e apresentaram alta associação entre valores de  $a^*$  e  $b^*$  ( $p < 0,001$  e  $r = 0,978$ ),  $a^*$  e  $C^*$  ( $p < 0,001$  e  $r = 0,997$ ) e  $a^*$  e  $h^*$  ( $p < 0,001$  e  $r = 0,864$ ). Além disso, foi encontrada alta correlação negativa de  $a^*$  com os pigmentos de MMb ( $p < 0,001$  e  $r = -0,836$ ) de Mb+ ( $p < 0,001$  e  $r = -0,890$ ) e alta correlação de  $a^*$  com  $O_2Mb$  ( $p < 0,001$  e  $r = 0,932$ ), indicando que, no escurecimento da carne, em que há a formação de MMb e Mb+, há também um decréscimo do parâmetro  $a^*$  da cor.

Diferenças no índice de amarelo ( $b^*$ ) ficaram evidenciadas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos durante o período de estocagem (Figura 19). O comportamento dos tratamentos para os valores de  $b^*$  foi semelhante ao dos valores de  $a^*$ . Durante o período de estocagem, observou-se ( $p < 0,05$ ) decréscimo nos valores de  $b^*$  do controle, enquanto os valores de  $a^*$  do revestimento em monocamada mantiveram-se estáveis e o revestimento em dupla camada apresentou incremento dos valores de  $a^*$  com o tempo (Tabela 11).

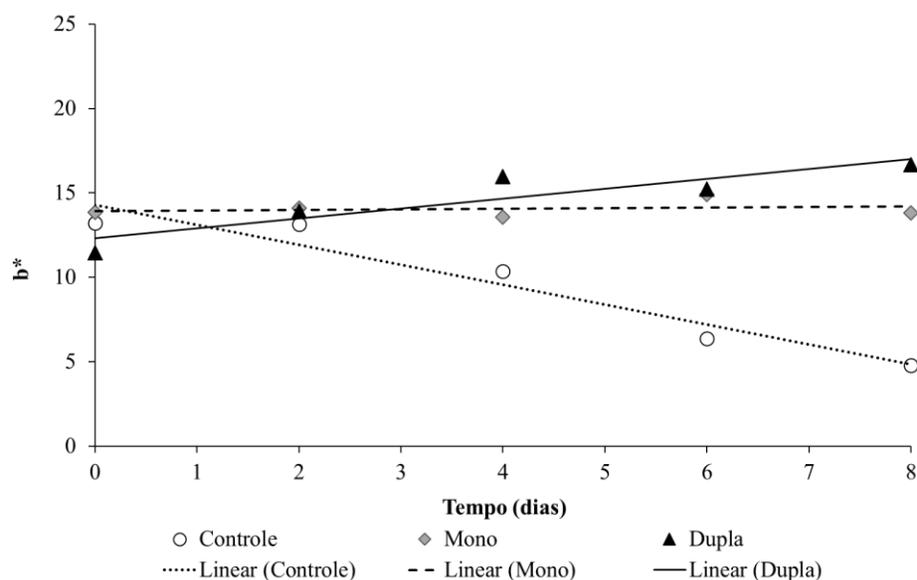


Figura 19 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camadas no parâmetro de amarelo ( $b^*$ ) de bifés armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 11 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de  $b^*$  ( $Y_i$ ) dos tratamentos bcontrole, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 14,29 - 1,18 X_i$	0,85
Mono	$Y_i = 14,05$	-
Dupla	$Y_i = 12,30 + 0,59 X_i$	0,30

Mudanças nos valores de  $L^*$  e  $b^*$  com a aplicação de revestimentos de gelatina e quitosana em mono e dupla camada podem estar relacionadas à espessura do filme formado nos bifés, que aumenta à medida mais de uma camada é aplicada. Isso explica o aumento nos valores de  $b^*$ , devido à

participação dos pigmentos e/ou corantes presentes nestes, e redução nos valores de  $L^*$ , uma vez que os filmes vão se tornando cada vez menos translúcidos, em função da modificação do seu índice de refração da camada superficial (CARDOSO, 2011).

Segundo McKenna et al. (2005) e Seyfert et al. (2006), músculos com acúmulo rápido de MMb (baixa estabilidade de cor) apresentam menores valores de  $b^*$ , confirmando a hipótese de Lindahl, Lundstrom e Tornberg (2001), segundo a qual maiores valores de  $b^*$  se devem a uma maior proporção de  $O_2Mb$  (oxigenação) na carne. Dessa forma, a redução nos valores de  $b^*$  no controle, com o decorrer do experimento, pode ser identificada como uma redução nos percentuais de  $O_2Mb$  na superfície da carne. Esta hipótese pode ser confirmada pelas altas correlações de  $b^*$  com o teor de  $O_2Mb$  ( $p < 0,001$  e  $r = 0,932$ ) e com os valores de MMb ( $p < 0,001$  e  $r = -0,760$ ). Seyfert et al. (2006) constataram que carne moída exposta no varejo apresentou diminuição nos valores de  $a^*$  e  $b^*$ .

A saturação descreve a intensidade ou a quantidade de uma tonalidade. Assim, cores que apresentam baixo valor de saturação são consideradas pálidas enquanto as com alto valor de  $C^*$  são consideradas saturadas (RAMOS; GOMIDE, 2007). Portanto, desde que a cor pura (tonalidade) seja a ideal, maiores valores de saturação são mais desejáveis.

Diferenças na saturação ( $C^*$ ) e na tonalidade ( $h^*$ ) ficaram evidenciadas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos durante o período de estocagem (Figuras 20 e 21, respectivamente). Os comportamentos dos tratamentos para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram também observados para os parâmetros de saturação ( $C^*$ ) e na tonalidade ( $h^*$ ) dos bifés. Foi observado decréscimo nos valores de  $C^*$  e  $h^*$  do controle no tempo de estocagem, enquanto  $C^*$  e  $h^*$  do tratamento monocamada mantiveram-se estáveis, e o revestimento em dupla camada apresentou incremento nestes dois parâmetros (Tabelas 12 e 13).

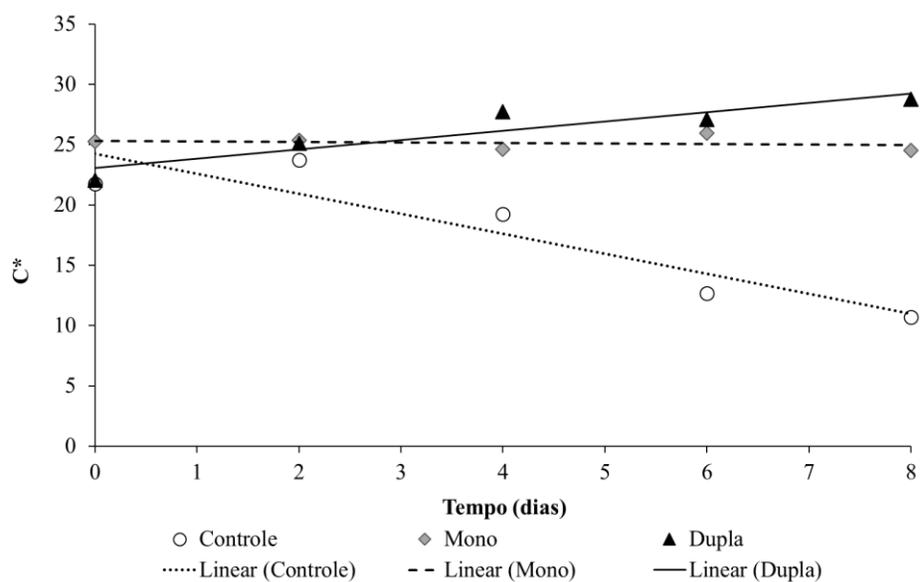


Figura 20 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos parâmetros de saturação ( $C^*$ ) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 12 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de  $C^*$  ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 26,07 - 1,96 X_i$	0,88
Mono	$Y_i = 25,14$	-
Dupla	$Y_i = 23,08 + 0,77 X_i$	0,84

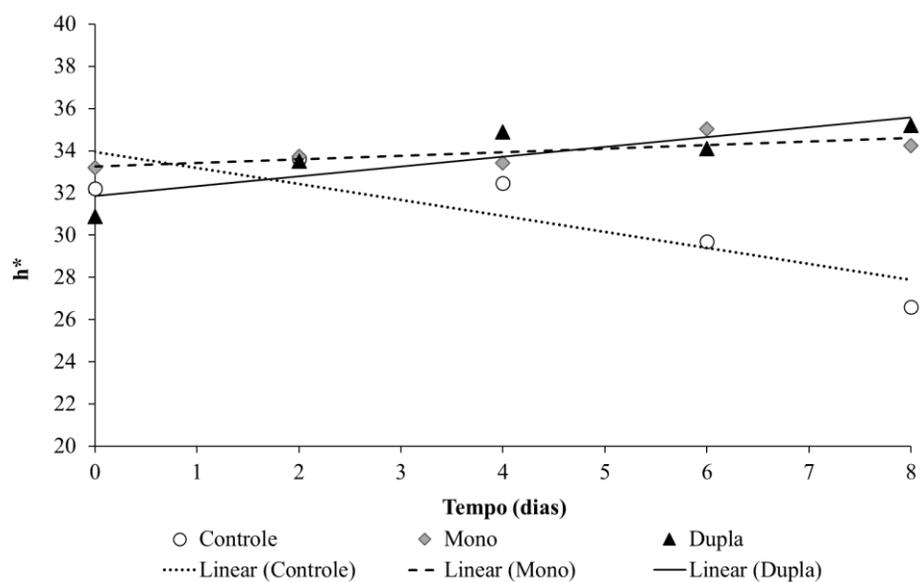


Figura 21 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada nos parâmetros da tonalidade ( $h^*$ ) de bifes armazenados, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Tabela 13 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de  $h^*$  ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 33,96 - 0,76 X_i$	0,57
Mono	$Y_i = 33,71$	-
Dupla	$Y_i = 31,86 + 0,46 X_i$	0,23

Segundo Hutchings (1994), a saturação da cor pode definir e determinar a vida útil da carne fresca. Como observado no estudo de Seyfert et al.(2006), valores de  $C^*$  decrescem à medida que o tempo de estocagem aumenta. Raines,

Hunt e Unruh (2009) observaram que carne moída armazenada como no varejo tiveram diminuição dos valores de  $a^*$  e  $C^*$ , dos dias 0 a 4 de exibição.

Na formação de MMb, a  $C^*$  diminui à medida que a cor muda de vermelho-brilhante para vermelho-escuro e de marrom para marrom-esverdeado. Foi observada média correlação negativa de  $C^*$  com o teor de MMb ( $p < 0,001$  e  $r = -0,539$ ). Além disso, o aumento da espessura do revestimento no bife causa mudança nos valores de  $h^*$  (CARDOSO, 2011).

Outro fator relacionado a alterações as coordenadas de cor é o pH, cujo aumento está associado à redução dos valores de  $h^*$  e  $C^*$  (GOALSZ; SILVA; SILVA, 2013), fator que também foi observado neste experimento, no qual houve relação negativa entre pH e  $C^*$  ( $p < 0,001$  e  $r = -0,558$ ). e pH e  $h^*$  ( $p < 0,001$  e  $r = -0,445$ ).

Os valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^*$  dos tratamentos apresentaram evolução similar durante o tempo de estocagem. Em termos gerais, o controle apresentou os menores valores dos parâmetros de cor, quando comparado aos outros tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Para os tratamentos revestidos por monocamada, os valores de todos os parâmetros de cor apresentaram comportamento estável durante o tempo, sendo utilizada a média dos valores para determinar o comportamento deste tratamento. Os dados de cor para o tratamento monocamada foram representados pelas médias dos valores no tempo. Já os bifes revestidos com dupla camada apresentaram grande incremento nos parâmetros de cor, de zero ao oitavo de estocagem.

#### **4.6 Determinação da taxa de consumo de oxigênio e da atividade da metamioglobina redutase**

Durante a estocagem em embalagens tradicionais de PVC, há uma descoloração e a atividade da metamioglobina redutase (MRA) diminui na superfície de bifes de carne bovina (SAMMEL et al., 2002; SEYFERT et al., 2006). Tanto a taxa de consumo de oxigênio (TCO) como a MRA são relacionadas com a estabilidade de cor, pois quanto mais baixa a TCO e maior a MRA, mais estável será a cor da carne (AMSA, 2012). De acordo com McKenna et al. (2005), tanto a TCO quanto a MRA diminuem com o aumento do tempo de exposição.

Pesquisas (MCKENNA et al., 2005 ; O'KEEFE; HOOD, 1982) têm indicado que um aumento na TCO diminui a estabilidade de cor, pois há menos oxigênio disponível para ligar-se à mioglobina, criando condições oxidantes que favorecem a formação de MMb.

A TCO atua como um dos mais importantes parâmetros na determinação da estabilidade da cor em carnes. Músculos de TCO elevada são caracterizados como de baixa estabilidade. Portanto, um maior consumo de oxigênio é responsável por uma descoloração mais rápida da carne cor (O'KEEFE; HOOD, 1982).

Foi observada interação entre tempo e tratamento ( $p < 0,05$ ) para a TCO. Portanto, foi realizada decomposição de tratamentos no tempo (Figura 22). Observou-se que, no tempo inicial, as médias de TCO não diferiram entre os três tratamentos. No segundo dia de estocagem, foi observada queda dos valores de TCO para os três tratamentos, sendo a taxa de consumo do tratamento monocamada intermediária à do controle e à da dupla camada. No sexto tempo de armazenamento, a média do controle foi superior à dos tratamentos mono e dupla camada.

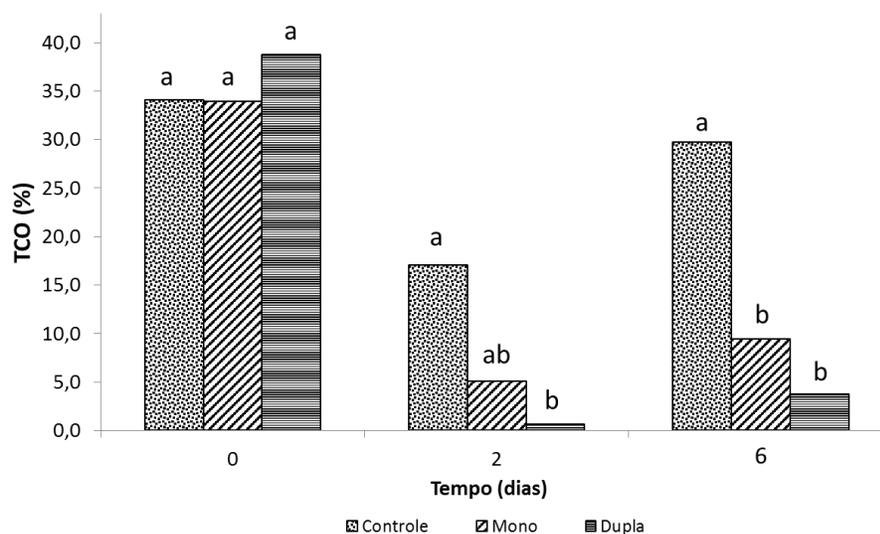


Figura 22 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na taxa de consumo de oxigênio (TCO) de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C

A profundidade em que o oxigênio penetra depende de um equilíbrio químico entre a concentração de oxigênio na superfície e a respiração mitocondrial residual do músculo (MCKENNA et al., 2005). A aplicação de revestimento à base de gelatina e quitosana pode ter funcionado como uma barreira ao oxigênio (KROCHTA; DEMULDEN-JOHNSON, 1997), implicando em uma menor TCO pela mitocôndria e resultando em menores teores de oxigênio livre para se ligar à mioglobina dos tratamentos revestidos, evitando, assim, condições que favorecem a formação de MMb. Menor TCO também implica em menor formação de espécies de oxigênio reativas (ROS), capazes de provocar a oxidação da mioglobina ou, mesmo, a oxidação lipídica (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Altas TCOs diminuem a penetração de oxigênio no tecido muscular, favorecendo a formação do pigmento de Mb+ próximo à superfície da carne, o qual é mais susceptível à oxidação que a O<sub>2</sub>Mb (MCKENNA et al., 2005).

Associado a isso, uma menor TCO implica, possivelmente, em uma menor ação da atividade da metamioglobina redutase (MRA) na manutenção da condição redutora na carne, prolongando sua atividade com o tempo de armazenamento.

King et al. (2011) relataram que a estabilidade de cor foi correlacionada negativamente com TCO, mas, após seis dias de armazenamento, a estabilidade de cor e a TCO não foram mais correlacionadas.

Foi observada interação para tempo e tratamento ( $p < 0,05$ ) para a TCO. Portanto, foi realizada decomposição de tratamentos no tempo (Figura 26). De imediato, a atividade da MRA foi influenciada pela aplicação dos filmes, principalmente pelo tratamento dupla camada, que diferiu do controle. No segundo e no sexto dia de armazenamento, a atividade da MRA decaiu para o controle, sendo mantida pela aplicação dos revestimentos em mono e dupla camada (Figura 19).

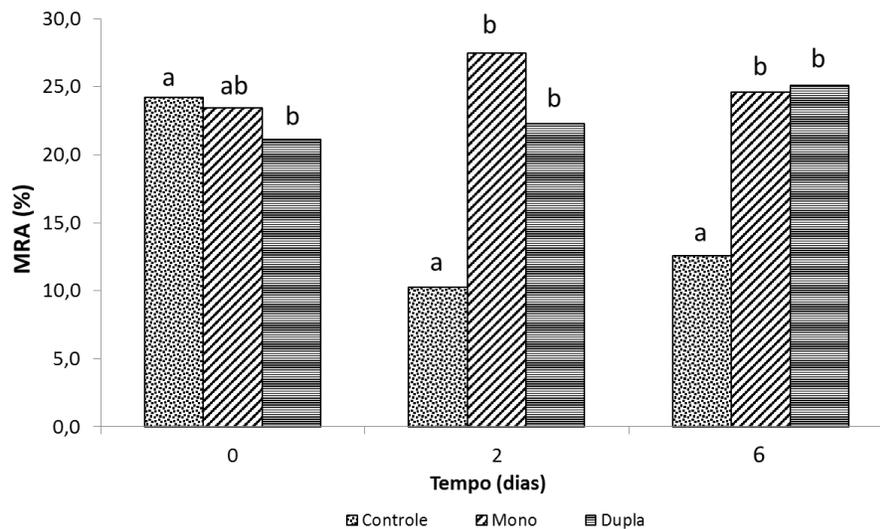


Figura 23 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na atividade redutora da mioglobina (MRA) de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C

É presumível que o filme tenha ajudado a MRA a permanecer por mais tempo ativa, uma vez que o revestimento pode ter reduzido a taxa de consumo de oxigênio TCO durante o armazenamento dos bifés. Resultados de trabalhos anteriores (MCKENNA et al., 2005; SAMMEL et al., 2002) indicam que menor TCO e maior atividade da MRA prolongam a vida útil da carne.

Uma vez que a oxidação do pigmento de Mb<sup>+</sup> inibe a sua oxigenação (LIVINGSTON e BROWN, 1981), isto poderia afetar a TCO, aparentemente diminuindo-a, já que haveria menos oxigênio estocado para ser utilizado pelas enzimas do metabolismo aeróbico.

McKenna et al. (2005) estudaram as propriedades bioquímicas de 19 músculos de carne e identificaram que músculos de alta estabilidade de cor têm elevada penetração de oxigênio e baixo consumo de oxigênio (TCO), enquanto músculos com baixa estabilidade de cor apresentaram baixa penetração e oxigênio e alta TCO. Estes autores verificaram, ainda, que músculos de carne bovina com alta estabilidade de cor têm maior MRA e alta resistência à formação de MMb, enquanto músculos de baixa estabilidade de cor têm menores valores de MRA e baixa resistência à formação de MMb.

#### **4.7 Análises microbiológicas**

É bem estabelecido que o crescimento microbiano e sua atividade na superfície de carnes são os maiores causadores de mudanças no sabor e aroma, o que reduz sua aceitação e encurta sua vida útil, com subseqüentes perdas econômicas para a indústria (PETROU et al., 2012).

Mancini e Hunt (2005) observaram que o maior tempo no tempo de exposição de carne em sistema de exposição em balcões aumenta significativamente a contagem microbiana. Estudos recentes têm demonstrado que revestimentos comestíveis à base de diferentes biopolímeros e contendo

compostos com atividade antimicrobiana, aumentam o prazo de validade de carnes e produtos cárneos (FERNÁNDEZ-PAN; ROYO; MATÉ, 2012).

Neste trabalho, eficácia antimicrobiana de revestimentos mono e dupla camada foi observada, dependendo do grupo microbiológico (psicrotróficos, mesófilos e fungos e leveduras) analisado em oito dias de estocagem.

Os revestimentos em mono e dupla camada apresentaram redução no crescimento de microrganismos psicrotróficos durante o tempo de estocagem e as contagens das amostras revestidas foram inferiores à do controle (Figura 24). No primeiro dia de armazenamento, os tratamentos mono e dupla camada apresentaram redução de 1 ciclo  $\text{Log}_{10}$ , sendo essa redução aumentada para 1,8 ciclos  $\text{Log}_{10}$ , a partir do segundo dia de estocagem.

Segundo Gill e Jones (1994), o desenvolvimento de odores levemente ácidos produzidos por bactérias sob condições aeróbias só é detectável quando a contagem é próxima ou superior a 5 log UFC/g. Portanto, no sexto dia de armazenamento, a amostra controle atingiu o limiar de 5 log UFC/g, sendo este considerado impróprio para consumo.

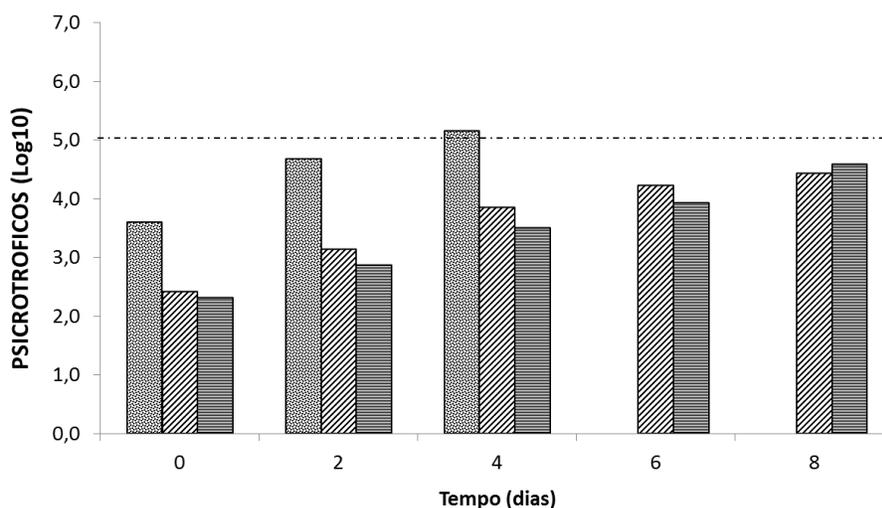


Figura 24 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na contagem de microrganismos psicrotróficos de bifês de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4 °C

Para os microrganismos mesófilos, o tratamento em dupla camada foi mais efetivo a partir do quarto dia de estocagem (Figura 25). O efeito deste revestimento diminuiu em mais de três unidades logarítmicas, quando comparado com o controle no sexto e no oitavo dia de armazenamento, respectivamente.

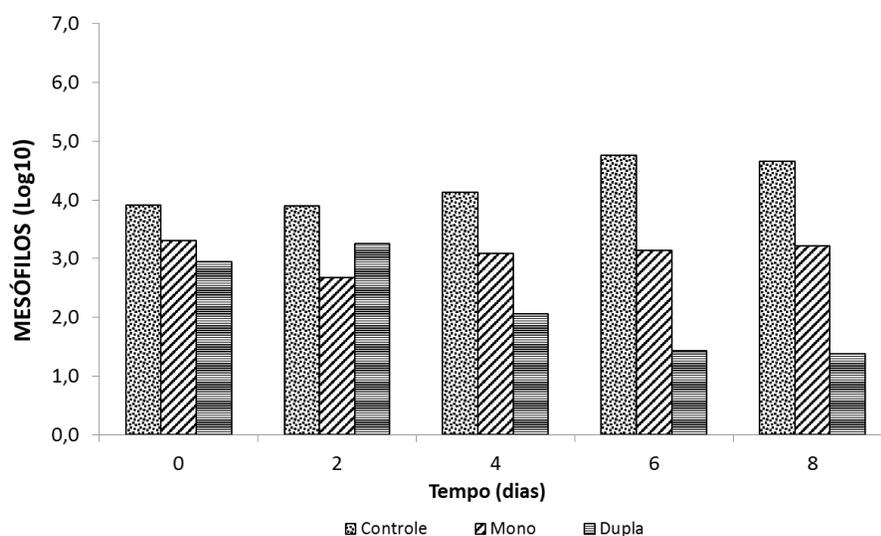


Figura 25 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na contagem de microrganismos mesófilos de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C

Em relação ao efeito dos revestimentos em mono e dupla camada sobre a população de fungos e leveduras (Figura 26), estes foram eficiente na inibição, apresentando reduções de contagem de até 1,5 ciclos logarítmicos em relação ao controle. Ao final do período de estocagem, o revestimento em dupla camada foi o mais efetivo, revelando que uma maior espessura de revestimento pode auxiliar no controle de desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras em bifes refrigerados.

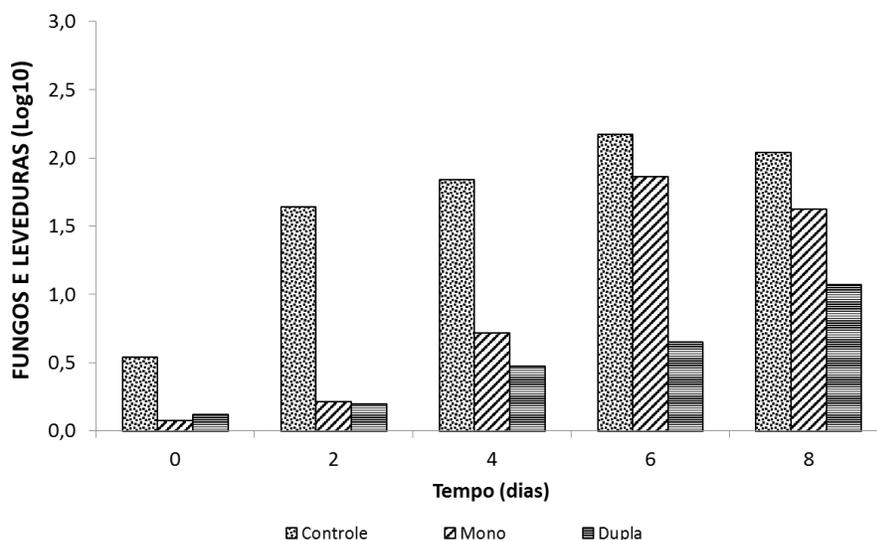


Figura 26 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na contagem fungos e leveduras de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C

A quitosana tem sido muito utilizada em filmes e em revestimentos antimicrobianos pela sua propriedade de inibir o crescimento de muitas bactérias patogênicas e fungos (LAMBERTUS et al., 2015).

Em fungos, a quitosana pode produzir alterações nas funções de membrana, por interação com sua superfície eletronegativa, levando a mudanças na permeabilidade, distúrbios metabólicos e morte celular (DURANGO, 2004).

O modo de ação da quitosana pode ser devido a interações superfície-superfície entre as cadeias dos biopolímeros e as paredes das células microbianas (RAAFAT; SAHL, 2009). Segundo Avadi et al. (2004), existe correlação entre a atividade antimicrobiana da quitosana e a formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos microrganismos, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes

intracelulares e, conseqüentemente, inibição microbiana. Segundo Muzzarelli et al. (1990), a atividade antimicrobiana da quitosana sobre bactérias é devido à natureza policatiónica da molécula, que permite a interação e a formação de complexos polieletrólitos com os polímeros ácidos produzidos na superfície da bactéria (lipopolissacarídeos, ácido teitóico e teicurônico).

Assim como neste trabalho, Coma et al. (2002) e Villadiego (2004) observaram relação inversa entre a eficiência antimicrobiana da quitosana e o tempo de estocagem, ou seja, à medida que aumenta o tempo de estocagem, diminui a eficiência antimicrobiana da quitosana. Uma provável explicação para a diminuição da atividade antimicrobiana do revestimento contendo quitosana com o tempo é que os grupos aminos da quitosana unidos à célula bacteriana, ou a componentes dela, não estarão mais disponíveis para ligarem-se a outras superfícies celulares (SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992).

Neste trabalho, é provável que não apenas a quitosana, mas o processo de aplicação dos revestimentos (temperatura de 40 °C) pode ter contribuído para a diminuição da velocidade de crescimento dos microrganismos avaliados.

#### **4.8 Análise sensorial – perfil descritivo otimizado**

Os resultados do perfil descritivo otimizado (PDO) foram analisados por meio da ANOVA, com duas fontes de variação (amostra e julgador) e interação amostra x julgador. De acordo com a análise de variância, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os dois atributos avaliados, que foram cor vermelha e cor marrom. A interação entre amostra e julgador indica que existe pelo menos um julgador que avaliou as amostras de forma diferente do grupo, e isto ocorre com frequência em análise sensorial (SILVA; DAMASIO, 1994).

Portanto, para os atributos cor vermelha e marrom da carne bovina, que apresentaram interação significativa, o teste para efeito de amostras foi realizado

novamente, utilizando o quadrado médio da interação amostra x julgador como denominador (F versus interação), como proposto por Stone e Sidel (1974). As fotos utilizadas na análise sensorial são apresentadas na Figura 27.

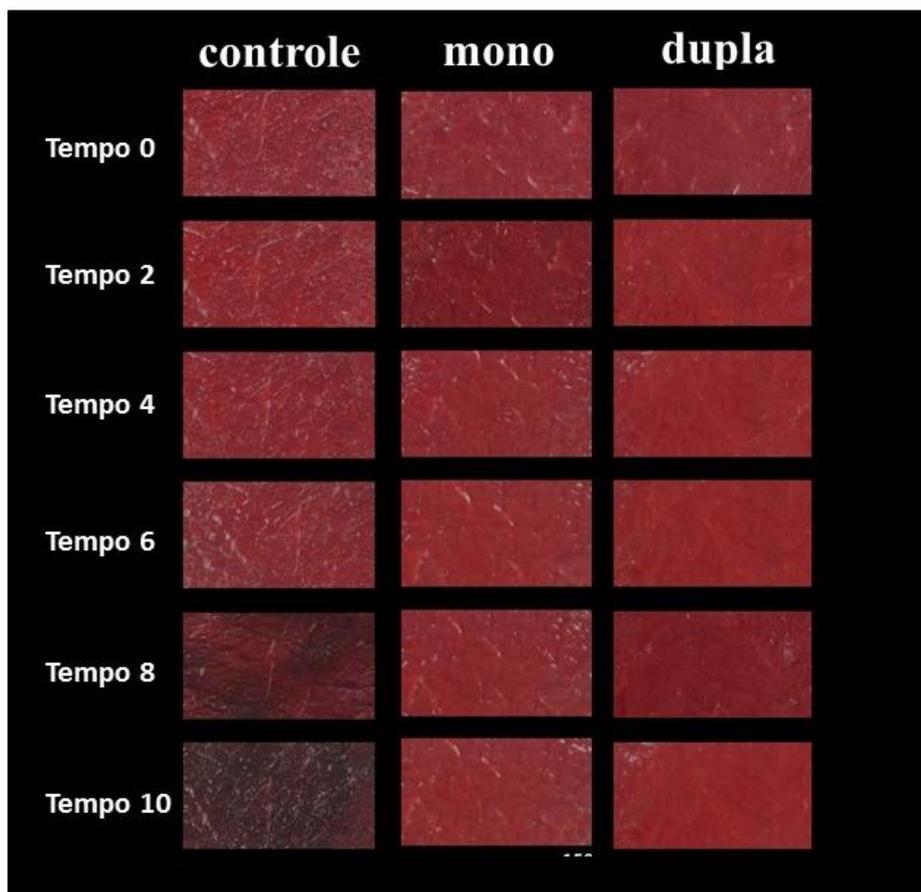


Figura 27 Imagens dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C

Os valores encontrados pelo PDO para o atributo de cor vermelha das amostras em função do tempo de estocagem são apresentados na Figura 28. Para os tratamentos revestidos por monocamada e dupla camada, os valores de todos

os parâmetros de cor apresentaram comportamento estável durante o tempo, sendo utilizada a média dos valores para determinar seus comportamentos (Tabela 14).

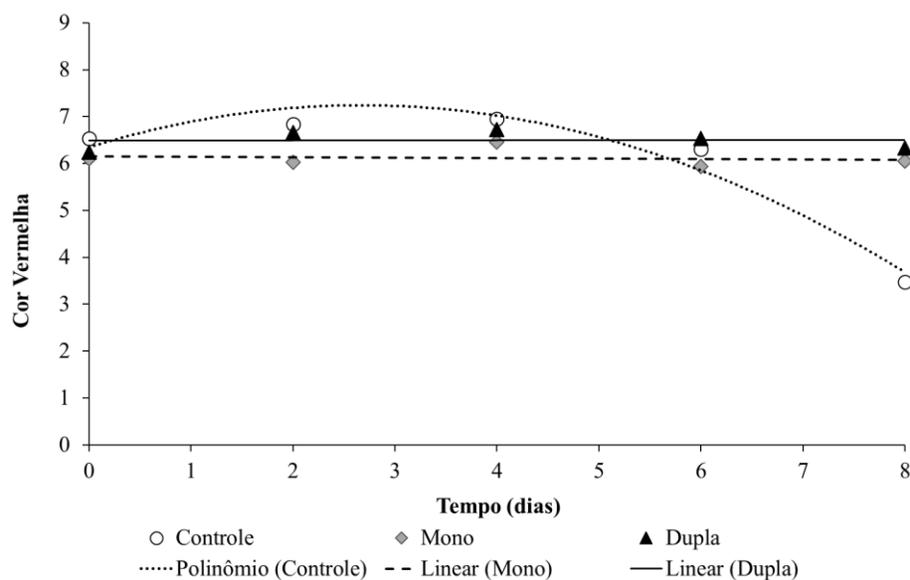


Figura 28 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na percepção da cor vermelha de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C.

Tabela 14 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de cor vermelha ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 6,39 + 0,60 X_i - 0,13 X_i^2$	0,48
Mono	$Y_i = 6,11$	-
Dupla	$Y_i = 6,50$	-

Para a cor vermelha, pode-se observar que, no tempo zero de estocagem, as notas foram semelhantes para os três tratamentos, variando entre notas de 6,39, para o controle; 6,11, para mono e 6,49, para dupla camada. Sendo assim, de imediato, os consumidores perceberam pouca diferença na cor de bifes revestidos e não revestidos. Maior diferença entre a intensidade da cor vermelha de bifes que receberam a aplicação dos revestimentos foi observada após o sexto dia, sendo que, no oitavo dia de armazenamento, enquanto os bifes em monocamada continuaram apresentando média de 6,11 e dupla 6,49, o controle apresentou média de 3,23, indicando que a maior diferença na cor vermelha foi percebida no oitavo dia.

Em carnes vermelhas, os consumidores associam o vermelho brilhante a frescor, enquanto ocorre melhor aceitação quando a carne se torna marrom (LYNCH et al., 1999). A taxa em que a superfície da carne progride do vermelho ao marrom é determinada por taxa de difusão e consumo de oxigênio, taxa de auto-oxidação dos pigmentos da mioglobina a MMb e pela atividade da metamioglobina redutase (FAUSTMAN; CASSENS, 1990).

De acordo com Lindahl, Lundstrom e Tornberg (2001), o vermelho-brilhante é correlacionado à  $O_2Mb$ , a cor roxa à  $Mb^+$ , enquanto a cor marrom correlaciona-se com MMb.

Neste trabalho, a cor vermelha avaliada sensorialmente apresentou correlação média com os índices de  $L^*$  ( $p < 0,0001$   $r = 0,6326$ ),  $a^*$  ( $p = 0,0004$   $r = 0,5019$ ),  $b^*$  ( $p = 0,0005$   $r = 0,4969$ ),  $C^*$  ( $p = 0,0004$   $r = 0,4869$ ) e  $h^*$  ( $p = 0,0007$   $r = 0,4869$ ),  $O_2Mb$  ( $p = 0,0009$   $r = -0,4777$ ) e  $Mb^+$  ( $p = 0,0030$   $r = 0,4319$ ). A cor marrom apresentou baixa correlação com todos os parâmetros citados.

Mesquita (2015), avaliando carne bovina em sistemas de serviços de alimentação, verificou associação negativa dos resultados  $L^*$ ,  $b^*$  e  $h^*$  de cor instrumental com o parâmetro sensorial cor vermelha para carne bovina, ou seja, amostras que apresentaram médias mais baixas na cor vermelha apresentam

maiores  $L^*$ , bem como maior  $b^*$  e menor  $h^*$ , confirmando os resultados de determinação de cor pelos avaliadores treinados.

Os consumidores perceberam, durante o armazenamento, um aumento no teor de marrom apenas para o tratamento controle (Figura 29). Os coeficientes de regressão da interação estão representados na Tabela 15.

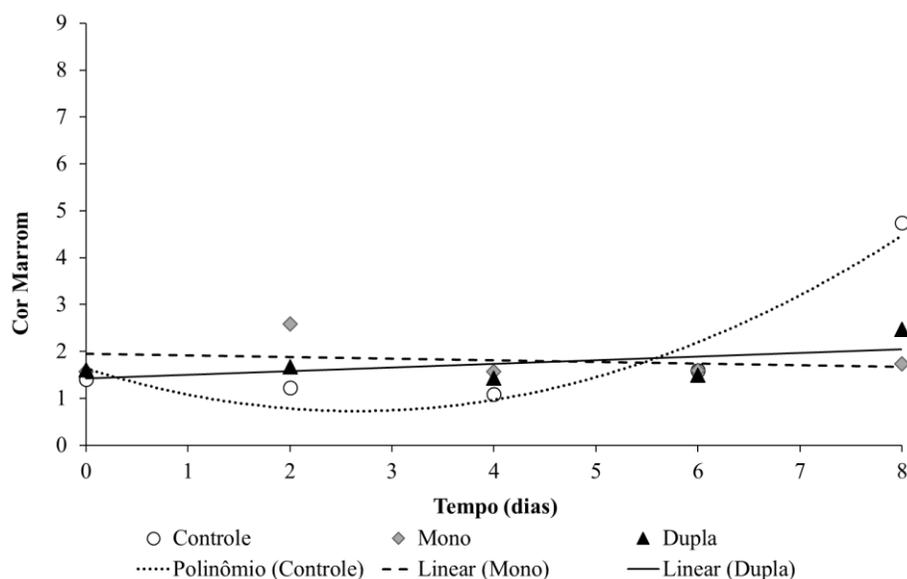


Figura 29 Efeito dos tratamentos controle, mono e dupla camada na percepção da cor marrom de bifes de carne bovina armazenada, por 8 dias, sob refrigeração a 4°C.

Tabela 15 Equações ajustadas e respectivos coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para valores de cor marrom ( $Y_i$ ) dos tratamentos controle, mono e dupla camada, durante armazenamento ( $x$ , em dias) sob refrigeração a 4 °C

Tratamento	Equação	$R^2$
Controle	$Y_i = 1,64 - 0,69 X_i + 0,13 X_i^2$	0,50
Mono	$Y_i = 1,81$	-
Dupla	$Y_i = 1,73$	-

Os provadores não perceberam alterações nos valores de cor marrom para os tratamentos mono e dupla camada. A observação de cor marrom para o controle iniciou-se a partir do terceiro dia, quando havia cerca de 30,9% de MMb. Estes resultados corroboram os dados de Renerre e Labas (1987), segundo os quais os consumidores tendem a perceber diferença entre carnes quando aproximadamente 20% de MMb estão presentes.

## **5 CONCLUSÃO**

Pela facilidade de aplicação e por não apresentar diferenças significativas em muitos parâmetros estudados (quando comparado ao revestimento em dupla camada), o revestimento em monocamada pode ser considerado efetivo na manutenção de parâmetros de qualidade da carne refrigerada e armazenada em sistema simples de embalagem em isopor e filme PVC.

De acordo com o conceito de tecnologia de barreiras de proteção, o uso desse revestimento pode contribuir para aumentar a segurança de bifés de carne vendidos em balcões refrigerados e prolongar sua vida útil em, pelo menos, quatro dias a mais, quando comparado com o controle não revestido.

## REFERÊNCIAS

ABUGOCH, L. E. et al. Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 879-886, July 2011.

ALISHAHI, A.; AİDER, M. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. **Food and Bioprocess Technology**, Chicago, v. 5, n. 3, p. 817-830, 2012.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Meat color measurement guidelines**. Champaign, 2012. 124 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D6400-04**: standard specification for compostable plastics. West Conshohocken, 2004. Disponível em: <<http://www.astm.org>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D6866-06**: standard test methods for determining the biobased content of natural range materials. West Conshohocken, 2006. Disponível em: <<http://www.astm.org>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ANGELO, A. J.; VERCELLOTTI, J. R. **Inhibition of warmed-over flavor and preserving of uncured meat containing materials**. US PI n. 4,871,556, 3 Oct. 1989.

ANTONIEWSKI, M. N. et al. Effect of a gelatin coating on the shelf life of fresh meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 6, p. E382-E387, June 2007.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 478 p.

ARIHARA, K. et al. Localization of metmyoglobin-reducing enzyme (NADH cytochrome b5 reductase) system components in bovine skeletal muscle. **Meat Science**, Barking, v. 39, n. 2, p. 205-213, 1995.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C.; FELIPE, M. G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 56-62, 2006.

ARVANITTOYANNIS, I. et al. Biodegradable films made from low-density polyethylene (LDPE), rice starch and potato starch for food packaging applications: part 1. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 36, n. 2/3, p. 89-104, July 1998.

ARVANITTOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol: part 1. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 31, n. 2, p. 179-192, Apr. 1996.

AVADI, M. R. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial effects of trimethylated and triethylated 6-NH<sub>2</sub>-6-Deoxy Chitosan M. **European Polymer Journal**, New York, v. 40, n. 10, p. 1355-1361, Oct. 2004.

AZEVEDO, A. N. et al. Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 43, p. 1-9, Sept. 2014.

BARIKANI, M. et al. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian Polymer Journal**, Shiraz, v. 23, n. 4, p. 307-326, 2014.

BEKHIT, A. E. D.; FAUSTMAN, C. Metmyoglobin reducing activity. **Meat Science**, Barking, v. 71, n. 3, p. 407-439, Nov. 2005.

BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. 2003. 203 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 17-26, 1997.

BOWERS, J. R. Consumer perception of sensory qualities in muscle foods. **Food Technology**, Oxford, v. 47, p. 116-120, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os métodos analíticos oficial para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

CARDOSO, G. P. **Revestimentos comestíveis à base de gelatina, glicerina, quitosana e óleos essenciais para conservação de carne bovina refrigerada.** 2011. 220 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CARDOSO, G. P.; RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S. Avaliação de revestimentos comestíveis de gelatina na cor objetiva de carne bovina *in natura*: testes preliminares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 170/171, p. 128-129, 2009a.

CARDOSO, G. P.; RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S. Uso de revestimentos comestíveis de gelatina na manutenção da cor objetiva de carne bovina *in natura* refrigerada: testes preliminares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 170/171, p. 132-133, 2009b.

CELIS, D.; ENRIONE, J.; MATIACEVICH, S. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* frente a biopolímeros utilizados en películas comestibles con y sin antimicrobiano. **Indualimentos**, Santiago, v. 13, n. 71, p. 92-94, jul./ago. 2011.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 11, p. 2563-2583, Nov. 1995.

CHURCH, I. J.; PARSONS, A. L. Modified atmosphere packaging technology: a review. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 67, n. 1, p. 143-152, Feb. 1995.

COELHO, G. M. C. **Influência da embalagem na vida útil de carnes resfriadas e/ou processadas.** 2008. 142 p. Monografia (Pós Graduação *Latu Sensu* em Processamento e Controle de Qualidade de Carne, Leite e Ovos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

COMA, V. et al. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1/2, p. 1162-1169, Jan./Feb. 2002.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers. In: ROONEY, M. L. (Ed.). **Active food packagings.** Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 111-143.

DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, Barking, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow packaging: a review. **Critical Reviews in Food Science**, Cleveland, v. 38, n. 4, p. 299-313, Aug. 1998.

DESCALZO, A. M. et al. Antioxidante consumption and development of oxidation during ageing of buffalo meat produced in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 582-588, July 2008.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. (Ed.). **Edible films and coatings to improve quality**. Lancaster: Technomic, 1994. p. 1-24.

DOULGERAKI, A. I. et al. Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. **LWT - Food Science and Technology**, Chicago, v. 50, n. 1, p. 353-356, Jan. 2013.

DOULGERAKI, A. I. et al. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 2, p. 130-141, July 2012.

DURANGO, A. M. **Desenvolvimento de revestimento comestível antimicrobiano a base de amido de inhame com quitosana na conservação de cenoura minimamente processada**. 2004. 128 f. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

ERCOLINI, D. et al. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 137-143, Feb. 2010.

ESMER, O. K. et al. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. **Meat Science**, Barking, v. 88, n. 2, p. 221-226, June 2011.

FAKHOURI, F. M. **Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina**. 2009. 249 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FAKHOURI, F. M. Characterization of degradable films obtained from gelatin and cellulose acetate phthalate mixtures. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS ANNUAL MEETING, 2., 2002, New Orleans. **Proceedings...** New Orleans: IFT, 2002. 1 CD-ROM.

FAKHOURI, F. M.; BATISTA, J. A.; GROSSO, C. R. F. Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis de gelatina, triacetina e ácidos graxos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 301-308, 2003.

FARBER, I. M. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology: a review. **Journal of Food Protection**, Guildford, v. 54, n. 1, p. 58-70, Jan. 1991.

FAUSTMAN, C.; CASSENS, R. G. Influence of aerobic metmyoglobin reducing capacity on color stability of beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 5, p. 1278-1283, Sept. 1990.

FAUSTMAN, C. et al. Improvement of pigment and lipid stability in Holstein steer beef by dietary supplementation with vitamin E. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 4, p. 858-862, 1989.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; ROYO, M.; MATÉ, J. I. Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 7, p. 383-390, July 2012.

FERNÁNDEZ-SAIZ, P. et al. Characterization of antimicrobial properties on the growth of *Staphylococcus aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 13-20, 2009.

GALLO, J. A. Q. et al. Lipidic hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 180, n. 1, p. 37-46, 2000.

GARCÍA-ESTEBAN, M. et al. Optimization of instrumental colour analysis in dry-cured ham. **Meat Science**, Barking, v. 63, n. 3, p. 287-292, Mar. 2003.

GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 304, n. 1, p. 42-46, May 2002.

GENNADIOS, A. et al. Edible coatings and films based on proteins. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. (Ed.). **Edible coatings and films to improve food quality**. Lancaster: Technomic, 1994. p. 465-470.

GENNADIOS, A.; HANNA, M. A.; KURTH, L. B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 30, n. 4, p. 337-350, Aug. 1997.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of rosemary extract, chitosan and [alpha]-tocopherol on lipid oxidation and colour Stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, Barking, v. 75, n. 2, p. 256-264, Feb. 2007.

GILL, C. O.; JONES, J. The display life of retail-packaged beef steaks after their storage in master packs under various atmospheres. **Meat Science**, Barking, v. 38, n. 3, p. 385-396, 1994.

GILL, O.; MCGINNIS, J. C. The effects of residual oxygen concentration and temperature on the degradation of the colour of beef packaged under oxygen-depleted atmospheres. **Meat Science**, Barking, v. 39, n. 3, p. 387-394, 1995.

GOALSZ, L.; SILVA, J.; SILVA, S. B. Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 155-162, 2013.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Oxford, v. 18, n. 1/2, p. 46-52, Mar. 2009.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatina chitosan films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 1461-1469, Aug. 2011.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 39-50, Jan. 1996.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Chicago, v. 55, n. 7, p. 539-546, 1978.

GRAY, J. I.; PEARSON, A. M. **Flavor of meat and meat products**. Glasgow, 1987. 250 p.

GREENE, B. E.; HSIN, I. M.; ZIPSER, M. W. Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 36, p. 940-942, 1971.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, G. M. Prolongation of the self-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 29, n. 1/2, p. 10-17, Apr. 1996.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. In: AHVENAINEN, R. (Ed.). **Novel food packaging techniques**. Washington: CRC, 2003. p. 50-65.

HAN, J. H. Antimicrobial packaging systems. In: \_\_\_\_\_. **Innovations in food packaging**. Baltimore: CRC, 2005. p. 80-107.

HOLLEY, R. A.; GILL, C. O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 3., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ITAL, 2005. Disponível em:  
<[http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro\\_congresso/](http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro_congresso/)>. Acesso em: 15 nov. 2005.

HOOD, D. E.; RIORDAN, E. B. Discoloration in pre-packaged beef: measurement by reflectance spectrophotometry and shopper discrimination. **Journal of Food Technology**, Chicago, v. 8, p. 333-343, 1973.

HUTCHINGS, A. Chemistry of food colour. In: MCDOUGALL, D. B. (Ed.). **Food color and appearance**. Cambridge: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 401-410.

IOST, R. N.; CRESPILO, F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 31, n. 1, p. 1-10, Jan. 2012.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Colour stability and lipid oxidation of fresh beef: development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. **Meat Science**, Barking, v. 54, n. 1, p. 49-57, Jan. 2000.

JAYASINGH, P. et al. Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. **Meat Science**, Barking, v. 59, n. 3, p. 317-324, Sept. 2001.

JEON, Y. J.; KAMIL, J. Y. V. A.; SHAHIDI, F. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 18, p. 5167-5178, Aug. 2002.

JEONG, J. Y.; CLAUS, J. R. Color stability and reversion in carbon monoxide packaged ground beef. **Meat Science**, Barking, v. 85, n. 3, p. 525-530, July 2010.

JIANG, Y. F. et al. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 8, p. 5100-5108, Apr. 2010.

JOHN, M. C.; GUTTERIDGE, B. H. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 129-135, Apr. 1990.

KANATT, S. R. et al. Active chitosan polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 290-297, Dec. 2012.

KARDAS, I. et al. Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications. In: NARVARD, P. (Ed.). **The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE): research initiatives and results**. Wien: Springer-Verlag, 2012. p. 329-374.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 47-59, Dec. 1986.

KHAN, M. I. et al. Application of edible coating for improving meat quality: a review PAK. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 23, n. 2, p. 71-79, 2013.

KING, D. A. et al. Effect of time of measurement on the relationship between metmyoglobin reducing activity and oxygen consumption to instrumental measures of beef longissimus color stability. **Meat Science**, Barking, v. 87, n. 1, p. 26-32, Jan. 2011.

KING, D. A. et al. Sampling and aging effects on beef longissimus color stability measurements. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 10, p. 3596-3605, Oct. 2012.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 122-124, Jan. 1991.

KNOTHE, G. et al. **Manual de biodiesel**. São Paulo: E. Blücher, 2006. 352 p.

KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. **Edible coatings and films to improve food quality**. Harrisburg: Technomic, 1994. 379 p.

KROCHTA, J. M.; DEMULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 61-74, Apr. 1997.

LAGERSTEDT, Å.; LUNDSTRÖM, K.; LINDAHL, G. Influence of vacuum or high-oxygen modified atmosphere packaging on quality of beef M. longissimus dorsi steaks after different ageing times. **Meat Science**, Barking, v. 87, n. 2, p. 101-106, 2011.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DOODS, K. L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat: a review. **Food Microbiology**, London, v. 8, n. 4, p. 267-297, Aug. 1991.

LAMBERTUS, A. M. et al. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 116, p. 237-242, Feb. 2015.

LIMBO, E. et al. Shelf life of case-ready beef steaks (Semitendinosus muscle) stored in oxygen-depleted master bag system with oxygen scavengers and CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> modified atmosphere packaging. **Meat Science**, Barking, v. 93, n. 3, p. 477-484, Mar. 2013.

LINDAHL, G.; LUNDSTROM, K.; TORNBERG, E. Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. **Meat Science**, Barking, v. 59, n. 2, p. 141-151, Oct. 2001.

LIU, L.; KERRY, J. F.; KERRY, J. P. Application and assessment of extruded edible casings manufactured from pectin and gelatin/sodium alginate blends for use with breakfast pork sausage. **Meat Science**, Barking, v. 75, n. 2, p. 196-202, Feb. 2012.

LIVINGSTON, D. J.; BROWN, W. D. The chemistry of myoglobin and its reactions. **Food Technology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 244-252, Apr. 1981.

LÓPEZ-CABALLENO, M. C. et al. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 19, p. 303-311, June 2004.

LOPEZ-RUBIO, A.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Bioactive packaging: turning food into healthier foods through biomaterioas. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 10, p. 567-575, Oct. 2006.

LYNCH, M. P. et al. Effect of dietary vitamin E supplementation on the colour and lipid stability of fresh, frozen and vacuum-packaged beef. **Meat Science**, Barking, v. 52, n. 1, p. 95-99, May 1999.

MADHAVI, D. L.; CARPENTER, C. E. Aging and processing affect color, metmyoglobin reductase and oxygen consumption of beef muscles. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 5, p. 939-947, 1993.

MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. de. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e o oxigênio. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 1-24, 2000.

MANCINI, R. A.; HUNT, M. C. Current research in meat color. **Meat Science**, Barking, v. 71, n. 1, p. 100-121, Sept. 2005.

MCDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n. 1/2, p. 1-27, Nov. 1999.

MCKENNA, D. R. et al. Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. **Meat Science**, Barking, v. 70, p. 665-682, Feb. 2005.

MESQUITA, M. O. **Procedimento para avaliação da qualidade da carne bovina in natura na recepção em serviços de alimentação**. 2015. 293 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

MOHAN, C. N. et al. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 167-174, Jan. 2012.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 179-190, jan. 2000.

MONTGOMERY, J. L. et al. Storage and packaging effects on sensory and color characteristics of ground beef. **Meat Science**, Barking, v. 64, p. 357-363, June 2003.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. **The polysaccharides**. New York: Academic, 1985. v. 3, 450 p.

NOWZARI, F.; SHA'BANPOUR, B.; OJAGH, S. M. Comparison of chitosan gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, Oxford, v. 141, n. 3, p. 1667-1672, Dec. 2014.

NTZIMANI, A. G. et al. Formation of biogenic amines and relation to microbial flora and sensory changes in smoked turkey breast fillets stored under various packaging conditions at 4° C. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 509-517, Mar. 2008.

NYCHAS, G. J. E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1/2, p. 77-89, Jan./Feb. 2008.

OJAGH, S. M. et al. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, Oxford, v. 120, n. 1, p. 193-198, May 2010.

O'KEEFE, M.; HOOD, D. E. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing color stability. **Meat Science**, Barking, v. 7, p. 209-228, Sept. 1982.

OUSSALAH, M. et al. Inibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

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

PERDONES, A. et al. Effect of chitosanelemon essential oil coatings on storage-keeping quality of Strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 70, p. 32-41, Aug. 2012.

PEREDA, M. et al. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, June 2011.

PETROU, S. M. et al. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 3, p. 264-271, June 2012.

PINO, L. M. **Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenadas sob congelamento**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

RAAFAT, D.; SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential: a critical literature review. **Microbial Biotechnology**, New York, v. 2, n. 2, p. 186-201, 2009.

RAHARJO, S. et al. Improved speed, specificity and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 12, p. 2182-2185, Dec. 1992.

RAINES, C. R. et al. Cow biological type affects ground beef colour stability. **Meat Science**, Barking, v. 83, n. 4, p. 752-758, Dec. 2009.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.

RENERRE, M. Review: factors involved in the discoloration of beef meat. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 613-630, Dec. 1990.

RENERRE, M.; LABAS, R. Biochemicals factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. **Meat Science**, Barking, v. 19, p. 151-165, 1987.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 90, n. 4, p. 531-539, Feb. 2009.

ROBERTSON, G. L. **Food packaging: principles and practice**. New York: M. Dekker, 1992. 676 p.

ROBIN, H. et al. Phenotypic characterisation of colour stability of lamb meat. **Meat Science**, Barking, v. 96, n. 2, p. 1040-1048, Feb. 2014.

ROITMAN, I.; TRAVESSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1987. v. 2, 126 p.

ROLLER, S. et al. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. **Meat Science**, Barking, v. 62, n. 2, p. 165-177, 2002.

ROSENVOLD, K.; HENRIK, J.; ANDERSEN, H. J. The significance of pre-slaughter stress and diet on colour and colour stability of pork. **Meat Science**, Barking, v. 63, n. 2, p. 199-209, Feb. 2003.

ROWE, L. J. et al. Influence of early post mortem protein oxidation on beef quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 3, p. 785-793, Mar. 2004.

SAMMEL, L. M. et al. Comparison of assays for metmyoglobin reducing ability in beef inside and outside Semimembranosus muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 3, p. 978-984, 2002.

SANTOS, A. F. et al. Determinação da dose de radiação gama para reduzir a população de salmonela spp em carn de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 200-205, 2003.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ANTÔNIO, J. T. Embalagem para carnes *in natura*. In: CASTILLO, C. J. C. (Ed.). **Qualidade da carne**. São Paulo: Varela, 2006. p. 173-184.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E.  
**Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis.** Campinas:  
CETEA-ITAL, 2001. 213 p.

SATHIVEL, S. et al. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorboscha*) fillets during frozen storage. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 83, n. 3, p. 366-373, Dec. 2007.

SEBRANEK, J. G. Meat is dynamic: factors in controlled atmosphere packs. **The National Provisioner**, New York, v. 10, n. 5, p. 10-16, 1986.

SEIDEMAN, S. C. et al. Factors associated with fresh meat color: a review. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 6, n. 2, p. 211-237, May 1984.

SEYFERT, M. et al. Color stability, reducing activity, and cytochrome c oxidase activity of five bovine muscles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 23, p. 8919-8925, Oct. 2006.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, jan./fev. 1999.

SILVA, M. P. A.; DAMASIO, M. H. **Análise sensorial descritiva.** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1994. 58 p.

SILVA, R. C. S. N. **Caracterização sensorial e reológica de requeijão lighr adicionado de concentrado proteico de soro.** 2010. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SILVA, R. C. S. N. et al. Optimized descriptive profile: a rapid methodology for sensory description. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 24, p. 190-200, 2012.

SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, Surrey, v. 25, p. 795-801, July 2004.

SMITH, J.; RAMASWAMY, H.; SIMPSON, B. Developments in food packaging technology part 2: storage aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 1, n. 5, p. 111-118, Sept. 1990.

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

SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. **Meat Science**, Barking, v. 52, n. 2, p. 157-164, Apr. 1999.

SOUZA, S. M. A. de et al. Extração de proteínas miofibrilares de carne bovina para elaboração de filmes comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 619-626, 2004.

STONE, H.; SIDEL, J. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, New York, v. 11, p. 24-34, 1974.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, O. G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 257-272, 1992.

SUMAN, S. P. et al. Packaging-specific influence of chitosan on color stability and lipid oxidation in refrigerated ground beef. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 4, p. 994-998, Apr. 2010.

SWATLAND, H. J. Progress in understanding the paleness of meat with a low pH. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 34, n. 2, p. 1-7, Feb. 2004.

TARSITANO, M. A. et al. Influencia da maturação na cor da carne bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 22., 2012, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2012. 1 CD-ROM.

TAWFIK, M. S. et al. Chemical contamination potential of bottle materials. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 26, n. 3, p. 219-233, 1997.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 172-176, Feb. 2005.

TROUT, R. G. Biochemistry of lipid and myoglobin oxidation in postmortem muscle and processed meat products: effects on rancidity. **Brazilian Journal of Animal Science**, Campinas, v. 6, p. 50-55, 2003. Special issue.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Meat and meat products**. New York: Chapman & Hall, 1995. 430 p.

VENTURINI, A. C. Revisão: sistemas de embalagem para carne bovina fresca em atmosfera modificada. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 128-137, abr./jun. 2009.

VILLADIEGO, A. M. D. **Desenvolvimento de um revestimento comestível antimicrobiano à base de amido de inhame com quitosana na conservação de cenoura minimamente processada**. 2004. 141 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

VINCI, G.; ANTONELLI, M. L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 519-524, Aug. 2002.

WU, Y. et al. Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coatings and films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 2, p. 300-304, Feb. 2000.

WU, Y.; WELLER, C. L. Moisture loss and lipid oxidation for precooked ground-beef patties packaged in edible starch-alginate-based composite films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 3, p. 486-493, Mar. 2001.

XIA, X. et al. Physicochemical changes and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze/thaw cycles. **Meat Science**, Barking, v. 83, p. 239-245, 2009.

XIONG, Y. L. Protein oxidation and implications for muscle food quality. In: DECKER, E.; FAUSTMAN, C. (Ed.). **Antioxidants in muscle foods**. Chichester: J. Wiley, 2000. p. 3-127.

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

YOUNG, O. A.; WEST, J. Meat color. In: HUI, Y. H. et al. (Ed.). **Meat science and applications**. New York: M. Dekker, 2001. p. 39-69.

ZHANG, H. Z. et al. Properties of different chitosan/low-density polyethylene antibacterial plastics. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 113, n. 3, p. 2018-2021, 2009.

ZHU, L. G.; BREWER, M. S. Discoloration of fresh pork as related to muscle and display conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 5, p. 763-767, 1998.

## ANEXOS

Anexo 1 Valores de correlação de Pearson, a 0,05 de significância, para as análises realizadas

	Vermelho	Marrom	tba	pH	PP	IP	L*	a*	b*	C*	h*	MMb	Mb+	O <sub>2</sub> Mb	psicro	mesóf	fungos	TCO	
vermelho																			
marrom	<b>-0,38</b>																		
tba	-0,14	0,17																	
pH	<b>-0,39</b>	0,24	0,49																
PP	-0,20	0,10	<b>0,82</b>	<b>0,40</b>															
IP	0,25	-0,03	<b>0,28</b>	0,05	<b>0,30</b>														
L*	<b>0,19</b>	-0,11	-0,22	<b>-0,44</b>	<b>-0,32</b>	0,12													
a*	<b>0,50</b>	-0,16	<b>-0,45</b>	<b>-0,58</b>	<b>-0,52</b>	0,07	<b>0,63</b>												
b*	<b>0,50</b>	-0,15	<b>-0,33</b>	<b>-0,52</b>	<b>-0,41</b>	0,11	<b>0,62</b>	<b>0,98</b>											
C*	<b>0,50</b>	-0,16	<b>-0,41</b>	<b>-0,56</b>	<b>-0,48</b>	0,09	<b>0,63</b>	<b>1,00</b>	<b>0,99</b>										
h*	<b>0,49</b>	-0,14	-0,18	<b>-0,45</b>	-0,24	0,20	<b>0,62</b>	<b>0,87</b>	<b>0,93</b>	<b>0,89</b>									
MMb	-0,27	0,12	<b>0,69</b>	<b>0,50</b>	<b>0,73</b>	0,19	<b>-0,50</b>	<b>-0,84</b>	<b>-0,76</b>	<b>-0,81</b>	<b>-0,54</b>								
Mb+	<b>-0,48</b>	0,20	<b>0,54</b>	<b>0,60</b>	<b>0,56</b>	-0,01	<b>-0,57</b>	<b>-0,89</b>	<b>-0,83</b>	<b>-0,87</b>	<b>-0,76</b>	<b>0,72</b>							
O <sub>2</sub> Mb	<b>0,43</b>	-0,18	<b>-0,64</b>	<b>-0,60</b>	<b>-0,67</b>	-0,07	<b>0,58</b>	<b>0,93</b>	<b>0,86</b>	<b>0,91</b>	<b>0,73</b>	-0,88	<b>-0,96</b>						
psicro	0,23	-0,15	<b>0,78</b>	<b>0,35</b>	<b>0,64</b>	<b>0,44</b>	<b>0,37</b>	<b>0,41</b>	<b>0,48</b>	<b>0,45</b>	<b>0,54</b>	0,39	-0,05	-0,23					
mesóf	<b>-0,35</b>	0,21	0,21	<b>0,36</b>	0,22	-0,20	-0,22	<b>-0,68</b>	<b>-0,69</b>	<b>-0,69</b>	<b>-0,54</b>	<b>0,60</b>	<b>0,49</b>	<b>-0,57</b>	-0,06				
fungos	<b>-0,29</b>	0,24	<b>0,66</b>	0,14	<b>0,72</b>	0,17	-0,21	<b>-0,56</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,74</b>	<b>0,55</b>	<b>-0,66</b>	<b>0,35</b>	<b>0,46</b>			
TCO	<b>-0,38</b>	0,18	-0,37	0,03	<b>-0,37</b>	<b>-0,63</b>	-0,20	-0,37	<b>0,45</b>	<b>-0,40</b>	<b>-0,52</b>	0,04	0,29	-0,20	-0,37	<b>0,37</b>	-0,01		
MRA	0,11	0,21	-0,21	-0,08	<b>-0,47</b>	0,05	0,28	<b>0,49</b>	<b>0,45</b>	<b>0,48</b>	0,32	<b>-0,52</b>	<b>-0,46</b>	<b>0,51</b>	0,10	<b>-0,40</b>	<b>-0,56</b>	-0,25	

\*Valores em negrito diferem significativamente

Anexo 2 Valores de correlação de Pearson, a 0,05 de significância, para as análises realizadas

Característica	amostra (A)			tempo (T)					P(F)		
	controle	mono	dupla	0	2	4	6	8	A	T	A*T
Perda de Peso (%)	1,46	0,86	0,87	0,00	0,97	1,13	1,51	1,70	<0,0001	<0,0001	0,0133
pH	5,97 <sup>a</sup>	5,68 <sup>b</sup>	5,67 <sup>b</sup>	5,67 <sup>a</sup>	5,63 <sup>a</sup>	5,71 <sup>a</sup>	5,87 <sup>a</sup>	5,97 <sup>a</sup>	0,0045	0,0497	0,1332
Índice de peróxidos	24,22	29,75	29,01	13,97	21,07	42,72	32,58	27,95	0,0168	<0,0001	<0,0001
TBARs	1,14	0,87	0,81	0,41	0,73	0,77	1,12	1,18	<0,0001	<0,0001	0,0047
L	28,99	31,51	29,55	30,37	30,10	29,77	29,97	29,05	<0,0001	0,0741	<0,0001
a*	14,10	20,83	21,25	20,32	20,57	19,80	18,20	17,75	<0,0001	<0,0001	<0,0001
b*	9,33	14,02	14,40	12,83	13,73	13,30	12,17	11,76	<0,0001	0,1831	<0,0001
C*	16,99	25,11	25,69	24,04	24,74	23,87	21,91	21,33	<0,0001	0,0011	<0,0001
h*	31,34	33,87	33,82	32,10	33,62	33,59	32,94	32,01	0,0005	0,2362	0,0055
O2Mb	31,24	29,54	29,15	28,12	29,70	30,48	30,79	30,92	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Mb+	9,65	6,81	6,03	6,46	6,28	7,44	9,12	9,57	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MMb	59,11	64,82	63,65	65,42	64,02	62,08	60,09	59,51	<0,0001	<0,0001	<0,0001
psicrotróficos	4,26	3,64	3,44	2,81	3,34	3,84	4,20	4,52	0,0044	<0,0001	0,8823
mesófilos	4,27	3,09	2,21	3,39	3,28	3,09	3,11	3,08	<0,0001	0,8273	0,0094
fungos e leveduras	1,65	0,90	0,50	0,24	0,68	1,01	1,56	1,58	<0,0001	<0,0001	0,4326
Vermelho	6,02	6,12	6,50	6,29	6,51	6,71	6,26	5,28	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Marrom	2,01	1,81	1,74	1,53	1,83	1,36	1,56	2,99	<0,0001	<0,0001	<0,0001