

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE
FILMES ANTIMICROBIANOS
INCORPORADOS COM ALIL
ISOTIOCIANATO E NANOTUBO DE
CARBONO NA CONSERVAÇÃO DE
ALIMENTOS**

MARALI VILELA DIAS

2010

MARALI VILELA DIAS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FILMES
ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS COM ALIL ISOTIOCIANATO
E NANOTUBO DE CARBONO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Dra. Soraia Vilela Borges

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Dias, Marali Vilela.

Desenvolvimento e avaliação de filmes antimicrobianos incorporados de alil isotiocianato e nanotubo de carbono na conservação de alimentos / Marali Vilela Dias. – Lavras : UFLA, 2010.

85 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Soraia Vilela Borges.

Bibliografia.

1. Nanocomposto. 2. Carne de frango cozida. 3. Carne de frango desfiada. 4. *Salmonella Choleraesuis*. 5. *Listeria innocua*. 6. Embalagem ativa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.092

MARALI VILELA DIAS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FILMES
ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS COM ALIL ISOTIOCIANATO
E NANOTUBO DE CARBONO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2010

Prof. Dr. João de Deus Souza Carneiro UFLA

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos UFLA

Profa. Dra. Nilda de Fátima Ferreira Soares UFV

Profa. Dra. Soraia Vilela Borges
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, por estar presente
em todos os momentos de
minha vida.

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Alaor e Maria; as minhas
irmãs Elmara e Liliane; a Ana Laura e Larissa,
aos meus cunhados e Matheus

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria para a realização desta pesquisa.

Às orientadoras, professora Soraia Vilela Borges pelo incentivo e conhecimentos transmitidos e professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, apoio e orientação dedicada.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira, pelo auxílio na realização da análise de força atômica.

Ao professor Eduardo Alves e à equipe do Laboratório de Ultraestrutura e Microscopia Eletrônica, pelo auxílio nas análises de microscopias.

Aos membros da banca examinadora, Eduardo Mendes Ramos e João de Deus Souza Carneiro.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio institucional e pelas facilidades oferecidas.

À Universidade Federal de Lavras e aos professores e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelos conselhos e ensinamentos.

A toda equipe do Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pela ajuda, conselhos e encorajamento contínuos na pesquisa.

A Isadora, pelo companheirismo e ajuda durante o experimento.

A Ana Clarissa, pelos conselhos, ensinamentos e também pela agradável convivência na república, juntamente com Emiliane.

Aos meus pais, irmãs e familiares, pela força e paciência e ao Matheus, pela ajuda e carinho.

Finalmente, agradeço a meus amigos e colegas, em especial a Luisa, que contribuíram na elaboração desta dissertação.

A todos, meu sincero agradecimento, **muito obrigada!**

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
1 Introdução Geral	1
1.1 Objetivo geral.....	2
1.2 Objetivos específicos.....	3
2 Referências Bibliográficas.....	4
CAPÍTULO 1: Alterações estruturais e efeito dos filmes antimicrobianos sobre os microrganismos <i>Salmonella Choleraesuis</i> e <i>Listeria innocua</i>	6
1 Resumo.....	7
2 Abstract	8
3 Introdução.....	9
4 Material e Métodos	13
4.1 Planejamento experimental.....	13
4.2 Desenvolvimento dos filmes.....	15
4.3 Ativação e preparo do inóculo	15
4.4 Teste da atividade antimicrobiana da embalagem por volatilização	16
4.5 Teste da atividade antimicrobiana da embalagem por contato direto.....	16
4.6 Liberação de AIT	17
4.7 Alterações estruturais nos microrganismos.....	17
4.8 Alterações estruturais nos filmes.....	19
4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura	19
4.8.2 Microscopia de força atômica	19
5 Resultados e Discussões	21
5.1 Teste da atividade antimicrobiana da embalagem por volatilização e por contato direto e liberação de AIT do filme.....	21

5.2 Alterações estruturais nos microrganismos.....	24
5.3 Alterações estruturais nos filmes.....	27
5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura	27
5.3.2 Microscopia de força atômica	33
6 Conclusão	38
7 Referências Bibliográficas.....	39
CAPÍTULO 2: Aplicação de embalagem antimicrobiana em carne de frango cozida e desfiada	
1 Resumo.....	45
2 Abstract	46
3 Introdução.....	47
4 Material e Métodos	51
4.1 Desenvolvimento dos filmes.....	51
4.2 Taxa de transmissão ao vapor de água e espessura	51
4.3 Experimento carne de frango cozida e desfiada embalada em filmes antimicrobianos.....	53
4.3.1 Planejamento experimental.....	53
4.3.2 Desenvolvimento dos filmes.....	54
4.3.3 Preparo do frango cozido e desfiado	54
4.3.4 Ativação e inoculação do frango cozido e desfiado	55
4.3.5 Acondicionamento de frango cozido desfiado em embalagens antimicrobianas	55
4.3.6 Análises das embalagens.....	56
4.3.6.1 Avaliação das propriedades mecânicas.....	56
4.3.6.2 Liberação de AIT.....	56
4.3.6.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	57
4.3.7 Análises da carne de frango cozida e desfiada	57
4.3.7.1 Medida da oxidação lipídica	57
4.3.7.2 Análise de cor.....	58

4.3.7.3 Liberação de AIT.....	58
4.3.7.4 Análise microbiológica	59
4.4 Análise estatística.....	59
5 Resultados e Discussões	61
5.1 Taxa de transmissão ao vapor de água e espessura	61
5.2 Análises das embalagens	63
5.2.1 Avaliação das propriedades mecânicas.....	63
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	66
5.3 Análises da carne de frango cozida e desfiada.....	67
5.3.1 Medida da oxidação lipídica	67
5.3.2 Análise de cor.....	68
5.3.3 Liberação de AIT.....	75
5.3.4 Análises microbiológicas	78
6 Conclusão	80
7 Referências Bibliográficas.....	81

RESUMO GERAL

DIAS, Marali Vilela. **Desenvolvimento e avaliação de filmes antimicrobianos incorporados com alil isotiocianato e nanotubo de carbono na conservação de alimentos** 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A produção de alimentos com qualidade e segurança alimentar é meta prioritária para as indústrias alimentícias. Além das boas práticas higiênico-sanitárias, faz-se necessário também o acondicionamento em embalagens adequadas, para proteger e conservar o produto. Este trabalho foi realizado em duas etapas. Primeiramente, estudou-se o encapsulamento do alil isotiocianato (AIT) e verificou-se sua adequação em embalagens ativas com e sem nanocompostos, por meio da avaliação *in vitro* dessas embalagens com relação a *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua* por volatilização e por contato direto. Na segunda etapa, avaliaram-se os filmes desenvolvidos aplicando-os em carne de frango cozida e desfiada inoculada, com *Salmonella Choleraesuis*, por meio da redução na contagem microbiológica, alterações nas características de cor e oxidação e também as alterações nas propriedades mecânicas, estrutural e difusão do antimicrobiano do filme para o alimento, durante 40 dias de estocagem. Os resultados indicaram que o desenvolvimento de filmes incorporados com AIT é possível, pois eles inibiram o crescimento dos microrganismos estudados e sua retenção pode ser obtida com o processo de encapsulamento com β -ciclodextrina e ou uso de nanotubo de carbono (NTC). Diante dos resultados da aplicação dos filmes na carne de frango, recomenda-se a utilização de AIT em concentrações superiores a 28%, combinada com concentrações superiores a 0,02% de NTC para se conseguir redução microbiológica, controle de oxidação e redução nas alterações de cor, considerando que esses dois fatores não influenciaram as características mecânicas. Essas embalagens foram eficientes durante 40 dias de estocagem, pois permitiram a difusão de AIT para o frango, representando grande potencial de aplicação em produtos alimentícios.

Palavras-chave: embalagem ativa, alil isotiocianato, nanotubo de carbono.

* Comitê Orientador: Dra. Soraia Vilela Borges – UFLA – MG (Orientadora); Dr^a. Nilda de Fátima Ferreira Soares – UFV – MG. Dr^a. Ana Clarissa dos Santos Pires – UFV – MG. Dr^o. José Ivo Ribeiro Júnior – UFV – MG.

GENERAL ABSTRACT

DIAS, Marali Vilela. **Development and evaluation of antimicrobial films incorporated with allyl isothiocyanate and carbon nanotubes on food preservation.** 2010. 85 p. Dissertation (Master's in Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.[†]

The production of foods with quality and alimentary safety is a priority goal for the food industries. Besides good hygienic-sanitary practices, packaging in appropriate packages is also necessary to protect and to preserve the product. This work was carried out in two stages. First, the encapsulation of the allyl isothiocyanate (AIT) was studied and it was verified its adequacy in active packagings with and without nanocompounds, through the *in vitro* evaluation of those packagings regarding *Salmonella Choleraesuis* and *Listeria innocua* by volatilization and by direct contact. In the second stage, the developed films were applied on cooked, shredded chicken inoculated with *Salmonella Choleraesuis*, and evaluated through the reduction of the microbiological count, alterations in the color and oxidation characteristics and also the alterations in the mechanical and structural properties, and also the antimicrobial diffusion properties of the film to the food, during 40 days of storage. The results indicated that the development of films incorporated with AIT is possible, because they inhibited the growth of the studied microorganisms and their retention can be obtained with the encapsulation process with β -cyclodextrin and, or the use of carbon nanotubes (CNT). Considering the results of the application of the films on the chicken, the use of AIT is recommended at concentrations above 28%, combined with CNT concentrations over 0.02% to achieve microbiological reduction, oxidation control and reduction in the color alterations, considering that those two factors did not influence the mechanical characteristics. Those packagings were efficient during 40 days of storage, because they allowed the diffusion of AIT to the chicken, representing a high application potential in food products.

Keywords: active packaging, allyl isothiocyanate, carbon nanotube.

[†] Guidance Committe: Dra. Soraia Vilela Borges – UFLA – MG (Adviser); Dr.^a Nilda de Fátima Ferreira Soares – UFV – MG. Dr.^a Ana Clarissa dos Santos Pires – UFV – MG. Dr.^o José Ivo Ribeiro Júnior – UFV – MG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em 2003, a aquisição domiciliar per capita de peito de frango foi de 1,050 kg no Brasil e de 1,768 kg na região sudeste, para utilização nos mais diversos pratos, como pizza, salpicão, salgadinhos e tortas, entre outros (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2003).

Carne cozida é um produto altamente perecível, com vida de prateleira de aproximadamente 14 a 15 dias, a 4°C. O processo de cozimento torna a carne praticamente estéril, mas alguns microrganismos que sobrevivem ou são introduzidos após o cozimento podem facilmente crescer e atingir números elevados de contaminação. Contaminação pós-cozimento ocorre principalmente pelos procedimentos de corte que, juntamente com a temperatura de armazenamento, afetam a vida de prateleira de carnes cozidas (Patterson et al., 2010).

O uso de embalagem antimicrobiana pode melhorar a qualidade microbiológica da carne de aves cozidas. Vários trabalhos utilizando a tecnologia de embalagens ativas melhoraram a segurança alimentar por meio da redução do número de agentes patogênicos e deterioradores (Lemay et al., 2002; Pires et al., 2008, 2009; Santiago-Silva et al., 2009).

Recentemente, a nanotecnologia tem recebido grande atenção, visando à sua aplicação na área de embalagens para alimentos, uma vez que as embalagens constituídas a partir de materiais poliolefinicos ou biodegradáveis incorporados com nanocompostos apresentam propriedades mecânicas e de barreira melhoradas. O conceito de nanotecnologia tem se difundido amplamente no meio científico, buscando criar novos materiais e desenvolver novos produtos e processos baseados na incorporação de nanocompostos na matriz polimérica (Bao & Tjong, 2008; Cho et al., 2009).

Este tipo de aplicação é vista como a mais importante das nanotecnologias na área de alimentos para o futuro próximo. Nanopartículas de silicato, de prata, magnésio e de argila são incorporadas para aumentar as propriedades de barreira dos materiais de embalagem (Bouwmeester et al., 2009). As propriedades excepcionais dos nanotubos têm motivado muitas pesquisas acerca das propriedades mecânicas de compósitos à base desses compostos (Herbst et al., 2004; Narayan et al., 2005).

Um nanotubo de carbono (CNT) caracteriza-se pelo enrolamento de uma ou várias folhas de grafeno de forma concêntrica, com diâmetro em dimensões nanométricas, com cavidade interna oca (Zarbin, 2007), indicando a possibilidade de poder abrigar substâncias ativas, como antimicrobianos voláteis que precisam ser encapsulados para serem utilizados. Nano-encapsulamento envolve incorporação, absorção ou dispersão de compostos bioativos em pequenas vesículas com nano (ou submicron) diâmetros (Bouwmeester et al., 2009).

Com relação à migração desses compostos, mais estudos são necessários para chegar a uma afirmação conclusiva. Ainda não existem dados disponíveis sobre a possível migração de nanocompostos em alimentos (Azeredo, 2009), principalmente em função da falta de métodos para a detecção de nanopartículas em matrizes de alimentos (Bouwmeester et al., 2009).

1.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar embalagens ativas incorporadas com antimicrobiano e nanocomposto para a conservação e monitoramento da qualidade de alimentos.

1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver filme incorporado com antimicrobiano volátil por meio de encapsulamento com β -ciclodextrina e/ou nanotubo de carbono.
- Avaliar a eficiência *in vitro* dos filmes desenvolvidos sobre *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua*.
- Estudar alterações estruturais dos filmes incorporados com antimicrobiano e nanocomposto.
- Aplicar a embalagem antimicrobiana em frango cozido e desfiado inoculado com *Salmonella Choleraesuis* e avaliar a redução na contagem microbiológica, as características de cor e oxidação do frango, e analisar nas embalagens as alterações mecânicas, estruturais e difusão do antimicrobiano para o alimento.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEREDO, H. M. C. Review nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, Nov. 2009.

BAO, S. P.; TJONG, S. C. Mechanical behaviors of polypropylene/carbon nanotube nanocomposites: the effects of loading rate and temperature. **Materials Science and Engineering A**, Lausanne, v. 485, n. 1/2, p. 508-516, June 2008.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAMA, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G. T.; WIJNHOFEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 53, n. 1, p. 52-62, **Fev.** 2009.

CHO, J.; KONOPKA, K.; ROZNIATOWSKI, K.; LECINA, E. G.; SHAFFER, M. S. P.; BOCCACCINI, A. R. Characterisation of carbon nanotube films deposited by electrophoretic deposition. **Carbon**, Elmsford, v. 47, n. 1, p. 58-67, Jan. 2009.

HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 986-992, nov./dez. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por grandes regiões, segundo os produtos - período 2002-2003**. 2003. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002aquisicao/tab14.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2010.

LEMAY, M. J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P. J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 217-226, 2002.

NARAYAN, R. J.; BERRY, C. J.; BRIGMON, R. L. Structural and biological properties of carbon nanotube composite film. **Materials Science and Engineering B**, Lausanne, v. 123, n. 2, p. 123-129, Nov. 2005.

PATTERSON, M. F.; MCKAY, A. M.; CONNOLLY, M.; LINTON, M. Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 266-273, Apr. 2010.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packging Technology and Science**, [S.l.], v. 21, n. 7, p. 375-383, Apr. 2008.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C. Increased preservation of sliced mozzarella cheese by antimicrobial sachet incorporated with allyl isothiocyanate. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 1002-1008, Dez. 2009.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. F.; NÓBREGA, J. E.; WANDERLEI JÚNIOR, M. A.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; WÜRLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 1, p. 85-89, Jan. 2009.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

**CAPÍTULO 1: Alterações estruturais e efeito dos filmes antimicrobianos
sobre os microrganismos *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua***

1 RESUMO

O desenvolvimento de sistemas de embalagens ativas é uma área de grande importância na tecnologia de alimentos que, além de possibilitar a conservação dos alimentos, permite também o desenvolvimento de novos produtos. Embalagens antimicrobianas se apresentam como uma das versões mais promissoras de embalagem ativa, pois agem para reduzir, retardar ou inibir o crescimento de microrganismos que podem estar presentes nos alimentos. Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a adequação do alil isotiocianato (AIT), encapsulado ou não, em embalagens ativas com e sem nanocompostos, por meio da avaliação *in vitro* dessas embalagens por volatilização e por contato direto com relação a *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua*. Avaliaram-se também as alterações estruturais causadas pelo AIT nas bactérias por microscopia eletrônica de transmissão e a superfície dos filmes por microscopias de força atômica e eletrônica de varredura. Os resultados obtidos sugerem que o desenvolvimento de filmes incorporados com AIT é possível e que sua retenção pode ser obtida com o processo de encapsulamento com β -ciclodextrina e/ou uso de nanotubo de carbono (NTC). O AIT causou danos na parede celular, induzindo ao vazamento citoplasmático dos microrganismos estudados, mostrando ser capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Listeria innocua* e *Salmonella Choleraesuis*. Os filmes apresentaram alterações estruturais provocadas pela adição de AIT encapsulado em β -ciclodextrina e NTC e também redução na liberação de AIT. Os resultados globais sugerem que esses filmes apresentam grande potencial como embalagens antimicrobianas na conservação de alimentos, pois podem ser mais aceitáveis para os consumidores, em comparação com o uso de compostos químicos sintéticos.

Palavras-chave: embalagem antimicrobiana, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*

2 ABSTRACT

The development of active packaging systems is an area of great importance in the foods technology that, besides making the conservation of foods possible, also allows for the development of new products. Antimicrobial packaging is one of the most promising versions of active packaging, because it acts to reduce, delay or inhibit the growth of microorganisms that can be present in the foods. Thus, this work was conducted with the objective of studying the adequacy of allyl isothiocyanate (AIT), encapsulated or not, for active packagings with and without nanocompounds, through *in vitro* the evaluation of those packagings by volatilization and direct contact regarding *Salmonella Choleraesuis* and *Listeria innocua*. The structural alterations caused by AIT in the bacteria were also evaluated by transmission electron microscopy and the surface of the films by atomic force and scanning electron microscopy. The obtained results suggest that the development of films incorporated with AIT is possible and that its retention can be obtained with the encapsulation process with β -cyclodextrin and/or the use of carbon nanotubes (CNT). AIT caused damage in the cell walls, inducing the cytoplasmic leakage of the studied microorganisms, showing to be capable of inhibiting the *in vitro* growth of *Listeria innocua* and *Salmonella Choleraesuis*. The films present structural alterations provoked by the addition of AIT encapsulated in β -cyclodextrin and CNT and also reduction in the liberation of AIT. The global results suggest that those films present great potential as antimicrobial packaging in the conservation of foods, because they can be more acceptable to the consumers, in comparison with the use of synthetic chemical compounds.

Keywords: antimicrobial packaging, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*

3 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, novos materiais desenvolvidos a partir de polímeros naturais têm despertado interesse no meio científico, por se apresentarem como alternativa para substituição de plásticos derivados de petróleo que causam impacto negativo ao meio ambiente. Um exemplo são os plásticos de celulose, que são polímeros termoplásticos produzidos por esterificação de celulose de materiais, como algodão, papel reciclado, madeira e cana-de-açúcar. Esses materiais têm sido utilizados para aplicações em muitas áreas, tais como laminados, filmes ópticos, fibras têxteis e revestimentos para fármacos e alimentos (Pranoto et al., 2005; Romero et al., 2009).

Além da questão ambiental, a produção de alimentos com qualidade e segurança alimentar é meta prioritária para as indústrias alimentícias e, para isso, as boas práticas higiênico-sanitárias fazem-se necessárias, juntamente com o acondicionamento do produto em embalagens adequadas para proteger e conservar o alimento. Embalagem ativa é um conceito inovador e pode ser definida como uma interação entre embalagem e produto, com o objetivo de prolongar a vida útil ou melhorar a segurança e ou as propriedades sensoriais, mantendo a qualidade do produto (Soares, 1998). Dentro desse conceito, destacam-se as embalagens antimicrobianas como uma das versões mais promissoras de embalagem ativa, que agem para reduzir, retardar ou inibir o crescimento de microrganismos que podem estar presentes nos alimentos embalados (Vartiainen et al., 2003).

Dentre os microrganismos de origem alimentar que representam ameaça para a segurança do consumidor, podem-se citar *Listeria ssp.* e *Salmonella ssp.*

Listeria spp. é um microrganismo psicotrófico capaz de crescer, mesmo em condições de refrigeração. Além disso, tem sido relatado que este patógeno

pode sobreviver em ambientes ácidos, bem como na ausência ou em quantidades muito baixas de oxigênio.

O controle de *L. monocytogenes* é comum em vários alimentos, como frango, carne e laticínios e desempenha papel fundamental para fins de segurança alimentar, devido aos inúmeros focos registrados de listeriose, que é uma doença altamente letal. A fim de evitar alguns problemas de segurança durante estudos com microrganismos tem se optado frequentemente pela substituição de espécies patogênicas por outras espécies não patogênicas que se comportam da mesma forma do microrganismo de interesse. Como exemplo, tem-se *Listeria innocua*, microrganismo não patogênico tratado no lugar do patógeno *Listeria monocytogenes*, por apresentar comportamento análogo ao desta (Noriega et al., 2008). Vaz-Velho et al. (2001) mostraram que *L. innocua* e *L. monocytogenes* comportam-se de maneira semelhante diante de tratamentos com ozônio e bacteriocinas aplicados a peixe e, diante disso, *L. innocua* tem sido utilizada como um substituto para *L. monocytogenes*, por vários autores (Perni et al., 2006; Noriega et al., 2008; Pinto et al., 2009).

Já o microrganismo *Salmonella* spp. é responsável por doenças gastrintestinais, com o número de casos em todo o mundo excedendo a 100 milhões a cada ano. A infecção ocorre geralmente após a ingestão de alimentos, principalmente os de origem animal, como aves, ovos, leite, carne de porco ou água contaminados, sendo caracterizada por diarreia, cólicas abdominais, náuseas, febre e vômitos (Miko et al., 2005; Harakeh et al., 2005; Andrews-Polymenis et al., 2009).

Extratos naturais e óleos essenciais de plantas foram historicamente utilizados para prolongar a vida de prateleira, estabilizando ou melhorando a qualidade sensorial de alimentos. No entanto, desde o advento de potentes antibióticos sintéticos, na década de 1950, o uso de derivados de vegetais como antimicrobianos tornou-se quase inexistente. Recentemente, os óleos essenciais e

os extratos de muitas espécies de plantas tornaram-se populares (López et al., 2005; Nadarajah et al., 2005b; Rasoolia et al., 2006). Várias substâncias, como ácidos orgânicos, extratos de temperos, óleos essenciais e isotiocianatos, já foram incorporadas em materiais de embalagens e testadas *in vitro* e também em alimentos, apresentando atividade antimicrobiana sobre microrganismos deterioradores e patogênicos (Vartiainen et al., 2003; Oliveira et al., 2007; Becerril et al., 2007; Pires et al., 2008; Santiago-Silva et al., 2009; Guiga et al., 2009).

O alil isotiocianato (AIT) é um composto volátil, não fenólico e natural, encontrado em caule, raiz, folhas e sementes de plantas pertencentes à família *Crucifereae*, como rábano, mostarda, couve, brócolis e nabo (Lim & Tung, 1997). Vários trabalhos relatam sua eficiência antimicrobiana contra diversos microrganismos patogênicos, inclusive de origem alimentar, mesmo quando utilizado em baixas concentrações (Isshiki et al., 1992; Nielsen & Rios, 2000; Rhee et al., 2002; Nadarajah et al., 2005b; Luciano & Holley, 2009), exercendo um amplo espectro de inibição.

Lin et al. (2000) sugerem que AIT interfere na atividade de enzimas intracelulares essenciais alterando a estrutura das proteínas. Segundo Luciano & Holley (2009), o AIT inibe a catálise de tioredoxina redutase e acetato quinase, que são responsáveis por importantes reações metabólicas em bactérias. O AIT é conhecido também pela sua capacidade de alterar a captação de oxigênio. Entretanto, para isso, é necessária uma quantidade de antimicrobiano maior que a necessária para inibir microrganismos (Lin et al., 2000; Luciano & Holley, 2009).

Vega-Lugo & Lim (2009) investigaram o encapsulamento de AIT no intuito de desenvolver uma metodologia de incorporação deste antimicrobiano na proteína isolada de soja e fibras poliláticas. Segundo Oliveira & Oliveira (2004), os japoneses desenvolveram um filme de polietileno impregnado de alil-

isotiocianato encapsulado em um oligossacarídeo cíclico. Mesmo diante dos excelentes resultados já adquiridos com a utilização desse antimicrobiano, sua aplicação na indústria de alimentos é limitada por ser um produto volátil e pungente, necessitando, portanto, ser mais investigado.

O conceito de nanotecnologia tem se difundido amplamente e recentemente tem recebido grande atenção, visando à sua aplicação na área de embalagens para alimentos, uma vez que as embalagens constituídas a partir de materiais poliolefinicos ou biodegradáveis, incorporadas com nanocompostos, apresentam propriedades mecânicas e de barreira melhoradas (Bao & Tjong, 2008; Bouwmeester et al., 2009). A pequena dimensão, em intervalo de nanoescala, em combinação com a composição química e estrutura superficial, proporciona aos nanocompostos características únicas e potencialidade de aplicações em diversas áreas (Bouwmeester et al., 2009; Azeredo, 2009).

Várias nanopartículas inorgânicas têm sido reconhecidas como aditivos para melhorar o desempenho do polímero. Alguns exemplos dessas partículas são representados por sólidos em camadas, nanofibras de polímero sintético, nanocelulose e nanotubos de carbono. Entre estas, até agora apenas os sólidos inorgânicos, como argila, têm atraído alguma atenção da indústria de embalagens. Esse fato ocorre não apenas devido à sua disponibilidade e ao baixo custo, mas também devido às suas melhorias significativas e relativa processabilidade simples (Sorrentino et al., 2007).

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o encapsulamento do AIT e verificar sua adequação em embalagens ativas, com e sem nanocompostos, por meio da avaliação *in vitro* dessas embalagens por volatilização e contato direto com relação a *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua*, assim como estudar as alterações causadas pelo antimicrobiano nos microrganismos e nos filmes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

4.1 Planejamento experimental

Foi realizada uma experimentação sequencial em que os fatores estudados foram quantidade e tipo de AIT e quantidade de NTC, sendo os níveis de AIT avaliados entre 0% e 40%, com variação de 5 em 5 pontos percentuais e os níveis de NTC fixados em dois pontos: 0% e 0,1% (p/p). Os tipos de AIT foram encapsulados (1) e não encapsulados (0). O experimento foi realizado com duas repetições. Na Tabela 1 encontra-se a descrição dos filmes desenvolvidos.

TABELA 1 Filmes antimicrobianos desenvolvidos

Filmes	AIT (%)	Tipo de AIT	NTC (%)
1	0	Não encapsulado	0
2	5	Não encapsulado	0
3	10	Não encapsulado	0
4	15	Não encapsulado	0
5	20	Não encapsulado	0
6	25	Não encapsulado	0
7	30	Não encapsulado	0
8	35	Não encapsulado	0
9	40	Não encapsulado	0
10	0	Encapsulado	0
11	5	Encapsulado	0
12	10	Encapsulado	0
13	15	Encapsulado	0
14	20	Encapsulado	0
15	25	Encapsulado	0
16	30	Encapsulado	0
17	35	Encapsulado	0
18	40	Encapsulado	0
19	0	Não encapsulado	0,1
20	5	Não encapsulado	0,1
21	10	Não encapsulado	0,1
22	15	Não encapsulado	0,1
23	20	Não encapsulado	0,1
24	25	Não encapsulado	0,1
25	30	Não encapsulado	0,1
26	35	Não encapsulado	0,1
27	40	Não encapsulado	0,1
28	0	Encapsulado	0,1
29	5	Encapsulado	0,1
30	10	Encapsulado	0,1
31	15	Encapsulado	0,1
32	20	Encapsulado	0,1
33	25	Encapsulado	0,1
34	30	Encapsulado	0,1
35	35	Encapsulado	0,1
36	40	Encapsulado	0,1

4.2 Desenvolvimento dos filmes

Os filmes antimicrobianos de base celulósica foram obtidos pela técnica de *casting*, de acordo com a metodologia descrita por Soares (1998), que consiste na preparação da solução filmogênica e a aplicação da mesma em um suporte/molde com o auxílio de máquina *casting* (K Paint applicator), com posterior evaporação do solvente. O antimicrobiano utilizado foi o alil-isotiocianato (AIT, Sigma Aldrich), aplicado na forma não encapsulada e encapsulada segundo método citado por Zhang et al. (2007). O processo para encapsular o AIT consistiu, basicamente, de uma solução de etanol com β -ciclodextrina (CD) e AIT agitados em banho de gelo por 6 horas e posterior filtração em papel filtro. Adicionou-se também ao filme nanocomposto nanotubo de carbono (NTC, Ahwahree Technogy) 0,1% (p/p) em relação ao peso do polímero de celulose (PC).

4.3 Ativação e preparo do inóculo

As bactérias *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 6539) e *Listeria innocua* (ATCC 33090) foram ativadas por duas vezes consecutivas em *Tryptic Soy Broth* (TSB - Difco™, USA) e incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas. Após a incubação, os meios foram centrifugados a 3.783 g, por 5 minutos, a 5°C (Centrifuge 4K-15, Sigma, USA). Os pellets celulares foram lavados com água peptonada 0,1% e novamente centrifugados nas mesmas condições. As culturas foram ressuspensas em água peptonada e diluídas a uma absorbância de 0,3 a um comprimento de onda de 600 nm, determinada por espectrofotômetro (GBC, UV/ VIS 918, SHIMADZU, Japão), equivalendo a uma contagem de $8 \log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Nadarajah et al., 2005b).

4.4 Teste da atividade antimicrobiana da embalagem por volatilização

Avaliou-se a eficiência dos filmes antimicrobianos sobre os diferentes microrganismos, seguindo metodologia citada por López et al. (2005) (padronizar). Inocularam-se separadamente *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 6539) e *Listeria innocua* (ATCC 33090), friccionando-se um swab de algodão estéril umedecido com a suspensão do inóculo (10^8 UFC·mL⁻¹), previamente preparado, em placas contendo meio *Tryptic Soy Ágar* (TSA, Difco™, USA). Posteriormente adicionou-se o filme produzido (8 cm²) na tampa da placa de Petri para verificar o efeito por volatilização. Incubaram-se as placas a 35±2°C por 18-20 horas. A fim de simular a embalagem de alimentos, as placas foram acondicionadas em sacos plásticos de PE/náilon e selados.

Depois da incubação, determinou-se a CMI por meio da embalagem com menor concentração de agente antimicrobiano que causou inibição visual dos microrganismos.

4.5 Teste da atividade antimicrobiana da embalagem por contato direto

Por meio do método de diluição avaliou-se o efeito antimicrobiano das embalagens por contato direto. Adicionaram-se 10µL do inóculo (8 log UFC·mL⁻¹) *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 6539) e *Listeria innocua* (ATCC 33090) em caldo Mueller Hinton (MH, Difco™, USA) e *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco™, USA), respectivamente, resultando em concentração de 5 log UFC·mL⁻¹. Posteriormente, colocou-se a embalagem antimicrobiana (8 cm²) e incubou-se por 18-20 horas a 35±2°C. A fim de simular a embalagem de alimentos, os tubos foram acondicionados em sacos plásticos de PE/náilon e selados.

Determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) por meio da embalagem com menor concentração de agente antimicrobiano que inibiu

completamente o crescimento dos microrganismos nos tubos, sem turvação detectada a olho nu (Rasoolia et al., 2006).

4.6 Liberação de AIT

Para quantificar o AIT liberado pelos filmes desenvolvidos, uma área de 90 cm² de amostra foi colocada em frasco de 10 mL e submetida a um aquecimento de 40°C, por 5 minutos, para acelerar a liberação de AIT do filme. Com o auxílio de uma seringa *gastight* (Hamilton®), uma alíquota de 10 µl foi retirada do frasco e injetada no cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS – QP 5050, coluna DB5, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) e injetor automático (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). Depois da injeção da amostra, as condições de operação do GC-MS foram: temperatura inicial da coluna de 60°C, mantida durante 2 minutos, aumento para 90°C à taxa de 12,5°C.min⁻¹, sendo mantida por 45 segundos, a 90°C. A temperatura do injetor era de 250°C e gás hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ (Nadarajah et al., 2005a). O resultado foi expresso em mg de AIT/100 mL.

Para quantificar o AIT, uma curva padrão com diferentes concentrações conhecidas do antimicrobiano foi obtida com o tempo de retenção de 3,45 minutos.

Considerando o valor de AIT encontrado em 90 cm² de área de filme, estimou-se a concentração de AIT possivelmente liberada pela área utilizada nos testes de volatilização e por contato direto, indicando a quantidade de AIT necessária para causar inibição nos microrganismos em estudo.

4.7 Alterações estruturais nos microrganismos

As alterações estruturais causadas pelo AIT nas bactérias foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão utilizando-se o método de

diluição citado no item 2.4, em contato com filmes em concentração mínima inibitória (CMI) com um tempo menor de incubação para permitir o crescimento dos microrganismos (Rasoolia et al., 2006). As amostras foram preparadas segundo metodologia citada por Lucas (2009), com algumas alterações. A análise foi realizada no Laboratório de Ultraestrutura e Microscopia Eletrônica, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Após o período de incubação, os caldos Muller Hinton e BHI foram centrifugados e as células de *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua* foram mantidas em fixador Karnovsky, por 24 horas. Após a etapa de pré-fixação, centrifugou-se e eliminou-se o sobrenadante, adicionando-se tampão fosfato salino (Phosphate buffered saline, PBS, Laborclin, SP, Brasil).

Para facilitar a obtenção dos cortes, os pellets celulares foram ressuspensos após centrifugação em ágar-ágar 2% (Difco™, USA), sendo novamente lavados em tampão PBS (3 vezes por 10 minutos) e procedendo-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) por 4 horas, em geladeira. Após esta etapa, os cortes foram lavados (6 vezes de 10 minutos) em água destilada e, com acetato de uranila 2%, realizou-se a contrastação em bloco por 12 horas em geladeira e esses fragmentos foram posteriormente lavados em água destilada (6 vezes de 10 minutos) e desidratados gradualmente em álcool (30%, 50%, 70%, 80% e 95%, por 10 minutos e por 2 vezes de 15 minutos em álcool 100%). A seguir, houve a infiltração do material na resina *spurr* e etanol, permanecendo por 12 horas antes de cada amostra ser montada em moldes e polimerizada em estufa, a 65°C, por 24 horas.

Para a ultramicrotomia, os blocos obtidos foram desbastados para a retirada do excesso de resina e, em seguida, secções semifinas (0,85µm) e ultrafinas (<100nm) foram cortadas utilizando-se um ultramicrotomo Reichert – Jung (ultracut) com navalha de diamante. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades e pós-contrastados em acetato de uranila (2%), seguido por citrato de

chumbo (3%) por três minutos cada, lavando-os em uma série de 3 béqueres de 100 mL de água destilada depois de cada contrastante.

As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, utilizando o programa AnalySIS Imager.

4.8 Alterações estruturais nos filmes

A superfície dos filmes foi estudada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica. Os filmes utilizados nessas análises foram os de concentração mínima inibitória (CMI) para *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua*.

4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura

A análise foi realizada no Laboratório de Ultraestrutura e Microscopia Eletrônica, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para a obtenção das fotomicrografias analisaram-se, aproximadamente, 2 mm dos filmes e porções do nanotubo de carbono e do AIT encapsulado em β -ciclodextrina. As amostras foram acondicionadas em *stubs* com fita de carbono e banhadas a ouro, por 180 segundos (metalização), fixadas no aparelho e fotomicrografadas. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO EVO 40), com tensão de aceleração de 20 KV.

4.8.2 Microscopia de força atômica

A análise de força atômica foi realizada no Laboratório de Nanoscopia, no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os filmes foram cortados e fixados no suporte de amostra com auxílio de fita dupla face. Em seguida, cada amostra foi analisada no Microscópio de Força Atômica modelo NTEGRA marca NT – MDT, operando no modo de contato intermitente. Para cada amostra, foram realizadas varreduras de 10 μm x 10 μm ,

3 μm x 3 μm e 1 μm x 1 μm . O software de análise de imagens do microscópio foi utilizado para a determinação da rugosidade média quadrática de cada amostra, utilizando-se as varreduras de 3 μm x 3 μm .

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Teste da atividade antimicrobiana da embalagem por volatilização e por contato direto e liberação de AIT do filme

Nas Tabelas 2 a 5 estão listados os filmes que inibiram o crescimento microbiano (CMI) para *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua* por volatilização e por contato direto, respectivamente, a quantidade de AIT liberado dessas embalagens e a concentração estimada de AIT necessária para causar inibição dos microrganismos em estudo.

TABELA 2 Concentração mínima inibitória (CMI), expressa em porcentagem de AIT adicionada ao filme para *Salmonella Choleraesuis* por volatilização, teor de AIT liberado pelos filmes e concentração em ppm estimada de AIT para causar inibição.

Filmes	Tipo de AIT	NTC (%)	CMI por volatilização AIT (%)	mg AIT/100mL	ppm (mL/mL)
5	Não encapsulado	0	20	294,182	258,14
23	Não encapsulado	0,1	20	213,586	187,42
16	Encapsulado	0	30	193,499	169,79
34	Encapsulado	0,1	30	152,771	134,05

TABELA 3 Concentração mínima inibitória (CMI), expressa em porcentagem de AIT adicionada ao filme para *Listeria innocua* por volatilização, teor de AIT liberado pelos filmes e concentração em ppm estimada de AIT para causar inibição.

Filmes	Tipo de AIT	NTC (%)	CMI por volatilização AIT (%)	mg AIT/100mL	ppm (mL/mL)
9	Não encapsulado	0	40	356,923	294,77
26	Não encapsulado	0,1	35	342,756	300,76
18	Encapsulado	0	40	230,543	202,28
36	Encapsulado	0,1	40	223,805	196,38

TABELA 4 Concentração mínima inibitória (CMI), expressa em porcentagem de AIT adicionada ao filme para *Salmonella Choleraesuis* por contato direto, teor de AIT liberado pelos filmes e concentração em ppm estimada de AIT para causar inibição.

Filmes	Tipo de AIT	NTC	CMI por contato direto AIT (%)	mg AIT/100mL	ppm (mL/mL)
2	Não encapsulado	0	5	135,197	118,63
20	Não encapsulado	0,1	5	85,567	75,08
13	Encapsulado	0	15	119,927	105,23
30	Encapsulado	0,1	10	47,736	41,88

TABELA 5 Concentração mínima inibitória (CMI), expressa em porcentagem de AIT adicionada ao filme para *Listeria innocua* por contato direto, teor de AIT liberado pelos filmes e concentração em ppm estimada de AIT para causar inibição.

Filmes	Tipo de AIT	NTC (%)	CMI por contato direto AIT (%)	mg AIT/100mL	ppm (mL/mL)
5	Não encapsulado	0	20	294,182	258,14
26	Não encapsulado	0,1	35	342,756	300,76
17	Encapsulado	0	35	209,206	183,57
36	Encapsulado	0,1	40	223,805	196,38

A CMI para *Salmonella Choleraesuis* foi sempre inferior à CMI da *Listeria innocua*. Estudos mostram que bactérias gram-negativas são mais sensíveis que bactérias gram-positivas quando submetidas ao AIT, provavelmente, devido à maior espessura da parede celular das bactérias gram-positivas (Lin et al., 2000).

Filmes com AIT encapsulado exigem uma CMI maior, tanto por volatilização quanto por contato direto, quando comparada com os filmes elaborados com AIT não encapsulados. O processo de encapsulamento diminui a liberação de AIT quando se compara a quantidade do antimicrobiano dos filmes não encapsulados e encapsulados, independentemente da concentração utilizada nos filmes. Chacon et al. (2006) avaliaram diferenças na atividade

antimicrobiana de AIT, quando usado como gás, líquido ou microencapsulado contra *E. coli* O157:H7 em ágar e sistemas alimentares. Estes autores concluíram que um nível maior inicial de AIT foi necessário quando foram utilizadas microcápsulas em relação à volatilização no espaço vazio da embalagem para se ter o mesmo efeito bactericida.

Analisando o teor de AIT liberado pelos filmes, com e sem NTC, e com a mesma concentração de AIT (5 e 23; 16 e 34; 2 e 20; 18 e 36; 2 e 20), observa-se que os filmes com NTC liberaram menor quantidade de antimicrobiano, indicando que o nanocomposto utilizado, assim como o encapsulamento, auxilia na retenção de AIT, ou seja, ocorre uma liberação gradual, o que é mais desejável por prolongar o seu efeito, protegendo, por um período maior de tempo, o alimento que possa ser embalado com essas embalagens.

A dispersão uniforme das nanopartículas leva a uma matriz de grande área interfacial, que muda a mobilidade molecular (Azeredo, 2009), o que pode interferir na liberação do antimicrobiano. Segundo Bao & Tjong (2008), a incorporação de NTC em filmes de polipropileno reduziram a mobilidade da cadeia polimérica. Além disso, os nanotubos de carbono, devido ao entrelaçamento de dezenas e centenas de tubos individuais que são aderidos (ligados) uns aos outros como resultado das forças de atração de Van der Waals, formam poros agregados que são capazes de fornecer grandes superfícies externas que podem imobilizar substâncias (Upadhyayula et al., 2009).

Lin et al. (2000) encontraram valores de CMI de AIT para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium na fase líquida de 197 e 99 ppm (v/v). Esses valores são intermediários aos encontrados neste estudo para causar inibição de *Listeria innocua* e *Salmonella* Choleraesuis por contato direto.

5.2 Alterações estruturais nos microrganismos

Na Figura 1 são ilustradas as fotomicrografias de transmissão de *Salmonella Choleraesuis* (A) e *Listeria innocua* (B).

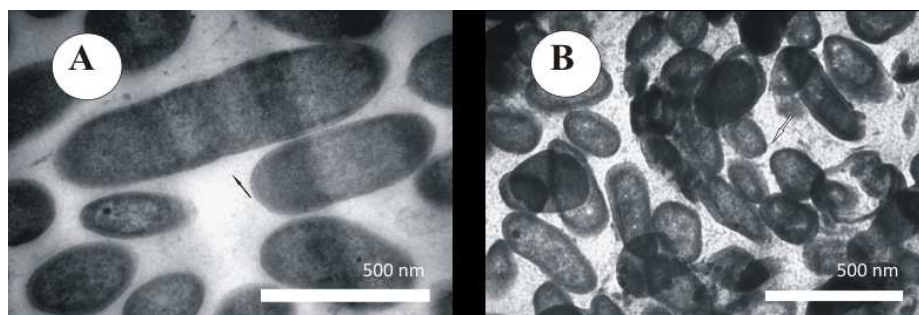


FIGURA 1 Fotomicrografia de transmissão dos inóculos testemunha *Salmonella Choleraesuis* (A) e *Listeria innocua* (B).

Nas imagens A e B (Figura 1) encontram-se os inóculos de *Salmonella Choleraesuis* e *Listeria innocua* com as paredes celulares intactas, lisas, contínuas sem nenhum dano

Na Figura 2 são apresentadas as fotomicrografias de *Salmonella Choleraesuis* em contato com diferentes filmes antimicrobianos.

Nas fotomicrografias A e B da Figura 2, observa-se que o antimicrobiano causou irregularidades na parede celular, deixando as células mais rugosas. Nas imagens A, C e D ocorreu ruptura da parede celular e perda de material citoplasmático. Rasoolia et al. (2006) observaram perda de suavidade e uniformidade na parede celular de *L. monocytogenes* tratada com diferentes óleos essenciais.

De maneira geral, pode-se observar que as bactérias sofreram alterações degenerativas, mostrando ruptura da parede celular e perda de material citoplasmático. Este padrão de anormalidades foi evidente em quase todos os tratamentos.

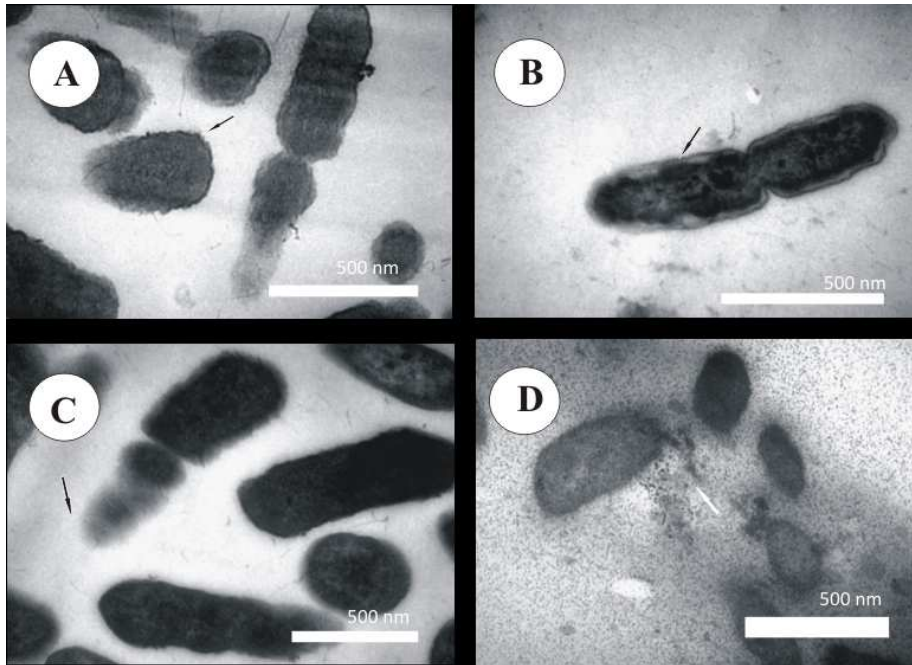


FIGURA 2 Fotomicrografia de transmissão de *S. Choleraesuis* (A a D): *S. Choleraesuis* em contato com filme 5% AIT (A); *S. Choleraesuis* em contato com filme 5% AIT + NTC (B); *S. Choleraesuis* em contato com filme 15% AIT encapsulado (C); *S. Choleraesuis* em contato com filme 10% AIT encapsulado + NTC (D).

Na Figura 3, a imagem A mostra que o contato do filme antimicrobiano com as células *Listeria innocua* provocou ruptura da parede celular.

Observa-se também, na fotomicrografia B (Figura 3), que as células também mostraram uma falta de citoplasma (setas), possivelmente, devido à diminuição da funcionalidade de membrana celular como barreira.

Nas imagens C e D (Figura 3) pode-se observar vazamento de material citoplasmático decorrente de ruptura da parede celular e, nesta última imagem, percebe-se também processo de mitose. Rasoolia et al. (2006) perceberam que o tamanho das células de *L. monocytogenes* diminuiu e estas foram encontradas

mais próximas quando expostas a óleos essenciais, provavelmente em uma tentativa de sobrevivência.

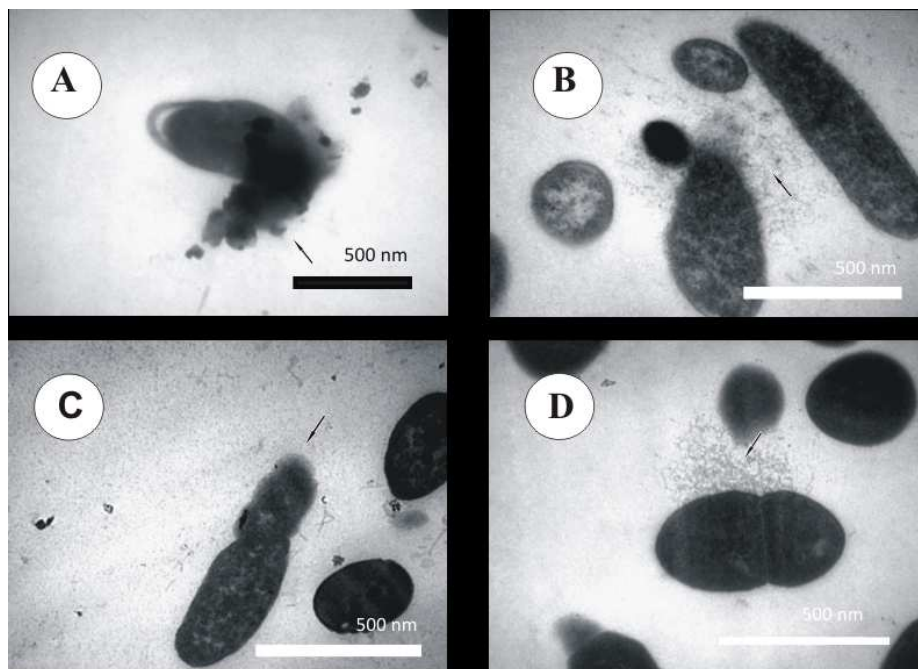


FIGURA 3 Fotomicrografia de transmissão de *Listeria innocua* (A a D) expostas aos filmes antimicrobianos. *Listeria innocua* em contato com filme 20% AIT (A); *Listeria innocua* em contato com filme 35% AIT + NTC (B); *Listeria innocua* em contato com filme 35% AIT encapsulado (C); *Listeria innocua* em contato com filme 40% AIT encapsulado + NTC (D).

Maisner-Patin & Richard (1996) relataram que a exposição de *Listeria innocua* à nisina induziu ao espessamento da parede celular e também a irregularidades. Lin et al. (2000) mostraram que a AIT causou danos na membrana celular de *Escherichia coli* K-12, levando à perda de metabólitos celulares. Segundo Burt (2004), uma característica importante dos óleos

essenciais e de seus componentes é a hidrofobicidade, o que lhes permite a interação com lipídios da membrana celular bacteriana e mitocôndrias, perturbando as estruturas, tornando-as mais permeáveis. Vazamento de íons e de outros conteúdos celulares pode ocorrer. Certa quantidade de fuga de células bacterianas pode ser tolerada, sem perda de viabilidade, mas a extensa perda de conteúdo da célula ou a saída de moléculas importantes nos processos de metabolismo levarão à morte da célula.

Diante do exposto, a ação do AIT se dá, principalmente, na parede celular, induzindo ao vazamento citoplasmático.

5.3 Alterações estruturais nos filmes

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 4, as fotomicrografias revelam uma superfície caracterizada por uma rede de cilíndricos que representam vários segmentos de NTC entrelaçados, de tal forma que cada cilindro interfere no movimento do outro.

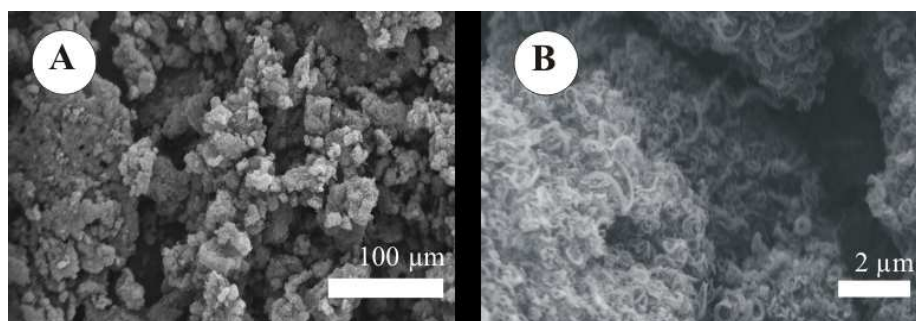


FIGURA 4 Fotomicrografias de nanotubo de carbono obtidas por MEV.

Liang et al. (2008), analisando NTC por microscopia eletrônica de varredura, exibiram imagens semelhantes. Segundo este autor, atrações momentâneas, por meio das forças de Van der Waals, podem ocorrer entre NTC. Nesses casos, nenhuma transferência de carga ocorre entre eles, mas as cargas

podem ser deslocadas dentro dessas moléculas e os NTCs irão, conseqüentemente, atrair uns aos outros, tornando-se entrelaçados ou enrolados à medida que crescem.

Na Figura 5 observam-se as fotomicrografias do encapsulado de AIT em β -ciclodextrina, de aparência branca e de microcápsulas irregulares, porém, semelhantes entre si. Chacon et al. (2006) utilizaram goma acácia para encapsular AIT e exibiram imagens semelhantes às das microcápsulas apresentadas na Figura 5.

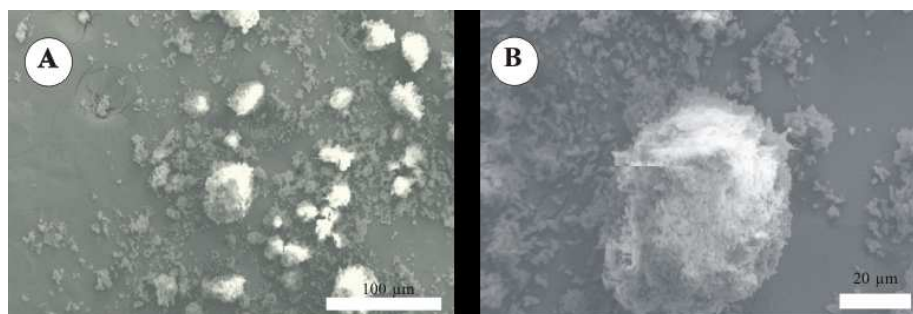


FIGURA 5 Fotomicrografias do encapsulado de AIT em β -ciclodextrina, obtidas por MEV.

A β -ciclodextrina (CD) é conhecida por sua capacidade de formar complexos por ligações químicas com uma vasta gama de compostos sólidos, líquidos e gasosos. Os dois fatores envolvidos no encapsulamento de moléculas efetuado por CD são o tamanho da cavidade e as interações termodinâmicas entre o hóspede e as moléculas de acolhimento. A cavidade hidrofóbica da molécula de CD fornece um microambiente favorável para o AIT que tende a deslocar moléculas de água por causa de suas propriedades hidrofóbicas, levando, assim, a um estado de energia mais baixo e termodinamicamente mais estável (Vega-Lugo & Lim, 2009).

Na Figura 6 são apresentadas as fotomicrografias dos filmes sem AIT (controles). Observa-se que o filme de base celulósica controle (6A) apresenta uma superfície lisa com a presença de flocos de celulose que não foram solubilizados na solução filmogênica.

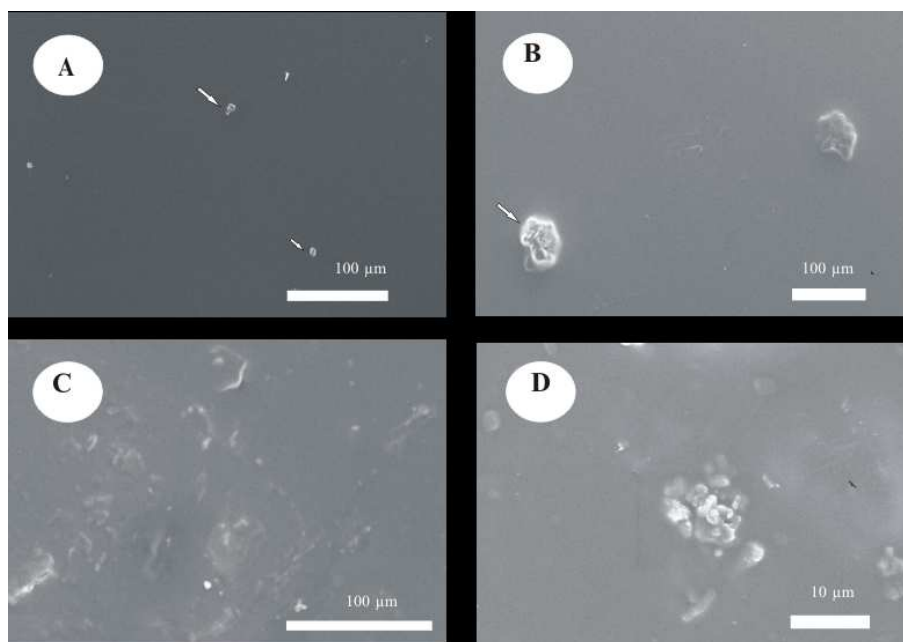


FIGURA 6 Fotomicrografias dos filmes de base celulósica (A); base celulósica + nanotubo de carbono (B); base celulósica + β -ciclodextrina (C) e base celulósica + β -ciclodextrina + nanotubo de carbono (D), obtidas por MEV.

Já na imagem 6B (setas) observam-se aglomerados de NTC. Liang et al. (2008) desenvolveram compósitos preparados via moldagem de embalagens por injeção (*dynamic packing injection molding* ou DPIM) e conseguiram dispersão homogênea e sem agregados de nanotubos de carbono, o que é desejável para o desenvolvimento de filmes de maior qualidade.

Para os filmes adicionados de solução de CD (6C e 6D), percebe-se que ocorreram alterações na estrutura, deixando-os menos homogêneos.

Santiago-Silva et al. (2009) desenvolveram filmes de base celulósica incorporados com pediocina e, por microscopia eletrônica de varredura, observaram que o filme apenas de base celulósica (controle) foi visualmente o mais transparente e o mais homogêneo e que uma evidente alteração na morfologia de superfície dos filmes foi evidenciada com o aumento da concentração de pediocina incorporada.

Os filmes com AIT não encapsulado (Figura 7) apresentam alguns flocos de celulose não dissolvidos, mas, em geral, observa-se uma superfície homogênea, possivelmente em decorrência da afinidade química entre a solução de base celulósica e solvente com o antimicrobiano AIT, que apresentam características hidrofóbicas. Estes filmes (7A; 7B e 7C) apresentam também microfuros, possivelmente, em função da volatilização do antimicrobiano utilizado, considerando que este é um composto volátil e que, nos filmes sem AIT (Figura 6), esta alteração não foi observada. Na Figura 7D, observam-se a presença de aglomerado de NTC e a ausência de microfuros, reforçando o indicativo de que a presença de NTC diminui a liberação de AIT.

As fotomicrografias 7C e 7D são de filmes incorporados com NTC, entretanto, o filme 7C apresenta microfuros, possivelmente em função da alta concentração de AIT, quando se compara com o filme 7D.

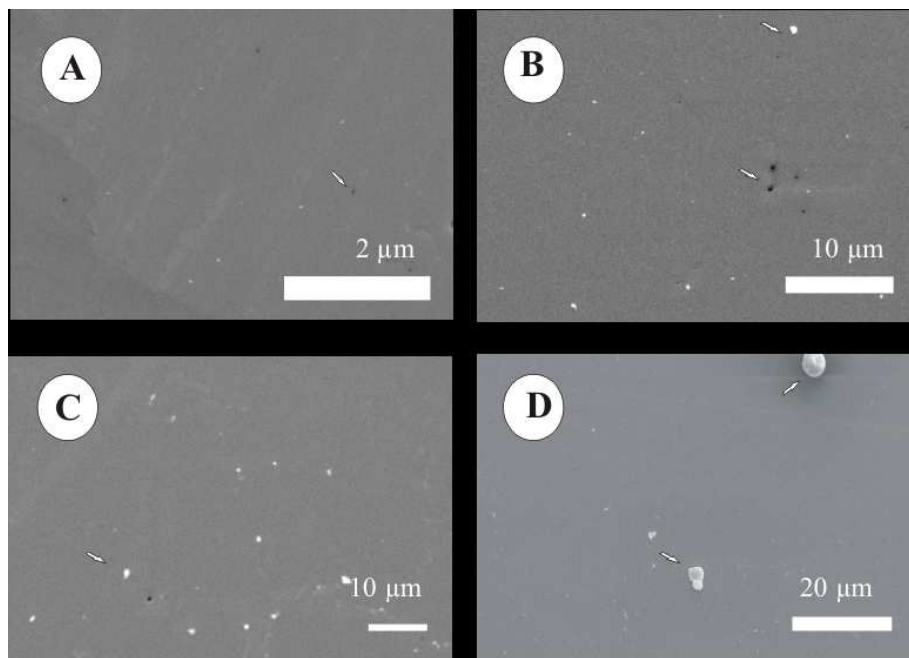


FIGURA 7 Fotomicrografias dos filmes incorporados com AIT não encapsulados obtidas por MEV: 5% AIT (A); 20% AIT (B); 35% AIT + NTC (C) e 5% AIT + NTC (D).

Nas imagens apresentadas na Figura 8 observa-se a liberação de AIT (microfuros) e também saliências que correspondem ao AIT encapsulado em β -ciclodextrina. A presença de compostos de AIT encapsulados em β -ciclodextrina promoveu uma desuniformidade na estrutura do filme, provavelmente devido ao caráter hidrofílico da parte externa da ciclodextrina que fica em contato com a solução filmogênica, desempenhando um papel desestabilizador na interface do filme.

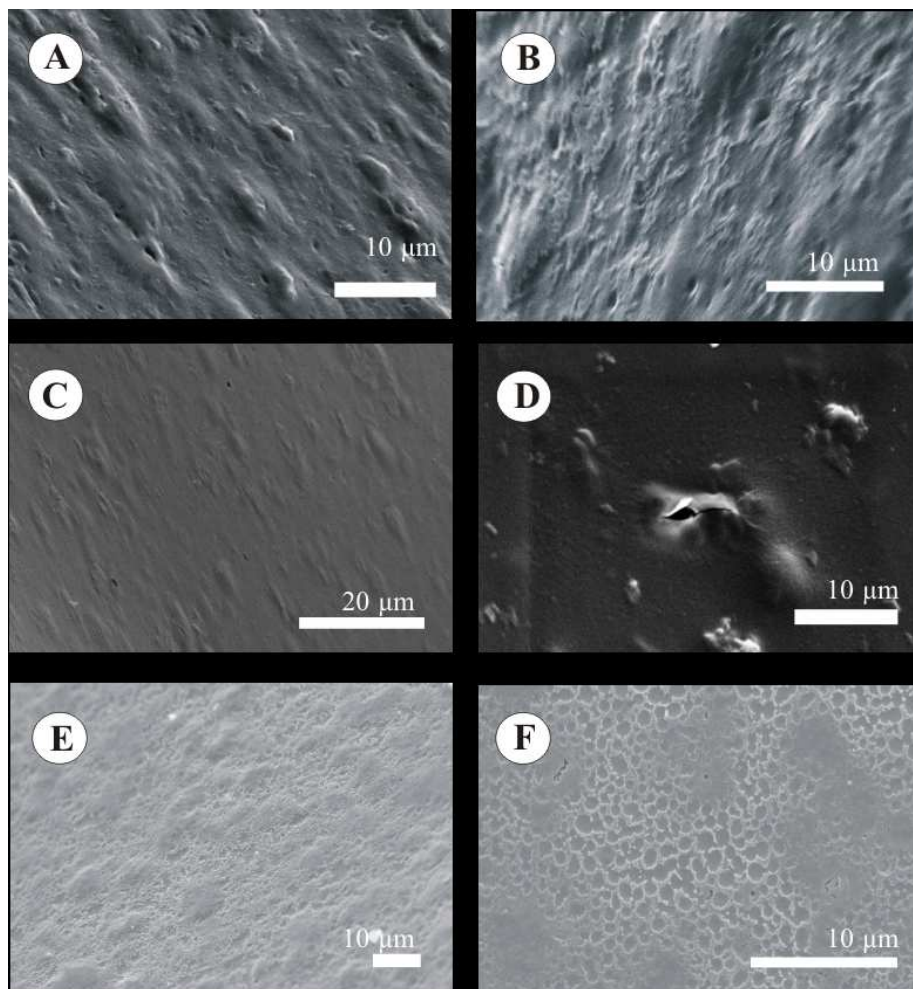


FIGURA 8 Fotomicrografias de filmes incorporados com AIT encapsulados obtidas por MEV: 15% AIT encapsulado (A); 35% AIT encapsulado (B); 10% AIT encapsulado + NTC (C e D); 40% AIT encapsulado + NTC (E e F).

Hambleton et al. (2009) desenvolveram filmes de carragena com aroma encapsulado e encontraram, por meio de fotomicrografias, uma estrutura mais homogênea da emulsão, que, segundo estes autores, foi devido ao caráter

anfifílico do n-hexanal utilizado, que tem papel estabilizador na estrutura do filme.

Nas imagens da Figura 8, observa-se que a quantidade de AIT encapsulado, juntamente com o NTC, alterou a morfologia do filme, resultando na formação de uma rede de estrutura homogênea e porosa, o que indica que o NTC neste filme ficou bem disperso, com presença de saliências que seriam o AIT encapsulado.

5.3.2 Microscopia de força atômica

Na Tabela 6 encontram-se os valores da rugosidade média quadrática (rqm) dos filmes, calculados a partir das imagens obtidas pela varredura de 3 µm x 3 µm, por meio da microscopia de força atômica (MFA).

TABELA 6 Rugosidade dos filmes analisados por microscopia de força atômica

Filmes	Rugosidade média quadrática (nm)
PC	4,527
PC + NTC	4,675
PC + CD	3,465
PC + CD + NTC	4,462
PC + 5% AIT	3,249
PC + 20% AIT	3,579
PC + 5% AIT + 0,1% NTC	2,602
PC + 35% AIT + 0,1% NTC	3,083
PC + 15% AIT encapsulado	3,556
PC + 35% AIT encapsulado	5,616
PC + 10% AIT encapsulado + 0,1% NTC	3,832
PC + 40% AIT encapsulado + 0,1% NTC	6,768

PC: polímero de celulose; NTC: nanotubo de carbono; CD: β- cicodextrina; AIT: alil isotiocianato; AIT encapsulado: AIT encapsulado em β- cicodextrina

O filme de base celulósica apresentou superfície áspera e valor de rugosidade média quadrática (rmq) de 4,527 nm, o que é coerente com resultados previamente relatados por Xu et al. (2009), que encontraram valores de rqm para substratos de celulose de 4,691 nm. Já Amim Júnior et al. (2009) estudaram propriedades de superfície de filmes de acetato propionato de celulose e acetato butirato de celulose e relataram valores médios de rqm inferiores a 0,9 nm, indicando a formação de topografias muito lisas.

A rugosidade encontrada para os demais filmes variou de 2,602 a 6,768 nm, tendo o maior valor sido observado para o filme com 40% de AIT encapsulado + NTC, indicando que ele apresenta topografia mais irregular, comparada à das demais superfícies. Isso confirma o revelado pela fotomicrografia deste filme obtida por MEV, que mostrou estrutura diferenciada, quando comparada com as imagens dos demais filmes.

Nas Figuras de 9 a 11 observam-se as fotomicrografias dos filmes em três dimensões, obtidas por microscopia de força atômica com o fundo de escala.

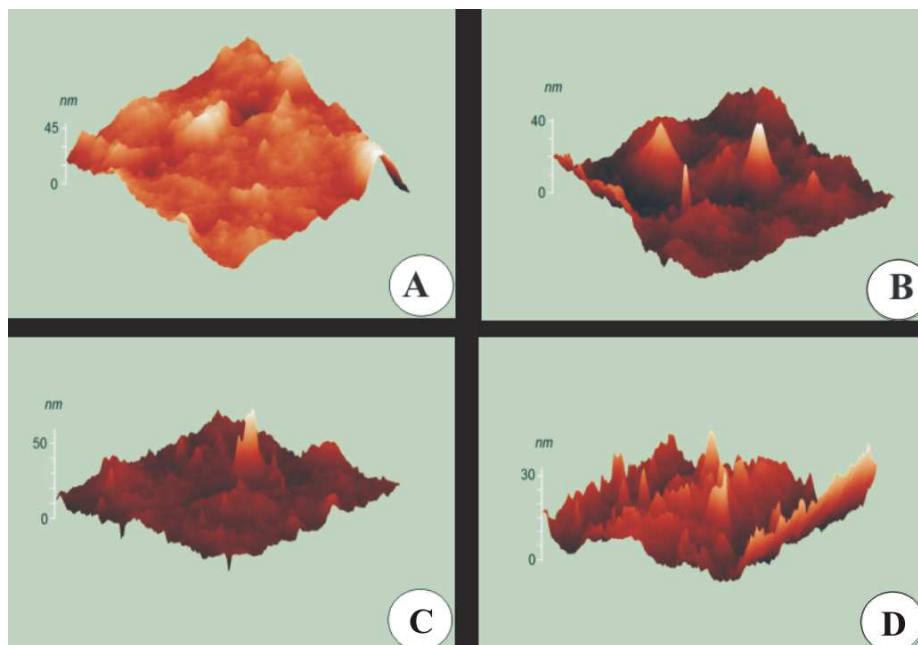


FIGURA 9 Imagens obtidas por microscopia de força atômica da estrutura dos filmes de base celulósica (A); base celulósica + nanotubo de carbono (B); base celulósica + β -ciclodextrina (C) e base celulósica + β -ciclodextrina + nanotubo de carbono (D).

Com o uso de microscopia de força atômica constata-se que mesmo as regiões mais homogêneas dos filmes não são tão regulares quanto aparentam. Entretanto, esta característica de topografia irregular é comum nos filmes, quando analisados em escala nanométrica (Assis & Silva, 2003).

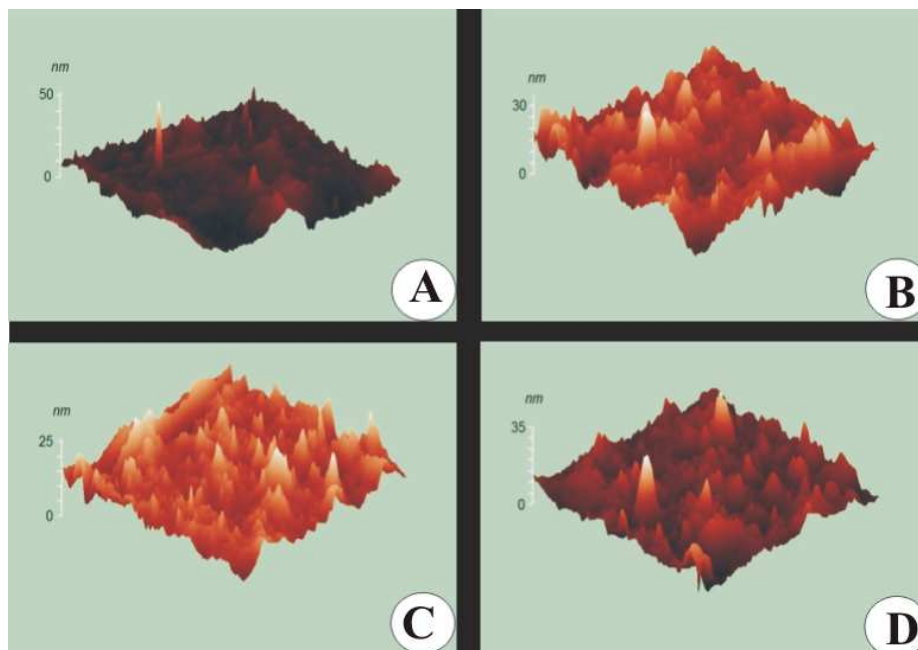


FIGURA 10 Imagens obtidas por microscopia de força atômica da estrutura dos filmes incorporados com AIT não encapsulados: 5% AIT (A); 20% AIT (B); 5% AIT + NTC (C) e 35% AIT + NTC (D).

Uma superfície lisa na microscopia eletrônica de varredura (MEV) torna-se aparentemente mais irregular, contendo falhas ou “buracos”, configurando uma estrutura do tipo “montanhas e vales” na microscopia de força atômica. Tal comportamento pode estar relacionado à evaporação do solvente utilizado, o que não foi detectado na MEV.

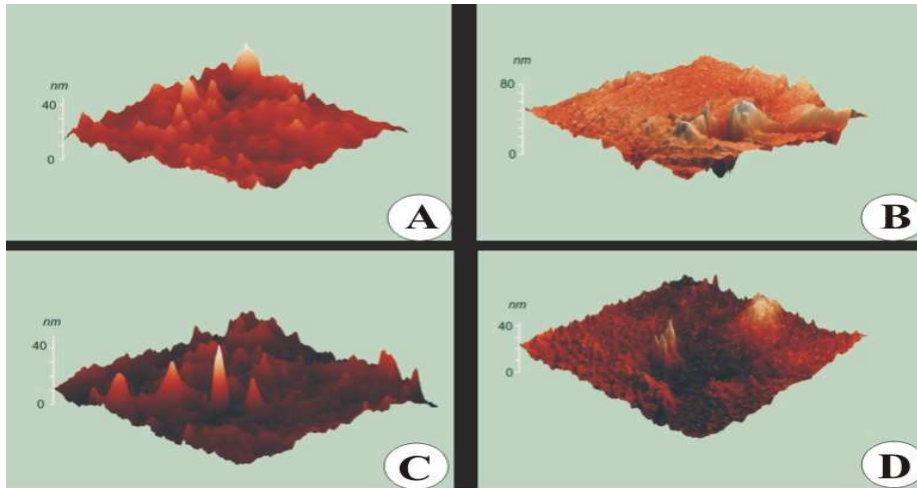


FIGURA 11 Imagens obtidas por microscopia de força atômica da estrutura dos filmes incorporados com AIT encapsulados: 15% AIT encapsulado (A); 35% AIT encapsulado (B); 10% AIT encapsulado + NTC (C); 40% AIT encapsulado + NTC (D).

Na Figura 12 têm-se as fotomicrografias dos filmes de base celulósica em três dimensões, obtidas por microscopia de força atômica em varreduras de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ e $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ (vetores x e y) e também fundo de escala. Essas imagens são representativas para as imagens dos demais filmes.

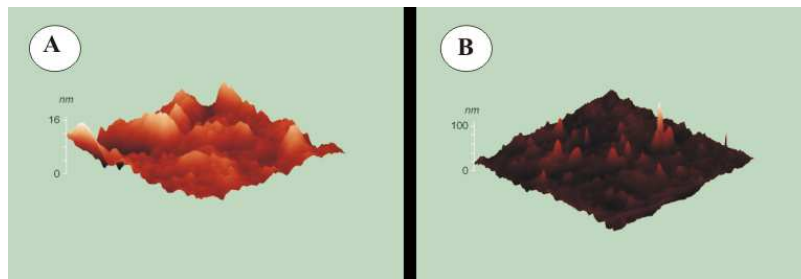


FIGURA 12 Fotomicrografias dos polímeros celulósicos em varreduras de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ (A) e $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ (B), obtidas por microscopia de força atômica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados analisados sugerem que o desenvolvimento de filmes incorporados com AIT é possível e que sua retenção pode ser obtida com o processo de encapsulamento com β -ciclodextrina e ou uso de nanotubo de carbono (NTC). Conclui-se que os agentes encapsulantes provocaram alterações estruturais nos filmes, porém, isso não prejudicou a ação antimicrobiana destes sobre os microrganismos estudados. O AIT causou danos na parede celular, induzindo ao vazamento citoplasmático dos microrganismos. As embalagens antimicrobianas inibiram o crescimento *in vitro* de *Listeria innocua* e *Salmonella Choleraesuis*, tanto em contato direto como por volatilização, apresentando grande potencial como embalagens antimicrobianas na conservação de alimentos, pois são compostos naturais e, portanto, mais aceitos pelos consumidores em comparação com o uso de compostos químicos sintéticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIM JÚNIOR, J.; KOSAKA, P. M.; PETRI, D. F. S.; MAIA, F. C. B.; MIRANDA, P. B. Stability and interface properties of thin cellulose ester films adsorbed from acetone and ethyl acetate solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 332, n. 2, p. 477-483, Apr. 2009.
- ANDREWS-POLYMENIS, H. L.; SANTIVIAGO, C. A.; MCCLELLAND, M. Novel genetic tools for studying food-borne *Salmonella*. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 2, p. 149-157, Apr. 2009.
- ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. da. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- AZEREDO, H. M. C. Review nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, Nov. 2009.
- BAO, S. P.; TJONG, S. C. Mechanical behaviors of polypropylene/carbon nanotube nanocomposites: the effects of loading rate and temperature. **Materials Science and Engineering A**, Lausanne, v. 485, n. 1/2, p. 508-516, June 2008.
- BECERRIL, R.; GÓMEZ-LUS, R.; GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; NERÍN, C. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 388, n. 5/6, p. 1003-1011, July 2007.
- BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAMA, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G. T.; WIJNHOFEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 53, n. 1, p. 52-62, **Fev.** 2009.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CHACON, P. A.; BUFFO, R. A.; HOLLEY, R. A. Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 231-237, Apr. 2006.

GUIGA, W.; GALLAND, S.; PEYROL, E.; DEGRAEVE, P.; CARNET-PANTIEZ, A.; SEBTI, I. Antimicrobial plastic film: physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. **Innovative Food Science and Emerging Technologie**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 203-207, Apr. 2009.

HAMBLETON, A.; FABRA, M-J.; DEBEAUFORT, F.; DURY-BRUN, C.; VOILLEY, A. Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion-based films used for encapsulation of active food compounds. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 93, n. 1, p. 80-88, July 2009.

HARAKEH, S.; YASSINE, H.; GHARIOS, M.; BARBOUR, E.; HAJJAR, S.; EL-FADEL, M.; TOUFEILI, I.; TANNOUS, R. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from meat-based fast food in Lebanon. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 341, n. 1/3, p. 33-44, Apr. 2005.

ISSHIKI, K.; TOKUOKA, K.; MORI, R.; CHIBA, S. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S.l.], v. 56, n. 9, p. 1476-1477, 1992.

LIANG, S.; WANG, K.; CHEN, D.; ZHANG, Q.; DU, R.; FU, Q. Shear enhanced interfacial interaction between carbon nanotubes and polyethylene and formation of nanohybrid shish-kebabs. **Polymer**, Berlin, v. 49, n. 23, p. 4925-4929, Oct. 2008.

LIM, L. T.; TUNG, M. A. Vapor pressure of allyl isothiocyanate and its transport in PVDC/PV copolymer packaging film. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, p. 1061-1066, 1997.

LIN, C. M.; PRESTON, J. F.; WEI, C. I. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 6, p. 727-734, June 2000.

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 17, p. 6939-6946, 2005.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro**. 2009. 93 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LUCIANO, F. B.; HOLLEY, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2/3, p. 240-245, May 2009.

MAISNIER-PATIN, S.; RICHARD, J. Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 29-35, June 1996.

MIKO, A.; PRIES, K.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, n. 6, p. 1025-1033, 2005.

OLIVEIRA, T. M.; SOARES, N. D. F. F.; PEREIRA, R. M.; FAGA, K. D. F. Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in Gorgonzola cheese conservation. **Packaging Technology and Science**, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 147-153, Oct. 2007.

NADARAJAH, D.; HAN, J. H.; HOLLEY, R. A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 269-279, Apr. 2005a.

NADARAJAH, D.; HAN, J. H.; HOLLEY, R. A. Use of mustard flour to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 257-267, 2005b.

NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 219-229, 2000.

NORIEGA, E.; LACA, A.; DÍAZ, M. Modelling of diffusion-limited growth to predict *Listeria* distribution in structured model foods. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 87, n. 2, p. 247-256, 2008.

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. A. L. V. Revisão: principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 161-165, 2004.

PERNI, S.; JORDAN, S. J.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 11, p. 875-883, 2006.

PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S.; PAULA, J. C. J.; SOBRAL, D.; MAGALHÃES, F. A. R. Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 12, p. 1167-1170, 2009.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packging Technology and Science**, **Inglaterra**, v. 21, n. 7, p. 375-383, Apr. 2008.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 8, p. 859-865, 2005.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. **International Society for Infectious Diseases**, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 236-241, 2006.

RHEE, M. S.; DOUGHERTY, R. H.; KANG, D. H. Combined effects of mustard flour, acetic acid, and salt against *Escherichia coli* O157:H7 stored at 5 and 22°C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 10, p. 1632-1635, 2002.

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

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. F.; NÓBREGA, J. E.; WANDERLEI JÚNIOR, M. A.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; WÜRLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 1, p. 85-89, Jan. 2009.

SOARES, N. F. F. **Bitterness reduction in citrus juice through nariginase immobilized into polymer film**. 1998. 130 p. Dissertation (Ph.D in Food of Science) – Cornell University, New York.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 84-95, 2007.

UPADHYAYULA, V. K. K.; DENG, S.; MITCHELL, M. C.; SMITH, G. B. Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: a review. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 1, p. 1-13, 2009.

VARTIAINEN, J.; SKYTÄ, E.; AHVENAINEN-RANTALA, R.; ENQVIST, J. Antimicrobial and barrier properties of LDPE films containing imazalil and EDTA. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 249-261, 2003.

VAZ-VELHO, M.; FONSECA, F.; SILVA, M.; GIBBS, P. Is *Listeria innocua* 2030c, a tetracycline-resistant strain, a suitable marker for replacing *L. monocytogenes* in challenge studies with cold-smoked fish? **Food Control**, Guildford, v. 12, n. 6, p. 361-364, 2001.

VEGA-LUGO, A. C.; LIM, L. T. Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 8, p. 933-940, 2009.

XU, Y.; YIN, H.; YUAN, S.; CHEN, Z. Film morphology and orientation of amino silicone adsorbed onto cellulose substrate. **Applied Surface Science**, [S.l.], v. 255, n. 20, p. 8435-8442, 2009.

ZHANG, Q. F.; JIANG, Z. T.; LI, R. Complexation of allyl isothiocyanate with β -cyclodextrin and its derivatives and molecular microcapsule of allyl isothiocyanate in β -cyclodextrin. **European Food Research and Technology**, [S.l.], v. 225, n. 3/4, p. 407-413, 2007.

CAPÍTULO 2: Aplicação de embalagem antimicrobiana em carne de frango cozida e desfiada

1 RESUMO

O princípio de atuação de embalagem antimicrobiana é a adição de uma barreira microbiológica às tradicionais barreiras físicas de oxigênio e umidade por meio da liberação de aditivos, permitindo o aumento da validade e da segurança do produto. Com o objetivo de aumentar a vida de prateleira de produtos cárneos, desenvolveram-se embalagens antimicrobianas incorporadas com alil isotiocianato (AIT) e nanotubo de carbono (NTC), aplicando-as em carne de frango cozida e desfiada inoculada com *Salmonella Choleraesuis*. Analisaram-se, durante 40 dias de estocagem, a redução na contagem microbiológica, as características de cor e oxidação e também as alterações nas propriedades mecânicas, estrutural e difusão do antimicrobiano do filme para o alimento. Diante dos resultados, recomenda-se a utilização de AIT em concentrações superiores a 28%, combinada com concentrações superiores a 0,02% de NTC para se conseguir redução microbiológica, controle de oxidação e redução nas alterações de cor, considerando que esses dois fatores estudados (AIT e NTC), não influenciaram as características mecânicas dos filmes. Essas embalagens foram eficientes durante 40 dias de estocagem, pois permitiram a difusão do AIT do filme para o frango, representando grande potencial de aplicação em produtos cárneos.

Palavras-chave: embalagem antimicrobiana, *Salmonella Choleraesuis*, carne de frango cozida e desfiada

2 ABSTRACT

The operational principle of antimicrobial packaging is the addition of a microbiological barrier to the traditional physical barriers of oxygen and humidity through the liberation of additives, allowing the increase of the product validity and safety. With the objective of increasing the shelf-life of meat products, antimicrobial packaging incorporated with allyl isothiocyanate (AIT) and carbon nanotubes (CNT) were developed, applying them on cooked, shredded chicken meat inoculated with *Salmonella Choleraesuis*. The reduction of the microbiological count, the color and oxidation characteristics and also the alterations in the mechanical and structural properties, plus the antimicrobial diffusion properties from the film to the food, during 40 days of storage were analysed. Based on the results, the use of AIT is recommended in concentrations above 28%, combined with concentrations over 0.02% of NTC to achieve microbiological reduction, oxidation control and reduction in the color alterations, considering that those two studied factors (AIT and CNT), did not influence the mechanical characteristics of the films. Those packagings were efficient for 40 days of storage, because they allowed the diffusion of AIT from the film to the chicken, representing a high application potential for meat products.

Keywords: antimicrobial packaging, *Salmonella Choleraesuis*, cooked shredded chicken meat

3 INTRODUÇÃO

Vida de prateleira dos alimentos refrigerados é determinada, principalmente, pela qualidade microbiológica e pelas propriedades físicas durante o armazenamento e o manuseio. O aumento da vida de prateleira do produto pode ter um impacto econômico importante, reduzindo as perdas atribuídas à deterioração e permitindo que os produtos atinjam mercados distantes e novos. A demanda dos consumidores está orientada para os alimentos que são "naturais" e isentos de aditivos, mas, ainda assim, seguros e convenientes para o consumo (Kim & Marshall, 1999).

As tendências modernas para atingir a qualidade e a segurança dos alimentos incluem a aplicação da tecnologia de barreiras e o uso dos conservantes naturais, a fim de manter o processamento mínimo (Chouliara et al., 2007). O uso da tecnologia de embalagem adequada para minimizar as perdas de alimentos e fornecimento de produtos seguros e saudáveis também tem sido utilizada. Filmes de polímeros naturais incorporados com compostos antimicrobianos têm despertado interesse, pois, além de reduzir o impacto sobre o meio ambiente, proporciona, de maneira saudável e eficaz, segurança aos alimentos (Mitsumoto et al., 2005). Várias substâncias, como ácidos orgânicos, extratos de temperos, óleos essenciais e isotiocianatos já foram incorporados em materiais de embalagens e testados *in vitro* e em alimentos, apresentando atividade antimicrobiana sobre microrganismos deterioradores e patogênicos (Lemay et al., 2002; Vartiainen et al., 2003; Becerril et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Pires et al., 2008; Santiago-Silva et al., 2009; Guiga et al., 2009).

O princípio de atuação desse tipo de embalagem é a adição de uma barreira microbiológica às tradicionais barreiras físicas de oxigênio e umidade (Han, 2003) por meio da liberação de aditivos, aumentando a segurança do consumidor, já que esses compostos, em vez de serem adicionados diretamente

ao alimento, são liberados de maneira controlada e, por isso, estão presentes em menores quantidades (Appendini & Hotchkiss, 2002).

Materiais de embalagens antimicrobianas desenvolvidas até agora têm mostrado efeito contra vários microrganismos, principalmente em condições laboratoriais, pois, em contato direto com gêneros alimentícios, perdem grande parte da sua atividade (Vartiainen et al., 2003). Os maiores desafios dessas embalagens têm sido a estabilidade térmica, a eficácia a baixas temperaturas e o atendimento às exigências legais (Brody et al., 2001), além de manter ou melhorar as propriedades físicas, mecânicas e a maquinabilidade dos filmes, que podem ser alteradas devido às substâncias adicionadas ao material de embalagem (Oliveira & Oliveira, 2004).

Considerando o fato de que as carnes de aves pertencem à classe de alimentos altamente perecíveis, a principal preocupação das indústrias é a extensão da vida de prateleira desses produtos. Além da segurança microbiológica, cor e estabilidade lipídica em carnes são importantes características de qualidade que influenciam na aceitação do produto pelos consumidores. Carnes picadas sofrem mudanças oxidativas e desenvolvem ranço mais rapidamente do que o músculo intacto, pois a moagem expõe mais a superfície do músculo ao ar e à contaminação microbiana (Mitsumoto et al., 2005).

Isotiocianato é um dos principais compostos antimicrobianos isolados de extratos de planta (Lemay et al., 2002). Estudos têm demonstrado que alil isotiocianato (AIT), um composto sulfurado, volátil, alifático e com grande instabilidade química a altas temperaturas e em sistemas aquosos apresenta propriedades antioxidantes e microbiológicas, inibindo uma variedade de patógenos a baixas concentrações (Lemay et al., 2002; Nadarajah et al., 2005a,b; Luciano & Holley, 2009; Wang et al., 2010).

O AIT de fontes naturais é permitido para uso como conservante de alimentos no Japão, sendo classificado como seguro pelo órgão de Administração de Drogas e Alimentos (Food and Drug Administration – FDA) dos Estados Unidos (Nadarajah et al., 2005b) e, por isso, há grande interesse em utilizar este antimicrobiano em vários sistemas alimentares.

AIT pode ser um valioso tratamento secundário para a redução de patógenos durante a distribuição de produtos cárneos congelados (Nadarajah et al., 2005a). Entretanto, alguns autores têm citado que os constituintes da carne podem diminuir a atividade antimicrobiana do AIT, por este reagir com tióis, grupos sulfídricos e aminoácidos livres de proteínas, acelerando seu esgotamento na carne (Nadarajah et al., 2005a,b). Outro fator importante que pode afetar a atividade antimicrobiana do AIT é a sua solubilidade em ácidos graxos da carne. Sabe-se também que reações espontâneas de degradação envolvendo íons hidróxido e ataque nucleofílico por água (Chen & Ho, 1998) e adsorção do antimicrobiano pelo material de embalagem (Lim & Tung, 1997; Nadarajah et al., 2005a) têm sido relatadas como responsáveis pela redução da estabilidade do AIT. Além disso, a gordura dos alimentos pode fornecer uma camada protetora em torno das bactérias contaminantes ou, eventualmente, absorver a parte lipofílica do AIT e reduzir a sua eficácia no produto (Chacon et al., 2006).

Nadarajah et al. (2005a,b) não observaram redução na contagem de mesófilos em carne bovina tratada com AIT. Chacon et al. (2006) observaram redução na contagem de *E. coli* O157:H7 em carne bovina devido à liberação contínua de AIT encapsulado em goma acácia durante a estocagem. Nadarajah et al. (2005b) observaram que níveis entre 5% e 10% de farinha de mostarda foram suficientes para eliminar *E. coli* O157:H7 de carne moída fresca contaminada com 10 Log UFC·g⁻¹. Estes autores perceberam também, por meio de análise sensorial, que, em quantidades superiores a 10% de farinha, os provadores

distinguiram o controle dos tratamentos, embora a carne tratada com farinha de mostarda tenha sido mais aceita.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar embalagem antimicrobiana contendo AIT e NTC na vida útil de carne cozida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Embalagens, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

4.1 Desenvolvimento dos filmes

Os filmes antimicrobianos de base celulósica foram obtidos segundo a técnica de *casting*, de acordo com a metodologia descrita por Soares (1998), que consiste na preparação da solução filmogênica e na aplicação da mesma em um suporte/molde com o auxílio de máquina *casting* (K Paint applicator) com posterior evaporação do solvente. O antimicrobiano utilizado foi o alil-isotiocianato (AIT – Sigma Aldrich) incorporado, encapsulado ou não, em uma faixa de concentração de 20% a 60% (v/p). O encapsulamento do AIT foi conduzido segundo método citado por Zhang et al. (2007) que consiste, basicamente, de uma solução de etanol com β -ciclodextrina (CD) e AIT agitados em banho de gelo por 6 horas e posterior filtração em papel filtro. Adicionou-se também ao filme nanocomposto nanotubo de carbono (NTC - Ahwahree Technogy) na faixa de 0% a 0,1% (p/p) em relação ao peso do polímero de celulose (PC).

4.2 Taxa de transmissão ao vapor de água e espessura

A espessura dos filmes foi medida por meio da leitura em dez pontos distintos, utilizando micrômetro manual Mitutoyo (precisão 0.01 mm; Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil).

A taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, segundo a metodologia ASTM E 96-00 (American Society Standard Testing and Materials – ASTM, 2000), com algumas modificações. Utilizaram-se cápsulas circulares ($\varnothing = 85$ mm), com

paredes impermeáveis, contendo 25 g de cloreto de cálcio anidro, granulometria entre 0,006 e 2,36 mm, sendo os filmes vedados na junção filme/cápsula com auxílio de parafina. Após a montagem das cápsulas, estas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio em seu interior, de forma a manter a umidade relativa de 75%. Por meio de pesagens diárias até peso constante, avaliou-se o ganho de peso associado à umidade permeada pelo filme. Os dados de ganho de peso e tempo foram representados em gráfico e, a partir do período em que os pontos formaram uma reta, foi calculado o ganho de peso por dia, sendo, então, convertida para a unidade relativa à taxa de transmissão ao vapor de água ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$).

Para estas análises foram estudados três fatores. O primeiro se referiu à concentração de AIT (20 a 60% v/p) e o segundo, ao teor de NTC (0% a 0,1% p/p), sendo ambos em relação ao polímero de celulose. O terceiro fator foi o AIT encapsulado e não encapsulado, representados por 0 e 1, respectivamente. Para a definição da combinação dos níveis dos dois primeiros fatores foi utilizado o delineamento composto central, sendo as combinações ensaiadas na presença de AIT encapsulado e não encapsulado. A combinação de 40% de AIT e 0,05% de NTC, tanto para filmes encapsulados como não encapsulados (ponto central), foi realizada com 4 repetições. Na Tabela 1 apresentam-se as combinações entre os níveis de AIT e NTC.

TABELA 1 Matriz de experimentos para análise de taxa de transmissão ao vapor de água e espessura

AIT (%)	NTC (%)
26	0,02
54	0,02
26	0,08
54	0,05
20	0,05
60	0
40	0,10
40	0,05
40	0,05
40	0,05
40	0,05

4.3 Experimento carne de frango cozida e desfiada embalada em filmes antimicrobianos

Diante dos resultados apresentados no capítulo anterior, optou-se por continuar os estudos com *Salmonella Choleraesuis*, por ter sido este o microrganismo que apresentou melhor resultado *in vitro*. Definiu-se o nível inferior de antimicrobiano a ser adicionado nos filmes (20%) de acordo com o valor de concentração mínima inibitória (CMI) por volatilização, encontrado para este microrganismo. Os filmes incorporados com alil isotiocianato não encapsulado e nanotubo de carbono foram selecionados para aplicação em carne de frango cozida e desfiada.

4.3.1 Planejamento experimental

Foi realizado um delineamento composto central com três fatores: os fatores valor do antimicrobiano AIT (20% a 60% v/p), o teor de nanotubo de carbono (NTC) adicionado no filme (0% a 0,1% p/p) e o tempo de análise que foi de 2 a 40 dias para o experimento de frango cozido e desfiado inoculado com

Salmonella Choleraesuis embalado em filmes antimicrobianos. Na Tabela 2 encontram-se os ensaios que foram delineados utilizando-se o software Minitab.

Foi feito um controle (filme sem antimicrobiano em contato com frango contaminado) para avaliar a eficácia deste filme.

TABELA 2 Matriz de experimentos do delineamento composto central

Ensaio	a (AIT %)	b (NTC %)	c (Tempo)
1	28	0,02	10
2	52	0,02	10
3	28	0,08	10
4	52	0,08	10
5	28	0,02	32
6	52	0,02	32
7	58	0,08	32
8	52	0,08	32
9	20	0,05	21
10	60	0,05	21
11	40	0,00	21
12	40	0,10	21
13	40	0,05	2
14	40	0,05	40
15	40	0,05	21
16	40	0,05	21
17	40	0,05	21

a, b, c = variáveis independentes

4.3.2 Desenvolvimento dos filmes

Os filmes antimicrobianos de base celulósica foram obtidos segundo metodologia citada anteriormente (item 2.1).

4.3.3 Preparo do frango cozido e desfiado

O peito de frango foi cozido, por 10 minutos, em evaporador de tacho aberto encamisado e, posteriormente, desfiado, manualmente, com o auxílio de utensílios previamente esterilizados em água clorada (200 ppm, por 20 minutos). Para confirmar a esterilização, realizou-se a detecção de *Salmonella* sp. segundo

normas da American Public Health Association – APHA (2001) e contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e psicrotróficos (Brasil, 2003). O resultado apresentou ausência de *Salmonella* sp. em 25 g e contagem inicial $<1 \times 10^1 \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, estimado para mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e psicrotróficos.

4.3.4 Ativação e inoculação do frango cozido e desfiado

Salmonella Choleraesuis (ATCC 6539) foi ativada duas vezes consecutivas em TSB (Tryptic Soy Agar - Merk) e incubada, a 35°C, por 24 horas. Após incubação, as bactérias foram centrifugadas, a 3.783 g, por 5 minutos, a 5°C (Centrifuge 4K-15, Sigma, USA). Os pellets celulares foram lavados com água peptonada 0,1% e novamente centrifugados nas mesmas condições. As culturas foram ressuspensas em água peptonada e diluídas a uma absorbância de 0,3 a 600 nm, determinada por espectrofotômetro (GBC, UV/VIS 918, Shimadzu, Japão), o que equivale a uma contagem de 8 log UFC·mL⁻¹. Primeiramente, o inóculo foi diluído para 7 Log UFC·mL⁻¹ e, na proporção de 160 mL para 8,0 kg de carne, foi adicionado e homogeneizado por 10 minutos, resultando, dessa maneira, em uma contagem de *Salmonella* Choleraesuis de 5,3 Log UFC·mL⁻¹ no frango cozido desfiado (Nadarajah et al., 2005b).

4.3.5 Acondicionamento de frango cozido desfiado em embalagens antimicrobianas

Frango cozido e desfiado inoculado foi embalado (aproximadamente 100 g por embalagem) nos filmes antimicrobianos (embalagem primária) que foram envolvidos em papel manteiga e acondicionados em sacos plásticos de PE/náilon. As embalagens foram seladas e armazenadas em geladeira, a 8±2°C.

4.3.6 Análises das embalagens

Para a análise mecânica, liberação de AIT e espectroscopia na região do infravermelho, utilizaram-se as embalagens antimicrobianas empregadas para o acondicionamento da carne de frango cozida e desfiada.

4.3.6.1 Avaliação das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando-se o teste de tração por meio do Aparelho Universal de Teste (Instron – modelo 3367, USA), com célula de carga de 1kN, velocidade e distância de separação entre as garras de 12,5 mm.min⁻¹ e 125 mm, respectivamente. Para cada filme, foram analisadas cinco amostras com dimensões de 25 mm x 175 mm (ASTM, 2002). Foram analisados os parâmetros carga máxima (N), módulo de elasticidade (MPa) e tensão na ruptura (MPa).

4.3.6.2 Liberação de AIT

Para quantificar o AIT liberado pelos filmes desenvolvidos, uma amostra de 90 cm² foi colocada em vial de 10 mL e submetida a um aquecimento de 40°C, por 5 minutos, para acelerar liberação de AIT presente no filme. Para quantificar o AIT nessas amostras, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (GC/MS – QP 5050, coluna DB5, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) por meio da metodologia descrita por Nadarajah et al. (2005a). Uma alíquota de 10 µl foi retirada do espaço livre com auxílio de uma seringa *gastight* (Hamilton®) e injetada automaticamente (injetor automático AOC-5000, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) no cromatógrafo. Depois da injeção da amostra, as condições de operação do GC-MS foram as seguintes: temperatura inicial da coluna de 60°C, mantida durante 2 minutos, aumento para 90°C à taxa de 12,5°C.min⁻¹, mantendo-se por 45 segundos a 90°C. A temperatura

do injetor foi de 250°C e gás hélio foi utilizado como gás de arraste, ao fluxo de 1 mL.min⁻¹. O resultado foi expresso em mg de AIT/100mL.

Para quantificar o AIT, uma curva padrão com diferentes concentrações conhecidas do antimicrobiano foi obtida com o tempo de retenção de 3,45 minutos.

4.3.6.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Para avaliação do comportamento dos grupos químicos isotiocianatos presentes nos filmes durante o acondicionamento do frango, foram obtidos espectros na região do infravermelho por um espectrômetro Thermo Nicolet IR200 (Thermo Nicolet Corporation, EUA) no modo de transmissão. A faixa de análise foi de 4.000 a 400 cm⁻¹ e um total de 32 varreduras (*scans*) foi realizado por amostra.

Segundo Lieber et al. (1959), tiocianatos e isotiocianatos, que são as substâncias presentes no óleo essencial de mostarda, (Lemay et al., 2002) possuem frequências de vibração característica em torno de 2.140 cm⁻¹ e entre 2.060-2.105 cm⁻¹, respectivamente.

4.3.7 Análises da carne de frango cozida e desfiada

4.3.7.1 Medida da oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi medida pela análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) em duplicata. Para a execução da análise, utilizaram-se 5 g de cada amostra e adicionaram-se 0,5 mL de butil-hidroxitolueno (BHT) 0,15%, para prevenir a oxidação durante o preparo e 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, aguardando-se um tempo de contato de 15 a 20 minutos para que ocorresse a extração do malonaldeído (MDA). Para a homogeneização, utilizou-se homogeneizador vortex e, em seguida, a mistura foi filtrada através de funil e papel filtro para balões volumétricos de 25 mL e seu

volume completado com TCA 5%. Dessa solução foram retirados 2 mL, que reagiram com 2 mL de ácido tiobarbitúrico 0,08 M (TBA), sendo os tubos vedados, colocados em banho-maria fervente e deixados por 5 minutos após a temperatura da água ter atingido 95°C. O líquido resfriado foi centrifugado a 3.783g (Centrífuga 4K-15, Sigma[®], USA), durante cinco minutos e foi efetuada a leitura em espectrofotômetro (GBC, UV/ VIS 918, SHIMADZU, Japão), a 531 nm, contra um branco contendo todos os reagentes, exceto a amostra (Rotta, 2007).

O teor de malonaldeído na amostra (mg de MDA/1000 g de amostra) foi calculado utilizando-se a equação da curva padrão obtida por meio de 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP), cuja hidrólise ácida gera malonaldeído na proporção de 1:1 mol (Racanizzi, 2004).

4.3.7.2 Análise de cor

Medições de cor foram determinadas utilizando-se o colorímetro Color Quest XE Huber Lab no sistema CIELab operando com fonte iluminante D65 e ângulo de observação de 10°, em que foram avaliados os parâmetros L^* = luminosidade, a^* =intensidade de cor vermelha/verde, b^* = intensidade da cor amarela/azul, índice de saturação ($c^* = \text{raiz de } a^2 + b^2$), variação de saturação ($\Delta c^* = c^*_{amostra} - c^*_{padrão}$) e diferença global de cor ($\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$). A amostra utilizada como padrão foi o frango cozido no tempo zero.

4.3.7.3 Liberação de AIT

Para quantificar o AIT absorvido pelo frango embalado nos filmes antimicrobianos, 5 g de amostra foram colocadas em vial de 10 mL e submetidas a um aquecimento de 40°C, por 5 minutos, para acelerar a liberação de AIT. Para

quantificar o AIT nessas amostras, utilizou-se a mesma metodologia citada anteriormente no item 2.3.6.2.

Para esta análise, foi realizada correlação entre os valores de AIT liberado pelo filme e os valores de AIT absorvido pelo frango.

4.3.7.4 Análise microbiológica

Utilizou-se o meio *plate count Agar* (PCA) Difco[®], para a contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e psicrotróficos, e ágar melhorado *microme salmonella* (Himédia[®]), recomendado pela ISO 9001-2000 para a contagem de *Salmonella Choleraesuis*. Foram assepticamente coletados 25 g de frango cozido e desfiado e adicionado em 225 mL de água peptonada. A mistura foi homogeneizada, por 30 segundos, em Stomacher (ITR Ltd., Esteio, Rio Grande do Sul, Brasil) modelo 1240 e diluições seriadas foram feitas. Alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas nos meios de cultura, sendo as placas incubadas a 35°C, por 24 horas, para contagem de *Salmonella Choleraesuis* e mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e a 7±2°C, por 10 dias, para psicrotróficos. A leitura foi realizada selecionando-se as placas que continham de 25 a 250 colônias, sendo o resultado expresso em log UFC·g⁻¹ (Brasil, 2003).

4.4 Análise estatística

A superfície de resposta dos parâmetros analisados foi ajustada em função dos fatores estudados, cujos coeficientes foram testados pelo teste t, a 5% de probabilidade.

Para obter a superfície de resposta ajustada, foram retirados os efeitos não significativos, um de cada vez, começando pelo de maior dificuldade de interpretação. O modelo inicial, denominado de modelo completo, foi dado por:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 a_i + \beta_2 b_i + \beta_3 c_i + \beta_4 a_i^2 + \beta_5 b_i^2 + \beta_6 c_i^2 + \beta_7 a_i b_i + \beta_8 a_i c_i + \beta_9 b_i c_i + e_i;$$

em que a_i representa o valor do AIT na i -ésima observação ($20 \leq a_i \leq 60$), b_i o valor do NTC na i -ésima observação ($0 \leq b_i \leq 1$), $c_i = 0$ para filme com AIT não encapsulado e $c_i = 1$ para filme com AIT encapsulado para as análises de TTVA e espessura dos filmes. Para as demais análises do filme (análise mecânica e liberação de AIT) e da carne de frango cozida e desfiada (TBARS, análise de cor e liberação de AIT da carne de frango cozida e desfiada), c_i representou o valor do tempo ($2 \leq c_i \leq 40$).

Para a superfície de resposta ajustada foram estimados os coeficientes de determinação (R^2) e de variação residual (CV_{res}), como seguem, respectivamente:

$$R^2 = \frac{SQ_{Regressão}}{SQ_{Total}}$$

$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{QM_{Resíduo}}}{\bar{Y}}, \text{ em que:}$$

SQ regressão = soma de quadrados da regressão da análise de variância;

SQTotal = soma de quadrados total da análise de variância;

QM Resíduo = quadrado médio do resíduo puro da análise de variância;

\bar{Y} = média amostral da característica avaliada.

Para os parâmetros mais significativos, foram construídos gráficos de contorno.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Minitab 14.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Taxa de transmissão ao vapor de água e espessura

Não houve efeito ($P > 0,05$) da variável AIT na taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) e espessura, sendo as equações estimadas descritas na Tabela 3.

A variável AIT não influenciou ($P > 0,05$) e, portanto, em função da variável TTVA, pode-se utilizar qualquer concentração entre 20% e 60% (Tabela 3).

TABELA 3 Equações geradas para as variáveis TTVA e espessura, R^2 e CV (%)

Variáveis	Equação	R^2	CV
TTVA	$\hat{y}_i = 0,020655 - 0,002315 b - 0,003425 c + 0,111492^{\Delta} bc$	0,48	13,97
Espessura	$\hat{y}_i = 0,036667 + 0,174344^{\Delta} b + 0,005727^{\Delta} c$	0,49	12,73

^Δ Significativo, ao teste t ($P < 0,05$)

b:NTC: c: filme com AIT não encapsulado (0) ou filme com AIT encapsulado (1).

O efeito do NTC na variável TTVA foi diferenciado para cada tipo de filme. Para os filmes elaborados com AIT não encapsulado ($c = 0$), observa-se que a adição de NTC acarreta leve redução no valor de TTVA. Já para os filmes incorporados com AIT encapsulado ($c = 1$), a adição de NTC acarreta aumento na TTVA, de acordo com a Figura 1.

As diferenças de hidrofobicidade da estrutura polimérica determinam como as moléculas de água interagem com a matriz. A cavidade hidrofóbica da molécula de ciclodextrina fornece um microambiente favorável para o AIT; já a sua parte externa, de caráter hidrofílico, que fica em contato com a solução filmogênica, desempenha um papel na interação da estrutura polimérica com as moléculas de água, aumentando assim a taxa de transmissão de vapor de água

que depende da difusividade e da solubilidade da molécula de água na matriz (Vega-Lugo & Lim, 2009).

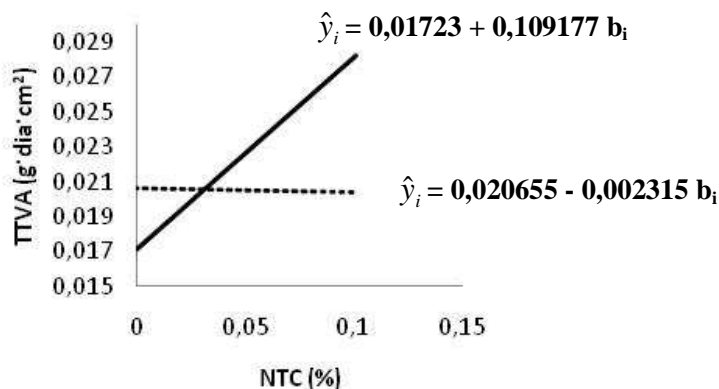


FIGURA 1 Efeito da adição de NTC na taxa de permeabilidade ao vapor de água para os filmes com AIT encapsulado (–) e não encapsulado (---).

Rao & Diwan (1997) avaliaram filmes de acetato de celulose elaborados com diferentes plastificantes e encontraram de 0,007 a 0,026 g·cm⁻¹·dia⁻¹ de TTVA em umidade relativa de 84% e entre 0,006 e 0,014 g·cm⁻¹·dia⁻¹ em 52% de UR, valores intermediários aos encontrados neste trabalho.

A variável espessura é influenciada positivamente pelo NTC, ou seja, o aumento desse fator implica em aumento linear na espessura, tanto para os filmes com AIT encapsulado quanto para os filmes com AIT não encapsulado. Este comportamento pode ser verificado na Figura 2.

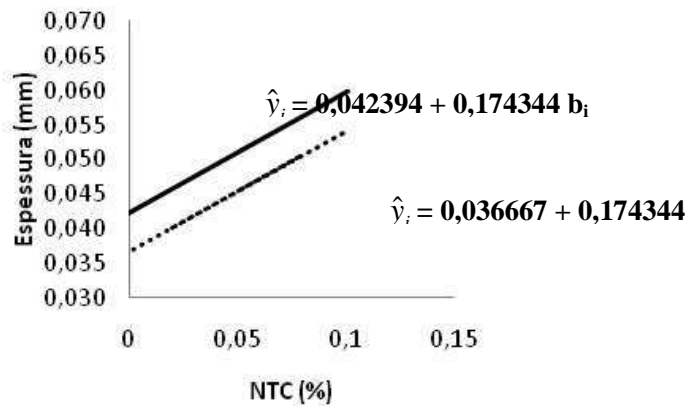


FIGURA 2 Efeito da adição de NTC na espessura para os filmes com AIT encapsulado (–) e não encapsulado (---).

Resultados semelhantes foram encontrados por Cho et al. (2009), que desenvolveram filmes homogêneos de NTC utilizando deposição eletroforética (*electrophoretic deposition*) e perceberam que a espessura correlaciona-se linearmente com a concentração de NTC na suspensão utilizada.

5.2 Análises das embalagens

5.2.1 Avaliação das propriedades mecânicas

Para os parâmetros carga máxima (CM), módulo de elasticidade (E) e tensão na ruptura (TR), somente o fator tempo foi significativo (Tabela 4). Os constituintes do frango (água, gordura), possivelmente, agiram como plastificantes em contato com o filme, proporcionando o aumento da resistência e da elasticidade do filme. A variável E apresentou grau de explicação bastante baixo, o que sugere o estudo de outras variáveis, além da variável tempo, para ajudar em estimativas melhores.

TABELA 4 Equações geradas para as variáveis mecânicas, em função dos fatores estudados, R², CV

Variável	Equação de regressão	R ²	CV (%)
Carga máxima (N)	$\hat{y}_i = 29,5048 + 0,3728^{\Delta} c$	0,51	4,82
Módulo de elasticidade (MPA)	$\hat{y}_i = 2027,70 + 18,64^{\Delta} c$	0,24	6,90
Tensão na ruptura (MPA)	$\hat{y}_i = 26,2853 + 0,4814^{\Delta} c$	0,59	6,23

^Δ Significativo, ao teste t (P < 0,05)

c: Tempo.

A dispersão uniforme das nanopartículas leva a uma matriz de grande área interfacial, que muda a mobilidade molecular, o comportamento de relaxamento e, conseqüentemente, as propriedades térmica e mecânica do material (Azeredo, 2009).

Bao & Tjong (2008), adicionando nanotubo de carbono em matriz de polipropileno, perceberam um aumento na elasticidade dos nanocompósitos. Liang et al. (2008) incorporaram NTC em matriz de polietileno e observaram um aumento na elasticidade e força em até 10,5 MPa e 18,5 MPa, respectivamente, pela adição de 0,5% em peso de nanotubo de carbono.

Santiago-Silva et al. (2009) adicionaram pediocina a filmes de base celulósica na concentração de 25% e perceberam aumento na força necessária à ruptura do filme em relação ao controle, indicando uma possível interação entre pediocina e a matriz de celulose, que se tornou mais rígida. No entanto, na concentração de 50%, possivelmente houve um excesso de pediocina incorporada, enfraquecendo as cadeias de celulose.

Pires et al. (2008), analisando filmes celulósicos incorporados com antimicrobianos naturais (natamicina e/ou nisina), encontraram valores de carga máxima de 93,86N e deformação de 4,54% para o filme controle (sem antimicrobiano) e valores inferiores para os filmes antimicrobianos, indicando que o antimicrobiano utilizado afetou a estrutura polimérica.

Já neste trabalho, a adição de AIT e NTC não interferiu nas características mecânicas dos filmes, já que o filme de base celulósica (controle) teve comportamento semelhante aos dos demais filmes, ou seja, tendência de as características mecânicas aumentarem em função do tempo (Figura 3).

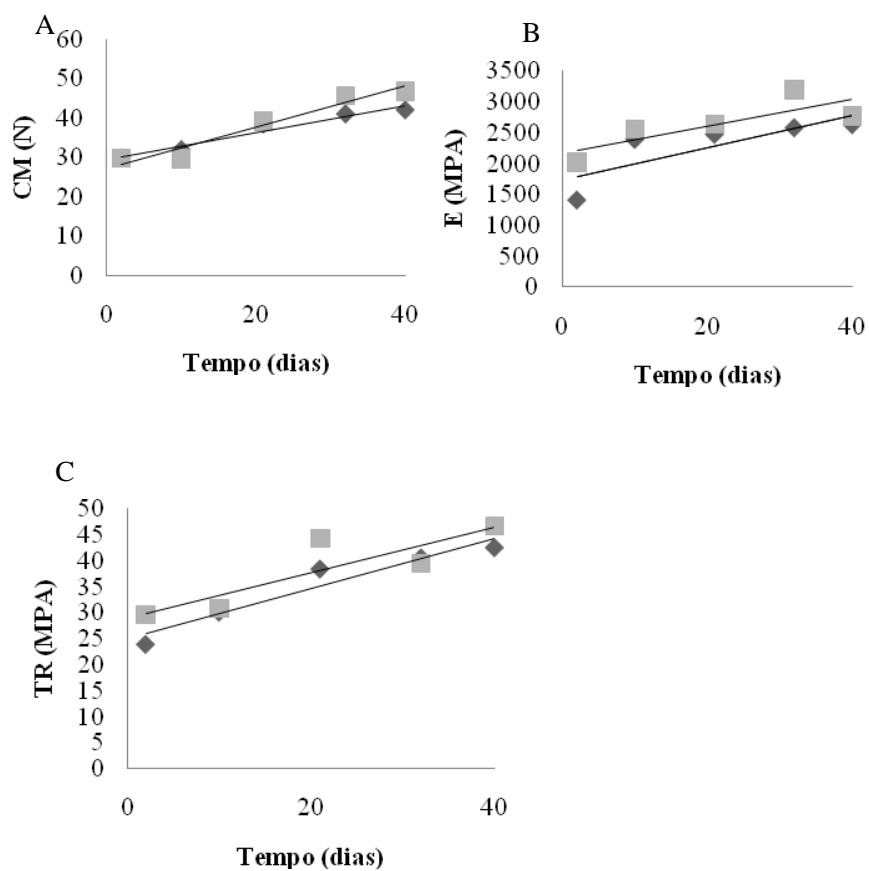


FIGURA 3 Média dos parâmetros carga máxima (A), módulo de elasticidade (B) e tensão na ruptura (C) para os filmes: (-■-) antimicrobianos, (-◆-) base celulósica (controle) ao longo do tempo e linhas de tendência (-).

5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Por meio dos espectros obtidos pela análise de espectroscopia na região do infravermelho, pode-se observar a diferença de concentração de AIT dos filmes entre os diferentes tempos. De maneira geral, todos os tratamentos apresentaram maior concentração de AIT (maior área) no tempo 0 e, gradualmente, apresentaram redução na área dos picos correspondentes ao antimicrobiano. Esse comportamento indica que o AIT está difundido no filme. Na Figura 4 tem-se o espectro do filme incorporado com 40% de AIT e 0,05% de NTC, nos diferentes tempos.

Shofran et al. (1998) testaram a ação antimicrobiana de alil tiocianato com relação a várias espécies de bactérias e encontraram concentração mínima inibitória de 200 a 400 ppm, para *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*, indicando que ele apresenta efeito antimicrobiano, assim como o AIT.

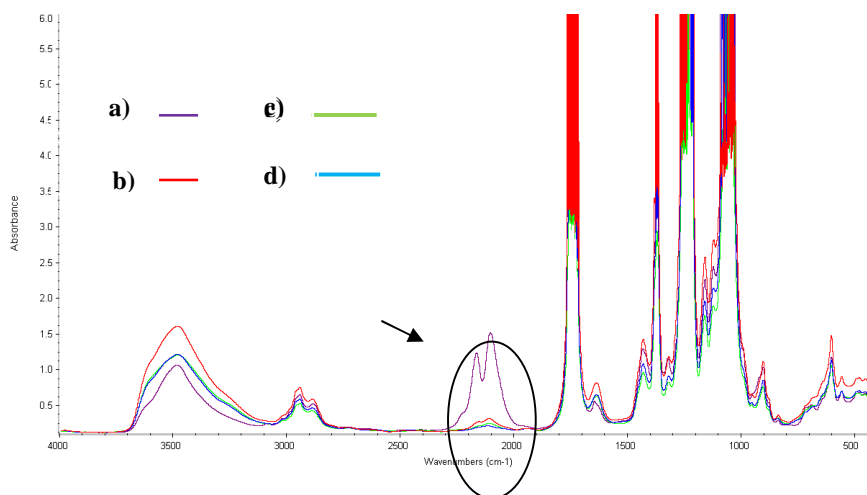


FIGURA 4 Espectros do filme incorporado com 40% de AIT e 0,05% de NTC, nos diferentes tempos (dias): a) tempo 0; b) tempo 2; c) tempo 21 e d) tempo 40.

5.3 Análises da carne de frango cozida e desfiada

5.3.1 Medida da oxidação lipídica

Não foi possível ajustar um modelo matemático para a análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), mas observa-se que o tratamento controle (sem AIT) apresentou valores de TBARS superiores ao longo do tempo (Figura 5), comparado aos tratamentos com AIT, o que permite concluir que este composto parece contribuir para o controle da oxidação. A média de TBARS para os tratamentos com AIT foi de 0,167 mg de MDA/kg de amostra e, para o frango acondicionado em filme controle, foi de 0,264 mg de MDA/kg.

Os valores de TBARS encontrados para os tratamentos com AIT podem ser comparados aos valores de 0,2 mg malonaldeído/kg de amostra para frango cozido, durante 15 dias de armazenamento refrigerado, encontrados por Naveena et al. (2008), ao estudarem o potencial antioxidante da casca de romã.

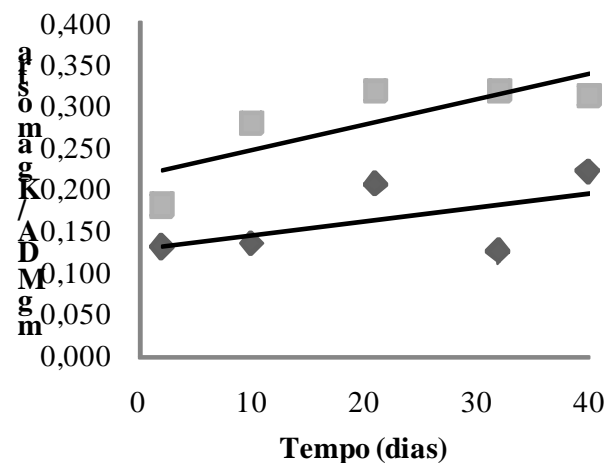


FIGURA 5 Valores médios de malonaldeído (MDA) para o frango cozido e desfiado acondicionado em filme de base celulósica (controle) – (■-) e para frango cozido e desfiado acondicionado em filmes antimicrobianos (-◆-), durante armazenamento

Propriedades antioxidantes do óleo essencial de mostarda, cujo princípio ativo é o AIT, foram relatadas por Chanjirakul et al. (2006). Entretanto, Lemay et al. (2002) não observaram alterações significativas no potencial redox (Eh) da carne de frango tratada em relação ao grupo controle. Portanto, o efeito de AIT como antioxidante deve ser mais investigado, pois ainda existem contradições.

5.3.2 Análise de cor

As equações de regressão para expressar influência dos fatores estudados sobre os parâmetros de cor da carne de frango cozida e desfiada são apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5 Equações de regressão dos parâmetros de cor; R² e CV

Variável	Equação de regressão	R ²	CV(%)
L*	$\hat{y}_i = 40,47 + 3,3730^{\Delta} ab + 0,6379^{\Delta} a + 0,3263^{\Delta} c - 0,0083^* a^2 - 4,2671^{\Delta} cb - 25,9721 b$	0,85	2,23
a*	$\hat{y}_i = -0,01744 + 6,18033^{\Delta} b - 0,01562^{\Delta} c$	0,49	314,57
b*	$\hat{y}_i = 9,21678 + 0,05577^{\Delta} a$	0,35	3,88
c*	$\hat{y}_i = 9,00098 + 0,06044^{\Delta} a$	0,34	4,38
ΔE^*	$\hat{y}_i = 27,963 + 607,456^{\Delta} b^2 + 2,781^{\Delta} cb + 0,01^{\Delta} a^2 + 0,004^{\Delta} c^2 - 0,390^{\Delta} c - 0,789^{\Delta} a - 2,440^{\Delta} ab - 43,429 b$	0,97	13,74
Δc^*	$\hat{y}_i = -4,87696 + 0,05589^{\Delta} a$	0,35	17,76

^ΔSignificativo, ao teste t (P < 0,05)

a: AIT; b: NTC; c: Tempo

L*: luminosidade, a*: vermelha/verde, b*: amarela/azul, c*: índice de saturação, ΔE^* : diferença global de cor, Δc^* : diferença de saturação

Todos os fatores estudados influenciaram o parâmetro L*. Para o aumento do valor de L*, o modelo gerado, de maneira geral, sugere aumentar o valor de AIT e o tempo e diminuir o valor de NTC.

Para o gráfico de contorno gerado com os valores NTC fixados em 0% (Figura 6A), pode-se observar que valores de L*, em intervalos de concentrações de AIT de 20% a 30% e de 50% a 60% são semelhantes em todos os tempos, ou seja, pode-se observar o efeito quadrático negativo de AIT da equação de regressão para L*. Neste nível de NTC, o valor de L* aumenta com o tempo, para uma mesma concentração de AIT.

Quando o NTC é fixado em 0,05%, com o tempo, o valor de L* aumenta, indicando que a amostra descoloriu, o que é resultado da redução na intensidade de cor vermelha e aumento na amarela, ou seja, a amostra está oxidando (Figura 6 B).

Já quando se utiliza nível de NTC 0,1%, observa-se que, para certa concentração de AIT, o valor de L* apresenta redução (Figura 6 C), mas, fixando-se o tempo, à medida que AIT aumenta, o L* também aumenta.

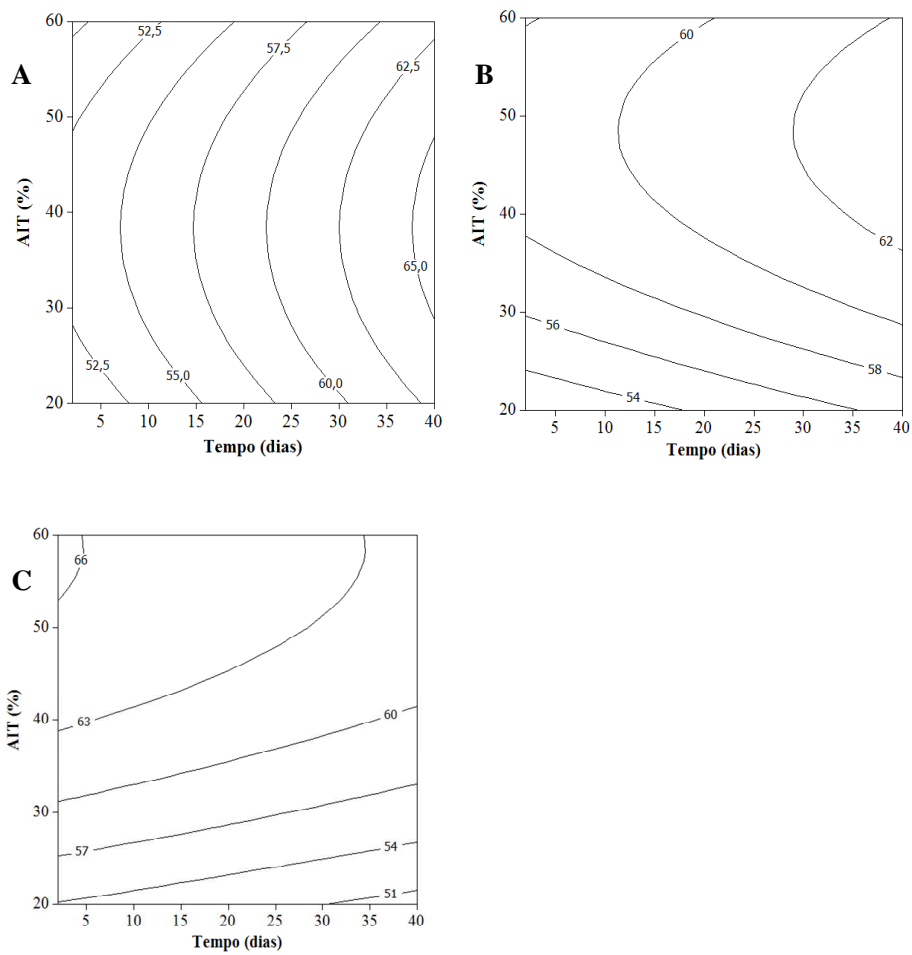


FIGURA 6 Curva de contorno para parâmetro L^* , em função do tempo e da concentração de AIT para valor de $NTC = 0$ (A); $NTC = 0,05\%$ (B); $NTC = 0,1\%$ (C).

A equação de regressão gerada para o parâmetro a^* indica que os fatores tempo e NTC foram significativos ($P < 0,05$). O fator NTC influencia a variável resposta positivamente, ou seja, um aumento na concentração de NTC implica

em aumento do parâmetro a^* . A influência desse nanocomposto na cor de alimentos ainda não foi estudada. Com relação ao tempo, este apresenta efeito negativo, de modo que, com o passar do tempo, o valor de a^* diminui, evidenciando perda de intensidade do pigmento vermelho (Figura 7).

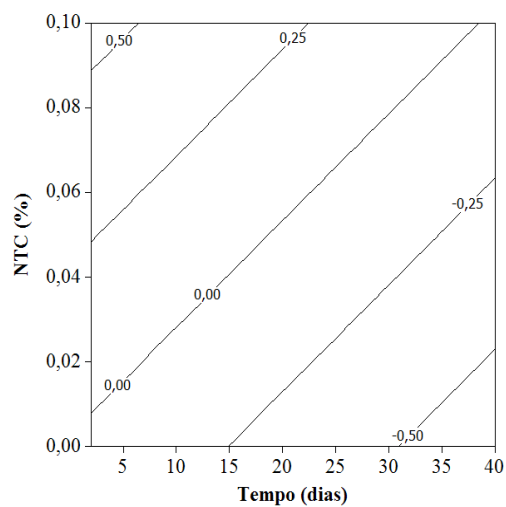


FIGURA 7 Curvas de contorno para o parâmetro a^* , em função do tempo e de NTC.

O parâmetro b^* foi influenciado positivamente ($P < 0,05$) pela concentração de AIT (Tabela 5), indicando que o aumento desse fator acarreta um leve aumento em b^* (Figura 8). Os valores de b^* variaram de 9,56 a 12,66.

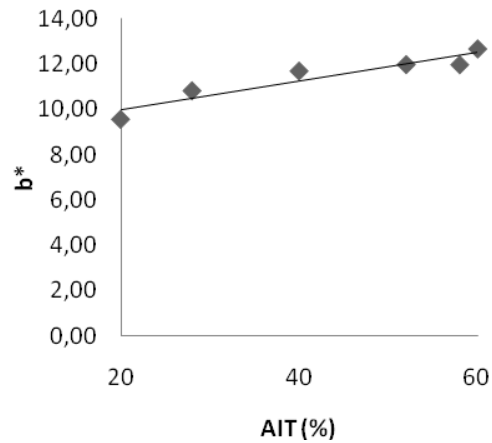


FIGURA 8 Comportamento do parâmetro b^* , em função da concentração de AIT.

Chouliara et al. (2007) avaliaram carne de peito de frango fresca e observaram tendência de o parâmetro L^* diminuir progressivamente, durante 25 dias de armazenamento, indicativo do fato de que a cor da produto tornou-se mais escura. A mesma tendência foi observada em amostras contendo óleo de orégano na concentração de 0,1%. Já para as amostras contendo óleo de orégano 1% houve tendência de aumentar o valor de L^* até o final do armazenamento. No que diz respeito ao parâmetro a^* , estes valores variaram entre 3,30 e 7,03, sem um padrão específico produzido por qualquer um dos tratamentos. O mesmo padrão é válido para o parâmetro b^* , cujos valores variaram entre 9,17 e 14,82.

O mesmo comportamento com relação ao parâmetro L^* foi observado neste estudo, em que o tratamento sem AIT (controle) apresentou valor inferior de L^* quando comparado aos tratamentos com AIT.

O índice saturação faz distinção entre cor fraca e forte, apresentando a relação com a intensidade ou a quantidade de uma tonalidade (Ramos &

Gomide, 2007). O fator AIT influenciou positivamente ($P < 0,05$) o parâmetro c^* , assim como Δc^* (Tabela 5). Apesar de a saturação (índice c^*) aumentar nas amostras em função do AIT, quando elas são comparadas com o padrão (frango cozido e desfiado no tempo 0), percebe-se que as amostras se apresentam menos saturadas ($\Delta c^* < 0$), ou seja, a amostra está descolorindo (Figura 9).

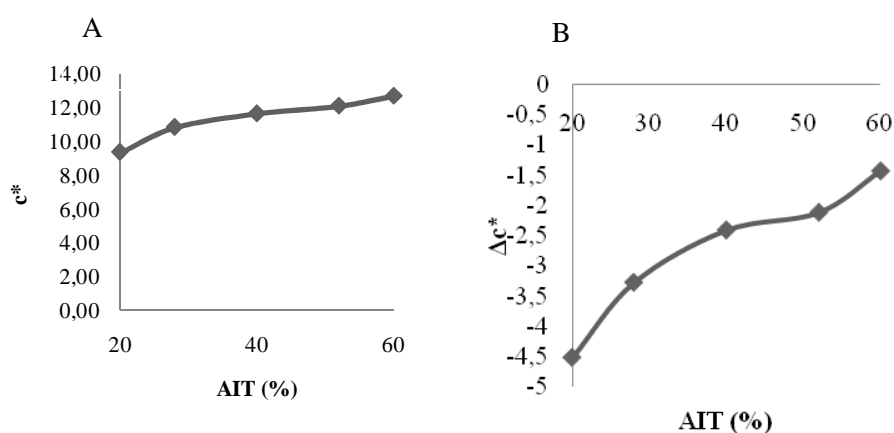


FIGURA 9 Variação de c^* (A) e Δc^* (B), em função da concentração de AIT.

Todos os fatores influenciaram o parâmetro ΔE^* . De maneira geral, para se obter valores baixos de ΔE^* , devem-se utilizar valores elevados de AIT e NTC. Fixando-se o valor de NTC em 0,1% (Figura 10 A), o valor de ΔE^* diminui com o aumento da concentração de AIT e mantém-se praticamente constante com o tempo. Quando o AIT é fixado em 60%, o valor de ΔE^* diminui com o aumento do valor de NTC e com o tempo (Figura 10 B). Para o tempo fixando em 40 dias, a redução de ΔE^* é obtida com redução de NTC e aumento de AIT (Figura 10C).

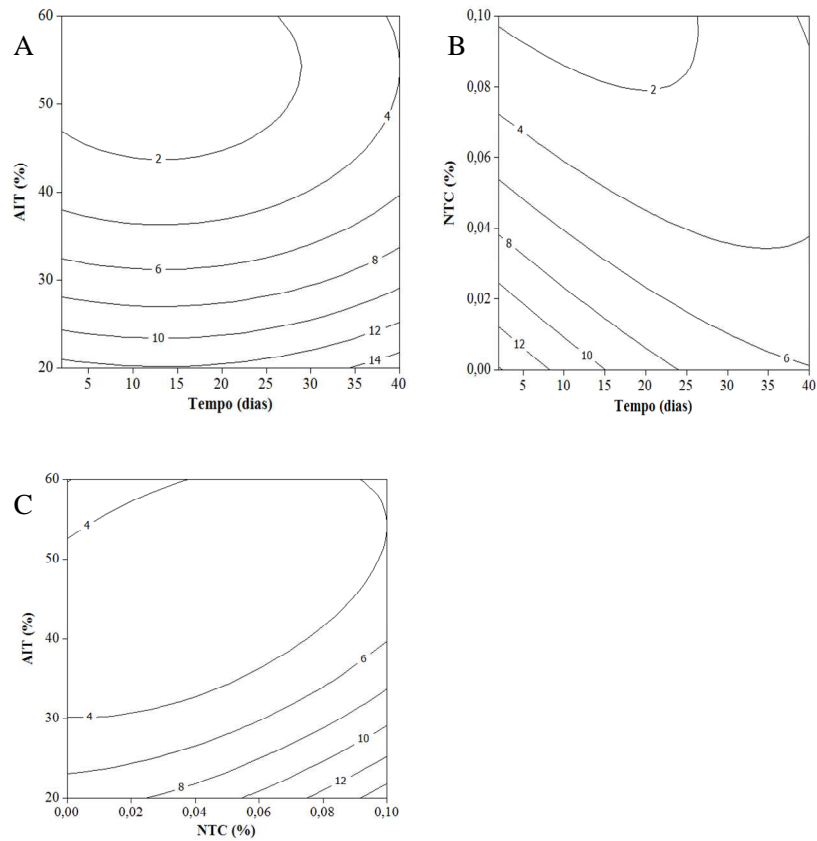


FIGURA 10 Curvas de contorno para ΔE^* , em função de AIT e tempo para $NTC = 0,1$ (A); em função de NTC e tempo com $AIT = 60\%$ (B) e em função de AIT e NTC para tempo =40 (C).

Dessa maneira, recomendam-se valores elevados de AIT e NTC para reduzir a variação de cor em relação ao padrão.

Segundo Ramos & Gomide (2007), valores de $\Delta E^* > 5$ representam diferenças detectáveis pelo olho humano. Os tratamentos que excederam este valor foram os ensaios 1, 2, 3, 9 e 13 (Tabela 2), ou seja, os tratamentos com poucos dias de armazenamento, (2 e 10 dias), e um tratamento com 20% de AIT

e 0,05% de NTC e 21 dias de armazenamento. Assim, recomendam-se, para a redução de ΔE^* , tempo maior de acondicionamento e valores maiores de AIT e NTC.

5.3.3 Liberação de AIT

O filme elaborado com 0,02% de NTC e 28 % de AIT, em contato com o frango, apresentou ausência de AIT na carne de frango cozida e desfiada analisada com 10 e 32 dias, indicando que essa quantidade de NTC não é o suficiente para retenção do AIT. Já o ensaio com 28% de AIT e 0,08% de NTC com 10 dias apresentou 0,778 e 0,562 mg de AIT/100 mL, no filme e na carne de frango cozida e desfiada, respectivamente (Tabela 6).

No ensaio 11 observou-se o maior teor de AIT no filme e no frango com 21 dias, possivelmente devido à alta concentração de antimicrobiano utilizada e à alta difusão proporcionada pela ausência de NTC.

TABELA 6 Valores de AIT nos filmes e carne de frango cozida e desfiada, para os diferentes ensaios

Ensaio	AIT (%)	NTC (%)	Tempo (dias)	mg de AIT no filme/100 mL	mg de AIT no frango/100 mL
13	40	0,05	2	5,432	2,922
1	28	0,02	10	0,325	0,000
2	52	0,02	10	1,411	1,718
3	28	0,08	10	0,778	0,562
4	52	0,08	10	2,823	2,324
9	20	0,05	21	0,180	0,879
10	60	0,05	21	5,389	23,779
11	40	0	21	11,466	32,223
12	40	0,1	21	4,855	25,964
15	40	0,05	21	2,749	12,645
16	40	0,05	21	6,391	17,653
17	40	0,05	21	2,304	14,739
5	28	0,02	32	0,000	0,000
6	52	0,02	32	1,124	3,129
7	58	0,08	32	7,282	16,517
8	52	0,08	32	0,352	1,371
14	40	0,05	40	0,791	4,445

De maneira geral, os demais tratamentos foram eficientes, pois apresentaram AIT no filme e no frango com até 40 dias de acondicionamento e também permitiram a difusão deste para o frango, à temperatura de 8°C.

A liberação de AIT do filme para o frango pode ser explicada pelo efeito de plastificação da água presente no frango, que pode ter aumentado o movimento molecular na matriz filmogênica e desencadeado a liberação do AIT.

Nadarajah et al. (2005a) encontraram alta concentração de AIT no espaço vazio da embalagem de carne moída tratada com este antimicrobiano, o que sugere que a maioria do AIT volatilizou. Entretanto, a embalagem com maior teor de AIT não foi a que apresentou melhor atividade antimicrobiana, indicando, portanto, que a solubilidade do AIT na carne e em contato com a bactéria contaminante foi, provavelmente, mais importante que a concentração de AIT no espaço vazio para ação antimicrobiana.

A absorção de AIT da carne de frango cozida e desfiada pode ser explicada pela equação 1, na qual se observa que a absorção de AIT da carne de frango (y) foi influenciada ($P < 0,05$) positivamente pela quantidade de AIT liberada pelo filme (x). Os valores de R^2 e CV_{res} foram 0,7% e 25,71%, respectivamente, para o modelo gerado:

$$y = 0,774 + 2,753 x^{\wedge} \quad (1); \text{ em que}$$

\wedge significativo, pelo teste t, a 5%; y: absorção de AIT da carne de frango cozida e desfiada (mg de AIT/100mL) e x: AIT liberado pelo filme (mg de AIT/100mL).

Pela correlação da liberação de AIT do filme e absorção de AIT pela carne de frango cozida e desfiada, observa-se (Figura 11) que quanto maior a liberação de AIT do filme, maior a absorção de AIT pelo frango. Assim, pode-se afirmar ocorre a difusão do antimicrobiano do filme para a carne de frango cozida e desfiada.

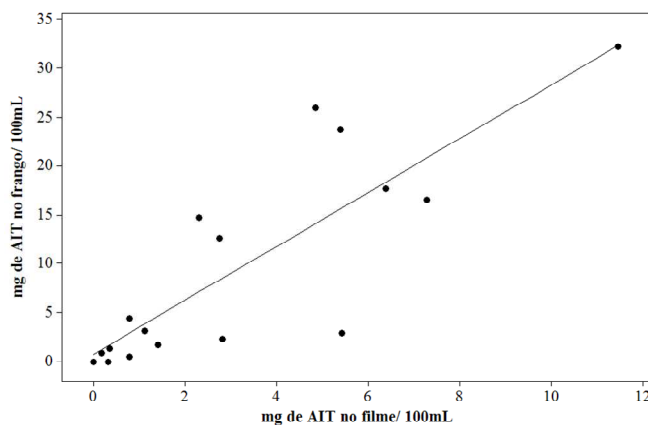


FIGURA 11 Liberação de AIT da carne de frango cozida e desfiada embalada em filmes antimicrobianos, em função da liberação de AIT pelos filmes

5.3.4 Análises microbiológicas

Na Figura 12 observa-se a contagem de *Salmonella* Choleraesuis, mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e psicrotróficos para carne de frango cozida e desfiada inoculada com $5,7 \text{ Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ e embalada com os filmes antimicrobianos e filme de base celulósica sem AIT e sem NTC (controle), por 40 dias.

O filme com 28% de AIT e 0,02% NTC e o filme com mesma quantidade de AIT, mas com 0,08% de NTC, apresentaram, com 10 dias de acondicionamento, contagem de $5,7 \text{ Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ e de $3,9 \text{ Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, para *Salmonella* Choleraesuis, ou seja, apenas o segundo filme reduziu a contagem na carne de frango cozida e desfiada. Este tratamento (28% AIT e 0,02% de NTC) apresentou contagem de $5,7$; $6,3$ e $6,5 \text{ Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, com 32 dias para *Salmonella* Choleraesuis, mesófilos e psicrotróficos, respectivamente, tendo sido o único que permitiu o crescimento de psicrotróficos. Esse resultado corrobora os de liberação de AIT, que mostraram ausência de AIT para este tratamento.

Já o filme elaborado com 52% de AIT e 0,08% de NTC reduziu a contagem de *Salmonella* Choleraesuis e mesófilos para $1,9 \text{ Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ e para $3,8 \text{ Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, ou seja, reduções próximas de 4 e 2 ciclos logarítmicos, respectivamente, com 10 dias de estocagem.

Com até 10 dias de acondicionamento, percebe-se que a redução de *Salmonella* Choleraesuis foi maior que a redução de mesófilos, provavelmente devido à presença de microflora gram-positiva, que é mais resistente ao AIT. Nadarajah et al. (2005a) e Chacon et al. (2006) observaram este mesmo comportamento na contagem de mesófilos em carne bovina.

Os demais tratamentos analisados com 21, 32 e 40 dias apresentaram contagem $<1,0 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, estimada para *Salmonella* Choleraesuis, mesófilos e psicrotróficos.

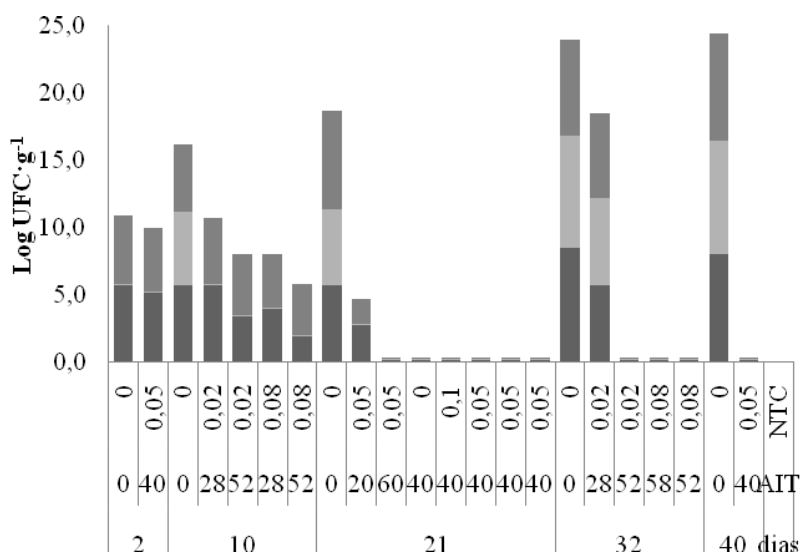


FIGURA 12 Contagem de *Salmonella Choleraesuis* (■), psicrotróficos (■) e mesófilos (■), para carne de frango cozida e desfiada embalada em filmes antimicrobianos e em filme controle.

Já a carne de frango cozida e desfiada embalada com os filmes sem antimicrobiano e sem NTC (controle) apresentou contagem de *Salmonella Choleraesuis* de 8,4 Log UFC·g⁻¹ e, para mesófilos e psicrotróficos, 8,0 e 7,9 Log UFC·g⁻¹, respectivamente, depois de 40 dias de estocagem. Estes valores são superiores aos encontrados para o frango acondicionado em embalagens antimicrobianas, comprovando a eficácia das mesmas na inibição microbiológica deste produto.

O tempo aumenta a contagem dos microrganismos e AIT e/ou NTC agem impedindo essa tendência.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, recomenda-se a utilização de AIT em concentrações superiores a 28%, combinadas com concentrações superiores a 0,02% de NTC, para se conseguir redução microbiológica, controle de oxidação e redução nas alterações de cor, considerando que esses dois fatores (AIT e NTC) não influenciaram as características mecânicas. Essas embalagens foram eficientes durante 40 dias de estocagem, representando grande potencial de aplicação em produtos cárneos, para aumentar a vida de prateleira.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: APHA, 2001. 600 p.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting: D 882-02**. Philadelphia: ASTM, 2002. 10 p.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for water vapor transmission of materials: E 96-00**. Philadelphia: ASTM, 2000. 9 p.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 113-126, 2002.

AZEREDO, H. M. C. Review nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, Nov. 2009.

BAO, S. P.; TJONG, S. C. Mechanical behaviors of polypropylene/carbon nanotube nanocomposites: the effects of loading rate and temperature. **Materials Science and Engineering A**, Lausanne, v. 485, n. 1/2, p. 508-516, June 2008.

BECERRIL, R.; GÓMEZ-LUS, R.; GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; NERÍN, C. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. **Anal Bioanal Chemistry**, [S.l.], v. 388, n. 5/6, p. 1003-1011, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 15 jul. 2009.

BRODY, A. L.; STRUPINSKY, E. R.; KLINE, L. R. Antimicrobial packaging. In: BRODY, A. L.; STRUPINSKY, E. R.; KLINE, L. R. (Ed.). **Active packaging for food applications**. Washington: CRC, 2001. cap. 10, p. 234-247.

CHACON, P. A.; BUFFO, R. A.; HOLLEY, R. A. Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 231-237, 2006.

CHANJIRAKUL, K.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y.; SIRIPHANICH, J. Effect of natural volatile compounds on antioxidant capacity and antioxidant enzymes in raspberries. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 106-115, 2006.

CHEN, C. W.; HO, C. T. Thermal degradation of allyl isothiocyanate in aqueous solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 1, p. 220-223, 1998.

CHO, J.; KONOPKA, K.; ROZNIATOWSKI, K.; LECINA, E. G.; SHAFFER, M. S. P.; BOCCACCINI, A. R. Characterisation of carbon nanotube films deposited by electrophoretic deposition. **Carbon**, Elmsford, v. 47, n. 1, p. 58-67, Jan. 2009.

CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 6, p. 607-617, 2007.

GUIGA, W.; GALLAND, S.; PEYROL, E.; DEGRAEVE, P.; CARNET-PANTIEZ, A.; SEBTI, I. Antimicrobial plastic film: physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 203-207, 2009.

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

KIM, C. R.; MARSHALL, D. L. Microbiological, colour and sensory changes of refrigerated chicken legs treated with selected phosphates. **Food Research International**, Barking, v. 32, n. 3, p. 209-215, 1999.

LEMAY, M. J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P. J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 217-226, 2002.

LIANG, S.; WANG, K.; CHEN, D.; ZHANG, Q.; DU, R.; FU, Q. Shear enhanced interfacial interaction between carbon nanotubes and polyethylene and formation of nanohybrid shish-kebabs. **Polymer**, Berlin, v. 49, n. 23, p. 4925-4929, Oct. 2008.

LIEBER, E.; RAO, C. N. R.; RAMACHANDRAN, J. The infrared spectra of organic thiocyanates and isothiocyanates. **Spectrochimica Acta**, London, v. 13, n. 4, p. 296-299, 1959.

LIM, L. T.; TUNG, M. A. Vapor pressure of allyl isothiocyanate and its transport in PVDC/PV copolymer packaging film. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, p. 1061-1066, 1997.

LUCIANO, F. B.; HOLLEY, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2/3, p. 240-245, 2009.

MITSUMOTO, M.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, Barking, v. 69, n. 4, p. 773-779, 2005.

NADARAJAH, D.; HAN, J. H.; HOLLEY, R. A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 269-279, Apr. 2005a.

NADARAJAH, D.; HAN, J. H.; HOLLEY, R. A. Use of mustard flour to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 257-267, 2005b.

NAVEENA, B. M.; SEN, A. R.; VAITHIYANATHAN, S.; BABJI, Y.; KONDAIAH, N. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. **Meat Science**, Barking, v. 80, n. 4, p. 1304-1308, 2008.

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. A. P. L. V. Revisão: principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 161-165, 2004.

OLIVEIRA, T. M.; SOARES, N. D. F. F.; PEREIRA, R. M.; FAGA, K. D. F. Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in Gorgonzola cheese conservation. **Packaging Technology and Science**, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 147-153, 2007.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology and Science**, [S.l.], v. 21, n. 7, p. 375-383, Apr. 2008.

RACANICCI, A. M. C. **O efeito do uso do óleo de vísceras de aves oxidado no desempenho de frangos de corte e na estabilidade oxidativa da carne da sobrecoxa**. 2004. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes - fundamentos e metodologias**. Viçosa-MG: UFV, 2007. v. 1, 599 p.

RAO, P. R.; DIWAN, P. V. Permeability studies of cellulose acetate free films for transdermal use: influence of plasticizers. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, [S.l.], v. 72, n. 1, p. 47-51, 1997.

ROTTA, R. B. **Estudo da atividade da enzima glutathione peroxidase em carne de frango**. 2007. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. F.; NÓBREGA, J. E.; WANDERLEI JÚNIOR, M. A.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; WÜRLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 1, p. 85-89, Jan. 2009.

SHOFRAN, B. G.; PURRINGTON, S. T.; BREIDT, F.; FLEMING, H. P. Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 621-624, 1998.

SOARES, N. F. F. **Bitterness reduction in citrus juice through nariginase immobilized into polymer film**. 1998. 130 p. Dissertation (Ph.D in Food of Science) – Cornell University, New York.

VARTIAINEN, J.; SKYTТА, E.; AHVENAINEN-RANTALA, R.; ENQVIST, J. Antimicrobial and barrier properties of LDPE films containing imazalil and EDTA. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 249-261, 2003.

VEGA-LUGO, A. C.; LIM, L. T. Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 8, p. 933-940, 2009.

WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; YIN, J. J. Effect of allyl isothiocyanate on antioxidants and fruit decay of blueberries. **Food Chemistry**, London, v. 120, n. 1, p. 199-204, 2010.

ZHANG, Q. F.; JIANG, Z. T.; LI, R. Complexation of allyl isothiocyanate with β -cyclodextrin and its derivatives and molecular microcapsule of allyl isothiocyanate in β -cyclodextrin. **European Food Research and Technology**, [S.l.], v. 225, n. 3/4, p. 407-413, 2007.