



GISELLE PEREIRA CARDOSO

**REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE
GELATINA, GLICERINA, QUITOSANA E
ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CONSERVAÇÃO
DE CARNE BOVINA REFRIGERADA**

LAVRAS - MG

2011

GISELLE PEREIRA CARDOSO

**REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA,
GLICERINA, QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA REFRIGERADA**

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

Dr. Eduardo Mendes Ramos

Orientador

LAVRAS - MG

2011

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

Cardoso, Giselle Pereira.

Revestimentos comestíveis à base de gelatina, glicerina,
quitosana e óleos essenciais para conservação de carne bovina
refrigerada / Giselle Pereira Cardoso. – Lavras : UFLA, 2011.
220 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.
Orientador: Eduardo Mendes Ramos.
Bibliografia.

1. Carne *in natura*. 2. Filme comestível. 3. Biopolímeros. 4.
Pimenta-da-jamaica. 5. Alecrim. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 664.92992

GISELLE PEREIRA CARDOSO

**REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS À BASE DE GELATINA,
GLICERINA, QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA REFRIGERADA**

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

APROVADA em 03 de outubro de 2011.

Dra. Alcinéia de Lemos Souza Ramos UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Dr. Lúcio Alberto de Miranda Gomide UFV

Dr. Paulo Rogério Fontes UFLA

Dr. Eduardo Mendes Ramos

Orientador

LAVRAS – MG

2011

Aos meus pais, Tida e Dalceu,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Deixei esta parte para o final. Por varias e várias vezes, pensei que não conseguiria terminar. Agradecer a todos aqueles que me ajudaram é uma grande alegria.

A Deus, pela existência, por encher de bênçãos cada dia da minha vida. Aos meus pais, Maria Aparecida Pereira Cardoso (Tida) e Dalceu Cardoso Filho, por sempre acreditarem em mim, serem meus incentivadores, meus exemplos de luta, força, honestidade e simplicidade. Seus ensinamentos estarão comigo para a vida toda.

Ao meu irmão, Túlio, pela companhia e apoio.

Ao Fabrício, pelo carinho, por sempre estar disposto a me ajudar e me acompanhar.

A Mel e Pandora, alegrias do meu cotidiano.

Ao professor Eduardo, meu orientador, professor e amigo, que tornou esta caminhada mais fácil e os dias mais felizes. Ele me ensinou que o conhecimento vai além dos livros.

À professora Alcinéia, que me ajudou a enfrentar meus medos e minhas limitações.

À professora Graça, por toda a ajuda.

À banca examinadora, Lúcio, Paulo e Roberta, que proporcionaram discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

A todos os meus amigos do Laboratório de Carnes, Daynna, Cecília, Monalisa, Ísis, Cristiane, Michelle, Rafa e Amanda, obrigada por tudo.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Aline, Danilo e Máira.

A todos do Laboratório de Química Orgânica.

À Capes e à Fapemig, por todo o apoio financeiro.

À Universidade Federal de Lavras, por todo o aprendizado.

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de vocês!!!

"Quanto mais conhecemos, mais amamos." (Leonardo da Vinci).

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de revestimentos comestíveis à base de gelatina, quitosana, glicerina e óleos essenciais na conservação de bifes de carne bovina refrigerada. A otimização da composição dos filmes foi conduzida em três experimentos: no primeiro, foi utilizado um delineamento central composto rotacional (DCCR) em um fatorial 2^3 , com oito pontos fatoriais, seis pontos axiais e quatro pontos centrais, totalizando 18 ensaios, tendo como fatores gelatina (0-6%), quitosana (0,5-1,5%) e glicerina (0-12%). Os bifes revestidos pelos biopolímeros foram avaliados quanto à perda de peso, índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor objetiva nos tempos zero e cinco de armazenamento a 4°C, sob fotoperíodo (12 horas luz, 12 horas escuro). Os modelos estatísticos utilizados foram significativos ($p < 0,10$) para a avaliação de índice de TBARS, índices de luminosidade (L), amarelo (b^*), saturação (C^*) e razão R630/R580 no tempo zero de estocagem e para perda de peso, TBARS, pigmento de mioglobina reduzida (Mb+), índices de vermelho (a^*), saturação (C^*) e razão R630/R580 no quinto dia de armazenamento. A partir deste experimento, foi possível padronizar o valor ótimo de glicerina em 6% para produção dos filmes. No segundo experimento, foi gerado um novo DCCR, em um fatorial 2^2 , com quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais e três pontos centrais, totalizando 11 ensaios, tendo como fatores gelatina (0-6%) e quitosana (0,5-1,5%). Foi utilizada a quantidade padrão de 6% de glicerina. Foi testada a capacidade antimicrobiana dos filmes contra cinco bactérias [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica Enteritidis* (S64) e *Escherichia coli* (Inc0181 CDC055)]. Os bifes revestidos pelos biopolímeros também foram avaliados quanto a perda de peso, pH, índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor objetiva nos tempos zero e seis de armazenamento. Os modelos estatísticos utilizados foram significativos ($p < 0,10$) para os halos de inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica Enteritidis*. Os modelos estatísticos utilizados também foram significativos ($p < 0,10$) para avaliação de pH, índice de TBARS, pigmentos de metamioglobina (MMb), deoximioglobina (Mb+) e oximioglobina (O_2Mb), fator K572/K525 e para o índice de cor tonalidade (h^*) no tempo zero e para perda de peso, índice de TBARS, pigmentos de metamioglobina (MMb), deoximioglobina (Mb+) e oximioglobina (O_2Mb), fator K572/K525 e para os índices de cor luminosidade (L), vermelho (a^*), amarelo (b^*), saturação (C^*), tonalidade (h^*) e fator R630/R580 após seis dias de estocagem. Os resultados de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor indicaram que a concentração ótima do filme para conservação dos bifes de carne bovina foi de

3% de gelatina e 1,5% quitosana. No terceiro experimento, foi testada a adição de combinações dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica Lindl*) ao filme otimizado (3% de gelatina, 1,5% de quitosana e 6% de glicerina). Foi gerado um DCCR, em um fatorial 2^2 , com quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais e três pontos centrais, totalizando 11 ensaios, tendo como fatores alecrim (100-1000 ppm) e pimenta-da-jamaica (100-1000 ppm). Os bifes revestidos pelos biopolímeros foram avaliados quanto a perda de peso, índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor objetiva nos tempos zero e sete de armazenamento. Os modelos estatísticos utilizados foram significativos ($p < 0,10$) para a avaliação de índice de TBARS, pigmento de oximioglobina (O_2Mb), índice de vermelho (a^*) e saturação (C^*) no tempo zero. No tempo sete, o modelo estatístico foi significativo ($p < 0,10$) apenas para o índice de TBARS. Foi possível obter uma formulação otimizada de filme para a conservação de bifes de carne bovina, sendo a formulação de 3% de gelatina, 1,5% de quitosana, 6% de glicerina, 550 ppm de óleo essencial de alecrim e 550 ppm de óleo essencial de pimenta-da-jamaica. Conclui-se que a utilização de revestimentos comestíveis à base de gelatina, quitosana, glicerina e óleos essenciais pode ser uma alternativa interessante para a conservação de carne bovina refrigerada.

Palavras-chave: Carne *in natura*. Filme comestível. Biopolímeros. Pimenta-da-jamaica.

ABSTRACT

The aim of this work was evaluate the effects of applying coatings to edible gelatin, chitosan, glycerin and essential oils for the preservation of refrigerated beef. The optimization of the composition of the films was conducted in three experiments: the first was used in a *Rotational Central Composite Design* (DCCR) in a 2^3 factorial, with eight factorial points, six axial points and four central points, totaling 18 trials with factors such as gelatin (0-6%), chitosan (0.5-1.5%) and glycerin (0-12%). The beefs coated by biopolymers were evaluated for weight loss, TBARS values, for the pigment myoglobin and objective color at zero and five day of storage at 4°C, under photoperiod (12 hours light, 12 hours dark). The statistical models used were significant ($p < 0.10$) for the evaluation of TBARS index, index of luminosity (L), yellow (b *), saturation (C *) and R630/R580 ratio at time zero of storage and for weight loss, TBARS, reduced pigment myoglobin (Mb+), rates of red (a*), saturation (C*) and R630/R580 ratio on the fifth day of storage. From this experiment, it was possible to standardize the optimal value of 6% for glycerin in film production. In the second experiment, was generated a new DCCR in a 2^2 factorial design with four factorial points, four axial points and three central points, totaling 11 trials with factors such as gelatin (0-6%) and chitosan (0.5-1, 5%), and used the default amount of 6% glycerin. The ability of antimicrobial films against five bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica Enteritidis* (S64) and *Escherichia coli* (Inc051 CDC055)) was tested. Steaks coated by biopolymers were also evaluated for weight loss, pH, TBARS values, pigments and myoglobin for objective color at zero and six storage. The statistical models used were significant ($p < 0.10$) for the halos of inhibition for *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica Enteritidis*. The statistical models used were also significant ($p < 0.10$) for evaluation of pH, TBARS values, pigment metmyoglobin (MMb), deoximioglobina (Mb +) and oximioglobina (O₂Mb), K572/K525 factor for the index and color hue (h *) at time zero and weight loss, TBARS values, pigment metmyoglobin (MMb), deoximioglobina (Mb+) and oximioglobina (O₂Mb), K572/K525 factor and the color indices luminosity (L), red (a*), yellow (b*), saturation (C*), hue (h*) and R630/R580 factor after six days of storage. The results of TBARS, pigments for color and myoglobin indicated that the optimum concentration of the film for preservation of beef steaks was 3% gelatin and 1.5% chitosan. In the third experiment, was tested the addition of combinations of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and allspice (*Pimenta dioica Lindl*) in optimized the film (3% gelatin, chitosan 1.5% and 6% glycerin). DCCR one was generated in a

2² factorial design with four factor scores, four axial points and three central points, totaling 11 trials with factors such as rosemary (100-1000 ppm) and allspice (100-1000 ppm). Steaks coated by biopolymers were evaluated for weight loss, TBARS values, for the pigment myoglobin and objective color at zero and seven storage. The statistical models used were significant ($p < 0.10$) for the evaluation of TBARS values, pigment oximioglobin (O₂Mb), redness (a*) and saturation (C*) at time zero. In the seven time, the statistical model was significant ($p < 0.10$) only for the content of TBARS. It was possible to obtain an optimized formulation of film for preservation of refrigerated beef, and the formulation of 3 % gelatin, chitosan 1.5%, 6% glycerol, 550 ppm of rosemary essential oil and 550 ppm of essential oil of allspice. The use of edible coatings based on gelatin, chitosan, glycerin and essential oils may be an interesting alternative to refrigerated storage of beef.

Keywords: Fresh beef. Edible film. Biopolymers. Allspice.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Estrutura molecular da quitosana 49

CAPÍTULO 2

Figura 1 Coloração dos bifes após 5 dias de armazenamento, sendo (A) controle (água destilada); (B) amostra 3: 1,22% gelatina + 1,3% quitosana + 2,4% glicerina; (C) amostra 9: 0% gelatina + 1% quitosana + 6% glicerina; (D) amostra 17: 3% gelatina + 1% quitosana + 6% glicerina 111

CAPÍTULO 3

Figura 1 Coloração dos bifes após 5 dias de armazenamento, sendo (A) controle (água destilada); (B) amostra 9: 3% gelatina + 1% quitosana + 6% glicerina; (C) amostra 4: 5,12% gelatina + 1,35% quitosana + 6% glicerina; (D) amostra 7: 3% gelatina + 0,5% quitosana + 6% glicerina 171

CAPÍTULO 4

Figura 1 Coloração dos bifes após 7 dias de armazenamento, sendo (A) controle; (B) amostra 5: 100 ppm alecrim + 550 ppm pimenta-da-jamaica; (C) amostra 6: 1.000 ppm alecrim + 550 ppm pimenta-da-jamaica; (D) amostra 4: 869,15 ppm alecrim + 869,15 ppm pimenta-da-jamaica 213

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1	Superfície de resposta para perda de peso de bifes <i>M. semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no quinto dia de armazenamento	81
Gráfico 2	Superfície de resposta para o índice de TBARS dos bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função do teor de quitosana, gelatina e glicerina no tempo zero	87
Gráfico 3	Valores preditos para o percentual de mioglobina reduzida (Mb+) de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no quinto dia de armazenamento.....	92
Gráfico 4	Superfície de resposta para a luminosidade (L*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no tempo zero	98
Gráfico 5	Superfície de resposta para o índice de amarelo (b*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no tempo zero.....	100
Gráfico 6	Superfície de resposta para a saturação (C*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no tempo zero	102
Gráfico 7	Valores preditos para a razão R630/R580 de bifes <i>M. semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, no tempo zero	103
Gráfico 8	Superfície de resposta para o índice de vermelho (a*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no quinto dia de armazenamento.....	107
Gráfico 9	Superfície de resposta para a saturação (C*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no quinto dia de armazenamento.....	109
Gráfico 10	Valores preditos para a razão R630/R580 da cor de bifes <i>M. semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, no quinto dia de armazenamento	109

CAPÍTULO 3

Gráfico 1	Superfície de resposta para os halos de inibição (mm) de (A) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (B) <i>Listeria monocytogenes</i> e (C) <i>Salmonella</i> Enteritides, após 48 horas de incubação, a 37°C.....	135
Gráfico 2	Valores preditos para o halo de inibição (em milímetros) contra <i>Staphylococcus aureus</i> , em função das concentrações de quitosana, após 48 horas de incubação a 37°C.....	136
Gráfico 3	Superfície de resposta para pH dos bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no tempo zero	140
Gráfico 4	Superfície de resposta para perda de peso dos bifes <i>M. Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento.....	142
Gráfico 5	Superfície de resposta para o índice de TBARS de bifes <i>M.semitendinosus</i> , em função do teor de glicerina e quitosana: (A) no tempo zero; (B) após seis dias de armazenamento e (C) diferença entre os valores de TBARS no tempo zero e após seis dias de armazenamento	146
Gráfico 6	Superfície de resposta para o percentual de metamioglobina (MMb), deoximioglobina (Mb+) e oximioglobina (O ₂ Mb) na superfície de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no tempo zero	150
Gráfico 7	Superfície de resposta para o percentual de metamioglobina (MMb), deoximioglobina (Mb+) e oximioglobina (O ₂ Mb) na superfície de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento	154
Gráfico 8	Superfície de resposta para razão K572/K525 de bifes <i>M. semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento.....	157
Gráfico 9	Valores preditos para o índice de tonalidade (h*) da cor de bifes <i>M. semitendinosus</i> , em função das concentrações de quitosana, no tempo zero	160
Gráfico 10	Superfície de resposta para o índice de luminosidade (L*) e índice de amarelo (b*) da cor de bifes de <i>M. semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento	164
Gráfico 11	Valores preditos para o índice de vermelho (a*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, no sexto dia de armazenamento	165

Gráfico 12	Valores preditos para a saturação (C*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, no sexto dia de armazenamento	167
Gráfico 13	Superfície de resposta para a tonalidade (h*) da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento.....	168
Gráfico 14	Valores preditos para a o índice R630/R580 da cor de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de gelatina, no sexto dia de armazenamento	169

CAPÍTULO 4

Gráfico 1	Valores preditos para a o índice de TBARS de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função da concentração do óleo essencial de alecrim, no tempo zero	200
Gráfico 2	Superfície de resposta para o índice de TBARS de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função do teor de pimenta-da-jamaica e alecrim no sétimo dia de armazenamento.....	200
Gráfico 3	Valores preditos para a variação do índice de TBARS de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função da concentração do óleo essencial de alecrim	201
Gráfico 4	Superfície de resposta para o teor de oximioglobina (O ₂ Mb) de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , em função das concentrações de óleo essencial de pimenta-da-jamaica e alecrim, no tempo zero	206
Gráfico 5	Superfície de resposta para o índice de (A) vermelho (a*) e (B) saturação (C*) da cor de bifes de <i>M. semitendinosus</i> , em função das concentrações dos óleos essenciais de pimenta da pimenta-da-jamaica e alecrim, no tempo zero	211

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Possíveis utilizações dos filmes, de acordo com sua natureza.....	42
Tabela 1	Níveis utilizados no DCCR para três fatores, para as variáveis gelatina, quitosana e glicerina.....	71
Tabela 2	Delineamento fatorial completo para composição dos filmes de gelatina, quitosana e glicerina.....	71
Tabela 3	Perda de peso dos bifes de <i>M.Semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle, no quinto dia de armazenamento.....	79
Tabela 4	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a perda de peso de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , no quinto dia de armazenamento.....	80
Tabela 5	Modelo codificado da regressão para perda de peso.....	83
Tabela 6	Índice de TBARS dos bifes de <i>M. semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento.....	84
Tabela 7	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o índice de TBARS de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , no tempo zero.....	85
Tabela 8	Modelo codificado da regressão para o índice de TBARS.....	89
Tabela 9	Pigmentos relativos da mioglobina e valor K572/K525 dos bifes de <i>M.Semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle, no tempo zero e no quinto dia de armazenamento.....	91
Tabela 10	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a Mb ⁺ de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , no quinto dia de armazenamento.....	92
Tabela 11	Modelo codificado da regressão para a Mb ⁺	95
Tabela 12	Cor objetiva e valor de R630/R580 dos bifes de <i>M.vsemitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle, no tempo zero e no quinto dia de armazenamento.....	96
Tabela 13	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a	

	luminosidade (L*), índice de amarelo (b*), saturação (C*) e razão R630/R580 de bifes <i>M. semitendinosus</i> , no tempo zero 97
Tabela 14	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o índice de vermelho (a*), saturação (C*) e razão R630/R580 de bifes <i>M. semitendinosus</i> , no quinto dia de armazenamento 106
Tabela 15	Modelos codificados das regressões para os componentes da cor. 110

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Níveis utilizados no DCCR para dois fatores, para as variáveis gelatina e quitosana 124
Tabela 2	Delineamento fatorial completo para composição dos filmes à base de gelatina e quitosana 124
Tabela 3	Valores médios dos halos de inibição (mm) para diferentes concentrações de quitosana nos biopolímeros sobre diferentes bactérias, após 48 horas de incubação a 37°C 132
Tabela 4	Valores médios dos halos de inibição (mm) dos biopolímeros à base de gelatina e quitosana sobre diferentes bactérias após 48 horas de incubação a 37°C 133
Tabela 5	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o halo de inibição (mm) das cepas de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 134
Tabela 6	Modelos codificados das regressões para atividade antimicrobiana contra <i>P. aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. enteritides</i> 138
Tabela 7	Perda de peso e pH dos bifes de <i>M. Semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle, no tempo zero e no sexto dia de armazenamento 139
Tabela 8	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para a perda de peso e pH de bifes <i>M. Semitendinosus</i> , no tempo zero e no quinto dia de armazenamento 140
Tabela 9	Modelos codificados das regressões para a perda de peso e pH 143
Tabela 10	Índice de TBARS dos bifes de <i>M. semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle no tempo zero, no sexto dia de armazenamento e valor de Δ TBARS 144
Tabela 11	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para

	o índice de TBARS de bifes <i>M.Semitendinosus</i> no tempo zero, no sexto dia de armazenamento e para o valor de Δ TBARS	145
Tabela 12	Modelos codificados das regressões para os índices de TBARS ...	147
Tabela 13	Pigmentos relativos da mioglobina dos bifes de <i>M. semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle, no tempo zero e no sexto dia de armazenamento	148
Tabela 14	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para metamioglobina (%MMb), deoximioglobina (%Mb+) e oximioglobina (%O ₂ Mb) de bifes de <i>M. semitendinosus</i> , no tempo zero.....	151
Tabela 15	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para metamioglobina (%MMb), deoximioglobina (%Mb+) e oximioglobina (%O ₂ Mb) e K572/K525 de bifes de <i>M. semitendinosus</i> , no sexto dia de armazenamento	152
Tabela 16	Modelos codificados das regressões para os pigmentos relativos da mioglobina e índice K572/K525	157
Tabela 17	Cor objetiva e valor de R630/R580 dos bifes de <i>M. semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle, no tempo zero e no sexto dia de armazenamento	159
Tabela 18	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a tonalidade (h) de bifes <i>M.Semitendinosus</i> , no tempo zero.....	160
Tabela 19	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a luminosidade (L*), índice de vermelho (a*), índice de amarelo (b*), saturação (C*), tonalidade (h*) e razão R630/R580 de bifes <i>M. semitendinosus</i> , no sexto dia de armazenamento.....	162
Tabela 20	Modelos codificados das regressões para os componentes da cor .	170

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Níveis utilizados no DCCR para dois fatores, para as variáveis óleo essencial de alecrim e óleo essencial de pimenta-da-jamaica	184
Tabela 2	Delineamento fatorial completo para combinação dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica	184
Tabela 3	Constituição química do OE de folhas frescas de alecrim, identificado por CG/EM, e seus respectivos teores	192

Tabela 4	Constituição química do OE de folhas frescas de pimenta-da-jamaica, identificado por CG/EM, e seus respectivos teores	194
Tabela 5	Perda de peso dos bifes de <i>M.Semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle, no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento	197
Tabela 6	Índice de TBARS dos bifes de <i>M. semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle no tempo zero, no sétimo dia de armazenamento e valor de Δ TBARS	198
Tabela 7	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o índice de TBARS de bifes <i>M.Semitendinosus</i> no tempo zero, no sétimo dia de armazenamento e para o valor de Δ TBARS	199
Tabela 8	Modelos codificados das regressões para os índices de TBARS ...	203
Tabela 9	Pigmentos relativos dos bifes de <i>M. semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle, no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento	205
Tabela 10	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para O_2 Mb de bifes <i>M.semitendinosus</i> bovino, no tempo zero	206
Tabela 11	Modelo codificado da regressão para o conteúdo de O_2 Mb.....	208
Tabela 12	Cor objetiva e valor de R630/R580 dos bifes de <i>M. semitendinosus</i> revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle, no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento.....	209
Tabela 13	Coefficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para os índices de vermelho (a^*) e saturação (C^*) da cor de bifes de <i>M. semitendinosus</i> , no tempo zero	210
Tabela 14	Modelos codificados das regressões para os componentes da cor .	212

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	23
1	INTRODUÇÃO	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1.	A cor da carne fresca	28
2.2.	Oxidação lipídica da carne	31
2.3.	Microrganismos deterioradores e patogênicos em carnes	33
2.4	Sistemas de embalagens para carne fresca	35
2.5	Revestimentos comestíveis	39
2.5.1.	Tipos e formação de biopolímeros	41
2.5.2	Aplicações de revestimentos comestíveis	45
2.5.3	Incorporação de antimicrobianos e antioxidantes nos filmes de revestimento	47
2.5.4	Plastificantes	52
	REFERÊNCIAS	55
	CAPÍTULO 2 Otimização de revestimentos comestíveis à base de gelatina, quitosana e glicerina para aumento da qualidade e da vida útil de carne bovina refrigerada	65
1	INTRODUÇÃO	67
2	MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1.	Delineamento experimental	70
2.2	Preparo das soluções de revestimento	72
2.3	Obtenção e porcionamento dos bifes	72
2.4	Aplicação dos revestimentos	73
2.5	Armazenamento e amostragem	73
2.6	Análises físicas e bioquímicas na carne	74
2.6.1	Perda de peso	74
2.6.2	Índice de TBARS	74
2.6.3	Pigmentos relativos da mioglobina	75
2.6.4	Análise objetiva da cor	76
2.7	Análise estatística	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1	Perda de peso	78
3.2	Índice de TBARS	84
3.3	Pigmentos relativos da mioglobina	89
3.4	Cor Objetiva	95
	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	113
	CAPÍTULO 3 Efeito de revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana na preservação de carne bovina refrigerada	117

1	INTRODUÇÃO	120
2	MATERIAL E MÉTODOS	122
2.1	Delineamento experimental	122
2.2	Preparo das soluções de quitosana para teste antimicrobiano ..	123
2.3	Preparo das soluções de revestimento	123
2.4	Determinação da atividade antimicrobiana das soluções de quitosana e dos filmes de gelatina + quitosana	124
2.4	Obtenção e porcionamento dos bifes	125
2.5	Aplicação dos revestimentos	125
2.6	Armazenamento e amostragem	126
2.7	Análises físicas e bioquímicas na carne	127
2.7.1	Perda de peso e pH	127
2.7.2	Índice de TBARS	127
2.7.3	Pigmentos relativos da mioglobina	128
2.7.4	Análise objetiva da cor	129
2.7.5	Análise estatística	130
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
3.1	Atividade antimicrobiana da quitosana	131
3.2	Atividade antimicrobiana dos filmes	132
3.3	Perda de peso e pH	138
3.4	Índice de TBARS	143
3.5	Pigmentos relativos da mioglobina	147
3.6	Cor objetiva	158
4	CONCLUSÃO	172
	REFERÊNCIAS	173
	CAPÍTULO 4 Aplicação de revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana incorporados de óleos essenciais de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>) e pimenta-da-jamaica (<i>Pimenta dioica Lindl</i>), para conservação de carne bovina refrigerada	177
1	INTRODUÇÃO	179
2	MATERIAL E MÉTODOS	181
2.1	Óleos essenciais	181
2.1.1	Extração dos óleos essenciais	181
2.1.2	Determinação do teor de umidade e rendimento	182
2.1.3	Avaliação qualitativa e quantitativa dos constituintes dos óleos essenciais	182
2.2	Desenvolvimento e aplicação dos biopolímeros	183
2.2.1	Delineamento experimental	183
2.2.2	Preparo das soluções de revestimento	184
2.2.3	Obtenção e porcionamento dos bifes	185
2.2.4	Aplicação dos revestimentos	185

2.2.5	Armazenamento e amostragem.....	186
2.2.6	Avaliação dos tratamentos.....	187
2.2.6.1	Perda de peso	187
2.2.6.2	Índice de TBARS	187
2.2.6.3	Pigmentos Relativos da Mioglobina.....	188
2.2.6.4	Análise da cor objetiva.....	189
2.2.7	Análise estatística	189
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	191
3.1	Óleos essenciais	191
3.2	Perda de peso	196
3.3	Índice de TBARS	197
3.4	Pigmentos relativos da mioglobina	203
3.5	Cor objetiva	208
4	CONCLUSÃO	214
	REFERÊNCIAS	215
	CONCLUSÕES GERAIS	219

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de prolongar a vida útil da carne fresca é desejável não apenas por motivos econômicos, mas também por mudanças ocorridas no perfil do mercado e do consumidor. Uma maior vida útil permite responder ao intervalo de tempo entre a produção e a distribuição dos produtos para atender a mercados mais distantes, reduzir perdas econômicas e compensar as flutuações da demanda. Além disso, é possível conseguir a centralização da preparação de cortes para o mercado institucional e para a venda no varejo, com benefícios econômicos e técnicos em termos de qualidade da carne, satisfazendo a um mercado consumidor cada vez mais exigente e seletivo.

Nesse sentido, a venda do produto embalado possibilita a comercialização de carne bovina e suína com marca comercial, traduzindo em mais possibilidades de mercado para a indústria de carne e produtos de melhor qualidade para o consumidor. O prévio acondicionamento em bandejas, pelo próprio frigorífico, permite que a carne, depois de embalada, só seja reaberta no momento do consumo, garantindo um produto com qualidade e mais seguro, o que tem levado as indústrias a especificar com mais critério os sistemas de acondicionamento.

Um dos sistemas mais utilizados no acondicionamento da carne é a embalagem a vácuo, empregada tanto para carnes processadas como em cortes primários e secundários frescos. Outro sistema, a embalagem com atmosfera controlada (CAP), na qual a composição da atmosfera usada não se altera durante a estocagem do produto, utiliza altas concentrações de CO₂ ou N₂, isoladamente ou em conjunto, em uma embalagem com um espaço livre adequado. Nestes sistemas, o princípio básico é a redução da atividade

microbiana pela inibição de microrganismos aeróbios, mas, tanto para o sistema a vácuo como o CAP, a forma dominante do pigmento da carne é a deoximioglobina, que apresenta cor vermelho-púrpura-escura, pouco atrativa para o consumidor.

Embora o sistema a vácuo e o CAP possibilitem a extensão da vida útil de um produto fresco (9 a 12 semanas quando armazenado a $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), para aplicações domésticas em regiões com alta densidade populacional, tem aumentado a adoção do uso de atmosfera modificada (MAP) com alta concentração de O_2 para carnes frescas (30% a 80% O_2 e 20% a 70% CO_2). O oxigênio é importante, pois combina com a mioglobina para a manutenção da atrativa cor vermelho-brilhante da carne fresca, tão apreciada pelo consumidor. Este sistema, no entanto, limita a vida útil da carne em duas a três semanas sob refrigeração (2°C), seja devido à ação microbiana ou à oxidação da gordura, favorecidas pela presença do O_2 , ou à oxidação do pigmento, formando uma cor marrom indesejável na superfície.

Comparado com o sistema a vácuo, o uso de embalagens MAP com misturas gasosas exige uma etapa a mais de processo, referente à injeção dos gases, e implica na utilização de material de embalagem rígido e em maior quantidade, devido à necessidade de grande volume de espaço livre, requerendo maior espaço para a estocagem refrigerada. Devido a isso e ao fato de que no mercado interno brasileiro o que se registra é uma competitividade baseada exclusivamente no preço, o sistema a vácuo é o mais utilizado no país para cortes de carne bovina.

Ainda assim, nos balcões de autoatendimento dos supermercados brasileiros, é muito difundido o método convencional de reacondicionamento da carne, que remove a embalagem a vácuo original e reembala a carne em bandejas plásticas envoltas em filmes de alta permeabilidade ao oxigênio, como o policloreto de vinila (PVC), garantindo a cor vermelho-brilhante atrativa para

o consumidor no momento da compra. No entanto, a microbiota deteriorante e a oxidação do pigmento limitam a vida útil desta carne em cerca de 2 a 4 dias, dependendo da temperatura de refrigeração e do tipo de corte.

Uma alternativa para os problemas citados pode ser o uso de filmes e revestimentos comestíveis, que vem se tornando um tópico de grande interesse devido ao seu potencial para evitar a deterioração dos alimentos por degradação oxidativa e reações respiratórias, melhorando, assim, a qualidade dos produtos e aumentando sua vida útil. O uso de películas com esse propósito constitui vantagem econômica, evitando a necessidade de estocagem em atmosfera controlada que implicaria em custos operacionais e de equipamento.

Entre as propriedades funcionais dos filmes biodegradáveis podem ser mencionadas a barreira ao vapor de água, o transporte de gases (oxigênio e gás carbônico) e de solutos, a retenção de compostos aromáticos e a possibilidade de incorporação de aditivos. Dessa forma, a proliferação microbiana e a descoloração na superfície do produto, bem como a perda excessiva de exsudado da carne, podem ser controladas mediante a utilização de revestimentos comestíveis à base de biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos e lipídios, incorporados com compostos antimicrobianos e antioxidantes.

O uso de agentes antioxidantes e conservantes naturais em produtos cárneos tem sido estudado devido à demanda, pelo consumidor, por alimentos “orgânicos” ou “naturais”. O interesse também tem se baseado nas restrições ao uso dos antioxidantes sintéticos, devido à possibilidade de efeitos carcinogênicos. Por esse motivo, estudos envolvendo a aplicação óleos essenciais, tais como com alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica Lindl*), isolados ou em conjunto, em produtos cárneos têm aumentado. Além disso, vários compostos, como a quitosana, têm sido reconhecidos como potentes agentes antimicrobianos.

Diante do exposto, nesta pesquisa objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de revestimentos comestíveis à base de gelatina, quitosana, glicerina e óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica na conservação de bifes de carne bovina refrigerada. A otimização do revestimento foi feita nas duas primeiras etapas e a adição das combinações dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica ao revestimento foi feita na terceira e última etapa. Em cada etapa foram avaliados o índice de TBARS, a perda de peso, os pigmentos relativos da mioglobina e a cor objetiva dos bifes de carne bovina envoltos pelos revestimentos comestíveis.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os consumidores modernos estão, a cada dia, tornando-se mais exigentes na escolha de produtos alimentícios. Eles demandam alimentos frescos, de alta qualidade, sem conservantes químicos, convenientes e cada vez mais inovadores. Essa atitude é observada para todos os tipos de alimentos e tem impulsionado os produtores e os processadores de alimentos a buscarem novas tecnologias a fim de se tornarem mais competitivos (RAMOS; GOMIDE, 2007).

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

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

Embora algumas das alterações do produto não se devam à atuação de microrganismos, o crescimento microbiano é o fator mais importante que influencia a qualidade da carne. A carne *in natura* tem vida útil de um dia ou menos, quando permanece à temperatura ambiente (20 °C a 30 °C), mas pode ser preservada por mais tempo à temperatura de refrigeração, inferior ou igual a 4°C (LAMBERT; SMITH; DOODS, 1991). Sinais de deterioração, como aromas desagradáveis, são detectados quando a população atinge cerca de 10^7 UFC/cm² e a limosidade torna-se aparente somente quando a população está próxima a 10^8 UFC/cm² (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 2000).

2.1. A cor da carne fresca

A cor e a aparência são os maiores, senão os mais importantes, atributos de qualidade de alimentos, sendo critérios muito utilizados para estabelecer limites que sugerem parâmetros para avaliar a qualidade da carne. É pela cor do alimento que este alcança as melhores classificações e, efetivamente, os maiores preços, relacionando-se diretamente com a qualidade da matéria-prima. A cor constitui o primeiro impacto sobre o consumidor, despertando o desejo de consumir ou de rejeitar o produto, além de também fornecer uma indicação, embora nem sempre correta, sobre o grau de conservação do alimento (RAMOS; GOMIDE, 2007).

A cor da carne fresca está associada à proporção e à distribuição relativa de três formas químicas da mioglobina: mioglobina reduzida ou deoximioglobina (Mb^+), de coloração vermelho-púrpura; oximioglobina (O_2Mb), de coloração vermelho-brilhante e metamioglobina (MMb), de coloração marrom (LIVINGSTON; BROWN, 1981). É raro quando apenas uma destas formas químicas se encontra presente na superfície da carne. Geralmente,

duas ou mais formas estarão presentes, mas a cor resultante será aquela característica da forma química predominante. Por exemplo, a carne fresca exposta ao oxigênio usualmente possui as três formas químicas principais (O_2Mb , MMb e Mb^+), mas, enquanto a O_2Mb predominar na superfície, a cor da carne será vermelho-brilhante. Entretanto, se 60% dos pigmentos de uma área particular se oxidarem a MMb , esta área aparecerá marrom (SEIDEMAN et al., 1984).

A tensão de oxigênio exerce importância fundamental na manutenção da cor desejável da carne, tendo influência direta na oxidação de seus pigmentos. Para se evitar a autooxidação da mioglobina e a consequente formação de MMb , a tensão de oxigênio deve ser mantida ou muito elevada, prevalecendo o pigmento de O_2Mb , ou muito baixa, prevalecendo o de Mb^+ . A taxa de oxidação aumenta com a redução da pressão de oxigênio, sendo máxima em pressões próximas de 7,0 mm Hg (variável com o pH e a temperatura) (RICHARDSON, 2003).

O processo de oxidação e redução das formas químicas da mioglobina está sempre ocorrendo no músculo vivo e por um tempo *post mortem* significativo. O processo de redução da MMb a Mb^+ é realizado por um sistema de enzimas redutoras, NADH dependentes, presentes no músculo, denominado metamioglobina redutase (MRA) (O'KEEFE; HOOD, 1982). Este complexo enzimático está ativo no músculo vivo e também permanece em atividade após a morte do animal.

Entretanto, o músculo não pode manter a capacidade redutora por muito tempo e, à medida que o pH muscular cai, ocorre um aumento na concentração de MMb na carne. Este aumento ocorre, possivelmente, devido à redução da atividade das enzimas MRA presentes na carne e à redução na geração de coenzimas redutoras (NADH e NADPH), responsáveis pela redução da MMb a Mb^+ e sua posterior oxigenação a O_2Mb (VARNAM; SUTHERLAND, 1995). Segundo Zhu e Brewer (1998), a perda de atividade do sistema MRA durante o

armazenamento é acentuada quando a carne é mantida exposta à luz. Quando o potencial de oxirredução da carne é esgotado, a descoloração torna-se irreversível.

Dessa forma, quando a carne é armazenada refrigerada (2°C), porém exposta a altos níveis de oxigênio, a sua vida útil torna-se limitada a menos do que duas semanas. Neste período, se não houver uma ação microbiana, haverá seguramente uma conversão do pigmento de O₂Mb a MMb, devido à perda dos sistemas redutores da carne, ocasionando sua descoloração (SØRHEIM; NISSEN; NESBAKKEN, 1999).

Está bem definido que existem grandes diferenças na taxa de descoloração da carne de diferentes músculos, de diferentes espécies e de animais com dietas diferenciadas (TROUT, 2003). O'Keefe e Hood (1982) verificaram que músculos mais oxidativos, como o *M. psoas major* (filé mignon), possuíam maior taxa de consumo de oxigênio (TCO) e apresentavam-se mais propensos à descoloração do que músculos menos oxidativos, como *M. longissimus dorsi* (contrafilé), mais estáveis. Mesmo observando uma maior atividade de MRA no músculo *longissimus dorsi*, estes autores postularam que a alta TCO em músculos mais oxidativos acarreta maior conversão de O₂Mb a Mb⁺ e, uma vez que este último pigmento é mais propenso à oxidação, o maior consumo de oxigênio é responsável pela descoloração mais rápida da carne.

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

Uma medida importante na análise dos pigmentos da carne é a proporção de reflectância da superfície de 572 nm para 525 nm, que é usada para descrever a quantidade de metamioglobina acumulada sobre a superfície de um bife (MCKENNA et al., 2005). Stewart, Zisper e Watts (1965) estabeleceram

uma relação linear entre $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ e a porcentagem de MMb. Eles reportaram que valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ iguais a 1,40 e 1,30 correspondem a 0% e 13% de MMb, respectivamente. Valores de 1,20; 1,10; 1,00 e 0,90 correspondem a, aproximadamente, 21%, 33%, 46% e 59% de MMb, respectivamente.

2.2. Oxidação lipídica da carne

Os lipídeos têm papel determinante na aceitação da carne, já que a sua concentração e composição influenciam fortemente as propriedades sensoriais (textura, sabor, cor e aroma). A oxidação lipídica é o principal processo pelo qual ocorre perda de qualidade da carne e seus produtos, depois da deterioração microbiana. Além da alteração de odor e gosto, ela está relacionada também com a oxidação dos pigmentos da carne, provocando perda de cor. Alguns fatores afetam o processo de oxidação, entre eles, fatores ambientais (umidade, temperatura, luz e oxigênio), presença de metais (cobre, ferro e manganês), enzimas e pigmentos (PINO, 2005).

A oxidação lipídica está relacionada com o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, causadas por complexas reações de oxidação, hidrólise, polimerização, pirólise, dentre outras, sofridas pelos ácidos graxos insaturados, resultando na formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos, impróprios para o consumo. Compromete, ainda, a biodisponibilidade de vitaminas, proteínas e pigmento, reduzindo o valor nutricional dos alimentos (TAWFIK et al., 1997).

Os mecanismos reacionais da oxidação lipídica dependem de diversos fatores que controlam a estabilidade lipídica, podendo ser influenciados pela estrutura química do lipídio, o número e a natureza das insaturações, fatores ambientais (exposição à luz, O_2 , temperatura), íons metálicos (cobre e ferro),

atividade de água, reações ionizantes, presença de enzimas (metaloproteínas e lipoxigenases) e pigmentos (ANGELO, 1996). Além disso, a oxidação lipídica também é influenciada pelas condições de processamento, a exemplo de trituração, moagem, entre outros, favorecendo a ação enzimática provocada pela ruptura dos compartimentos celulares (HASENHUETTL; WAN, 1992).

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

A oxidação lipídica está na origem do desenvolvimento do ranço, da produção de compostos responsáveis por sabores e odores desagradáveis, da reversão e da ocorrência de um elevado número de reações de polimerização e de cisão. Estes tipos de reações não só diminui o tempo de vida e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como também podem gerar compostos nocivos, como cetonas, aldeídos, alcoóis, hidrocarbonetos e epóxidos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A fotooxidação é um mecanismo que envolve a adição direta de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) aos ácidos graxos insaturados. O oxigênio singlete reage diretamente com as duplas ligações presentes nos ácidos graxos insaturados, produzindo hidroperóxidos conjugados e não conjugados. A forma mais importante de geração do oxigênio singlete é a exposição à luz na presença de um fotosensibilizador. Clorofilas e compostos heme contendo ferro são fotosensibilizadores que ocorrem naturalmente nos alimentos. A estrutura básica destas moléculas é um anel porfirínico coordenado a um átomo central de magnésio (no caso da clorofila) e de ferro (no caso dos compostos heme). Estes

compostos absorvem luz na região do UV próximo e do visível, transferindo a energia para o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), tornando-o 1.500 vezes mais reativo na forma de $^1\text{O}_2$ (LABUZA, 1971).

A energia radiante de fontes luminosas ou artificiais, seja ultravioleta ou visível, afeta de modo significativo a estabilidade de alimentos fotosensíveis, pois tem efeito deteriorativo, uma vez que inicia e acelera reações de degradação por meio da ação fotoquímica (SILVERSTEIN; BASSLER; NORRIL, 1987).

2.3. Microrganismos deterioradores e patogênicos em carnes

Em relação aos tipos de alimentos, dentre outros produtos frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares, as carnes merecem destaque, pois possuem elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento de microrganismos e elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas, tornando-se excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deterioradores (CARDOSO; ARAUJO, 2001).

Os patógenos de origem alimentar comumente presentes em carnes são *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*, que são responsáveis por um grande número de surtos, casos e óbitos (OUSSALAH et al., 2007).

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São bactérias gram-negativas aeróbias facultativas que podem crescer na presença de oxigênio. Há apenas duas espécies neste gênero, algumas subespécies e inúmeros sorovares (mais de 2.400 já identificados) (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). As salmonelas são bacilos móveis, com flagelos peritríquios, que tipicamente fermentam a glicose e a manose sem produção de gás, mas não fermentam a lactose nem a sacarose. A maioria produz H_2S , é móvel, com flagelos peritríquios (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2008).

Listeria monocytogenes é bastonete curto gram-positivo com 1-2 µm de comprimento, não forma esporos, aeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase negativo e móvel. A característica que distingue *L. monocytogenes* de outros patógenos de origem alimentar, como a *Salmonella*, é a taxa de mortalidade mais elevada, além da menor dose infectante requerida (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2008).

Outro importante agente de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) é o gênero *Staphylococcus* spp., que abrange bactérias gram-positivas, aeróbios facultativos e algumas coagulase positiva, ou seja, capazes de produzir enzima coagulase (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). A principal espécie envolvida em DTAs é o *Staphylococcus aureus*, uma espécie coagulase positiva que tem cepas capazes de produzir enterotoxinas termoestáveis que, quando ingeridas, causam intoxicações alimentares (PARDI et al., 2006). A presença do gênero *Staphylococcus* spp. em número elevado indica falhas de higiene, principalmente na manipulação, além do perigo potencial à saúde pública pela presença de enterotoxinas (OLIVEIRA et al., 2003).

Os microorganismos deterioradores, como os do gênero *Pseudomonas*, são bactérias gram-negativas que vivem especialmente no solo e na água, produtoras de enzimas proteolíticas e lipolíticas e estão associadas à deterioração de carne *in natura* (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

A *Escherichia coli* é um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de uma variedade de animais. São bactérias gram-negativas, não esporuladas, capazes de fermentar glicose produzindo ácido e gás. Os coliformes são indicadores que, além de refletir as condições higiênico-sanitárias durante a produção e/ou armazenamento, levantam a suspeita de patógenos de origem entérica associados, advindos da mesma fonte de contaminação (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), que estabelece padrões microbiológicos sanitários para alimentos, no item 5a do anexo I, as carnes resfriadas ou congeladas de bovinos *in natura* para serem comercializadas devem apresentar ausência de *Salmonella* sp.

2.4 Sistemas de embalagens para carne fresca

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

Comercialmente, no Brasil, a embalagem mais utilizada para carnes frescas é de filmes plásticos de altíssima permeabilidade ao oxigênio e baixa permeabilidade ao vapor de água, que podem manter a coloração vermelha, ao mesmo tempo em que protegem o produto da desidratação superficial. Utilizam-se filmes de alta permeabilidade a gases, mas que não exercem controle sobre a deterioração microbiana. Para carne *in natura*, têm sido utilizados filmes de policloreto de vinila (PVC) ou poliolefinicos coextrusados, esticáveis ou encolhíveis, com permeabilidade na faixa de 8.000 a 20.000 cm³ (CNTP) O₂/(m²/dia), a 25 °C e 1 atm (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001). Os filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) monocamada, devido ao fato de sua taxa de permeabilidade ao oxigênio não ser muito alta, normalmente inferior a 8.000 cm³ (CNTP) O₂/(m²/dia), não são recomendados

para embalagens de varejo de carne bovina *in natura*, pois favorecerão o escurecimento rápido do produto (SARANTÓPOULOS; ANTÔNIO, 2006).

No entanto, a microbiota deteriorante, composta, principalmente, por *Pseudomonas* sp., e a oxidação da O₂Mb a MMb limitam a vida útil da carne na bandeja em cerca de 4 a 7 dias, dependendo da temperatura de refrigeração e do tipo de corte (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001). Comercialmente, este período é muito curto para permitir a centralização das operações de embalagens em bandejas, uma vez que o tempo estimado entre a embalagem nas plantas processadoras e sua exposição ao varejo, considerando as flutuações de demanda, é de cerca de três semanas (JAYASINGH et al., 2001).

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

Há duas maneiras comumente usadas pela indústria alimentícia para modificar a atmosfera gasosa no interior de um produto embalado: a primeira, e mais simples, é a aplicação de vácuo e a segunda, a introdução de gases desejados, após evacuação e antes do fechamento da embalagem. A embalagem a vácuo consiste em envolver o produto em um filme de baixa permeabilidade ao oxigênio, com remoção do ar da embalagem, e aplicação de uma selagem hermética (SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990). A embalagem a gás é uma extensão deste processo, envolvendo a remoção do ar da embalagem e sua substituição por gases específicos, um único gás ou a combinação deles (CHURCH; PARSONS, 1995).

Atualmente, cerca de 85% das carnes frescas e a maioria das carnes processadas na América do Norte são embaladas sob vácuo ou distribuídas embaladas utilizando embalagens de atmosfera modificada contendo um ou mais gases (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Garantindo-se que as temperaturas de estocagem sejam mantidas baixas (-1,5°C), a vida útil de carnes frescas pode alcançar entre 9 e 12 semanas.

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

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

conversão da cor arroxeada à atrativa cor vermelho-brilhante resultante da oxigenação dos pigmentos superficiais da carne (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001).

A grande categoria de MAP (embalagem com atmosfera modificada) usada em carnes é a embalagem com atmosfera controlada (CAP), na qual a composição da atmosfera utilizada não se altera durante a estocagem do produto. Isto pode ser obtido pelo uso de altas concentrações de CO₂ ou N₂ isoladamente ou em conjunto em uma embalagem com um espaço livre adequado (HOLLEY; GILL, 2005). O CO₂ é o componente mais importante das misturas gasosas usadas na embalagem de alimentos em razão da sua atividade antimicrobiana (FARBER, 1991). Em embalagens com 100% de CO₂ e mantidas a 4°C, a vida útil da carne pode chegar a 45 dias. No entanto, da mesma forma que no sistema a vácuo, a forma dominante do pigmento da carne no sistema CAP é a Mb⁺ de cor vermelho-púrpura, pouco atrativa para o consumidor.

Além dos gases CO₂ e N₂, pode-se utilizar o O₂ em uma variedade de combinações para se obter a cor vermelho-brilhante desejada. As combinações de gases usados podem ter altas (80%) ou baixas (16%) concentrações de oxigênio, nas quais o N₂ é usado como gás inerte de enchimento combinado com determinada proporção de CO₂ (menor que 20%) que retarda a deterioração microbiana, conferindo maior estabilidade ao produto. Estes sistemas usam filmes de embalagem com uma camada com barreira ao O₂ (cloreto de polivinilideno, PVDC, ou náilon) e quase sempre estas embalagens são mantidas durante a estocagem e a distribuição a 4°C (SARANTÓPOULOS; ANTÔNIO, 2006). Em alguns países, pequena quantidade de monóxido de carbono (CO<0,5%) pode ser adicionada à baixa concentração de O₂ para o desenvolvimento do pigmento de carboximioglobina (COMb) de cor vermelho-cereja, similar ao vermelho-brilhante da O₂Mb (SØRHEIM; NISSEN; NESBAKKEN, 1999).

A adoção do MAP com alta concentração de O₂ para carnes frescas (30 a 80% O₂, e 20 a 70%CO₂) está aumentando, devido ao estabelecimento de instalações centralizadas especializadas na preparação de cortes e produtos em porções para varejo. Estas operações recebem cortes primários embalados a vácuo provenientes de abatedouros e usam sistemas para entregar produtos em porções controladas embaladas em MAP sob alta concentração de O₂ e implementam condições de fabricação cuidadosamente controladas. Os produtos são enviados para as lojas de varejo no dia seguinte e têm uma vida útil de 9 a 12 dias, a 4 °C, limitada principalmente pela autoxidação da O₂Mb (HOLLEY; GILL, 2005).

No entanto, segundo Jayasingh et al. (2001), a tecnologia ideal para a conservação de carnes mantidas sob refrigeração deveria proporcionar, pelo menos, 21 dias de estabilidade da cor, incluindo 7 dias para embalagem e distribuição, 7 dias para exposição no varejo e 7 dias para armazenamento após a compra.

Além disso, comparado com o sistema a vácuo, o uso de embalagens MAP com misturas gasosas exige uma etapa a mais de processo, referente à injeção dos gases, e implica na utilização de material de embalagem rígido e em maior quantidade, devido à necessidade de grande volume de espaço livre, requerendo maior espaço para estocagem refrigerada (SARANTÓPOULOS; ANTÔNIO, 2006). Devido a isso e ao fato de que no mercado interno brasileiro o que se registra é uma competitividade baseada exclusivamente no preço, o sistema a vácuo ainda é o mais utilizado no país para cortes de carne bovina.

2.5 Revestimentos comestíveis

Como alternativa aos filmes de origem sintética, biopolímeros ou filmes biodegradáveis, constituídos de materiais biológicos, como hidrocoloides e

lipídios, vêm sendo empregados há alguns anos em produtos alimentícios. O desenvolvimento e a caracterização desses filmes vêm sendo fortemente estudados, pois podem atuar como barreira a elementos externos como água e gases e ainda promover melhorias na resistência de alguns produtos em relação ao manuseio ou ao transporte. Além disso, aos filmes podem ser incorporados aditivos alimentícios, agentes antimicrobianos e fármacos (BATISTA, 2004).

Em frutas e vegetais, o uso de filmes e revestimentos comestíveis vem se tornando tópico de grande interesse, devido ao potencial para evitar a deterioração dos alimentos por degradação oxidativa e reações respiratórias, melhorando, assim, a qualidade dos alimentos e aumentando sua vida de prateleira (MCHUGH; HUXSOLL; KROCHTA, 1996).

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

A utilização dos filmes visa controlar a migração de água de um sistema alimentício, a permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono, a migração lipídica, manter qualidades desejáveis no alimento relacionadas a cor, sabor, aroma, doçura, acidez e textura e, ainda, podem conter aditivos alimentícios como antioxidantes e antimicrobianos, os quais visam retardar a taxa de deterioração (MCHUGH; KROCHTA, 1994).

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

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

2.5.1 Tipos e formação de biopolímeros

Os filmes e os revestimentos comestíveis são definidos por dois princípios. Primeiro, o termo comestível implica em os compostos usados na elaboração da embalagem serem GRAS, sigla em inglês que significa compostos geralmente reconhecidos como seguros pela Food and Drug Administration, a FDA, e processados dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF), estabelecidas para alimentos. Segundo, estes filmes e revestimentos devem ser feitos a partir de um polímero, tipicamente um biopolímero, já que a cadeia longa é necessária para dar certa insolubilidade e estabilidade à matriz da embalagem em meio aquoso (KESTER; FENNEMA, 1986).

De acordo com sua composição, os filmes e os revestimentos comestíveis podem ser classificados em três categorias:

1. **hidrocoloidais** - são filmes à base de polissacarídeos ou proteínas. Apresentam baixa permeabilidade a oxigênio, dióxido de carbono e lipídeos. No entanto, devido à natureza hidrofílica, têm baixa barreira ao vapor de água (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994);

2. **lipídicos** - são compostos de lipídeos, os quais, por sua natureza hidrofóbica, apresentam baixa permeabilidade ao vapor de água (GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1996). Existem muitos lipídeos em forma cristalina, com baixa permeabilidade aos gases e ao vapor de água (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994);

3. **compostos** - são à base de proteínas mais lipídeos ou polissacarídeos mais lipídeos. Podem existir como camadas separadas, ou associados, em que ambos os componentes são adicionados ao filme. Na atualidade, as pesquisas têm sido focalizadas sobre embalagens compostas porque combinam as vantagens de cada um dos componentes, reduzindo, assim, suas desvantagens (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994).

A base dos filmes e revestimentos comestíveis são os biopolímeros, como polissacarídeos, proteínas e lipídeos, derivados de várias fontes naturais. O uso de biopolímeros na elaboração de embalagens é condicionado pelas suas características físicas e pelas propriedades dos biofilmes obtidos, que são resultado da relação entre as características físico-químicas da macromolécula e a formulação utilizada (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000). A Tabela 1 apresenta as possíveis utilizações dos filmes, de acordo com sua natureza.

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

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

*um filme composto consiste de componentes combinados de lipídios e hidrocolóides para formar uma bicamada ou conglomerado. Fonte: Donhowe e Fennema (1994)

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

1. **fusão e solidificação**, usadas para gorduras sólidas e ceras;
2. **coacervação simples**, que consiste na precipitação do hidrocoloide que está disperso em solução aquosa. Esta precipitação pode ser obtida pela evaporação do solvente (secagem), pela adição de soluto não eletrólito e no qual o hidrocoloide não é solúvel (por exemplo, etanol), pela adição de eletrólito que induz precipitação ou cruzamento dos componentes, ou pela modificação do pH da solução;
3. **coacervação complexa**, que consiste em se obter a precipitação pela mistura de duas soluções de hidrocoloides com cargas elétricas opostas que interagem, formando o polímero complexo;
4. **gelificação ou coagulação térmica**, que consiste no aquecimento das macromoléculas que envolvem desnaturação, formação de gel e precipitação. Isto ocorre, por exemplo, quando a proteína ovoalbumina é aquecida. A gelificação também pode ser obtida pelo resfriamento rápido de uma solução hidrocoloide que se encontra aquecida. Por exemplo, o ágar a 95 °C está líquido e, quando resfriado a abaixo de 45 °C, forma gel, solidificando-se.

Na indústria alimentícia são usados, principalmente, os revestimentos, os quais podem ser aplicados nos alimentos por diferentes métodos, como pulverização, imersão ou aplicação com pincéis, seguido de uma etapa de secagem para revestimentos hidrocoloidais ou esfriamento para revestimentos à base de lipídeos (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998).

Os filmes desenvolvidos de acordo com as técnicas citadas podem ser aplicados utilizando-se os seguintes métodos: *dipping*, *spraying* e *casting*. *Dipping* e *spraying* baseiam-se na formação do filme no próprio produto que será recoberto. No primeiro caso, devido a um prévio mergulho na solução formadora de filme e no segundo, devido à aspensão desta solução sobre o

produto. Já a técnica *casting*, útil por formar filmes não fixos, é baseada em métodos desenvolvidos para filmes não-comestíveis e, por isso, representa menor investimento em pesquisas, além de ser a mais utilizada para analisar as propriedades filmogênicas dos biomateriais. Ela consiste na aplicação da solução formadora de filme em moldes, permitindo o controle da espessura dos filmes por meio da quantidade de matéria seca depositada nos suportes (GONTARD, 1994) e da variação da “espessura aparente” das soluções quando acondicionadas nos moldes (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995).

Os filmes são obtidos no laboratório pelo método *casting*, que consiste em espalhar a solução formadora do filme em superfície lisa e deixar secar. Na indústria, os filmes podem ser obtidos mediante os mesmos métodos usados para filmes plásticos flexíveis, como extrusão e coextrusão para filmes multicamadas, laminação e, principalmente, por secagem em rolos para a remoção do solvente da solução polimérica (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998).

Os biopolímeros mais utilizados na elaboração de filmes e coberturas comestíveis são as proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína, proteínas miofibrilares), os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato, carragena) e os lipídeos (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ésteres de ácido graxo) (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995).

Filmes constituídos de proteínas e polissacarídeos geralmente apresentam propriedades mecânicas adequadas a algumas aplicações, permeabilidade seletiva aos gases oxigênio e dióxido de carbono e aos aromas, porém, não atuam como bons constituintes de barreira à umidade devido às suas características hidrofílicas. Contudo, alguns filmes de polissacarídios podem retardar a perda de umidade de alguns alimentos, quando aplicados na forma de

gel, que funciona como agente sacrificante, ou seja, a umidade do gel evapora antes da desidratação do alimento revestido (KESTER; FENNEMA, 1986).

Por outro lado, filmes apenas com lipídios, devido à característica hidrofóbica, são resistentes à passagem de água, o que denota permeabilidade ao vapor de água reduzida, porém, apresentam-se muito quebradiços, o que reflete em baixa resistência mecânica. Os filmes lipídicos apresentam-se, ainda, opacos e podem promover sabores estranhos resultantes de processos oxidativos (GALLO et al., 2000). Dessa forma, para que haja melhoria das características funcionais dos filmes, geralmente são realizadas misturas de hidrocolóides (proteínas ou polissacarídeos) com substâncias hidrofóbicas (lipídios), originando, assim, filmes compostos. Quando os polímeros são combinados, eles podem interagir física e quimicamente e resultar em filmes com melhores propriedades (SHIH, 1996).

2.5.2 Aplicações de revestimentos comestíveis

Filmes comestíveis são aplicados para prolongar a vida útil de vegetais e produtos animais, especialmente em formas não processadas, para embalar alimentos prontos para consumo, produtos de açougue, e podem agir como carreadores de conservantes, aditivos de processo de especiarias (TEDERKO, 1995).

Exemplos práticos das características funcionais da aplicação de biopolímeros comestíveis são dados por diversos autores, como, por exemplo, o uso de revestimentos de superfície para minimizar a difusão de sal para dentro do alimento, tal como camarão e caranguejo, durante seu congelamento em salmoura (GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1986).

Andres (1985) verificou que líquidos viscosos transformam-se em filmes protetores durante o aquecimento, diminuindo a quantidade de óleo absorvida

pelo alimento. O mesmo autor também citou filmes que funcionam como barreira contra a evaporação da umidade em carnes, que resulta em perda de peso e de qualidade do produto e, ainda, filmes aplicados em pizzas, prevenindo potenciais problemas com deslocamentos e perdas de ingredientes, como azeitonas, fatias de tomate, etc.

Revestimentos à base de alginato de cálcio têm sido propostos em carcaça de cordeiro para reduzir a população microbiana e preservar o sabor e as características sensoriais (LAZARUS et al., 1976) e em carne bovina para a manutenção da cor desejada (WILLIAMS; OBLINGER; WEST, 1978).

Na indústria de carnes, os revestimentos à base de carragenina têm sido utilizados para evitar a desidratação superficial de carnes frescas e congeladas (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998).

Revestimentos comestíveis à base de proteína isolada de soro e acetilmonoglicérides aplicados no salmão reduziram a perda de água de 42% a 65%, durante as três primeiras semanas de estocagem em temperatura de congelamento a -23°C (STUCHELL; KROCHTA, 1995).

López-Caballero et al. (2004) relataram que coberturas de gelatina são convenientes barreiras ao O₂ devido à sua estabilidade em temperaturas baixas. Whiteman, Weston e Rosenthal (1971) estabeleceram que coberturas com 10% a 50% de gelatina e 50% a 90% de álcool poliidríco permitem acesso limitado de oxigênio à carne.

Moorjane et al. (1978) obtiveram melhores valores de umidade (entre 15% e 21%) em carne de frango defumada tratada com revestimento de etileno-glicol/gelatina (4:1 peso/peso), quando comparados com o controle sem revestimento, nos tempos de 7 dias a 27 dias, a 31 °C.

Cardoso et al. (2009) e Cardoso, Ramos e Ramos (2009a) estudaram os efeitos da aplicação de revestimento à base de gelatina e glicerina, adicionados de diferentes concentrações de ácido ascórbico, na formação e na manutenção da

cor da carne armazenada em sistema aeróbico. Seus resultados evidenciaram o potencial de uso deste sistema na conservação da carne *in natura* refrigerada.

O uso de revestimento à base de gelatina contendo misturas de óleo essencial (OE) favorece a estabilidade da cor da carne embalada em condições aeróbicas e a melhora na cor vermelha dos produtos pode ser atribuída à ação do óleo essencial de orégano (CARDOSO; RAMOS; RAMOS, 2009b).

Assim, o uso de filmes e revestimentos comestíveis nos alimentos tem diversos objetivos, dos quais os mais importantes são: reduzir a perda de umidade, controlar a permeabilidade aos gases, controlar a atividade microbiana, preservar a integridade estrutural dos produtos e possibilitar liberação gradual do sabor e de antioxidantes em alimentos (ARVANITOYANNIS; PSOMIADOU; NAKAYAMA, 1996). O fino recobrimento sobre o produto alimentício age como barreira aos elementos externos, como umidade, óleo, vapor orgânico, protegendo-o e estendendo sua vida de prateleira (GUILBERT; CONTARD; GORRIS, 1996; KROCHTA; DEMULDER-JOHNSTON, 1997).

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

2.5.3 Incorporação de antimicrobianos e antioxidantes nos filmes de revestimento

Uma inovação da embalagem comestível é que ela pode carrear aditivos alimentares, como antimicrobianos, vitaminas, saborizantes, antioxidantes, nutrientes, corantes e outros ingredientes funcionais, interagindo com o alimento para se obter um resultado desejável. Essa interação objetiva melhorar a

estabilidade, a qualidade, a segurança e a funcionalidade dos alimentos (LABUZA; BREENE, 1989).

Na maioria dos alimentos frescos ou processados, a contaminação microbiana ocorre, em maior intensidade, na superfície dos mesmos, requerendo um controle efetivo do crescimento microbiano neste local (PADGETT; HAN; DAWSON, 1998). Tradicionalmente, os antimicrobianos são adicionados diretamente aos alimentos, mas sua atividade pode ser inibida por muitas substâncias do próprio produto, diminuindo a sua eficiência. Nestes casos, o emprego de filmes ou revestimentos antimicrobianos pode ser mais eficiente do que o uso direto de antimicrobianos no alimento, pois o antimicrobiano migra seletiva e gradualmente da embalagem para a superfície do alimento, mantendo-se, assim, altas concentrações onde são mais necessárias (OUATTARA et al., 2000).

Dentre os antimicrobianos mais utilizados em filmes e revestimentos, a quitosana tem recebido grande atenção, devido não apenas à sua ação bactericida e fungicida, mas também por possuir boas propriedades formadoras de filmes.

A quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza (ROMANAZZI et al., 2002). Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina), apresentando cadeia polimérica similar à da celulose (Figura 1). Devido às suas características atóxicas e de fácil formação de géis, a quitosana tem sido considerada, há décadas, como composto de interesse industrial e, especialmente, de uso farmacêutico. Recentemente, contudo, uma série de estudos têm sido publicados, caracterizando o seu uso como coberturas de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999). Sua aplicação também se estende a produtos cárneos.

Kanatt, Chander e Sharma (2007, 2008) avaliaram a ação da quitosana, juntamente com extrato de hortelã como antioxidante, na conservação de salame, e a ação de um complexo quitosana-glicose em carne moída de cordeiros e salame contra *E. coli*, *Pseudomonas*, *S. aureus* e *B. cereus*, confirmando sua efetividade como agente antimicrobiano em carnes e produtos cárneos.

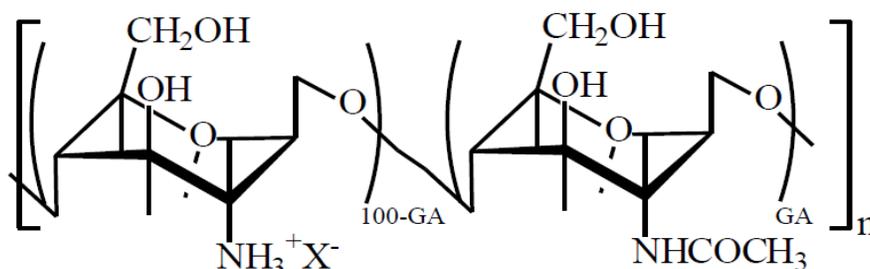


Figura 1 Estrutura molecular da quitosana

A incorporação de agentes antioxidantes também é vantajosa para a produção de filmes de revestimento, uma vez que pode diminuir grande parte da ocorrência de rancificação.

O uso de antioxidantes, como forma de inibir a oxidação, deve-se à sua facilidade de emprego, eficiência, baixo custo, termorresistência, ‘neutralidade’ sensorial e ausência reconhecida de toxicidade (SILVA, 1999). O uso de antioxidantes confere proteção à cor, reduzindo os danos causados por intermediários da oxidação (DREHMER, 2005 citado por RAMOS; GOMIDE, 2007). De acordo com Brasil (1965, p. 3), “antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento”.

O uso de antioxidantes naturais em produtos cárneos tem sido estudado devido à demanda do consumidor por alimentos “orgânicos” ou “naturais”. O interesse também tem se baseado nas restrições ao uso dos antioxidantes

sintéticos, que podem apresentar efeitos carcinogênicos (HERNÁNDEZ-HERNANDEZ et al., 2009).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas e apresentam uma multiplicidade de aplicações, podendo-se destacar, principalmente, sua aplicação como antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes e inseticidas naturais. Dependendo da família, podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Podem ser estocados em certos órgãos, tais como nas flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes. São, geralmente, incolores ou ligeiramente amarelados, sendo poucos os óleos que apresentam coloração. Em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. A maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas utilizadas na sua identificação e controle de qualidade (SIMÕES et al., 2007).

O mercado mundial de óleos essenciais gira em torno de US\$ 1,8 bilhão, sendo a participação do Brasil de apenas 0,1%, com 80% referindo-se ao comércio de óleo essencial de laranja, cujos principais consumidores estão incluídos nos setores de higiene pessoal, perfumaria e cosmética (COSTA, 2008). No entanto, os óleos essenciais têm atraído a atenção de pesquisadores de outras áreas, devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano, flavorizantes, aromático, antisséptico, carminativo, antiespasmódico e expectorante, com um mercado apresentando crescimento acima de 20% ao ano (JAKIEMIU, 2008).

Por serem considerados seguros (GRAS), o uso de óleos essenciais em alimentos tem sido adotado para melhorar o sabor, o aroma e, ainda, por sua capacidade antioxidante e antimicrobiana. No ano de 1992, o timol foi avaliado pelo Comitê de Especialistas em Substâncias Aromatizantes do Conselho

Europeu e, desde então, sua adição em alimentos foi permitida em uma concentração máxima de até 50 mg/kg e, para bebidas, de 10 mg/kg. No Brasil ainda não há referência na legislação quanto ao uso dessa substância em alimentos (JAKIEMIU, 2008).

Em relação à atividade antimicrobiana, os óleos essenciais interagem com vários componentes celulares e afetam diferentes processos metabólicos e fisiológicos, modificando a permeabilidade da membrana e inibindo a produção de ATP (PAPARELLA et al., 2008). Segundo Moreira et al. (2005), compostos fenólicos dos óleos ligam-se à bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e extravasando os constituintes intracelulares ou danificando os sistema enzimático da célula.

Nedorostova et al. (2009) avaliaram o efeito de óleos essenciais de 27 espécies de plantas sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Destes, apenas 13 foram ativos, tendo apenas os óleos essenciais de *Allium sativum* e *Armoracia rusticana* sido capazes de inibir todas as bactérias. *Staphylococcus aureus* foi inibida por todos os óleos ativos, seguida de *E.coli* (8), *L. monocytogenes* (7), *S. Enteritidis* (6) e *P. aeruginosa* (2).

Em alguns estudos foi demonstrado que óleos essenciais de orégano, tomilho e alecrim estão entre os mais ativos antimicrobianos (DIMITRIJEVIC et al., 2007). Além disso, extratos de orégano e alecrim demonstraram ação antioxidante favorável para aplicação em carnes e produtos cárneos (DJENANE et al., 2002; SÁNCHEZ-ESCALANTE et al., 2001).

Em trabalhos preliminares desenvolvidos nos laboratórios da UFPA (CARDOSO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009), foram avaliados bifes bovinos revestidos com filmes comestíveis à base de gelatina e glicerina, adicionados de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare L*) e capim-limão

(*Cymbopogon citratus*), em concentrações que variavam de 120 a 800 mg/kg. A mistura de revestimento que continha quantidades iguais (400 mg/kg) de cada óleo essencial favoreceu sensivelmente a qualidade microbiológica da carne embalada em condições aeróbias por oito dias de estocagem refrigerada. Embora o uso do revestimento com óleo essencial tenha favorecido a estabilidade da cor da carne embalada em condições aeróbias, a melhora na cor vermelha dos produtos foi devido unicamente à ação do óleo essencial de orégano, sendo a concentração de 120 mg/kg a mais aconselhada para uso na mistura de revestimento. Todas as misturas de revestimento contendo óleos essenciais retardaram sensivelmente a oxidação lipídica dos bifes.

O óleo essencial de alecrim é conhecido devido ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano (DUTRA et al., 2011), apresentando como constituintes majoritários α -pineno, 1,8-cineol e linalol. Já o óleo essencial das folhas de pimenta-da-jamaica possui aroma semelhante ao do cravo-da-índia, sendo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) o componente majoritário com cerca de 70% a 77,9%. O eugenol é um fenol que tem propriedades antioxidantes devido à sua capacidade de doar um hidrogênio para radicais livres mais reativos, formando um radical estabilizado por ressonância, menos reativo (MINOTT; BROWN, 2007).

Existem poucos estudos publicados sobre o óleo essencial da pimenta-da-jamaica e sua aplicação em alimentos. Dutra et al. (2011) descrevem o alto potencial antioxidante deste óleo, enquanto Cardoso et al. (2011) observaram seu alto potencial antimicrobiano.

2.5.4 Plastificantes

Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade. Quando adicionados a outro material provocam

mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos mesmos (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994). Além disso, em sua maioria, apresentam caráter hidrofílico e, por serem normalmente moléculas pequenas, são facilmente acoplados entre as cadeias poliméricas devido à sua habilidade em reduzir a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER, 1997).

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

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

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

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

A glicerina tem efeito plastificante por sua habilidade em reduzir as pontes de hidrogênio, enquanto aumenta os espaços intermoleculares, e em diminuir as

interações entre as cadeias de polímeros, aumentando a flexibilidade e diminuindo as propriedades de barreiras dos filmes (BANKER, 1966).

Thomazine, Carvalho e Sobral (2005) observaram que, com o aumento na concentração de plastificante (glicerol), em filmes de gelatina, ocorre aumento da permeabilidade ao vapor d'água e da flexibilidade do filme.

REFERÊNCIAS

- ANDRES, C. Edible films have potential for significantly improving aesthetic and nutritional content of foods. **Food Processing**, London, v. 46, n. 7, p. 102-106, 1985.
- ANGELO, A. J. Lipid oxidation on foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 36, n. 1, p. 175-224, Feb. 1996.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C.; FELIPE, M. G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 56-62, 2006.
- ARVANITTOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol: part 1. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 31, n. 2, p. 179-192, Apr. 1996.
- BANKER, G. S. Films coating theory and practice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 55, p. 81-89, 1966.
- BATISTA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes à base depectina, gelatina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolos**. 2004. 140 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- BODMEIER, P. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutic**, Amsterdam, v. 152, n. 2, p. 153-163, June 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto n. 55.871**, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Brasília, 1965. Disponível em: <http://www.fooddesign.com.br/arquivos/legislacao/decreto_55871-1965_aditivos_para_alimentos.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2011.
- _____. **Resolução RDC nº 12**, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 10 mar. 2011.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia médica**. 22. ed. Rio de Janeiro: Lange, 2008. 1501 p.

CARDOSO, G. P. et al. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de folhas frescas de pimenta-da-jamaica (*Pimenta dióica*). In: SEMANA ACADÊMICA INTEGRADA, 3.; SIMPÓSIO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL INICIAL E CONTINUADA, 1., 2011, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2011. 1 CD-ROM.

_____. Filmes de gelatina contendo óleos essenciais e seus efeitos na oxidação lipídica e na cor objetiva de carnes bovinas refrigeradas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 5., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2009. 1 CD-ROM.

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

_____. Uso de revestimentos comestíveis de gelatina na manutenção da cor objetiva de carne bovina *in natura* refrigerada: testes preliminares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 170/171, p. 132-133, 2009b.

CARDOSO, L.; ARAUJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997 - 2001. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 32-42, 2001.

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

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

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

COSTA, A. G. **Desenvolvimento vegetativo, rendimento e composição do óleo essencial de Patchouli após a adubação nitrogenada**. 2008. 92 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

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

DIMITRIJEVIC, S. I. et al. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 5, p. 774-782, May 2007.

DJENANE, D. et al. Ability of a-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. **Food Chemistry**, London, v. 76, n. 4, p. 407-415, Apr. 2002.

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

DUTRA, M. P. et al. Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas frescas de pimenta da jamaica (*pimenta dióica*) e de alecrim (*rosmarinus officinalis*). In: CONGRESSO MINEIRO DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 4.; CONGRESSO NACIONAL DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, 1., 2011, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: UFOP, 2011. 1 CD-ROM.

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

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

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

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008. 512 p.

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

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

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

HASENHUETTL, G.; WAN, P. J. Temperature effects on the determination of oxidative stability with Methrom Rancimat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 69, n. 6, p. 525-527, June 1992.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, Barking, v. 81, n. 4, p. 410-417, Dec. 2009.

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

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganisms in foods: microbial ecology of food commodities**. Maryland: Chapman & Hall, 2000. 615 p.

- JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Colour stability and lipid oxidation of fresh beef: development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. **Meat Science**, Barking, v. 54, n. 1, p. 49-57, Jan. 2000.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. New York: Springer Science, 2005. 790 p.
- JAYASINGH, P. et al. Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. **Meat Science**, Barking, v. 59, n. 3, p. 317-324, Sept. 2001.
- KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: a new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 8, p. 845-852, Aug. 2007.
- _____. Chitosan glucose complex: a novel food preservative. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 5, p. 521-528, May 2008.
- KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 47-59, Dec. 1986.
- KNOTHE, G. et al. **Manual de biodiesel**. São Paulo: E. Blücher, 2006. 352 p.
- KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. **Edible coatings and films to improve food quality**. Harrisburg: Technomic, 1994. 379 p.
- KROCHTA, J. M.; DEMULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 61-74, Apr. 1997.
- LABUZA, T. F. Kinetics of lipid oxidation in foods. **Critical Review Food and Technology**, Cleveland, v. 2, n. 3, p. 355-405, 1971.

LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 13, n. 1, p. 1-69, Mar. 1989.

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

LAZARUS, C. R. et al. Evaluation of a calcium alginate coating and protective plastic wrapping for the control of lamb carcass shrinkage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 4, p. 639, 1976.

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

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

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

MCHUGH, T. H.; HUXSOLL, C. C.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of fruit puree edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 1, p. 88-91, Jan. 1996.

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

MINOTT, D. A.; BROWN, H. A. Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dióica* (L.) Merr. trees based on composition of leaf volatiles. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 17, p. 30-532, July 2007.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 179-189, jan. 2000.

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

MOORJANE, M. N. et al. Studies on curing and smoking poultry meat. **Indian Journal of Poultry Science**, New Delhi, v. 15, p. 52-57, 1978.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 38, n. 5, p. 565-570, May 2005.

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 1, p. 157-160, Jan. 2009.

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

OLIVEIRA, A. M. et al. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 114/115, p. 12-19, 2003.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 771-775, jul./set. 2009.

OUATTARA, B. et al. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 139-148, Feb. 2000.

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

PADGETT, T.; HAN, L. Y.; DAWSON, P. L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 10, p. 1330-1335, Oct. 1998.

PAPARELLA, A. et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1174-1182, Dec. 2008.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2. ed. Goiânia: UFG, 2006. 1150 p.

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

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

RICHARDSON, I. Case ready red meat packaging technology. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, p. 148-155, 2003. Special issue.

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

ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1862-1866, May 2002.

SÀNCHEZ-ESCALANTE, A. et al. The effects of natural antioxidants on the quality characteristics of beef patties packaged in modified atmosphere. **Meat Science**, Barking, v. 58, p. 421-429, Sept. 2001.

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

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

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

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

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 37-51, Mar. 1999.

SHIH, F. F. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 73, n. 3, p. 406-409, 1996.

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

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; NORRIL, T. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. 203 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1102 p.

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

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

STEWART, M. R.; ZISPER, M. W.; WATTS, B. M. The use of reflectance spectrophotometry for the assay of raw meat pigments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 30, p. 464-469, 1965.

STUCHELL, Y. M.; KROCHTA, J. M. Edible coating on frozen king Salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 1, p. 28-31, Feb. 1995.

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

TEDERKO, A. **Edible food packages**. Kharkiv: Przem Spoz, 1995. 345 p.

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

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

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

WHITEMAN, G. R.; WESTON, G.; ROSENTHAL, H. **Process of coating food**. US n. PI 3,556,814, 19 Jan. 1971.

WILLIAMS, S. K.; OBLINGER, J. I.; WEST, R. I. Evaluation of calcium alginate films for use on beef cuts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, p. 292-296, 1978.

ZHU, L. G.; BREWER, M. S. Metmyoglobin reducing capacity of fresh normal, PSE, and DFD pork during retail display. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 3, p. 390-393, June 1998.

CAPÍTULO 2

Otimização de revestimentos comestíveis à base de gelatina, quitosana e glicerina para aumento da qualidade e da vida útil de carne bovina refrigerada

RESUMO

Foram otimizados revestimentos comestíveis à base de gelatina, quitosana e glicerina pelo método estatístico Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Dezoito revestimentos foram aplicados em bifés de carne bovina e seus efeitos na conservação da carne foram avaliados nos tempos zero e cinco de armazenamento, sendo conduzidas as análises de perda de peso, índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor objetiva. A aplicação dos filmes foi efetiva para a diminuição da perda de peso, sendo as maiores concentrações de gelatina mais efetivas. No tempo zero de armazenamento, os três componentes do revestimento (gelatina, quitosana e glicerina) afetaram significativamente o aumento do índice de TBARS; em contraste, após cinco dias, apesar de o modelo não ter sido ajustado, os bifés adicionados dos revestimentos apresentaram médias nos índices de TBARS de 0,191 mg MA/kg enquanto o controle (sem o revestimento) apresentou valores médios de 1,59 mg MA/kg. No tempo zero, nenhum modelo de regressão ajustado foi significativo ($P > 0,10$). Após cinco dias, o modelo para o pigmento de deoximioglobina (Mb+) foi ajustado, sendo apenas o componente linear da gelatina efetivo no aumento desse pigmento. Ainda, os valores médios de MMb entre os bifés envoltos com biopolímeros foi de 33%, enquanto o controle atingiu 44% e os bifés envoltos por biofilmes continham, em média, 25% de O₂Mb, contra apenas 10% na amostra controle, após os cinco dias de estocagem. Logo após a aplicação dos filmes (tempo zero), os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,05$) para luminosidade (L*), índice de amarelo (b*), saturação (C*) da cor e razão R630/R580 dos bifés. Após cinco dias, os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,05$) índice de vermelho (a*), saturação (C*) da cor e razão R630/R580, indicando que concentrações de 3% a 6% de gelatina, 1% a 1,5% de quitosana e 6% de glicerina são as melhores para a formação do revestimento. Os revestimentos à base de gelatina, quitosana e glicerina oferecem uma alternativa promissora na preservação de carne bovina refrigerada.

Palavras-chave: Gelatin. Quitosana. Glicerina, Filmes comestíveis.

ABSTRACT

Edible coatings formulated with gelatin, chitosan and glycerin have been optimized by the statistical method DCCR (Central Composite Rotational Design). Eighteen coatings were applied on beef steaks, and their effects on the conservation of meat were tested in zero and five days of storage, and the analysis of weight loss, TBARS values, pigments of myoglobin and objective color were conducted. The application of the films was effective in reducing weight loss, where the largest concentrations of gelatin was more effective. At time zero of storage, the three components of the coating (gelatin, chitosan and glycerin) significantly affected the increase in TBARS values. In contrast, after five days, although the model has not been set, adding the steaks in the middle of the coatings showed TBARS levels of 0.191 mg MA/kg while the control (without coating) showed values of 1.59 mg MA/kg. At time zero, no adjusted regression model was significant ($P > 0.10$) for myoglobin pigments. After five days, the model for the pigment deoxymyoglobin (Mb +) was set, and only the linear component of gelatin increased this pigment. Still, the mean values between the MMb steaks wrapped with polymers was 33%, while the control reached 44% and steaks wrapped in biopolymers contained on average 25% of O_2Mb , compared with 10% in the control sample after five days of storage. Shortly after the application of the films (time zero), the adjusted regression models were significant ($P < 0.05$) for the luminosity (L^*), yellow index (b^*), saturation (C^*) color and reason R630/R580 of steaks. After five days, the adjusted regression models were significant ($P < 0.05$) for redness (a^*), saturation (C^*) and color ratio R630/R580, indicating that concentrations of 3 to 6% of gelatin, 1 to 1.5% chitosan and 6% glycerin are the best for the formation of the coating. The coatings of gelatin, chitosan and glycerin offer a promising alternative for the preservation of chilled beef.

Keywords: Gelatin. Chitosan. Glycerin. Edible films.

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de prolongar a vida útil da carne fresca é desejável não apenas por motivos econômicos, mas também por mudanças ocorridas no perfil do mercado e do consumidor. Uma maior vida útil permite responder ao intervalo de tempo entre a produção e a distribuição dos produtos para atender a mercados mais distantes, reduzir perdas econômicas e compensar as flutuações da demanda. Nesse sentido, a embalagem é um importante fator que influencia a qualidade e a durabilidade de carnes frescas, pois altera o ambiente ao redor do produto, criando condições que retardam as reações de deterioração (SARANTÓPOULOS; ANTÔNIO, 2006).

Nos balcões de autoatendimento dos supermercados brasileiros é muito difundido o acondicionamento da carne em bandejas plásticas envoltas em filmes de alta permeabilidade ao oxigênio, garantindo a cor vermelho-brilhante, atrativa para o consumidor no momento da compra. No entanto, a microbiota deteriorante e a oxidação do pigmento limitam a vida útil desta carne em cerca de 2 a 4 dias, dependendo da temperatura de refrigeração e do tipo de corte (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

Uma alternativa para o problema citado pode ser o uso de filmes de revestimentos comestíveis, que podem ser aplicados como embalagens primárias para prolongar a vida útil desses produtos (CARDOSO et al., 2011). Dentre as propriedades funcionais dos revestimentos comestíveis, podem ser mencionadas a barreira ao vapor de água, o transporte de gases (oxigênio e gás carbônico) e de solutos, a retenção de compostos aromáticos e a possibilidade de incorporação de aditivos. Dessa forma, o crescimento microbiano, a oxidação lipídica e a descoloração na superfície do produto, bem como a perda excessiva de exsudado da carne, podem ser controladas mediante a utilização de revestimentos comestíveis à base de biopolímeros, como proteínas,

polissacarídeos e lipídios, incorporados com compostos antimicrobianos e antioxidantes, como, por exemplo, óleos essenciais e quitosana.

Entre os hidrocoloides disponíveis para a produção de biopolímeros, a gelatina é a mais popular e utilizada largamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica, devido às suas interessantes propriedades funcionais, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos. A cobertura de gelatina em carnes frescas pode auxiliar na redução da deterioração, ao atuar como barreira ao oxigênio (KROCHTA; DEMULDEN-JOHNSON, 1997). Quando a O₂Mb (vermelho-brilhante) é oxidada a MMb (marrom), os consumidores tendem a rejeitar a carne. Uma vez que o oxigênio é o promotor da oxidação, sua redução ou eliminação implicarão na manutenção da cor da carne fresca.

Devido às suas características atóxicas e de fácil formação de géis, a quitosana tem sido considerada, há décadas, como um composto de interesse industrial e, especialmente, de uso farmacêutico. Recentemente, uma série de estudos tem sido publicados, caracterizando o uso da quitosana como coberturas de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999). Sua aplicação também se estende a produtos cárneos. Kanatt, Chander e Sharma (2007, 2008) avaliaram a ação da quitosana, juntamente com extrato de hortelã, como antioxidante, na conservação de salame, e de um complexo quitosana-glicose em carne moída de cordeiros e salame contra *E. coli*, *Pseudomonas*, *S. aureus* e *B. cereus*, confirmando sua efetividade como agente antimicrobiano em carnes e produtos cárneos.

Plastificantes são adicionados aos biopolímeros para melhorar suas propriedades mecânicas (CUQ et al., 1997). Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade. Quando adicionados a outro material, provocam mudanças nas propriedades físicas,

químicas e mecânicas dos mesmos (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994). Os polióis têm sido citados com bons plastificantes para filmes e revestimentos à base de proteínas, sendo a glicerina o mais utilizado (AUDIC; CHAUFER, 2005).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina na perda de peso, na oxidação lipídica, nos pigmentos relativos da mioglobina e na estabilidade da cor de bifes de *M. semitendinosus* (lagarto), durante a estocagem sob refrigeração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1. Delineamento experimental

A influência dos níveis de gelatina, quitosana e glicerina nas blends foi avaliada por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), segundo Rodrigues e Iemma (2005), para três variáveis independentes em um esquema fatorial 2^3 , com as seguintes concentrações:

- a) 0% a 6% de gelatina (CARDOSO; RAMOS; RAMOS, 2009);
- b) 0,5% a 1,5% de quitosana (VILLADIEGO, 2004);
- c) 0 a 12% de glicerina, em relação a gelatina + quitosana (CARDOSO; RAMOS; RAMOS, 2009).

O DCCR foi composto por 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 18 ensaios. Os três fatores independentes foram investigados em cinco diferentes níveis (-1,68, -1, 0, +1, +1,68), dispostos na Tabela 1. As concentrações de gelatina, quitosana e glicerina utilizadas para a formulação dos tratamentos são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1 Níveis utilizados no DCCR para três fatores, para as variáveis gelatina, quitosana e glicerina

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Gelatina (%)	0	1,22	3	4,78	6
Quitosana (%)	0,5	0,7	1	1,3	1,5
Glicerina (%)	0	2,4	6	9,6	12

Tabela 2 Delineamento fatorial completo para composição dos filmes de gelatina, quitosana e glicerina

ENSAIO	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X1	X2	X3	% GEL	%QUIT	% GLI
1	-1	-1	-1	1,22	0,7	2,4
2	1	-1	-1	4,78	0,7	2,4
3	-1	1	-1	1,22	1,3	2,4
4	1	1	-1	4,78	1,3	2,4
5	-1	-1	1	1,22	0,7	9
6	1	-1	1	4,78	0,7	9,6
7	-1	1	1	1,22	1,3	9,6
8	1	1	1	4,78	1,3	9,6
9	-1,68	0	0	0	1	6
10	1,68	0	0	6	1	6
11	0	-1,68	0	3	0,5	6
12	0	1,68	0	3	1,5	6
13	0	0	-1,68	3	1	0
14	0	0	1,68	3	1	12
15	0	0	0	3	1	6
16	0	0	0	3	1	6
17	0	0	0	3	1	6
18	0	0	0	3	1	6

2.2 Preparo das soluções de revestimento

No preparo dos revestimentos, foi utilizada gelatina do tipo B, com *Bloom* de 250, gentilmente doada pela Empresa Gelita (São Paulo, SP); a quitosana (densidade de 0,30g/mL, grau de desacetilação >85,0%) foi adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, CE).

As soluções dos filmes de revestimento foram obtidas hidratando-se a gelatina em pó em água destilada por 30 minutos, com posterior solubilização a 70°C, em banho-maria, por 10 minutos, quando foram adicionadas a quitosana e a glicerina (MERCK), cujo percentual foi definido em relação ao conteúdo de gelatina + quitosana. O pH natural das soluções foi mantido.

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

2.3 Obtenção e porcionamento dos bifes

Foram utilizadas peças de lagarto (*M. semitendinosus*, *MS*), adquiridas diretamente em matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Federal (SIF), sendo desossadas após 24 horas de abate e conduzidas refrigeradas ao Laboratório de Processamento de Carnes e Derivados da UFLA. Foi feita uma limpeza prévia nos músculos, tendo sido removidos a gordura superficial e o tecido conectivo. Os bifes de ± 20 mm de espessura foram obtidos a partir do porcionamento no sentido transversal dos músculos.

2.4 Aplicação dos revestimentos

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

Os bifés, imediatamente após o preparo, foram imersos nas soluções de revestimento por 3 segundos e, em seguida, pendurados por ganchos em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab), a 4 °C, por 30 minutos, até a secagem do revestimento. Em seguida, foram pesados e acondicionados em bandejas de poliestireno e envoltos em filme plástico transparente de PVC.

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

2.5 Armazenamento e amostragem

As amostras foram armazenadas em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab), à temperatura controlada de $4 \pm 0,5$ °C, sendo submetidas a fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro). As análises foram feitas em dois tempos: primeiro no dia 0 (tempo zero de armazenamento) e o segundo tempo quando foram verificadas diferenças visíveis entre a coloração do controle e a das amostras revestidas. Neste caso, o segundo tempo de análise ocorreu no tempo 5 de armazenamento.

2.6 Análises físicas e bioquímicas na carne

2.6.1 Perda de peso

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

2.6.2 Índice de TBARS

A oxidação lipídica foi avaliada pelo número de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo metodologia proposta por Raharjo, Sofos e Schmidt (1992), com pequenas modificações.

Porções de 10 g de amostra foram coletadas na região externa de cada bife de *MS*, tendo sido retirada a gordura. Às 10 g de amostra foram adicionados 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% e 1mL de BHT (2,6-di-tert-butil-4-methylphenol) 0,15% (em etanol) e homogeneizadas em politron, por 5 minutos. Em seguida, o homogenato foi filtrado em filtro de papel e o volume do filtrado ajustado com TCA 5% para 50 mL, em balão volumétrico. Aliquotas de 2 mL dos balões foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 2 mL de TBA (2-thiobarbituric acid) 0,08 M (diluído em ácido acético glacial 50%). Os tubos foram levados ao banho-maria, por 5 minutos e as leituras foram realizadas a 531 nm, em espectrofotômetro tipo CARY 50 *Varian*.

Para cada repetição, as médias foram obtidas considerando-se a média de três replicatas. Os valores de TBARS foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg MDA/kg), por meio de curva

padrão, utilizando 1,1,3,3 tetraethoxipropano (TEP) em ácido tricloroacético 20%.

2.6.3 Pigmentos relativos da mioglobina

As curvas de reflectância foram obtidas com um colorímetro espectrofotométrico CM-5 (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm, sendo estabelecido o iluminante A, o ângulo de 10° para o observador, luz especular incluída (RSIN) e o sistema de cor CIELAB.

Os valores intermediários (473, 525 e 572 nm) de reflectância foram calculados por interpolação linear. O conteúdo relativo dos pigmentos heme, expressos como oximioglobina (O₂Mb), mioglobina reduzida (Mb⁺) e metamioglobina (MMb), na superfície dos músculos MS (bife), foi calculado segundo o método matemático de Krzywicki (1979 citado por RAMOS; GOMIDE, 2007), de acordo com as seguintes equações:

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

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

$$\text{O}_2\text{Mb} = 1 - (\text{MMb} + \text{Mb}^+)$$

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

Também foi obtida a razão entre as reflectâncias 572 nm e 525 nm, para descrever a quantidade de metamioglobina (MMb) acumulada sobre a superfície da carne (MCKENNA et al., 2005). Para separar a contribuição relativa da absorção do pigmento (K) da dispersão do meio (S), foi utilizada a razão K/S dos comprimentos de onda a 575 e 525 nm, obtidos pela equação de Kubelka-Munk (RAMOS; GOMIDE, 2007), sendo a MMb acumulada mensurada pela razão $(K/S)_{572} / (K/S)_{525}$.

Para cada repetição, as reflectâncias foram obtidas considerando-se o valor médio de dez leituras realizadas em diferentes pontos da superfície dos bifés.

2.6.4 Análise objetiva da cor

A avaliação objetiva da cor foi realizada na superfície dos bifés ainda envoltos pelo filme, fazendo-se uso de um colorímetro espectrofotométrico CM-5 (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm. Para o cálculo dos índices de cor foi estabelecido o iluminante A, o ângulo de 10° para o observador, a reflectância especular excluída (RSEX) e o sistema de cor CIELAB, segundo sugerido por Ramos e Gomide (2007) para carnes *in natura*.

Os índices de cor luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) foram obtidos, para cada repetição, considerando-se o valor médio de dez leituras realizadas em diferentes pontos da superfície do bife. A partir dos índices de cor, também foram calculadas as coordenadas polares (RAMOS; GOMIDE, 2007): o índice de saturação [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] e o ângulo de tonalidade [$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$].

Além dos índices de cor L^* , a^* e b^* , também foi calculado o índice de vermelhidão (*redness*) para acompanhamento do declínio da cor vermelha (RAMOS; GOMIDE, 2007), estimado pela razão entre os valores da reflectância a 630 e 580 nm (%R 630/580 nm).

2.7 Análise estatística

Foi utilizado o Modelo de Superfície de Resposta para o estudo da avaliação simultânea das três variáveis independentes (gelatina, quitosana e glicerina). Para cada fator experimental, a variância foi decomposta em

componentes (linear, quadrático e interação) para a verificação de ajuste da seguinte função polinomial de segunda ordem, em função de X_i , ajustada para cada variável, e a importância de cada componente:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^9 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^9 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^9 \sum_{j=1}^9 \beta_{ij} X_i X_j$$

em que

Y = resposta estimada;

B_0, B_i, B_{ii} e B_{ij} , = constantes e coeficientes de regressão do modelo;

X_i e X_j = níveis das variáveis independentes.

A significância de cada parâmetro da equação, para cada variável resposta, foi avaliada pelo teste F, utilizando-se o programa Statistica 5.0 (StatSoft, Poland). Para a modelagem foi utilizado o Erro Puro e os feitos não significativos foram ignorados para o desenvolvimento dos gráficos. Devido à variação inerente das amostras, foram considerados os níveis de significância de 1%, 5% e 10% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perda de peso

O valor médio da variável perda de peso (PP) para os tratamentos e a amostra controle são apresentados na Tabela 3. No quinto dia de armazenamento, o componente linear da gelatina e a interação dos compostos do filme (gelatina e quitosana, gelatina e glicerina e quitosana e glicerina) afetaram significativamente ($p < 0,10$) a perda de peso dos bifés de lagarto (Tabela 4). A partir dos modelos ajustados para os coeficientes significativos foi possível construir as superfícies de resposta em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina (Gráfico 1).

Tabela 3 Perda de peso dos bifes de *M.Semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle, no quinto dia de armazenamento

TRATAMENTOS				
TRAT.	% GEL	% QUIT	% GLIC	PP (%)
1	1,22	0,7	2,4	9,683
2	4,78	0,7	2,4	7,359
3	1,22	1,3	2,4	8,771
4	4,78	1,3	2,4	5,884
5	1,22	0,7	9	9,753
6	4,78	0,7	9,6	7,286
7	1,22	1,3	9,6	11,539
8	4,78	1,3	9,6	7,070
9	0	1	6	10,018
10	6	1	6	6,696
11	3	0,5	6	6,690
12	3	1,5	6	7,393
13	3	1	0	9,665
14	3	1	12	8,493
15	3	1	6	7,647
16	3	1	6	11,280
17	3	1	6	9,501
18	3	1	6	8,645
<i>MÉDIAS</i>				8,521
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)				21,452

Tabela 4 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a perda de peso de bifes *M.Semitendinosus*, no quinto dia de armazenamento

Variável	Coefficiente	Erro Padrão
Constante	9,169*	0,769
Gelatina (linear)	-2,265*	0,417
Gelatina (quadrática)	0,107	0,434
Quitosana (linear)	-0,939	0,417
Quitosana (quadrática)	-0,359	0,434
Glicerina (linear)	-0,821	0,417
Glicerina (quadrática)	0,363	0,434
Gelatina x quitosana	1,328***	0,545
Gelatina x glicerina	1,433***	0,545
Quitosana x glicerina	2,143**	0,545
R^2	0,6794	

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$; e *** $P < 0,10$

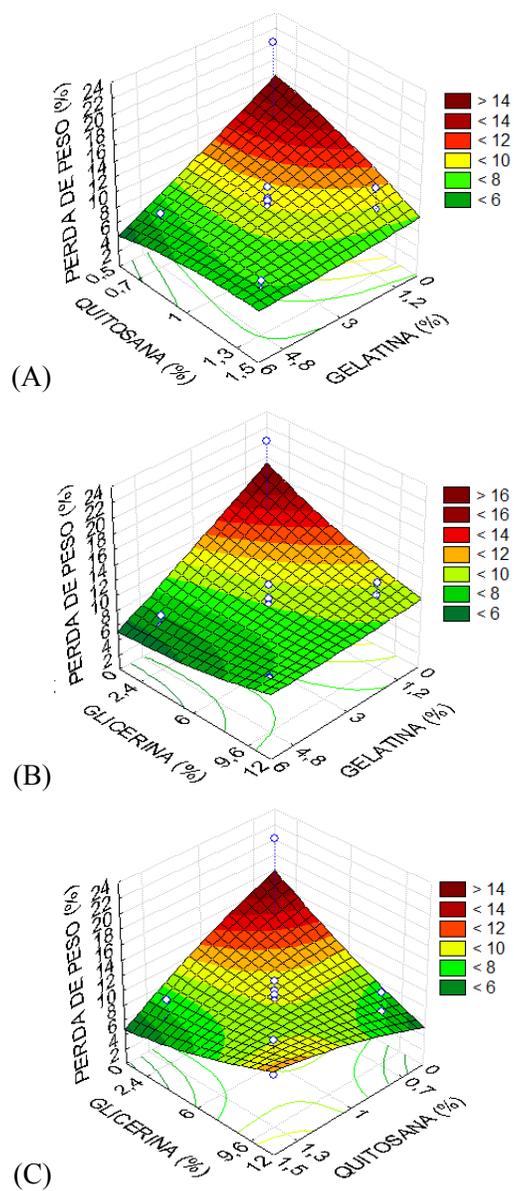


Gráfico 1 Superfície de resposta para perda de peso de bifes *M. semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no quinto dia de armazenamento

Pode-se observar que a interação entre os polímeros favoreceu a redução na perda de peso dos bifés, especialmente com a adição de gelatina. Este fato se deve, provavelmente, à permeabilidade dos filmes, uma vez que biopolímeros à base de gelatina têm como propriedade uma alta barreira a gases (PEREDA et al., 2011) e ao vapor de água, o que pode ter dificultado a perda de água dos bifés por evaporação. Para blendas com maiores concentrações de gelatina, a adição de quitosana (Gráfico 1A) ou glicerina (Gráfico 1B) surtiu pouco efeito na perda de peso dos bifés.

Ainda segundo Pereda et al. (2011), embora filmes somente à base de quitosana tenham permeabilidade ao vapor de água muito mais alta que as blendas poliméricas, a adição de quitosana à matriz de gelatina não afeta significativamente a permeabilidade dos filmes. No presente experimento, isto foi válido quando houve adição de grandes quantidades de gelatina na blenda, mas não o contrário (Gráfico 1A). À medida que menores concentrações de gelatina são utilizadas, maiores adições de quitosana reduziram a perda de peso dos bifés, ou seja, diminuíram a permeabilidade do filme de revestimento.

Normalmente, o aumento da concentração do plastificante (glicerina) causa um aumento na permeabilidade ao vapor de água de filmes que possuem propriedades higroscópicas. Segundo Cuq et al. (1997), isso se deve à reorganização da rede proteica, com consequente aumento do espaço livre. No presente experimento, no entanto, a adição da glicerina contribuiu para a perda de peso dos bifés à medida que menores quantidades de biopolímeros, gelatina (Gráfico 1A) ou quitosana (Gráfico 1C), foram utilizadas nos filmes.

Portanto, maiores concentrações de gelatina e baixas concentrações de quitosana e glicerina são mais favoráveis à diminuição da perda de peso dos bifés. Neste trabalho, concentrações entre 0% e 6% de glicerina, 0% e 1% de quitosana e entre 3% e 6% de gelatina foram as regiões ótimas na mistura dos biopolímeros para a diminuição da perda de peso.

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

Em relação à amostra controle, que apresentou perda de peso de 21,45%, a aplicação dos filmes foi eficiente, permitindo uma redução média da perda de peso dos bifés de 8,52%, em cinco dias de estocagem, o que representa redução de 12,93% em relação ao controle. Wu e Weller (2001) estudaram a perda de umidade de bifés de carne bovina envoltos por cinco tipos de biopolímeros diferentes e constataram que a amostra envolta pelo filme de quitosana (2%) perdeu 66% de umidade a menos que o controle.

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

A equação que expressa a perda de peso dos bifés envoltos por biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 Modelo codificado da regressão para perda de peso

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R²
5	PP	$y = 9,169 - 2,265x_1 + 1,328x_1x_2 + 1,433x_1x_3 + 2,143x_2x_3$	0,02	0,5925

x_1 = variável codificada para gelatina; x_2 = variável codificada para quitosana; x_3 = variável codificada para glicerina

3.2 Índice de TBARS

O valor médio para o índice de TBARS para os tratamentos e a amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento é apresentado na Tabela 6. No tempo zero de armazenamento, o controle apresentou índice de TBARS de 0,047 e todos os componentes afetaram ($P < 0,10$) os valores de TBARS. Apenas o componente quadrático da quitosana não foi significativo (Tabela 7). A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos, foi possível construir as superfícies de resposta em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina (Gráfico 2).

Tabela 6 Índice de TBARS dos bifes de *M. semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento

TRAT.	TRATAMENTOS			dia 0	dia 5	Δ TBARS
	% GEL	% QUIT	% GLIC	TBARS	TBARS	
1	1,22	0,7	2,4	0,047	0,156	0,109
2	4,78	0,7	2,4	0,133	0,140	0,006
3	1,22	1,3	2,4	1,066	0,149	-0,916
4	4,78	1,3	2,4	0,209	0,162	-0,047
5	1,22	0,7	9	0,040	0,187	0,147
6	4,78	0,7	9,6	0,030	0,178	0,148
7	1,22	1,3	9,6	0,053	0,161	0,108
8	4,78	1,3	9,6	0,204	0,186	-0,017
9	0	1	6	0,040	0,366	0,326
10	6	1	6	0,073	0,159	0,087
11	3	0,5	6	0,040	0,179	0,139
12	3	1,5	6	0,072	0,194	0,122
13	3	1	0	0,069	0,248	0,179
14	3	1	12	0,058	0,246	0,188
15	3	1	6	0,071	0,187	0,116
16	3	1	6	0,086	0,177	0,091
17	3	1	6	0,050	0,165	0,115
18	3	1	6	0,139	0,207	0,068
<i>MÉDIAS</i>				0,138	0,191	0,054
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)				0,047	1,211	1,164

Tabela 7 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o índice de TBARS de bifes *M.Semitendinosus*, no tempo zero

Variável	Coefficiente	Erro padrão
Constante	0,0783**	0,0190
Gelatina (linear)	-0,0422**	0,0103
Gelatina (quadrática)	0,0253***	0,0107
Quitosana (linear)	0,0978*	0,0103
Quitosana (quadrática)	0,0251	0,0107
Glicerina (linear)	-0,0841*	0,0103
Glicerina (quadrática)	0,0279***	0,0107
Gelatina x quitosana	-0,0978*	0,0135
Gelatina x glicerina	0,1139*	0,0135
Quitosana x glicerina	-0,1134*	0,0135
R^2	0,5753	

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$ e *** $P < 0,10$

A quitosana foi o fator que mais influenciou os valores de TBARS nos bife no tempo zero (Gráficos 2A e 2C), tendo um efeito pró-oxidante, sendo uma controvérsia sobre seu poder antioxidante, evidenciado por outros autores.

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

Em contrapartida, Wu et al. (2000) relataram que bifes envoltos por filmes de quitosana no tempo zero apresentaram maiores índices de TBARS que

o controle. Segundo os autores, isso provavelmente ocorreu devido à alta permeabilidade ao oxigênio da quitosana em sua forma gelatinosa. Assim, no momento da imersão, houve um favorecimento da oxidação dos bifes no tempo inicial.

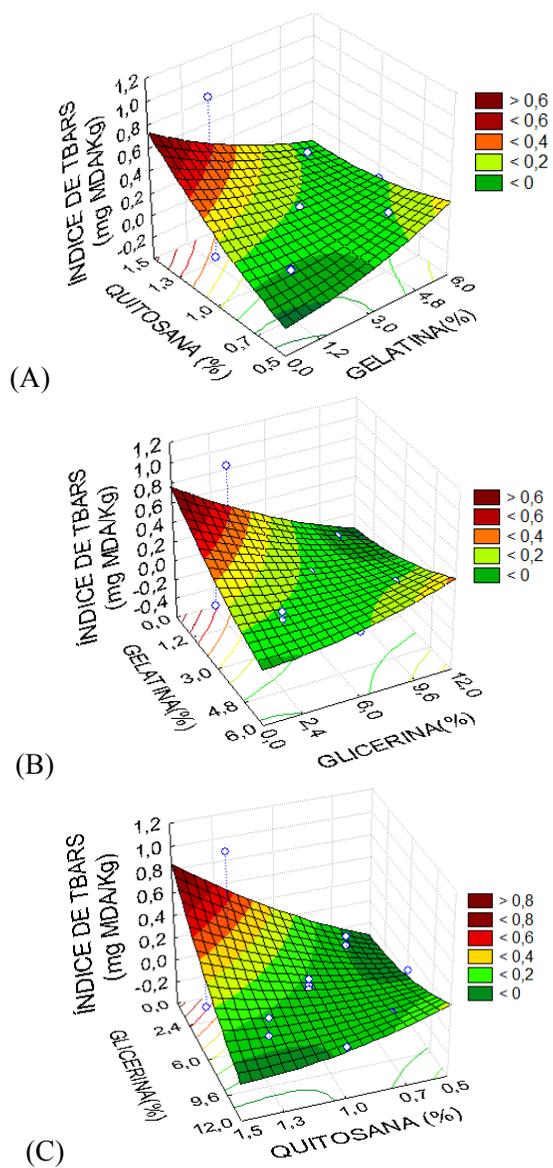


Gráfico 2 Superfície de resposta para o índice de TBARS dos bifes *M.Semitendinosus*, em função do teor de quitosana, gelatina e glicerina no tempo zero

No entanto, também deve ser considerado que os valores de TBARS podem ter sido influenciados pelos componentes dos filmes. Segundo Osawa et al. (2005), o teste de TBARS pode apresentar interferência de compostos, como açúcares, aldeídos e proteínas. Segundo estes autores, outras substâncias presentes nos alimentos podem interagir com o TBA, motivo pelo qual o teste deve ter a terminologia de “substâncias reativas com TBA” ou TBARS. Além disso, o teste deve ser utilizado para medir a extensão geral da oxidação lipídica e não apenas quantificar o malonaldeído.

Com a adição da gelatina e glicerina, os valores de TBARS reduziram mesmo em grandes quantidades de quitosana (Gráficos 2A e 2C, respectivamente). É possível supor que as blendas tenham reduzido o acesso de oxigênio na superfície da carne, retardando o processo de oxidação lipídica nos filmes adicionados com os biopolímeros. Segundo Krochta e Demulder-Johnston (1997), filmes à base de proteína são mais efetivos na redução do índice de TBARS do que os à base de polissacarídeos, devido às melhores propriedades de barreira dos filmes de proteína (no caso, gelatina).

Avaliando os modelos preditos, pode-se observar que menores valores de TBARS no tempo zero foram obtidos nas faixas de 0% a 3% de gelatina, 0,5% a 1,0% de quitosana e acima de 9,6% de glicerina.

No quinto dia de armazenamento, o modelo não pôde ser ajustado; no entanto, todos os tratamentos apresentaram índice de TBARS mais baixos que o controle: enquanto o controle apresentou valores médios de TBARS de 1,21 mg MA/kg (Tabela 6), o valor médio obtido pelos tratamentos foi de 0,191 mg MA/kg. Além disso, todos os filmes testados apresentaram índices de TBARS inferiores a 1,0 mg MA/kg, considerado, por McKenna et al. (2005), como o limiar de percepção de sabor estranho e rancidez oxidativa para carne bovina. Para Torres e Okani (2000), valores de TBARS menores que 1,59 mg de MA/kg

são considerados baixos para serem percebidos por análise sensorial e não representam risco para a saúde humana.

É plausível considerar que o fato de não se observar efeitos entre os diferentes tratamentos estudados nos índices de TBARS seja devido à pequena oxidação ocorrida no período de avaliação, sendo necessário mais tempo de armazenamento para efetivamente observar diferenças entre os tratamentos.

A equação que expressa o índice de TBARS dos bifés envoltos por biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 Modelo codificado da regressão para o índice de TBARS

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	TBARS	$y = 0,0783 - 0,0422x_1 + 0,0253x_2^2 + 0,0978x_2 - 0,0841x_3 + 0,0279x_3^2 - 0,0978x_1x_2 + 0,1139x_1x_3 - 0,1134x_2x_3$	<0,01	0,5753

x_1 = variável codificada para gelatina; x_2 = variável codificada para quitosana; x_3 = variável codificada para glicerina

3.3 Pigmentos relativos da mioglobina

Os valores médios para os pigmentos relativos da mioglobina (MMb, Mb+ e O₂Mb) e do índice de K572/K525 dos tratamentos e da amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento são apresentados na Tabela 9. Para o tempo zero, nenhum modelo de regressão ajustado foi significativo (P>0,10) para os pigmentos relativos da mioglobina (MMb, Mb+ e O₂Mb), o que, provavelmente, indica que a aplicação dos filmes, de imediato, não alterou as formas químicas presentes nas amostras para os diversos tratamentos.

No quinto dia de estocagem, em condições propícias para a oxidação dos pigmentos (fotoperíodo), os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,10$) apenas para a forma química de mioglobina reduzida (Mb^+) (Tabela 10). O único componente a ter efeito significativo ($P < 0,10$) foi a gelatina, cujo coeficiente de regressão linear foi positivo, ou seja, o aumento da concentração de gelatina no filme é linearmente proporcional ao aumento de Mb^+ formada (Gráfico 3).

Durante o armazenamento refrigerado, o oxigênio ligado à molécula de mioglobina é consumido pela atividade muscular, notadamente pela ação das mitocôndrias, conhecida como taxa de consumo de oxigênio (TCO). Altas TCOs diminuem a penetração de oxigênio no tecido muscular, favorecendo a formação do pigmento de deoximioglobina (Mb^+) próximo à superfície da carne, o qual é mais susceptível à oxidação que a oximioglobina (RAMOS; GOMIDE, 2007). Dessa forma, a aplicação de maiores concentrações de gelatina pode ter funcionado como uma barreira ao oxigênio, conforme descrito por Krochta e Demulden-Johnson (1997), fazendo com que parte dos pigmentos de O_2Mb fosse convertida e mantida na forma Mb^+ , durante o armazenamento.

Tabela 9 Pigmentos relativos da mioglobina e valor K572/K525 dos bifes de *M.Semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle, no tempo zero e no quinto dia de armazenamento

TRAT.	TRATAMENTOS			dia 0				dia 5			
	% GEL	% QUIT	% GLIC	% MMb	% Mb+	% O2Mb	K572/K525	%MMb	% Mb+	%O2Mb	K572/K525
1	1,22	0,7	2,4	0,299	0,073	0,628	1,146	0,436	0,363	0,201	0,929
2	4,78	0,7	2,4	0,250	0,139	0,612	1,249	0,337	0,443	0,221	1,111
3	1,22	1,3	2,4	0,281	0,083	0,636	1,175	0,327	0,418	0,255	1,119
4	4,78	1,3	2,4	0,299	0,054	0,647	1,170	0,301	0,447	0,252	1,187
5	1,22	0,7	9	0,283	-0,034	0,750	1,182	0,335	0,407	0,259	1,105
6	4,78	0,7	9,6	0,286	0,039	0,675	1,178	0,324	0,431	0,245	1,134
7	1,22	1,3	9,6	0,276	0,035	0,689	1,188	0,353	0,382	0,266	1,077
8	4,78	1,3	9,6	0,240	0,118	0,642	1,237	0,292	0,420	0,288	1,197
9	0	1	6	0,297	-0,021	0,724	1,163	0,311	0,408	0,281	1,142
10	6	1	6	0,227	-0,060	0,833	1,264	0,308	0,409	0,283	1,169
11	3	0,5	6	0,246	0,041	0,712	1,218	0,332	0,388	0,280	1,118
12	3	1,5	6	0,245	0,056	0,699	1,251	0,320	0,437	0,242	1,136
13	3	1	0	0,244	0,006	0,750	1,245	0,335	0,460	0,206	1,111
14	3	1	12	0,249	0,059	0,692	1,243	0,300	0,433	0,267	1,186
15	3	1	6	0,271	0,091	0,638	1,200	0,294	0,399	0,307	1,202
16	3	1	6	0,260	0,030	0,710	1,235	0,340	0,401	0,260	1,112
17	3	1	6	0,319	-0,024	0,705	1,122	0,342	0,435	0,223	1,100
18	3	1	6	0,205	0,196	0,598	1,298	0,359	0,419	0,222	1,067
<i>MÉDIAS</i>				<i>0,265</i>	<i>0,049</i>	<i>0,686</i>	<i>1,210</i>	<i>0,330</i>	<i>0,417</i>	<i>0,253</i>	<i>1,122</i>
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)				0,244	0,055	0,701	1,269	0,502	0,379	0,119	0,834

Tabela 10 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a Mb⁺ de bifes *M.Semitendinosus*, no quinto dia de armazenamento

Variável	Coefficiente	Erro Padrão
Constante	0,4140*	0,0085
Gelatina (linear)	0,0126***	0,0046
Gelatina (quadrática)	-0,0038	0,0048
Quitosana (linear)	0,0078	0,0046
Quitosana (quadrática)	-0,0023	0,0048
Glicerina (linear)	-0,0056	0,0046
Glicerina (quadrática)	0,0096	0,0048
Gelatina x quitosana	-0,0046	0,0060
Gelatina x glicerina	-0,0057	0,0060
Quitosana x glicerina	-0,0119	0,0060
R^2	0,6491	

* $P < 0,01$; e *** $P < 0,10$

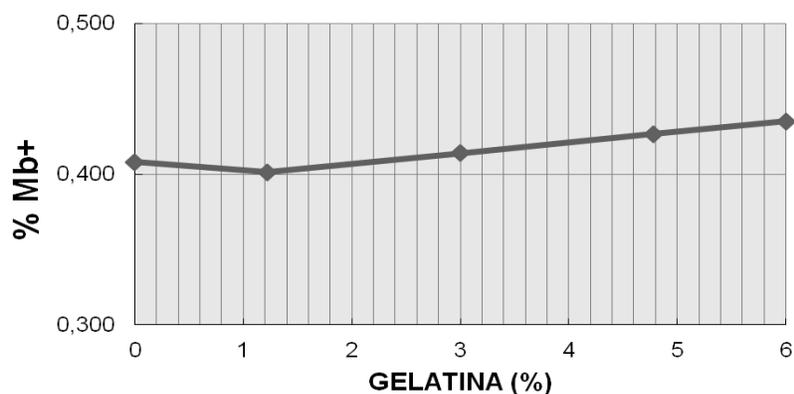


Gráfico 3 Valores preditos para o percentual de mioglobina reduzida (Mb⁺) de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no quinto dia de armazenamento

Segundo Greene, Hsin e Zipser (1971), o consumidor tende a rejeitar carnes em que o teor de MMb esteja acima de 40%. Dessa forma, no quinto dia de armazenamento, todos os tratamentos apresentaram melhores resultados do que o controle (sem revestimento, embalado em PVC): os valores médios de MMb entre os bifes envoltos com biopolímeros foi de 33%, enquanto o controle atingiu 50,2% no quinto dia de armazenamento. Além disso, os bifes envoltos por biofilmes continham, em média, 25,3% de O₂Mb, contra apenas 11,9% na amostra controle.

Estes resultados indicam que a aplicação de biopolímeros permite reduzir significativamente a oxidação do pigmento de O₂Mb a MMb. Entretanto, deve-se considerar que a cor formada pela Mb⁺ (vermelho púrpura), favorecida com a adição dos biofilmes, também não é desejada pelos consumidores, por apresentar característica de cor da carne a vácuo (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Embora não tenha mantido o pigmento responsável pela cor vermelha característica da carne *in natura*, O₂Mb, os filmes de revestimento atuaram como antioxidantes ao evitar que a Mb⁺ formada fosse convertida a MMb, pelo processo de autooxidação.

Apesar de, neste trabalho, não terem sido quantificadas a atividade da metamioglobina redutase (MRA) e a taxa de consumo de oxigênio (TCO), uma hipótese é a de que o filme tenha ajudado a MRA a permanecer por mais tempo ativa, uma vez que o filme pode ter reduzido a taxa de consumo de oxigênio TCO durante o armazenamento dos bifes. Resultados de trabalhos anteriores (MCKENNA et al., 2005; SAMMEL et al., 2002) indicam que menor TCO e maior atividade da MRA prolongam a vida útil da carne.

Outra medida relacionada à proporção de MMb é a razão $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$. No dia zero de armazenamento, o modelo não foi ajustado para valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$, apresentando valores médios de 1,21, o que indica baixa porcentagem de MMb presente e, conseqüentemente, baixa descoloração

das amostras. Segundo Stewart, Zisper e Watts (1965), valores $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ próximos a 1,20 correspondem a, aproximadamente, 21% de MMb, o que corresponde aos valores de MMb calculados neste experimento.

A tendência dos valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ é diminuir à medida que MMb é formada na carne (STEWART; ZISPER; WATTS, 1965), ou seja, com o tempo de estocagem. No quinto dia de armazenamento, os bifes adicionados em filme apresentaram razão $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ média de 1,06, contra 0,83 para a amostra controle, indicando menor acúmulo de MMb nos bifes envoltos pelos biopolímeros. Segundo Stewart, Zisper e Watts (1965), estes valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ próximos a 1,10 e 0,90 correspondem a, aproximadamente, 33% e 59% de MMb, respectivamente, o que corresponde apenas aos valores de MMb calculados para os tratamentos, mas não para as amostras controle.

McKenna et al. (2005) estudaram 19 músculos, entre eles o *M. semitendinosus*. Em seu experimento, os bifes foram embalados diretamente em filmes de PVC e armazenados, por cinco dias, em gôndolas, a 2 °C, com iluminação de 1.200 lux. Segundo estes autores, os músculos *Semitendinosus* estão no grupo de cortes cárneos que têm acúmulo moderado de MMb durante a estocagem. Os resultados do presente trabalho são discrepantes em relação aos de McKenna et al. (2005) e as diferenças podem ter sido devido a fatores como raça, corte, presença de gordura, temperatura de estocagem, iluminação e a existência do revestimento comestível.

A equação que expressa os valores dos pigmentos relativos da mioglobina dos bifes envoltos por biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 Modelo codificado da regressão para a Mb+

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (<i>p</i>)	R ²
0	Mb+	$y=0,4140+0,0126x_1$	0,05	0,6491

x_1 = variável codificada para gelatina;

3.4 Cor Objetiva

Os valores médios para os índices de cor (L, a*, b*, C* e h*) e do índice de R630/R580 dos tratamentos e da amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento são apresentados na Tabela 12. A avaliação dos bifes no tempo zero permite observar as mudanças imediatas oriundas da aplicação do biofilme na cor dos bifes. Logo após a aplicação dos filmes, os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,05$) para a luminosidade (L*), índice de amarelo (b*), saturação (C*) da cor e razão R630/R580 dos bifes (Tabela 13).

Tabela 12 Cor objetiva e valor de R630/R580 dos bifes de *M.vsemitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina, e da amostra controle, no tempo zero e no quinto dia de armazenamento

TRATAMENTOS				dia 0							dia 5					
TRAT.	% GEL	% QUIT	% GLIC	L*	a*	b*	C*	h*	R630/R580	L*	a*	b*	C*	h*	R630/R580	
1	1,22	0,7	2,4	47,260	11,640	13,580	17,890	49,380	2,405	41,270	9,950	11,300	15,060	48,650	1,799	
2	4,78	0,7	2,4	45,780	13,110	13,590	18,890	46,030	2,988	48,420	17,800	20,850	27,420	49,510	3,050	
3	1,22	1,3	2,4	51,090	11,620	15,760	19,580	53,610	2,510	50,760	15,110	18,020	23,510	50,010	2,648	
4	4,78	1,3	2,4	46,920	13,180	15,160	20,090	49,000	2,750	46,830	21,020	21,560	30,110	45,730	3,773	
5	1,22	0,7	9	53,670	12,410	17,260	21,260	54,280	2,617	48,920	13,980	17,060	22,050	50,660	2,467	
6	4,78	0,7	9,6	49,180	12,980	15,630	20,320	50,310	2,680	48,050	17,300	19,630	26,160	48,610	2,934	
7	1,22	1,3	9,6	50,850	12,800	16,070	20,540	51,470	2,666	47,810	12,930	14,870	19,710	48,980	2,315	
8	4,78	1,3	9,6	50,700	10,900	14,830	18,410	53,680	2,755	46,030	17,820	18,960	26,020	46,790	3,587	
9	0	1	6	54,190	12,920	16,810	21,200	52,470	2,483	50,280	14,120	16,050	21,380	48,670	2,685	
10	6	1	6	53,390	11,420	16,630	20,170	55,540	3,195	48,360	16,870	18,950	25,370	48,320	2,830	
11	3	0,5	6	54,150	10,150	15,580	18,590	56,900	2,767	48,580	14,480	16,550	21,990	48,820	2,759	
12	3	1,5	6	48,240	12,530	15,540	19,970	51,130	3,054	50,350	16,050	19,960	25,620	51,210	2,941	
13	3	1	0	49,920	13,340	16,700	21,370	51,370	2,936	51,590	16,450	21,100	26,750	52,070	2,775	
14	3	1	12	47,170	12,920	15,420	20,120	50,040	2,815	49,540	17,470	20,310	26,790	49,290	3,208	
15	3	1	6	49,780	12,740	15,930	20,400	51,360	3,091	42,380	18,490	16,710	24,920	42,100	3,475	
16	3	1	6	50,230	13,340	17,000	21,610	51,890	2,985	44,580	17,390	17,460	24,640	45,110	2,947	
17	3	1	6	49,880	13,120	16,920	21,400	52,210	2,584	51,690	16,660	20,940	26,750	51,500	2,883	
18	3	1	6	50,560	9,030	14,650	17,210	58,340	2,904	49,450	15,670	19,330	24,880	50,960	2,706	
<i>MÉDIAS</i>																
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)				50,164	12,231	15,726	19,946	52,167	2,788	48,049	16,087	18,312	24,396	48,722	2,877	
				49,890	12,860	17,120	21,410	53,080	2,715	51,980	9,800	18,170	20,650	61,650	1,536	

Tabela 13 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a luminosidade (L*), índice de amarelo (b*), saturação (C*) e razão R630/R580 de bifes *M. semitendinosus*, no tempo zero

Variáveis	L*		b*		C*		R630/R580	
	CR	EP	CR	EP	CR	EP	CR	EP
Constante	48,837*	0,898	16,701*	0,318	21,298*	0,207	2,901*	0,109
Gelatina (linear)	-1,606**	0,487	-0,529***	0,173	-0,274**	0,112	0,159***	0,059
Gelatina (quadrática)	0,374	0,506	-0,056	0,180	-0,117	0,117	-0,062	0,062
Quitosana (linear)	-0,653	0,487	-0,481***	0,173	-0,447**	0,112	0,035	0,059
Quitosana (quadrática)	-	0,506	-0,096	0,180	0,126	0,117	-0,037	0,062
Glicerina (linear)	0,846	0,487	0,532***	0,173	0,375**	0,112	-0,01	0,059
Glicerina (quadrática)	0,390	0,506	-0,105	0,180	-0,288***	0,117	-0,049	0,062
Gelatina x quitosana	0,796	0,636	0,266	0,226	0,049	0,147	-0,04	0,077
Gelatina x glicerina	0,604	0,636	0,164	0,226	-0,261	0,147	-0,084	0,077
Quitosana x glicerina	-0,336	0,636	-0,574***	0,226	-0,459***	0,147	0,032	0,077
R ²	0,8252		0,5863		0,4570		0,5943	

*P < 0,01; **P < 0,05; e ***P < 0,10

A luminosidade é considerada o parâmetro de cor que governa a qualidade da carne e produtos cárneos (GARCIA-ESTEBAN et al., 2003). Os valores de L^* foram dependentes apenas dos teores de gelatina e quitosana no filme (Tabela 13) e a superfície de resposta em função das concentrações destes componentes é apresentada no Gráfico 4. Menores concentrações de gelatina e de quitosana no filme induzem uma diminuição na luminosidade dos bifes.

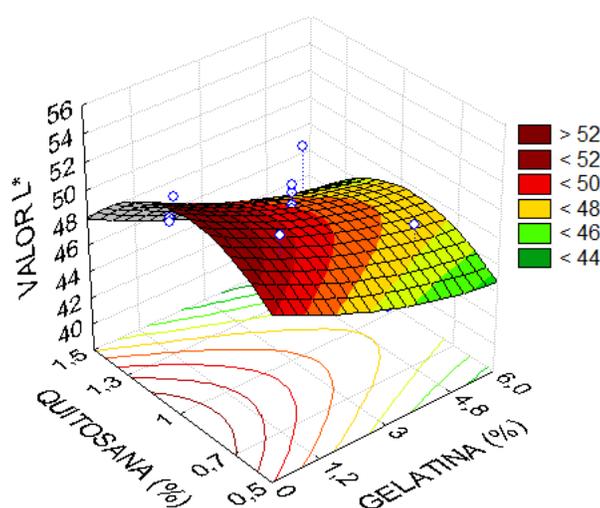


Gráfico 4 Superfície de resposta para a luminosidade (L^*) da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no tempo zero

Para os valores de b^* , foram significativos ($P < 0,10$) os efeitos lineares de todos os componentes (gelatina, quitosana e glicerina) e a interação entre a quitosana e a glicerina (Tabela 13). As superfícies de resposta em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina são apresentadas no Gráfico 5.

Maiores concentrações dos polímeros de quitosana ou gelatina induzem uma redução na participação da tonalidade amarela nos bifes. Estes resultados não estão de acordo com os reportados por outros autores (JO et al., 2001; YOUN; KIM; AHN, 1999), que observaram um aumento nos valores de b^* com

a adição de quitosana, sugerindo que a cor amarela natural destes polímeros pode ter afetado a cor observada.

Mudanças nos valores de L^* e b^* com o aumento dos polímeros de gelatina e quitosana podem estar relacionadas à espessura do filme formado nos bifés, que aumenta à medida que maiores concentrações de polímeros são utilizadas. Isso explica o aumento nos valores de b^* , devido à participação dos pigmentos e/ou corantes presentes nestes, e redução nos valores de L^* , uma vez que os filmes vão se tornando cada vez menos translúcidos, em função da modificação do seu índice de refração da camada superficial.

Darmadji e Izumoto (1994) não encontraram diferenças significativas nos valores de L^* , a^* e b^* no tempo zero de carnes moídas adicionadas de quitosana nas concentrações de 0% a 1%.

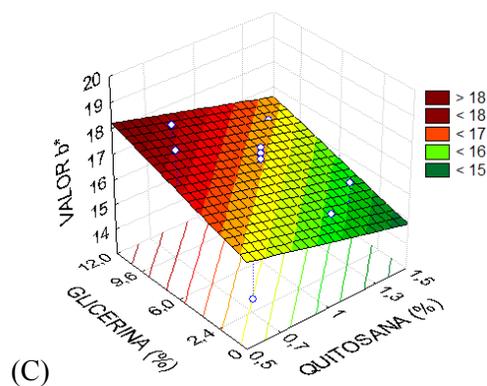
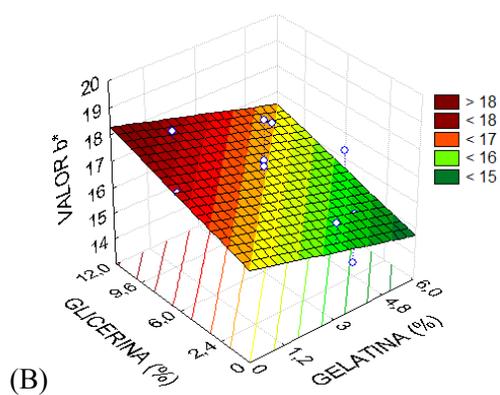
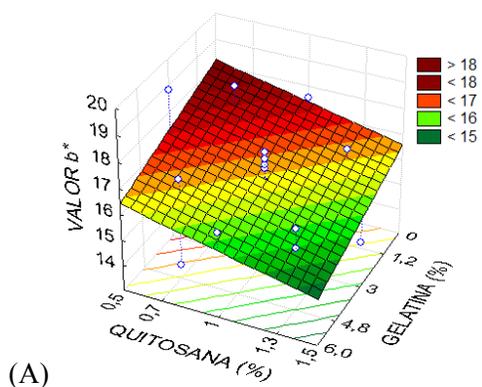


Gráfico 5 Superfície de resposta para o índice de amarelo (b^*) da cor de bifés *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no tempo zero

A saturação (C^*) das amostras também foi afetada no tempo zero por todos os compostos (Tabela 5), em seus componentes lineares, porém, a glicerina teve maior influência neste índice, uma vez que seu componente quadrático e interação com a quitosana também foram significativos ($p < 0,10$). A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos de C^* , foi construída a superfície de resposta em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina (Gráfico 6).

A saturação descreve a intensidade ou a quantidade de uma tonalidade. Assim, cores que apresentam baixo valor de saturação são consideradas pálidas enquanto as com alto valor de C^* são consideradas saturadas (RAMOS; GOMIDE, 2007). Portanto, desde que a cor pura (tonalidade) seja a ideal, maiores valores de saturação são mais desejáveis. No presente experimento, a adição de gelatina e quitosana induziu uma redução nos valores de C^* da cor dos bifés (Gráfico 6A). Para a gelatina, este efeito foi maior quando maiores concentrações de quitosana foram utilizadas. Embora os maiores valores C^* tenham sido observados em menores concentrações dos polímeros, este efeito pode ser atenuado pela adição de glicerina (Gráficos 6B e 6C), favorecendo a cor dos bifés.

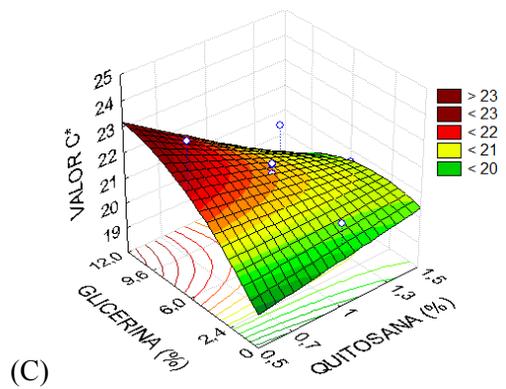
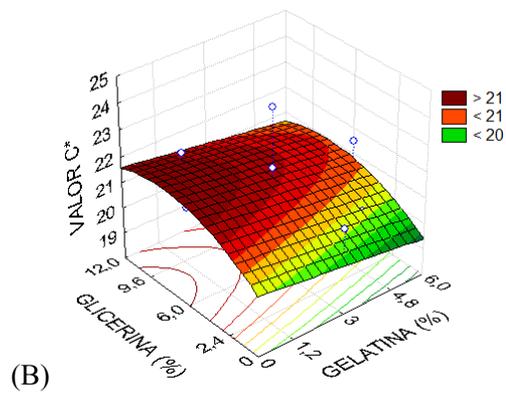
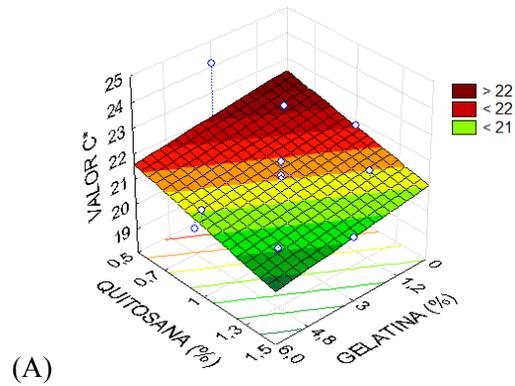


Gráfico 6 Superfície de resposta para a saturação (C^*) da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no tempo zero

Para o índice R630/R580, apenas o componente linear da gelatina foi significativo ($P < 0,10$) para o componente linear da gelatina no tempo zero (Tabela 13), sendo o modelo ajustado e a superfície de resposta construída em função das concentrações de gelatina (Gráfico 7).

O índice R630/R580 é utilizado como uma estimativa indireta da coloração marrom nas superfícies da carne. Relações mais baixas indicam uma coloração mais marrom e descoloração acentuada da superfície da carne (SUMAN et al., 2010). Apesar de a gelatina não ter apresentado efeito significativo para os valores de a^* , observa-se que maiores concentrações de gelatina implicam a maior avermelhamento dos bifes, o que pode ser correlacionado com a saturação (C^*).

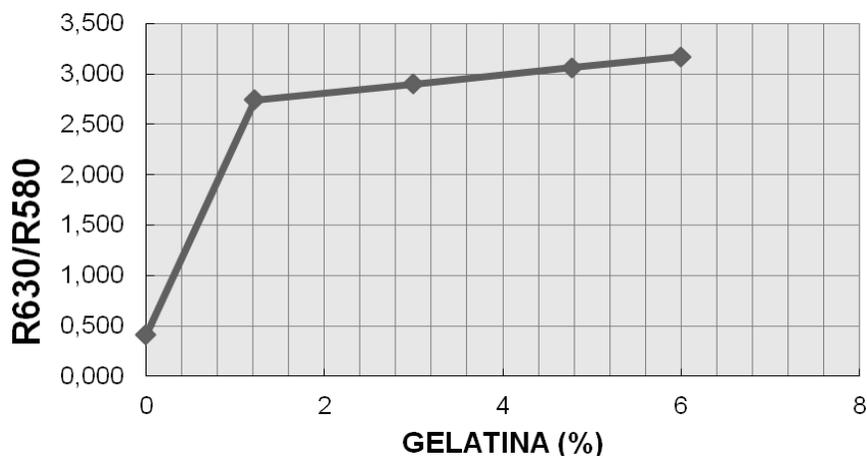


Gráfico 7 Valores preditos para a razão R630/R580 de bifes *M. semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, no tempo zero

Embora seja importante avaliar os efeitos do filme de revestimento na cor dos bifés, é ainda mais importante observar os efeitos na estabilidade da cor durante o armazenamento refrigerado. No quinto dia de estocagem, em condições propícias para a oxidação dos pigmentos (fotoperíodo), os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,05$) apenas para os componentes do índice de vermelho (a^*), saturação (C^*) e razão R630/R580 da cor dos bifés (Tabela 14).

O índice de vermelho (a^*) é o principal índice de cor relacionado à carne vermelha (RAMOS; GOMIDE, 2007). Sendo assim, sua manutenção é extremamente importante para a aceitabilidade da carne *in natura*. Segundo McKenna et al. (2005), há uma forte relação direta entre os valores de a^* e o grau de oxigenação do pigmento (O_2Mb).

Os compostos gelatina e quitosana e suas respectivas interações com a glicerina afetaram significativamente ($P < 0,05$) a manutenção da cor vermelha, tendo uma grande participação da gelatina. A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos de a^* , foi possível construir as superfícies de resposta em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina (Gráfico 8).

A gelatina teve maior participação na manutenção de a^* do que a quitosana (Gráfico 8A), sendo que maiores teores de ambos os polímeros favorecem a cor vermelha. Esta manutenção dos valores de a^* pode estar relacionada à maior barreira ao oxigênio, conforme anteriormente relatado, o que dificulta a penetração de oxigênio na carne e, conseqüentemente, reduz a TCO da carne, prolongando a atividade da metamioglobina redutase (MRA) e favorecendo a manutenção da cor vermelha, ou seja, os valores de a^* . Isto é condizente com a observação de que, para maiores valores de polímeros (quitosana e gelatina), a adição de glicerina reduz levemente os valores de a^* das amostras (Gráficos 8B e 8C). Segundo Cuq et al. (1997), a adição de plastificantes, como a glicerina, leva a uma reorganização da rede proteica, com

consequente aumento do espaço livre, o que pode ter favorecido a permeabilidade ao oxigênio, reduzindo a manutenção da estabilidade da cor vermelha.

Tabela 14 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o índice de vermelho (a*), saturação (C*) e razão R630/R580 de bifes *M. semitendinosus*, no quinto dia de armazenamento

Variáveis	a*		C*		R630/R580	
	CR	EP	CR	EP	CR	EP
Constante	16,7295*	0,2674	25,1327*	0,9111	3,00468*	0,16510
Gelatina (linear)	1,8820*	0,1450	2,4537**	0,4941	0,31944**	0,08953
Gelatina (quadrática)	-0,5541**	0,1508	-0,8056	0,5139	-0,09471	0,09313
Qitosana (linear)	0,8069**	0,1450	1,2740***	0,4941	0,17429	0,08953
Qitosana (quadrática)	-0,3274	0,1508	-0,1909	0,5139	-0,06202	0,09313
Glicerina (linear)	0,0054	0,1450	-0,1408	0,4941	0,05572	0,08953
Glicerina (quadrática)	0,1368	0,1508	0,5744	0,5139	-0,01188	0,09313
Gelatina x qitosana	0,0550	0,1894	-0,3175	0,6453	0,08490	0,11693
Gelatina x glicerina	-0,5775**	0,1894	-1,0125	0,6453	-0,07969	0,11693
Qitosana x glicerina	-0,8275**	0,1894	-1,1625	0,6453	-0,13375	0,11693
R ²	0,7576		0,7266		0,7641	

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$; e *** $P < 0,10$

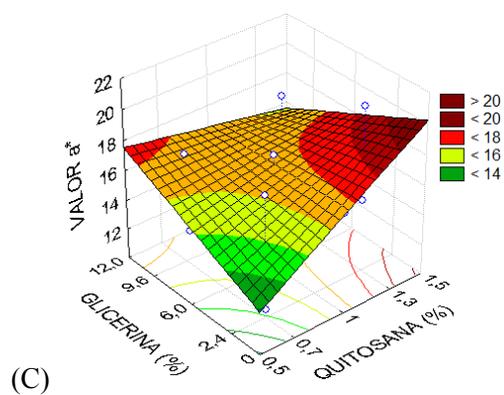
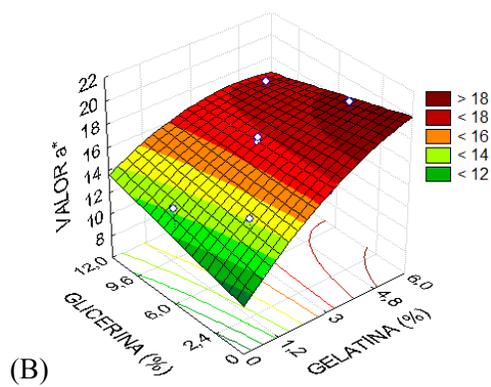
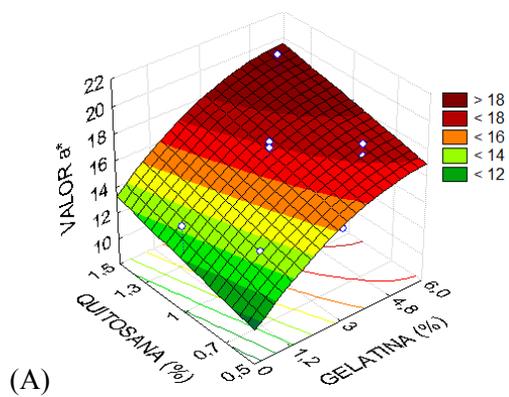


Gráfico 8 Superfície de resposta para o índice de vermelho (a^*) da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, quitosana e glicerina, no quinto dia de armazenamento

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

Para a saturação (C^*), os efeitos foram significativos apenas ($P < 0,10$) para gelatina e quitosana (Tabela 14), sendo os coeficientes sempre positivos e lineares, o que indica que a maior participação destes compostos favorece a força da cor vermelha (Gráfico 9), sendo, portanto, desejável. No entanto, ao se avaliar a cor vermelha por meio da razão R630/R580 (Gráfico 10), apenas a participação da gelatina foi significativa.

Embora a glicerina contribua para uma redução da cor vermelha durante o armazenamento, sua participação na formação da cor no tempo zero deve ser considerada. Nesse sentido, a aplicação de elevadas concentrações de gelatina ($>3\%$) e quitosana ($>1\%$), associada a quantidades intermediárias (3% a 6%) de glicerina, pode ser considerada satisfatória, por conferir elevados valores de a^* e C^* .

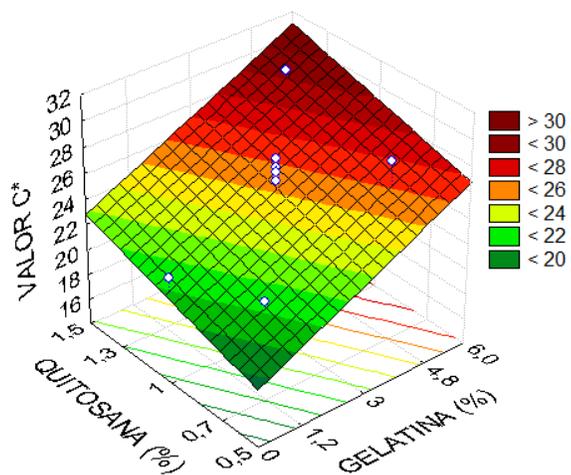


Gráfico 9 Superfície de resposta para a saturação (C^*) da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no quinto dia de armazenamento

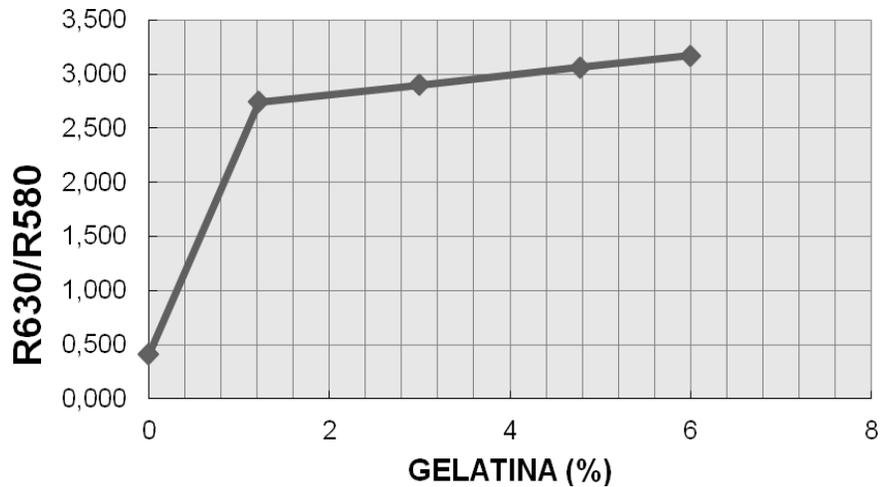


Gráfico 10 Valores preditos para a razão R630/R580 da cor de bifes *M. semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, no quinto dia de armazenamento

A equação que expressa os índices de cor dos bifos envoltos por biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina é apresentada na Tabela 15.

Tabela 15 Modelos codificados das regressões para os componentes da cor

tempo	variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	L*	$y=48,837-1,606x_1-1,261x_2^2$	0,03	0,8252
	b*	$y=16,701-0,529x_1-0,481x_2+0,532x_3-0,574x_2x_3$	0,02	0,6434
	C*	$y=21,298-0,74x_1-0,447x_2+0,375x_3-0,288x_3^2-0,459x_2x_3$	0,22	0,4279
	R630/R580	$y=2,901+0,159x_1$	<0,01	0,6392
5	a*	$y=16,7295+1,8820x_1-0,551x_2+0,8069x_3-0,577x_1x_3-0,8275x_2x_3$	0,06	0,7474
	C*	$y=25,1327+2,4537x_1+1,2740x_2$	<0,01	0,9679
	R630/R580	$y=3,00468+0,31944x_1$	<0,01	0,6224

x_1 = variável codificada para gelatina; x_2 = variável codificada para quitosana; x_3 = variável codificada para glicerina;

Na Figura 1 é possível observar a coloração dos bifes após cinco dias de armazenamento.

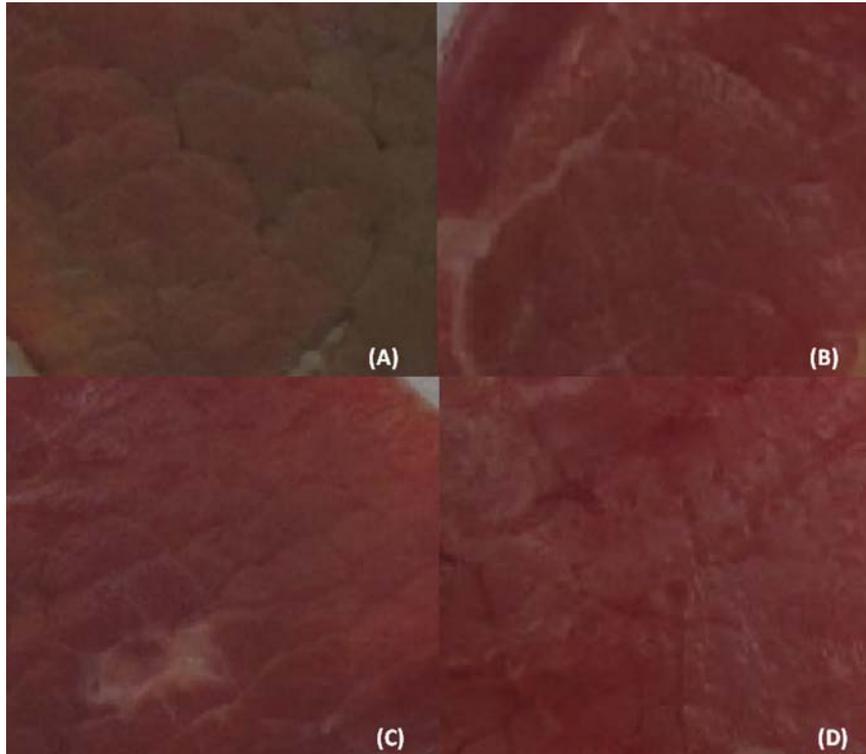


Figura 1 Coloração dos bifes após 5 dias de armazenamento, sendo (A) controle (água destilada); (B) amostra 3: 1,22% gelatina + 1,3% quitosana + 2,4% glicerina; (C) amostra 9: 0% gelatina + 1% quitosana + 6% glicerina; (D) amostra 17: 3% gelatina + 1% quitosana + 6% glicerina

CONCLUSÃO

A aplicação de biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina mostrou efetividade na diminuição da perda de peso dos bifês e na diminuição da oxidação lipídica durante cinco dias de estocagem sob fotoperíodo. Os revestimentos também favoreceram a manutenção da cor de carnes bovinas durante os cinco dias de estocagem, reduzindo a oxidação do pigmento de O₂Mb a MMb durante o armazenamento. Entretanto, há uma maior formação de Mb⁺, o que também afeta a cor percebida na superfície da carne, embora de forma menos negativa do que a formação de MMb.

Com base nos resultados mais relevantes, perda de peso, índice de TBARS e cor (a* e C*) no quinto dia de estocagem, as melhores concentrações para a formação do filme foram nas faixas de 3% a 6% de gelatina, 1,0% a 1,5% de quitosana e 6% de glicerina.

REFERÊNCIAS

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

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

AUDIC, J. L.; CHAUFER, B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. **European Polymer Journal**, New York, v. 41, n. 8, p. 1934-1942, Aug. 2005.

CARDOSO, G. P. et al. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de folhas frescas de pimenta da jamaica (*Pimenta dióica*). In: SEMANA ACADÊMICA INTEGRADA, 3.; SIMPÓSIO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL INICIAL E CONTINUADA, 1., 2011, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2011. 1 CD-ROM.

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

CUQ, B. et al. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 3, p. 622-626, Mar. 1997.

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

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

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

JO, J. W. et al. Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer. **Meat Science**, Barking, v. 59, n. 4, p. 369-375, Apr. 2001.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: a new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 8, p. 845-852, Aug. 2007.

_____. Chitosan glucose complex: a novel food preservative. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 5, p. 521-528, May 2008.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Oxford, v. 10, n. 12, p. 47-59, Dec. 1986.

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

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

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

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

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

OSAWA, C. C. et al. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 655-663, jul./ago. 2005.

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

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

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos:** uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

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

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

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

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 37-51, Mar. 1999.

STEWART, M. R.; ZISPER, M. W.; WATTS, B. M. The use of reflectance spectrophotometry for the assay of raw meat pigments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 30, p. 464-469, 1965.

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

TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E. T. **Teste de TBA:** ranço em alimentos. São Paulo: USP, 2000. 10 p.

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

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

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

YOUN, S. K.; KIM, Y. J.; AHN, D. H. Antioxidative effects of chitosan in meat sausage. **Journal of Korean Society Food Science Nutrition**, Seoul, v. 30, n. 3, p. 477-481, 2001.

CAPÍTULO 3

Efeito de revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana na preservação de carne bovina refrigerada

RESUMO

Foram otimizados revestimentos comestíveis à base de gelatina e pelo método estatístico Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para conservação de carne bovina refrigerada. A atividade antimicrobiana de seis concentrações de quitosana (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5) e dos revestimentos foi testada contra cinco bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* Enteritidis (S64) e *Escherichia coli* (Inc0181 CDC055). Os revestimentos foram aplicados em bifes de carne bovina *M.Semitendinosus* (lagarto) e seus efeitos na conservação da carne foram avaliados nos tempos zero e seis de armazenamento, sendo conduzidas as análises de perda de peso, pH, índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor objetiva. Concentrações acima de 1% de quitosana foram efetivas na inibição de todas as bactérias testadas e filmes nas concentrações de 1,5% de quitosana e 6% de gelatina apresentaram as maiores atividades antimicrobianas. No sexto dia, os revestimentos afetaram o pH dos bifes, tendo a região de pH (5,40) ocorrido em concentrações abaixo de 3% de gelatina e acima de 1% de quitosana. Esta mesma região apresentou as menores perdas de peso (2%). As menores variações no índice de TBARS do tempo zero ao tempo seis ocorreram em revestimentos com concentrações nas regiões de 3% de gelatina e 1,5% de quitosana, indicando forte diminuição da oxidação lipídica. A aplicação imediata dos revestimentos induziu o aumento de O₂Mb e, no sexto dia de armazenamento, observou-se maior quantidade de O₂Mb (32%) e menor de MMb (30%) em bifes envoltos em revestimentos com 1,5% de quitosana e 3% de gelatina. Logo após a aplicação dos filmes (tempo zero), o modelo de regressão foi ajustado ($P < 0,05$) apenas para a tonalidade (h*), tendo os valores variado de 33 a 35, variação não muito expressiva. No sexto dia de armazenamento, os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,05$) para luminosidade (L*), índice de vermelho (a*), índice de amarelo (b*), saturação (C*) e tonalidade da cor. Para a razão R630/R580 dos bifes, os modelos indicaram que concentrações de 3% de gelatina e 1,5% de quitosana

são as melhores na formação do revestimento para a conservação de carne bovina refrigerada.

Palavras-chave: Filmes comestíveis. Atividade antimicrobiana. Carne bovina.

ABSTRACT

Edible gelatin based coatings have been optimized by the statistical method DCCR (Central Composite Rotational Design). The antimicrobial activity of six concentrations of chitosan (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5) and the coatings was tested against five bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* Enteritidis (S64) and *Escherichia coli* (Incos181 CDC055). The coatings were applied in beef *M. Semitendinosus*, and their effects on the conservation of meat were evaluated in zero and sixth day of storage, and the analysis of weight loss, pH, TBARS values, pigments of myoglobin and objective color were conducted. Concentrations above 1% chitosan were effective in the inhibition of all bacteria tested, and films at concentrations of 1.5% chitosan and 6% gelatin showed the highest inhibitory activity. On the sixth day, the coatings affected the pH of steaks, and the region of pH (5.40) occurred at concentrations below 3% gelatin and above 1% chitosan; this region had the lowest weight losses (2%). The minor variations in TBARS values from time zero to sixth time occurred in the regions with concentrations of 3% gelatin and 1.5% chitosan, indicating a strong decrease of lipid oxidation. The immediate application of coatings induced increased O₂Mb and on the sixth day of storage showed higher amount of O₂Mb (32%) and lower MMb (30%) in beef wrapped in coats with 1.5% chitosan and 3 gelatina. After application of the films (time zero), the regression model was adjusted (P <0.05) only for the hue (h*), and the values ranged from 33 to 35, not much expressive variation. On the sixth day of storage, the adjusted regression models were significant (P <0.05) for lightness (L*), redness (a*), yellow index (b*), saturation (C*), hue color (h*) and the R630/R580 ratio of steaks, the models indicated that concentrations of 3% gelatin and 1.5% chitosan are the best in the formation of the coating for the preservation of chilled beef.

Keywords: Edible films. Antimicrobial activity. Meat.

1 INTRODUÇÃO

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

Uma das alternativas para retardar a deterioração por reações oxidativas e aumentar a vida útil de carnes é a utilização de revestimentos comestíveis, associada a embalagens secundárias simples, que são capazes de manter a qualidade com mínima alteração de suas propriedades intrínsecas (CARDOSO; RAMOS; RAMOS, 2009).

Muitas substâncias possuem propriedades adequadas para uso como revestimento ou filme. A maioria funciona como barreira ao oxigênio, mas não à água, sendo este um dos fatores limitantes para os compostos aptos para tal uso. A atividade antimicrobiana é outro fator extremamente importante; o revestimento com esta capacidade é de interesse considerável (LÓPEZ-CABALLERO et al., 2004).

A quitosana tem sido muito utilizada na composição de filmes e revestimentos antimicrobianos porque, além de ter boas propriedades formadoras de filmes, tem ação bactericida e fungicida. Esta ação é devido à sua capacidade de ligar-se às moléculas de água, inativar as enzimas microbianas e absorver os nutrientes usados pelos microrganismos (OUATTARA et al., 2000).

A utilização de gelatina apresenta afinidade para aplicação como revestimento, devido à sua viabilidade econômica aliada ao seu baixo custo. A cobertura de gelatina em carnes frescas pode auxiliar na redução da deterioração,

ao atuar como barreira ao oxigênio (KROCHTA; DEMULDEN-JOHNSON, 1997). Quando a O₂Mb (vermelho-brilhante) é oxidada a MMb (marrom), os consumidores tendem a rejeitar a carne. Uma vez que o oxigênio é o promotor da oxidação, sua redução ou eliminação implicarão na manutenção da cor da carne fresca.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um revestimento comestível à base de gelatina e quitosana e avaliar seu efeito na conservação de carne refrigerada a partir dos testes de atividade antimicrobiana da quitosana e dos filmes contra cinco bactérias, bem como o efeito da aplicação dos filmes na perda de peso, na oxidação lipídica e na estabilidade da cor, de bifes de *M. Semitendinosus* (lagarto), durante a estocagem sobre refrigeração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1 Delineamento experimental

A influência dos níveis de gelatina e quitosana nas blendas foi avaliada por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), segundo Rodrigues e Iemma (2005), para duas variáveis independentes em um esquema fatorial 2^2 , com as seguintes concentrações:

- a) 0% a 6% de gelatina (CARDOSO; RAMOS; RAMOS, 2009) e
- b) 0,5% a 1,5% de quitosana (VILLADIEGO, 2004).

A concentração de glicerina em relação à gelatina + quitosana foi fixada em 6%, conforme região ótima observada no capítulo 1. O DCCR foi composto por 4 pontos fatoriais + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios. Os dois fatores independentes foram investigados em cinco diferentes níveis (-1,41, -1, 0, +1, +1,41), conforme disposto na Tabela 1. As concentrações de gelatina e quitosana utilizadas para a formulação dos tratamentos são apresentadas na Tabela 2.

2.2 Preparo das soluções de quitosana para teste antimicrobiano

Seis concentrações de quitosana foram utilizadas para as soluções filmogênicas: 0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,5%. A quitosana foi solubilizada em solução de ácido acético glacial (Merck) a 0,4% (VILADIEGO, 2004). As suspensões foram homogeneizadas em agitador tipo Turrax, a 10.000 rpm, por 1 minuto. O pH natural das soluções foi mantido.

2.3 Preparo das soluções de revestimento

No preparo dos revestimentos, foi utilizada gelatina do tipo B, com *Bloom* de 250, gentilmente doada pela Empresa Gelita (São Paulo, SP). A quitosana (densidade de 0,30g/mL, grau de desacetilação >85,0%) foi adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, CE).

As soluções dos filmes de revestimento foram obtidas hidratando-se a gelatina em pó em água destilada por 30 minutos com posterior solubilização, a 70°C, em banho-maria, por 10 minutos, quando foram adicionadas a quitosana e a glicerina (Merck), cujo percentual foi definido em 6% em relação ao conteúdo de gelatina + quitosana. O pH natural das soluções foi mantido.

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

Tabela 1 Níveis utilizados no DCCR para dois fatores, para as variáveis gelatina e quitosana

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Gelatina (%)	0	0,88	3	5,12	6
Quitosana (%)	0,5	0,65	1	1,35	1,5

Tabela 2 Delineamento fatorial completo para composição dos filmes à base de gelatina e quitosana

Variáveis codificadas		Variáveis reais	
X_1	X_2	GELATINA (%)	QUITOSANA (%)
-1	-1	0,88	0,65
1	-1	5,12	0,65
-1	1	0,88	1,35
1	1	5,12	1,35
-1,41	0	0,00	1,00
1,41	0	6,00	1,00
0	-1,41	3,00	0,50
0	1,41	3,00	1,50
0	0	3,00	1,00
0	0	3,00	1,00
0	0	3,00	1,00

2.4 Determinação da atividade antimicrobiana das soluções de quitosana e dos filmes de gelatina + quitosana

Foram utilizadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* Enteritidis (S64) e *Escherichia coli* (Incos181 CDC055). As culturas foram ativadas, por meio de dois cultivos sucessivos, em caldo TSB (caldo tripton de soja) contendo 0,6% de extrato de levedura, a 37°C, por 24 horas.

A metodologia utilizada foi a difusão em disco (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2000). Aliquotas de 0,1 mL das culturas (10^8 UFC/mL) foram inoculadas em meio de cultura TSA (ágar triptona de soja) com o auxílio de alça de Drigalski. Após a solidificação do ágar, foram adicionados discos de papel com 6 mm de diâmetro, que foram preenchidos com 5 μ L da solução filmogênica, a 35°C. O procedimento foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas, a 37°C, por 48 horas. Após esse intervalo, a mensuração dos halos de inibição formados foi realizada com paquímetro digital Digimess[®]. Os halos foram medidos em milímetros.

2.4 Obtenção e porcionamento dos bifes

Foram utilizadas peças de lagarto (*M. semitendinosus*, MS), adquiridas diretamente em matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção federal (SIF), sendo desossadas após 24 horas de abate e conduzidas refrigeradas ao Laboratório de Processamento de Carnes e Derivados da UFLA. Foi feita uma limpeza prévia nos músculos, removendo-se a gordura superficial e o tecido conectivo. Os bifes de ± 20 mm de espessura foram obtidos a partir do porcionamento no sentido transversal dos músculos.

2.5 Aplicação dos revestimentos

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

Os bifes, imediatamente após o preparo, foram imersos nas soluções de revestimento por 3 segundos e, em seguida, pendurados por ganchos em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab), a 4 °C, por 30

minutos, até a secagem do revestimento. Em seguida, foram pesados e acondicionados em bandejas de poliestireno e envoltos por filme plástico transparente de PVC.

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

2.6 Armazenamento e amostragem

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

As análises foram feitas em dois tempos: primeiro, no dia 0 (tempo zero de armazenamento) e o segundo tempo quando foram verificadas diferenças visíveis entre a coloração do controle e das amostras revestidas. Neste caso, o segundo tempo de análise ocorreu no sexto dia de armazenamento.

2.7 Análises físicas e bioquímicas na carne

2.7.1 Perda de peso e pH

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

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

2.7.2 Índice de TBARS

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

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

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

2.7.3 Pigmentos relativos da mioglobina

As curvas de reflectância foram obtidas com um colorímetro espectrofotométrico CM-5 (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm, sendo estabelecido o iluminante A, o ângulo de 10° para o observador, luz especular incluída (RSIN) e o sistema de cor CIELAB.

Os valores intermediários (473, 525 e 572 nm) de reflectância foram calculados por interpolação linear. O conteúdo relativo dos pigmentos heme, expressos como oximioglobina (O₂Mb), mioglobina reduzida (Mb⁺) e metamioglobina (MMb), na superfície dos músculos MS (bife), foi calculado segundo o método matemático de Krzywicki (1979 citado por RAMOS; GOMIDE, 2007), de acordo com as seguintes equações:

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

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

$$\text{O}_2\text{Mb} = 1 - (\text{MMb} + \text{Mb}^+)$$

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

Também foi obtida a razão entre as reflectâncias 572 nm e 525 nm, para descrever a quantidade de metamioglobina (MMb) acumulada sobre a superfície da carne (MCKENNA et al., 2005). Para separar a contribuição relativa da absorção do pigmento (K) da dispersão do meio (S), foi utilizada a razão K/S

dos comprimentos de onda a 575 e 525 nm, obtidos pela equação de Kubelka-Munk (RAMOS; GOMIDE, 2007), sendo a MMb acumulada mensurada pela razão $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$.

Para cada repetição, as reflectâncias foram obtidas considerando-se o valor médio de dez leituras realizadas em diferentes pontos da superfície dos bifés.

2.7.4 Análise objetiva da cor

A avaliação objetiva da cor foi realizada na superfície dos bifés ainda envoltos pelo filme, utilizando-se um colorímetro espectrofotométrico CM-5 (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm. Para o cálculo dos índices de cor foi estabelecido o iluminante A, o ângulo de 10° para o observador, a reflectância especular excluída (RSEX) e o sistema de cor CIELAB, segundo sugerido por Ramos e Gomide (2007) para carnes *in natura*.

Os índices de cor luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) foram obtidos, para cada repetição, considerando-se o valor médio de dez leituras realizadas em diferentes pontos da superfície do bife. A partir dos índices de cor, também foram calculadas as coordenadas polares (RAMOS; GOMIDE, 2007): o índice de saturação [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] e o ângulo de tonalidade [$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$].

Além dos índices de cor L^* , a^* e b^* , também foi calculado o índice de vermelhidão (*redness*) para acompanhamento do declínio da cor vermelha (RAMOS; GOMIDE, 2007), estimado pela razão entre os valores da reflectância a 630 e 580 nm (%R 630/580 nm).

2.7.5 Análise estatística

A análise de atividade antimicrobiana das concentrações de quitosana foi conduzida em um delineamento em blocos casualizados (DBC), tendo as bactérias como blocos, avaliando seis concentrações de quitosana em três repetições. Os tratamentos foram submetidos a ANOVA e as médias avaliadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância, e por regressão, utilizando o programa estatístico Statistica® 5.0 (Statsoft, Poland).

Para os tratamentos, foi utilizado Modelo de Superfície de Resposta para o estudo da avaliação simultânea de duas variáveis independentes (gelatina e quitosana). Para cada fator experimental, a variância foi decomposta em componentes (linear, quadrático e interação), para a verificação de ajuste da seguinte função polinomial de segunda ordem, em função de X_i , ajustada para cada variável, e a importância de cada componente:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j$$

em que

Y = resposta estimada;

B_0, B_i, B_{ii} e B_{ij} , = constantes e coeficientes de regressão do modelo; e

X_i e X_j = níveis das variáveis independentes.

A significância de cada parâmetro da equação, para cada variável resposta, foi avaliada pelo teste F, usando o programa Statistica 5.0 (StatSoft, Poland). Devido à variação inerente das amostras, foram considerados os níveis de significância de 1%, 5% e 10% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antimicrobiana da quitosana

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) dos tratamentos para todas as bactérias analisadas, exceto para *P. aeruginosa*, em que a regressão não foi significativa ($P > 0,05$), sendo a avaliação conduzida pelo teste de médias (Tabela 3). Pode-se observar que concentrações acima de 1,0% de quitosana apresentaram efeito inibitório para todas as bactérias testadas.

O modo de ação da quitosana pode ser devido a interações superfície-superfície entre as cadeias dos biopolímeros e as paredes das células microbianas (CANER; VERGANO; WILES, 2005). Segundo Avadi et al. (2004), existe uma correlação entre a atividade antimicrobiana da quitosana e a formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos microrganismos, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e, conseqüente, inibição microbiana.

Tabela 3 Valores médios dos halos de inibição (mm) para diferentes concentrações de quitosana nos biopolímeros sobre diferentes bactérias, após 48 horas de incubação a 37°C

QUITOSANA	Salm	List	ECol	Staph	Pseud*	
%	Halos de inibição (mm)					
0,1	0	0	1,245	0	0,84	a
0,5	0	0	1,695	0	0,895	a
1	1,245	0,095	1,745	0,815	1,08	a
1,5	1,71	0,935	2,11	1,65	1,29	ab
2	2,55	1,44	2,315	2,34	1,455	ab
2,5	4,465	1,5	2,37	3,3	2,67	b
Água destilada	0	0	0	0	0	c

Salm = *Salmonella enterica* Enteritidis; List = *Listeria monocytogenes*; ECol = *Escherichia coli*; Saph = *Staphylococcus aureus*; e Pseud = *Pseudomonas aeruginosa*.

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

3.2 Atividade antimicrobiana dos filmes

Os filmes testados apresentaram atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias estudadas. Apenas para a *E. coli* não foi possível ajustar um modelo de superfície de resposta ($P > 0,10$). Entretanto, a quitosana apresentou efeito inibitório contra este microrganismo, com halos de inibição que variaram de 0,03 mm (para 0,5% de quitosana) a 2,33 mm (para 0,65% de quitosana), enquanto, para o controle (água destilada), nenhum halo foi formado (Tabela 4).

Tabela 4 Valores médios dos halos de inibição (mm) dos biopolímeros à base de gelatina e quitosana sobre diferentes bactérias após 48 horas de incubação a 37°C

GELATINA	QUITOSANA	Salm	List	EColi	Staph	Pseud
-1	-1	1,00	5,00	1,67	1,67	1,33
1	-1	1,00	2,00	2,33	0,67	0,50
-1	1	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00
1	1	2,33	3,00	1,00	2,00	3,00
-1,41	0	1,00	0,00	1,00	0,00	2,00
1,41	0	0,00	1,00	0,50	0,00	0,03
0	-1,41	2,00	0,50	0,00	0,50	1,00
0	1,41	2,00	1,00	1,00	3,33	1,67
0	0	1,33	0,67	1,50	0,67	1,00
0	0	1,00	1,33	1,00	1,50	1,00
0	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>MÉDIAS</i>		1,24	1,50	1,09	1,09	1,23
<i>CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)</i>		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Salm = *Salmonella enterica* Enteritidis; List = *Listeria monocytogenes*; ECol = *Escherichia coli*; Saph = *Staphylococcus aureus* e Pseud = *Pseudomonas aeruginosa*

A completa inativação de *E.coli* foi observada por Wang (1992) em concentrações de quitosana entre 0,5% e 1%, após dois dias de incubação, o que condiz com este trabalho, em que o maior halo de inibição foi encontrado na concentração de 0,65% de quitosana (2,33 mm). Já na maior concentração (1,5% de quitosana), os discos apresentaram apenas 0,33 mm de halo.

Pelo DCCR, puderam ser ajustados os modelos (Tabela 5) e as superfícies de resposta são apresentadas no Gráfico 1, para os halos de inibição para *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Enteritidis e o Gráfico 2, para *Staphylococcus aureus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana avaliadas.

Tabela 5 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o halo de inibição (mm) das cepas de *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

	Salm		List		Staph		Pseud	
	CR	EP	CR	EP	CR	EP	CR	EP
Constante	1,1108*	0,1111	0,9916**	0,1924	1,0544**	0,2422	0,9988*	0,0000
Gelatina (linear)	-0,0096	0,0681	0,0514	0,1180	0,0418	0,1485	-0,2073*	0,0000
Gelatina (quadrática)	-0,2865***	0,0813	0,2877	0,1408	-0,4569	0,1772	0,0737*	0,0000
Quitosana (linear)	0,1672	0,0681	-0,2877	0,1180	0,5427***	0,1485	0,3895*	0,0000
Quitosana (quadrática)	0,4680**	0,0813	0,4135***	0,1408	0,5072	0,1772	0,2413*	0,0000
Gelatina X quitosana	0,3333***	0,0962	1,2500*	0,1667	0,5833	0,2097	0,7083*	0,0000
R^2	0,70468		0,40869		0,76863		0,623	

Salm = *Salmonella enterica* Enteritidis; List = *Listeria monocytogenes*; Saph = *Staphylococcus aureus*; e Pseud = *Pseudomonas aeruginosa*

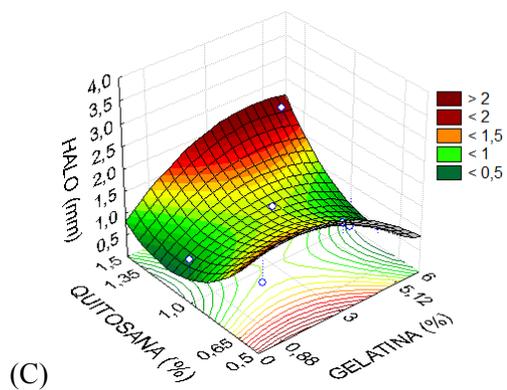
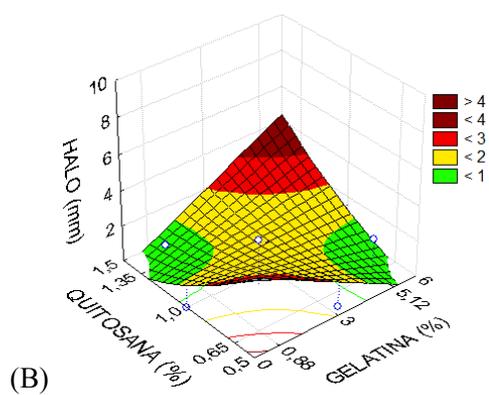
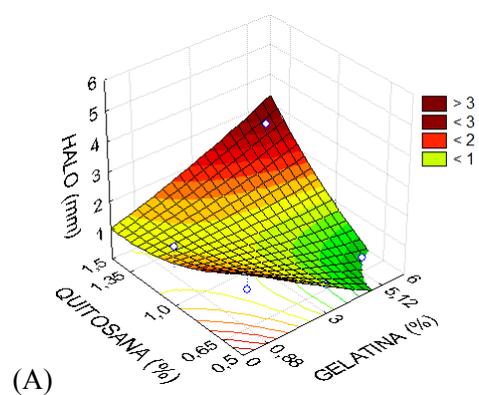


Gráfico 1 Superfície de resposta para os halos de inibição (mm) de (A) *Pseudomonas aeruginosa*, (B) *Listeria monocytogenes* e (C) *Salmonella* Enteritidis, após 48 horas de incubação, a 37°C

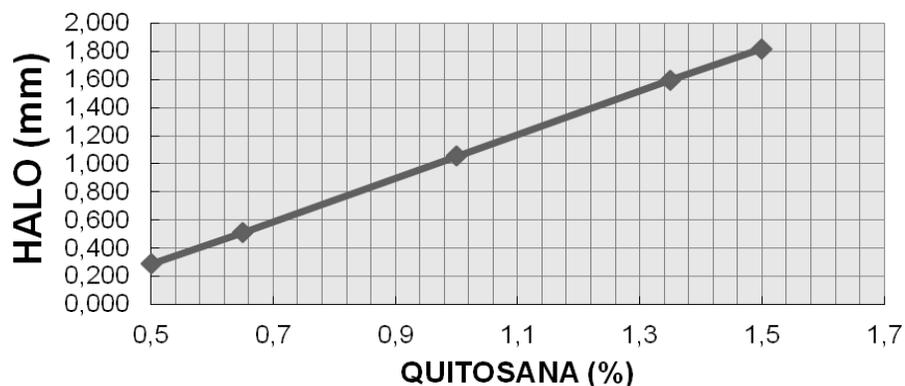


Gráfico 2 Valores preditos para o halo de inibição (em milímetros) contra *Staphylococcus aureus*, em função das concentrações de quitosana, após 48 horas de incubação a 37°C

Os modelos ajustados para o comportamento de inibição dos filmes foi semelhante para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa) e *Listeria monocytogenes* (gram-positiva) e diferentes de *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Salmonella enteritidis* (gram-negativa). Portanto, não houve diferenciação na inibição de bactérias gram-positivas e negativas. Em contrapartida, No-Kyoon et al. (2007) estudaram seis tipos de quitosana contra quatro bactérias gram-negativas e sete gram-positivas e concluíram que todos os tipos de quitosana a 0,1% de concentração demonstraram maior efeito contra bactérias gram-positivas do que contra gram-negativas.

As faixas que promoveram maior halo de inibição de *P. aeruginosa* (Gráfico 1A) e *L.monocytogenes* (Gráfico 1B) foram acima de 1,0% de quitosana e 3% de gelatina. Zivanovic et al. (2004) demonstraram que soluções de 0,58% de quitosana e 0,1% de ácido acético reduziram o inóculo inicial de *L. monocytogens* de uma concentração inicial de 10^7 UFC/mL para abaixo dos limites de detecção após 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento a 25°C.

Para *Staphylococcus aureus* (Gráfico 2) e *Salmonella enteritidis* (Gráfico 1C), as concentrações que apresentaram maior halo de inibição foram acima de 1,0% de quitosana e 4% de gelatina. Em experimento realizado por Wang (1992), para completa inativação de *Staphylococcus aureus*, após dois dias de incubação, foram necessárias concentrações de quitosana maiores que 1% a 1,5%. Contudo Chang et al. (1989) relatam que concentrações de quitosana maiores ou iguais a 0,005% foram suficientes para o mesmo efeito sobre o mesmo microrganismo.

Como anteriormente citado, o modo de ação da quitosana pode ser devido a interações superfície-superfície entre as cadeias dos biopolímeros e as paredes das células microbianas (RAAFAT; SAHL, 2009). Segundo Gil et al. (2004), há aumento da atividade antimicrobiana das soluções à base de quitosana com o aumento da acidez. O ponto isoelétrico da quitosana é, aproximadamente, 6 (WICKEN; KNOX, 1983 citados por FOSTER; BUTT, 2011), portanto, abaixo deste pH, os grupos amino C2 das unidades monoméricas da quitosana são carregados positivamente. Esta carga aumenta a interação das cadeias de quitosana com os grupos aniônicos da superfície da célula microbiana, aumentando, assim, o efeito da quitosana sobre os microrganismos (FOSTER; BUTT, 2011).

Os filmes comestíveis à base de gelatina e quitosana apresentaram capacidade de inibir as bactérias estudadas, tendo a melhor composição para efeito de inibição microbiana sido para quantidades acima de 1,0% de quitosana e 3,0% de gelatina.

Park, Marsh e Dawson (2010) testaram a atividade antimicrobiana de blendas de polietileno de baixa densidade com lactato de quitosana em diferentes concentrações. Foram testadas três bactérias patogênicas: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. A atividade antimicrobiana dos filmes aumentou com o aumento da concentração de

quitosana na matriz polimérica. Maiores concentrações de quitosana (2,1%) no filme inibiram totalmente *E.coli* em 12 horas. No entanto, a menor concentração testada (0,3%) foi insuficiente para a manutenção do efeito inibitório sobre as três bactérias.

As equações que expressam a atividade antimicrobiana dos filmes sobre as bactérias testadas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 Modelos codificados das regressões para atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. enteritidis*

variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
Salm	$y=1,1108-0,2865x_1^2+0,4680x_2^2+0,333x_1x_2$	0,40	0,6310
List	$y=0,9916+0,4135x_2^2+1,25x_1x_2$	0,08	0,3340
Staph	$y=1,0544+0,5427x_2$ $y=0,9988-$ $0,2073x_1+0,0737x_1^2+0,3895x_2+0,2413x_2^2+$	0,09	0,2861
Pseud	$0,7083x_1x_2$	0,17	0,1931

x_1 = variável codificada para gelatina; x_2 = variável codificada para quitosana; Salm = *Salmonella enterica* Enteritidis; List = *Listeria monocytogenes*; Saph = *Staphylococcus aureus* e Pseud = *Pseudomonas aeruginosa*

3.3 Perda de peso e pH

Os valores médios das variáveis perda de peso (PP) e pH para os tratamentos e amostra controle são apresentados na Tabela 7. Houve diferenças significativas entre o pH dos tratamentos apenas no tempo zero (Tabela 8). Quanto maior a concentração de quitosana, menor o pH dos filmes e quanto mais gelatina, maior o pH (Gráfico 3). Após 6 dias de estocagem, os pH não apresentaram diferenças significativas ($P>0,10$) entre os tratamentos, provavelmente devido ao efeito tamponante da carne (RAMOS; GOMIDE, 2007). Observou-se um aumento de pH do tempo 0 para o tempo 6, em que a

média de pH dos tratamentos foi em torno de 5,96, sendo este valor ainda menor que o controle (pH = 6,99). Suman et al. (2010) analisaram o efeito da embalagem primária de quitosana (1%) em vários tipos de embalagens secundárias (PVC, vácuo e atmosfera modificada) em bifés de carne bovina estocada a 1 °C, por cinco dias no escuro. Os resultados obtidos demonstraram que o biofilme de quitosana provocou um aumento de pH nos bolos de carne moída.

Tabela 7 Perda de peso e pH dos bifés de *M.Semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle, no tempo zero e no sexto dia de armazenamento

TRATAMENTOS				dia 0	dia 6
TRAT.	% GEL	% QUIT	PP (%)	pH	pH
1	0,88	0,65	4,380	5,430	5,423
2	5,12	0,65	3,918	5,543	5,610
3	0,88	1,35	6,417	5,417	6,020
4	5,12	1,35	3,887	5,550	6,050
5	0	1	6,099	5,480	6,475
6	6	1	3,691	5,513	5,887
7	3	0,5	11,270	5,667	5,687
8	3	1,5	3,603	5,487	6,780
9	3	1	4,423	5,450	6,300
10	3	1	4,132	5,490	6,007
11	3	1	2,520	5,497	5,367
<i>MÉDIAS</i>			4,940	5,502	5,964
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)			4,081	5,417	6,993

Tabela 8 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para a perda de peso e pH de bifes *M.Semitendinosus*, no tempo zero e no quinto dia de armazenamento

	pH (dia zero)		PP (dia 6)	
	CR	EP	CR	EP
Constante	3,69781*	0,592069	5,479095**	0,014572
Gelatina (linear)	-0,80083***	0,363111	0,036818***	0,008937
Gelatina (quadrática)	0,21733	0,433286	-0,004242	0,010664
Quitosana (linear)	-1,10389***	0,363111	-0,032655***	0,008937
Quitosana (quadrática)	1,49581***	0,433286	0,035997***	0,010664
Gelatina X quitosana	-0,51696	0,512753	0,005000	0,012620
R^2	0,59186		0,6529	

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$; e *** $P < 0,10$

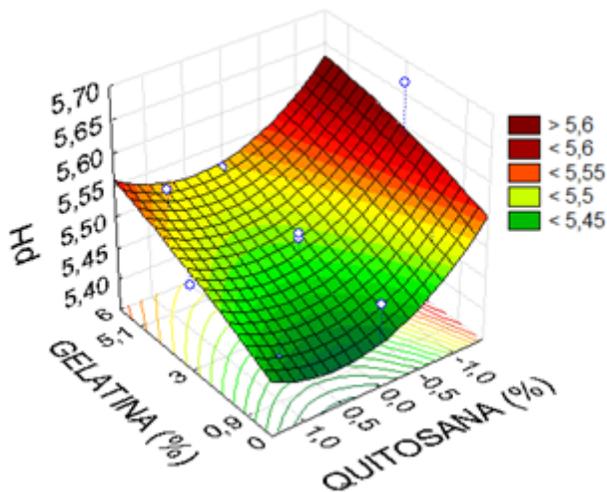


Gráfico 3 Superfície de resposta para pH dos bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no tempo zero

Em alimentos armazenados sob aerobiose e ricos em proteínas ou aminoácidos livres, como a carne bovina, é comum o aumento no valor de pH à medida que aumenta a contagem de microrganismos deteriorantes (NTZIMANI et al., 2008), cuja atividade proteolítica resulta em compostos de caráter básico (VINCI; ANTONELLI, 2002). Isso pode explicar o aumento significativo no valor de pH do controle com o passar do tempo e a possível atividade antimicrobiana dos filmes sobre os bifes. Variações de pH na faixa de 5,55 a 6,0 têm influência limitada na formação de metamioglobina (CLAUSS et al., 2005; LEDWARD, 1985, 1971 citados por WANDERLEI JÚNIOR, 2008) e, portanto, na cor de carnes. Assim, neste estudo, apenas a cor do controle pode ter sido influenciada pelo aumento brusco de pH durante o período de estocagem.

Todos os compostos, gelatina (componente linear) e quitosana (componente linear e quadrático), afetaram a perda de peso dos bifes após seis dias de armazenamento. Estes resultados são semelhantes aos encontrados no capítulo 1, em que maiores concentrações de gelatina diminuiram a perda de peso (Gráfico 4). O experimento com duas variáveis permitiu observar o efeito negativo da quitosana na perda de peso dos bifes.

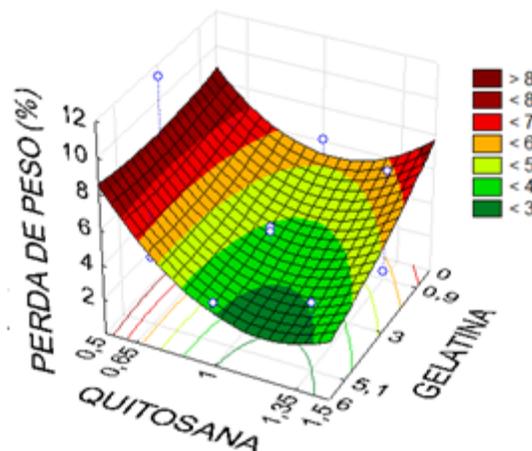


Gráfico 4 Superfície de resposta para perda de peso dos bifes *M. Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento

Neste experimento, diferentemente do capítulo 1, em que foram avaliadas três variáveis, foi possível observar que maiores concentrações de quitosana favorecem a perda de peso (Gráfico 4). Segundo Pereda et al. (2011), embora filmes somente à base de quitosana possuam permeabilidade muito mais alta que as blendas poliméricas, a adição de quitosana à matriz de gelatina não afeta significativamente a permeabilidade dos filmes. Novamente, foi observado que à medida que menores concentrações de gelatina são usadas, maiores adições de quitosana reduziram a perda de peso dos bifes, ou seja, possivelmente aumentaram a permeabilidade do filme de revestimento.

Segundo Wu et al. (2001), quanto mais hidrofóbico o material do filme, mais lenta a perda de peso de bifes embalados nestes filmes. Esses mesmos autores afirmam que a perda de umidade do produto pode ser adiada até que a umidade contida na solução filmogênica evapore, ou seja, os filmes atuam como agente sacrificante, perdem água em lugar da carne. Amaral et al. (2011), avaliando a secagem de filmes à base de gelatina e quitosana, observaram que a

quitosana seca mais rapidamente que a gelatina, e o tempo de secagem dos filmes depende da concentração de gelatina, em que filmes com maiores concentrações de gelatina secam mais rápido. Provavelmente, devido ao componente gelatina demorar mais para secar, ele consegue segurar mais a perda de peso.

As equações que expressam a perda de peso e pH dos bifes envoltos por biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 Modelos codificados das regressões para a perda de peso e pH

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	pH	$y=3,69781-0,80083x_1-1,10389x_2+1,49581x_2^2$	<0,01	0,5930
6	PP	$y=5,479095+0,036818x_1-0,032655x_2+0,035997x_2^2$	<0,01	0,5063

x_1 = variável codificada para gelatina; x_2 = variável codificada para quitosana;

3.4 Índice de TBARS

Os valores médios para o índice de TBARS para os tratamentos e amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento são apresentados na Tabela 10.

Tanto no tempo zero de armazenamento quanto no sexto dia, os componentes gelatina e quitosana afetaram ($P < 0,10$) os valores de TBARS, não tendo os componentes linear da quitosana e a interação sido significativos no tempo zero (Tabela 11). Novamente, a quitosana foi o fator que mais influenciou positivamente os valores de TBARS nos bifes no tempo zero (Gráficos 5A e 5B), tendo, aparentemente, um efeito pró-oxidante inicial. Outra possibilidade, discutida no capítulo 1, é a interferência de componentes presentes no filme no

teste de TBA. Para verificar esta possibilidade, a diferença entre o índice de TBARS no tempo seis e no tempo zero foi avaliada, sendo todos componentes significativos (Tabela 5 e Gráfico 5C).

Tabela 10 Índice de TBARS dos bifes de *M. semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle no tempo zero, no sexto dia de armazenamento e valor de Δ TBARS

TRATAMENTOS			dia 0	dia 6	Δ TBARS
TRAT.	% GEL	% QUIT	TBARS	TBARS	
1	0,88	0,65	0,025	0,377	0,352
2	5,12	0,65	0,028	0,136	0,108
3	0,88	1,35	0,012	0,314	0,302
4	5,12	1,35	0,048	0,369	0,321
5	0	1	0,018	0,525	0,507
6	6	1	0,024	0,247	0,223
7	3	0,5	0,016	0,444	0,429
8	3	1,5	0,763	0,198	-0,564
9	3	1	0,070	0,238	0,168
10	3	1	0,055	0,263	0,208
11	3	1	0,068	0,239	0,171
<i>MÉDIAS</i>			0,102	0,305	0,202
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)			0,017	0,352	0,335

Tabela 11 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o índice de TBARS de bifes *M.Semitendinosus* no tempo zero, no sexto dia de armazenamento e para o valor de Δ TBARS

	Dia zero		Dia seis		Δ TBARS	
	CR	EP	CR	EP	CR	EP
Constante	0,065*	0,0047	0,2468*	0,0084	0,2468*	0,0084
gelatina (linear)	0,0059	0,0029	-0,0723*	0,0051	-0,0723*	0,0051
gelatina (quadrática)	-0,0668*	0,0035	0,0562*	0,0061	0,0562*	0,0061
quitosana (linear)	0,133*	0,0029	-0,0221**	0,0051	-0,0221*	0,0051
quitosana (quadrática)	0,1184*	0,0035	0,0236**	0,0061	0,0236*	0,0061
gelatina X quitosana	0,0083	0,0041	0,074***	0,0072	0,074**	0,0072
R^2	0,5844		0,6529		0,5659	

Δ TBARS = diferença entre os valores de TBARS no dia seis e no dia zero

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$; e *** $P < 0,10$

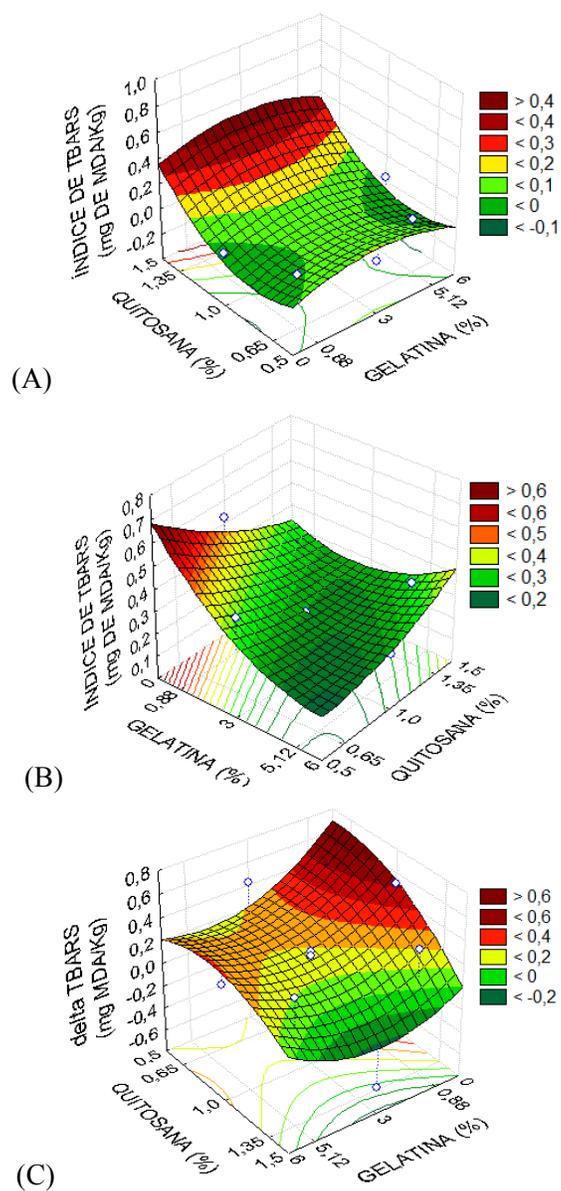


Gráfico 5 Superfície de resposta para o índice de TBARS de bifes *M.semitendinosus*, em função do teor de glicerina e quitosana: (A) no tempo zero; (B) após seis dias de armazenamento e (C) diferença entre os valores de TBARS no tempo zero e após seis dias de armazenamento

No sexto dia de armazenamento, todos os fatores afetaram ($p < 0,10$) o índice de TBARS (Tabela 5). Maiores concentrações de quitosana apresentaram menores índices de TBARS (Gráfico 5C), demonstrando o efeito antioxidante que era inicialmente esperado. Observa-se que a menor variação do tempo zero para o tempo seis ocorre em concentrações de 3% de gelatina e 1,5% de quitosana. As equações que expressam os índices de TBARS dos bifés envoltos pelos biopolímeros no tempo zero e no tempo seis são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 Modelos codificados das regressões para os índices de TBARS

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	TBARS	$y=0,065-0,0668x_1^2+0,133x_2+0,1184x_2^2$	0,11	0,5481
6	TBARS	$y=0,2468-0,0723x_1+0,0562x_1^2-0,0221x_2+0,0236x_2^2+0,074x_1x_2$	<0,01	0,6623
Δ	TBARS	$y=0,2468-0,0723x_1+0,0562x_1^2-0,0221x_2+0,0236x_2^2+0,074x_1x_2$	<0,01	0,5348

x_1 = variável codificada para gelatina; x_2 = variável codificada para quitosana;

3.5 Pigmentos relativos da mioglobina

Os valores médios para os pigmentos relativos da mioglobina (MMb, Mb+ e O₂Mb) e do índice de K572/K525 dos tratamentos e da amostra controle no tempo zero e no sexto dia de armazenamento são apresentados na Tabela 13. Tanto no tempo zero (Tabela 14) quanto no tempo seis (Tabela 15), os filmes afetaram todas as formas químicas da mioglobina.

Tabela 13 Pigmentos relativos da mioglobina dos bifes de *M. semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle, no tempo zero e no sexto dia de armazenamento

TRATAMENTOS			dia 0				dia 6			
TRAT.	% GEL	% QUIT	% MMb	% Mb+	% O2Mb	K572/K525	% MMb	% Mb+	% O2Mb	K572/K525
1	0,88	0,65	22,677	8,391	68,933	2,703	37,058	36,103	26,840	1,026
2	5,12	0,65	22,533	10,261	67,206	2,196	36,461	35,205	28,334	1,036
3	0,88	1,35	20,243	8,853	70,904	2,286	32,188	34,874	32,938	0,923
4	5,12	1,35	25,634	5,567	68,799	4,604	32,709	36,445	30,845	0,897
5	0	1	24,712	7,555	67,733	3,271	47,825	34,339	17,836	1,393
6	6	1	24,249	9,322	66,429	2,601	40,605	36,276	23,119	1,119
7	3	0,5	22,122	7,223	70,655	3,063	39,146	35,270	25,584	1,110
8	3	1,5	24,476	8,753	66,771	2,796	31,774	35,677	32,549	0,891
9	3	1	23,692	4,747	71,561	4,991	37,672	35,165	27,162	1,071
10	3	1	24,193	2,649	73,159	9,134	35,948	35,489	28,563	1,013
11	3	1	23,156	2,033	74,811	11,390	34,112	35,827	30,061	0,952
<i>MÉDIAS</i>			23,426	6,850	69,724	4,458	36,863	35,516	27,621	1,039
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)			23,452	3,387	73,161	1,299	34,433	35,005	30,562	1,084

No tempo zero, apenas a gelatina (componente linear) e a interação entre os componentes afetaram a MMb (Gráfico 6A). A gelatina (componente quadrático) afetou positivamente a quantidade de Mb⁺ e negativamente a quantidade de O₂Mb, sendo um indicativo de que a aplicação dos biopolímeros, inicialmente, teve um efeito inversamente proporcional nas quantidades de O₂Mb e Mb⁺. Como o controle no tempo zero apresentou valores de 20,14% de MMb, 16,36% de Mb⁺ e 63,5% de O₂Mb, presume-se que, de imediato, os filmes nas regiões de 1,0% de quitosana e 3% de gelatina converteram a Mb⁺ em O₂Mb, portanto, promoveram uma oxigenação dos bifes.

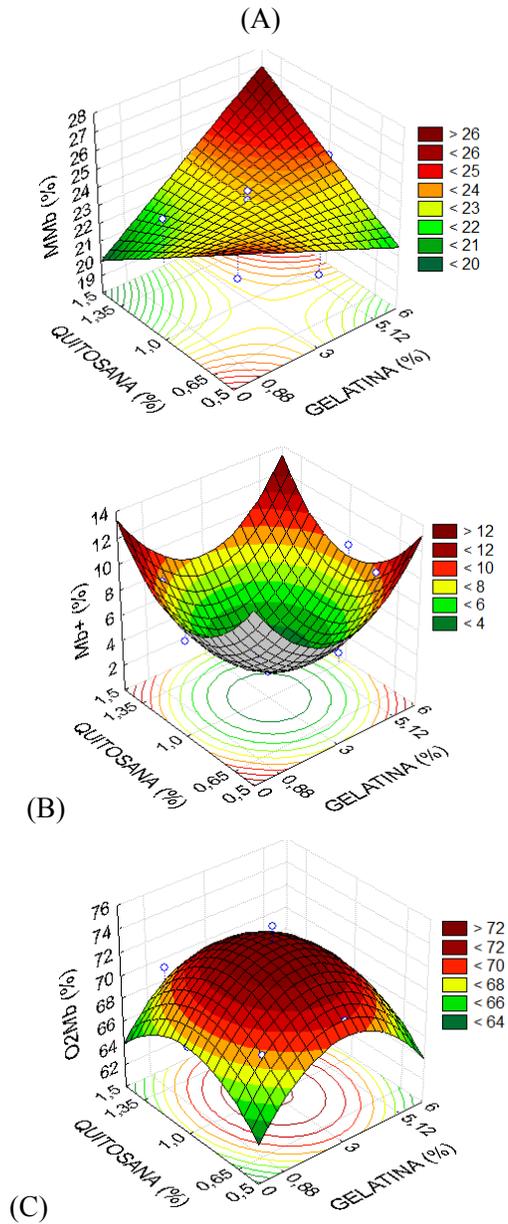


Gráfico 6 Superfície de resposta para o percentual de metamioglobina (MMb), deoximioglobina (Mb+) e oximioglobina (O_2 Mb) na superfície de bifés *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no tempo zero

Tabela 14 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para metamioglobina (%MMb), deoximioglobina (%Mb+) e oximioglobina (%O₂Mb) de bifes de *M. semitendinosus*, no tempo zero

	%MMb		%Mb+		%O ₂ Mb	
	CR	EP	CR	EP	CR	EP
Constante	23,68459*	0,299302	3,14296**	0,821597	73,17245*	0,938351
Gelatina (linear)	0,57623***	0,183560	0,13473	0,503879	-0,71096	0,575484
Gelatina (quadrática)	0,11879	0,219035	2,66977**	0,601259	-2,78856***	0,686702
Quitosana (linear)	0,49968	0,183560	-0,25996	0,503879	-0,23972	0,575484
Quitosana (quadrática)	-0,47532	0,219035	2,44311***	0,601259	-1,96780	0,686702
Gelatina X quitosana	1,38370**	0,259206	-1,28914	0,711532	-0,09456	0,812646
<i>R</i> ²	<i>0,6283</i>		<i>0,8529</i>			<i>0,75335</i>

P* < 0,01; *P* < 0,05; e ****P* < 0,10

Tabela 15 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para metamioglobina (%MMb), deoximioglobina (%Mb+) e oximioglobina (%O₂Mb) e K572/K525 de bifes de *M. semitendinosus*, no sexto dia de armazenamento

	%MMb		%Mb+		%O ₂ Mb		K572/K525	
	CR	EP	CR	EP	CR	EP	CR	EP
Constante	35,93137*	1,027974	35,4929*	0,191106	28,57573*	0,836871	1,012734*	0,034404
Gelatina (linear)	-1,28567	0,630449	0,42675***	0,117204	0,85892	0,513247	-0,050362	0,021100
Gelatina (quadrática)	2,84449***	0,752289	-0,02615	0,139855	-2,81834*	0,612437	0,082595***	0,025177
Quitosana (linear)	-	0,630449	0,07331	0,117204	2,31075*	0,513247	-0,069060***	0,021100
Quitosana (quadrática)	-1,55916	0,752289	0,0574	0,139855	1,50176	0,612437	-0,046063	0,025177
Gelatina X quitosana	0,27965	0,890262	0,61719***	0,165505	-0,89684	0,72476	-0,008672	0,029795
<i>R</i> ²	0,6509		0,765		0,67552		0,6295	

P* < 0,01; *P* < 0,05; e ****P* < 0,10

No sexto dia de estocagem, observaram-se aumento global na quantidade relativa dos pigmentos de MMb e Mb+ e queda nos pigmentos de O₂Mb (Gráfico 7). Os modelos para MMb e O₂Mb (Gráficos 7A e 7C, respectivamente) apresentaram comportamento inverso, indicando possível conversão de O₂Mb em MMb, em valores extremos de gelatina e menores concentrações de quitosana. Os valores mais favoráveis à cor vermelha foram encontrados na região de 3% de gelatina e 1,5% de quitosana.

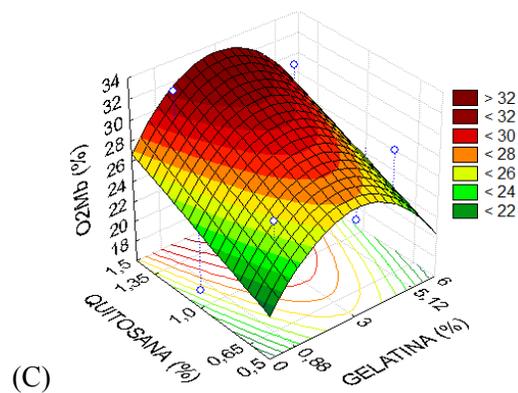
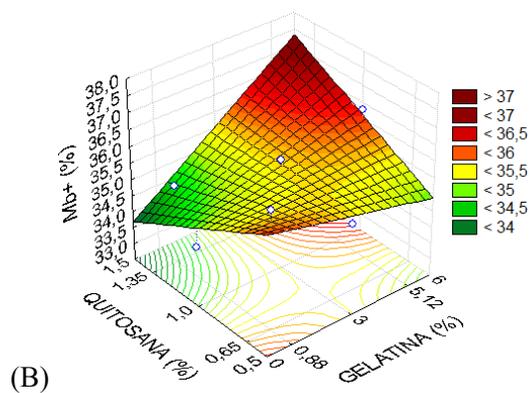
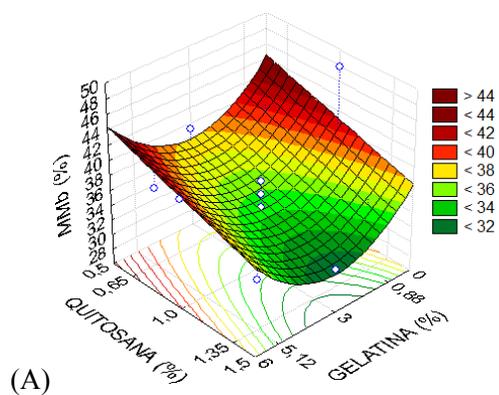


Gráfico 7 Superfície de resposta para o percentual de metamioglobina (MMb), deoximioglobina (Mb+) e oximioglobina (O₂Mb) na superfície de bifés *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento

À medida que aumenta a concentração de gelatina há um ligeiro aumento nos valores de Mb⁺, o que pode ser devido à menor permeabilidade do filme ao oxigênio. No entanto, a Mb⁺ é mais susceptível à oxidação que a O₂Mb (RICHARDS et al., 2002 citados por RAMOS; GOMIDE, 2007) e sua conversão a MMb pode ser acelerada em condições de estocagem.

Uma hipótese para o favorecimento da O₂Mb com a aplicação dos filmes é baseada na menor permeabilidade ao gás oxigênio e num efeito antioxidante possivelmente exercido pela quitosana (Gráfico 8). Segundo McKenna et al. (2005), as relações entre TCO, MRA e estabilidade dos pigmentos são dependentes dos níveis relativos de consumo de oxigênio do músculo, ou seja, os músculos mais estáveis têm capacidade redutora suficiente para atenuar os efeitos do consumo de oxigênio.

Altas TCOs diminuem a penetração de oxigênio no tecido muscular, favorecendo a formação do pigmento de deoximioglobina (Mb⁺), próximo à superfície da carne, o qual é mais susceptível à oxidação que a oximioglobina (MCKENNA et al., 2005; RAMOS; GOMIDE, 2007). Por outro lado, a aplicação de maiores concentrações de gelatina pode ter funcionado como uma barreira ao oxigênio (KROCHTA; DEMULDEN-JOHNSON, 1997), implicando em uma menor taxa de consumo de oxigênio (TCO) pela mitocôndria e resultando em menores teores de oxigênio livre para se ligar à mioglobina e evitando, assim, condições que favorecem a formação de MMb. Menor TCO também implica em menor formação de espécies de oxigênio reativas (ROS), capazes de provocar a oxidação da mioglobina ou, mesmo, a oxidação lipídica (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Associado a isso, uma menor TCO implica, possivelmente, em uma menor ação da atividade da metamioglobina redutase (MRA) na manutenção da condição redutora na carne, prolongando sua atividade com o tempo de armazenamento. McKenna et al. (2005) e Sammel et al. (2002) reportaram que

menores TCO e maior atividade da MRA prolongam a vida útil da carne. No entanto, Sammel et al. (2002) lembram que níveis muito baixos da TCO são deletérios para a estabilidade do pigmento, porque a respiração mitocondrial é necessária para regenerar a NADH para ser usada como um cofator na redução da MMb. Isso explica o comportamento do efeito do componente quadrático (Gráfico 10C) na gelatina para a concentração de MMb nos bifés após seis dias de armazenamento. Bifés envoltos com filmes compostos por quantidades intermediárias de gelatina (3%) apresentaram menores conteúdos de MMb.

Também foi possível ajustar o modelo da razão $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ para o sexto dia de estocagem. Os valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ são um indicativo da taxa de descoloração ou do acúmulo de MMb, de modo que maiores valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ indicam menor acúmulo de MMb. Neste trabalho, os valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ (Gráfico 8) apresentaram comportamento semelhante aos resultados da quantidade relativa de pigmentos de MMb (Gráfico 7A) calculada. Era esperado um comportamento inverso, uma vez que, como menores valores de valores de $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ implicam em maiores quantidades de MMb.

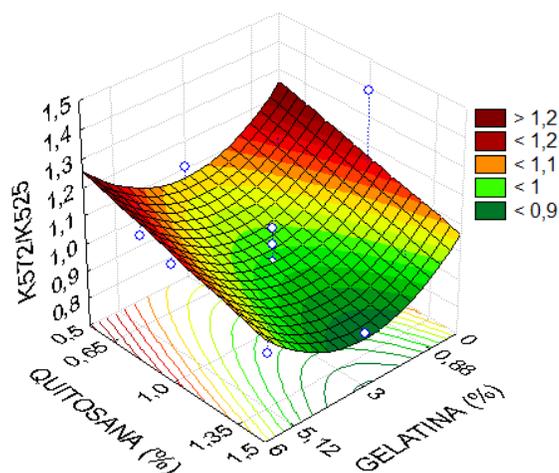


Gráfico 8 Superfície de resposta para razão K572/K525 de bifes *M. semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento

As equações que expressam os índices de cor dos bifes envoltos pelos revestimentos à base de gelatina e quitosana são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 Modelos codificados das regressões para os pigmentos relativos da mioglobina e índice K572/K525

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	%MMb	$y=23,68459+0,57623x_1+1,38370x_1x_2$	0,07	0,4823
	%Mb+	$y=3,14296+2,66977x_1^2+2,44311x_2^2$	<0,01	0,8363
	%O ₂ Mb	$y=73,17245-2,78856x_1^2$	0,01	0,5254
6	%MMb	$y=35,93137+2,84449x_1^2-2,38406x_1$	0,05	0,6509
	%Mb+	$y=35,4929+0,42675x_1+0,61719x_1x_2$	0,72	0,0124
	%O ₂ Mb	$y=28,57573-2,81834x_1^2+2,31075x_2$	0,40	0,0535
	K572/K525	$y=1,012734+0,082595x_1^2-0,06906x_2$	0,0913	0,4327

x_1 = variável codificada para gelatina; x_2 = variável codificada para quitosana;

3.6 Cor objetiva

Os valores médios para os índices de cor (L , a^* , b^* , C^* e h^*) e do índice de R630/R580 dos tratamentos e da amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento são apresentados na Tabela 17. Diferentemente do capítulo 1, logo após a aplicação dos filmes, o modelo de regressão ajustado foi significativo ($P < 0,10$) apenas para a tonalidade (Tabela 18). A tonalidade (h^*) indica a qualidade da cor da carne. De imediato, a aplicação dos filmes desfavoreceu a tonalidade (h^*), indicando que quanto maiores as concentrações dos componentes gelatina e quitosana, menor a tonalidade (Gráfico 9).

Darmadji e Izumoto (1994) não encontraram diferenças significativas nos valores de L^* , a^* e b^* no tempo zero de carnes moídas adicionadas de quitosana, nas concentrações de 0% a 1%. O aumento da concentração de quitosana e gelatina no filme causa aumento da sua espessura nos bifés, explicando a mudança nos valores de h .

Tabela 17 Cor objetiva e valor de R630/R580 dos bifés de *M. semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, e da amostra controle, no tempo zero e no sexto dia de armazenamento

TRATAMENTOS			dia 0							dia 6				
TRAT.	% GEL	% QUIT	L*	a*	b*	C*	h*	R630/R580	L*	a*	b*	C*	h*	R630/R580
1	0,88	0,65	42,810	21,200	14,800	25,860	34,910	3,500	40,690	18,400	15,760	24,230	40,570	2,471
2	5,12	0,65	41,760	20,270	13,440	24,320	33,540	3,472	38,590	17,920	15,370	23,610	40,620	2,515
3	0,88	1,35	43,490	21,760	14,860	26,350	34,340	3,598	43,140	19,880	15,410	25,150	37,780	2,820
4	5,12	1,35	39,950	19,830	13,350	23,910	33,950	3,408	38,570	19,780	15,610	25,190	38,280	2,944
5	0	1	43,850	20,560	13,760	24,740	33,790	3,333	40,950	14,110	13,830	19,760	44,410	1,659
6	6	1	43,580	20,890	14,540	25,450	34,840	3,278	40,650	18,540	15,890	24,410	40,590	2,379
7	3	0,5	44,290	21,340	15,200	26,200	35,460	3,381	41,070	18,580	16,370	24,760	41,370	2,377
8	3	1,5	41,700	19,380	12,850	23,260	33,550	3,223	40,430	19,160	14,740	24,170	37,570	2,904
9	3	1	44,390	21,190	14,580	25,720	34,520	3,325	40,710	18,210	15,470	23,900	40,360	2,392
10	3	1	43,190	20,990	14,490	25,510	34,620	3,335	40,905	18,760	15,680	24,455	39,900	2,540
11	3	1	43,500	21,810	15,290	26,630	35,040	3,489	41,100	19,310	15,890	25,010	39,440	2,692
<i>MÉDIAS</i>			42,955	20,838	14,287	25,268	34,415	3,395	40,619	18,423	15,456	24,059	40,081	2,518
CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)			41,980	20,430	14,460	25,030	35,280	3,401	40,100	19,220	15,960	24,980	39,700	2,759

Tabela 18 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a tonalidade (h^*) de bifes *M.Semitendinosus*, no tempo zero

	h^*	
	CR	EP
Constante	34,72755*	0,159302
Gelatina (linear)	-0,03504	0,097699
Gelatina (quadrática)	-0,26362	0,116580
Quitosana (linear)	-0,35770***	0,097699
Quitosana (quadrática)	-0,16805	0,116580
Gelatina X quitosana	0,24500	0,137961
R^2	0,4185	

* $P < 0,01$; e *** $P < 0,10$

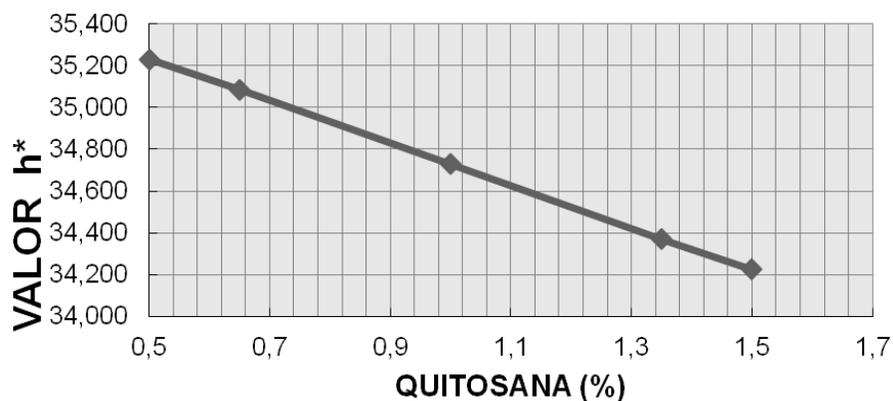


Gráfico 9 Valores preditos para o índice de tonalidade (h^*) da cor de bifes *M. semitendinosus*, em função das concentrações de quitosana, no tempo zero

No sexto dia de estocagem, em condições propícias para a oxidação dos pigmentos (fotoperíodo), os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,10$) para os componentes da luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*), índice de amarelo (b^*), saturação (C^*), tonalidade (h^*) e razão R630/R580 da cor dos bifes (Tabela 19). As curvas para L^* , a^* e b^* estão representadas no Gráfico 10.

Tabela 19 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para a luminosidade (L*), índice de vermelho (a*), índice de amarelo (b*), saturação (C*), tonalidade (h*) e razão R630/R580 de bifes *M. semitendinosus*, no sexto dia de armazenamento

	L*		a*		b*	
	CR	EP	CR	EP		
Constante	40,90709*	0,112582	18,75443*	0,317539	15,67868*	0,121242
Gelatina (linear)	-0,88927*	0,069046	0,7104***	0,194744	0,34034**	0,074357
Gelatina (quadrática)	-0,18633	0,082389	-0,86878***	0,232381	-0,32809***	0,088727
Quitosana (linear)	0,19152	0,069046	0,52128	0,194744	-0,30194***	0,074357
Quitosana (quadrática)	-0,21148	0,082389	0,41133	0,232381	0,02149	0,088727
Gelatina X quitosana	-0,6175**	0,0975	0,095	0,275	0,1475	0,105
R^2	<i>0,55198</i>		<i>0,54051</i>		<i>0,5335</i>	
	C*		h*		R630/R580	
	CR	EP	CR	EP		
Constante	24,44993*	0,320426	39,90666*	0,265578	2,539837*	0,086795
Gelatina (linear)	0,74929***	0,196515	-0,60633***	0,162877	0,148327	0,053231
Gelatina (quadrática)	-0,86838***	0,234493	0,88219**	0,194355	-0,171512	0,063518
Quitosana (linear)	0,20913	0,196515	-1,31491**	0,162877	0,190691***	0,053231
Quitosana (quadrática)	0,32874	0,234493	-0,64188***	0,194355	0,141029	0,063518
Gelatina X quitosana	0,165	0,2775	0,1125	0,23	0,019858	0,075168
R^2	<i>0,4905</i>		<i>0,71344</i>		<i>0,6856</i>	

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$; e *** $P < 0,10$

Os valores de L^* no tempo zero (média de 42,95) não apresentaram grande variação após seis dias de estocagem, mas a interação de menores concentrações de gelatina e maiores de quitosana favoreceu os valores da luminosidade dos bifés (Gráfico 10A). No capítulo 1 não foram evidenciadas mudanças significativas nos valores de L^* nos bifés armazenados por cinco dias. O músculo *M. semitendinosus* foi considerado, por McKenna et al. (2005), como sendo de alta estabilidade, em que a luminosidade (L^*) desempenha um papel mínimo na cor. Estes autores observaram pequeno incremento na luminosidade de bifés de *M. semitendinosus* envoltos apenas por filmes de PVC durante 5 dias de estocagem. Suman et al. (2010) encontraram, em bolos de carne moída embalados por biofilme de quitosana e filme de PVC, menor luminosidade que os bifés embalados somente em PVC, em todos os tempos analisados (0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias).

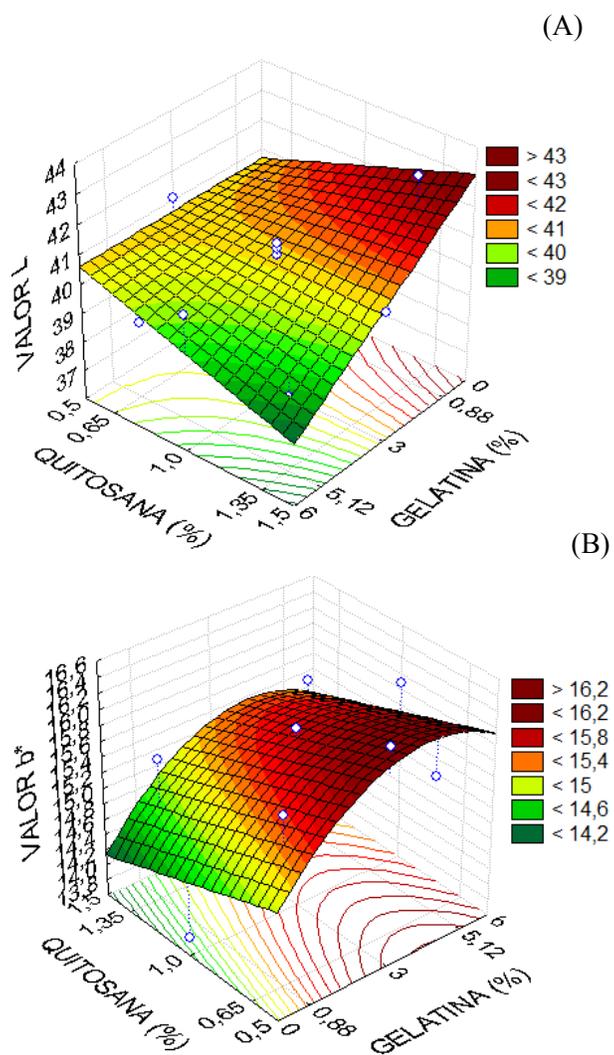


Gráfico 10 Superfície de resposta para o índice de luminosidade (L^*) e índice de amarelo (b^*) da cor de bifes de *M. semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento

O índice de vermelho foi afetado significativamente pela gelatina (Gráfico 11), com valores intermediários de gelatina (3%) apresentando os maiores índices de vermelho (próximos de 21,00). McKenna et al. (2005) encontraram valores muito superiores aos deste trabalho par o *M. semitendinosus*, de cerca de 26,71 para o índice de vermelho, após 5 dias de armazenamento.

Diferentemente do capítulo 1, apenas a gelatina teve participação na manutenção de a^* , favorecendo a cor vermelha. Como já citado, esta manutenção dos valores de a^* pode estar relacionada à maior barreira ao oxigênio, o que dificulta a penetração de oxigênio na carne e reduz, conseqüentemente, a TCO da carne, prolongando a atividade das metamioglobina redutase (MRA) e favorecendo a manutenção da cor vermelha, ou seja, os valores de a^* .

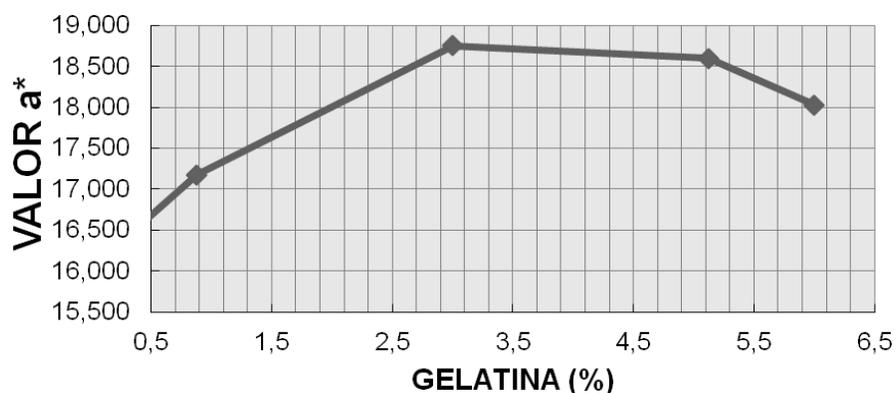


Gráfico 11 Valores preditos para o índice de vermelho (a^*) da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, no sexto dia de armazenamento

Segundo McKenna et al. (2005), há forte relação entre os valores de a^* e o grau de oxigenação do pigmento (O_2Mb). Os maiores valores de a^* foram encontrados na mesma região (3% de gelatina e 1,5% de quitosana) de maiores porcentagem de O_2Mb (Gráficos 10C).

Apesar de o componente quitosana não ter apresentado diferenças entre os tratamentos para o índice de vermelho (a^*) (Tabela 19), a capacidade da quitosana em manter a cor vermelha de carnes foi evidenciada no capítulo 1 e é corroborada por outros estudos.

Suman et al. (2010) encontraram maior índice de vermelho em carne moída envolta por filmes de quitosana estocada por 3, 4 e 5 dias, quando comparadas com o controle. Os autores concluíram que a adição de filmes de quitosana estabilizou a coloração vermelha da carne moída. Georgantelis et al. (2007) observaram que, durante seis meses de congelamento, bolos de carne moída adicionados de quitosana (individualmente ou adicionados de alecrim ou de α -tocoferol) apresentaram maior intensidade da cor vermelha do que os controles, inclusive de controles contendo apenas alecrim ou alfa-tocoferol. As carnes moídas que não continham quitosana foram consideradas inaceitáveis após 120 dias de armazenamento, em embalagem sob condição aeróbica.

Park, Marsh e Dawson (2010) testaram o efeito de blendas de polietileno de baixa densidade com lactato de quitosana em diferentes concentrações para a manutenção da cor vermelha de bifes de carne bovina. Menores variações no valor de a^* com o tempo foram observadas em concentração de 8% de quitosana.

Para os valores de b^* , foram significativos ($P < 0,10$) os efeitos linear e quadrático da gelatina e linear da quitosana (Tabela 19). A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos de b^* , foi possível construir a superfície de resposta em função das concentrações de gelatina e quitosana (Gráfico 10B).

Segundo McKenna et al. (2005), músculos de alta estabilidade, como o *M. semitendinosus*, apresentam valores de b^* elevados e, em seus resultados, foram encontrados valores de 21,19 para o índice de b^* , após 5 dias de estocagem. Este valor é muito superior aos encontrados neste trabalho para bifes envoltos em biopolímeros, nos quais os valores máximos de 16,5 ocorreram em concentrações de 0,5% de quitosana e 3% de gelatina.

A saturação (C^*) das amostras foi influenciada ($P < 0,10$) apenas pelos componentes linear e quadrático da gelatina, enquanto a tonalidade foi afetada, além destes componentes, pelos componentes linear e quadrático da quitosana (Tabela 19). Maiores valores de saturação (maior força) e menor tonalidade (tendência ao vermelho), a princípio, são favoráveis à cor da carne. No presente experimento, a adição de gelatina induziu, até a faixa de 3%, um aumento nos valores de C^* da cor dos bifes (Gráfico 12), sendo necessárias, nestes valores, maiores quantidades de quitosana para favorecer h^* (Gráfico 13).

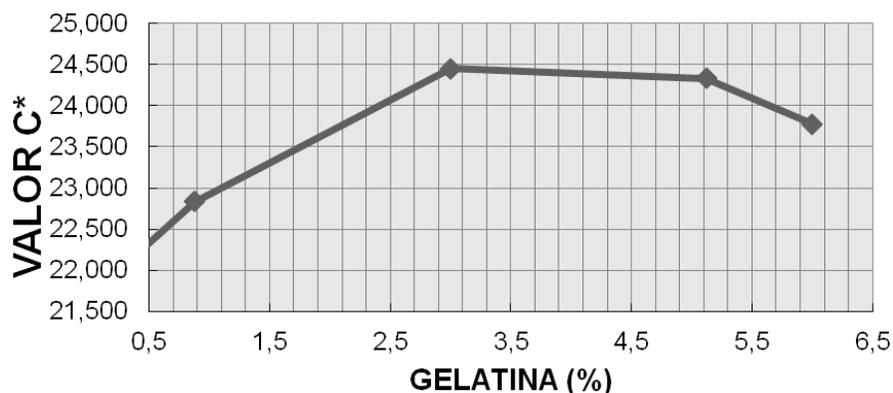


Gráfico 12 Valores preditos para a saturação (C^*) da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, no sexto dia de armazenamento

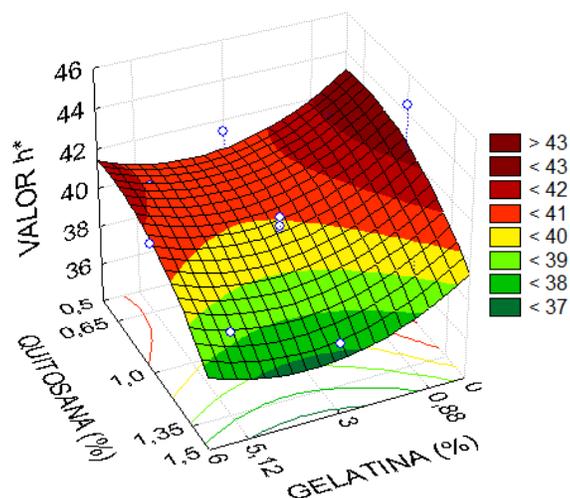


Gráfico 13 Superfície de resposta para a tonalidade (h^*) da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina e quitosana, no sexto dia de armazenamento

Apenas o componente linear da quitosana apresentou efeito significativo para a relação de R630/R580 (Tabela 19), evidenciando que maiores taxas foram encontradas nas maiores concentrações de quitosana (Gráfico 14). A relação entre R630/R580 é utilizada como uma estimativa indireta da coloração marrom nas superfícies da carne. Relações mais baixas indicam maior coloração marrom e maior descoloração da superfície da carne (SUMAN et al., 2010).

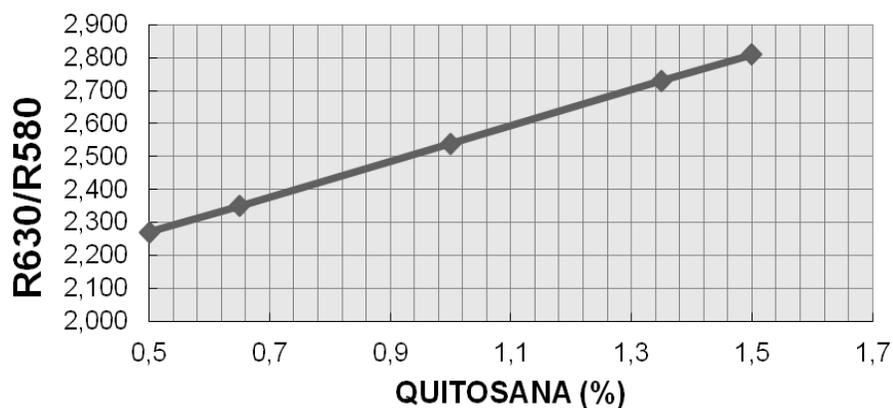


Gráfico 14 Valores preditos para a o índice R630/R580 da cor de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de gelatina, no sexto dia de armazenamento

A influência de filmes de quitosana (1%) na relação R630/R580 foi analisada por Suman et al. (2010). Para todas as embalagens secundárias testadas, o filme de quitosana aumentou a proporção de R630/R580 dos bolos de carne moída. Segundo estes autores, o efeito de filmes de quitosana em embalagens secundárias de PVC tornou-se visível nos dias 3, 4 e 5 de armazenamento. A equação que expressa os índices de cor dos bifes envoltos por biopolímeros à base de gelatina, quitosana e glicerina é apresentada na Tabela 20.

Tabela 20 Modelos codificados das regressões para os componentes da cor

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	h	$y=34,7255-0,35770x_2$	0,02	0,2524
	L*	$y=40,90709-0,88927 x_1 - 0,6175 x_1 x_2$	<0,01	0,5096
	a*	$y=18,75443+0,7104 x_1 - 0,86878 x_1^2$	0,02	0,3754
6	b*	$y=15,67868+0,34034 x_1 - 0,32809 x_1^2 - 0,30194 x_2$	<0,01	0,5152
	C*	$y=24,44993+0,74929 x_1 - 0,86838 x_1^2$	<0,01	0,4181
	h*	$y=39,90666-0,60633 x_1 + 0,88219 x_1^2 - 1,31491 x_2 - 0,64188 x_2^2$	<0,01	0,6984
	R630/R580	$y=2,539837+0,190691 x_2$	0,11	0,2660

$x_1 =$ variável codificada para gelatina; $x_2 =$ variável codificada para quitosana

A coloração dos bifés, após seis dias de armazenamento, está ilustrada na Figura 1.

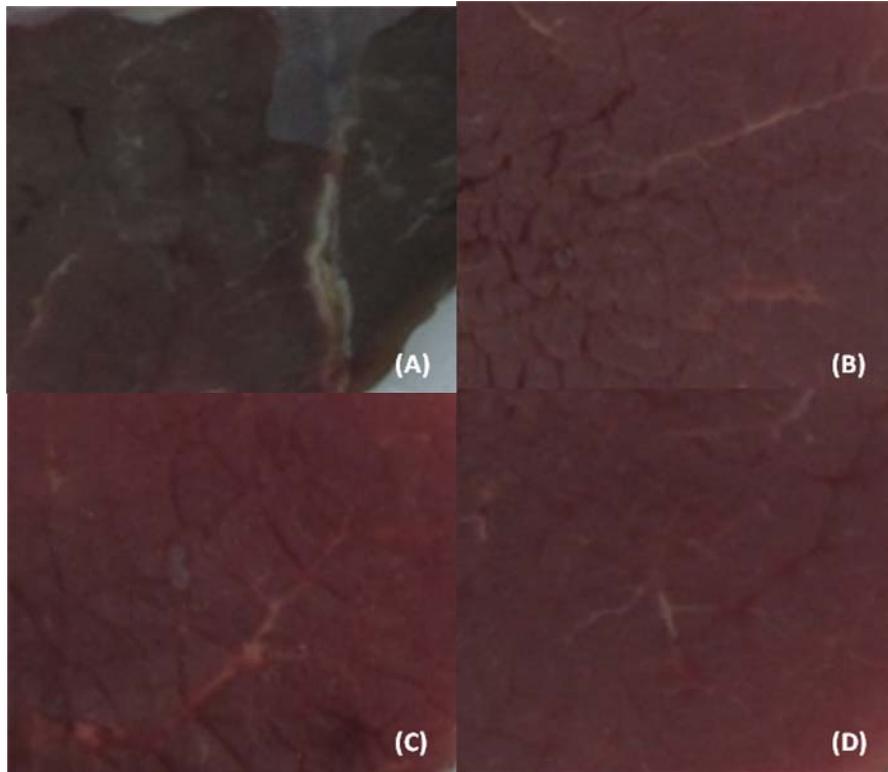


Figura 1 Coloração dos bifes após 5 dias de armazenamento, sendo (A) controle (água destilada); (B) amostra 9: 3% gelatina + 1% quitosana + 6% glicerina; (C) amostra 4: 5,12% gelatina + 1,35% quitosana + 6% glicerina; (D) amostra 7: 3% gelatina + 0,5% quitosana + 6% glicerina

4 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a quitosana pode ser utilizada para inibir o crescimento bacteriano. Maiores concentrações de quitosana apresentam maiores halos de inibição. Soluções de quitosana acima de 1,0% de concentração inibiram tanto as bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas testadas. Os revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana também apresentaram efeito antimicrobiano, sendo as maiores concentrações na blenda de quitosana e gelatina mais efetivas.

Os revestimentos foram efetivos na diminuição da perda de peso e índice de TBARS em seis dias de armazenamento. Significativa extensão da cor vermelha da carne bovina e redução da oxidação do pigmento de O₂Mb a MMb foram observadas durante a estocagem.

Portanto, a aplicação de biopolímeros à base de gelatina e quitosana foi efetiva na conservação de bifes de carne bovina refrigerada.

Com base no resultado de inibição do crescimento microbiano (concentração de 1,5%) e nos resultados mais relevantes do sexto dia de estocagem, perda de peso, índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor objetiva, a melhor concentração para a formação do filme para a conservação de bifes de carne bovina *in natura* foi de 3% de gelatina e 1,5% de quitosana, além dos 6% de glicerina estabelecidos no capítulo 1.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, I. C. et al. Avaliação da secagem de filmes de revestimento à base degelatina e quitosana pela técnica de biospeckle laser. In: SEMANA ACADÊMICA INTEGRADA, 3.; SIMPÓSIO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL INICIAL E CONTINUADA COM REGISTRO, 1., 2011, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2011. 1 CD-ROM.
- AVADI, M. R. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial effects of trimethylated and triethylated 6-NH₂-6-Deoxy Chitosan M. **European Polymer Journal**, New York, v. 40, n. 10, p. 1355-1361, Oct. 2004.
- CANER, C.; VERGANO, P. J.; WILES, J. L. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 8, p. 1049-1053, Aug. 2005.
- CARDOSO, G. P.; RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S. Avaliação de revestimentos comestíveis de gelatina na cor objetiva de carne bovina *in natura*: testes preliminares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 170/171, p. 128-129, 2009.
- COELHO, G. M. C. **Influência da embalagem na vida útil de carnes resfriadas e/ou processadas**. 2008. 142 p. Monografia (Pós Graduação *Latu Sensu* em Processamento e Controle de Qualidade de Carne, Leite e Ovos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, Barking, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.
- FOSTER, J. L.; BUTT, J. L. Chitosan films are NOT antimicrobial. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, p. 417-421, Oct. 2011.
- GEORGANTELIS, D. et al. Effect of rosemary extract, chitosan and [alpha]-tocopherol on lipid oxidation and colour Stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, Barking, v. 75, n. 2, p. 256-264, Feb. 2007.
- GIL, G. et al. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeasts. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 7, p. 569-57, Apr. 2004.

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

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

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: INFORMATIONAL SUPPLEMENT: AEROBIC DILUTION, 10., 2000, Wayne. **Proceedings...** Wayne: NCCLS, 2000. 1 CD-ROM.

NO-KYOON, H. K. et al. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 1, p. 87-100, Jan. 2007.

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

OUATTARA, B. et al. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 139-148, Feb. 2000.

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

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

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

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

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

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

SUMAN, S. P. et al. Chitosan inhibits premature browning in ground beef patties. **Meat Science**, Barking, v. 88, p. 512-516, June 2011.

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

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

WANDERLEI JÚNIOR, M. A. **Efeito da embalagem, do músculo e do tempo de estocagem sobre a estabilidade físico-química da carne bovina**. 2008. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

WANG, G. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. **Journal of Food Protection**, Guildford, v. 55, n. 5, p. 916-919, Sept. 1992.

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

ZIVANOVIC, S. et al. Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions. **Journal of Food Protection**, Guildford, v. 67, n. 5, p. 952-959, Sept. 2004.

CAPÍTULO 4

Aplicação de revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana incorporados de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica Lindl*), para conservação de carne bovina refrigerada

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de otimizar a concentração de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica a serem incorporados em filme de revestimento à base de gelatina e quitosana para conservação de carne bovina refrigerada. Perda de peso, índice de TBARS, pigmentos relativos da mioglobina e cor objetiva foram determinados nos dias zero e sete de armazenamento. Os resultados indicaram que a incorporação de óleos essenciais nas concentrações utilizadas neste trabalho (100 a 1.000 ppm de cada óleo), aos revestimentos, não interferiu na perda de peso dos bifes; no entanto, bifes revestidos perderam menos peso que o controle. No tempo zero de armazenamento, apenas o óleo essencial de alecrim contribuiu significativamente ($P < 0,05$) com o aumento do índice de TBARS. Após sete dias, concentrações abaixo de 550 ppm de ambos os óleos essenciais contribuíram para a diminuição da oxidação lipídica. No tempo zero, o modelo de regressão foi ajustado ($P < 0,10$) apenas para o teor de oximioglobina presente nos bifes, tendo quantidades na faixa de 550 ppm de óleo essencial de pimenta-da-jamaica favorecido o aumento da formação deste pigmento. No sétimo dia, nenhum modelo foi significativo ($P > 0,10$) para os pigmentos relativos da mioglobina. A adição dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica afetou apenas no tempo zero a cor da carne, sendo os índices de a^* e C^* favorecidos por maiores concentrações dos óleos de alecrim e pimenta-da-jamaica. No sétimo dia de armazenamento, não houve diferenças significativas ($P > 0,10$) entre os componentes da cor dos bifes. Com base nos resultados do índice de TBARS foi possível padronizar as concentrações de 550 ppm de óleo essencial de alecrim e 550 ppm do óleo essencial de pimenta-da-jamaica como as melhores concentrações para a manutenção da oxidação lipídica e a conservação da carne.

Palavras-chave: Óleo essencial. Alecrim. Pimenta da Jamaica. Carne bovina.

ABSTRACT

The aim of this study was optimize the concentration of essential oils of rosemary and allspice to be incorporated into the film coating of gelatin and chitosan for preservation of fresh beef. Weight loss, TBARS values, pigment of myoglobin and objective color were determined on days zero and seven of storage. The results indicated that the incorporation of essential oils in the concentrations used in this study (100 to 1000 ppm of each oil) to the coatings did not affect the weight loss of steaks, however, coated steaks lost less weight than control. At time zero of storage, only the essential oil of rosemary contributed significantly ($P < 0.05$) with the increase in TBARS values. After seven days, concentrations below 550ppm of both essential oils contributed to the decrease in lipid oxidation. At time zero, the regression model was adjusted ($P < 0.10$) only for the content present in oximioglobin (O_2Mb) steaks, with amounts ranging from 550ppm of essential oil of allspice favored increased formation of this pigment. On the seventh day no model was significant ($P > 0.10$) for the relative pigments of myoglobin. The addition of essential oils of rosemary and allspice affected meat color only on the time zero, and the indices a^* and C^* favored by higher concentrations of the oils of rosemary and allspice. On the seventh day of storage no significant differences ($P > 0.10$) between the components of the color were found. Based on the results of the TBARS values was possible standardize the concentrations of essential oil in 550ppm for rosemary and 550ppm for allspice as the best concentrations for maintenance of lipid oxidation and preserving the meat.

Keywords: Essential oils. Rosemary. Allspice. Meat.

1 INTRODUÇÃO

A oxidação da carne fresca pode levar à descoloração devido à oxidação da mioglobina com formação de metamioglobina (O'GRADY; MONOHAN; MOONEY, 2001), pigmento heme de cor marrom indesejável. A oxidação da gordura e pigmentos heme pode ocorrer em conjunto para acelerar uma ou ambas as reações, embora cada reação possa se desenvolver de forma independente.

O ferro heme, ou o ferro livre, contribui para a reação de auto-oxidação durante as fases de iniciação e propagação da oxidação dos lipídios da carne, enquanto a oxidação da mioglobina também tem sido reportada como uma reação auto-oxidante (GRAY et al., 1996). Vários outros agentes, incluindo metais, luz, enzimas, O₂ e gordura exógena oxidada, podem catalisar a oxidação lipídica e, conseqüentemente, catalisar a oxidação do pigmento. Na carne, a auto-oxidação é frequentemente iniciada por componentes do músculo, como ferro e outros metais de transição presentes em baixas concentrações (MCMILLIN, 1997). A fotoxidação é um mecanismo alternativo que não envolve a formação de radicais livres; é um processo oxidativo de ácidos graxos insaturados, resultante da exposição à luz, oxigênio e foto sensores. A fotoxidação é iniciada com a exposição das molecular de fotossensores (miglobina) (ARAUJO, 1995).

Os antioxidantes podem retardar as reações oxidativas dos lipídios e pigmentos da carne e, ultimamente, muita atenção tem sido dada à utilização de antioxidantes naturais, devido à percepção negativa que os consumidores têm do uso de aditivos sintéticos (CARDOSO et al., 2011).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais é atribuída aos seus compostos fenólicos (SHAN et al., 2005). Viuda-Martos et al. (2009) reportaram a capacidade dos componentes do óleo essencial de alecrim em quelar o Fe²⁺

pelo método FIC (quelação do íon ferro), tendo o óleo essencial conseguido inibir a oxidação em 76,06%. Segundo estes autores, a quelação de metais de transição é de grande interesse na indústria de alimentos, visto que a transição de íons metálicos, por catalizar a interação e a decomposição de hidroperóxidos, contribui para a oxidação lipídica e de pigmentos.

Bozin et al. (2007) descreveram a potencial atividade antioxidante de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). O efeito de proteção do óleo contra a oxidação lipídica foi testado *in vitro* pelo método de TBARS. Concentrações de 1,065% e 2,13% apresentaram efeitos de 43,75% e 58,33% de atividade antioxidante, demonstrando, assim como Dutra et al. (2011), que o efeito antioxidante do óleo essencial de alecrim é dose-dependente.

O óleo essencial das folhas de pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica Lindl*) tem aroma semelhante ao do cravo-da-índia, sendo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) o componente majoritário, com cerca de 70% a 77,9%. O eugenol é um fenol que tem propriedades antioxidantes devido à sua capacidade de doar um hidrogênio para radicais livres mais reativos, formando um radical estabilizado por ressonância, menos reativo (MINOTT; BROWN, 2007). Existem poucos estudos publicados na literatura sobre o óleo essencial da pimenta-da-jamaica e sua aplicação em alimentos. Dutra et al. (2011) descrevem o alto potencial antioxidante deste óleo em carnes mecanicamente separadas de frango, enquanto Cardoso et al. (2011) observaram alto potencial antimicrobiano para o óleo extraído das folhas da pimenta-da-jamaica. Trabalhos publicados na literatura sobre a aplicação de óleo essencial das folhas de pimenta-da-jamaica em carnes ou produtos cárneos não foram encontrados.

Foi estudado o efeito da incorporação de óleos essenciais das folhas de alecrim e pimenta-da-jamaica em revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana para a conservação de carne bovina refrigerada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Processamento de Carnes e Derivados, no Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) e no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química (DQI), ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) utilizados foram obtidos de folhas frescas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica Lindl*).

As folhas frescas de alecrim foram coletadas no município de Lavras, MG, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras. A cidade de Lavras situa-se à latitude 21° 14' 43 sul e longitude 44° 59' 59 oeste, à altitude de 919 m. Já as folhas frescas de pimenta-da-jamaica foram coletadas em um sítio situado no município de Ribeirão Vermelho, MG, à latitude 21° 11' 26 sul e longitude 45° 03' 43 oeste, à altitude de 808 m.

2.1.1 Extração dos óleos essenciais

O material coletado foi picado e pesado, sendo imediatamente utilizado para a extração do óleo essencial das folhas frescas.

Os óleos essenciais foram extraídos segundo metodologia da hidrodestilação, com utilização de aparelho de Clevenger modificado feita no Laboratório de Química Orgânica, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

As folhas frescas foram imersas em balão de 6.000 mL de fundo redondo e boca esmerilada, e submetidas a aquecimento, em ebulição, por 2

horas. O hidrolato foi coletado (óleo+água), centrifugado e o óleo (parte superior) foi recolhido com pipeta tipo Pasteur. O óleo foi armazenado em frascos de vidro e acondicionado, à temperatura de 4 °C, ao abrigo da luz, durante a condução do experimento.

2.1.2 Determinação do teor de umidade e rendimento

A umidade foi determinada segundo Pimentel et al. (2006). Colocaram-se cerca de 5 g das folhas em balão de 250 mL e 80 mL de cicloexano. O sistema foi acoplado a um condensador com coletor volumétrico graduado e colocado em ebulição por 2 horas. Após o processo de destilação, o volume de água foi quantificado, sendo expresso como teor de água contido em 100 g de amostra.

2.1.3 Avaliação qualitativa e quantitativa dos constituintes dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada na Universidade Federal do Sergipe, utilizando-se o aparelho de cromatografia acoplado à espectrometria de massa (CG/EM), tipo Shimadzu CG-17^a, com detector seletivo de massa (modelo QP 5000) sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (0,25 µm de espessura do filme), temperatura do injetor de 220 °C, coluna programada para temperatura inicial de 240 °C, hélio como gás carreador (1 mL.min⁻¹), taxa de split de 1:10, volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão inicial na coluna de 100,2 KPa (OLIVEIRA et al., 2011).

Para o espectrofotômetro, as condições foram as seguintes: energia de impacto de 70eV, velocidade de decomposição de 1.000, intervalo de

decomposição 0,50 e fragmentos de 45 daltons a 450 daltons decompostos. Injetou-se, nas mesmas condições das amostras, uma mistura de hidrocarbonetos (C_9H_{20} ; $C_{10}H_{22}$; $C_{11}H_{24}$;... $C_{24}H_{50}$; $C_{25}H_{52}$; $C_{26}H_{54}$). A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros obtidos com os do banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovats, para cada constituinte, de acordo com Adams (2007 citado por OLIVEIRA et al., 2011). A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

2.2 Desenvolvimento e aplicação dos biopolímeros

2.2.1 Delineamento experimental

A influência da adição dos óleos essenciais (alecrim e pimenta-da-jamaica) e sua possível interação foi avaliada por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (*Central Composite Rotatable Design* ou DCCR), em um fatorial 2^2 , com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios (Tabela 1), segundo Rodrigues e Iemma (2005).

As concentrações de adição dos óleos foi definida com base na literatura científica (DUTRA et al., 2011), sendo: 100 ppm a 1.000 ppm de alecrim e 100 ppm a 1.000 ppm de pimenta-da-jamaica. Os dois fatores independentes foram investigados em cinco diferentes níveis (-1,41, -1, 0, +1, +1,41), conforme disposto na Tabela 1. As concentrações dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica utilizados para a formulação dos tratamentos são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1 Níveis utilizados no DCCR para dois fatores, para as variáveis óleo essencial de alecrim e óleo essencial de pimenta-da-jamaica

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Alecrim (ppm)	100	230,85	550	869,15	1000
Pimenta-da-jamaica (ppm)	100	230,85	550	869,15	1000

Tabela 2 Delineamento fatorial completo para combinação dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica

Variáveis Codificadas		Variáveis reais	
X_1	X_2	Alecrim (ppm)	Pimenta-da-jamaica (ppm)
-1	-1	230,85	230,85
1	-1	869,15	230,85
-1	1	230,85	869,15
1	1	869,15	869,15
-1,41	0	100	550
1,41	0	1000	550
0	-1,41	550	100
0	1,41	550	1000
0	0	550	550
0	0	550	550
0	0	550	550

2.2.2 Preparo das soluções de revestimento

No preparo dos revestimentos, foi utilizada gelatina do tipo B, com *Bloom* de 250, gentilmente doada pela Empresa Gelita (São Paulo, SP). A quitosana (densidade de 0,30g/mL, grau de desacetilação >85,0%) foi adquirida da empresa Polymar (Fortaleza, CE).

A composição do biofilme foi padronizada em 3% de gelatina, 1,5% de quitosana e 6% de glicerina (sobre a quantidade de gelatina + quitosana), conforme resultados encontrados nos capítulos 1 e 2.

As soluções dos filmes de revestimento foram obtidas hidratando-se a gelatina em pó em água destilada por 30 minutos e posterior solubilização a 70°C, em banho-maria, por 10 minutos, quando foram adicionadas a quitosana e a glicerina (MERCK), cujo percentual foi definido em 6% em relação ao conteúdo de gelatina + quitosana. A quitosana foi previamente solubilizada em solução de ácido acético glacial (MERCK), a 0,4% (VILLADIEGO, 2004) e adicionada a cada mistura de revestimento. As soluções foram homogeneizadas em Polítron (Tecnal), a 10.000 rpm, por 1 minuto. Os óleos essenciais foram adicionados à solução filmogênica à temperatura de 40 °C e, em seguida, a solução foi novamente homogeneizada, em homogeneizador tipo Turrax, por 30 segundos.

2.2.3 Obtenção e porcionamento dos bifes

Foram utilizadas peças de lagarto (*M. semitendinosus*, MS), adquiridas diretamente em matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção federal (SIF), que foram desossadas após 24 horas de abate e conduzidas refrigeradas ao Laboratório de Processamento de Carnes e Derivados da UFLA. Foi feita uma limpeza prévia nos músculos, removendo-se a gordura superficial e o tecido conectivo. Os bifes de ± 20 mm de espessura foram obtidos a partir do porcionamento no sentido transversal dos músculos.

2.2.4 Aplicação dos revestimentos

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

Os bifes, imediatamente após o preparo, foram imersos nas soluções de revestimento por três segundos e, em seguida, pendurados por ganchos em

câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab), a 4 °C, por 30 minutos, até a secagem do revestimento. Em seguida, foram pesados e acondicionados em bandejas de poliestireno e envoltos por filme plástico transparente de PVC.

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

2.2.5 Armazenamento e amostragem

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

As análises foram feitas em dois tempos. Primeiro, no dia 0 (tempo zero de armazenamento) e o segundo tempo, quando foram verificadas diferenças visíveis entre a coloração do controle e a das amostras revestidas. Neste caso, o segundo de análise ocorreu no sétimo dia de armazenamento.

2.2.6 Avaliação dos tratamentos

2.2.6.1 Perda de peso

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

2.2.6.2 Índice de TBARS

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

Porções de 10 g de amostra foram coletadas na região externa de cada bife de *MS*, sendo a gordura retirada. Às 10 g de amostra foram adicionados 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% e 1 mL de BHT (2,6-di-tert-butil-4-methylphenol) 0,15% (em etanol) e homogeneizadas em politron, por 5 minutos. Em seguida, o homogenato foi filtrado em filtro de papel e o volume do filtrado ajustado com TCA 5% para 50 mL, em balão volumétrico. Aliquotas de 2 mL dos balões foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 2 mL de TBA (2-thiobarbituric acid) 0,08 M (diluído em ácido acético glacial 50%). Os tubos foram levados a banho-maria, por 5 minutos e as leituras foram realizadas a 531 nm, em espectrofotômetro tipo CARY 50 *Varian*.

Para cada repetição, as médias foram obtidas considerando-se a média de três replicatas. Os valores de TBARS foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg MDA/kg), por meio de curva

padrão, utilizando 1,1,3,3 tetraethoxipropano (TEP) em ácido tricloroacético 20%.

2.2.6.3 Pigmentos Relativos da Mioglobina

As curvas de reflectância foram obtidas com um colorímetro espectrofotométrico CM-5 (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm, sendo estabelecido o iluminante A, o ângulo de 10° para o observador, luz especular incluída (RSIN) e o sistema de cor CIELAB.

Os valores intermediários (473, 525 e 572 nm) de reflectância foram calculados por interpolação linear. O conteúdo relativo dos pigmentos heme, expressos como oximioglobina (O₂Mb), mioglobina reduzida (Mb⁺) e metamioglobina (MMb), na superfície dos músculos MS (bife), foi calculado segundo o método matemático de Krzywicki (1979 citado por RAMOS; GOMIDE, 2007), de acordo com as seguintes equações:

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

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

$$\text{O}_2\text{Mb} = 1 - (\text{MMb} + \text{Mb}^+)$$

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

Também foi obtida a razão entre as reflectâncias 572 nm e 525 nm, para descrever a quantidade de metamioglobina (MMb) acumulada sobre a superfície da carne (MCKENNA et al., 2005). Para separar a contribuição relativa da absorção do pigmento (K) da dispersão do meio (S), foi utilizada a razão K/S dos comprimentos de onda a 575 e 525 nm, obtidos pela equação de Kubelka-Munk (RAMOS; GOMIDE, 2007), sendo a MMb acumulada mensurada pela razão $(K/S)_{572} / (K/S)_{525}$.

Para cada repetição, as reflectâncias foram obtidas considerando-se o valor médio de dez leituras realizadas em diferentes pontos da superfície dos bifés.

2.2.6.4 Análise da cor objetiva

A avaliação objetiva da cor foi realizada na superfície dos bifés ainda envoltos pelo filme, utilizando-se um colorímetro espectrofotométrico CM-5 (Kônica Minolta), com porta de abertura de 30 mm. Para o cálculo dos índices de cor foi estabelecido o iluminante A, o ângulo de 10° para o observador, a reflectância especular excluída (RSEX) e o sistema de cor CIELAB, como sugerido por Ramos e Gomide (2007) para carnes *in natura*.

Os índices de cor luminosidade (L^*), de vermelho (a^*) e de amarelo (b^*) foram obtidos, para cada repetição, considerando-se o valor médio de dez leituras realizadas em diferentes pontos da superfície do bife. A partir dos índices de cor, também foram calculadas as coordenadas polares (RAMOS; GOMIDE, 2007): índice de saturação [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] e ângulo de tonalidade [$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$].

Além dos índices de cor L^* , a^* e b^* , também foi calculado o índice de vermelhidão (*redness*) para acompanhamento do declínio da cor vermelha (RAMOS; GOMIDE, 2007), estimado pela razão entre os valores da reflectância a 630 e 580 nm (%R 630/580 nm).

2.2.7 Análise estatística

Foi utilizado Modelo de Superfície de Resposta para o estudo da avaliação simultânea das duas variáveis independentes (alecrim e pimenta-da-jamaica). Para cada fator experimental, a variância foi decomposta em

componentes (linear, quadrático e interação) para verificação de ajuste da seguinte função polinomial de segunda ordem, em função de X_i , ajustada para cada variável, e a importância de cada componente:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j$$

em que

Y = resposta estimada;

B_0, B_i, B_{ii} e B_{ij} , = constantes e coeficientes de regressão do modelo e

X_i e X_j = níveis das variáveis independentes.

A significância de cada parâmetro da equação, para cada variável resposta, foi avaliada pelo teste F, usando o programa Statistica 5.0 (StatSoft, Poland). Devido à variação inerente das amostras, foram considerados os níveis de significância de 1%, 5% e 10% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Óleos essenciais

A identificação e a quantificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais (OE) das folhas de alecrim e pimenta-da-jamaica, assim como o teor de umidade e os rendimentos das extrações, podem ser observadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 Constituição química do OE de folhas frescas de alecrim, identificado por CG/EM, e seus respectivos teores

Pico	Composto	¹ IRcal	² IRlit	³ Área %
1	⁴ NI	907	-	0,11
2	NI	910	-	0,16
3	triciclono	919	AI 921 KI 926	11,49
4	Camphene	938	AI 946 KI 954	4,32
5	thuja-2,4(10)-diene	942	AI 953 KI 960	0,17
6	β -pineno	971	AI 975 KI 979	3,67
7	3-octanona	979	AI 979 KI 983	0,46
8	mirreno	985	AI 988 KI 990	9,40
9	α -phellandrene	1005	AI 1002 KI 1002	0,33
10	α -terpineno	1015	AI 1014 KI 1017	0,54
11	ρ -cimeno	1022	AI 1020 KI 1024	0,72
12	limoneno	1027	AI 1024 KI 1029	3,30
13	1,8-cineol	1031	AI 1026 KI 1031	17,67
14	ocimene \square (Z)- β - \square	1033	AI 1032 KI 1037	0,12
15	γ -terpineno	1056	AI 1054 KI 1059	1,28
16	mentha-2,4-(8)-diene \square ρ \square	1083	AI 1085 KI 1088	0,84
17	linalol	1098	AI 1095 KI 1096	2,13
18	chrysanthenone	1119	AI 1124 KI 1127	0,52
19	cânfora	1146	AI 1141 KI 1146	30,06
20	Pinocarvone	1160	AI 1160 KI 1164	0,22
21	δ -terpineol	1168	AI 1162 KI 1166	0,22
22	borneol	1170	AI 1165 KI 1169	2,55
23	Pinocamphone \square cis- \square	1174	AI 1172 KI 1175	0,34
24	terpinen-4-ol	1179	AI 1174 KI 1177	1,48
25	α -terpineol	1193	AI 1186 KI 1188	2,69
26	verbenone	1205	AI 1204 KI 1205	2,71
27	isobornyl acetate	1282	AI 1283 KI 1285	1,78
28	(Z)-cariofileno	1417	AI 1408 KI 1408	0,56
29	NI	1579	-	0,16
Total de compostos			99,57%	
Umidade (folhas frescas)			63,80%	
Rendimento (⁵BLU)			0,61%	

¹IR cal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats (ADAMS, 2007 citado por OLIVEIRA et al., 2011), ²IR lit = índice de retenção da literatura, ³Área % = porcentagens fornecidas pelo GC/MS, ⁴NI = composto não identificado, ⁵BLU = base livre de umidade (matéria seca)

Foram identificados 26 componentes químicos (99,57%) para o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Os componentes encontrados em maior proporção foram cânfora (30,06%), 1,8-cineol (17,67%) e tricicleno (11,49%).

Prins, Lemos e Freitas (2006), estudando os efeitos da velocidade de aquecimento na etapa de hidrodestilação dos óleos, encontraram, como componentes principais para o óleo essencial das folhas secas de alecrim, 33,48% de cânfora, 23,29% de eucaliptol, 16,52% de β -mirceno e 15,18% de α -pineno. Diferentemente, Gutierrez et al. (2008) encontraram, como constituintes principais, eucaliptol (39,6%), cânfora (19%) e α -pineno (4,8%).

Tabela 4 Constituição química do OE de folhas frescas de pimenta-da-jamaica, identificado por CG/EM, e seus respectivos teores

Pico	Composto	¹ IRcal	² IRlit	³ Área %
1	triciclono	919	AI 1921 KI 1926	0,74
2	octen-3-ol □1□	973	AI 974 KI 979	2,68
3	3-octanona	980	AI 979 KI 983	1,09
4	Myrceno	986	AI 988 KI 990	22,43
5	3-octanol	994	AI 988 KI991	0,69
6	α-phellandrene	1005	AI 1002 KI 1002	1,64
7	p-cimeno	1023	AI 1020 KI1024	0,32
8	limoneno	1027	AI 1024 KI 1029	7,79
9	γ-terpineno	1056	AI 1054 KI 1059	0,19
10	mentha-2,4-(8)- diene□p□	1083	AI 1085 KI 1088	0,2
11	linalol	1098	AI 1095 KI 1096	1,07
12	terpinen-4-ol	1179	AI 1174 KI 1177	0,52
13	chavicol	1247	AI 1247 KI 1250	5,12
14	eugenol	1351	AI 1356 KI 1359	55,52
total de compostos identificados			100,00%	
umidade (folhas frescas)			55,90%	
Rendimento (⁴BLU)			0,75%	

¹IR cal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats (ADAMS, 2007 citado por OLIVEIRA et al., 2011) ²IR lit = índice de retenção da literatura, ³Área % = porcentagens fornecidas pelo GC/MS, ⁴BLU = base livre de umidade (matéria seca)

Em um estudo realizado com o óleo essencial de alecrim no Rio Grande do Sul, foram identificados 20 compostos que corresponderam a 95% do total, em que o α-pineno foi o majoritário (ATTI-SANTOS et al., 2005). Pozzatti et al. (2008) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim constituído por 1-8 cineol (23,61%), cânfora (26,31%), α-pineno (19,81%), canfeno (11,76%) e limoneno (5,41%). Por sua vez, Bozin et al. (2007) encontraram, como constituintes do óleo essencial de alecrim, limoneno (21,7%), cânfora (21,6%) e α-pineno (13,5%).

Segundo Wang et al. (2008), o óleo essencial de alecrim contendo 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, canfeno e β -pineno, tem maior atividade antioxidante do que seus componentes individualmente.

Todos os componentes do óleo essencial de pimenta-da-jamaica (*Pimenta Dioica* Lindtl) puderam ser identificados. Os componentes encontrados em maior proporção foram eugenol (55,52%), mirceno (22,43%), limoneno (7,79%) e chavicol (5,12%) (Gráfico 1).

Estes resultados estão de acordo com os de Oliveira et al. (2009) que encontraram, como constituintes majoritários para as folhas frescas de pimenta-da-jamaica, quantidades de 82,56% de eugenol, 6,31% de mirceno e 7,04% de chavicol. O rendimento encontrado por este autor (1,41%) foi superior ao encontrado neste trabalho.

Martinez-Velazquez et al. (2011) avaliaram a composição química do óleo essencial de pimenta-da-jamaica e encontraram como componentes majoritários metil-eugenol (86,41%), eugenol (8,3%) e 1,8-cineol (4,1%).

Pode-se perceber que há uma grande variabilidade na composição química dos dois OE estudados. Gobbo-Neto e Lopes (2007) já haviam descrito que fatores como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes e altitude, entre outros fatores, influenciam diretamente a composição química de óleos essenciais.

Segundo Ruberto e Baratta (1999), pouco se sabe sobre o efeito antioxidante individual dos componentes dos óleos essenciais. No trabalho destes autores foi possível identificar a atividade antioxidante de alguns componentes presentes nos óleos essenciais estudados. Para os componentes presentes em maior quantidade no óleo essencial de alecrim, a cânfora apresentou, em concentrações de 1.000, 500 e 100 ppm do componente, baixíssimas atividades antioxidantes, cujos valores foram de 6,6%, 2,3% e 0%, respectivamente. O 1,8-

cineol apresentou atividades de 20,3%, 3,3% e 0%, nas mesmas concentrações acima citadas, respectivamente.

Dos componentes do óleo essencial de pimenta-da-jamaica, Ruberto e Baratta (1999) encontraram, para o eugenol, em concentrações de 1.000, 500 e 100 ppm do componente, atividades antioxidantes de 81,2%, 67,2% e 64,7% respectivamente. O mirceno apresentou menor atividade antioxidante com valores que foram 32,1%, 29,4% e 24,0% respectivamente, nas mesmas concentrações. Para o limoneno, os valores obtidos foram de 27,4%, 26,3% e 2,9%.

3.2 Perda de peso

Os valores médios da variável perda de peso (PP) para os tratamentos e amostra controle são apresentados na Tabela 5.

Não houve diferenças significativas ($P > 0,10$) para a perda de peso dos tratamentos após sete dias de armazenamento. Portanto, a adição de óleos essenciais nas concentrações utilizadas neste trabalho não interferiu na permeabilidade do polímero. Enquanto a maior perda de peso dos bifés envoltos pelo biopolímero foi de 5,87%, o controle perdeu 17,58% do peso, comprovando a eficiência da aplicação do biopolímero na diminuição da perda de peso de bifés de carne bovina.

Tabela 5 Perda de peso dos bifes de *M.Semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle, no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento

TRATAMENTOS			
TRAT.	PIMENTA-DA-JAMAICA (ppm)	ALECRIM (ppm)	PP (%)
1	230,85	230,85	4,942
2	869,15	230,85	4,266
3	230,85	869,15	4,545
4	869,15	869,15	3,726
5	100	550	5,298
6	1000	550	5,234
7	550	100	5,180
8	550	1000	5,123
9	550	550	5,872
10	550	550	5,294
11	550	550	4,978
		<i>MÉDIAS</i>	4,948
	CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)		17,584

3.3 Índice de TBARS

Os valores médios para os índices de TBARS dos tratamentos e amostra controle no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento são apresentados na Tabela 6.

Para o índice de TBARS, foi possível ajustar ($P < 0,05$) o modelo de regressão para o tempo zero, para sete dias de armazenamento e para a diferença (Δ TBARS) entre os tempos zero e sete (Tabela 7), sendo possível construir as curvas de superfície de resposta em função dos óleos essenciais (OE) de alecrim e de pimenta-da-jamaica (Gráfico 1 e 2). Para minimizar a possibilidade de interferência dos filmes e dos óleos essenciais no teste de TBA, conforme discutido nos capítulos 1 e 2, a diferença entre o índice de

TBARS no tempo sete e no tempo zero também foi avaliada, sendo apenas o alecrim significativo (Tabela 7 e Gráficos 3).

Tabela 6 Índice de TBARS dos bifos de *M. semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle no tempo zero, no sétimo dia de armazenamento e valor de Δ TBARS

TRATAMENTOS			dia 0	dia 7	
TRAT.	PIMENTA- DA- JAMAICA	ALECRIM	TBARS	TBARS	Δ TBARS
	(ppm)	(ppm)			
1	230,85	230,85	0,352	0,123	-0,230
2	869,15	230,85	0,377	0,109	-0,268
3	230,85	869,15	0,136	0,157	0,021
4	869,15	869,15	0,314	0,180	-0,135
5	100	550	0,369	0,174	-0,196
6	1000	550	0,525	0,276	-0,249
7	550	100	0,247	0,224	-0,023
8	550	1000	0,444	0,295	-0,150
9	550	550	0,198	0,148	-0,050
10	550	550	0,238	0,160	-0,078
11	550	550	0,263	0,163	-0,100
		<i>MÉDIAS</i>	0,320	0,185	-0,136
	CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)		0,229	0,244	0,015

Tabela 7 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para o índice de TBARS de bifes *M.Semitendinosus* no tempo zero, no sétimo dia de armazenamento e para o valor de Δ TBARS

	Dia zero		Dia sete		Δ TBARS	
	CR	EP	CR	EP	CR	EP
Constante	0,2336*	0,0189	0,1578*	0,0046	-0,0758**	0,014456
OE alecrim (linear)	0,0529**	0,0116	0,0190**	0,0028	-0,0339**	0,008866
OE alecrim (quadrática)	0,0817**	0,0139	0,0084	0,0034	-0,0732**	0,010579
OE jamaica (linear)	-0,0002	0,0116	0,0257**	0,0028	0,02581	0,008866
OE jamaica (quadrática)	0,0307	0,0139	0,0260**	0,0034	-0,00472	0,010579
OE alecrim X OE jamaica	0,0384	0,0164	0,0090	0,0040	-0,02939	0,012519
R^2	0,6153		0,8521		0,5379	

OE = óleo essencial. Δ TBARS = diferença entre os valores de TBARS no dia sete e no dia zero

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$;

No tempo zero, apenas o óleo essencial de alecrim teve efeito sobre o índice de TBARS (Gráfico 3), enquanto no dia sete, as principais alterações foram devido à presença do OE das folhas da pimenta-da-jamaica (Gráfico 4). Porém, observando-se a diferença nos valores da TBARS (Gráfico 5), nota-se que houve efeito apenas do OE de alecrim, permanecendo constante com a adição da pimenta-da-jamaica.

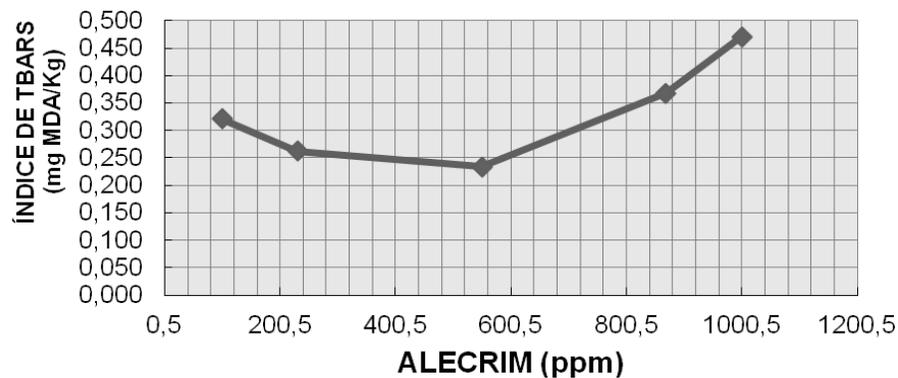


Gráfico 1 Valores preditos para a o índice de TBARS de bifos *M.Semitendinosus*, em função da concentração do óleo essencial de alecrim, no tempo zero

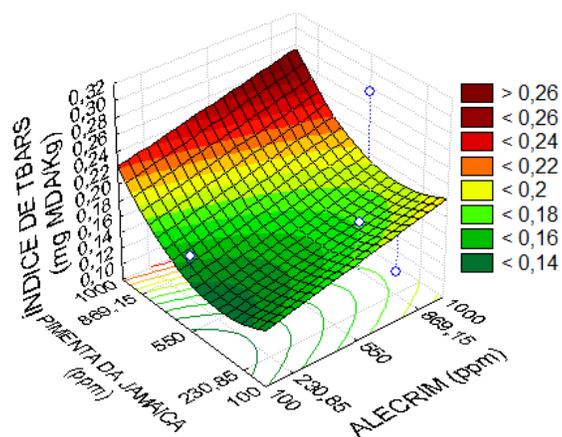


Gráfico 2 Superfície de resposta para o índice de TBARS de bifos *M.Semitendinosus*, em função do teor de pimenta-da-jamaica e alecrim no sétimo dia de armazenamento

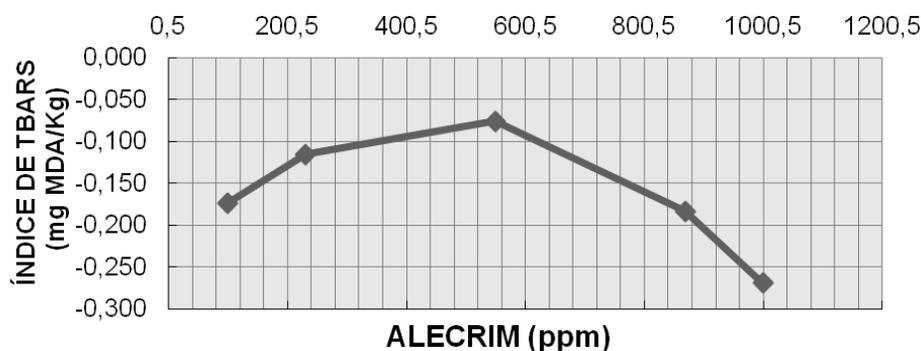


Gráfico 3 Valores preditos para a variação do índice de TBARS de bifes *M.Semitendinosus*, em função da concentração do óleo essencial de alecrim

Maiores índices de TBARS no tempo zero de armazenamento (Gráfico 3) foram observados em maiores concentrações de OE de alecrim; quantidades adicionadas a partir de 800 ppm indicaram efeito pró-oxidante. Este efeito contraditório da adição de OE de alecrim também foi observado por Estévez e Cava (2006), quando níveis mais elevados (600 ppm) de OE de alecrim, adicionados à massa da salsicha, provocaram efeito pró-oxidante, aumento significativo da oxidação de proteínas e consequente liberação do ferro da mioglobina.

Oussalah et al. (2007) cobriram bifes de coxão mole com biopolímeros de proteína do leite adicionados de 1% dos OE de orégano, de pimenta e da mistura orégano + pimenta. Os bifes envoltos por todos os filmes adicionados de OEs apresentaram maiores índices de TBARS do que o controle, em sete dias de armazenamento. Segundo estes autores, certos compostos, quando degradados, podem gerar aldeídos fenólicos capazes de provocar uma reação similar à reação do malonaldeído nas análises de TBARS. Provavelmente, a presença destes compostos aumenta os valores de TBARS e mascara o potencial efeito

antioxidante dos óleos essenciais, o que pode ter ocorrido com algum dos compostos dos OE utilizados neste trabalho.

Os filmes que foram adicionados de quantidades próximas de 550 ppm de OE de alecrim no tempo zero, de 550 ppm de OE pimenta-da-jamaica e abaixo de 300 ppm de alecrim no sétimo dia apresentaram os maiores valores de TBARS. *In vitro*, pelo método de TBARS utilizando os lipídeos da gema de ovo como substrato, Dutra et al. (2011) observaram maiores atividades antioxidantes para concentrações maiores tanto para o óleo de alecrim (67,60% para 500 ppm e 76,17% para 1.000 ppm) como para o óleo de pimenta-da-jamaica (59,19% para 500 ppm e 82,47% para 1000 ppm), o que pode evidenciar a participação de outros compostos como interferentes no teste de TBARS. Esta possível interferência também foi observada na otimização dos filmes de revestimento sem adição de OE (capítulo 2).

Georgantelis et al. (2007) estudaram o efeito da aplicação de quitosana (10 g/kg), com e sem adição de óleo essencial de alecrim (200 ppm), em carne reestruturada. Os resultados indicaram, por meio do índice de peróxido, dienos conjugados e índice de TBARS, que os bifes adicionados de quitosana + óleo essencial de alecrim apresentaram a menor oxidação em 180 dias de congelamento a -18°C. Mohamed e Mansour (2011) adicionaram, simultaneamente, óleos essenciais de alecrim e manjerona (200 mg/kg de cada) em misturas de carne mecanicamente separadas (bovina + suína), armazenadas por 3 meses, sob refrigeração. Os resultados encontrados mostraram que os índices de TBARS para os bifes tratados com óleos essenciais foram muito inferiores ao do controle que foi tratado com BHT. Estes autores evidenciaram o poder antioxidante de óleos essenciais que, em alguns casos, pode ser superior ao dos antioxidantes sintéticos.

O efeito antioxidante dos revestimentos no sétimo dia de armazenamento deveu-se, principalmente, ao OE de pimenta-da-jamaica

(Gráfico 2). Este OE teve como componente principal o eugenol (Tabela 4), fenol que possui propriedades antioxidantes, devido à sua capacidade de doar um hidrogênio para radicais livres mais reativos, formando um radical estabilizado por ressonância, menos reativo (MINOTT; BROWN, 2007). Segundo Ogata et al. (2000), o eugenol pode inibir a peroxidação lipídica na fase de iniciação, propagação ou em ambas as fases. Provavelmente, para que fosse observado o efeito do óleo essencial da pimenta-da-jamaica no tempo zero, seria necessário realizar testes de índice de peróxidos.

As equações que expressam os índices de TBARS dos bifos envolvidos pelos biopolímeros adicionados dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica no tempo zero e no tempo seis são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 Modelos codificados das regressões para os índices de TBARS

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	TBARS	$y=0,2336+0,0529x_1+0,0817x_1^2$	<0,01	0,4567
7	TBARS	$y=0,1578+0,0190x_1+0,0257x_2-+0,0260x_2^2$	<0,01	0,3402
Δ	TBARS	$y=-0,075-0,0339x_1-0,0732x_1^2$	<0,01	0,4381

x_1 = variável codificada para óleo essencial de alecrim; x_2 = variável codificada para óleo essencial de pimenta-da-jamaica;

3.4 Pigmentos relativos da mioglobina

Os valores médios para os pigmentos relativos da mioglobina (MMb, Mb+ e O₂Mb) e do índice de K572/K525 dos tratamentos e da amostra controle no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento são apresentados na Tabela 9. Os valores médios do percentual para a O₂Mb, nos tempos zero e sete dias de armazenamento sob refrigeração (4°C), são apresentados na Tabela 10. Para o tempo zero, o modelo de regressão ajustado foi significativo

apenas para o pigmento de oximioglobina (O_2Mb), apresentando efeitos no componente quadrático do óleo de pimenta-da-jamaica e na interação com o óleo de alecrim. A partir do modelo ajustado para os coeficientes significativos, foi possível construir a superfície de resposta de O_2Mb em função das concentrações dos óleos essenciais (Gráfico 4).

Tabela 9 Pigmentos relativos dos bifos de *M. semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle, no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento

TRATAMENTOS			dia 0				dia 7			
TRAT.	PIMENTA- DA- JAMAICA (ppm)	ALECRIM (ppm)	% MMb	% Mb+	% O2Mb	K572/ K525	%5MMb	% Mb+	%O2Mb	K572/ K525
1	230,85	230,85	20,637	0,000	79,363	1,318	33,158	37,505	29,336	1,112
2	869,15	230,85	22,545	0,363	77,092	1,295	33,475	37,361	29,165	1,107
3	230,85	869,15	22,994	0,901	76,105	1,277	35,213	36,523	28,264	1,073
4	869,15	869,15	21,784	0,000	78,216	1,315	32,531	37,542	29,927	1,125
5	100	550	21,695	0,000	78,305	1,307	34,561	36,628	28,811	1,085
6	1000	550	21,564	0,000	78,436	1,320	31,103	37,471	31,427	1,149
7	550	100	22,860	0,000	77,140	1,297	33,329	37,785	28,886	1,110
8	550	1000	25,423	3,636	70,941	1,238	36,109	35,443	28,448	1,059
9	550	550	23,400	0,000	76,600	1,275	34,625	38,491	26,884	1,084
10	550	550	20,890	0,000	79,110	1,321	30,762	36,914	32,325	1,157
11	550	550	20,786	0,000	79,214	1,310	32,345	38,155	29,500	1,112
		MÉDIAS	22,379	0,490	77,131	1,296	33,487	37,166	29,347	1,106
	CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)		24,407	4,954	70,639	1,266	36,784	36,691	26,525	1,047

Tabela 10 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para O₂Mb de bifes *M.semitendinosus* bovino, no tempo zero

Variável	O ₂ Mb	
	CR	EP
Constante	81,00465*	0,895244
OE alecrim (linear)	0,79575	0,549047
OE alecrim (quadrática)	0,24889	0,655156
OE jamaica (linear)	-1,44984	0,549047
OE jamaica (quadrática)	-2,76009***	0,655156
OE alecrim X OE jamaica	2,54114***	0,775313
R^2	0,8036	

OE = óleo essencial

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$; e *** $P < 0,10$

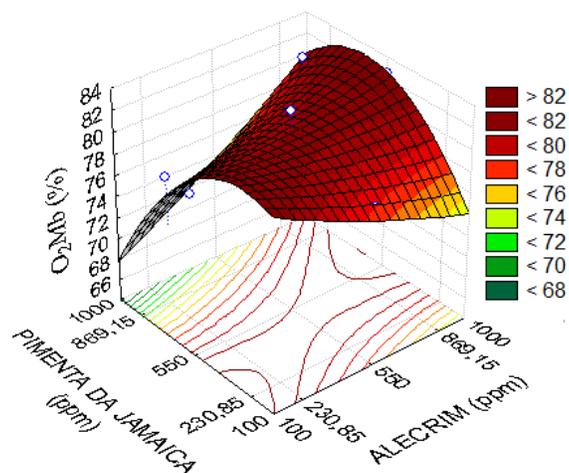


Gráfico 4 Superfície de resposta para o teor de oximioglobina (O₂Mb) de bifes *M.Semitendinosus*, em função das concentrações de óleo essencial de pimenta-da-jamaica e alecrim, no tempo zero

A adição de óleo essencial de pimenta-da-jamaica no filme de revestimento favoreceu o aumento da formação da oximioglobina, responsável pela cor vermelho-brilhante da carne. No entanto, elevadas concentrações deste óleo essencial, especialmente a partir de 550 ppm, induziram a uma maior dissociação da molécula de oxigênio, sem formação específica de Mb⁺ ou MMb, uma vez que não foi possível ajustar um modelo para ambos os pigmentos. Nesta concentração (550 ppm), a adição de OE de alecrim basicamente não apresenta efeito, embora a dissociação de oxigênio pareça ser minimizada pela presença do alecrim, quando maiores concentrações de OE de pimenta-da-jamaica são utilizadas, e favorecida, para menores concentrações de OE de pimenta-da-jamaica.

Para o sétimo dia de armazenamento, não foram ajustados modelos ($P > 0,10$) para o comportamento dos pigmentos nos bifés de carne bovina. No entanto, o que pode ser observado comparado ao controle (Tabela 9) é que, além de uma maior manutenção do teor de O₂Mb e redução na MMb, houve uma pequena conversão para o pigmento Mb⁺.

Não houve diferenças significativas para o $(K/S)_{572}/(K/S)_{525}$ nos tempos zero e com sete dias de armazenamento, assim como observado para o cálculo da %MMb.

A equação que expressa o conteúdo de O₂Mb dos bifés envoltos pelos revestimentos adicionados dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 Modelo codificado da regressão para o conteúdo de O₂Mb

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R ²
0	%MMb	$y=81,00465-2,76009x_2^2+2,54114x_1x_2$	0,02	0,6250

x_1 = variável codificada para óleo essencial de alecrim; x_2 = variável codificada para óleo essencial de pimenta-da-jamaica;

3.5 Cor objetiva

Os valores médios para os índices de cor (L, a*, b*, C* e h*) e do índice de R630/R580 dos tratamentos e da amostra controle no tempo zero e no quinto dia de armazenamento são apresentados na Tabela 12. A avaliação dos bifes no tempo zero permite observar as mudanças oriundas da aplicação do revestimento na cor dos bifes. Logo após a aplicação dos filmes, os modelos de regressão ajustados foram significativos ($P < 0,05$) para o índice de vermelho (a*) e saturação (C*) da cor dos bifes (Tabela 13).

Tabela 12 Cor objetiva e valor de R630/R580 dos bifes de *M. semitendinosus* revestidos pelos biopolímeros à base de gelatina e quitosana, adicionados de óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica, e da amostra controle, no tempo zero e no sétimo dia de armazenamento

TRATAMENTOS			dia 0						dia 7					
TRAT.	PIMENTA- DA- JAMAICA (ppm)	ALECRIM (ppm)	L*	a*	b*	C*	h*	R630/ R580	L*	a*	b*	C*	h*	R630/ R580
1	230,85	230,85	47,640	23,880	19,230	30,660	38,850	3,675	48,520	21,310	19,400	28,820	42,310	2,648
2	869,15	230,85	47,190	24,250	19,480	31,110	38,780	3,805	50,910	20,800	19,610	28,580	43,310	2,546
3	230,85	869,15	49,820	23,090	18,200	29,400	38,250	3,329	51,200	19,870	18,990	27,490	43,700	2,319
4	869,15	869,15	49,030	24,400	19,830	31,440	39,100	3,663	51,330	21,540	20,070	29,440	42,990	2,622
5	100	550	47,350	24,090	19,360	30,900	38,780	3,702	52,090	19,410	18,250	26,640	43,230	2,316
6	1000	550	48,370	24,170	19,830	31,260	39,360	3,634	52,200	20,990	19,150	28,410	42,370	2,539
7	550	100	47,290	23,730	19,000	30,400	38,690	3,649	48,450	20,880	19,190	28,360	42,580	2,526
8	550	1000	48,030	20,840	15,900	26,210	37,340	2,946	50,420	18,740	16,650	25,070	41,620	2,219
9	550	550	47,550	24,110	20,400	31,580	40,240	3,605	50,460	20,220	19,990	28,430	44,660	2,383
10	550	550	50,020	22,500	17,640	28,590	38,110	3,295	51,410	21,550	18,940	28,690	41,310	2,655
11	550	550	50,960	22,620	18,320	29,110	39,000	3,261	53,610	20,120	19,370	27,930	43,910	2,373
		MÉDIAS	48,229	23,506	18,887	30,155	38,750	3,530	50,699	20,531	19,024	27,993	42,808	2,477
	CONTROLE (ÁGUA DESTILADA)		46,570	23,570	19,590	30,650	39,730	3,582	48,530	20,210	19,510	28,090	43,980	2,423

Tabela 13 Coeficientes de regressão (CR) e erro padrão (EP) para as variáveis codificadas do modelo matemático polinomial para os índices de vermelho (a*) e saturação (C*) da cor de bifes de *M. semitendinosus*, no tempo zero

Variável	a*		C*	
	CR	EP	CR	EP
Constante	21,8157*	0,1417	27,8217*	0,1562
OE alecrim (linear)	0,3779**	0,0869	0,5149**	0,0958
OE alecrim (quadrática)	0,5092**	0,1037	0,5630**	0,1143
OE jamaica (linear)	-0,2257	0,0869	-0,3460***	0,0958
OE jamaica (quadrática)	-0,1170	0,1037	-0,3247	0,1143
OE alecrim X OE jamaica	0,5350**	0,1227	0,8150**	0,1353
R ²	0,70992		0,73582	

OE = óleo essencial

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$; e *** $P < 0,10$

O índice de vermelho (a*) é o principal índice de cor relacionado à carne vermelha (RAMOS; GOMIDE, 2007) e, dessa forma, sua manutenção é extremamente importante para a aceitabilidade da carne *in natura*. Os valores de a* foram afetados positivamente pela adição do óleo essencial de alecrim (tanto para componente linear quanto para quadrático), assim como pela interação positiva entre os óleos, favorecendo o aumento dos valores de a* no tempo zero (Gráfico 5A).

A saturação (C*) das amostras também foi afetada pelos dois óleos essenciais, em seus componentes lineares, porém, o alecrim teve maior influência neste índice, uma vez que também apresentou efeito no componente quadrático, além da sua interação com o óleo da pimenta-da-jamaica, o que pode está evidenciado no Gráfico 5B. A saturação descreve a intensidade ou a quantidade de uma tonalidade e, assim, cores que apresentam baixo valor de

saturação são consideradas pálidas enquanto as com alto valor de C^* são consideradas saturadas (RAMOS; GOMIDE, 2007). Portanto, desde que a cor pura (tonalidade) seja a ideal, maiores valores de saturação são mais desejáveis.

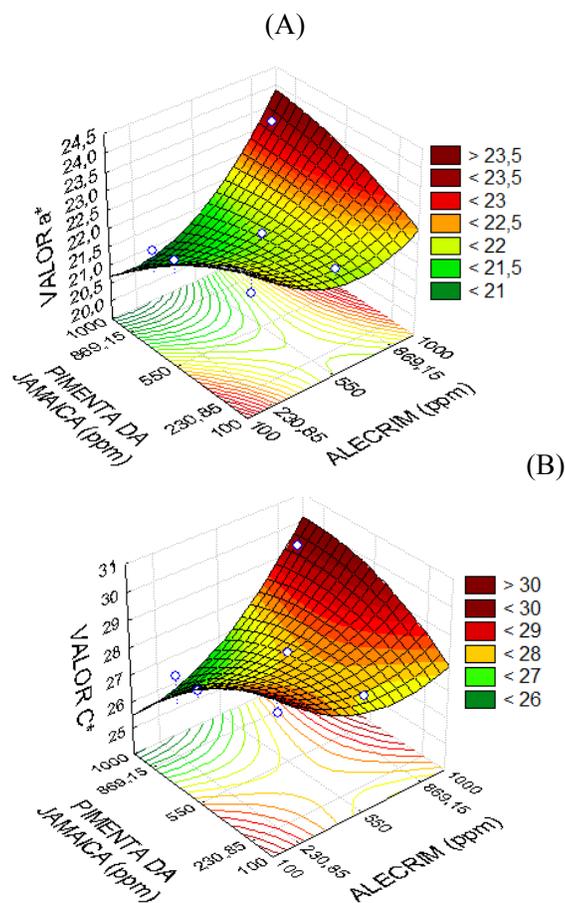


Gráfico 5 Superfície de resposta para o índice de (A) vermelho (a^*) e (B) saturação (C^*) da cor de bifes de *M. semitendinosus*, em função das concentrações dos óleos essenciais de pimenta da pimenta-da-jamaica e alecrim, no tempo zero

O comportamento para o índice de vermelho e para a saturação no tempo zero foi semelhante, o que já era esperado, devido ao fato de as mudanças no amarelo (b^*) serem pouco significativas.

Nenhum modelo foi ajustado ($p > 0,10$) para os parâmetros de cor, no sétimo dia de armazenamento. No entanto, visualmente, todos os tratamentos apresentaram a coloração próxima à da carne fresca no sétimo dia, enquanto o controle já se apresentava marrom. Segundo Sánchez-Escalante et al. (2003), o alecrim contém vários terpenos e compostos fenólicos que têm atividade antioxidante, reduzindo mudanças na saturação com o tempo.

Como os resultados do sétimo dia não diferiram entre si, apenas diferiram do controle, é possível inferir que, com o passar do tempo, tanto as menores concentrações de óleo quanto as maiores têm o mesmo efeito na cor. Portanto, por fatores econômicos (preço dos óleos) e sensoriais (maiores concentrações de óleo são mais perceptíveis), é possível padronizar as melhores concentrações em 500 ppm de óleo de pimenta-da-jamaica e 500 ppm do óleo essencial de alecrim para a manutenção da cor desejada. As equações que expressam os índices de cor dos bifes envoltos por biopolímeros adicionados dos óleos essenciais de alecrim e pimenta-da-jamaica são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 Modelos codificados das regressões para os componentes da cor

Tempo	Variável	Modelo codificado	Nível de significância (p)	R^2
	a*	$y = 21,8157 + 0,3779x_1 + 0,5092x_1^2 + 0,5350x_1x_2$	0,10	0,4342
	C*	$y = 27,8217 + 0,5149x_1 + 0,5630x_1^2 - 0,3460x_2 + 0,8150x_1x_2$	0,03	0,6714

x_1 = variável codificada para óleo essencial de alecrim; x_2 = variável codificada para óleo essencial de pimenta-da-jamaica;

A coloração dos bifes após sete dias de armazenamento é apresentada na Figura 1.

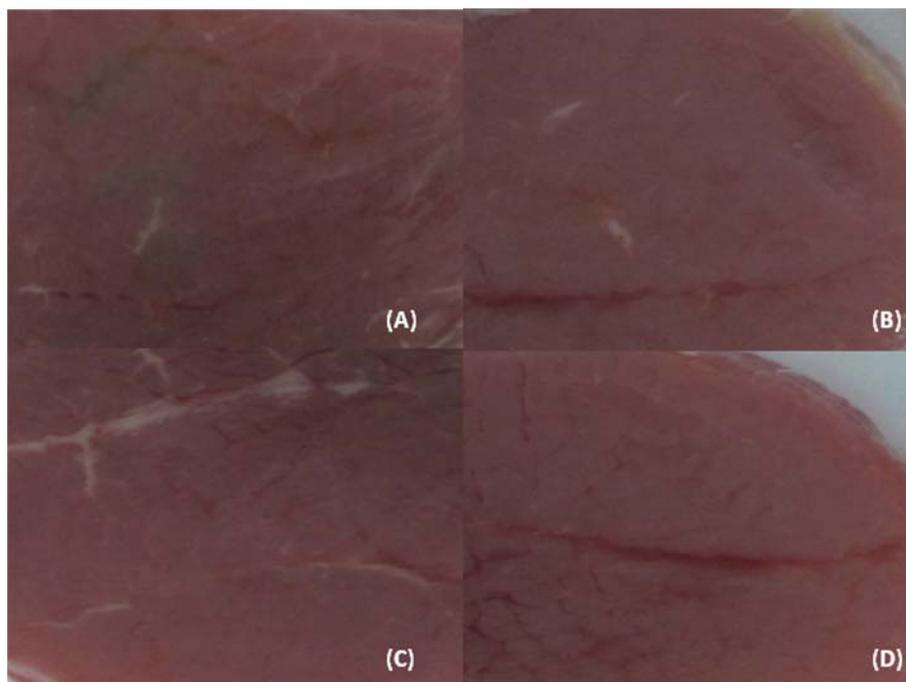


Figura 1 Coloração dos bifes após 7 dias de armazenamento, sendo (A) controle; (B) amostra 5: 100 ppm alecrim + 550 ppm pimenta-da-jamaica; (C) amostra 6: 1.000 ppm alecrim + 550 ppm pimenta-da-jamaica; (D) amostra 4: 869,15 ppm alecrim + 869,15 ppm pimenta-da-jamaica

4 CONCLUSÃO

De acordo com os presentes resultados, a adição dos óleos essenciais diminuiu o índice de TBARS durante sete dias de armazenamento. Além disso, favoreceu, de imediato, a coloração vermelha da carne pela formação de O₂Mb nos bifés, promovendo menor redução deste pigmento durante o armazenamento.

A decisão de usar determinada concentração de óleos essenciais na carne deve ser tomada considerando-se cuidadosamente as características peculiaridades do tipo de carne utilizada. Sabe-se que os óleos essenciais possuem forte aroma (mesmo em pequenas doses), o que pode influenciar as características organolépticas finais da carne.

Neste trabalho, levando-se em consideração os efeitos sobre a oxidação lipídica na carne refrigerada, as melhores concentrações de óleos a serem adicionadas nos filmes foram de 550 ppm para pimenta-da-jamaica e 550 ppm para o óleo essencial de alecrim. É importante ressaltar que seriam necessários testes sensoriais para averiguar a aceitabilidade de bifés revestidos com biopolímeros adicionados de óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 335 p.

ATTI-SANTOS, A. C. et al. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 1035-1039, 2005.

BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L.; Lamiaceae) essential Oils. **Journal of Agriculture of the Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 19, p. 7879-7885, Oct. 2007.

CARDOSO, G. P. et al. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de folhas frescas de pimenta da jamaica (*Pimenta dióica*). In: SEMANA ACADÊMICA INTEGRADA, 3.; SIMPÓSIO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL INICIAL E CONTINUADA, 1., 2011, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2011. 1 CD-ROM.

DUTRA, M. P. et al. Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas frescas de pimenta da jamaica (*pimenta dióica*) e de alecrim (*rosmarinus officinalis*). In: CONGRESSO MINEIRO DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 4.; CONGRESSO NACIONAL DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, 1., 2011, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: UFOP, 2011. 1 CD-ROM.

ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. **Meat Science**, Barking, v. 68, n. 4, p. 551-558, Apr. 2006.

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

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GRAY, J. I. et al. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, Barking, v. 43, p. S111-S123, 1996. Supplement.

GUTIERREZ, J. et al. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, Jan. 2008.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. et al. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, n. 2, p. 481-487, Apr. 2011.

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

MCMILLIN, K. W. Initiation of oxidative processes in muscle foods. In: ANNUAL PROCEEDINGS OF THE RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 49., 1997, Chicago. **Proceedings...** Chicago: America Meat Science Association, 1997. p. 53-64.

MINOTT, D. A.; BROWN, H. A. Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dióica* (L.) Merr. trees based on composition of leaf volatiles. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 17, p. 530-532, July 2007.

MOHAMED, H. M. H.; MANSOUR, H. A. Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. **LWT - Food Science and Technology**, London, 2011. In press.

OGATA, M. et al. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 48, n. 10, p. 1467-1469, Oct. 2000.

O'GRADY, M. N.; MONOHAN, F. J.; MOONEY, M. T. Oxymyoglobin in bovine muscle systems as affected by oxidizing lipids, vitamin E and metmyoglobin reductase activity. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v. 12, n. 1, p. 19-35, 2001.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 771-775, jul./set. 2009.

- OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 546-555, Mar. 2011.
- OUSSALAH, M. et al. Inibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.
- PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.
- POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 12-15, Jan. 2010.
- PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 92-95, out./dez. 2006.
- RAHARJO, S. et al. Improved speed, specificity and limit of determination of an aqueous acid extration thiobarbituric acid-C18 method for mesuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 12, p. 2182-2185, Dec. 1992.
- RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, London, v. 69, n. 1, p. 167-174, Jan. 2000.

SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. et al. Stabilisation of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 3, p. 187-194, Mar. 2003.

SHAN, B. et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 20, p. 7749-7755, Oct. 2005.

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

WANG, W. et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, Mar. 2008.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 1, p. 13-19, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

Na presente pesquisa evidenciou-se que a utilização do biopolímero comestível à base de gelatina, quitosana e glicerol em carne refrigerada é altamente viável, por apresentar efeitos positivos na carne, como diminuir a perda de peso, manter por mais tempo a cor vermelha, reduzir a quantidade de MMb formada, inibir a oxidação lipídica e pela sua capacidade antimicrobiana, além de ser um revestimento de baixo custo.

Os resultados evidenciaram que a quitosana, em concentrações acima de 1% em solução (0,4% de ácido acético 50%), tem capacidade antimicrobiana para as bactérias testadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Escherichia coli*) e que os revestimentos à base de gelatina, quitosana e glicerina também são efetivos na inibição do crescimento destas bactérias. Portanto, o uso do revestimento constituído de gelatina e quitosana é uma alternativa viável no controle da microbiota deteriorante de carnes refrigeradas.

Os revestimentos comestíveis à base de gelatina e quitosana apresentaram efeito benéfico sobre a perda de peso dos bifês e a diminuição da oxidação lipídica. Também favoreceram a manutenção da cor de carnes bovinas durante os dias de estocagem, reduzindo a oxidação do pigmento de O₂Mb a MMb, durante o armazenamento. Entretanto, há uma maior formação de Mb⁺, o que também afeta a cor percebida na superfície da carne, embora de forma menos negativa do que a formação de MMb.

A adição dos óleos essenciais ao revestimento diminuiu o índice de TBARS durante sete dias de armazenamento. Além disso, favoreceu, de imediato, a coloração vermelha da carne pela formação de O₂Mb nos bifês, promovendo menor redução deste pigmento durante o armazenamento.

Neste trabalho, foi indicada que a melhor concentração para a formação do revestimento para carne refrigerada é de 3% de gelatina, 1,5% de quitosana e 6% de glicerina, 550 ppm do óleo essencial de pimenta-da-jamaica e 550 ppm do óleo essencial de alecrim.

É importante ressaltar que seriam necessários testes sensoriais para averiguar a aceitabilidade de bifés revestidos com biopolímeros adicionados de óleos essenciais.