

NEDIO JAIR WURLITZER

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS E
ANTIMICROBIANAS DE FILMES DE POLI(CLORETO DE VINILIDENO)
INCORPORADOS COM TRICLOSAN**

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

W967d
2007

Wurlitzer, Nedio Jair, 1962-

Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli(cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan / Nedio Jair Wurlitzer.

– Viçosa, MG , 2007.

xi, 91f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas:f.

1. Alimentos - Embalagens. 2. Plásticos nas embalagens.
 3. Filmes plásticos. 4. Triclosan. 5. Ácido sórbico.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 664.09

NEDIO JAIR WURLITZER

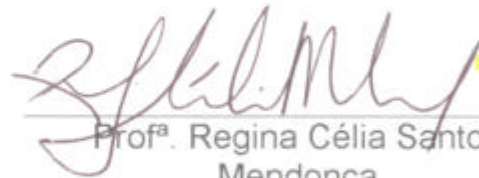
**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS E
ANTIMICROBIANAS DE FILMES DE POLI(CLORETO DE VINILIDENO)
INCORPORADOS COM TRICLOSAN**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 2 de março de 2007.



Prof. Antonio Tavares da Silva



Prof.ª Regina Célia Santos
Mendonça



Prof.ª Edimar Aparecida Filomeno
Fontes



Prof. Nélcio José de Andrade
(Co-orientador)



Prof.ª Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)

Aos meus pais, Osvaldo Arnildo Wurlitzer
(*in memoriam*) e Ines Maria Wurlitzer

Aos meus filhos, Bruno e Sofia.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre conduz minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, por disponibilizarem a estrutura e recursos na elaboração deste trabalho.

Ao SENAI/RJ – Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas, pelo apoio e oportunidade de participar deste curso de doutorado e em especial à Lucia, Imar e Ary, pelo apoio e incentivo.

À professora Nilda pela orientação, pela competência e esforço em manter a estrutura e recursos de Laboratório de Embalagens, e viabilizar os testes relacionados aos trabalhos de pesquisa. Também pela amizade, convivência e entusiasmo, motivando-nos na realização dos trabalhos.

A todos os professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos - UFV, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Antônio Tavares, pelo incentivo e orientação.

Às minhas amigas, em especial à Socorro, Joesse, Nathália, Edimar, Maria Paula, Márcia, Geany e Alba, que tanto me apoiaram neste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de embalagens, pela compreensão e paciência nas vezes em que dividíamos os equipamentos do laboratório para meus experimentos. Pelo apoio, motivação e bom convívio, que facilitaram a concretização deste trabalho.

À Socorro, que sempre disponibilizou de sua amizade e atenção e ainda por sugestões durante a execução deste trabalho.

Ao Fernando Mourão, Angélica, Selene e Paulo, pela amizade e companhia nas minhas estadias em Viçosa.

Aos funcionários do DTA que sempre me ajudaram, facilitando assim a elaboração deste trabalho.

Aqueles que por ventura não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Nedio Jair Wurlitzer, filho de Osvaldo Arnildo Wurlitzer e Ines Maria Wurlitzer, nasceu em Peritiba, Estado de Santa Catarina, em 27 de maio de 1962.

Em 1986, graduou-se em Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal de Santa Catarina.

Desde março de 1988, atua em atividades profissionais como engenheiro de alimentos, no SENAI/RJ - Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas, em Vassouras – RJ, com atividades relacionadas a treinamentos, assessoria tecnológica a empresas e desenvolvimento de produtos.

Em 1993 iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com defesa de tese em abril de 1996.

Desde 1998, atua também em atividades de docência em curso de Química Industrial, na Universidade Severino Sombra, em Vassouras – RJ.

Em abril de 2002 iniciou o Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, com defesa de tese em março de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Panorama – embalagens ativas em alimentos.....	4
2.1.1. Embalagens de alimentos.....	4
2.1.2. Embalagens ativas – conceitos e aplicações	5
2.1.3. Produtos cárneos: mercado	8
2.1.4. Segurança de alimentos processados.....	11
2.2. Tipos de embalagens ativas	13
2.2.1. Sistemas absorvedores de oxigênio	13
2.2.2. Embalagens com absorvedores de umidade	14
2.2.3. Embalagens com liberação ou absorção de CO ₂ e etanol.....	15
2.2.4. Embalagens com indicador de tempo-temperatura.....	17
2.2.5. Embalagens com sistemas de aquecimento ou resfriamento ..	19
2.3. Embalagens Antimicrobianas	20
2.3.1. Tipos de substâncias antimicrobianas utilizadas	22
2.3.2. Aplicação de antimicrobianos por recobrimento	27
2.3.3. Incorporação de antimicrobiano em polímeros plásticos.....	28
2.3.4. Imobilização de antimicrobiano em polímeros	29
2.3.5. Modificação de superfície	31
2.3.6. Fatores a considerar na fabricação de filmes antimicrobianos.	32
2.4. Métodos de avaliação de ação antimicrobiana	34
2.4.1. Atividade antimicrobiana pelo método de disco e halo de inibição.....	35
2.4.2. Atividade antimicrobiana através da curva de crescimento	35
2.5. Legislação para embalagens ativas	36

3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Produção dos filmes antimicrobianos	38
3.2. Análise das propriedades físico-mecânicas dos filmes.....	39
3.2.1. Determinação da espessura dos filmes	39
3.2.2. Determinação da resistência à tração e alongamento do filme	40
3.2.3. Resistência da termossoldagem à tração	41
3.2.4. Taxa de permeabilidade ao vapor de água	42
3.2.5. Análise estatística das propriedades físico-mecânicas	43
3.3. Testes de migração de triclosan do filme para o meio.....	43
3.3.1. Migração de triclosan em simulantes água e n-heptano	43
3.3.2. Migração de triclosan em salsicha	44
3.4. Microscopia eletrônica de varredura	45
3.5. Avaliação de ação antimicrobiana dos filmes com triclosan e ácido sorbico	46
3.5.1. Ação antimicrobiana pelo método de halo de inibição.....	47
3.5.2. Ação antimicrobiana por inibição da curva de crescimento em meio líquido	48
3.5.3. Ação antimicrobiana em produto cárneo tipo salsicha	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Produção dos filmes antimicrobianos	52
4.2. Análise das propriedades físico-mecânicas dos filmes.....	53
4.2.1. Determinação da espessura dos filmes	53
4.2.2. Determinação da resistência dos filmes à tração	53
4.2.3. Resistência da termossoldagem à tração em filmes de PVdC e PVdC/poliéster.....	54
4.2.4. Permeabilidade ao vapor de água	56
4.3. Testes de migração de triclosan do filme para o meio.....	56
4.3.1. Migração de triclosan em água e em simulante n-heptano.....	57
4.3.2. Migração de triclosan em salsicha, sob temperatura de refrigeração	61
4.4. Caracterização dos filmes por microfotografias	62

4.5. Avaliação de ação antimicrobiana dos filmes com triclosan e ácido sórbico	67
4.5.1. Ação antimicrobiana pelo método de halo de inibição.....	67
4.5.2. Ação antimicrobiana por inibição da curva de crescimento em meio de cultura líquido	71
4.5.3. Ação antimicrobiana em produto cárneo tipo salsicha	75
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
7. ANEXOS	88
Tabelas de análise estatística	88

RESUMO

WURLITZER, Nedio Jair, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli(cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-orientadores: Nélio José de Andrade e Maria Paula Gonçalves da Conceição Junqueira.

Embalagens ativas, adicionadas de substâncias com ação antimicrobiana, podem atuar contra microrganismos patogênicos ou deterioradores na superfície de alimentos embalados, garantindo a segurança dos produtos e aumentando sua vida-de-prateleira. Neste trabalho foram desenvolvidos filmes antimicrobianos de poli(cloreto de vinilideno) (PVdC), preparados pelo método “cast”, adicionados de triclosan (2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenil éter). Os filmes foram avaliados quanto às propriedades mecânicas de resistência e alongamento sob tração, permeabilidade ao vapor de água, migração do triclosan e avaliação de ação antimicrobiana dos filmes sobre *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, por meio dos métodos de halo de inibição, alterações da curva de crescimento e em embalagem de salsicha. A adição de triclosan provocou pequenas variações nas propriedades físicas de resistência à tração e termossoldagem dos filmes, sendo maior a diferença quando adicionado ácido sórbico. A migração de triclosan em simulante n-heptano alcançou, em 20 dias de contato, 22 a 24 % do total de triclosan incorporado em cada filme. Sugere-se assim que moléculas de triclosan mais próximas à superfície do filme migram mais facilmente, ficando o restante firmemente aprisionado na rede de polímero. Em salsicha envolta nos filmes antimicrobianos, observou-se migração de triclosan menor que 3 mg.kg^{-1} , sendo inferior ao do limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia para alimentos. Os resultados indicaram eficiência antimicrobiana nos testes *in vitro*, com formação de halos de inibição proporcionais à concentração de triclosan incorporado, sendo mais efetivos contra *Staphylococcus aureus* (halos de inibição de 8,9 a 16,7 mm), *Salmonella*

(halo 2,4 a 8,1 mm), *Escherichia coli* (halo de 0,2 a 5,4 mm) e para *Klebsiela* (halo de 0,3 a 5,6 mm), para as concentrações de 0,5 e 5 % de triclosan, respectivamente. *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* não foram inibidos por ação dos filmes incorporados com triclosan, nas concentrações e condições utilizadas no teste de halo de inibição. A atividade antimicrobiana dos filmes contendo 0,5 % e 1,0 % de triclosan também foi evidenciada na avaliação da curva de crescimento em meio líquido, pela redução da taxa de crescimento (μ) na fase exponencial e pelo aumento do tempo de fase lag, quando comparado com o filme controle. A velocidade de crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* adicionadas de filmes antimicrobianos com 1 % de triclosan, foram significativamente menores ($P < 0,05$) do que as adicionadas do filme controle (sem antimicrobiano). Para *Staphylococcus aureus*, o filme com 1 % triclosan e 2 % de ácido sórbico, apresentou menor velocidade de crescimento, diferindo significativamente do filme controle, mas não se diferenciou significativamente dos outros tratamentos. A adição de ácido sórbico ao filme não indicou alteração do efeito antimicrobiano quando comparado com o filme adicionado somente com triclosan. A adição de 0,5 % de triclosan ao filme, apresentou ação intermediária na inibição do crescimento microbiano. O microrganismo mais sensível ao aumento da fase lag, por ação de triclosan, foi o *Staphylococcus aureus*, seguido de *Escherichia coli*, enquanto que a fase lag de *Listeria monocytogenes* não foi afetada pela adição dos filmes antimicrobianos. Na avaliação da eficiência antimicrobiana sobre salsicha, observou-se tendência em reduzir a velocidade de crescimento de *Listeria monocytogenes* em filmes com 1 % e 3 % de triclosan. Com estes resultados pode-se concluir sobre a potencialidade do uso destes filmes antimicrobianos na embalagem de alimentos para produzir alimentos seguros ao consumidor e aumentar a vida-de-prateleira dos mesmos.

ABSTRACT

WURLITZER, Nedio Jair, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Development and evaluation of physic and antimicrobial properties of triclosan incorporated poly(vinylidene chloride) film.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-Advisers: Nélio José de Andrade and Maria Paula Gonçalves da Conceição Junqueira.

Active packagings with the addition of antimicrobial substances to increase shelf-life and food safety were studied in this work. The films used in these experiments were made of poly(vinylidene chloride) (PVdC), prepared by "cast" method and they were added of triclosan (2,4,4' - trichloro-2' - hidroxidifenil ether) to act against pathogenic or spoilage bacteria. Were investigated in this research the film mechanical properties such as resistance and elongation under traction, water vapour transmission rate, migration of triclosan, and the evaluation of antimicrobial effect of the films on growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, carried out by using agar diffusion test, changes on the shape of the growth curve (liquid culture test) and in sausage samples. The addition of triclosan cause small variations on tensile strength and welding temperature of the films, and higher difference were obtained when sorbic acid was used. The triclosan migration in n-heptano reached 22 to 24 % of the total of triclosan incorporated in each film after 20 days of contact. This suggests that molecules of triclosan next to the surface film may be more easily released, and the remains were trapped in the polymer structure. It could be observed in the sausage held in packages made with the antimicrobial films a triclosan migration lower of 3 mg.kg⁻¹ what is an amount lower than the maximum limit established by the European Community for foods. The results in agar diffusion test indicated that the addition of triclosan from 0,5 to 5 %, caused an inhibition zone that was proportional to antimicrobial agent concentration as it could be observed for the following microorganisms: *Staphylococcus aureus* (inhibition diameters of 8,9 to 16,7 mm), *Salmonella* (2,4 to 8,1 mm), *Escherichia coli* (0,2 to 5,4 mm) and for *Klebsiella* (0,3 to 5,6

mm), for the concentrations of 0,5 and 5 % of triclosan, respectively. However, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* were not affected by triclosan incorporated in films, for the concentrations and the conditions used. It could also be find out, from liquid culture test results, that the specific growth rate (μ) in the exponential phase was reduced and the lag time increased when using triclosan added films compared to control films (without antimicrobial). The specific growth rate for *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* cultures immersed with 1 % triclosan films were significantly lower ($P < 0.05$) than those with control films. The film with 1 % triclosan and 2 % of sorbic acid presented lower specific growth rate for *Staphylococcus aureus* differing significantly from the control film but not from the other treatments. The addition of sorbic acid to the film did not show any alteration for the antimicrobial effect when compared to the film added only with triclosan. The addition of 0,5 % of triclosan to the film, presented intermediate action in the growth inhibition. The microorganism most sensible to the increase of the lag time, as result of triclosan action, was the *Staphylococcus aureus*, followed by *Escherichia coli*, however the lag time of *Listeria monocytogenes* was not affected by the addition of the antimicrobial on films. The evaluation of the antimicrobial efficiency on the sausage showed reduction on the speed of *Listeria monocytogenes* growth in films with 1 % and 3 % of triclosan. The results might lead to the conclusion that antimicrobial films may have potential use in food packaging to produce safer foods to the consumer and increased shelf-life.

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos com qualidade e segurança dos alimentos é meta prioritária para as indústrias alimentícias. Além da aplicação de boas práticas higiênico-sanitárias faz-se necessário também o acondicionamento do produto em embalagens adequadas para proteger e conservar durante as fases de estocagem e comercialização, assegurando ao consumidor a aquisição de um produto saudável. O uso de embalagens que possam interagir diretamente com o alimento, ampliando os parâmetros desejáveis para a melhoria da qualidade do produto embalado, tem crescido acentuadamente na última década. Essas embalagens são denominadas embalagens ativas e, entre vários exemplos, podem ser citados os filmes antimicrobianos, filmes antioxidantes, sachês absorvedores de etileno, de oxigênio, de umidade e marcadores sensíveis a variações de temperatura (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002). A partir da década de 80, o setor de embalagens ativas vem mostrando um grande avanço, com a incorporação ou adição de substâncias antimicrobianas em superfícies de embalagens, utensílios de cozinha, materiais higiênicos, filtros de tratamento de água e materiais de embalagem.

A ampliação do consumo de alimentos industrializados põe em evidência a ocorrência de doenças veiculadas por estes. Estimativas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos indicam 76 milhões de casos de doenças alimentares por ano, com aproximadamente 5000 óbitos (CLEVELAND et al., 2001). Na União Européia foram relatados 42.447 casos de doenças de origem alimentar (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2005), com maior número de casos causados por *Salmonella* e *Campylobacter*, seguidos por *Yersinia*, *E.coli* e *Listeria monocytogenes*, sendo reportadas 107 mortes por listeriose, em 2004.

A incorporação de substâncias antimicrobianas em filmes plásticos tem como finalidade a liberação gradual destas sobre a superfície do alimento, impedindo ou inibindo o crescimento de microrganismos, aumentando assim

a vida-de-prateleira e ampliando aspectos da segurança dos alimentos, ao atuar sobre microrganismos patogênicos. É necessário o contato entre o produto e o filme antimicrobiano para que sua atividade seja efetiva, de modo que os alimentos acondicionados a vácuo apresentam grande potencial de uso dessa tecnologia (VERMEIREN et al., 2002b). As embalagens antimicrobianas apresentam aspectos tecnológicos inovadores por aumentar a segurança ao consumidor quanto ao consumo de alimentos, pois liberam de forma controlada o agente antimicrobiano sobre a superfície do mesmo, reduzindo ou tornando não necessária a sua adição direta ao produto. Desta forma o aditivo tem contato direto com a superfície do produto, onde sua presença é mais requerida, pois é nesta região que ocorre a maioria das deteriorações e contaminações de origem microbiana (GONTARD, 1997; APPENDINI e HOTCHKISS, 2002).

Em embalagens ativas inclui-se o desenvolvimento de materiais através da nanotecnologia, com objetivos de desenvolver ou melhorar propriedades dos materiais de embalagem, assegurando melhor proteção dos alimentos contra efeitos microbiológicos, mecânicos, térmicos ou químicos, além de aumentar a vida-de-prateleira. Alguns dos usos potenciais da nanotecnologia em embalagens de alimentos incluem a modificação de características de permeabilidade em filmes, aumento das propriedades de barreira, melhoria das propriedades de resistência mecânica e térmica, ação antimicrobiana, marcadores para rastreabilidade e uso de nanosensores para detecção de patógenos e contaminantes (EL AMIN, 2005).

A Universidade Federal de Viçosa, através do Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos, está dando enfoque em trabalhos de pesquisa para desenvolvimento de embalagens antimicrobianas. Vários trabalhos já foram realizados para desenvolvimento e avaliação de filmes antimicrobianos incorporados com quitosana, ácido propiônico, nisina, lactato de sódio, ácido sórbico, propionato de sódio para diferentes produtos como cenoura, massa de pastel, queijo, pães e sucos, entre outros.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram estabelecer as condições de incorporação e preparação de filmes de poli(cloreto de vinilideno) (PVdC), adicionado dos antimicrobianos triclosan e ácido sórbico, e avaliar a ação antimicrobiana aplicada a alimentos, com vistas a reduzir ou impedir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos em produtos cárneos tipo salsichas embalados a vácuo, ampliando as possibilidades de produção de alimentos com maior segurança. Também avaliar as alterações das propriedades físicas dos filmes, causadas pela adição do componente antimicrobiano.

Objetivos específicos:

- Obtenção dos filmes antimicrobianos incorporados com triclosan e/ou ácido sórbico em concentrações de até 3 %;
- Avaliar as propriedades de resistência à tração (ruptura, alongamento) dos filmes obtidos e da termossoldagem;
- Quantificar a liberação do triclosan para meio simulante de alimentos;
- Avaliar a eficiência antimicrobiana dos diferentes filmes sobre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, e *Listeria monocytogenes*, através de teste do halo ou zona de inibição e inibição da curva de crescimento em meio líquido;
- Avaliar a eficiência dos filmes antimicrobianos em salsichas inoculadas com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Listeria monocytogenes*, separadamente, envolvidas pelo filme antimicrobiano, acondicionadas sob vácuo e estocadas sob refrigeração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Panorama – embalagens ativas em alimentos

O desenvolvimento de embalagens ativas necessita de informações referentes a alimentos processados, sob aspectos de segurança dos alimentos e importância mercadológica, as embalagens aplicáveis e tendências tecnológicas, além de aspectos da legislação atual aplicada à produção e embalagem de alimentos.

2.1.1. Embalagens de alimentos

A embalagem também é um fator de importância na conservação dos

transformação dos materiais termoplásticos em filmes são utilizados processos de extrusão e o método “cast”. No método “cast” o polímero é solubilizado e depois espalhado em superfície plana e o solvente evaporado, utilizando temperaturas baixas, de até 80 °C. A baixa temperatura evita a degradação por calor de diversos antimicrobianos orgânicos, mantendo a ação antimicrobiana. O processo de produção de filmes por extrusão utiliza temperatura maior do que o ponto de amolecimento do polímero, podendo variar de 250 a 450 °C. No processo de extrusão, caso venha a ser adicionada substância antimicrobiana, esta não pode se degradar na temperatura utilizada.

A adição de substâncias antimicrobianas a polímeros plásticos, pode alterar as propriedades físico-mecânicas dos filmes. Entre estas, a termossoldagem é utilizada para fechamento de embalagens, que consiste na união de duas camadas do material termoplástico por fusão, sendo normalmente utilizado o calor como agente de fusão. A qualidade da termossoldagem depende das condições usadas na selagem, tais como temperatura aplicada ao material, pressão das mandíbulas e tempo de atuação do calor e pressão. É importante que a termossoldagem tenha resistência mecânica, para suportar o manuseio sem abrir, e integridade, garantindo a hermeticidade da embalagem. As propriedades de tração estão relacionadas à maquinabilidade e desempenho mecânico.

2.1.2. Embalagens ativas – conceitos e aplicações

A crescente observação de casos de intoxicações veiculadas por alimentos, destacando-se aquelas causadas por microrganismos, motiva as empresas que industrializam alimentos a buscar novas “barreiras” ao crescimento de microrganismos patogênicos. A adição de substâncias com ação antimicrobiana a polímeros termoplásticos, com o objetivo de atuar sobre a superfície dos alimentos, é um fator adicionado aos processos de conservação de alimentos.

Segundo ROONEY (1995), diferentes conceitos sobre embalagens de alimentos têm sido introduzidos, tais como as embalagens ativas, com um aumento crescente no número de publicações e patentes.

SOARES (1998) conceituou como embalagens ativas aquelas que interagem com o alimento, modificando alguma propriedade objetivando proporcionar segurança, melhoria de qualidade sensorial e ampliar a vida-de-prateleira do produto. Segundo ROONEY (1995) embalagem ativa é definida como uma embalagem que não apenas separa o alimento do meio ambiente, mas que interage com o alimento para manter suas propriedades. De acordo com SCANNEL et al. (2000), embalagem ativa é um conceito inovador que combina avanços em tecnologia e segurança dos alimentos, embalagens e materiais, em um esforço para melhor atender às demandas de consumidores por alimentos mais frescos e seguros. A embalagem ativa interage com o produto no espaço de contato entre a embalagem e o alimento, para restringir o crescimento de microrganismos e reduzir processos de deterioração da qualidade (APPENDINI e HOCHKISS, 2002).

De acordo com VERMEIREN et al. (2002), nos EUA, Japão e Austrália, o conceito de embalagens ativas está sendo aplicado com sucesso. Na Europa, o desenvolvimento e a aplicação desse tipo de embalagem são limitados devido a restrições de legislação, medo ou resistência do consumidor, necessidade de maior conhecimento sobre a efetividade e impacto econômico e ambiental.

No Brasil este conceito vem sendo difundido mais recentemente, com a divulgação dos trabalhos realizados por uma equipe pioneira multidisciplinar no Departamento de Tecnologia de Alimentos / Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com grande enfoque nas embalagens antimicrobianas. Vários trabalhos já foram realizados no Laboratório de Embalagens no desenvolvimento e avaliação de filmes antimicrobianos incorporados com quitosana, ácido propiônico, nisina, lactato de sódio, ácido sórbico, propionato de sódio para diferentes produtos como cenoura, massa de pastel, queijo, pães e sucos (MELO et al., 2002; SOARES et al., 2004; DURANGO et al., 2003; SOARES et al., 2003). Os

filmes produzidos apresentaram inibição *in vitro* (teste do halo em placas) e quando usado no acondicionamento dos alimentos, para os diferentes microrganismos testados.

A preocupação com melhorias na segurança e na qualidade dos alimentos processados tem despertado grande interesse no uso de filmes antimicrobianos comestíveis e coberturas antimicrobianas.

A liberação de aditivos por embalagens ativas aumenta a segurança do consumidor, já que esses compostos, ao invés de diretamente adicionados ao alimento, são liberados lentamente; com isso, estão presentes em menor quantidade, e apenas onde sua presença é requerida, a saber, na superfície do produto, onde ocorre a maioria das deteriorações (GONTARD, 1997).

KALYON e OLGUN (2001) reportaram a liberação de 0,06 % de triclosan de discos de poliestireno com espessura de 2 mm, cuja concentração foi efetiva na inibição de *B. thurigiensis* e *E. coli* Y 1090, após 5 horas de contato dos discos com a suspensão dos microrganismos. Nesse caso, a espessura contribuiu para uma menor liberação do aditivo para a superfície do disco, bem como, interação do aditivo com a matriz polimérica.

BOWER et al. (2002) mostraram em estudos *in vitro* que a nisina imobilizada em PVC e mantida sob estocagem durante dois meses em temperatura ambiente, após imobilização e secagem, apresentou atividade antimicrobiana, porém inferior à atividade do filme recém preparado, quantificando perda de 7 % após 30 minutos e 50 % após os 60 dias.

WENG e HOTCHKISS (1993) incorporaram 1 % de anidrido benzóico em filmes de polietileno, inibindo completamente o crescimento de *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium spp.* e *Aspergillus toxicarius* em meio de cultura. Na concentração de 2 % houve uma inibição do crescimento de fungos em queijo. WENG e HOTCHKISS (1992) incorporaram o fungicida imazalil em filmes de polietileno de baixa densidade, observando a inibição de fungos em alimentos. Foi observada a liberação do imazalil para a superfície do alimento.

MELO et al. (2002) desenvolveram pesquisas incorporando lactato de sódio em filme celulósico e mostraram a eficiência do filme obtido na inibição de mesófilos em superfície de salsichas. As salsichas foram envolvidas com filme antimicrobiano, acondicionadas sob vácuo em filme multicamada e estocadas sob refrigeração. Após 21 dias de estocagem as amostras em presença do filme com lactato apresentaram uma redução de quatro ciclos logarítmicos em relação às amostras em presença do filme sem lactato. SILVEIRA (2005) incorporou de 3 a 9% de ácido sórbico em filmes de acetato de celulose, aplicados como separador de massa de pastel, obteve redução na contagem de psicotróficos em relação ao tratamento controle.

2.1.3. Produtos cárneos: mercado

O mercado mundial de carnes apresenta produção crescente segundo dados apresentados pela ABIPECS (2005). A produção mundial de carnes foi de 257 milhões de toneladas, destacando-se as carnes suína, de frango e bovina, conforme apresentado na Tabela 1. O Brasil destaca-se na produção de carnes, tendo produção anual de 41 milhões de bovinos abatidos, quatro bilhões de frangos e 34,5 milhões de suínos, em 2004, representando uma produção anual de 24,4 bilhões de dólares, sendo exportados 4,5 bilhões (ABIPECS, 2005). Este destaque que o Brasil vem obtendo na exportação, também indica a necessidade de comprovar competência de manter a estrutura, garantindo a disponibilidade de produção e insumos, além de demonstrar o fortalecimento de controles sanitários e domínio da tecnologia e gestão da segurança dos alimentos.

Em 2001, o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial de carnes, superado apenas pela China e pelos Estados Unidos. Sua produção total passou das 15 milhões de toneladas equivalente carcaça (t.e.c.) (6,6 de bovina; 6,5 de frango; e 2,1 de suína), contra 58 milhões da China e 37 milhões de t.e.c. dos Estados Unidos (FERREIRA, 2002).

Tabela 1. Produção mundial de carnes, em toneladas.

ANO	1964	1974	1984	1994	2004
Carne suína	28.679.247	42.434.173	57.493.023	79.188.019	100.392.230
Carne de frango	8.679.038	15.930.767	26.289.224	43.659.189	67.718.544
Carne de peru	908.521	1.549.668	2.328.991	4.264.986	5.113.838
Carne de pato	381.483	578.422	833.162	1.875.913	3.245.102
Carne bovina	31.276.600	41.840.386	48.456.394	53.352.313	58.702.028
Carne de búfalo	1.165.052	1.471.117	1.909.704	2.723.432	3.171.168
Outras carnes	9.292.457	10.174.411	12.029.492	15.499.541	19.161.402
TOTAL	80.382.398	113.978.944	149.339.990	200.563.393	257.504.312

Fonte: ABIPECS, 2005.

A tendência é de contínuo crescimento para os próximos anos, com uma variação que dependerá do aumento das exportações, uma vez que, com um consumo *per capita* já superior a 75 kg.habitante⁻¹.ano⁻¹, cifra considerada elevada, o crescimento torna-se mais difícil (ABIA, 2001). A Figura 1 apresenta o consumo por tipo de carnes.

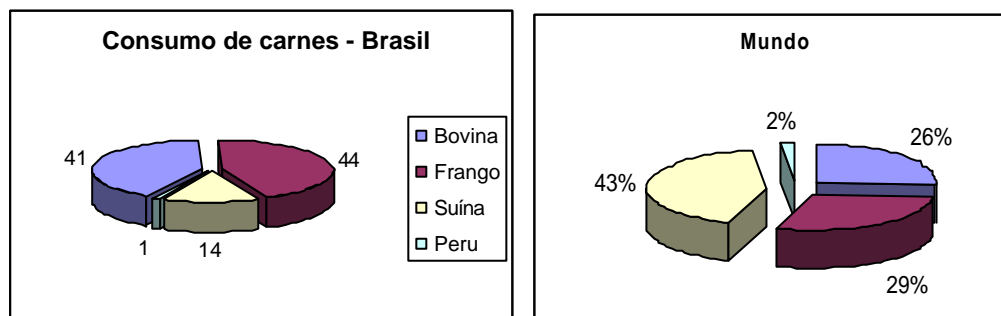


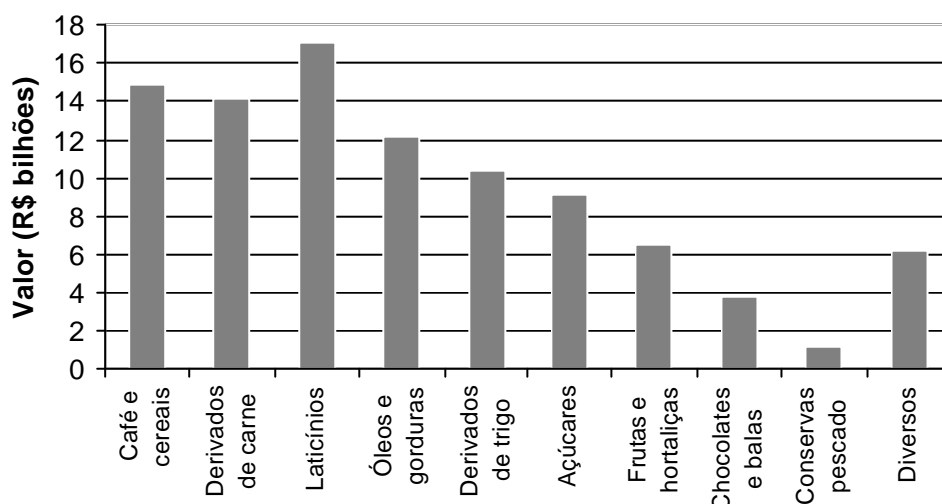
Figura 1. Consumo de carnes, por tipo, no Brasil e Mundo (ABIPECS, 2005).

A taxa de abate (desfrute), apesar de ainda apresentar baixos índices em relação aos outros grandes países produtores de carne bovina, vem apresentando significativa melhoria nos últimos anos, saindo de 18,7 %, em 1997, e superando os 20 %, em 2001. A produção nacional, de aproximadamente 6,6 milhões de toneladas, é garantida por um abate anual de aproximadamente 34 milhões de cabeças (FERREIRA, 2002).

No mercado de produtos industrializados, o segmento de carnes movimentou, em 2001, 14,4 bilhões de reais, aparecendo como o 3º segmento de maior comercialização (Figura 2) (ABIA, 2001).

Na União Européia, o consumo geral de carnes deverá aumentar de 87,4 kg por pessoa em 2004, para aproximadamente 89 kg até o ano de 2012 (BEEFPOINT, 2005). O consumo de carne suína representa cerca de 50 % do consumo total de carnes na União Européia, seguido pela carne de aves, de 27 %, ultrapassando a carne bovina e de vitelo desde 1996.

O mercado de produtos cárneos industrializados tem crescido e apresenta-se cada vez mais promissor, em função do aumento do consumo de embutidos pelos brasileiros. A estimativa de consumo anual *per capita* do brasileiro é de 1,1 quilos de salsichas, um dos embutidos mais consumidos no país, enquanto que o consumo anual de mortadelas, presuntos, lingüiças e salames, têm valores abaixo de um quilo (SEGALA E FERREIRA, 2001).



Valor Total: R\$ 96,8 bilhões

Figura 2. Valores de comercialização nos diferentes segmentos de produtos alimentícios (Fonte: ABIA, 2001).

Assim, a comercialização de produtos cárneos industrializados vem merecendo atenção em toda a sua cadeia produtiva e, particularmente, na qualidade do produto obtido a fim de disponibilizar para os consumidores produtos com segurança.

2.1.4. Segurança de alimentos processados

A manutenção da qualidade de carnes e derivados pode ser garantida por períodos maiores em embalagens capazes de retardar a deterioração microbiológica, de manter uma coloração desejável, retardar a perda de umidade e a oxidação de gorduras, permitindo um maior alcance do sistema de distribuição desses produtos perecíveis.

Os alimentos, quer sejam industrializados ou não, mantêm-se em constante atividade, manifestada por alterações de natureza química, física, microbiológica ou enzimática, podendo levar à perda de qualidade e redução da vida-de-prateleira. Destas alterações, a de maior preocupação com a segurança dos consumidores é a microbiológica. Entre os microrganismos patogênicos de maior importância em carnes e derivados, encontram-se a *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (JAY, 1992).

A elevada atividade de água e o pH da carne, seja ela bovina, suína, aves, etc., indicam ser esses produtos um meio ideal para o desenvolvimento microbiológico. O manuseio em boas condições sanitárias, a estocagem a baixa temperatura e o sistema de embalagem são elementos chave no aumento da vida-de-prateleira (SARANTÓPOULOS, 2001).

A conservação de salsichas normalmente é efetuada sob temperaturas inferiores a 7 °C, em embalagens a vácuo. A vida-de-prateleira estimada para este produto é de 60 dias, e pode ser menor devido ao crescimento de microrganismos deterioradores, tendo como flora predominante as bactérias lácticas, por exemplo, *Leuconostoc* ou *Microbacterium thermosphactum*. Alguns produtos não apresentam sinal de alteração, mesmo com contagens de 10^4 UFC.g⁻¹ (ICMSF, 1980). A deterioração com formação de limo ocorre no exterior de salsichas e pode ser visualizada nos estágios iniciais como colônias discretas, que podem coalescer formando uma camada uniforme de limo acinzentado. Neste material limoso, podem ser isoladas leveduras,

bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus thermosphacta* e *L. viridiscens*, que produzem limosidade e esverdeamento (JAY, 1992).

Dois tipos de esverdeamento ocorrem em carne estocada ou processada, um devido à presença de H_2O_2 e outro pela presença de H_2S , produzidos por bactérias. Geralmente ocorre após estocagem sob vácuo e exposição ao ar, pois o H_2O_2 reage com nitrosohemocromo para produzir uma porfirina oxidada esverdeada. O esverdeamento também ocorre a partir do crescimento de microrganismos, em que o baixo potencial de óxido-redução permite o acúmulo de H_2O_2 . *Lactobacillus viridiscens* é o microrganismo mais comum neste tipo de esverdeamento, mas *Leuconostoc*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* também são capazes de causar esverdeamento.

Em carnes *in natura* e produtos derivados, mesmo conservados pela aplicação de calor, cozimento, e depois mantidos sob refrigeração, podem apresentar microrganismos patogênicos, entre eles *Listeria monocytogenes*, causador de doenças em indivíduos imunocomprometidos, idosos e crianças. Muitas vezes a contaminação ocorre por manuseio após o cozimento, em etapas anteriores à embalagem (MING et al., 1997).

Vários surtos de infecção veiculados por alimentos têm sido relatados envolvendo microrganismos, tais como: *Escherichia coli* O157:H7 (PADHYE e DOYLE, 1992), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* (NATRAJAN e SHELDON, 2000). O relatório de doenças veiculadas por alimentos da Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2005), apresenta dados nos quais *Salmonella* e *Campylobacter*, são os principais agentes em casos relatados, seguidos por *Yersinia*, *E. coli* e *Listeria monocytogenes*, sendo que foram reportadas 107 mortes por listeriose na Europa, em 2004.

Para redução da carga microbiana dos alimentos, é importante a utilização de matéria-prima de boa qualidade e a aplicação das boas práticas de fabricação. Em produtos industrializados, os processos de conservação

têm papéis importantes, baseando-se na destruição total ou parcial dos microrganismos capazes de alterar o alimento, ou na modificação ou eliminação de um ou mais fatores (intrínseco ou extrínseco) que são essenciais para a sua multiplicação, de modo que o alimento não se torne propício ao desenvolvimento microbiano.

Um ambiente anaeróbio obtido com embalagem a vácuo ou com atmosfera modificada sem oxigênio pode retardar o crescimento de microrganismos aeróbios deterioradores e aumentar a durabilidade dos produtos por mais de um mês. Contudo, o pigmento da carne adquire uma coloração amarronzada que pode limitar sua aceitação no mercado, além de propiciar o crescimento de anaeróbios. Portanto, a opção de conservação de carnes em ambiente aeróbio e anaeróbio é um compromisso entre cor vermelha e vida útil, associada à deterioração microbiológica (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

2.2. Tipos de embalagens ativas

2.2.1. Sistemas absorvedores de oxigênio

Sendo o oxigênio utilizado para o crescimento de microrganismos aeróbios, além da ação nas reações de degradação de cor, alterações de aroma, sabor e perda de nutrientes, em muitas embalagens é adequada a supressão de oxigênio. A ação mais comum é a utilização de sistemas de retirada de ar, chamada “embalagem à vácuo”, com utilização de filmes barreira a gases. Estes sistemas têm boa eficiência, podendo reduzir o teor de oxigênio a 0,5 % (OLIVEIRA, 2004).

Em alimentos sensíveis ao oxigênio podem ser utilizados os absorvedores de oxigênio, que são substâncias incorporadas no material de embalagem ou na forma de *sachet*. A substância adicionada sofre oxidação pelo oxigênio, reduzindo a concentração de oxigênio a menos que 0,1 % no espaço livre (SUPPAKUL et al., 2003), sendo utilizados: sais de ferro, ácido ascórbico, pigmentos fotossensíveis, enzimas (glicose-oxidases e etanol

oxidase), ácidos graxos insaturados. A utilização de absorvedores de oxigênio é mais comum na forma de *sachet*, existindo diversos produtos disponíveis comercialmente, mas também podem ser incorporados através da oxidação da cadeia polimérica ou de grupos laterais, catalisada por sais metálicos, em geral a base de cobalto (OLIVEIRA, 2004).

Dentre os filmes disponíveis comercialmente, a Cry-o-Vac tem a linha OS-Films™, onde o filme capaz de ligar-se a oxigênio é composto de 90 % de terpolímero oxidável (etileno metacrilato ciclohexenil metil acrilato) e 10 % de catalisador metálico à base de sais de cobalto e fotoiniciador. Esta mistura é utilizada como camada interna em filmes flexíveis. Como o polímero tem capacidade limitada em absorver oxigênio residual interno da embalagem, é necessário que a camada externa do filme seja barreira ao oxigênio, como poliamida ou etileno vinil-álcool (EVOH) (BUTLER, 2002). A Crevron-Phillips Co. possui um filme com mesma composição, o OSP®, cujo mecanismo de ativação é através da aplicação de luz UV na linha de embalagem. Este filme tem sido aplicado a carnes, queijos e massas frescas e como não necessita de umidade para ativação, pode ser aplicado também a produtos secos como café, nozes ou misturas de panificação (MARKARIAN, 2004). Outro exemplo o filme o ShelfplusTMO₂®, da Ciba Chemicals, à base de sais ferrosos, é ativado por umidade, aplicado a produtos úmidos (OLIVEIRA, 2004). A empresa Wipak Walsrode desenvolveu um filme com barreira a oxigênio que é aplicado a tripas artificiais de produtos cárneos, o Combitherm O₂ Absorber®, sendo que a camada ativa de poliamida é interna a outras camadas plásticas, não entrando em contato com o alimento e é isolada do ambiente externo. A ativação ocorre na linha embalagem do produto e acredita-se que a retirada de oxigênio seja um pouco mais lenta, sendo necessário que este primeiro permeie a barreira interna passiva (OLIVEIRA, 2004).

2.2.2. Embalagens com absorvedores de umidade

Em alimentos sólidos embalados, a umidade pode aparecer por geração ou permeação através do material de embalagem, e pode provocar

alterações sensoriais ou deterioração, após condensação. Em alimentos nos quais ocorre exudação de água, como cortes de carne, frango e pescado, já são muito utilizadas as embalagens com material absorvente em camadas, como em bandejas de poliestireno expandido. Os polímeros mais utilizados são sais de poliacrilato e copolímeros de amido (ROONEY, 1995).

Absorvedores de umidade podem ter sua ação potencializada quando se combina seu poder de absorção de umidade com um agente antimicrobiano, como descrito em patente registrada por SOARES (2004), em que pesquisas demonstraram efetividade de *sachets* absorvedores de umidade antimicrobianos na inibição de microrganismos.

Alimentos desidratados ou secos, nos quais pequenas quantidades de vapor de água provocam alterações sensoriais, podem se beneficiar da adição de um *sachet* contendo agente dessecante (sílica gel, óxido de cálcio, silicatos de alumínio, potássio, sódio e cálcio, entre outros), como já usado em pipocas, batata chips, doces e condimentos.

Alimentos embalados que são expostos a variações de temperatura, nos quais ocorre condensação de umidade sobre a superfície do filme e redução da transparência, podem utilizar aditivo *antifog*, tendo como exemplos vinilon orientado biaxialmente e polietileno de alta densidade orientado em rolos de compressão (OZDEMIR e FLOROS, 2004), que reduz a tensão interfacial entre o condensado e o filme, contribuindo para a transparência e permitindo ao consumidor visualizar o produto, apesar de não afetar a quantidade de água presente no interior da embalagem.

2.2.3. Embalagens com liberação ou absorção de CO₂ e etanol

O dióxido de carbono em níveis de 60 % a 80 %, tem capacidade de inibir o crescimento microbiano em superfícies de alimentos e, assim, colabora para aumentar a vida-de-prateleira, ou então para reduzir o colapso da embalagem pela diminuição do volume gasoso em seu interior. A adição de substâncias geradoras de CO₂ em embalagens de alimentos pode ser efetuada na forma de *sachet* ou pela adição à estrutura do polímero plástico.

Como a permeabilidade de polímeros plásticos ao CO₂ é 3 a 5 vezes maior que ao O₂ em muitos plásticos, é necessário que o CO₂ seja gerado continuamente, para manter a concentração desejada no interior da embalagem (SUPPAKUL et al., 2003). Geradores de CO₂ podem ser aplicados em carne fresca, frango, pescado e embalagem de queijos, sendo que altas concentrações de CO₂ podem provocar alterações sensoriais em produtos e desenvolvimento de glicólise anaeróbica indesejável em frutas. Exemplo de gerador de CO₂ é a mistura seca de bicarbonato de sódio e ácido cítrico, que em contato com a umidade do alimento, reage e libera CO₂ no interior da embalagem (BRODY et al., 2001).

Alguns sistemas de embalagens ativas em que o CO₂ é indesejável, por sua formação em reações de respiração ou deterioração, causando estufamento da embalagem ou mesmo o seu estouro, o CO₂ pode ser retirado pela adição de sistema absorvedor, sendo comumente utilizado o hidróxido de cálcio, que em presença da umidade do produto reagem com CO₂, produzindo carbonato de cálcio.

O etanol tem capacidade de inibir crescimento microbiano, sendo usado para prevenir deterioração em alimentos de umidade intermediária como pães e outros produtos de panificação, queijos e pizza, através de spray na superfície antes da embalagem. O efeito de conservação também pode ser obtido pela inserção na embalagem de um *sachet* contendo etanol encapsulado ou usando filmes adicionados de gerador de etanol (SUPPAKUL et al., 2003).

Os primeiros *sachets* geradores de etanol foram constituídos de etanol grau alimentício encapsulado em pó inerte fino, sendo a taxa de liberação de etanol controlada pela permeabilidade do filme. Ao final do período de estocagem, o teor de álcool pode ser inaceitável para o consumidor, podendo ser evaporado por aquecimento antes do consumo do produto (SUPPAKUL et al., 2003). OZDEMIR e FLOROS (2004) indicam a possível adição de aromatizantes como baunilha ou outro, com objetivo de reduzir a percepção do odor de álcool na embalagem.

2.2.4. Embalagens com indicador de tempo-temperatura

Alimentos conservados sob refrigeração necessitam de controle da temperatura de estocagem, e beneficiam-se de sistemas que possam indicar quando o produto permaneceu por algum tempo em temperaturas diferentes das estabelecidas, que podem permitir o crescimento de microrganismos patogênicos, afetando a saúde do consumidor. Em sistemas de qualidade de produtos refrigerados, a manutenção da temperatura é um ponto crítico de controle (PCC) devendo ser monitorada. A aplicação de indicadores de tempo-temperatura (TTIs) sobre a embalagem, constitui um tipo de embalagem ativa que pode informar ao processador ou consumidor quando ocorreram desvios de temperatura de estocagem do produto alimentício.

A embalagem ativa com indicador de tempo-temperatura pode ser definida como um acessório de baixo custo, que pode mostrar de forma parcial ou completa o histórico de temperaturas as quais o produto foi exposto (TAOUKIS, e LABUZA, 2003). O princípio de operação de um TTI se dá através de alterações mecânicas, químicas, enzimáticas ou microbiológicas, que ocorrem de forma irreversíveis e visualizadas por deformação mecânica, desenvolvimento de cor específica ou movimentação de cor.

Existem basicamente três tipos de indicadores de tempo-temperatura, segundo TAOUKIS e LABUZA (2003):

- **Indicadores de temperatura crítica:** indicam a temperatura acima ou abaixo da temperatura de referência, sendo também chamado de indicador de temperatura de abuso. Indica basicamente que o produto foi exposto à temperatura indesejável, mas não indica o histórico. O tempo para fixar a alteração de cor do indicador pode demorar de minutos a horas, de acordo com o tipo de reação específica do indicador.
- **integradores de tempo-temperatura crítica:** a resposta que o indicador apresenta reflete a exposição cumulativa de tempo-temperatura acima a temperatura de referência, na qual o produto

foi exposto. É aplicado para indicar problemas de temperatura de conservação na distribuição e transporte de alimentos, nos quais reações importantes para a qualidade ou segurança se iniciam ou ocorrem a taxas específicas acima da temperatura crítica, tais como crescimento microbiano ou atividade enzimática, que são inibidas abaixo da temperatura crítica.

- **integradores ou indicadores de tempo-temperatura:** a resposta que o indicador apresenta é dependente do histórico das temperaturas as quais o produto foi exposto, indicando uma “média” de temperatura durante a distribuição, e possivelmente correlacionada à perda de qualidade dependente do desvio da temperatura de referência.

Os principais tipos de indicadores de tempo-temperatura em desenvolvimento e aplicação industrial são baseados em sistemas de difusão, enzimáticos e poliméricos. Estes indicadores, ao monitorar as temperaturas às quais os alimentos foram expostos durante a distribuição, podem servir como adequação a requisitos contratuais entre o produtor e distribuidor. Também podem ser utilizados como indicadores de final de vida-de-prateleira, em conjunto com a data de validade (TAOUKIS e LABUZA, 2003). Como exemplos de indicadores de tempo-temperatura, já em uso comercial, pode-se citar o *3M Monitor Mark*[®], que consiste em um sistema de difusão, onde um éster impregnado de pigmento azul difunde-se em uma faixa clara do dispositivo, quando a temperatura é maior que a de fusão do éster. Um exemplo de indicador enzimático, o *Vitasab*[®], constituído de dois pequenos compartimentos plásticos, um contendo uma lipase pancreática e o outro o substrato lipídico como tributirina ou outro, adicionado de indicador de pH. A ativação ocorre pelo rompimento entre os compartimentos e por ação enzimática relacionada à temperatura, a cor é alterada de verde a amarelo, sendo a mudança de cor causada pelo decréscimo de pH, que resulta da hidrólise enzimática controlada. Os indicadores de temperatura *Fresch-Chek*[®] e *Lifelines Freshness Monitor*[®], são baseados na propriedade do polímero, onde os cristais de diacetileno

polimerizam em estado sólido, resultando em polímero colorido. A mudança de cor de amarelo ou vermelho para uma cor escura, é indicativa da reação. Como o indicador é ativo desde a produção, deve ser estocado congelado, em temperatura na qual a alteração de cor é muito lenta.

2.2.5. Embalagens com sistemas de aquecimento ou resfriamento

Alguns tipos de bebidas são habitualmente consumidos em temperatura diferente da ambiente, gelados ou quentes, como no caso de refrigerantes, cervejas, chás e cafés. Em embalagens metálicas, é possível adicionar dispositivos com a função de aquecer ou resfriar, o que possibilita a venda em máquinas automáticas (vending machines) e maior conveniência para o consumidor em viagens e acampamentos.

Um exemplo de embalagem com capacidade de se auto-resfriar é a *IC Can*, da TEMPRATECH (2006), com capacidade de reduzir a temperatura do conteúdo líquido em 16 °C, em três minutos. A embalagem metálica é construída em duas partes, existindo um dispositivo que funciona como um “evaporador” e fica no interior do alimento líquido. Este dispositivo contém uma camada de gel selado sob vácuo em sua superfície, e uma parte absorvedora, com agente secante de argila. Para ativar, a lata é torcida, colocando em contato as duas partes, ocorrendo vaporização da água e retirada de calor, sendo a umidade logo absorvida pelo agente secante, assim a bebida resfria e o absorvedor aquece.

Embalagens com sistemas de auto-aquecimento têm aplicação em bebidas quentes e produtos com alto conteúdo de líquidos, como sopas. As embalagens com dispositivo de auto-aquecimento podem ser metálicas ou flexíveis, onde o dispositivo de aquecimento consta, em sua forma mais simples, de câmara ou *sachet* contendo óxido de cálcio seco, incluído em outra câmara com água. Ao se romper o *sachet* com óxido de cálcio permitindo o contato com a água, ocorre uma reação exotérmica cujo calor liberado aquece o produto. Um exemplo deste tipo de embalagem é a desenvolvida pela “On Tech”, usada para café pronto para o consumo, cuja

embalagem permite o aquecimento do líquido a 64°C em 8 minutos (SONOCO, 2006).

2.3. Embalagens Antimicrobianas

Embalagens antimicrobianas são preparadas com a incorporação de substâncias antimicrobianas ao polímero, ou com uso de materiais poliméricos antimicrobianos. De acordo com HAN (2002), os sistemas de

antimicrobiano; (3) as características físico-químicas do alimento; (4) a fisiologia do microrganismo alvo e a microflora do alimento; (5) a cinética de migração do agente antimicrobiano ao alimento; (6) o ambiente e temperatura de estocagem; (7) o processo de fabricação do filme ou container; (8) a toxicidade e aspectos regulatórios; (9) as propriedades sensoriais do agente antimicrobiano; e (10) a adequação ao processo da embalagem antimicrobiana.

A substância antimicrobiana pode ser incorporada no sistema de embalagem através da simples mistura com o material de embalagem, imobilização ou recobrimento, dependendo das características do sistema de embalagem, agente antimicrobiano e alimento. De acordo com HAN (2003), a função antimicrobiana pode ser obtida por três formas: por migração, por difusão ou por evaporação do agente antimicrobiano ao alimento ou espaço livre; a absorção de um ou mais fatores essenciais ao crescimento do microrganismo, como o caso de absorvedores de oxigênio, que previne o crescimento de bolores; e na forma de imobilização, em que o agente antimicrobiano não migra para o alimento, mas impede o crescimento de microrganismos na superfície de contato.

O controle da taxa de migração do antimicrobiano da embalagem para o alimento é importante, deve ser capaz de controlar o crescimento microbiano e manter a concentração do antimicrobiano acima da concentração inibitória mínima (BRODY et al., 2001). Em determinados casos é necessário que a embalagem tenha um mecanismo de ativação ao entrar em contato com o alimento, para evitar perda durante o transporte e estocagem das embalagens antes do uso, e maximizar a eficiência (YAMADA, 2004). Como exemplo do mecanismo de ativação pode-se citar o teor de água do alimento que, ao umedecer a embalagem ativa, solubiliza e permite a migração do agente antimicrobiano para a superfície de contato embalagem-alimento.

2.3.1. Tipos de substâncias antimicrobianas utilizadas

As substâncias antimicrobianas que podem ser incorporados aos materiais de embalagem são os aditivos de grau alimentício, as substâncias naturais presentes em alimentos, os produtos de biotecnologia, os polímeros antimicrobianos ou outros que tenham autorização de uso. O Quadro 1 apresenta várias substâncias que podem ser utilizadas em embalagens antimicrobianas, de acordo com YAMADA (2004). Pesquisas necessitam ser conduzidas para as diferentes aplicações em alimentos, a fim de se avaliar a potencialidade tecnológica, econômica e, principalmente, de segurança dos alimentos (SOARES et al., 2004). Diversas pesquisas já foram efetuadas com substâncias, como anidrido benzóico em polietileno de baixa densidade (WENG e HOTCHKISS, 1993), quitosana em polivinilacetato (CHO et al., 2000), extrato de sementes de “grapefruit” em polietileno de baixa densidade (LEE et al., 1998), extrato de própolis em polietileno de baixa densidade (HONG et al., 1998).

Considerando que os alimentos possuem diferentes características químicas e biológicas, tais como pH, atividade de água, fontes de carbono e nitrogênio, pressão parcial de oxigênio e temperatura, alimentos diferentes oferecem condições ambientais distintas para microrganismos e aos agentes antimicrobianos (BRODY et al., 2001). Por exemplo, o pH do alimento altera a ionização da maioria das substâncias químicas ativas, afetando a atividade antimicrobiana e a taxa de crescimento; a atividade de água afeta a atividade antimicrobiana e a estabilidade química de substâncias incorporadas, entre outras características.

Entre as substâncias antimicrobianas, as de maior potencial parecem ser aquelas contendo sais de prata, segundo BRODY et al. (2001), capazes de liberar íons do metal. Íons de cobre também podem destruir microrganismos, mas são considerados tóxicos quando em contato com alimentos, além de serem catalisadores de reações de oxidação, podendo acelerar outras reações de degradação (OLIVEIRA, 2004). A prata não produz íons tão facilmente quanto o cobre, mas é considerada segura e relativamente inerte,

sendo utilizada como agente antimicrobiano na indústria farmacêutica e em tratamento de água.

Classe	Exemplos
Ácido orgânico	Ácidos acético, benzóico, láctico cítrico, málico, propiônico, sórbico, succínico, tartárico
Sal de ácido	Sorbato de potássio, benzoato de sódio
Anidrido ácido	Anidrido sórbico, anidrido benzóico
Ácido para benzóico	Propil parabeno, metil parabeno, etil parabeno
Álcool	Etanol
Bacteriocinas	Nisina, pediocina, subtilina, lacticina
Ácidos graxos	Ácido láurico, ácido palmitoléico
Éster de ácido graxo	Glicerol mono laurato
Agente quelante	EDTA, citrato, lactoferrina
Enzima	Lizozima, glicose oxidase, lactoperoxidase
Metal	Prata, cobre
Antioxidante	Butil hidróxi anisol, butil hidróxi tolueno, terc-butil hidróxi quinona, sais de ferro
Antibiótico	Natamicina
Fungicida	Benomil, imazalil, dióxido de enxofre
Sanitizante	Ozônio, dióxido de cloro
Polissacarídeo	Quitosana
Fenólicos	Catequina, cresol, hidroquinona
Óleos voláteis de plantas	Alil isotiocianato, cinamaldeído, eugenol, linalool, terpineol, timol, carvacrol

Quadro 1. Exemplos de agentes antimicrobianos (YAMADA, 2004)

Agentes antimicrobianos constituídos de zeólito sintético (cristais de alumino-silicatos com sódio, potássio, magnésio ou cálcio) tendo parte do sódio substituída por íons prata (Ag-zeólito) são utilizados em materiais plásticos, tendo ação contra grande variedade de bactérias, fungos e leveduras, por meio da alteração de seus metabolismos, mas sem demonstrar efetividade contra esporos de bactérias resistentes ao calor. O íon prata é primeiro adsorvido pela superfície da célula microbiana e incorporado em seu interior por transporte ativo, inibindo enzimas metabólicas e demonstrando ação antimicrobiana. Como os íons prata

reagem com proteínas, após sua incorporação pela célula podem reagir com muitas proteases, inibindo processos metabólicos da célula (BRODY et al., 2001).

Diferentes tipos de embalagens antimicrobianas com Ag-zeólito, em teores de 1 % a 3 %, foram testados, sendo o polímero antimicrobiano laminado em fina camada interna à embalagem, devido ao alto custo do Ag-zeólito (BRODY et al., 2001). De acordo com o tipo de aminoácido envolvido na eluição da prata, a influência na ação antimicrobiana pode variar. A glicina estimula a eluição do Ag^+ e não interfere na ação antimicrobiana; com lisina, a eluição e interação com o íon prata são relativamente fortes e, portanto, a atividade antimicrobiana é reduzida; Em presença de cisteína, a eluição e associação com o íon prata são fortes e, portanto, a atividade antimicrobiana é inibida (BRODY et al., 2001).

O triclosan (2,4,4'-triclouro-2'-hidroxidifenil-éter) (Figura 3), vem sendo utilizado há tempos em cosméticos, sabonetes, pasta de dente e, nos últimos anos, em tábuas e cabos de facas para corte de carnes e alimentos em geral. Sua ação antimicrobiana explica-se por ser capaz de bloquear a síntese de ácidos graxos por meio de inibição enzimática, inibindo o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, bolores e leveduras. Estudos recentes têm indicado que o mecanismo de ação do triclosan sobre os microrganismos é baseado na inibição competitiva do enoil-acil transportador da proteína redutase, um componente na via de biossíntese de lipídeos (VERMEREIN et al., 2002a).

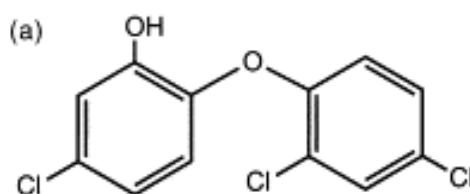


Figura 3. Estrutura molecular do triclosan (2,4,4'-triclouro-2'-hidroxidifenil-eter).

O triclosan pode ser incorporado a diversos polímeros, sendo necessária sua migração para a ocorrência da atividade antimicrobiana. De acordo com VERMEIREN et al. (2002b), componentes gordurosos presentes no alimento, além da baixa temperatura, podem interferir reduzindo a atividade antimicrobiana do triclosan. Esse produto foi recentemente aprovado pelo FDA e pelo Scientific Committee for Food (SCF, 2000), da Comunidade Européia, para uso em polímeros de contato com alimentos, sendo o limite máximo de migração para o alimento de 5 mg.Kg⁻¹.

Compostos a base de triclosan são comercialmente disponíveis como Microban®, Sanitized® e Ultra-fresh® e são amplamente incorporados em polímeros para fabricação de escova de dente, tábuas de carne, cabo de facas para uso industrial, bem como, em produtos hospitalares tais como, luvas, aventais cirúrgicos (SILVA, et al., 2005). VERMEREIN et al. (2002a) indicaram que polietileno adicionado de 0,5 % e 1 % de triclosan exibe atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Brochotrix thermosphacta* em teste de halo. Entretanto não foi efetivo em reduzir deterioradores e *L. monocytogenes* em peito de frango embalado a vácuo e estocado a 7 °C. BAFFA JÚNIOR et al. (2005) conduziram pesquisas para determinar a migração do antimicrobiano triclosan em caixas plásticas, com uso de água como simulante, tendo como resultado a migração de 0,012 % a 0,016 % do antimicrobiano adicionado, indicando também ser efetivos no controle de microrganismos.

O ácido láctico e seu sal (lactato de sódio), também apresentam ação antimicrobiana, sendo que estudos indicam que este interfere no metabolismo das bactérias, seja pela acidificação intracelular, ou por interferir na troca de prótons através da membrana celular, além de reduzir a atividade de água. Estes mecanismos de ação indicam que o lactato tem efeito bacteriostático e não bactericida, incrementando a fase *lag* do crescimento de microrganismos, e desta forma aumenta a vida-de-prateleira de produtos nos quais o lactato é utilizado. A eficácia do lactato aumenta com o aumento da concentração, e uma vantagem de sua aplicação em

carnes e produtos derivados se deve ao fato de que tanto microrganismos deterioradores como patogênicos, encontrados nestes produtos, são relativamente sensíveis ao lactato, mesmo aqueles mais tolerantes ao sal. O valor de pKa do ácido láctico, 3,86, indica uma maior efetividade em produtos com maior acidez, pois sua ação ocorre possivelmente pela maior capacidade do ácido láctico em penetrar na célula na forma não-dissociada, dissociar-se e acidificar o seu interior. A bactéria sobrevive, mantendo o pH normal através de um mecanismo que consome energia e, sendo esta energia indisponível para a reprodução, a velocidade é reduzida (WILMINK, 2001).

A adição direta de agentes ácidos, tais como o propiônico, benzóico e sórbico em polímeros como polietileno, tem pouco sucesso devido à diferença de polaridade entre o ácido e o filme que é não-polar. O processo desenvolvido por WENG e HOTCHKISS (1993) apresentou como solução a formação de anidrido do ácido, removendo a função ionizada e reduzindo a sua polaridade. Após a embalagem do produto e em contato com a umidade deste, ocorre hidrólise do anidrido, liberando o ácido e a seqüente migração para a superfície do alimento.

Substâncias antimicrobianas de ocorrência natural também podem ser aplicadas a materiais de embalagem para inibir crescimento microbiano em produtos cárneos. São exemplos as substâncias antimicrobianas originárias de extratos e condimentos, tais como canela, cravo, tomilho, rosmaryno, orégano, alho, mostarda, entre outros, e substâncias derivadas de microrganismos, como as bacteriocinas, destacando-se a nisina, pediocinas, natamicina, enterocinas e outras. As bacteriocinas são produzidas por diferentes linhagens de bactérias ácido-láticas, com ação normalmente direcionada a controle de patógenos. A nisina é uma proteína hidrossolúvel produzida por bactérias lácticas, com ação específica contra bactérias gram-positivas, inclusive formadoras de esporos, mas ineficiente contra gram-negativas e fungos (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004). A nisina é considerada pouco eficiente para conservação de carnes em presença de espécies psicrotróficas gram-negativas, como *Pseudomonas* spp. Estudos

comprovaram a eficiência da nisina em combinação com agente quelante, sobre *Listeria monocytogenes*, em alguns tipos de carnes processadas, e sobre bactérias lácticas e aeróbios totais em presunto cozido e queijo fatiado acondicionados em atmosfera modificada (BRODY et al., 2001).

O dióxido de cloro (ClO₂) é conhecido em indústrias de alimentos como um antimicrobiano de largo espectro, não formando trihalometanos ou dioxinas, e utilizado em filmes antimicrobianos, sendo comercialmente encontrado sob nome “Microatmosphère™”. Este filme é capaz de liberar quantidades controladas e constantes de dióxido de cloro. A geração do antimicrobiano no interior da embalagem é ativada pelas condições do produto, normalmente umidade (BRODY et al., 2001), e a quantidade e duração podem ser moduladas para eliminar diversos tipos de microrganismos, inclusive esporos de bolores. Testes indicaram ser efetivo para destruir *Escherichia coli* em produtos de carne moída.

2.3.2. Aplicação de antimicrobianos por recobrimento

A aplicação de coberturas como pré-embalagem ou como cobertura comestível, adicionada de agentes antimicrobianos, proporciona uma barreira adicional que auxilia a manutenção da qualidade e segurança em alimentos. Um sistema com recobrimento comestível tem vários benefícios devido ao fato de ser comestível, ser biodegradável e por sua simplicidade no manuseio, podendo ser aplicada a seco ou com cobertura úmida (HAN, 2003).

Na América do Norte vários produtos cárneos são comercializados temperados com mistura de condimentos naturais e firmemente embrulhados com película plástica dentro de uma embalagem tipo bandeja. Os condimentos são utilizados não somente para temperar, mas também pela atividade antimicrobiana, sendo que os consumidores não relutam em adquirir estes produtos, pois o recobrimento antimicrobiano é aceitável, amigável e fácil de usar, sem nenhuma consideração especial pelos consumidores. Estes produtos não reivindicam função antimicrobiana na

embalagem nem seguem qualquer legislação para embalagem antimicrobiana (YAMADA, 2004).

Em alguns casos, a aplicação de um spray de recobrimento sobre o filme, na forma de spray, como no caso de dióxido de cloro (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004), é uma forma de fácil aplicação e evita que as condições de processo de fabricação do filme reduzam a ação antimicrobiana. Em testes efetuados por Cooksey (2000) citado por SUPPAKUL et al. (2003), polietileno de baixa densidade foi recoberto com nisina, utilizando metil celulose/hidroxipropil celulose como veículo. O filme recoberto com nisina foi efetivo em suprimir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. COOKSEY (2005) efetuou testes com salsichas inoculadas superficialmente com *Listeria monocytogenes* e embaladas com filmes de polietileno recoberto com solução celulósica contendo nisina, embalado a vácuo e estocada em refrigeração, e obteve redução em até 2 ciclos log para os filmes recobertos com camada de 500 µm com solução contendo nisina em teores de 7500 UI.mL⁻¹.

2.3.3. Incorporação de antimicrobiano em polímeros plásticos

Sistemas de embalagens ativas, com ação antimicrobiana, baseiam-se na incorporação de substâncias antimicrobianas no polímero, e atuam sobre o alimento sob uma das duas formas: o antimicrobiano é imobilizado, e atua apenas na superfície de contato, ou quando o material ativo é colocado em contato com a umidade do alimento, o antimicrobiano é liberado e atua sobre o mesmo. Em ambos os casos, o objetivo do sistema é aumentar a vida-de-prateleira do alimento inibindo o crescimento microbiano e conservando suas propriedades sensoriais (BUONOCORE, 2005).

A incorporação de um antimicrobiano em material de embalagem necessita de avaliação adequada do controle de migração para a superfície do alimento e da cinética de crescimento do microrganismo alvo. Quando a taxa de migração do antimicrobiano é maior do que a taxa de crescimento do microrganismo, a concentração de antimicrobiano será inferior à

concentração inibitória mínima (MIC) antes do término do período de estocagem esperado, conseqüentemente o microrganismo irá crescer após a redução do agente antimicrobiano (HAN, 2003). Por outro lado, quando a taxa de migração for muito lenta, o microrganismo crescerá antes da migração do antimicrobiano. A concentração de agente antimicrobiano na superfície do alimento depende da taxa de migração, e é altamente dependente da solubilidade do antimicrobiano no alimento. O perfil de migração do agente antimicrobiano deve ser conhecido e possível de controlar para se obter ação antimicrobiana constante e acima da MIC durante toda a vida-de-prateleira do alimento (HAN, 2003).

A grande maioria dos trabalhos desenvolvidos em filmes antimicrobianos considera a estrutura monocamada, ou que a camada interna, em contato com o produto, tem ação antimicrobiana, sendo que a camada externa deve ter ação de barreira e estrutura. BUONOCORE (2005) comenta sobre a importância em se ampliarem estudos com filmes multicamadas, como: 1ª camada, externa, previne a perda de substância ativa para o ambiente e atua como barreira ao oxigênio, umidade e gases; 2ª camada, intermediária, contendo a substância antimicrobiana e com migração rápida; 3ª camada, interna e em contato com o alimento, com a função de controlar a migração do agente antimicrobiano para a superfície do alimento, sendo preparada em termos de difusibilidade e espessura para controlar o crescimento do microrganismo alvo.

2.3.4. Imobilização de antimicrobiano em polímeros

Alguns polímeros possuem atividade biológica sem permitir a migração de compostos para o alimento, podendo ter a ação de forma natural, como no caso de quitosana, ou formada pela ligação de molécula bioativa ao polímero sintético. A imobilização de substância antimicrobiana em polímeros pode ser efetuada por ligação covalente, adequada para os casos em que a legislação não permite migração do antimicrobiano para o alimento, devendo a inibição acontecer na superfície de contato da embalagem – produto alimentício.

A quitosana é um polímero com propriedades antimicrobianas, derivada da quitina (poli- β -(1-4)-N-acetil-D-glicosamina), extraída de casca de crustáceos. O mecanismo de ação antimicrobiana, ainda está em estudos, e se dá pela ruptura da membrana externa de bactérias (Helander et al. 2001, citado por STEVEN e HOTCHKISS, 2003), ou ainda, em indicações recentes, de que a atividade é devida à adsorção da bactéria (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002). Uma vez que a molécula polimérica é grande, não é adequado considerar ser necessário que a molécula penetre na célula para que ocorra a ação antimicrobiana.

Materiais poliméricos com agente bioativo imobilizado podem necessitar inicialmente da criação de grupos reativos como sites para ligação, devendo ser direcionada a desenvolver maior quantidade possível de pontos para ligação e imobilização do antimicrobiano (STEVEN e HOTCHKISS, 2003). Como na imobilização o agente ativo não está disponível para migrar do polímero para a superfície do substrato, as aplicações são limitadas, sendo de interesse principalmente na aplicação de superfícies de equipamentos para contato com alimentos. Um dos métodos para ligar agentes bioativos a polímeros é com uso do glutaraldeído, o qual é eficiente na formação de ligações cruzadas entre proteínas ou outras moléculas biológicas a polímeros, tendo como exemplo a imobilização da enzima naringinase (SOARES, 1998). Também são usados métodos com carboimidás e ésteres ativos de succinimidil succinato (STEVEN e HOTCHKISS, 2003).

Por aplicação de nanotecnologia, desenvolvimentos estão sendo efetuados com substâncias fotocatalisadoras, às quais em presença de luz, removem sujeira, odor ou moléculas orgânicas que entram em contato com a superfície na qual o fotocatalisador está aprisionado. Quando o fotocatalisador é irradiado com luz ultravioleta, radicais livres altamente reativos de oxigênio são gerados em áreas próximas, levando à decomposição de moléculas orgânicas (BRODY et al., 2001), e assim, também têm ação antimicrobiana. Óxidos de zinco, de chumbo e sais de prata têm propriedades fotocatalisadoras, mas o material mais promissor é o dióxido de titânio, já utilizado em pinturas, cosméticos e alimentos. Ainda

que o composto seja normalmente branco, quando reduzido a pó fino torna-se transparente.

Uma das dificuldades com o uso de fotocatalisadores parte do fato que plásticos são materiais orgânicos, e podem degradar na presença de um fotocatalisador. Para evitar este problema, já foi desenvolvido pela Yamamura Glass (Japão), um dióxido de titânio em microcápsulas de óxido de silício, sendo que apenas moléculas pequenas o suficiente para penetrar nos nanoporos da microcápsula são destruídos. Segundo BRODY et al. (2001), também no Japão, foi desenvolvido material de dióxido de titânio envolvido com apatita ($\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$), sendo esta uma cerâmica com capacidade para absorver proteínas e bactérias. O sistema não migra para a superfície do alimento nem atrai bactérias, portanto atua somente contra moléculas orgânicas as quais entra em contato direto.

2.3.5. Modificação de superfície

Em embalagens antimicrobianas é de grande interesse o desenvolvimento de materiais através de ação física sobre a superfície de filmes. PAIK et al. (1998) efetuaram estudos com uso de irradiação ultravioleta (UV) sobre filmes de poliamida (nylon 6,6), provocando a transformação de grupo amida do filme em aminas, atuando estes grupos como sítios de superfície com ação antimicrobiana. Adicionalmente, observaram que o tratamento UV provocou uma alteração na topografia superficial, o que leva a um aumento da área de contato embalagem/produto, não estando comprovado que este aumento leva a uma maior atividade antimicrobiana. O filme foi testado contra *Staphylococcus aureus*, obtendo três reduções decimais após 6 horas, partindo de concentração inicial de 8×10^3 UFC.mL⁻¹. O filme foi menos efetivo contra *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas fluorescens*. Segundo PAIK et al. (1998), o filme foi irradiado com fótons de luz UV em comprimento de onda de 193 nm, com irradiação de aproximadamente 200 kW.cm⁻² por 16 nanosegundos, com dosagem total de 2,7 J.cm⁻².

CHO et al. (2000) sintetizaram um polímero contendo cadeia lateral com quitosana-oligossacarídeo, introduzido em polivinilacetato (PVA) por ligações cruzadas com o composto bifuncional N-metilacrilamida (NMA). Observaram que o crescimento de *S. aureus* foi quase completamente suprimido desta maneira.

2.3.6. Fatores a considerar na fabricação de filmes antimicrobianos

Entre os processos de fabricação de filmes são utilizados os processos de extrusão e “casting” por solventes. A manutenção da ação antimicrobiana, a homogeneidade na distribuição, compatibilidade química, integridade, propriedades físico-mecânicas e óticas do filme devem ser consideradas. Estudos morfológicos dos polímeros são importantes para prever a perda de integridade causada pela adição do agente antimicrobiano. Segundo HAN (2003), antimicrobianos na forma de pequenas partículas podem ser misturados ao material polimérico e posicionados em regiões amorfas da estrutura; se grandes quantidades forem usadas, após saturação dos espaços amorfos a substância começa a interferir nas interações polímero-polímero na região cristalina, reduzindo a integridade do material de embalagem.

A incorporação de aditivos antimicrobianos em filmes plásticos durante a extrusão depende da estabilidade térmica dos aditivos e da não-volatilidade nas condições do processo, e ainda, da pressão e da força de cisalhamento a que são submetidos durante a extrusão (BRODY et al., 2001). Além disso, a polaridade e o peso molecular do aditivo são parâmetros que devem ser considerados na interação com a matriz polimérica e, posteriormente, na liberação do aditivo para o produto alimentício.

A atividade antimicrobiana de uma substância ativa incorporada a um polímero pode ser reduzida em decorrência das condições de processo de fabricação do filme, como “casting”, conversão ou extrusão, além das condições de estocagem e distribuição do material de embalagem. O processo de extrusão é o maior fator de perda de atividade antimicrobiana.

Devido às condições de alta temperatura, tensão de cisalhamento e pressão, a estabilidade química ou bioquímica é afetada, reduzindo a atividade antimicrobiana residual (BRODY et al., 2001, HAN e FLOROS, 1999). Os efeitos das operações de conversão, como laminação, impressão, adesivos, solventes, secagem e estocagem, também devem ser considerados.

Para a produção de filmes, os agentes antimicrobianos e materiais de embalagem devem ser quimicamente compatíveis, sendo recomendado o uso de solventes como água ou etanol para homogeneização. Outros solventes devem considerar a possibilidade de migração de resíduos para o alimento. O material usado na obtenção da embalagem antimicrobiana também deve manter inalteradas as propriedades físicas como resistência à tração, alongamento, selagem a quente, bem como outras propriedades mecânicas e óticas (YAMADA, 2004). Geralmente quando pequenos compostos químicos antimicrobianos são misturados a materiais macromoleculares de embalagem, as propriedades mecânicas não são alteradas significativamente, sendo as propriedades óticas (cor, transparência e brilho) as mais afetadas.

HAN (2002) sugeriu que a produção de filmes por extrusão tenha processo onde a resina plástica é misturada com o agente microbiano, extrusada e peletizada para produzir uma resina “masterbatch”. Estes *pellets* são adicionados em outra extrusora juntamente com resina plástica pura, produzindo o filme com o antimicrobiano incorporado. Neste processo é esperado manter uma distribuição uniforme da concentração da substância ativa e uma taxa de migração uniforme. O processo de fabricação também pode ser modificado para obter propriedades de liberação controlada dos agentes antimicrobianos, através da modificação da estrutura morfológica do polímero. LACOSTE et al. (2005) descreveram um sistema de mistura de polímeros após a extrusão, cujo objetivo foi modificar a estrutura morfológica com relação à cristalinidade e porosidade, para associar uma liberação inicial intensa de antimicrobiano, com adição lenta ao passar do tempo, mantendo sempre uma concentração inibitória mínima, ampliando as características de segurança e qualidade.

2.4. Métodos de avaliação de ação antimicrobiana

Para o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas, é necessário dispor de métodos de avaliação destas embalagens com relação à eficácia em reduzir a contagem microbiana de alimentos, ou de forma indireta, avaliar a capacidade da embalagem ativa em limitar o crescimento do microrganismo alvo.

A atividade antimicrobiana dos materiais de embalagem pode ser avaliada por experimentos microbiológicos, através da inoculação dos microrganismos alvos na superfície do alimento, em contato com o material antimicrobiano e com a devida estocagem. A contagem dos microrganismos a intervalos determinados, possibilita avaliar se houve crescimento de microrganismos ou se o material foi eficiente em inibir crescimento ou provocar redução da contagem do microrganismo inoculado. Comparam-se os resultados com amostra controle, inoculada e embalada com filme sem substância antimicrobiana (BRODY et al., 2001). Experimentos microbiológicos podem ser desenvolvidos para avaliar a ação antimicrobiana, destacando-se entre os mais usados o método de difusão em disco (halo de inibição) e influência na curva de crescimento em meio líquido. No Japão é utilizado o método SIAA-1998 como padrão para avaliar a eficiência de produtos contendo antimicrobianos e inicialmente desenvolvido para antimicrobianos inorgânicos como zeólitos de prata (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002).

Em conjunto com os experimentos microbiológicos, para comparar a atividade antimicrobiana dos diferentes sistemas, é importante determinar a espessura do material de embalagem, a quantidade (concentração) de antimicrobiano incorporado no material e a taxa de migração do antimicrobiano para o alimento.

2.4.1. Atividade antimicrobiana pelo método de disco e halo de inibição

O método de avaliação antimicrobiana por difusão em disco é derivado do método de avaliação de antibióticos, onde um meio sólido é inoculado com o microrganismo alvo e, imediatamente após, é aplicado o filme antimicrobiano sobre a superfície do meio de cultura seguido de incubação na temperatura adequada ao crescimento do microrganismo. Após incubação, como resultado positivo para ação antimicrobiana observa-se a formação de halo de inibição do crescimento ao redor do filme, anota-se a medida em milímetros e compara-se o resultado com filmes sem adição de antimicrobiano. (LIMJAROEN et al., 2003; SILVA, 2003; WURLITZER et al., 2005). Este método destaca-se pela facilidade e baixo custo de execução. VARTIAINEN et al. (2003) indicam o Standard EN 1104 “Papel e cartão intencionalmente em contato com alimentos – determinação da transferência de constituintes antimicrobianos”, também conhecido como “Teste de difusão de Kirby-Bauer”. Este teste de suscetibilidade antimicrobiana mede a capacidade de um antibiótico ou outro agente antimicrobiano em inibir crescimento de bactérias *in vitro* (WHO, 2006).

2.4.2. Atividade antimicrobiana através da curva de crescimento

A ação antimicrobiana de um filme pode ser observada pela alteração das características da curva de crescimento em meio líquido, sendo comparada à curva controle, sem ação do filme antimicrobiano. A curva de crescimento é obtida pela turvação do meio de crescimento, sendo a medida de densidade ótica efetuada em espectrofotômetro e plotada através da conversão logarítmica da absorbância em 640 nm versus tempo de crescimento (MELO et al., 2003).

A atividade antimicrobiana pode ser evidenciada pelo aumento da fase lag, redução da taxa de crescimento (μ) na fase exponencial e total de crescimento na fase estacionária, em comparação com a embalagem convencional ou sem embalagem. A taxa de crescimento é obtida da inclinação da reta referente ao período de crescimento exponencial, e

regressão linear fornece o valor de inclinação (HAN e FLOROS, 1998; HAN, 2000). O tempo de fase lag e valor máximo de crescimento na fase estacionária são facilmente obtidos diretamente da curva de crescimento.

Embalagens com ação antimicrobiana apresentam redução na taxa de crescimento e menor população microbiana na fase estacionária, indicando maior segurança, e a extensão da fase lag indica maior vida-de-prateleira (BRODY et al., 2001).

2.5. Legislação para embalagens ativas

O uso de agentes antimicrobianos como aditivos em embalagens para contato com alimentos deve seguir as recomendações e aprovação de agências reguladoras. Assim, o uso de substâncias já autorizadas para contato com alimentos, aditivos grau alimentício e o uso de antimicrobianos naturais, como extratos de plantas ou condimentos, é alternativa promissora devido a seu apelo de produto natural, preferência pelo consumidor e menos conflitos com as legislações (YAMADA, 2004). O agente antimicrobiano deve ser classificado como um aditivo de embalagem, substância de contato com alimentos ou como ingrediente ou aditivo de alimentos (HAN, 2003).

A legislação brasileira não se pronuncia com relação às embalagens ativas, devendo ser considerados em conjunto a lista de aditivos aplicados a alimentos, a legislação de materiais de embalagem e migração de substâncias, e a legislação de contaminantes químicos. Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) está conduzindo reuniões com equipe de especialistas em embalagens para definir o posicionamento legal com relação a embalagens ativas. De forma geral, qualquer aditivo conservante aprovado para uso em alimento, também pode ser utilizado em embalagens ativas.

De acordo com SUPPAKUL et al. (2003), diversas substâncias receberam autorização de uso do FDA (Food and Drug Administration), dos Estados Unidos, para uso em embalagens ativas e contato com alimentos. Na Comunidade Européia, até 2004 a Diretiva 89/109/EEC, que trata da

legislação de embalagens de alimentos, estabelecia o limite de migração total de substâncias de embalagens, de 60 mg.kg^{-1} , e era impeditivo para embalagens ativas, já que é planejada a migração da substância adicionada ao material de embalagem para o alimento (FABECH, et al. 2000). No período de 1999 a 2001, na União Européia foi realizado o estudo “Actipak”, sobre utilização de embalagens ativas e necessidades de modificação da legislação, resultando no Regulamento CE 1935/2004, do Parlamento Europeu (2004), o qual relaciona a utilização de embalagens ativas, admite a migração de substâncias de embalagens e regulamenta o registro destas substâncias e indica a rotulagem específica. Todos os novos sistemas de embalagens ativas e inteligentes necessitam avaliação da Autoridade Européia de Segurança dos Alimentos (JONG et al., 2005).

Embalagens ativas têm um grande futuro na tecnologia de alimentos, entretanto mais informações são necessárias sobre os efeitos químicos, microbiológicos e fisiológicos destes sistemas na embalagem de alimentos, especialmente sobre a qualidade nutricional e segurança aos consumidores (HAN e FLOROS, 1997). Para aprovar a utilização de novas substâncias, antes do seu uso são necessários os testes toxicológicos e outros aplicáveis (VERMEIREN et al., 2002b).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV, e parte das análises e produção de filmes nos laboratórios do SENAI /RJ – Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas e no Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Produção dos filmes antimicrobianos

Os materiais usados na preparação dos filmes antimicrobianos, foram o polímero poli(cloreto de vinilideno), conhecido pela sigla PVdC, (SGA-1, da Solvay Indupa), e os agentes antimicrobianos triclosan (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter), (marca Microban), e ácido sórbico (Vetec), adequados para aplicação em materiais para contato com alimentos. Utilizou-se a metodologia sugerida por SOARES et al. (1998), aplicada a filmes de base celulósica (LIMJAROEN et al., 2003), conhecido como método “cast”, sendo o PVdC solubilizado no solvente metiletilcetona, com agitação manual até a completa dissolução, e então adicionado de quantidade determinada de antimicrobiano, com agitação manual e tempo de mistura variando de 10 minutos a uma hora, dependendo do tipo de antimicrobiano adicionado. As proporções de antimicrobianos relativas à massa de PVdC foram de 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % e 5 % de triclosan. Um dos filmes foi adicionado de 1 % de triclosan e 2 % de ácido sórbico. Após homogeneização do antimicrobiano e solução de polímero, a mistura foi espalhada em vidro plano para dar formato de filme e para a evaporação do solvente, em temperatura ambiente, até cura completa. Os filmes foram retirados da placa de vidro e preparados para os testes específicos.

Os filmes preparados foram visualizados em microscópio Leica DM LB2, e efetuada foto digital, em aumento de 100x, observando-se a as

características de mistura do antimicrobiano com o polímero PVdC, como transparência, cristalização e resistência.

Após análises preliminares dos filmes por fotomicroscopia, propriedades mecânicas e de atividade antimicrobiana, foram selecionados os seguintes filmes para os experimentos posteriores: filme A: 1 % de triclosan + 2 % de ácido sórbico; filme B: 1 % de triclosan; filme C: 0,5 % de triclosan; filme D: controle, sem adição de antimicrobiano; filme E: 3 % de triclosan. Também foi utilizado nos testes de halo de inibição, filmes com 2 % e 5 % de triclosan. Antes da utilização em testes, os filmes foram condicionados (em temperatura e umidade relativa controladas) para os testes físicos e previamente esterilizados em luz ultravioleta antes dos testes de ação antimicrobiana. As concentrações de antimicrobianos foram selecionadas em testes preliminares, em função da manutenção da transparência e características físicas dos filmes. Os filmes que atendiam a esses parâmetros foram selecionados para os testes de ação antimicrobiana.

Para os testes de avaliação de resistência da termossoldagem à tração, além dos filmes de PVdC, foram preparados filmes bicamada, de PVdC sobre filmes de poliéster, de 0,02 mm de espessura, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente quanto à adição de compostos antimicrobianos.

3.2. Análise das propriedades físico-mecânicas dos filmes

Avaliaram-se as seguintes propriedades físico-mecânicas dos filmes plásticos obtidos: espessura, propriedades de tração e alongamento, resistência da termossoldagem à tração e taxa de permeabilidade ao vapor de água.

3.2.1. Determinação da espessura dos filmes

A resistência dos filmes é proporcional à espessura e, portanto, é adequado o controle da espessura dos filmes utilizados nos testes. Foi

utilizado o micrômetro Mitutoyo 7301 para medição de espessura de filmes plásticos ou papel, com display tipo relógio, pontas do cursor planas, diâmetro de cinco mm, e cursor de 25 mm, legibilidade de 0,01 mm ($\pm 0,005$ mm). As medidas foram tomadas em 8 pontos da amostra, em três repetições, sendo calculada média e desvio-padrão.

3.2.2. Determinação da resistência à tração e alongamento do filme

As propriedades de tração estão relacionadas à maquinabilidade e desempenho mecânico. Foram determinadas as propriedades de resistência máxima à tração e percentagem de alongamento, sendo os testes realizados 30 a 40 dias após a fabricação.

Amostras de 100 mm x 25,4 mm foram utilizadas como corpos-de-prova para o teste de tração (PADULA et al., 1989), como mostrado na Figura 4 (b), com distância de 50 mm entre as garras e velocidade de tração de $50 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, conforme indicado por OLIVEIRA et al. (1996), citando (ASTM D882-91, 1996). Foi utilizado o aparelho universal de testes (Instron, modelo 3367), com célula de carga de 1 kN (100 kg) e dispositivo de tração (probe) com presilhas de 50 mm (Figura 4a).



(a)



(b)

Figura 4. Equipamento de tração (a); corpo de prova e garras (b).

Considerando que as propriedades dos filmes e embalagens plásticas podem mudar significativamente com as alterações de temperatura e umidade relativa, foi efetuado o condicionamento anterior aos testes de caracterização física, sendo os corpos de prova colocados em dessecador com umidade relativa de $58 \% \pm 2 \% \text{ UR}$, e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em estufa BOD, por tempo mínimo de 40h. Este tempo de condicionamento está de acordo com OLIVEIRA et al. (1996), que indica ser necessário tempo mínimo de 40 horas para materiais com mais de $700 \mu\text{m}$ de espessura, e períodos menores podem ser usados para materiais bem finos. Este tempo de condicionamento tem por objetivo levar o corpo de prova a um estado de equilíbrio com as condições ambientais, e obter resultados reprodutíveis. OLIVEIRA et al. (1996), citando as normas técnicas NBR 7452 (1982), ASTM E171-94 (1996) e ASTM D681-95 (1996), indica que as condições de laboratório para ensaio de plásticos, em países de clima temperado são $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \% \pm 5 \% \text{ UR}$, e para países tropicais, de acordo com a NBR 7452, são pressão atmosférica normal e $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Neste trabalho, no dessecador foi utilizada solução salina de brometo de sódio ($\text{NaBr} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), que apresenta umidade relativa de 58 % no equilíbrio.

3.2.3. Resistência da termossoldagem à tração

A termossoldagem é utilizada para fechamento de embalagens, que consiste na união de duas camadas do material termoplástico por fusão, sendo normalmente utilizado o calor como agente de fusão. A qualidade da termossoldagem depende das condições usadas na selagem, tais como temperatura aplicada ao material, pressão das mandíbulas e tempo de atuação do calor e pressão. É importante que a termossoldagem tenha resistência mecânica, para suportar o manuseio sem abrir, e integridade, garantindo a hermeticidade da embalagem.

Para o teste de tração sobre a termossoldagem, foram utilizadas como corpos-de-prova, amostras constituídas de duas unidades de $75 \text{ mm} \times 25,4 \text{ mm}$ (Figura 5), com termossoldagem unindo as duas unidades em uma das pontas, (PADULA et al., 1989). A termossoldagem foi efetuada em

equipamento Selovac 500B, sob vácuo, com tempo de solda de 2 segundos. Foi utilizado aparelho universal de testes (Instron, modelo 3367), com célula de carga de 1 kN (100 kg) e dispositivo de tração (probe) com presilhas de 50 mm, velocidade de tração de 50 mm.min⁻¹, com distância de 50 mm entre as garras (ASTM, 1996). O condicionamento foi efetuado conforme indicado no item 3.2.2., sendo os testes realizados 30 a 40 dias após a fabricação.

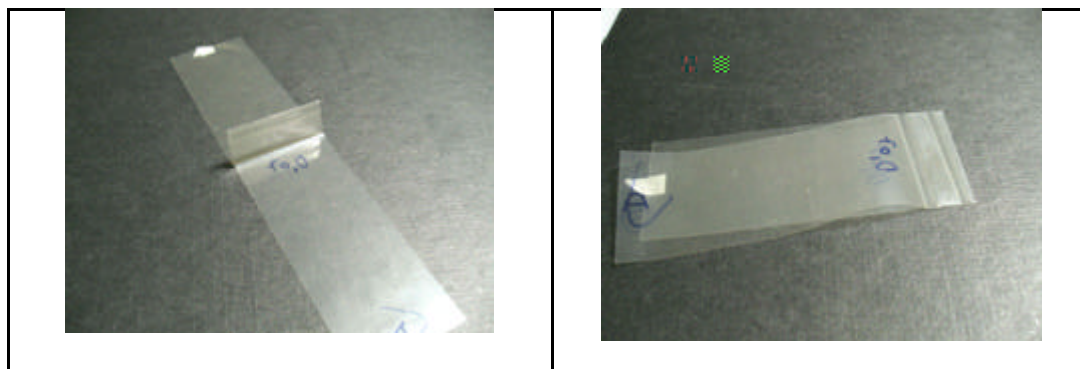


Figura 5. Corpo de prova para teste de resistência da termossoldagem à tração.

A resistência da termossoldagem à tração também foi avaliada em filmes bicamada, de PVdC / poliéster, seguindo as mesmas condições descritas. O filme de poliéster tem maior resistência e, assim, o teste com filme bicamada é adequado para avaliar se a resistência da termossoldagem é maior que a resistência do filme de PVdC.

3.2.4. Taxa de permeabilidade ao vapor de água

A propriedade de barreira ao vapor de água é uma das propriedades necessárias a embalagens para alimentos, principalmente àqueles que devem ser protegidos da absorção ou perda de umidade, devido ao teor de umidade do ambiente. Avaliou-se a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) dos filmes preparados, de acordo com PADULA et al. (1989), e também descrito por ROBERTSON (1992). Utilizaram-se corpos de prova acoplados a cápsulas com paredes impermeáveis e com cloreto de cálcio em seu interior, vedados na junção filme/cápsula. A área exposta do filme foi

de 50 cm². As cápsulas montadas foram pesadas e colocadas em dessecador com umidade controlada a 75 %, por adição de solução saturada de cloreto de sódio, e estocadas a temperatura ambiente de 25 ± 2 °C. Através de pesagens diárias, em balança analítica, até peso constante, foi avaliado o ganho de peso devido à umidade permeada através do filme e absorvida pelo cloreto de cálcio. Os dados de ganho de peso e tempo foram plotados em gráfico. Para o período em que os pontos formaram uma reta, calculou-se o ganho de peso por dia, sendo então convertida para a unidade relativa à TPVA (g.m⁻².dia⁻¹).

3.2.5. Análise estatística das propriedades físico-mecânicas

Os dados obtidos das propriedades físico-mecânicas dos filmes foram interpretados por meio de análise de variância, utilizando teste F e as comparações das médias aplicando teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade. Os tratamentos (filmes) foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para espessura e três repetições para resistência à tração. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

3.3. Testes de migração de triclosan do filme para o meio

A migração da substância antimicrobiana dos filmes produzidos foi avaliada com uso dos simulantes (água e n-heptano) e em salsichas, com posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os experimentos foram realizados em três repetições, e avaliados pela média e desvio-padrão.

3.3.1. Migração de triclosan em simulantes água e n-heptano

Amostras de cada tratamento (filmes com diferentes proporções de triclosan) com área de 75 cm² (150 cm² considerando os dois lados) foram imersas em 50 mL de simulante água e n-heptano, recomendados para

alimentos gordurosos, conforme indicado na Portaria 105/99, da Anvisa. O sistema foi montado utilizando tubos de ensaio com tampa e armazenados à temperatura ambiente, sendo coletadas amostras para análise da quantidade liberada de triclosan dos filmes para o simulante, de acordo com o tempo de contato com a solução.

A quantificação do triclosan foi realizada segundo CHUNG et al. (2003), com modificações, em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu 10AVP), com injeção de 20 µL, em uma coluna de Shim-Pack VP-ODS (4,6 µm, 4,6 x 150 mm), bombas LC 10 AT, detector de diodo UV Shimadzu SPD-M 10 AVP. A fase móvel com vazão de 1 ml.min⁻¹ (60 % acetonitrila; 40 % ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,05 %), corrida de 14 minutos. A detecção foi em 236 nm, sendo a quantificação da área em picos de retenção específicos determinados com uso do software Shimadzu Class VP, e a concentração de substância calculada com uso de curva-padrão. A concentração foi relacionada à área de filme de 150 cm². Para as análises de ácido sórbico utilizaram-se as mesmas condições cromatográficas acima mencionadas, com leitura de ácido sórbico em 260 nm (SILVEIRA, 2005), apenas para o filme A, que foi adicionado de 1 % de triclosan + 2 % de ácido sórbico.

As análises do líquido simulante foram realizadas em intervalos de tempo variáveis, sendo menores nos primeiros dias e, posteriormente, com intervalos de tempo de uma a duas semanas. Foram realizadas três repetições.

3.3.2. Migração de triclosan em salsicha

Unidades de salsicha foram envoltas nos filmes de PVdC, e então embalados em sacos de nylon/polietileno, selados sob vácuo e estocados em temperatura de refrigeração a 7 °C ± 2 °C. Amostras de salsichas foram retiradas para análise de triclosan a intervalos de 10 dias, até 70 dias de contato entre filme de PVdC e salsicha.

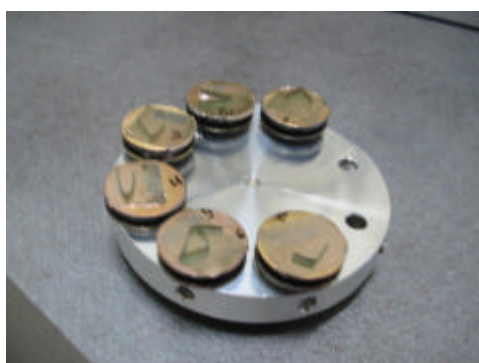
Para avaliação da migração de triclosan em salsichas adotou-se a metodologia descrita por SILVA et al. (2005), sendo tomadas 10 a 12 g de amostra de salsicha (3 cm do cilindro de salsicha, área de 19 a 20 cm²), sendo efetuada extração de triclosan e materiais gordurosos com 10 mL de hexano, por três vezes. As alíquotas de extração foram colocadas em rotavapor (Fisatom) sob vácuo para evaporação do hexano. No material gorduroso residual do balão, foram efetuadas três extrações de triclosan com 10 mL de acetonitrila, que foi evaporada sob vácuo. O resíduo de extração foi diluído com 10 mL de acetonitrila, filtrado em filtro Millipore 0,22 µm, e uma alíquota de 20 µL foi injetada em cromatógrafo líquido, nas condições descritas anteriormente em 3.3.1. A eluição por gradiente, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, usou as seguintes fases proporções da fase móvel: tempo 0 a 14 min, acetonitrila: água + 0,05 % ácido fosfórico (60:40); rampa: 14 a 20 min, até 100 % acetonitrila; 20 a 30 min, manutenção 100 % acetonitrila; rampa: 30 a 40 min, até 60 % acetonitrila; 40 a 45 min, manutenção a 60 % acetonitrila; tempo total de 45 minutos de corrida. A detecção foi realizada a 236 nm. As áreas foram relacionadas a curva-padrão de triclosan e calculadas as concentrações nas amostras. Os resultados foram reportados por área de filme em contato com o produto.

Foram realizadas três repetições, efetuando-se análises da concentração de triclosan em salsicha por um tempo de 70 dias, a intervalos de tempo de uma semana no início, e intervalos de duas semanas a partir do segundo mês de avaliação.

3.4. Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias das superfícies de filmes foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura, no Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com objetivo de verificar as diferenças de microtopografia entre os filmes. A preparação das amostras foi realizada segundo metodologia descrita por SILVEIRA (1989), efetuado corte de pedaços do filme e fixados com uso de fita adesiva no suporte de porta-amostras do microscópio (stub), de forma a permitir

visualização da superfície e do corte transversal (espessura) do filme, conforme indicado na Figura 6. Os suportes foram levados ao metalizador Balzers-Union Mundial FDU 010, e submetidos ao processo de metalização a vácuo com uma fina camada de ouro de 20 nm, tendo por objetivo torná-los bons condutores elétricos. Posteriormente, os filmes foram observados no microscópio eletrônico de varredura de alta voltagem LEO 1430 VP, com aumentos de 200x a 5000x.



(a)



(b)

Figura 6. Filmes fixados em “stub” (a); equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (b).

3.5. Avaliação de ação antimicrobiana dos filmes com triclosan e ácido sórbico

Os microrganismos utilizados nos testes de avaliação de ação antimicrobiana foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella choleraesuis*, sorotipo *typhi* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz, e uma cepa de *Klebsiella* sp., isolada no Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa.

As cepas foram reativadas de acordo com orientação específica do Instituto Oswaldo Cruz e preparadas para estocagem a -20 °C, para uso posterior. A preparação consistiu em incubação em meio caldo nutriente ou caldo soja-triptona (TSB), de acordo com o microrganismo, e incubação a 37 °C por 18 h.

Para os testes de avaliação de ação antimicrobiana, os filmes foram recortados em tamanhos específicos para cada teste e esterilizados através de exposição de luz UV (Prodicil, 254 nm) por 2 minutos em cada lado.

3.5.1. Ação antimicrobiana pelo método de halo de inibição

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes através do método de halo de inibição foi realizada conforme descrito por LIMJAROEN et al. (2003). Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, sorotipo *typhi*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiela*. Os microrganismos foram inoculados em placas com TSA, por estrias, para obter colônias isoladas. Para cada microrganismo, colônias isoladas foram suspensas em caldo TSB, e comparadas com tubos padrão de turbidez, de acordo com escala de McFarland (VANDERZANT et al., 2000), para obter-se suspensão com aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹. Com uso de swab esterilizado umedecido nesta suspensão, foi efetuada inoculação por espalhamento em superfície em placas com meio TSA e, após, aplicados filmes previamente recortados em discos com área de 1 cm², esterilizados em luz UV, e levados para incubação a 35 °C por 24 horas. Após incubação, ocorrendo inibição do crescimento microbiano ao redor da amostra, foi medido o raio do halo de inibição, em milímetros.

Na avaliação pelo método do halo os tratamentos (filmes) foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado. O teste foi efetuado em três repetições, com duplicata, e os dados foram interpretados por meio de análise de variância e regressão, utilizando o teste F e comparações das médias utilizando teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa SAS (Statistical Analysis System, 9.1), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

3.5.2. Ação antimicrobiana por inibição da curva de crescimento em meio líquido

Culturas puras dos microrganismos foram reativadas duas vezes, consecutivamente, em meio TSB líquido com incubação a 37 °C por 12 horas. Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Foram preparadas suspensões de cada microrganismo, contendo 10^2 UFC.mL⁻¹, em meio TSB, por meio de diluição das culturas ativadas. As suspensões foram mantidas em frascos com capacidade para 150 mL, à temperatura de 37 °C, sob agitação com uso de shaker em banho-maria, para a realização da curva de crescimento do microrganismo inoculado em cada frasco. Nos frascos, foram adicionados os filmes de PVdC com diferentes tratamentos: filme incorporado com 1 % triclosan + 2 % ácido sórbico (filme A), filme incorporado com 1 % de triclosan (filme B), filme incorporado com 0,5 % de triclosan (filme C), filme sem adição de antimicrobiano (filme D). Em um frasco não foi adicionado filme, sendo, portanto, o controle. A proporção de suspensão bacteriana e os filmes foi de 1 mL para 3 cm² de filme, considerando os dois lados do filme (150 mL de suspensão para 450 cm² de área de filme).

Amostras da suspensão de microrganismo foram retiradas a intervalos regulares de tempo e o crescimento microbiano avaliado por densidade ótica (DO) do meio de cultura, utilizando um espectrofotômetro (Analítica GBC UV/VIS 918) no comprimento de onda 640 nm. As leituras foram realizadas até a curva de crescimento atingir a fase estacionária. Nos casos em que o valor lido de absorbância apresentou-se maior que 0,6, diluía-se a alíquota com água destilada. Nos casos em que o valor lido de absorbância apresentou-se maior que 0,6, diluía-se a alíquota com água destilada.

O cálculo da velocidade específica de crescimento (μ) foi realizado por meio de regressão linear dos dados da fase exponencial de crescimento do microrganismo a partir do gráfico logaritmo neperiano da densidade ótica versus tempo (HAN e FLOROS, 1998; HAN, 2000).

Na avaliação da ação antimicrobiana por inibição em meio líquido, os tratamentos (filmes) foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, em três repetições, com duplicata, e os dados foram interpretados por meio de análise de variância, com uso do teste F e comparações entre as médias com uso do teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa SAS (Statistical Analysis System, 9.1), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

3.5.3. Ação antimicrobiana em produto cárneo tipo salsicha

A ação antimicrobiana dos filmes foi também testada pela aplicação destes sobre produto salsicha. Na preparação, os filmes foram recortados em tamanhos adequados para recobrir a unidade de salsicha e esterilizados em câmara com lâmpada UV, por 2 minutos de cada lado. Colônias isoladas de cada microrganismo foram inoculadas em tubos com caldo TSB, até obter turbidez equivalente a 10^8 UFC.mL⁻¹, em escala de McFarland (VANDERZANT et al., 2000). Diluições sucessivas foram efetuadas com água peptonada para obter-se 500 mL de suspensão com contagem estimada de 10^2 UFC.mL⁻¹ ou 10^4 UFC.mL⁻¹, para a imersão das salsichas esterilizadas ou irradiadas. O tempo de imersão foi de 15 minutos, com agitação manual, sendo depois o excesso de líquido escorrido e as salsichas envolvidas individualmente com os filmes antimicrobianos e, então, colocadas em sacos plásticos de nylon-polietileno, fechados sob vácuo com seladora Selovac 500B, e estocados em câmara refrigerada a temperatura de $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram tomadas amostras em tempos específicos (0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias de estocagem) e analisadas para contagem microbiana. A Figura 7 apresenta fotos de unidades de salsicha envolvidas com filmes de PVdC e fechadas sob vácuo. Os testes foram realizados em três repetições.



Figura 7. Salsichas envolvidas com filme antimicrobiano de PVdC

A montagem do experimento de avaliação da eficiência antimicrobiana dos filmes foi efetuada com as variações abaixo, sendo alteradas o processo de conservação de salsicha (esterilizada ou irradiada) e a forma de análise (meio não seletivo e em meio seletivo):

- a) utilização de salsicha tratada por esterilização comercial e análise em meio não-seletivo:** salsichas enlatadas, adquiridas no mercado local, foram inoculadas com os microrganismos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*, em testes individuais. Realizou-se contagem dos microrganismos inoculados com uso de ágar TSA, para avaliação de crescimento ou inibição dos microrganismos por ação dos filmes antimicrobianos;
- b) utilização de salsicha esterilizada por irradiação e análise em meio seletivo:** salsichas pasteurizadas embaladas sob vácuo, adquiridas no mercado local, foram esterilizadas por irradiação no CDTN – CETEC, Belo Horizonte, em dose de 5 kGrays, e depois, em condições assépticas de laboratório, inoculada com *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*, em testes individuais, sendo ampliada a concentração de microrganismos no caldo de imersão das salsichas para 10^4 UFC.ml⁻¹, e utilizou-se contagem em meio seletivo para cada microrganismo na avaliação de crescimento ou inibição dos microrganismos por ação dos filmes antimicrobianos.

Para a realização das análises microbiológicas, seguiu-se metodologia descrita em VANDERZANT et al. (2000), sendo cada amostra retirada da embalagem e colocada em saco plástico esterilizado, rinsada por agitação durante 2 minutos com 100 mL de diluente água peptonada. Das diluições preparadas, alíquota de 0,1 mL foi inoculadas por espalhamento em placas com TSA ou meio seletivo específico. Após incubação a 35 °C por 48 horas, o resultado da contagem em placas foi relacionado com a área superficial da amostra da salsicha e expresso em UFC.cm⁻².

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção dos filmes antimicrobianos

Os filmes produzidos, com espessura média de $0,08 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$, apresentaram características de flexibilidade e elasticidade próximas ao filme controle (sem adição de antimicrobiano). A transparência não foi afetada para os filmes produzidos com triclosan, sendo este facilmente homogeneizado no solvente metiletilcetona e PVdC.

Para a preparação dos filmes com ácido sórbico, foi necessário tempo de reação entre PVdC – metiletilcetona e ácido sórbico, maior que 45 minutos, pois em tempos menores de reação, ocorria a cristalização do ácido sórbico (Figura 8) após a evaporação do solvente, com a perda de transparência do filme e menor resistência mecânica. LIMJAROEN et al. (2003), também produziram filmes antimicrobianos de PVdC e tiveram como resultado que o ácido sórbico foi mais compatível com o polímero do filme, comparado com filmes adicionados de sorbato de potássio ou nisina.

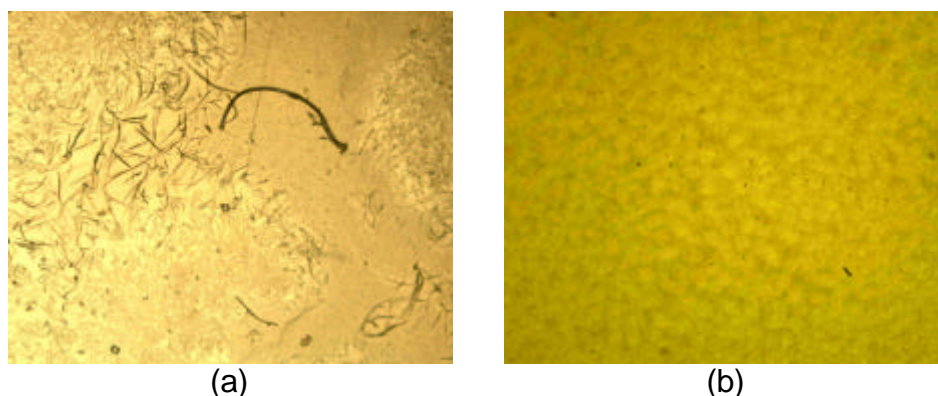


Figura 8 Fotografia em microscópio dos filmes de PVdC: (a) filme com ácido sórbico cristalizado; (b) filme com 2 % triclosan (aumento de 100x, em microscópio Leica).

4.2. Análise das propriedades físico-mecânicas dos filmes

4.2.1. Determinação da espessura dos filmes

Na Tabela 2 observa-se que foi possível obter filmes com espessura razoavelmente constante, no método “cast”. Os filmes de PVdC apresentaram espessura média de $0,077 \pm 0,007$ mm, e os filmes de PVdC em camada com poliéster espessura média de $0,088 \pm 0,010$ mm. Considerando que a camada de poliéster utilizada possuía espessura de $0,020$ mm, a camada de PVdC no filme bicamada foi, em média, de $0,066 \pm 0,010$ mm. Na análise estatística, não houve diferença significativa de espessura ($P > 0,05$) para os filmes de PVdC+poliéster, e observou-se diferença entre os filmes de PVdC, tratamentos C (maior espessura) e A e E (menor espessura) ($P < 0,05$). Esta diferença de espessura foi devida à condição de fabricação, não sendo influenciada pelo antimicrobiano.

Tabela 2 – Valores médios e desvio-padrão para espessura dos corpos de prova para os filmes de PVdC e PVdC com poliéster.

Filmes	PVdC (? \pm s) (mm)	PVdC + poliéster (? \pm s) (mm)
A (1 % triclosan + 2 % ác. sórbico)	$0,072 \pm 0,009^{ab}$	$0,094 \pm 0,007^a$
B (1 % triclosan)	$0,080 \pm 0,001^{ab}$	$0,088 \pm 0,013^a$
C (0,5 % triclosan)	$0,084 \pm 0,008^a$	$0,080 \pm 0,014^a$
D (controle)	$0,076 \pm 0,005^{ab}$	$0,088 \pm 0,003^a$
E (3 % triclosan)	$0,072 \pm 0,003^b$	$0,082 \pm 0,004^a$

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si, em teste de Duncan entre as médias ($P < 0,05$). Três repetições, com 8 medidas em cada repetição.

4.2.2. Determinação da resistência dos filmes à tração

Na avaliação das propriedades mecânicas dos filmes antimicrobianos de PVdC em testes de tração, obteve-se resistência de 8 a 10 N para as amostras, sendo que o filme controle suportou carga máxima pouco maior que os filmes com antimicrobiano (Tabela 3), enquanto que o alongamento (esticamento) até a ruptura, foi elevado, chegando a mais de duas vezes o comprimento inicial dos corpos de prova.

Tabela 3 – Resistência e alongamento sob tração, para filmes de PVdC incorporados com antimicrobianos e controle.

Filmes	Resistência máxima à tração (? ± s) (N)	Elongamento (? ± s) (%)
A (1 % triclosan + 2 % ác. sórbico)	8,3 ± 0,3 ^c	291,8 ± 9,0 ^a
B (1 % triclosan)	9,4 ± 0,3 ^b	294,5 ± 0,5 ^a
C (0,5 % triclosan)	9,7 ± 0,4 ^{ab}	291,0 ± 7,4 ^a
D (controle)	10,5 ± 0,7 ^a	294,2 ± 2,2 ^a
E (3 % triclosan)	9,0 ± 0,7 ^{bc}	294,8 ± 0,1 ^a

Médias seguidas de letras diferentes, na vertical, diferem estatisticamente entre si, em teste de Duncan entre as médias ($P < 0,05$). Três repetições, com 8 medidas em cada repetição.

Observou-se pelos resultados que a adição de triclosan em proporção de 1 % e 3 %, e adição de ácido sórbico em proporção de 2 %, reduziram significativamente ($P < 0,05$) a carga máxima de resistência à tração em comparação ao controle (Tabela 3). Resultado similar foi obtido por LIMJAROEN et al. (2003) para filmes de PVdC adicionados de ácido sórbico. Os antimicrobianos aparentemente ocupam espaços e criam pontos de stress na estrutura do polímero, reduzindo a resistência à tração. Não houve alteração na propriedade de alongamento relativo dos filmes. Os valores obtidos de resistência máxima à tração, em valores próximos a 10 N, são inferiores aos apresentados por filmes comerciais, com valores próximos a 80 N. A diferença é relacionada ao processo de extrusão e tratamentos posteriores à extrusão para aumentar a resistência mecânica.

4.2.3. Resistência da termossoldagem à tração em filmes de PVdC e PVdC/poliéster

A termossoldagem de filmes plásticos tem a importância relacionada à qualidade do fechamento da embalagem, sendo necessário manter a resistência mecânica do filme. Os resultados da resistência máxima da termossoldagem de filmes de PVdC à tração, apresentada na Tabela 4, indicaram que a adição de 1 % triclosan e 2 % de ácido sórbico (filme A), apresentou resistência inferior aos outros tratamentos e ao controle, indicando que a adição de ácido sórbico influencia significativamente a

resistência máxima da termossoldagem à tração. Observou-se, também, que o aumento na concentração de triclosan diminuiu a resistência máxima da termossoldagem à tração.

Tabela 4 – Resistência e alongamento sob tração, para a termossoldagem de filmes de PVdC.

Filmes	Resistência máxima à tração (N) (? ± s)	Elongamento (%) (? ± s)
A (1 % triclosan + 2 % ác. sórbico)	5,9 ± 0,5 ^b	296,2 ± 3,4 ^a
B (1 % triclosan)	6,7 ± 0,1 ^a	297,8 ± 3,7 ^a
C (0,5 % triclosan)	6,9 ± 0,2 ^a	297,1 ± 3,7 ^a
D (controle)	7,0 ± 0,1 ^a	292,5 ± 6,9 ^a
E (3 % triclosan)	6,4 ± 0,4 ^{ab}	297,9 ± 1,9 ^a

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si, em teste de Duncan (P < 0,05). Três repetições, com 8 medidas em cada repetição.

A avaliação da termossoldagem do PVdC em filme com duas camadas, PVdC/poliéster, indicou carga máxima variando de 36 a 38 N para os filmes (Tabela 5), não apresentando diferença significativa entre os tratamentos (P > 0,05). Observou-se que a resistência indicada pela carga máxima à tração dos filmes bicamada, é bem maior do que aquela apresentada pela termossoldagem dos filmes de PVdC monocamada. Estes resultados indicam que a resistência da termossoldagem, devido à maior espessura no ponto de fusão das camadas, é maior do que a resistência do filme.

Tabela 5 – Resistência e alongamento sob tração, para a termossoldagem de filmes de PVdC+poliéster.

Filmes	Resistência máxima à tração (N) (? ± s)	Elongamento (%) (? ± s)
A (1 % triclosan + 2 % ác. sórbico)	32,2 ± 6,6 ^a	27,4 ± 7,4 ^a
B (1 % triclosan)	38,6 ± 1,5 ^a	22,5 ± 7,3 ^a
C (0,5 % triclosan)	36,9 ± 1,7 ^a	24,1 ± 2,4 ^a
D (controle)	36,2 ± 0,7 ^a	30,5 ± 11,0 ^a
E (3 % triclosan)	34,6 ± 3,6 ^a	24,6 ± 6,7 ^a

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si, em teste de Duncan (P < 0,05). Três repetições, com 8 medidas em cada repetição.

O alongamento relativo à termossoldagem não apresentou diferença significativa entre os tratamentos para os filmes de PVdC e PVdC com poliéster ($P > 0,05$), conforme Tabelas 4 e 5, respectivamente. O alongamento apresentado pelos filmes de PVdC+poliéster foi muito inferior ao alongamento dos filmes de PVdC monocamada, devido à baixa elasticidade da camada de poliéster.

4.2.4. Permeabilidade ao vapor de água

Na avaliação da permeabilidade dos filmes de PVdC ao vapor de água, através da avaliação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) (Tabela 6), não se observou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os filmes preparados com adição dos diferentes antimicrobianos. O filme de PVdC, por ser uma matriz apolar, apresenta baixa TPVA e não é alterada pela adição de triclosan, que também tem característica apolar. O filme A, adicionado de ácido sórbico, apresentou maior TPVA e, de acordo com LIMJAROEN et al. (2003), a adição de uma substância hidrofílica à matriz de PVdC aumenta a solubilidade da água no polímero e também a taxa de permeabilidade.

Tabela 6 – Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água (TPVA) para os diferentes filmes de PVdC.

Filmes	TPVA * ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$) (? \pm s)
A (1 % triclosan + 2 % ácido sórbico)	$3,277 \pm 0,436^a$
B (1 % triclosan)	$2,804 \pm 0,684^a$
C (0,5 % triclosan)	$2,748 \pm 0,473^a$
D (controle, sem antimicrobiano)	$3,054 \pm 0,783^a$
E (3 % triclosan)	$3,147 \pm 0,393^a$

(*) taxa de permeabilidade para filmes de espessura média de 0,080 mm.

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si, em teste de Duncan ($P < 0,05$). Quatro repetições.

4.3. Testes de migração de triclosan do filme para o meio

Em embalagens antimicrobianas é necessário conhecer as condições e características de migração das substâncias adicionadas ao material de

embalagem. É de interesse que estas substâncias migrem para a superfície do alimento, de forma a ter a ação antimicrobiana prevista, e ao mesmo tempo é necessário identificar a quantidade de substância que está presente no alimento no momento de consumo, de forma que seu teor esteja abaixo do limite máximo de migração permitido para o alimento.

4.3.1. Migração de triclosan em água e em simulante n-heptano

A avaliação de migração de ácido sórbico e triclosan em meio aquoso como simulante, não apresentou migração sensível à detecção pelo método utilizado, pois tanto o ácido sórbico tem baixa solubilidade em água (0,16 g.100 mL⁻¹), enquanto que o triclosan é praticamente insolúvel em água, de acordo com CHUNG et al. (2003).

Nos testes com utilização do n-heptano como simulante, devido a seu caráter apolar e maior capacidade de solubilizar e extrair componentes orgânicos do filme de PVdC, foi possível detectar a migração de ácido sórbico e triclosan. A Figura 9 mostra um cromatograma característico destes testes, e observou-se que o tempo de retenção do ácido sórbico, para as condições de operação do cromatógrafo e fase móvel, foi de 2,4 min, e o tempo de retenção para o triclosan foi de 8,8 min.

A migração de triclosan em n-heptano (Figura 10), estabilizou-se em tempo próximo a 20 dias de contato com o simulante para os filmes com 0,5 e 1 % de triclosan. O filme com 3 % de triclosan também apresentou maior migração em até 20 dias de contato, e depois deste tempo a migração ocorreu mais lentamente.

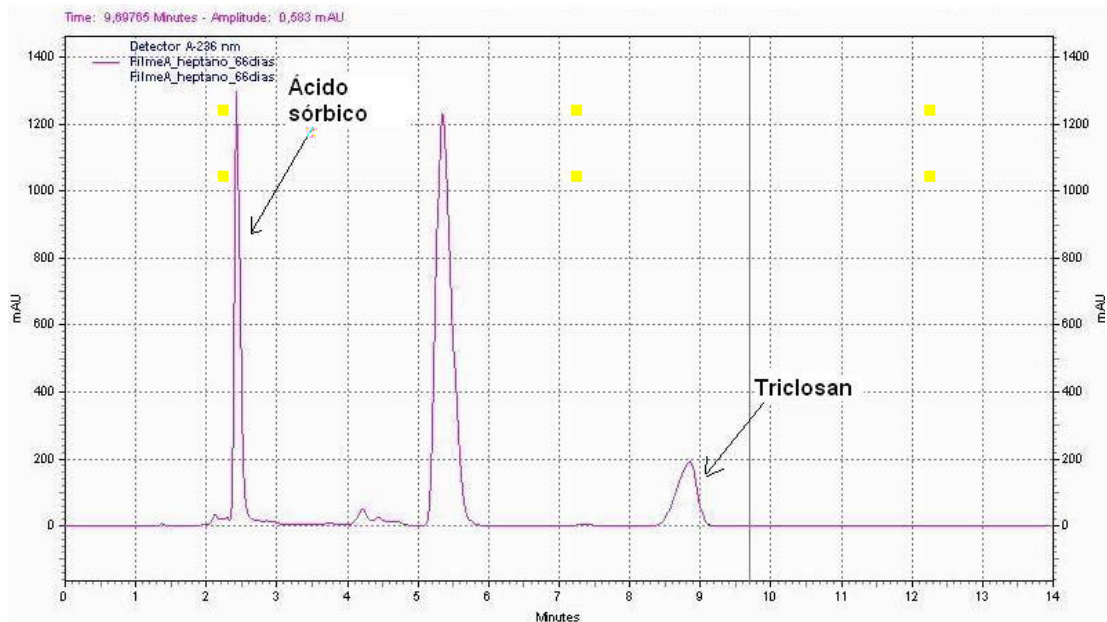


Figura 9. Cromatograma de eluição de triclosan e ácido sórbico, em simulante n-heptano.

Ao se relacionar a quantidade migrada com a quantidade total de triclosan presente no filme, observou-se que migraram de 22 a 24 % do total de triclosan incorporado no filme. Tais resultados sugerem possivelmente que a migração ocorre com o triclosan aderido à superfície do filme, dificultando a liberação do triclosan que interage com a rede interna de polímero. CHUNG et al. (2003) avaliaram a cinética de migração de triclosan de filme de copolímero de estireno-acrilato em simulante n-heptano, obtendo migração 65 % do triclosan em até 10 horas, e 97 % em até 40 horas, indicando que o copolímero foi fortemente afetado pelo simulante. KALYON e OLGUN (2001) produziram discos de poliestireno com triclosan incorporado e avaliaram a migração em mistura etanol + água, tendo como resultado que apenas 0,06 % do triclosan presente no polímero migra, o qual indicou que grande quantidade de triclosan ficou encapsulada na estrutura do polímero e não difundiu para a superfície, limitando a migração para o meio.

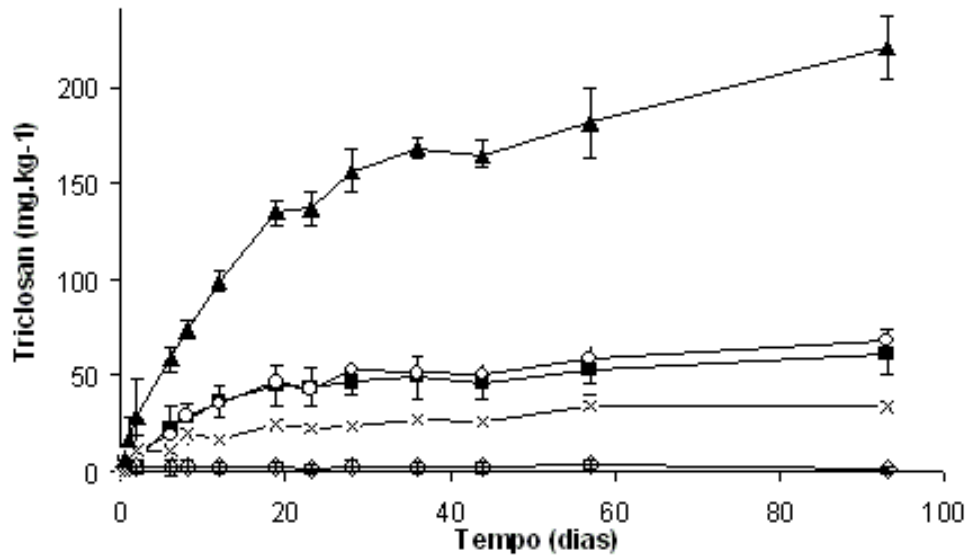


Figura 10 - Migração de triclosan dos filmes de PVdC em simulante n-heptano. Legenda: (o) Filme A (1 % triclosan + 2 % ácido sórbico); (Δ) Filme B (1 % triclosan); (x) Filme C (0,5 % triclosan); (□) Filme D (controle); (◇) Filme E: 3 % triclosan. Media de três repetições.

Na Figura 11, observa-se qu1 en5s04 3.75 0 TD -0.27 Tw (s, prptano.2va)2) Filme 6

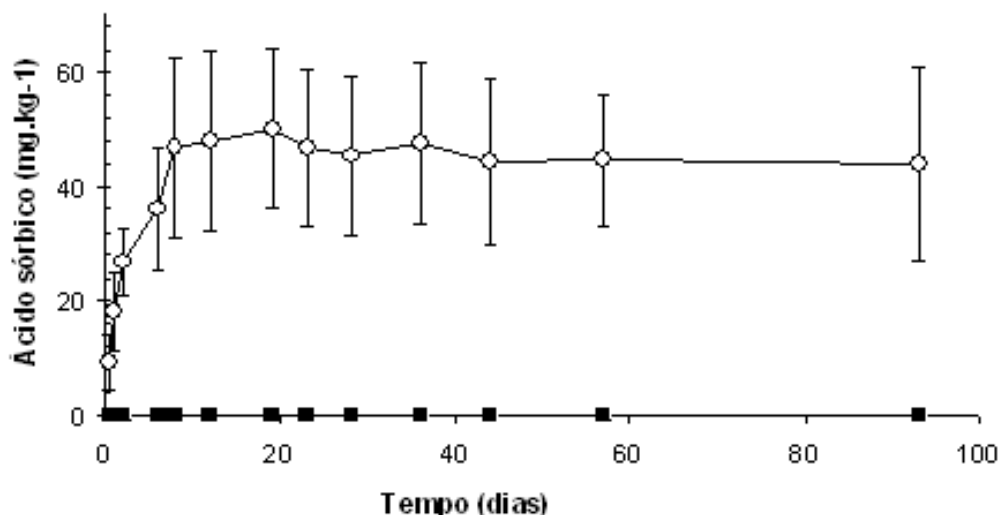


Figura 11 - Migração de ácido sórbico, por contato dos filmes de PVdC em simulante n-heptano. Legenda: (o) Filme A (1 % triclosan + 2 % ácido sórbico); (∇) Filme D (controle). Média de três repetições.

Na análise de triclosan migrado do filme para o simulante n-heptano, em cromatografia líquida, observou-se que o tempo de retenção do triclosan na coluna cromatográfica foi de 7,9 minutos, um pouco inferior ao tempo de retenção obtido na curva padrão (8,8 minutos), nas condições de realização da análise. Observou-se que esta alteração do tempo de retenção é proveniente de alguma interação entre o triclosan e o polímero PVdC ou solvente metiletilcetona, que possivelmente alterou a molécula de triclosan e sua interação com a coluna cromatográfica, alterando, assim, o tempo de retenção. Foi efetuada a comparação com adição de triclosan diretamente ao simulante n-heptano e em massa de salsicha, onde não ocorreu alteração do tempo de retenção por efeito destes.

Ao se relacionar a capacidade de migração de triclosan e ácido sórbico presentes nos filmes de PVdC, com a migração possível em alimentos, deve-se considerar que o simulante n-heptano, devido a sua polaridade, tem capacidade de interação com moléculas orgânicas e maior capacidade de extração, sendo que na Portaria 105/1999, a Anvisa, recomenda a divisão por quatro do total migrado do polímero.

4.3.2. Migração de triclosan em salsicha sob temperatura de refrigeração

Nos testes de migração do triclosan para a salsicha, mesmo após 70 dias de contato com o filme, observou-se uma migração de triclosan máxima de $2,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, ficando abaixo do limite máximo de 5 mg.kg^{-1} , estabelecido pelo Scientific Committee for Food (SCF, 2000), da Comunidade Européia para alimentos. Utilizou-se este limite da Comunidade Européia, pelo fato de a Legislação Brasileira não se pronunciar com relação a esta substância, em alimentos. A Figura 12 apresenta um cromatograma característico de eluição e detecção em UV, 236 nm, para análise de triclosan na salsicha.

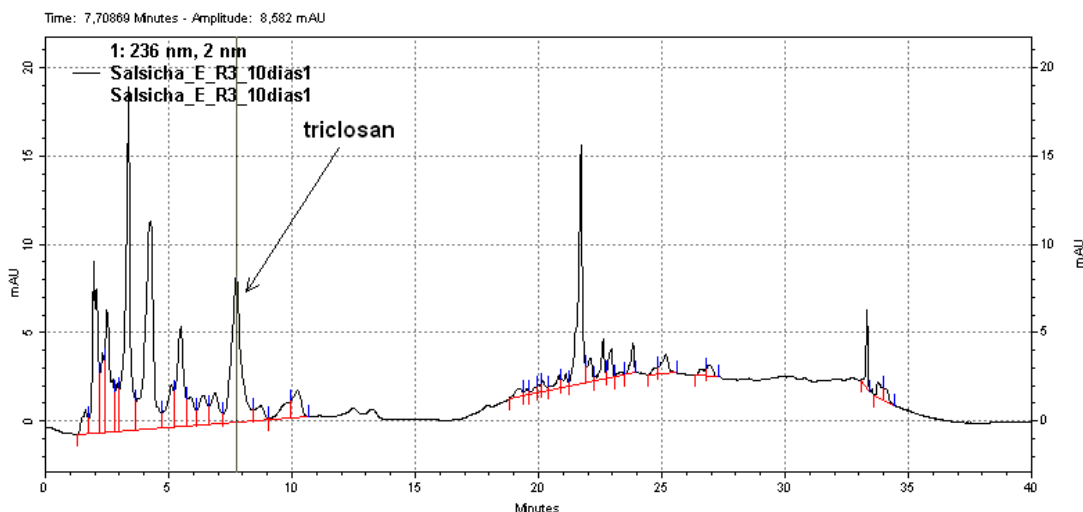


Figura 12 – Cromatograma de eluição de triclosan, em 236 nm, em salsicha.

O valor máximo de migração de triclosan em salsicha foi obtido para o filme E, adicionado de 3 % de triclosan, o qual atingiu teor de $2,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, seguido pelo filme C, que foi de $1,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, e filmes B e A, que tiveram migração de $0,9$ e $0,8 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente. Nos testes, observou-se que a própria salsicha possuía substâncias com absorção de UV no mesmo tempo de retenção do triclosan, interferindo na análise e tornando necessário aplicar ao resultado da quantificação de triclosan, subtração do

valor médio do branco (salsicha sem PVdC e sem triclosan), equivalente ao composto presente neste tempo de retenção. Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a metodologia utilizada tem baixa sensibilidade para quantificação de triclosan em concentrações inferiores a 2 mg.kg^{-1} , sugerindo estar próximo ao seu limite de quantificação.

A temperatura de refrigeração possivelmente reduz a migração de triclosan, comparada com a migração em temperatura ambiente (CHUNG et al., 2003). BRAID e WALE (2002) não observaram efeito antimicrobiano de caixa plástica incorporada com triclosan sobre *Escherichia coli* estocada sob refrigeração, possivelmente pela menor migração desta substância, mas observaram efeito antimicrobiano em temperatura ambiente.

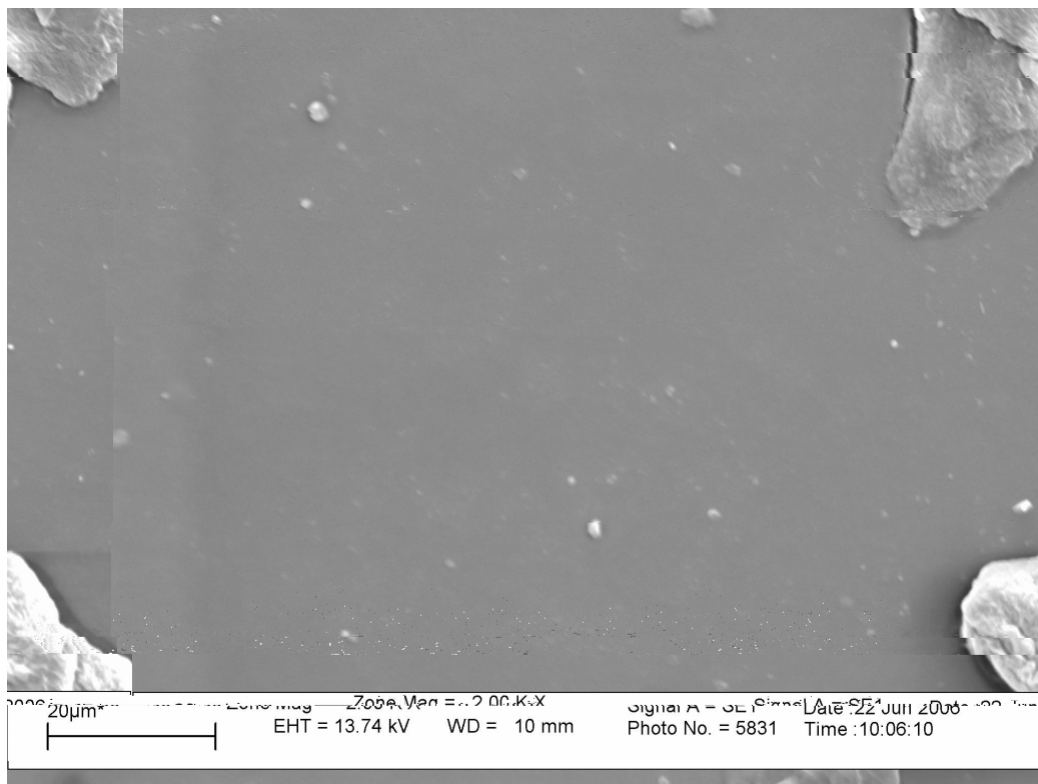
4.4. Caracterização dos filmes por microfotografias

A avaliação dos filmes de PVdC adicionados de agentes antimicrobianos através de fotografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, permitiu observar a topografia da superfície e de cortes transversais dos filmes. As Figuras 13a, 13b e 13c, exemplificam algumas das fotomicrografias realizadas. Observa-se nestas figuras que o filme controle (sem adição de substância antimicrobiana) tem topografia homogênea, tanto em sua superfície quanto no corte transversal, e que a adição de triclosan não altera esta característica.

A comparação entre as figuras relativas aos filmes com 1 % triclosan + 2 % ácido sórbico (filme A) e filme com 1 % triclosan (filme B), mostraram manchas brancas do ácido sórbico, que provocam descontinuidade na rede do polímero. Esta descontinuidade justifica a menor resistência à tração, observada pelo filme A e termossoldagem deste (Tabelas 3 e 4), e também a maior taxa de permeabilidade ao vapor de água (Tabela 6).

O triclosan possui uma boa interação com o polímero e não se diferencia nas fotomicrografias do PVdC, através de comparação entre o filme controle e aqueles contendo triclosan. Esta interação entre triclosan e polímero de PVdC, não alterou a estrutura dos filmes, o que justifica o fato de não terem

sido observadas alterações significativas nas propriedades mecânicas dos filmes adicionados de triclosan (Tabelas 3 e 4), quando comparados ao filme controle. LIMJAROEN et al. (2003) indicaram que, mantendo a estrutura da matriz de PVdC homogênea, menor será a alteração das propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água.

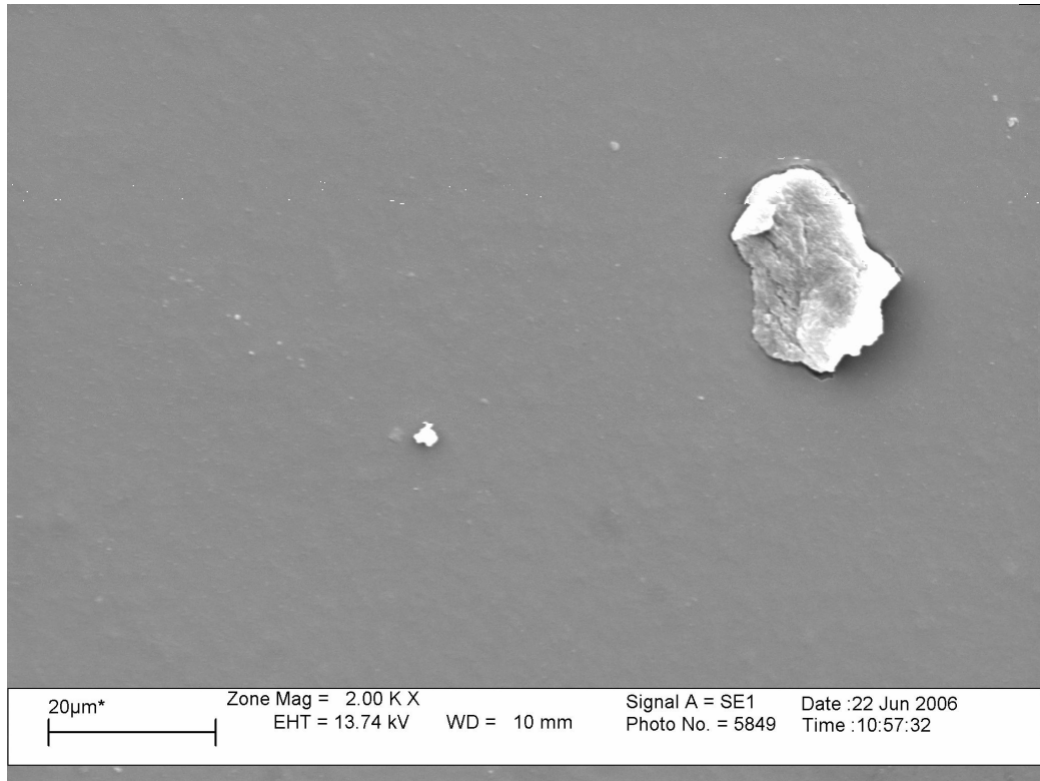


(1)

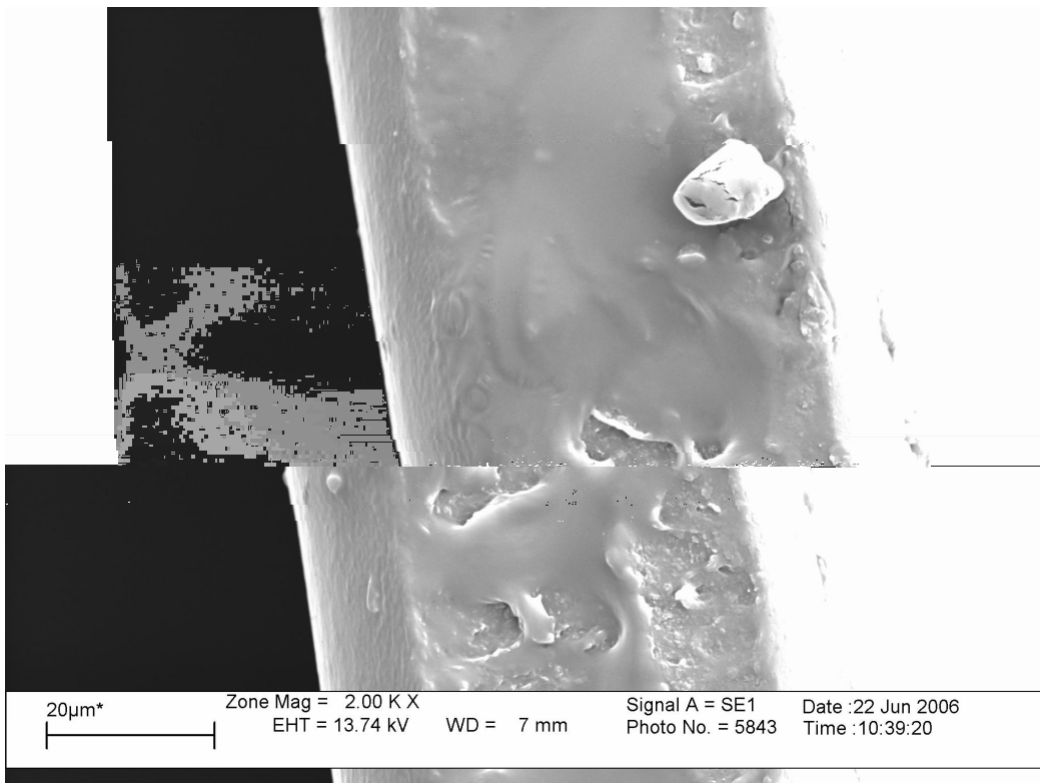


(2)

Figura 13a – Fotomicrografias superficial (1) e transversal (2), em microscopia eletrônica de varredura, do filme A - PVdC, adicionado de 1 % triclosan + 2 % de ácido sórbico (ampliação de 2000x).

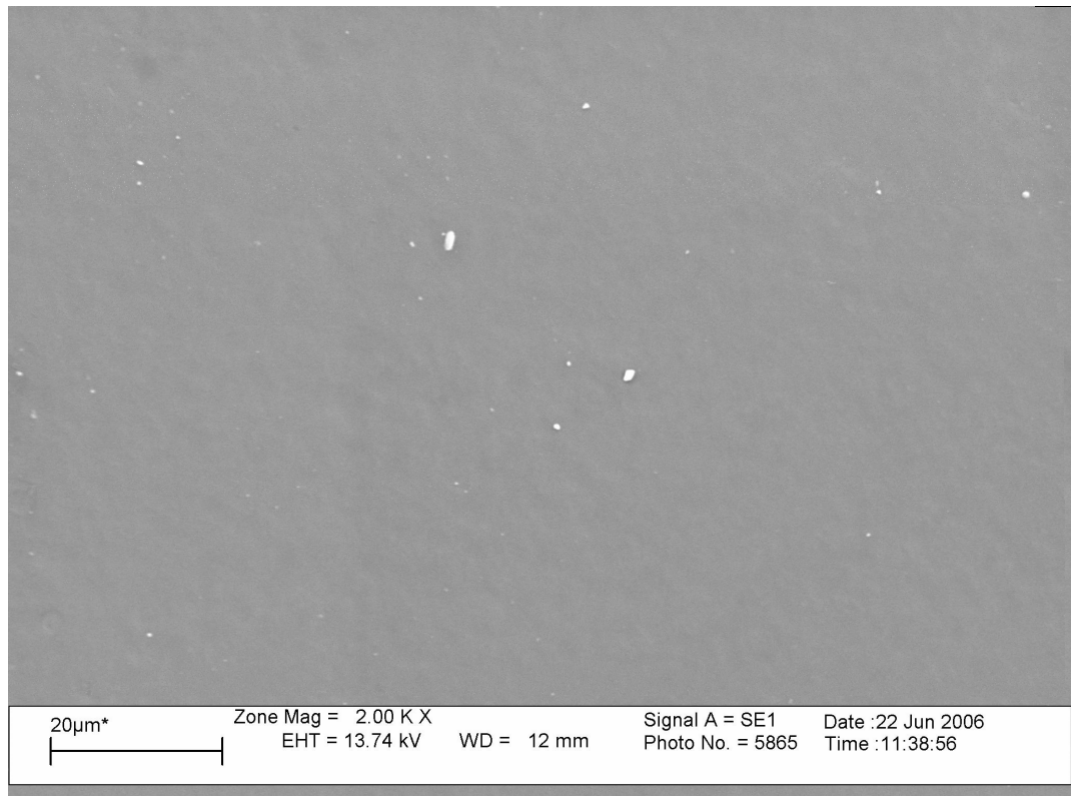


(1)

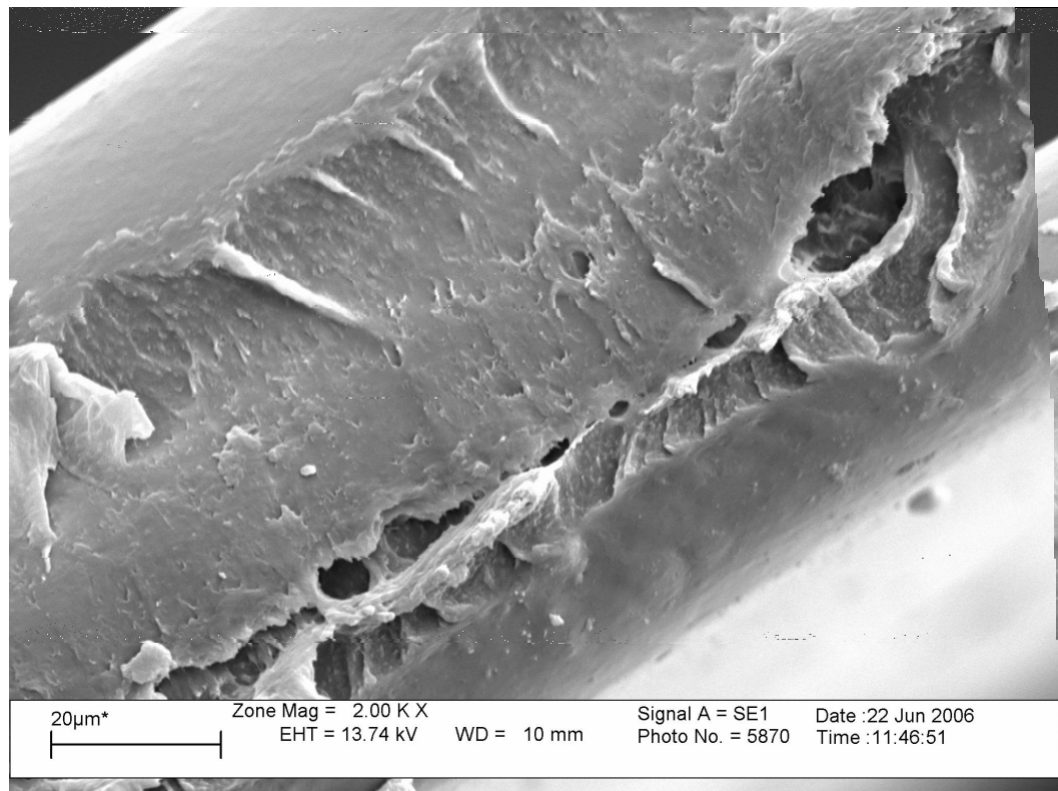


(2)

Figura 13b – Fotomicrografias superficial (1) e transversal (2), em microscopia eletrônica de varredura, do filme B - PVdC, adicionado de 1 % triclosan (ampliação de 2000x).



(1)



(2)

Figura 13c – Fotomicrografias superficial (1) e transversal (2), em microscopia eletrônica de varredura, do filme de PVdC, sem adição de antimicrobiano (ampliação de 2000x).

4.5. Avaliação de ação antimicrobiana dos filmes com triclosan e ácido sórbico

A avaliação de eficiência na ação antimicrobiana dos filmes de PVdC, foi realizada com uso dos métodos *in vitro* (halo de inibição e avaliação de alterações da curva de crescimento de microrganismos em meio líquido) e em salsichas envolvidas com os filmes, acondicionadas sob vácuo e refrigeração.

4.5.1. Ação antimicrobiana pelo método de halo de inibição

Os resultados obtidos nos testes de avaliação do halo de inibição mostraram efetividade antimicrobiana proporcional à concentração de triclosan nos filmes de PVdC, e também maior halo de inibição no caso de microrganismos mais sensíveis ao triclosan. As Figuras 14, 15 e 16 ilustram o halo de inibição do crescimento de bactérias patogênicas em teste, sendo maior o halo de inibição para *Staphylococcus aureus*, seguido de *Salmonella* e *Escherichia coli*. Para *Klebsiella*, o halo de inibição foi menor, variando de 0,3 a 5,6 mm, de acordo com a concentração de triclosan no filme de PVdC. Para *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* não se verificou formação de halo de inibição nas condições do teste (Tabela 7), com leitura de halo após 48 h. LIMJAROEN et al. (2003) observaram halo de inibição de *L. monocytogenes*, usando filme de PVdC adicionado de ácido sórbico e sorbato de potássio.

SUPPAKUL et al. (2003) indicaram forte efeito antimicrobiano de filme de polietileno com 1% de triclosan, *in vitro*, mas não foi efetivo em impedir deterioração e crescimento de *Listeria* em peito de frango estocado a 7 °C. A diferença entre resultados pode ser devido à menor migração de triclosan incorporado ao PVdC. Para *Pseudomonas aeruginosa*, a não apresentação de halo de inibição é justificada pela alta concentração inibitória mínima (MIC), com valores de até 1000 µg.mL⁻¹ para algumas linhagens (CHUANHUEN, 2003), e a migração de triclosan do filme para a superfície do meio pode não ter sido suficiente nesta metodologia de teste.

A formação de halo em testes de ação antimicrobiana é dependente da difusão do antimicrobiano e da velocidade de crescimento do microrganismo (TOLEDO, 2000). Estes parâmetros são influenciados pelo estado fisiológico da cultura indicadora, umidade do ágar, e difusão do antimicrobiano antes do início do crescimento (MELO, 2003).

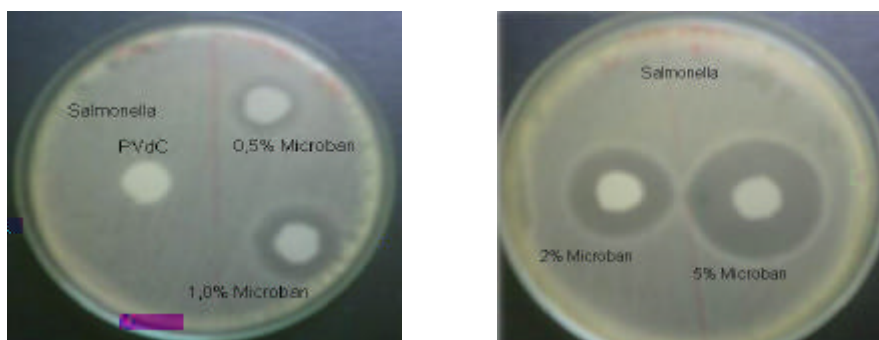


Figura 14. Halo de inibição de filmes de PVdC controle e com 0,5 a 5% de triclosan, frente a *Salmonella*.

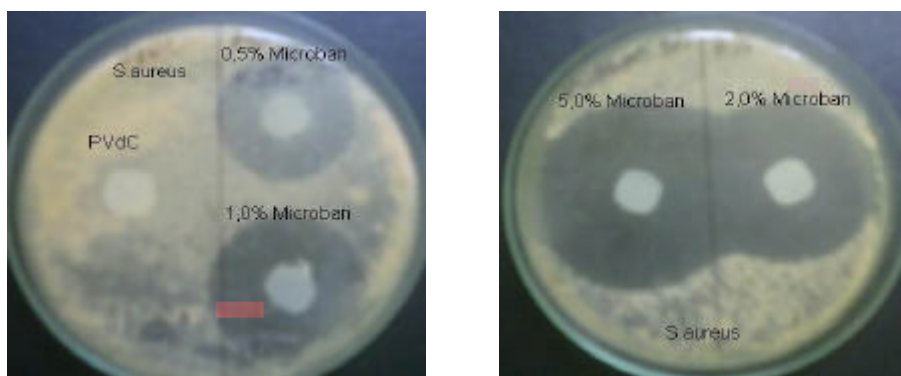


Figura 15. Halo de inibição de filmes de PVdC controle e com 0,5 a 5% de triclosan, frente a *Staphylococcus aureus*.

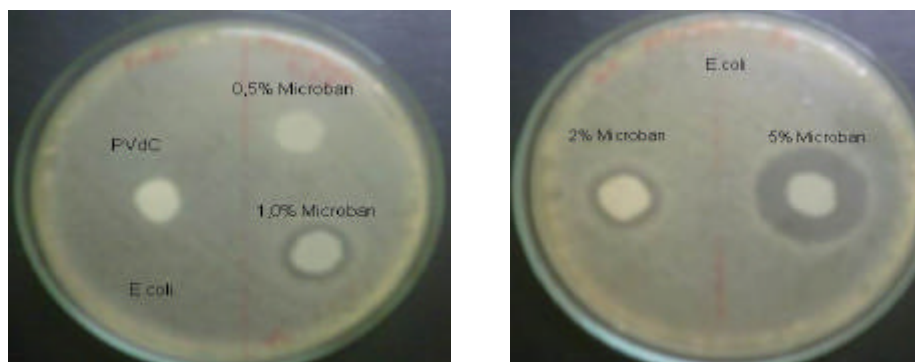


Figura 16. Halo de inibição de filmes de PVdC controle, controle e com 0,5 a 5% de triclosan, frente a *Escherichia coli*.

Tabela 7. Dimensões do raio do halo de inibição ao crescimento de microrganismos patogênicos.

Raio do halo (mm)	Concentração de triclosan no filme (%)			
	0,5 % (? ± s)	1,0 % (? ± s)	2,0 % (? ± s)	5,0 % (? ± s)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,9 ± 2,3	10,9 ± 2,7	13,2 ± 4,3	16,7 ± 4,0
<i>Salmonella</i>	2,4 ± 1,7	4,1 ± 1,4	4,8 ± 2,1	8,1 ± 1,8
<i>Escherichia coli</i>	0,2 ± 0,1	1,5 ± 0,6	2,2 ± 1,1	5,4 ± 1,8
<i>Klebsiela</i>	0,3 ± 0,3	1,2 ± 0,5	2,4 ± 1,2	5,6 ± 1,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,10 ± 0,1
<i>P. aeruginosa</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Média de três repetições, em duplicata.

A Figura 17 representa, a variação do halo de inibição em contato com filmes incorporados com diferentes concentrações de triclosan para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Klebsiella*. Observou-se que com o aumento da concentração de triclosan aumentam as dimensões do halo de inibição. Entre os microrganismos testados, o *Staphylococcus aureus* apresentou maior valor de inclinação da equação, portanto mostra ser o microrganismo mais sensível à presença do triclosan.

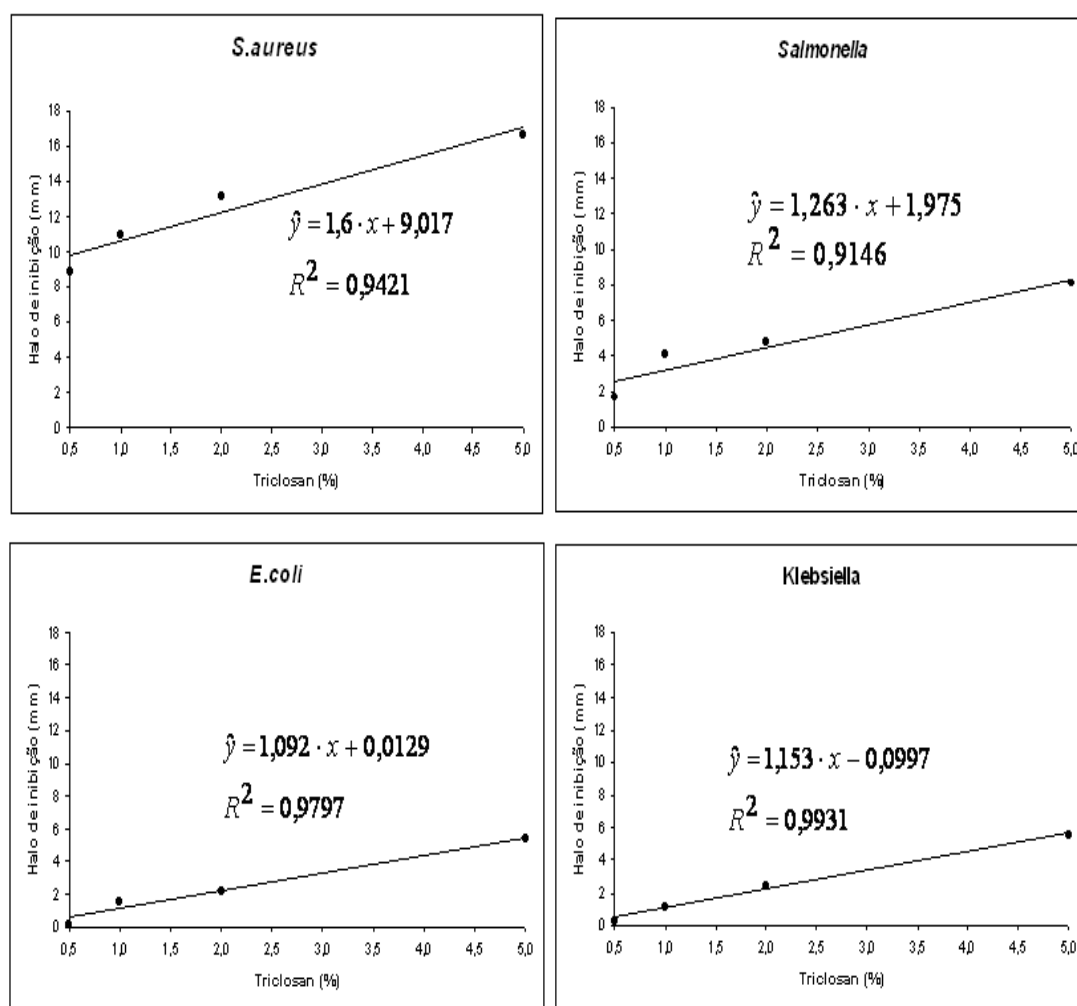


Figura 17 – Variação do halo de inibição em contato com filmes incorporados com diferentes concentrações de triclosan para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Klebsiella*.

Os filmes antimicrobianos de poli(cloreto de vinilideno) contendo triclosan apresentaram efeito inibitório contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Klebsiella* e, pela avaliação das características de aplicação a alimentos específicos, podem desempenhar papel importante na segurança e conservação dos alimentos, pelo controle da contaminação superficial destes alimentos.

4.5.2. Ação antimicrobiana por inibição da curva de crescimento em meio de cultura líquido

Os resultados obtidos nos testes de inibição da curva de crescimento podem ser observados nas Figuras 18 a 20, e utilizando-se a região linear da fase exponencial da curva de crescimento, foi possível calcular as respectivas velocidades específicas de crescimento microbiano (μ) e avaliar o aumento da fase lag.

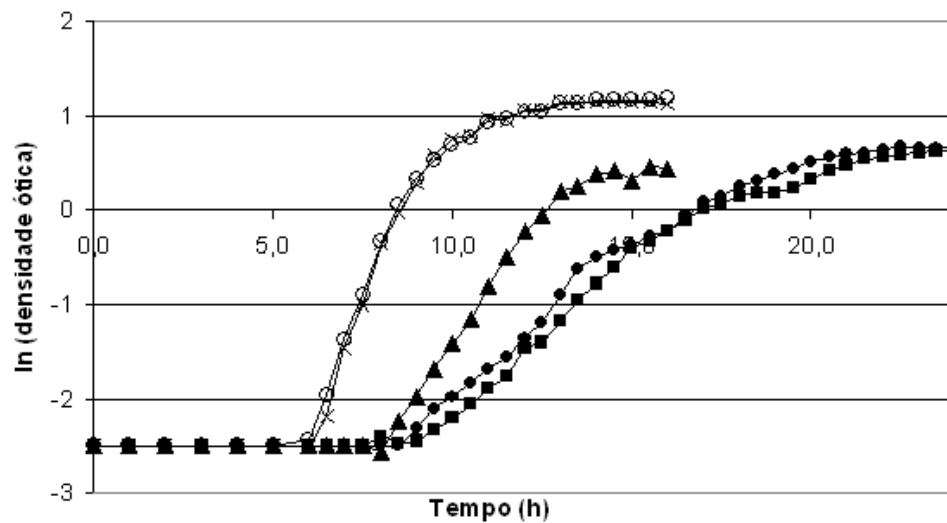


Figura 18. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* em meio TSB, na presença dos diferentes tipos de filmes de PVdC incorporados com antimicrobianos. Legenda: (○) Filme A (1 % triclosan + 2 % ácido sórbico); (◐) Filme B (1 % triclosan); (◑) Filme C (0,5 % triclosan); (◒) Filme D (controle); (x) sem filme. Média de três repetições, em duplicata.

Os gráficos permitem a comparação visual dos efeitos que os diferentes filmes provocam sobre as curvas de crescimento dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Esta comparação pode ser feita nas Figuras 18, 19 e 20 entre as curvas de crescimento de cada microrganismo individualmente, em meio TSB, sem a presença dos filmes de PVdC, e como a curva de crescimento de cada microrganismo é influenciada pela adição de filme de

PVdC, de acordo com o tratamento específico (Filmes A, B, C, D e controle, sem filme).

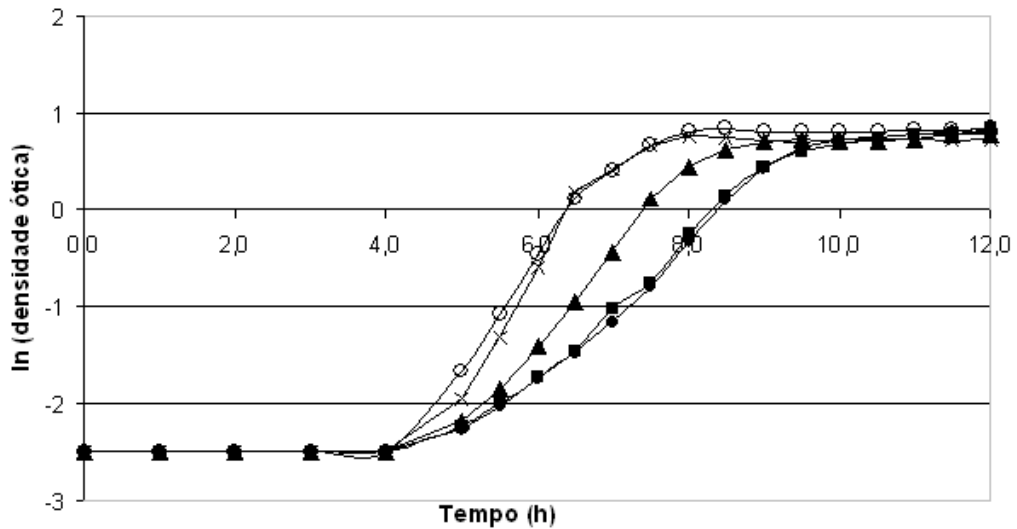


Figura 19. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* em meio TSB, na presença dos diferentes tipos de filmes de PVdC incorporados com antimicrobianos. Legenda: (○) Filme A (1 % triclosan + 2 % ácido sórbico); (∇) Filme B (1 % triclosan); (◐) Filme C (0,5 % triclosan); (△) Filme D (controle); (x) sem filme. Média de três repetições, em duplicata.

Os resultados obtidos nas curvas de crescimento foram avaliados pela alteração na velocidade de crescimento do microrganismo (μ), utilizando apenas os pontos que compõem a parte linear da fase exponencial. A aplicação de regressão linear a estes pontos permite a obtenção da inclinação desta reta e, quanto maior o valor, maior a velocidade de crescimento. O efeito inibidor do filme sobre a velocidade de crescimento do microrganismo, diminui o valor de μ .

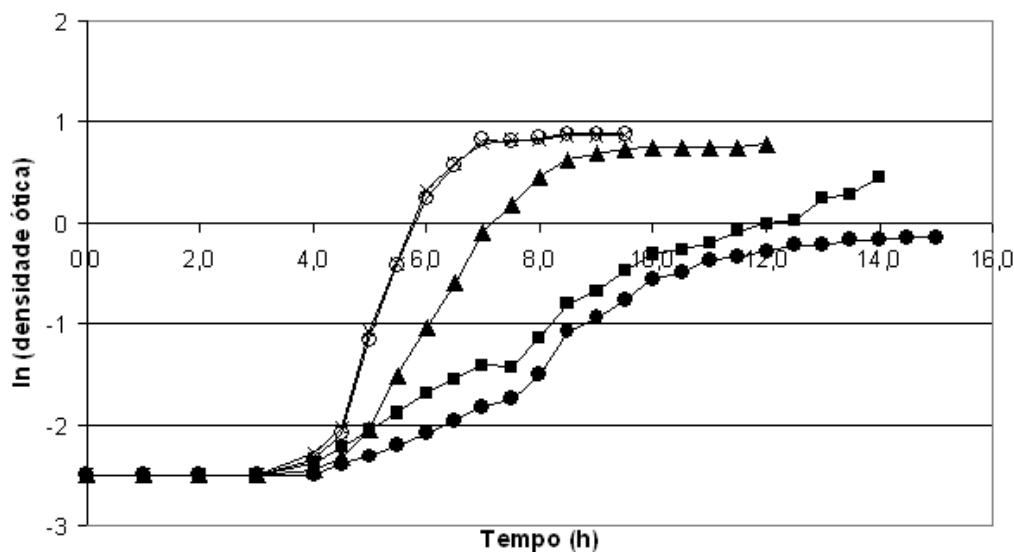


Figura 20. Curva de crescimento de *Escherichia coli* em meio TSB, na presença dos diferentes tipos de filmes de PVdC incorporados com antimicrobianos. Legenda: (○) Filme A (1 % triclosan + 2 % ácido sórbico); (▲) Filme B (1 % triclosan); (■) Filme C (0,5 % triclosan); (●) Filme D (controle); (x) sem filme. Média de três repetições, em duplicata.

A Tabela 8 apresenta os valores de μ (velocidade de crescimento na fase exponencial). Observou-se, de forma geral, que os filmes A e B, contendo 1 % de triclosan, apresentaram os menores valores de μ , indicando que o antimicrobiano aplicado ao filme diminuiu a velocidade de crescimento dos microrganismos patogênicos em teste, sendo a diferença significativa para *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Para *Staphylococcus aureus*, o filme A, com 1 % triclosan e 2 % de ácido sórbico, apresentou menor velocidade de crescimento, diferindo significativamente do filme D, sem adição de conservante ($P < 0,05$), mas não diferindo significativamente dos outros tratamentos.

Tabela 8. Valores médios da variável velocidade de crescimento na fase exponencial (μ , em h^{-1}), em contato com diferentes filmes de PVdC.

<i>Filmes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (? \pm s)(h^{-1})	<i>Listeria monocytogenes</i> (? \pm s) (h^{-1})	<i>Escherichia coli</i> (? \pm s) (h^{-1})
A (1 % triclosan + 2 % ác. sórbico)	0,5 \pm 0,1 ^b	0,7 \pm 0,1 ^c	0,4 \pm 0,1 ^b
B (1 % triclosan)	0,6 \pm 0,1 ^{ab}	0,7 \pm 0,1 ^c	0,5 \pm 0,4 ^b
C (0,5 % triclosan)	0,6 \pm 0,1 ^{ab}	0,9 \pm 0,1 ^b	1,0 \pm 0,1 ^a
D (sem antimicrobiano)	0,8 \pm 0,3 ^a	1,1 \pm 0,2 ^a	1,1 \pm 0,1 ^a
Controle (sem filme)	0,8 \pm 0,1 ^{ab}	1,0 \pm 0,2 ^{ab}	1,2 \pm 0,1 ^a

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si, em teste de Duncan ($P < 0,05$). Três repetições, em duplicata.

A adição de ácido sórbico ao filme A, não indicou alteração do efeito antimicrobiano quando comparado com o filme B, portanto não se observa efeito adicional de inibição por ação do ácido sórbico. O filme C, com 0,5% de triclosan, apresentou ação intermediária na inibição do crescimento microbiano, comparado com os valores de crescimento para filme D, sem adição de antimicrobiano e na curva controle. CHUNG et al. (2003), avaliando a ação antimicrobiana de copolímero de estireno-acrilato adicionado de triclosan contra *Enterococcus faecalis*, observaram redução de 60 % na velocidade de crescimento, comparada ao controle, sem antimicrobiano, e não observaram efeito sobre a fase lag. KALYON e OLGUN (2001) testaram o polímero estireno adicionado de 1,5 a 3 % de triclosan e observaram que estes reduzem o crescimento (menor densidade óptica) de *Escherichia coli* e *Bacillus thuringiensis* nas primeiras 5 horas, mas a densidade óptica se mantinha igual ao controle após 20 horas do experimento, não sendo avaliada a velocidade de crescimento na fase exponencial.

A Tabela 9 apresenta a influência do tipo de antimicrobiano adicionado ao filme de PVdC sobre o tempo de fase lag do microrganismo. Observa-se que os filmes A e B, com 1 % de triclosan, têm maior influência sobre o aumento da fase lag, seguido pelo filme C, que possui 0,5 % de triclosan. A adição de ácido sórbico ao filme A, não indicou alteração do

efeito antimicrobiano quando comparado com o filme B. O microrganismo mais sensível ao aumento da fase lag, por ação de triclosan, foi o *Staphylococcus aureus*, seguido de *Escherichia coli*. A adição de triclosan ao filme não apresentou efeito significativo sobre a fase lag de *Listeria monocytogenes*.

Tabela 9. Aumento da fase lag por ação dos diferentes filmes de PVdC com antimicrobianos.

Filmes	<i>Staphylococcus aureus</i> (? ± s) h	<i>Listeria monocytogenes</i> (? ± s) h	<i>Escherichia coli</i> (? ± s) h
A (% triclosan + 2 % ác. sórbico)	11,7 ± 3,7 ^a	5,8 ± 2,1 ^a	7,9 ± 0,3 ^a
B (1 % triclosan)	11,7 ± 3,0 ^a	6,9 ± 1,0 ^a	7,5 ± 1,1 ^a
C (0,5 % triclosan)	10,2 ± 0,8 ^{ab}	6,4 ± 0,9 ^a	6,1 ± 0,8 ^b
D (sem antimicrobiano)	7,3 ± 1,1 ^b	5,7 ± 0,7 ^a	4,9 ± 0,1 ^c
Controle (sem filme)	7,3 ± 1,0 ^b	5,5 ± 0,5 ^a	4,9 ± 0,2 ^c

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si, em teste de Duncan (P < 0,07). Três repetições, em duplicata.

Os filmes antimicrobianos de poli(cloreto de vinilideno) co

Experimento a) Utilização de salsicha tratada por esterilização comercial e análise em meio de cultura não-seletivo

A Figura 21 mostra os resultados de contagem microbiológica em salsichas envolvidas com filmes antimicrobianos de PVdC. Os resultados obtidos mostram que os filmes A e B apresentaram maior limitação de crescimento de *Staphylococcus aureus*, comparando-se com o filme C e controle, nos tempos de 5 e 10 dias. Com relação à *Escherichia coli*, não se observou diferença de comportamento do crescimento com relação à composição dos filmes, o que mostra não haver ação antimicrobiana contra esta bactéria, neste teste. No gráfico de crescimento de *Listeria monocytogenes*, observou-se maior limitação de crescimento relativo aos filmes A e B, nos tempos iniciais, mas o comportamento do crescimento de *L. monocytogenes* frente ao filme D (controle) foi similar, e a salsicha embalada com o filme C, apresentou maior crescimento (Figura 21).

As variações observadas neste teste podem ser devidas a dois principais fatores: 1) meio de cultura não seletivo, e 2) as salsichas utilizadas no teste possuíam textura macia e facilidade em apresentar poros, nos quais possivelmente houve penetração de bactérias ao interior da salsicha e isso poderia levar a contaminação inicial não somente à superfície. Assim sendo, a ação do filme antimicrobiano ocorreu apenas no ponto de contato entre o filme e a superfície da salsicha, não atuando sobre as bactérias localizadas em camada ao interior desta.

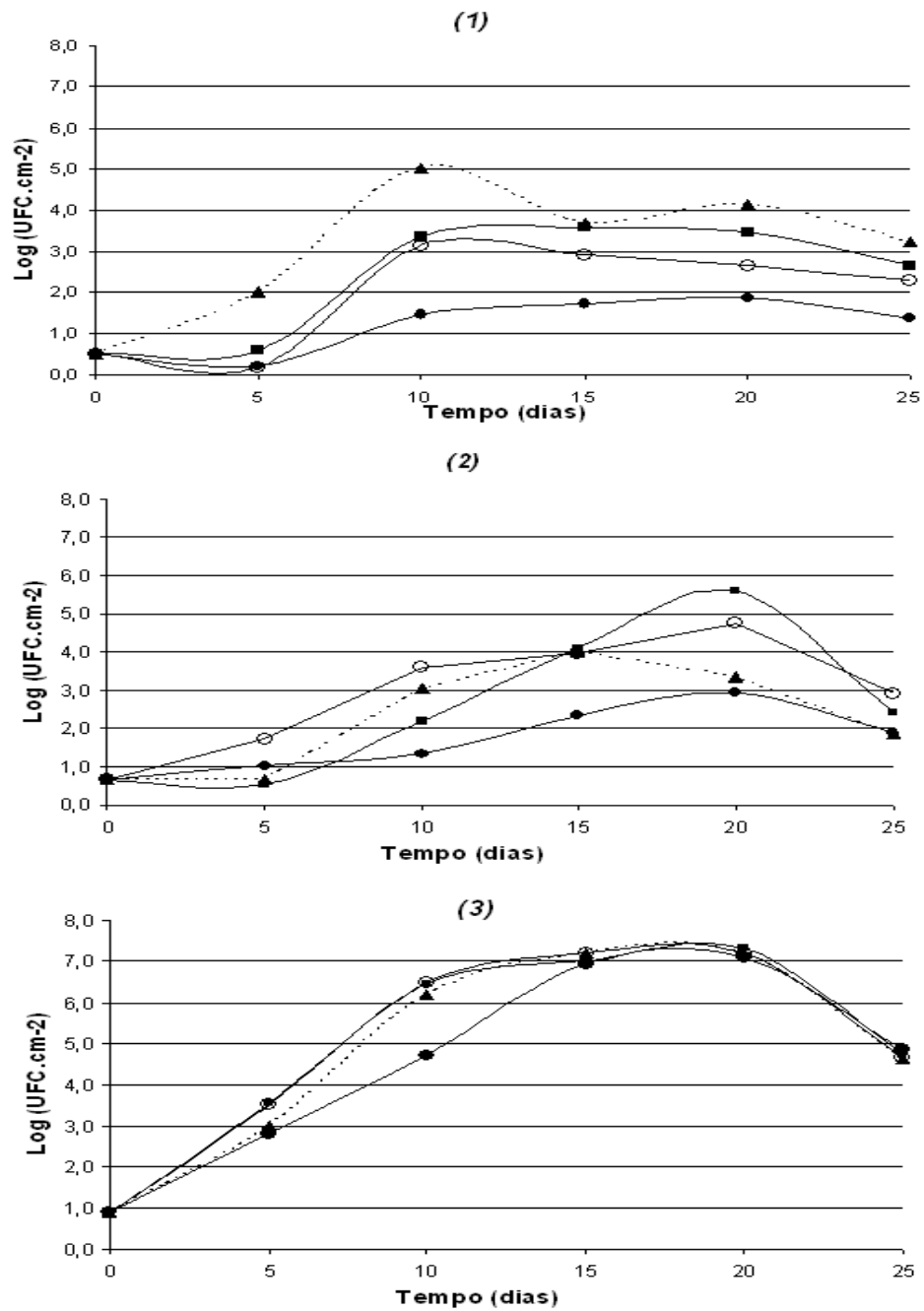


Figura 21 - Crescimento de *Listeria monocytogenes* (1), *Staphylococcus aureus* (2) e *Escherichia coli* (3), em salsichas envolvidas com filmes de PVdC incorporados com antimicrobianos, estocados sob refrigeração. Análises realizadas em meio de cultura não-seletivo (TSA). Legenda: (●) Filme A (1 % triclosan + 2 % ácido sórbico); (▲) Filme B (1 % triclosan); (○) Filme C (0,5 % triclosan); (■) Filme D (controle). Média de três repetições.

Experimento b) Utilização de salsicha esterilizada por irradiação e análise em meio seletivo

Os resultados apresentados na Figura 22 referem-se à primeira repetição e, no gráfico de crescimento de *Listeria monocytogenes* observa-se que, após a fase adaptação, houve menor velocidade de crescimento relativo aos filmes B e E, com 1 % e 3 % de triclosan, respectivamente. Salsicha embalada com o filme D (controle), apresentou maior velocidade de crescimento. O teste com *Staphylococcus aureus* não apresentou crescimento em nenhum dos tratamentos. Nas outras repetições, o teste falhou na avaliação de ação antimicrobiana sobre as salsichas inoculadas com *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, pois não se observou crescimento nas condições de teste. Um dos fatores que podem justificar tal fato está na contagem total inicial da salsicha que, mesmo com o tratamento de irradiação, apresentou-se na faixa de 10^4 UFC.g⁻¹, e à baixa capacidade de competição de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* frente à flora deterioradora. Nos tempos 20 e 25 dias, a contagem total apresentava-se na ordem de 10^5 a 10^7 UFC.g⁻¹.

BRAID e WALE (2002), ao estudar a ação antimicrobiana de caixas plásticas incorporadas com triclosan, observaram a ação antimicrobiana foi efetiva a temperaturas de 30 e 22 °C, para *Escherichia coli*, mas não efetiva sob refrigeração, a 4 °C, indicando que o efeito inibitório é dependente da temperatura. A baixa temperatura possivelmente reduz a migração de triclosan do filme para o produto.

VERMEIREN et al. (2002a), citando CUTTER et al. (1999) indicam que plásticos adicionados de triclosan têm efeito antimicrobiano em testes de recobrimento em placas, mas quando o plástico é combinado com embalagem sob vácuo e estocagem refrigerada, as bactérias não são suficientemente reduzidas em superfícies de carnes. Indicam possível interação entre triclosan e compostos gordurosos como responsável por esta inatividade. VERMEIREN et al. (2002a) descrevem teste em que filme de polietileno adicionado de 0,1 % de triclosan foi efetivo em limitar crescimento de *Listeria monocytogenes* em temperatura de 7 °C, utilizando placas de

meio de cultura TSA. Este mesmo teste com carne de peito de frango não apresentou efeito inibitório no crescimento de *Listeria monocytogenes*, em contraste com o teste *in vitro*.

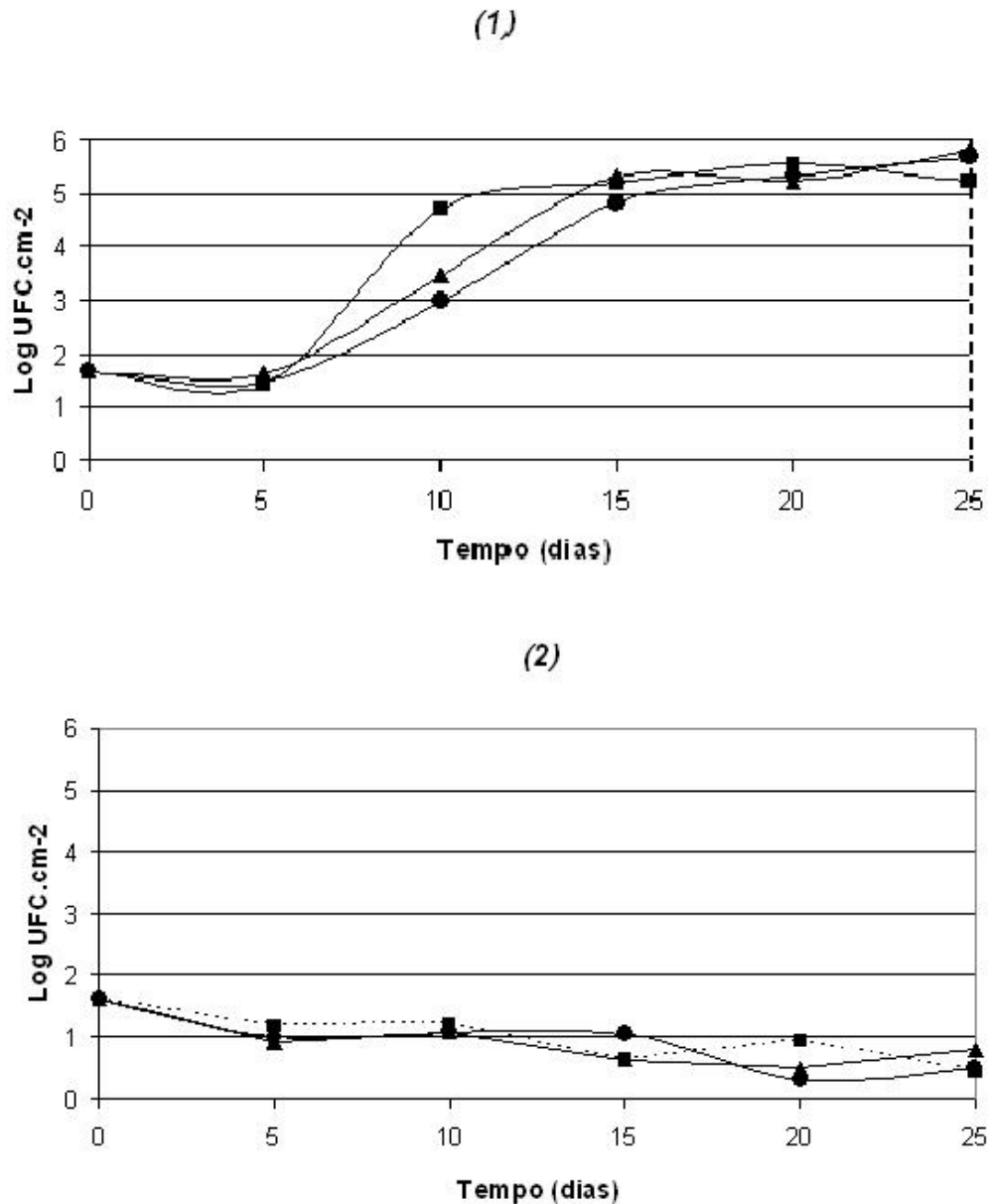


Figura 22 - Crescimento microbiano de *Listeria monocytogenes* (1) e *Staphylococcus aureus* (2), em salsichas envolvidas com filmes de PVdC incorporados com antimicrobianos. Análises realizadas em meio de cultura seletivo. Legenda: (●) Filme B (1 % triclosan); (▲) Filme E (3 % triclosan); (◻) Filme D (controle).

5. CONCLUSÕES

Os filmes antimicrobianos de poli(cloreto de vinilideno) contendo triclosan apresentaram efeito inibitório contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, nos testes *in vitro*, e avaliando-se as características de aplicação a alimentos específicos, podem desempenhar papel importante na segurança e conservação dos alimentos, através do controle da contaminação superficial.

Filmes de poli(cloreto de vinilideno) adicionados de ácido sórbico em conjunto com triclosan, não aumentaram a eficácia da ação antimicrobiana, nas concentrações e condições de teste utilizadas.

A adição do antimicrobiano triclosan em filmes de poli(cloreto de vinilideno) manteve as propriedades de resistência da termossoldagem e alongamento, com pequena redução na resistência à tração, sendo viável sua aplicação em filmes antimicrobianos de PVdC.

A quantidade do triclosan que migrou para o alimento, de $2,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, foi inferior ao limite estabelecido pela Comunidade Européia, não sendo a migração um impedimento para seu uso.

É necessário ampliar os testes para avaliação da ação antimicrobiana em salsicha, considerando a complexidade em controlar todas as condições de teste de contaminação microbiológica em salsicha e determinar a eficiência dos filmes de PVdC adicionados de triclosan, em embalagem de salsicha.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEPCS – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUÇÃO E EXPORTAÇÃO DE CARNE SUÍNA. **Participação do Brasil perante a produção mundial de carne**. In: Informativo ABIEPCS. Ano IV, nº 45, Janeiro/2005. Disponível na internet em < http://www.abiepcs.com.br/foco_45.pdf>. Acesso em 22/10/2005.

ASTM - AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**. D882-91. Philadelphia:ASTM, 1996, 9 p.

ANVISA. Portaria 105/1999. Embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos: classificação dos alimentos e simulantes. Disponível na internet em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19772&word=#>> Acesso em: 08/01/2007.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v.3, p.113-126, 2002.

ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos. 2001. **Perspectiva para a indústria de alimentação no Brasil - panorama gráfico-estatístico**. Home-page:www.abia.gov.br. Acesso em 27/01/2003.

BAFFA JÚNIOR Jr, J.C.; SOARES, N.F.F.; MELO, N.R.; FONTES, E.A.F.; GERALDINE, R.M. Migração de agente antimicrobiano incorporado em caixa plástica ativa. In. **6º Simpósio Latinoamericano de Ciência dos Alimentos - Anais**. Campinas - SP, 2005.

BEEFPOINT. **Projeções para o mercado mundial de carne bovina: 2005-2012**. Disponível na Internet em <http://www.beefpoint.com.br/bn/especiais/artigo.asp?area=&id_artigo=24599&nv=1&area_desc=>> Acesso em 20/10/2005.

BOWER, C. K.; PARKER, J. E.; HIGGINS, A. Z.; OEST, M. E.; WILSON, J. T.; VALENTINE, B. A.; BOTHWELL, M. K.; McGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**, v.25, p.81-90, 2002.

BRAID, J.J.; WALE, M.C.J. The antibacterial activity of triclosan-impregnated storage boxes against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Shewanella putrefaciens* in conditions simulating domestic use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49:p.87-94, 2002.

BRODY, A.L.; STRUPINSKY, E.R.; KLINE, L.R. **Active Packaging for Food Applications**. CRC Press. 2001.

BUONOCORE, A.G.G.; CONTE, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; DEL NOBILE, M. A. Mono- and multilayer active films containing lysozyme as antimicrobial agent. In: **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. V. 6, p. 459 – 464. 2005.

BUTLER, B.L. Cryovac® OS2000™ **Polymeric Oxygen Scavenging Systems**. Apresentado na Worldpak, 2002. Disponível na internet: <<http://www.sealedair.com/library/articles/article-os2000.html>>. Acesso em 17/02/2006.

CHO, Y. M.; ILAN, S. S.; KO, S. W. PVA containing chito-oligassacharide side chain. **Polymers**, v. 41(6):2033-6, 2000.

CHUANCHUEN, R. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. **American Journal of Infection Control**. 31, 124-127, 2003.

CHUNG, D.; PAPADAKIS, S.E.; YAM, K.L. Evaluation of a polymer coating containing triclosan as the antimicrobial layer for packaging materials. **International Journal of Food Science & Technology**, v.38(2), fev. 2003.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, L.M. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. 71:1-20, 2001.

COOKSEY, K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. **Food Additives and Contaminants**, 22(1):980-987, 2005.

DURANGO, A.M.; SOARES, N.F.F.; BENEVIDES, S.; SILVA, M.; TEIXEIRA, J.; WOBETO, C.; ANDRADE, N.J. **Desenvolvimento e avaliação de um filme comestível antimicrobiano a base de amido de inhame e quitosana**. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 17-20 /novembro-2003, Florianópolis, SC.

EL AMIN, AHMED. **Nanotechnology targets new food packaging products**. 12/outubro/2005. Disponível na internet em <www.sustainpack.com/news.php?id=39>. Acesso 13/fev/2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004**. Disponível na internet em http://www.efsa.eu.int/science/monitoring_zoonoses/reports/1277_en.html. Acesso em 26/dezembro/2005.

FABECH, B.; HELLSTROM, T.; HENRYSDOTTER, G.; NILSSON, J.; RÜDINGER, L.; SOLLI, E.; SVENSSON, K.; THORKESSON, A.; TUOMAALA, V. **Active and Intelligent Food Packaging – A Nordic report in the legislative aspects**. Disponível na internet em: <<http://www.norden.org/pub/sk/showpub.asp?pubnr=2000:584>>. Acessado em abril/2005.

FERREIRA, R.C. **O futuro do setor cárneo brasileiro**. <www.faemg.org.br> consultado em 10/01/2002.

GONTARD, N. **Active packaging**. In: SOBRAL, P.J.A.; CHUZEL, G., eds. Workshop sobre biopolímeros, Pirassununga – SP. FZEA, p. 23-27, 1997.

- HAN, J.H. Antimicrobial Food Packaging. In_ **Food Technology**, 54(3):56-65. 2000.
- HAN, J.H. **Antimicrobials and package system design. Session 24, Packaging tackles food safety: A look at antimicrobials.** In: 2002 ANNUAL MEETING AND FOOD EXPO. Anaheim – CA. Disponível em <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_9793.htm>. Acesso em: 19/02/2006.
- HAN, J.H. Antimicrobial Food Packaging. In_ AHVENAINEN, RAIJA. **Novel food packaging techniques.** CRC Press – Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. 2003.
- HAN, J.H.; FLOROS, J.D. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. In_ **Journal of Plastic Film & Sheeting.** Vol. 13 no 4, p 287-298, 1997.
- HAN, J.H.; FLOROS, J.D. Modelling Antimicrobial Activity Loss os Potassium Sorbate Against Baker's Yeast after Heat Process to Develop Antimicrobial Food Packaging Materials. In _ **Food Science Biotechnology**, 8(1):11-14, 1999.
- HAN, J.H. , FLOROS, J.D. Modelling the Growth Inhibition Kinetics of Baker's Yeast by Potassium Sorbate using Statistical Approaches. In_ **Journal of Food Science**, 63:12-14, 1998.
- HONG, S. I.; PARK, J. D.; KIM, D. M. Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. **Food Science Biotechnology** 9 (1):38-42, 1998.
- HOUTSMA, P.C.; WIT, J.C.; ROMBOUTS, F.M. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occuring in meat products. **International Journal of Food Microbiology.** 20 (1993) 247-257.
- ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Ecologia Microbiana de los Alimentos – 2. Productos alimentícios.** Ed. Acribia. Zaragoza – Espanha. 1980.
- JAY, J.M. **Modern Food Microbiology.** 4ª Ed. Chapman & Hall, New York, 1992.
- JONG, A. R.; BOUMANS, H.; SLAGHEK, T.; VEEN, J.; RIJK, R.; ZANDVOORT, M.N. Active and intelligent packaging for food: Is it the future? **Food Additives and Contaminants**, 22(10)975-979, 2005.
- KALYON, B.; OLGUN, U. Antibacterial efficacy of triclosan incorporated polymers. **American Journal of Infection Control.** 29:p. 124-125, 2001.
- LACOSTE, A.; SCHAICH, K.M.; ZUMBRUNNEN, D. YAM, K.L. Advancing Controlled Release Packaging through Smart Blending. **Packaging Technology and Science**, 18, 77-87, 2005.
- LEE, D. S.; IIWANG, Y. I.; CHO, S. Developing antimicrobial packaging film for curled lettuce and soy-bean sprouts. **Food Science Biotechnology** 7(2): 117-21, 1998.

LIMJAROEN, P.; RYSER, E.; LOCKHART, H.; HARTE, B. Development of a Packaging Coating Material with Antimicrobial Properties. **Journal of Plastic Film and Sheeting**. vol 19, nº 2, p. 95-109, 2003.

MARKARIAN, J. Packaging gets active additives lead the way. In_ **Plastics, Additives and Compounding**. 6(2):22-25. 2004.

MELO, N.R. **Avaliação de Embalagem Ativa por Incorporação de Nisina na Inibição de *Staphylococcus sp.*** M.Sc. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2003. 88 p.

MELO, N.R.; WURLITZER, N.J.; BASTOS, M.S.R.; SOARES, N.F.F.; MACEDO, V.F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes incorporados com lactato de sódio em salsichas embaladas a vácuo.** In: Anais do 18º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. CD-rom, seção Carnes e Pescado. Porto Alegre - RS. 2002.

MING, X.; WEBER, G.; AYRES, J.; SANDINE, W. Bacteriocins Applied to Food Packaging Materials to Inhibit *Listeria monocytogenes* on Meats. **Journal of Food Science**, v. 62, nº 2, p.413-415, 1997.

NATRAJAN, N.; SHELDON, B. W. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. **Journal of Food Protection**, v.63, n.9, p.1268-1272, 2000.

OLIVEIRA, L.M. **Embalagens ativas e inteligentes para produtos cárneos.** Revista Nacional da Carne. Nº 329 – julho, 2004.

OLIVEIRA, L.M.; ALVES, R.M.V.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; PADULA, M.; GARCIA, E.E.C.; COLTRO, L. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis.** Centro de Tecnologia de Embalagem – CETEA – ITAL – SP. Campinas, 1996. 219 p.

OLIVEIRA, L.M.; OLIVEIRA, P.L.V. Revisão: Principais Agentes Antimicrobianos Utilizados em Embalagens Plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**. V.7(2):161-165. 2004.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Active Food Packaging Technologies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44:185-193, 2004.

PADHYE, N. V. e DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**. v. 55, n.7, p.555-565. 1992.

PADULA, M.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.E.C.; OLIVEIRA, L.M.; ALVES, R.M.V. **Embalagens Plásticas: Controle de Qualidade.** CETEA – ITAL. Campinas, 1989.

PAIK, J.S.; DHANASEKHARAN, M.; KELLY, M.J. Antimicrobial Activity of UV-Irradiated Nylon Film for Packaging Applications. **Packaging Technology and Science**, 11, 179 – 187. 1998.

PARLAMENTO EUROPEU. **Regulamento (CE) n.º 1935/2004, relativo aos materiais e objetos destinados a entrar em contato com os alimentos.** Disponível em <<http://europa.eu.int/eur-Lex/lex/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32004R1935:PT:HTML>>. Acesso em 16/10/2005.

QUINTAVALLA, S. e VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62 (3): p373-380, 2002.

ROONEY, M.L. Active packaging in polymer films. In: **Active Food Packaging** (Rooney, M.L. ed) London, Blakie Academic and Professional, p. 74-110 1995.

ROBERTSON, G.L. **Food Packaging – Principles and Practice**. Marcel Dekker, Inc. Nova York, EUA. 1992.

SARANTÓPOULOS, C.L., OLIVEIRA, L.M. CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. ITAL, Campinas – SP, 213 p. 2001.

SCANNELL, AG.M.; HILL, C.; ROSS, R.P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E.K. **Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin**. International Journal of Food Microbiology 60, (2000) 241– 249.

SCF - SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOODS. **Opinion of the Scientific Committee on Food on the 10 th additional list of monomers and additives for food contact materials**. Adopted by the SCF on 22/6/2000. CS/PM/GEN/M82 final, 11 July 2000. Disponível: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index>.

SEGALA, D.; FERREIRA, A. S. Setor de tripas impulsionado pelo aumento de consumo de embutidos. **Revista Nacional da Carne**, Ano XXV, No 289, Março/2001.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.; ANDRADE, N.J.; NASCIMENTO, E.A.; PINHEIRO, A.L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**. 6(1):63-70, 2003.

SILVA, A.S.; GARCÍA, R.S.; HERNÁNDEZ, J.L.; LOSADA, P.P. Determination of triclosan in foodstuffs. **Journal of Separation Science**, 28:65-782. 2005.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W., HADDAD, A.; SILVEIRA, M.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; SOUTO-PADRÓN, T. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, v. 1, p. 71 – 79, 1989.

SILVEIRA, M.F.A. **Filme antimicrobiano de acetato de celulose incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. Tese (Doutorado). Viçosa : UFV, 2005.

SOARES, N.F.F. **Bitterness Reduction in Citrus Juice Through Naringinase Immobilized into Polymer Film**. Ph.D. Dissertation, New York: Cornell University, 130p., 1998.

SOARES, N.F.F.; SILVA, C. A. S.; SILVEIRA, M. F. A.; GERALDINE, R. M. **Atividade antimicrobiana de embalagem ativa incorporada com ácido propiônico**. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 17-22/Novembro,2003 . CD-ROM

SOARES, N.F.F., CRUZ, R.S., VILLADIEGO, A.M.D., MELO, N.R., SILVEIRA, M.F.A., BASTOS, M.S.R., GERALDINE, R.M., WURLITZER, N.J., RODRIGUES, P.P.C.F. Embalagem ativa na conservação de alimentos. In: Azeredo HMC. (eds) **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza-CE, EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2004. p. 167 – 195.

SONOCO NOTÍCIAS. **Café pronto para beber**. Disponível na internet em: <<http://www.sonocoforplas.com.br/noticias.html>>, acesso em 23/02/2006.

STEVEN, M.D.; HOTCHKISS, J.H. Non-migratory bioactive polymers (NMBP) in food packaging. In_ AHVENAINEN, RAIJA. **Novel food packaging techniques**. CRC Press – Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. 2003.

SUPPAKUL, P.; MILTZ J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science** v 68(2): 408-420, 2003.

TAOUKIS, P.S.; LABUZA, T.P. Time-temperature indicators (TTIs). In_ AHVENAINEN, RAIJA. **Novel food packaging techniques**. CRC Press – Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. 2003.

TEMPRATECH. **I C Can - self-refrigerating can**. <<http://www.tempratech.com/chill1.html>> Acesso em 23/02/2006.

TOLEDO, M.M. **Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCK 400 e Produção de Nisina em Meio à Base de Extratos Vegetais**. Viçosa – MG: UFV, 2000. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTIESSER, D.F **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, 3ª ed., 1218p, 2000.

VARTIAINEN, J.; SKYTA, E.; ENQVIST, J.; AHVENAINEN, R. Properties of a antimicrobial plastics containing traditional food preservatives. **Packaging Technology and Science**, 16(6):223-229. John Wiley and Sons, Ltd. 2003.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v.19 - suplemento, p.163-171, 2002a.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; Van BEEST, M.; KRUIJF de N.; DEBEVERE, J. Development in the active packaging of foods. **Trends in Food Science e Technology**, v.10, p.77-86, 2002b.

WENG, Y.; HOTCHKISS, J. H. Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. **Packaging Technology and Science**, v.6, p.123-128, 1993.

WENG, Y.; HOTCHKISS, J. H. Inhibition os Surface Molds on Cheese by Polyethylene Film Containing the Antimycotic Imazalil. **Journal of Food Protection**, vol 55, nº 5, p. 367-369, 1992.

WILMINK, M. Improving shelf-life and safety – lactate can inhibit the growth of spoilage and pathogenic bacteria in meat products. In: **Fleischwirtschaft International**. Frankfurt. Vol 4,p. 28-30, 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponível na internet em < <http://w3.who.sea.org/microbio/ch7.htm> >. Acesso em 14/fev/2006.

WURLITZER, N.J.; SOARES, N.F.F.; BASTOS, M.S.R.; VILLADIEGO, A.D.; ANDRADE, N.J. **Incorporação de triclosan em filme de poli(cloreto de vinilideno) para controle de microrganismos patogênicos em alimentos**. II Seminário Internacional de Gestão da Inovação Tecnológica no Nordeste – INOVA. Anais. Fortaleza – CE. 2005.

YAMADA, E. Desenvolvimento de sistema de embalagem antimicrobiana. In: **Boletim CTC TecnoCarnes**, Vol XM. Ital, Campinas – SP, 2004.

7. ANEXOS

Tabelas de análise estatística

Espessura:

Tabela 10 – Resumo da análise de variância para espessura dos corpos de prova para os filmes de PVdC e PVdC com poliéster.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio	
		PVdC	PVdC com poliéster
Filmes	4	0,00 ^{n.s}	0,00 ^{n.s}
Resíduo	10	0,00	0,00
CV(%)		7,58	10,99

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Propriedades de tração:

Tabela 11 – Resumo da análise de variância das variáveis resistência máxima à tração e alongamento para filmes de PVdC.

Fonte de variação	G.L	Quadrado médio	
		Resistência máxima à tração	alongamento
Filmes	4	1,97*	9,04 ^{n.s}
Resíduo	10	0,28	27,90
CV(%)		5,74	1,80

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 12 – Resumo da análise de variância das variáveis resistência máxima à tração e alongamento para termossoldagem de filmes de PVdC.

Fonte de variação	G.L	Quadrado médio	
		Resistência máxima à tração	alongamento
Filmes	4	0,52*	14,88 ^{n.s}
Resíduo	10	0,08	16,08
CV(%)		4,53	1,35

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 13 – Resumo da análise de variância das variáveis resistência máxima à tração e alongamento para termossoldagem de filmes de PVdC+poliéster.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio	
		termossoldagem	alongamento/termossaldagem
Filmes	4	17,69 ^{n.s}	30,20 ^{n.s}
Resíduo	10	12,27	56,31
CV(%)		9,81	29,07

Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

TPVA - Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água:

Tabela 14 – Resumo da análise de variância variável TPVA para diferentes filmes.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Filmes	4	0,20 ^{n.s}
Resíduo	15	0,32
CV(%)		19,10

Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Ação antimicrobiana por análise de Halo de inibição:

Tabela 15 – Resumo da análise de variância para teste do halo para os diferentes microrganismos em contato com os filmes incorporados com diferentes concentrações de triclosan.

Fonte de variação	G.L	QM			
		<i>S.aureus</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>
Data de fabricação	2	0,79	0,30	0,34	0,22
Triclosan	3	66,25*	42,48*	29,66*	32,61*
Resíduo	18	12,88	3,07	1,31	0,74
C.V(%)		28,91	37,61	49,13	36,70

Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 16 – Resumo da análise de regressão para teste do halo para os diferentes microrganismos em contato com os filmes incorporados com diferentes concentrações de triclosan.

Linear					
Fonte de variação	G.L	QM			
		<i>S.aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>
Regressão	1	187,20	116,56	87,19	97,18
Falta de ajustamento	2	5,77 ^{n.s}	5,44 ^{n.s}	0,90 ^{n.s}	0,33 ^{n.s}
Triclosan	(3)	66,25*	42,48*	29,66*	32,61*
Resíduo	18	12,88	3,07	1,31	0,74
Quadrática					
Fonte de variação	G.L	QM			
		<i>S.aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>
Regressão	2	99,06*	60,62*	43,80*	48,89*
Falta de ajustamento	1	0,61 ^{n.s}	6,21 ^{n.s}	1,39 ^{n.s}	0,07 ^{n.s}
Triclosan	(3)	66,25*	42,48*	29,66*	32,61*
Resíduo	18	12,88	3,07	1,31	0,74

Ação antimicrobiana avaliada através da curva de crescimento:

Tabela 17– Resumo da análise de variância da taxa de crescimento dos microrganismos (h^{-1}) em contato com diferentes filmes.

Fonte de variação	G.L	Quadrado médio		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
Filmes	4	0,06 ^{n.s}	0,10*	0,35*
Resíduo	10	0,02	0,01	0,04
CV(%)		22,56	11,13	25,37

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 18 - Resumo da análise de variância da variável tempo da fase Lag (h) dos microrganismos em contato com diferentes filmes.

Fonte de variação	G.L	Quadrado médio		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
Filmes	4	15,06 ^{n.s}	1,12 ^{n.s}	6,07
Resíduo	10	5,24	1,41	0,37
CV(%)		23,60	19,57	9,79

Significativo ao nível de 7 % de probabilidade pelo teste F.

^{n.s} Não significativo ao nível de 7 % de probabilidade pelo teste F.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)