UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LEANDRO NEODINI REMEDIO

**Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de
quitosana como veículo dos agentes antimicrobianos sorbato
de potássio e nisina**

Pirassununga

2016

LEANDRO NEODINI REMEDIO

**Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de
quitosana como veículo dos agentes antimicrobianos sorbato
de potássio e nisina**

(versão corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R386d Remedio, Leandro Neodini
Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos
de quitosana como veículo dos agentes
antimicrobianos sorbato de potássio e nisina /
Leandro Neodini Remedio ; orientadora Rosemary
Aparecida de Carvalho. -- Pirassununga, 2016.
83 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. polímeros. 2. compostos ativos. 3. difusão. 4.
propriedades. 5. bactericidas. I. Carvalho,
Rosemary Aparecida de, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e sempre iluminar meu caminho, para eu continuar seguindo em frente. Ele me fez chegar onde eu cheguei, e me fez ser quem eu sou.

Agradeço aos meus pais, Zanza e Paulo, pelo apoio, dedicação, pelo suporte, paciência e por estarem sempre ao meu lado, tanto nos momentos felizes, quanto nos mais difíceis.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho, pela paciência, ensinamentos, incentivo, pelas longas conversas, e acima de tudo, por acreditar e confiar em mim, por mais que eu a decepcionasse, sempre me dando mais uma chance. A você eu só tenho a agradecer. Este trabalho só foi possível graças a sua ajuda.

Aos meus irmãos, Rafael e Vitor, por estarem sempre ao meu lado, por serem meus companheiros eternos.

Aos meus avós, Waldir e Cândida, que nunca deixaram de acreditar em mim e sempre me apoiaram.

À minha namorada, Ana Claudia, pela paciência, compreensão e carinho, por sempre estar ao meu lado, e por entender e aceitar todas as vezes que não pude vê-la devido à distância.

Aos meus amigos, colegas e companheiros de laboratório, em especial ao Paulo e ao Júlio, amigos verdadeiros que levarei pelo resto da vida em minha memória.

À CAPES que me concedeu a bolsa de Mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

Enfim, muito obrigado a todos os que tornaram a realização deste trabalho possível.

RESUMO

REMEDI, L.N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de quitosana como veículo dos agentes antimicrobianos sorbato de potássio e nisina**. 2016. 83f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A crescente demanda dos consumidores por produtos seguros e com vida de prateleira estendida fez aumentar o interesse nas chamadas embalagens ativas. Estas podem interagir com o alimento, promovendo a melhoria de suas características, além da manutenção de sua segurança e qualidade. Dentre os compostos ativos comumente empregados para a formação deste tipo específico de embalagem, o sorbato de potássio e a nisina tem chamado a atenção, devido às suas propriedades antimicrobianas, sendo reconhecidos como conservantes seguros para alimentos por organizações como a *Food and Agriculture Organization* (FAO), *World Health Organization* (WHO) e *Food and Drug Administration* (FDA). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de filmes à base de quitosana como veículo dos agentes antimicrobianos sorbato de potássio (SP) e nisina (N). Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*, mantendo-se constante a concentração da quitosana em 2g/100g de solução filmogênica, e incorporando-se o SP e a N nas concentrações de 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 mg/g de quitosana. Os filmes foram caracterizados quanto à sua umidade, solubilidade em água, propriedades mecânicas (tensão na ruptura, alongação e módulo elástico), ângulo de contato, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e difusão dos compostos bioativos em meio aquoso. A umidade dos filmes não foi afetada pela adição dos compostos antimicrobianos em nenhuma das concentrações, variando entre aproximadamente 22 e 24%, e a solubilidade de todas as formulações foi completa, possivelmente devido ao alto grau de desacetilação da quitosana utilizada. Em relação às propriedades mecânicas, foi observada redução da tensão na ruptura e um forte aumento na alongação com o aumento da concentração tanto de SP quanto de N. Por outro lado, para o módulo elástico, foi constatado redução com o aumento da concentração de SP, diferente da N, onde não houve variação deste valor para as diferentes concentrações analisadas. A hidrofobicidade do filme aumentou com o aumento da concentração de ambos os compostos, verificada pelo aumento no ângulo de contato. As análises de MEV demonstraram que os filmes se apresentaram coesos, com estrutura homogênea e com ausência de regiões de descontinuidade, independente do agente antimicrobiano. Foi observado o aparecimento de um pico na região de 1650 nm, para os filmes adicionados de sorbato de potássio, indicando possível interação entre o grupo carboxila do

sorbato de potássio, e o grupo amina da quitosana. Para as análises de difusão, o modelo proposto apresentou bom ajuste, principalmente aos adicionados de SP, apresentando uma difusão mais controlada com o tempo. Observou-se uma difusividade efetiva na ordem de $10^{-13}\text{m}^2/\text{s}$ sem diferença estatística entre as concentrações analisadas. Portanto, pode-se concluir que os filmes de quitosana adicionados dos agentes antimicrobianos sorbato de potássio e nisina têm um bom potencial na formação de embalagens ativas, difundindo em meio aquoso de maneira eficaz, além de conferir aos filmes melhorias em suas propriedades físico-químicas.

Palavras chave: Polímeros, compostos ativos, difusão, propriedades, bactericidas

ABSTRACT

REMEDIO, L.N. **Development and characterization of chitosan active films as a vehicle of the antimicrobial agents potassium sorbate and nisin.**

2016. 83p. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Increasing consumer demand for safe products and with extended shelf-life has increased the interest in active packaging. It is designed to interact with food, improving its characteristics, keeping the safety and quality maintenance. Among the active compounds commonly used to form this particular type of packaging, potassium sorbate and nisin has drawn attention due to its antimicrobial properties, being recognized as safe for food applications by the Food and Agriculture Organization (FAO), World Health Organization (WHO) and Food and Drug Administration (FDA). In this context, this work aimed at the development and characterization of chitosan-based films as a vehicle of the antimicrobial agents potassium sorbate (PS) and nisin (N). The films were produced by casting technique, keeping the concentration of chitosan constant in 2g/100g of filmogenic solution and incorporating the PS and N at the concentrations of 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg/g of chitosan. The films were characterized for their moisture content, water solubility, mechanical properties (tensile stress, elongation at break and young modulus), contact angle, scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and diffusion of the bioactive compound in aqueous media. The moisture content of the films was not affected by the addition of antimicrobial compounds in any of the concentrations, ranging between approximately 22 and 24%, and the solubility of all formulations was complete, perhaps due to the high deacetylation degree of chitosan used. In the mechanical properties, it was observed a decrease in the tensile stress and a strong increase in elongation with increasing concentration of both PS and N. On the other hand, for the young modulus, it was observed a decrease with increasing concentrations of PS, different from N, which was not observed variations of this value for the different concentrations analyzed. The hydrophobicity of the film increased when increasing the concentration of both compounds, observed by an increase in the contact angle. The SEM analysis showed that the films was cohesive, with an homogeneous structure and with no discontinuity regions, independent of the agent used. It was observed the appearance of a peak in the wavelength 1650 nm, for the films with potassium sorbate, indicating possible interaction between the carboxyl group of potassium sorbate, and the amine group of chitosan. For diffusion analysis, the model showed good agreement, especially the PS formulations, showing a more controlled diffusion with time. Diffusion

coefficient was observed in the order of 10^{-13} m²/s with no statistical difference between the analyzed concentrations. Therefore, it can be concluded that the chitosan films made with potassium sorbate and nisin has good potential to produce active packaging, releasing their compounds effectively, and also conferring an improvement in its physicochemical properties.

Keywords: Polymers, active compounds, diffusion, properties, bactericides

Lista de Figuras

Figura 1 – Quitosana feita a partir da desacetilação da quitina	20
Figura 2 – Exemplos dos filmes de quitosana sem e com adição de sorbato de potássio (SP) e nisina (N), sendo: (a) controle; (b) 2,5 mg de SP; (c) 5,0 mg de SP; (d) 7,5 mg de SP; (e) 10,0 mg de SP; (f) 2,5 mg de N; (g) 5 mg de N; (h) 7,5 mg de N; (i) 10,0 mg de N/g de quitosana.	39
Figura 3 – Fotos do (a) pó de quitosana e (b) solução filmogênica formada antes da adição dos compostos antimicrobianos.....	40
Figura 4 - Imagem de uma gota de água sobre a superfície de filme de quitosana sem adição de agente antimicrobiano, nos tempos de: (a) 0 segundos; (b) 15 s; (c) 30 s; (d) 45 s; (e) 60 s, (f) 90 s; (g) 120 s; (h) 180 s; (i) 240 s; e (j) 300 s.	46
Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica dos filmes sem adição de agente antimicrobiano: (a) superfície; (b) criofratura.	49
Figura 6 - Imagem de microscopia eletrônica dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de sorbato de potássio (C_{SP}) nas seguintes condições: (a) superfície, $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (b) criofratura $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (c) superfície 5,0 mg/g; (d) criofratura 5,0 mg/g (e) superfície 7,5 mg/g; (f) criofratura 7,5mg/g (g) superfície 10,0 mg/g; (h) criofratura 10,0 mg/g de quitosana.....	50
Figura 7 - Imagem de microscopia eletrônica dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de nisina (C_N) nas seguintes condições: (a) superfície, $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (b) criofratura $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (c) superfície 5,0 mg/g; (d) criofratura 5,0 mg/g (e) superfície 7,5 mg/g; (f) criofratura 7,5mg/g (g) superfície 10,0 mg/g; (h) criofratura 10,0 mg/g de quitosana.....	51
Figura 8 - Espectros de absorção de infravermelho de filmes de quitosana em função da concentração de sorbato de potássio adicionado.	54
Figura 9 - Espectros de absorção de infravermelho de filmes de quitosana em função da concentração de nisina adicionada.....	55
Figura 10 - Curva de liberação de Sorbato de Potássio em função do tempo de imersão nas concentrações de: ● 2,5 mg/g; ■ 5,0 mg/g; ♦ 7,5 mg/g; e ▲ 10,0 mg/g de quitosana.	56

Figura 11 - Curva de liberação de Nisina em função do tempo de imersão nas concentrações de: ● 2,5 mg/g; ■ 5,0 mg/g; ♦ 7,5 mg/g; e ▲ 10,0 mg/g de quitosana..... 57

Figura 12 – Curva de liberação de sorbato de potássio (●) e respectiva modelagem (—) em função do tempo nas concentrações de: (a) 2,5 mg/g; (b) 5,0 mg/g; (c) 7,5mg/g e (d) 10mg/g de quitosana. 58

Figura 13 – Curva de Liberação de nisina (●) e respectiva modelagem (—) em função do tempo nas concentrações de: (a) 2,5 mg/g; (b) 5,0 mg/g; (c) 7,5mg/g e (d) 10mg/g de quitosana. 58

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Exemplo de filmes a base de macromoléculas naturais aditivados com agentes antimicrobianos.....	16
Tabela 2 – Exemplo de aplicações de embalagens biodegradáveis antimicrobianas ativas em alimentos.....	18
Tabela 3 – Exemplos de estudos sobre aplicação de sorbato de potássio em filmes ativos.....	26
Tabela 4 – Estudos sobre aplicação da nisina em filmes ativos e seus respectivos microrganismos testados.....	28
Tabela 5 – Teor de umidade dos filmes de quitosana incorporados com potássio de sorbato (SP) e nisina (N) à diferentes concentrações.....	41
Tabela 6 – Resistência à tensão na ruptura (T), alongação na ruptura (E), módulo elástico (ME) e espessura de filmes de quitosana incorporados com potássio de sorbato e nisina à diferentes concentrações.....	43
Tabela 7 - Efeito da variação da concentração de sorbato de potássio (C_{SP}) e da concentração de nisina (C_N) no ângulo de contato de filmes de quitosana, após 35 segundos de deposição.....	47
Tabela 8 – Parâmetros de modelagem e difusividade efetiva (D_{ef}) determinados por modelo de sólido semi-infinito para a difusão para os filmes de quitosana com diferentes concentrações de sorbato de potássio (C_{SP}) e nisina (C_N) em filmes ativos de quitosana, em meio aquoso.....	59

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Embalagens antimicrobianas	15
3.2	Polímeros naturais para produção de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis	19
3.3	Agentes antimicrobianos	24
3.3.1	Sorbato de Potássio.....	24
3.3.2	Nisina	26
3.4	Difusão de compostos bioativos	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Material	33
4.2	Metodologia	33
4.2.1	Solução Filmogênica	33
4.2.2	Caracterização dos filmes.....	34
4.2.3	Ângulo de contato	36
4.2.4	Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	36
4.2.5	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	36
4.2.6	Difusão dos compostos bioativos.....	37
4.2.7	Análise Estatística	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Caracterização dos filmes.....	39
5.1.1	Aspectos visuais.....	39
5.1.2	Teor de umidade	40
5.1.3	Solubilidade em água	42
5.1.4	Propriedades mecânicas	42
5.2	Ângulo de Contato	45
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
5.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	52
5.5	Difusão de compostos bioativos	55
6	CONCLUSÕES.....	61
7	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a demanda por produtos minimamente processados, de fácil preparo e prontos para o consumo, tem aumentado consideravelmente, exigindo grandes mudanças na segurança e qualidade dos alimentos. Neste contexto, um método bastante aplicado para se garantir uma segurança adicional dos produtos é a utilização de embalagens ativas, pois elas interagem com os alimentos, ou com o espaço-livre formado entre a embalagem e o produto, garantindo a qualidade desejada (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

A embalagem ativa é um conceito inovador, sendo definida como um sistema onde ocorre interação entre embalagem, produto e ambiente, prolongando a vida de prateleira, podendo ainda melhorar a segurança ou a qualidade sensorial do produto (SUPPAKUL et al., 2003). Segundo Abreu et al. (2012) estes sistemas têm sido usados com sucesso para aumentar a vida de prateleira de alimentos processados, além de satisfazer as exigências dos consumidores na demanda por produtos de alta qualidade.

A utilização de macromoléculas naturais para a formação de filmes e embalagens vem se destacando e sendo estudada há muitos anos, devido ao seu apelo ecológico, como por exemplo a gelatina (VANIN et al., 2005; COZMUTA et al., 2015), o amido de milho (RYU et al., 2002; GHASEMLOU et al., 2013), o amido de mandioca (ARAÚJO et al., 2015), a quitosana (CHENG et al., 2003), a proteína do soro do leite (BAHRAM et al., 2014), a proteína de soja (EMIROGLU et al., 2010) entre muitas outras.

Dentre as macromoléculas naturais, a que mais se destaca é a quitosana, proveniente da desacetilação da quitina, que é o segundo recurso orgânico mais abundante na Terra, depois da celulose (HUDSON; SMITH, 1998). Este polímero, devido às suas características físico-químicas, baixo custo e atividade antimicrobiana, vem sendo estudado há muito tempo como potencial formador de filme (OUATTARA et al., 2000; COMA et al., 2002; SRINIVASA et al., 2003; PARK et al., 2004; PEREDA et al., 2008; YOSHIDA et al., 2010; ALJAWISH et al., 2016; ARANAZ et al., 2016; SHAHBAZI et al., 2016).

Vários agentes antimicrobianos vêm sendo adicionados a matrizes poliméricas, a fim de se obter filmes ou embalagens que demonstrem alto potencial antimicrobiano. Tanto a nisina, um peptídeo antimicrobiano produzido pela bactéria *Lactococcus lactis*, quanto o sorbato de potássio, derivado do ácido sórbico, tem sido estudados e já demonstraram ser eficientes contra vários microrganismos, como por exemplo contra *Escherichia coli* e *Lactobacillus plantarum* (CUTTER, 2002), *Listeria monocytogenes* (JUCK et al., 2010), *Listeria innocua* (CAO-HOANG et al., 2010); *Saccharomyces cerevisiae* e *Listeria innocua* (RESA et al. 2016), *Salmonella Typhimurium* (NATRAJAN; SHELDON, 2000), entre outros.

Por outro lado, estudos relacionados ao mecanismo de difusão dos agentes antimicrobianos em filmes à base de macromoléculas naturais são de fundamental importância para o entendimento do mecanismo de inibição de vários microrganismos.

Poucos estudos relativos à difusão de agentes antimicrobianos presentes em matrizes poliméricas podem ser encontrados na literatura (TUTUNCU; LABUZA, 1996; ZACTITI; KIECKBUSH, 2006; YOSHIDA et al. 2010), principalmente quanto à influência da variação da concentração destes agentes nos filmes, dando margem a um estudo mais aprofundado sobre estes fatores.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e a caracterização de filmes à base de quitosana, adicionados de dois agentes antimicrobianos: sorbato de potássio (SP) e nisina (N).

Os objetivos específicos foram:

- Produção e caracterização dos filmes de quitosana adicionados de diferentes concentrações de cada um dos agentes antimicrobianos;
- Avaliação do efeito das diferentes concentrações de cada agente nas propriedades físico-químicas dos filmes;
- Estudo dos mecanismos de difusão do sorbato de potássio e da nisina nos filmes à base de quitosana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Embalagens antimicrobianas

A produção e caracterização de filmes biodegradáveis utilizando polímeros naturais, vem sendo amplamente pesquisada nos últimos tempos. Por outro lado, recentemente a incorporação de diversos compostos ativos nestes materiais tem despertado interesse devido a possibilidade de desempenhar funções adicionais como atividade antioxidante, atividade antimicrobiana dentre outras. De um modo geral, esses materiais contendo compostos ativos são denominados de embalagens ativas.

De acordo com Suppakul et al. (2003) a embalagem ativa é definida como um sistema onde ocorre interação entre produto, embalagem e espaço-livre, o que resulta em uma melhora na qualidade e na segurança do produto, sendo considerado um conceito inovador na área de alimentos.

Embalagens ativas são aquelas que interagem com o alimento de maneira intencional, visando primordialmente a melhoria de suas características, alterando as condições dos produtos, aumentando sua vida de prateleira, segurança e qualidade ou até mesmo melhorando suas características sensoriais, diferentemente das embalagens convencionais, que se limitam a apenas proteger os alimentos das condições externas, as embalagens ativas têm várias funções adicionais (VERMEIREN et al., 2002).

Dentre as embalagens ativas, existem dois tipos de agentes que podem ser adicionados: os sintéticos e os naturais. Ambos vêm sendo amplamente estudados ao longo dos anos, como pode-se observar na Tabela 1, onde são apresentados alguns estudos de filmes ativos incorporados com diferentes agentes.

Tabela 1 – Exemplo de filmes a base de macromoléculas naturais aditivados com agentes antimicrobianos.

Macromolécula	Agente antimicrobiano	Referência
Amido de mandioca	Extrato etanólico de própolis	Araújo et al. (2015)
Carboximetilcelulose	Óleo essencial de Zataria multiflora	Dashipour et al. (2015)
Alginato e argila	Óleos essenciais (manjerona, cravo e canela)	Alboofetileh et al. (2014)
Amido de milho	Óleos essenciais (Zataria Multiflora e Mentha pulegium)	Ghasemlou et al. (2013)
Amido de batata doce	Óleo essencial de orégano	Ehivet et al. (2011)
Quitosana	Óleo essencial de canela	Ojagh et al. (2010)
Gelatina	Óleo de cânhamo e sálvia	Cozmuta et al. (2015)
Proteína do soro concentrada	Óleo essencial de canela	Bahram et al. (2014)
Gelatina de peixe e quitosana	Óleo essencial de orégano	Hosseini et al. (2016)
Proteína de soja	Óleos essenciais (orégano e tomilho)	Emiroglu et al. (2010)
Alginato de sódio	Sorbato de potássio	Zactiti e Kieckbusch, (2003)
Zeína	Timol	Nobile et al. (2008)
Glúten de trigo	Sorbato de potássio	Türe et al. (2012)
Amido de ervilha	Lisozina	Nam et al. (2007)

De um modo geral, a maioria dos estudos avalia o efeito de diferentes concentrações na capacidade inibitória de diversos microrganismos, tais como: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (PAGNO et al., 2016); *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* O157:H7 (EHIVET et al., 2011); *Listeria monocytogenes* (JOVANOVIĆ et al., 2016; JUCK et al., 2010; PONCE et al., 2008); *Listeria innocua* (CAO-HOANG et al., 2010); esporos de *Bacillus anthracis* (DONG et al., 2014); Enterobactérias e *Serratia liquefaciens* (OUATTARA et al., 2000), *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (O'CALLAGHAN; KERRY, 2016); *Pseudomonas aeruginosa* (ARANAZ et al., 2016); *Saccharomyces cerevisiae* e *Listeria innocua* (RESA et al. 2016), *Lactobacillus plantarum* (PADGETT et al., 1998)

Vários autores estudaram o efeito da concentração de agente natural nos filmes, e concluíram que seu aumento causa um aumento no efeito inibitório antimicrobiano (ALBOOFETILEH et al., 2014; BAHRAM et al., 2014; DASHIPOUR et al., 2015; EHIVET et al., 2011; EMIROGLU et al., 2010; GHASEMLOU et al., 2013; HOSSEINI et al., 2016; OJAGH et al., 2010; PAGNO et al., 2016).

Por outro lado, estudos estão sendo realizados envolvendo a aplicação efetiva destes materiais em embalagens de alimentos. Na Tabela 2 pode-se observar alguns exemplos dos estudos realizados nesta área.

Os benefícios das embalagens ativas podem se estender para a qualidade e segurança de alimentos, bebidas, cosméticos e produtos farmacêuticos, baseando-se na adição de componentes ativos em uma matriz de embalagem, e sua incorporação nas embalagens dos alimentos é considerada uma tecnologia emergente promissora, sendo chamadas de embalagens antimicrobianas (YOSHIDA et al., 2010).

Tabela 2 – Exemplo de aplicações de embalagens biodegradáveis antimicrobianas ativas em alimentos.

Filmes (agente antimicrobiano)	Microrganismos	Aplicação	Autores
Amido de mandioca (Óleo essencial de canela)	<i>Penicillium commune</i> e <i>Eurotium amstelodami</i>	Pães	Souza et al. (2013)
Quitosana (Extrato de chá verde)	Bactérias ácido-láticas, bolores e leveduras	Salsicha suína	Siripatrawan; Noipha (2012)
Gelatina e quitosana (Óleos essenciais de cravo, erva-doce, cipreste, lavanda, tomilho, verbena, pinho e alecrim)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Peixe	Gómez-Estaca et al. (2010)
Proteína de soja (Óleos essenciais de orégano e tomilho)	<i>Pseudomonas</i> spp. e coliformes	Hambúrguer cru	Emiroglu et al. (2010)
Metilcelulose (Extrato da folha de oliveira)	<i>S. aureus</i>	Queijo Kasar	Ayana e Turhan (2009)
Proteína do soro isolada (Óleo essencial de orégano)	<i>Pseudomonas</i> e bactérias ácido-láticas	Carne bovina <i>in natura</i>	Zinoviadou; Koutsoumanis; Biliaderis (2009)
Amido de ervilha (extrato de semente de uva)	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. typhimurium</i> , and <i>B. thermosphaceta B2</i>	Lombo de porco	Corrales; Han; Tauscher (2009)

Um sistema de embalagem antimicrobiana pode ser obtido através da incorporação direta de agentes antimicrobianos naturais em filmes de revestimento ou em embalagens poliméricas e de alimentos, sendo sua eficiência já demonstrada por diversos autores, ao longo da última década, como pode ser observado no trabalho de Irkin e Esmer (2015).

De acordo com Cooksey (2005) o conceito por trás da embalagem ativa não é servir como um substituto para as práticas de fabricação e manuseio de

alimentos sólidos, mas sim em melhorar as medidas de segurança e qualidade já utilizados pela indústria de alimentos, destinando-se a servir como uma barreira adicional.

Algumas das principais vantagens das embalagens ativas contendo agentes antimicrobianos são:

- Liberação de agente antimicrobiano, somente a quantidade necessária é liberado, não sendo necessário sua adição diretamente no produto alimentício (IRKIN; ESMER, 2015);

- Eficiência, promovendo funções que inexistentes em embalagens comuns, por possuírem uma migração controlada do composto no alimento, permitindo não somente uma inibição inicial de microrganismos indesejáveis, mas também uma atividade residual ao longo do tempo, durante seu transporte, armazenamento e distribuição (QUINTAVALLA; VICINI, 2002);

- Fácil aplicação em produtos onde os processos tradicionais de preservação, como processos térmicos, secagem e irradiação por exemplo, não podem ser aplicados, como no caso de produtos cárneos frescos (QUINTAVALLA; VICINI, 2002);

Além disso, segundo Han e Floros (1998), a adição de agentes antimicrobianos diretamente nos alimentos pode resultar em uma perda de atividade devido a reações cruzadas com outros componentes alimentares como lipídeos e proteínas, diminuindo sua efetividade.

3.2 Polímeros naturais para produção de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis

Diversos são os polímeros utilizados na produção de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, tais como: amido de milho (DAS; CHOWDHURY, 2016; GUIMARÃES et al., 2016; GUTIERREZ et al., 2015;); amido de mandioca (ARAÚJO et al., 2015; RESA et al., 2014a; RESA et al, 2014b); quitosana (SANTACRUZ et al, 2015); gelatina (FACKHOURI et al., 2015; HOSSEINI et

al., 2016); proteína isolada de soro (BOYACI et al., 2016; PÉREZ et al., 2016; SOAZO et al., 2016); entre outros.

Dentre estes polímeros, um que se destaca é a quitosana, sendo alvo de muitos estudos. Por ter alta biodegradabilidade, não ser tóxico, e, principalmente, possuir grande potencial antimicrobiano, muitas aplicações podem ser encontradas, tendo sua atividade antimicrobiana sido demonstrada contra várias bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo aplicado em indústrias de alimentos, farmacêuticas, de cosméticos entre outras, misturado com outros polímeros naturais como amido e gelatina, ou em sua forma natural (ARVANITOYANIS et al, 1998; CHENG et al., 2003; HAQUE et al, 2005; KIM et al, 2005).

Quitosana é o nome dado para um grupo de compostos solúveis obtidos da desacetilação de 50% ou mais quitina (HUDSON; SMITH, 1998). É um polímero natural funcional, composto de resíduos de aminoglucopirano de N-acetilglucosamina e glucosamina, e é derivado da quitina, que ocorre naturalmente em vários fungos, artrópodes e endoesqueleto de cefalópodes (DOMARD; DOMARD, 2002).

Segundo Rabea et al. (2003), a produção da quitosana deriva de matérias-primas quitinosas, principalmente através de uma sequência de desproteinização, desmineralização e desacetilação química (Figura 1).

Figura 1 – Quitosana feita a partir da desacetilação da quitina. (Fonte: Rabea et al., 2003)

Por possuir um polímero linear com uma estrutura que consiste em unidades de β -(1-4)-2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose, sendo comumente descrito em termos de grau de desacetilação, forma excelentes filmes, com características favoráveis como alta flexibilidade, dificuldade de se romper e alta resistência a manipulação (SILVA et al., 2016; SRINIVASA et al., 2003). Muitos autores já descreveram suas boas propriedades, como barreira a gases (AGUIRRE-LOREDO et al., 2016; BUTLER et al., 1996; KUREK et al., 2014; PEREDA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2009) e propriedades mecânicas (ALJAWISH et al., 2016; ELSABEE; ABDOU, 2013; SHAHBAZI et al., 2016; YOSHIDA et al., 2009).

Segundo Butler et al. (1996), há um grande potencial na utilização da quitosana como material de embalagem para alimentos, por ser facilmente degradado, possuir barreira à gases (O_2 e CO_2), além de ter propriedades mecânicas parecidas às de polímeros sintéticos como o polietileno de baixa e de alta densidade, devido às características hidrofílicas de suas moléculas.

Investigações sobre as propriedades antimicrobianas da quitosana foram amplamente estudadas e exploradas no meio científico e tecnológico, tendo começado cerca de duas décadas atrás (RABEA et al., 2003).

Diferentes formas de aplicação da quitosana tem sido estudada, devido à sua potencial atividade antimicrobiana, englobando setores desde a agricultura até a indústria de alimentos e farmacêutica (YEN et al., 2008). Entretanto a quitosana não tem sido estudada a fundo, em todos os seus estados físicos, mesmo que já tenha sido comprovada sua atividade antimicrobiana (KONG et al., 2010).

Gómez-Estaca et al. (2010) mostraram em seus resultados que filmes formados por blenda de gelatina e quitosana, adicionados de óleo essencial de cravo, apresentam atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patógenos, como *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Listeria innocua*, *E. coli* e *Lactobacillus acidophilus*, independente da concentração de macromolécula utilizada.

Bégin e Calsteren (1999), estudando a produção de filmes de quitosana, utilizando como solventes o ácido clorídrico, fórmico, acético, láctico e cítrico, verificaram que a quitosana apresenta um grande potencial na obtenção de filmes biodegradáveis, e que a utilização dos ácidos clorídrico e fórmico resultaram em filmes com maior resistência, enquanto que os produzidos com os ácidos láctico e cítrico promoveram a formação de um gel durante a secagem, resultando em filmes espessos, porém mais frágeis.

De acordo com Yoshida et al. (2010), as propriedades mecânicas e de barreira em filmes de quitosana estão diretamente relacionados com a presença de aditivos como plastificantes e lipídeos, e estes filmes são barreiras eficientes contra oxigênio em umidades relativas baixas e intermediárias, mas sua barreira contra o vapor de água é baixa, devido ao carácter hidrofílico das cadeias de quitosana.

A solubilidade em água da quitosana é uma característica importante, por ter impacto sobre sua atividade antimicrobiana (SHEN et al, 2010). Em estado líquido a quitosana apresenta máxima atividade antimicrobiana, entretanto, pesquisas sobre seu estado sólido, como em grânulos, ou formando filmes e géis, mostraram uma certa restrição quanto as suas propriedades antimicrobianas, sendo indicada, principalmente, para aplicações na área biomédica (KONG et al., 2008).

A quitosana tem papel fundamental na atividade antimicrobiana de filmes em solução ou estado sólido, entretanto, em estado solúvel, ela apresenta maior eficácia na inibição do crescimento microbiano (KONG et al., 2010). Isso ocorre pois a quitosana solúvel possui uma conformação que se estende, permitindo uma maior reação. De acordo com a literatura, utilizando a concentração mínima de inibição (MIC), a quitosana em solução foi significativamente melhor contra *Escherichia coli* (XIE et al., 2007; CHUNG et al., 2005) e *Staphylococcus aureus* (CHUNG et al., 2005), quando comparado com ela em estado sólido.

Filmes antimicrobianos foram aplicados em carnes por Ouattara et al. (2000), adicionando-se ácido acético ou ácido propiônico em filmes de

quitosana, e foi observada uma grande inibição do desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*.

Segundo Anker et al. (2002), a adição de um componente hidrofóbico, como por exemplo um lipídeo, na matriz de um filme, pode melhorar sua barreira ao vapor de água. De acordo com o autor, nos casos onde se adiciona um componente lipídico a uma matriz polimérica, o componente lipídico serve como barreira ao vapor de água, enquanto o polímero utilizado fornece uma barreira contra o oxigênio e confere resistência ao filme.

Existem duas categorias básicas para produção de filmes antimicrobianos com polímeros naturais: uma envolve a incorporação do componente antimicrobiano no filme de embalagem; enquanto a outra se baseia no revestimento do material de embalagem com o componente antimicrobiano (IRKIN; ESMER, 2015).

No geral, em relação a suas propriedades antimicrobianas, os filmes de quitosana podem ser empregados como embalagens ativas. Estudos mostram que estes filmes foram eficazes na inibição do desenvolvimento de microrganismos patógenos importantes no controle de qualidade, para alimentos. Coma et al. (2002), afim de avaliar a eficácia de filmes de quitosana contra *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*, mostraram que a utilização da quitosana oferece grande vantagem na prevenção do crescimento microbiano em alimentos, resultando na inibição do desenvolvimento destes microrganismos. Efeito semelhante foi observado por Chen et al. (1996) e El-Ghaouth et al. (1992).

3.3 Agentes antimicrobianos

3.3.1 Sorbato de Potássio

Em alimentos, o ácido sórbico e seus sais solúveis em água, como por exemplo o sorbato de potássio, são utilizados como conservantes, pela capacidade de inibir o desenvolvimento de diferentes microrganismos, incluindo fungos, algumas bactérias e bolores (SOFOS, 1989).

O sorbato de potássio é um agente químico usado largamente na indústria de alimentos devido a sua forte atividade antimicrobiana (PRANOTO et al., 2005). Em alimentos, é eficaz no intervalo de concentrações de 0,05-0,3 g/100g (VOJDANI; TORRES, 1989).

É um sal de potássio proveniente do ácido sórbico, conhecido por sua potencial atividade antimicrobiana (MEHYAR et al., 2012; SAYANJALI et al., 2011; VALENCIA-CHAMORRO et al., 2008). Tem sido usado para inibir o crescimento de fungos e leveduras, mas também já apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, salmonelas e pseudomônas (ZAMORA; ZARITZKY, 1987). Segundo Baldino et al. (2016), o problema do uso do sorbato de potássio em filmes não está relacionado a sua estabilidade na matriz, mas sim nos mecanismos de sua liberação.

De acordo com Wurgler et al. (1992), o sorbato de potássio é produto de uma reação entre ácido sórbico e hidróxido de potássio, possui fórmula $C_6H_7O_2K$, e tanto ele quanto o ácido sórbico são eficientes na inibição do crescimento de leveduras e de alguns fungos.

São amplamente utilizados como agente antimicrobiano na indústria alimentar, mas pouco se sabe sobre o seu efeito quando presentes simultaneamente em uma matriz de embalagem polimérica. Consequentemente, a incorporação de mais do que uma formulação antimicrobiana de filmes é uma área de pesquisa interessante e inovadora (BASCH et al., 2013).

Filmes adicionados de sorbato de potássio podem atuar na redução de contaminação patogênica e no aumento da vida de prateleira de produtos

alimentícios (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002). Rico-Pena e Torres (1991), para filmes comestíveis a base de celulose adicionados de sorbato de potássio, observaram uma liberação lenta e controlada do sorbato em superfícies alimentares com baixa atividade de água.

Estudos estão sendo realizados para se determinar tanto seu poder antimicrobiano, quanto seus mecanismos de liberação, e sua influência nas propriedades físico-químicas de filmes ativos. Sayanjali et al. (2011) reportou grande redução nos valores de tensão na ruptura e alongação em filmes de carboximetil celulose, causada pela incorporação de sorbato de potássio, tendo também aumentado significativamente os valores de permeabilidade ao vapor de água de seus filmes.

Barzegar et al. (2014), para filmes de amido de batata, encontraram que a adição de sorbato de potássio na matriz filmogênica causou um aumento na sua permeabilidade ao vapor de água e alongação, e diminuição da força de tensão na ruptura, além da inibição de *Aspergillus niger* in vitro para filmes com concentrações acima de 7,5% de sorbato.

Alguns outros estudos já foram reportados sobre o uso do sorbato de potássio em filmes, analisando seu potencial antimicrobiano. Alguns desses estudos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Exemplos de estudos sobre aplicação de sorbato de potássio em filmes ativos.

Macromolécula	Concentração de sorbato de potássio	Microrganismo analisado	Referência
Amido de batata doce	15 g/100 g de amido	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Shen et al. (2010)
Alginato	3 mg/g de alginato	<i>Listeria monocytogenes</i>	Juck et al. (2010)
Glúten de trigo	10g/100g de glúten	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium incarnatum</i>	Türe et al. (2012)
Blenda de quitosana/amido de mandioca	0,05 g/100g solução	<i>Lactobacillus ssp.</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Vásconez et al. (2009)
Amido de batata	0,075 e 0,100 g/g de amido	<i>Aspergillus niger</i>	Barzegar et al. (2014)
Blenda amido de mandioca/HPMC	3 mg/g de blenda	<i>Listeria innocua</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Basch et al. (2013)

3.3.2 Nisina

Segundo Klaenhammer (1988), o termo nisina descreve uma família de polipeptídeos antibióticos (tipo A, B, C, D, E), consideradas como bacteriocinas, sendo efetivas contra bactérias Gram-positivas em geral, e também prevenindo o crescimento de *Clostridium botulinum* e esporos de *Bacillus*. Ainda segundo o autor, as bacteriocinas são compostos antimicrobianos peptídicos sintetizados por diferentes bactérias com atividade bactericida contra outras espécies microbianas.

Geralmente, a maioria das bacteriocinas são produzidas por bactérias ácido-láticas, tendo sua aplicação no controle de bactérias específicas em alimentos (KUMAR et al., 2012).

De acordo com Irkin e Esmer (2015), a nisina é considerada uma bactericina com alto valor comercial, e é um composto proteico produzido a partir de estirpes de *Lactococcus lactis*, o qual é naturalmente encontrado em leite cru e em alimentos fermentados.

O uso de filmes antimicrobianos contendo bacteriocinas pode aumentar a qualidade, segurança e prolongar a vida de prateleira de alimentos. A vantagem das bacteriocinas é que elas são termoestáveis, hipoalergênicas e facilmente degradadas por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal humano (ABREU et al. 2012).

A nisina tem um largo espectro de atividade antimicrobiana, que inclui algumas bactérias gram-positivas, incluindo microrganismos patogênicos de origem alimentar e deteriorantes como *Listeria monocytogenes* (CONCHA-MEYER et al., 2011; MARTINS et al., 2010; JIN, 2010; MATTHEWS et al., 2010; JUCK et al., 2010), *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacilli* (VIEDMA et al., 2010). Além disso, a nisina é estável ao calor, não-toxica e sensível a proteases digestivas, e tem sido usada no mundo todo como conservante natural de alimento desde enlatados até produtos lácteos (IRKIN; ESMER, 2015).

O uso da nisina em embalagens antimicrobianas tem atraído grande interesse nos últimos tempos. Há vários estudos mostrando que sua aplicação em filmes antimicrobianos e embalagens podem controlar o crescimento bacteriano, conservando a qualidade do alimento, segurança e estendendo a vida de prateleira dos produtos alimentares. Alguns desses estudos, envolvendo filmes adicionados com nisina, são apresentados na Tabela 4.

Em estudo de filmes adicionados de nisina, Natrajan e Sheldon (2000) demonstraram que o nível de inibição de crescimento microbiano de *Salmonella* é afetado pela concentração de nisina.

Tabela 4 – Estudos sobre aplicação da nisina em filmes ativos e seus respectivos microrganismos testados.

Macromolécula	Concentração de nisina	Microrganismo analisado	Referência
Polietileno de baixa densidade	6400 UI/mL solução	<i>Micrococcus luteus</i>	Mauriello et al. (2005)
HPMC	2,5 g/100g HPMC	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cooksey et al. (2005)
Glucomanan konjak	42000 UI/g filme	<i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> <i>Penicillium expansum</i> ,	Li et al. (2006)
Polietileno de baixa denisdade	16,7 mg/g PEBD	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Listeria ivanovií</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Listeria innocua</i>	Hanusova et al. (2010)
Amido de mandioca	2,31 mg/dm ² de filme	<i>Listeria innocua</i>	Resa et al. (2014a)
Caseinato de sódio	500 µg/ml de solução	<i>Listeria innocua</i>	Cao-Hoang et al (2010)
Galactomanana	10 mg/ml de solução	<i>Listeria monocytogenes</i>	Martins et al. (2010)
Alginato	100 UI/ml de solução	<i>Listeria monocytogenes</i>	Concha-Meyer et al. (2011)

Quando aplicada em filmes para embalagens plásticas, papelão e filmes comestíveis, possui atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos patogênicos e deteriorantes, como *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Micrococcus flavus*, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus ssp.*, *L. innocua*, *Staphilococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, além de terem sido consideradas efetivas na extensão da vida de prateleira de alimentos através

de sua aplicação em produtos cárneos e derivados, leite, creme de leite, queijo e suco de laranja (IRKIN; ESMER, 2015).

De acordo com Xiao et al. (2011), a nisina é um antimicrobiano efetivo contra uma larga escala de bactérias Gram-positivas, como por exemplo a *Listeria monocytogenes*. A nisina comercial, produzida pelo *Lactococcus lactis*, vem sendo aplicada em vários produtos alimentícios como sendo um antimicrobiano. Seu uso como conservante em alimentos foi reconhecido como seguro pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), *World Health Organization* (WHO) e pela *Food and Drug Administration* (FDA).

3.4 Difusão de compostos bioativos

Difusão é o processo pelo qual massa é transportada de uma parte do sistema para outra, como resultado de um movimento molecular aleatório (CRANK, 1975).

A difusividade, ou coeficiente de difusão, representa a velocidade com que moléculas se movem através de uma matriz difusora, relacionando a proporção de bioativo liberado em relação ao tempo de exposição ao filme. Segundo a composição e arranjo de sua matriz filmogênica, filmes ativos são responsáveis por liberar agentes ativos incorporados para o meio externo (OZDEMIR; FLOROS, 2003).

Algumas características físicas do soluto podem influenciar o mecanismo de difusão, como tamanho e forma (TUTUNCU; LABUZA, 1996). O mesmo também pode ser influenciado por características do filme, como o arranjo da estrutura polimérica, o tamanho dos poros, a flexibilidade das cadeias poliméricas, o grau de reticulação e sua composição, ou por características do meio, como temperatura, pH e atividade do solvente (ZACTITI; KIECKBUSCH, 2003).

Segundo Ozdemir e Floros (2003), o conhecimento da difusividade de agentes antimicrobianos em filmes possui importância teórica e prática. Em teoria, estes estudos auxiliam a uma melhor compreensão dos mecanismos de

transporte de conservantes em biofilmes. Na prática, os valores da difusividade de conservantes são essenciais na previsão da vida útil de produtos alimentícios revestidos com biofilmes contendo estes conservantes, e sob condições adversas de armazenamento (OZDEMIR; FLOROS, 2003).

Redl et al. (1996), determinando o coeficiente de difusão de ácido sórbico em filmes comestíveis de glúten, com e sem adição de lipídeos, observaram que filmes adicionados de monoglicerídeo acetilado apresentaram coeficiente de difusão inferior aqueles sem nenhum componente lipídico. De maneira parecida, Vojdani e Torres (1989) mostraram que a concentração de ácido sórbico usado na formulação dos filmes afeta a permeabilidade de agentes antimicrobianos, como o sorbato de potássio.

Ozdemir e Floros (2003) estudando o efeito da relação da concentração de cera de abelha e de sorbitol na difusividade do sorbato de potássio, em filmes de proteína de soro de leite, encontraram que o aumento da concentração de proteína no meio causa um decréscimo na difusividade do sorbato de potássio. Por outro lado, o aumento da concentração de sorbitol provocou aumento da difusividade do sorbato de potássio. Em seus resultados foi observado um comportamento não-Fickiano, com um coeficiente de difusão em intervalos de $5,4 \times 10^{-11}$ - $9,8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

Resultados similares foram encontrados por Sadikoglu, Sen e Ozdemir (2006), onde foi observado um coeficiente de difusão de $4,12 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ para proteínas de soro.

Alguns outros estudos já foram realizados e publicados sobre a difusividade do sorbato de potássio em sistemas alimentares, como por exemplo Han e Floros (1998), que compararam a difusividade do sorbato de potássio em queijos americanos processados e mozzarella.

Para se descrever sistemas difusivos, modelos matemáticos foram desenvolvidos a partir da equação (1) diferencial fundamental para difusão, a partir da segunda lei de Fick, expressa em uma dimensão, com um coeficiente de difusão dependente do tempo (CRANK, 1975):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D(t) \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1)$$

onde C é a concentração do soluto ativo no filme; $D(t)$ o coeficiente de difusividade do soluto ativo; e x a componente no sentido unidirecional da difusão.

Considerando-se as seguintes condições de contorno:

$$t = 0; C(x,0) = 0; 0 < x < L; C(0,t) = C_0; e t > 0 \rightarrow C(x,t) = 0$$

deduzidas do raciocínio de que no instante inicial, a distribuição de soluto pelo filme é uniforme (C_0), que na embalagem apenas a face em contato com o produto deve liberar o soluto, que o produto atua como um sorvedouro – alimentos com alta atividade de água apresentam difusividade de soluto cerca de duas ordens de grandeza maior que no filme (HAN, 2000), e considerando ainda que a espessura do filme e o coeficiente de difusão mantém-se aproximadamente constantes, obtém-se uma função para a fração de soluto liberada, representada na eq. (2) (OZDEMIR; FLOROS, 2003):

$$C = \frac{4C_0}{\pi} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{(2m+1)} \sin\left(\frac{(2m+1)\pi x}{L}\right) \exp\left[\frac{-(2m+1)^2 \pi^2 D t}{L^2}\right] \quad (2)$$

Integrando a equação no tempo e espaço, a taxa da concentração total do composto bioativo difundido no tempo t (M_t) e no equilíbrio (M_{∞}) é (Eq. 3) (RITGER; PEPPAS, 1987):

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{(2m+1)^2} \exp\left[\frac{-(2m+1)^2 \pi^2 D t}{L^2}\right] \quad (3)$$

com (M_t) sendo a massa de soluto liberada em um instante de tempo qualquer, e (M_{∞}) a massa de soluto liberada após um tempo infinito de exposição.

Segundo Ritger e Peppas (1987), uma solução alternativa para a Eq. (2), que é útil na interpretação do comportamento em períodos de tempo menores, é dada na forma de uma função erro, como apresentada na Eq. (4):

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = 4 \left[\frac{D t}{L^2} \right]^{1/2} \cdot \left[\frac{1}{\pi^{1/2}} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot \text{ierfc} \frac{nl}{2\sqrt{Dt}} \right] \quad (4)$$

onde ierfc é a função erro complementar integrada, D é a difusividade efetiva do composto antimicrobiano, t é o tempo de liberação e L é a espessura média dos filmes. Para pequenos tempos, esta equação pode ser aproximada para a Eq. (5) (RITGER; PEPPAS, 1987):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left[\frac{D \cdot t}{\pi \cdot L^2} \right]^{1/2} \quad (5)$$

Como indicado na Eq (5), a liberação de composto por difusão Fickiana em finas camadas de filme é caracterizada por um tempo inicial $t^{1/2}$. Segundo vários autores (CRANK, 1975; OZDEMIR; FLOROS, 2003; RITGER; PEPPAS, 1987; SIEPMANN; PEPPAS, 2001), para os primeiros 60% da liberação ($M_t/M_\infty < 0,6$) esta equação pode ser simplificada para a forma apresentada na Eq. (6):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (6)$$

onde k é a constante que caracteriza a incorporação das ligações moleculares, e n é o expoente de difusão, que indica o mecanismo de transporte (RITGER; PEPPAS, 1987).

O mecanismo de transporte segue a lei de Fick para valores de $n=0,5$. Já para $n=1,0$, o transporte do agente é considerado diretamente proporcional ao tempo. Para $0,5 < n < 1,0$, o mecanismo predominante é considerado anômalo, sendo considerado não-Fickiano (CRANK, 1975).

Segundo Yoshida et al. (2010) o mecanismo de difusão do sorbato de potássio em filmes de quitosana foi principalmente não-Fickiano, sendo seus resultados associados com o relaxamento das cadeias de polímero na matriz filmogênica, devido ao inchaço do filme.

Choi et al. (2005) incorporaram sorbato de potássio em matriz polimérica à base de k-carragena avaliando sua difusividade e foi observado coeficiente de difusão na ordem de $10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, levando de 2 a 8 horas para o sistema entrar em equilíbrio e comprovando sua eficácia na liberação do composto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os filmes ativos foram produzidos utilizando-se quitosana (89% desacetilados, MM=165,62 g/mol) fornecida pela empresa Polymar (Fortaleza, CE, Brasil) e ácido acético glacial, obtido da empresa LabSynth (Diadema, SP, Brasil). O agente antimicrobiano sorbato de potássio (SP) foi doado pela empresa Plury Química Ltda. (Lote: 01070901, São Paulo, Brasil) e a nisina (N) foi doada pela empresa Danisco (Nisaplin®, Brasil). Para o controle da umidade relativa, os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo brometo de sódio (LabSynth, Diadema, SP, Brasil).

4.2 Metodologia

4.2.1 Solução Filmogênica

Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*. Primeiramente a quitosana (2g/100g de solução filmogênica) foi dispersa em solução aquosa contendo ácido acético (1% em volume). O volume necessário de ácido acético a se adicionar na solução filmogênica foi determinado pela seguinte eq. (7) (ALVARENGA, 2011):

$$V_{\text{ác acético}} = \frac{\left(\frac{m_{\text{quitosana}} \cdot GD_{\text{quitosana}} \cdot MM_{\text{ác acético}}}{MM_{\text{quitosana}}} \right)}{d_{\text{ác acético}}} \quad (7)$$

onde m é a massa de quitosana (g) adicionada para 100g de solução filmogênica; GD é o grau de desacetilação da quitosana (89%); MM é a massa molar (ácido acético = 60,05 g/mol; quitosana = 165,12 g/mol); e d é a densidade do ácido acético (1,05 g/cm³).

Através destes cálculos, determinou-se que a concentração de ácido acético a ser adicionada foi 0,30 mL/g de quitosana. A solução foi mantida sobre agitação magnética por 2 horas, para completa solubilização da quitosana, em agitador SOLAB (SL91) a 500 rpm.

Após este período os agentes antimicrobianos, sorbato de potássio (SP) e nisina (N), foram adicionados, após prévia solubilização em água, nas concentrações de 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0mg/g de quitosana, considerando como controle o filme sem adição de agente antimicrobiano, sendo assim produzidas 9 formulações distintas (4 de filmes de quitosana aditivados com sorbato de potássio, 4 de filmes de quitosana aditivados com nisina e uma formulação controle apenas com quitosana). Por fim a solução filmogênica foi dispersa em placa de acrílico (12x12 cm). O controle da espessura ($0,080 \pm 0,005$ mm) foi realizado através do controle da relação massa/área do filme. A solução filmogênica foi submetida à secagem em estufa com circulação forçada (Estufa MA-035, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) à 30°C por 24h.

Anteriormente às caracterizações, os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo solução saturada de brometo de sódio (58% de umidade relativa) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias. Para as análises de espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura os filmes foram armazenados em dessecadores contendo sílica gel por 10 dias.

4.2.2 Caracterização dos filmes

4.2.2.1 Espessura

Para determinação da espessura dos filmes, foi utilizado um micrometro Mitutoyo (modelo IP65, Japão, sensibilidade de 0,001 mm), sendo determinada uma espessura média a partir de 10 medidas aleatórias.

4.2.2.2 Teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada gravimetricamente, seguindo metodologia de Gontard et al. (1994). Para isso, cortou-se amostras circulares dos filmes, determinou-se o peso inicial de cada amostra, e em seguida submeteu-se as mesmas à secagem em estufa à 105°C durante 24 horas. Por fim, determinou-se o teor de umidade, pela diferença de massa inicial e final.

4.2.2.3 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes em água foi determinada após 24 horas de imersão, seguindo metodologia proposta por Gontard et al. (1994). Amostras dos filmes na forma de disco (diâmetro de aproximadamente 2cm) foram imersas em água destilada (50ml) e mantidas sob agitação mecânica utilizando-se mesa agitadora MA420 (Marconi) por um período de 24 horas, em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram submetidas a secagem por 24 horas, a 105°C, para determinação da massa seca final. O peso inicial foi determinado conhecendo-se a umidade da amostra. A solubilidade, expressa em termos de massa seca dissolvida, foi determinada de acordo com a seguinte Eq. (8) (GONTARD et al, 1994):

$$S = \frac{|m_i - m_f|}{m_i} 100 \quad (8)$$

onde S é a solubilidade em água (g/100g de filme); m_i é a massa seca da amostra (g); e m_f é a massa final da amostra após incubação por 24 horas em água e secagem (g).

4.2.2.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes (tensão na ruptura, alongação e módulo elástico) foram avaliadas através de testes de tração, utilizando-se um texturômetro TA.XT Plus(TA Instruments). O teste foi realizado de acordo com o método ASTM D882-10 (ASTM, 2010). As amostras dos filmes foram cortadas em tiras de 25 x 100mm, e em seguida acondicionadas em dessecadores contendo NaBr (58% de umidade relativa) por 7 dias a 25±2°C. A espessura foi calculada pela média de 10 pontos aleatórios de cada tira.

Para realização do teste, as amostras foram fixadas em sonda “tensile grips”. A distância inicial de separação foi fixada em 100 mm e o teste foi realizado com velocidade constante de 1,0 mm/s. A tensão na ruptura (T, em MPa) e a alongação na ruptura (E, em %) foram determinadas a partir das curvas de tensão por alongação, e o módulo elástico (ME, em MPa), foi

determinado calculando-se o coeficiente angular da parte linear da curva de tensão (MPa) por elongação (%).

4.2.3 Ângulo de contato

O ângulo de contato entre uma gota e o filme foi determinado utilizando-se tensiômetro Attension Theta Lite (Biolin Scientific AB, Sweden) de acordo com Silva et al. (2009). Foi cortada uma amostra do filme de 3cm de comprimento e 5cm de largura, sendo a mesma fixada na base do aparelho. Foi depositada uma gota (0,1 mL) de água deionizada sobre a superfície do filme utilizando-se micro seringa. O ângulo entre a gota e o filme foi registrado no tempo de 35 segundos (SHAHBAZI et al., 2016) após a deposição, e determinado utilizando-se o software Attension Theta (Versão 4.1.9.8).

4.2.4 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Para esta análise utilizou-se um microscópio modelo TM-3000 (Hitachi). Amostras (25 x 100 mm) foram cortadas e acondicionadas em dessecador contendo sílica por 10 dias. A análise da superfície foi realizada fixando-se a amostra com fita dupla face no suporte do equipamento. Para avaliar a estrutura interna dos filmes, estes foram imersos em nitrogênio líquido, seguido de sua fratura, sendo então fixado em suporte. A análise foi realizada utilizando-se feixes de elétrons de 5kv para as análises de superfície, e de 15kV para as análises de estrutura interna, com aumento de 1000 vezes.

4.2.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para se determinar as interações entre os componentes do filme, foram realizadas análises utilizando-se a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, utilizando-se um espectrofotômetro Pekin Elmer (Spectrum One, USA). Os filmes foram sobrepostos diretamente

sobre a célula de leitura onde foram realizados os ensaios na faixa espectral de 650 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 2cm⁻¹ (VICENTINI, 2005). Para cada amostra foram realizadas 32 varreduras.

4.2.6 Difusão dos compostos bioativos

O ensaio de difusão, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Yoshida et al. (2010). Amostras dos filmes (2 x 2 cm) foram cortadas e imersas em 100 mL de água destilada em um Erlenmeyer, mantido sob agitação mecânica utilizando-se mesa agitadora MA420 (Marconi) a 170 rpm. Amostras da solução foram removidas em diferentes tempos pré-estabelecidos (1, 3, 5, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 e 240 minutos). A concentração do soluto liberada (sorbato de potássio ou nisina) foi determinada por medida de absorbância, utilizando-se espectrofotômetro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer). As leituras da absorbância para os filmes com sorbato de potássio e com nisina foram realizadas nos comprimentos de onda de 254nm (YOSHIDA et al, 2010) e 304 nm (HANUSOVA et al., 2010), respectivamente. A concentração de composto liberada por tempo t ($M(t)$) e a fração final ($M(t)/M$) foi calculada. Assim, a fração final ($M(t)/M$) foi plotada em função do tempo de imersão (t).

Para esta análise, as amostras dos filmes foram pré-acondicionadas em dessecadores contendo sílica por 48h. Em seguida, foram submetidas ao teste de difusão, sendo realizado em paralelo a análise do teor de umidade inicial. As curvas padrões foram determinadas para o sorbato de potássio e para a nisina nas faixas de concentrações de 0 a 10 mg de agente/g de água.

Para as modelagens, foi utilizado modelo proposto por Ritger e Peppas (1987), que é uma simplificação da lei de Fick, descrito na Eq. (6) anteriormente apresentada, com n simbolizando o mecanismo de transporte:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (6)$$

Para a determinação da difusividade efetiva de cada composto, em cada concentração específica, foi utilizado um outro modelo proposto por Ritger e Peppas (1987), com L sendo a espessura do filme, medida anteriormente às análises (Eq. 9)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left[\frac{D_{ef}.t}{\pi.L^2} \right]^{1/2} \quad (9)$$

Para a modelagem matemática dos resultados da liberação do bioativo em função do tempo, foi utilizado o programa computacional InfoStat®. A avaliação da confiabilidade do método foi feita pela soma dos quadrados dos desvios dos pontos experimentais às previsões da modelagem, e através de cálculos de correlação.

4.2.7 Análise Estatística

Todas as análises realizadas neste trabalho foram realizadas ao menos em triplicata, sendo posteriormente analisadas estatisticamente utilizando-se software InfoStat (Versão 5.13.1), e as médias foram determinadas pelo teste de Tukey, utilizando 95% de confiança. Para as modelagens de difusão foi utilizado o programa Statgraphics Centurion XVI (Versão 16.1.11).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos filmes

5.1.1 Aspectos visuais

Filmes obtidos com e sem a adição de agentes antimicrobianos (nisina e sorbato de potássio) podem ser observados na Figura 2. Verificou-se que independente da concentração de sorbato de potássio (Figura 2 b, c, d, e) ou nisina (Figura 2 f, g, h, i), os filmes apresentaram homogeneidade e ausência de partículas insolúveis. Pode-se observar ainda que eles apresentam coloração amarelada característica da quitosana utilizada (Figura 3).

Figura 2 – Exemplos dos filmes de quitosana sem e com adição de sorbato de potássio (SP) e nisina (N), sendo: (a) controle; (b) 2,5 mg de SP; (c) 5,0 mg de SP; (d) 7,5 mg de SP; (e) 10,0 mg de SP; (f) 2,5 mg de N; (g) 5,0 mg de N; (h) 7,5 mg de N; (i) 10,0 mg de N/g de quitosana.

Figura 3 – Fotos do (a) pó de quitosana e (b) solução filmogênica formada antes da adição dos compostos antimicrobianos.

5.1.2 Teor de umidade

Na Tabela 5 pode-se observar que a umidade dos filmes não foi afetada significativamente pelo conteúdo de sorbato ou nisina. Este comportamento está associado com o acondicionamento das amostras, que foi realizada em condições de umidade controlada (58% UR). Observou-se que os conteúdos de umidade variaram entre 22,49-23,89% e 23,24-24,40% para os filmes de quitosana elaborados com sorbato de potássio e nisina, respectivamente. Estes resultados demonstraram que os filmes elaborados a partir de quitosana são altamente hidrofílicos, possuindo uma grande capacidade de absorver água do ambiente.

Hafsa et al. (2016), analisando filmes de quitosana adicionados de óleo essencial de eucalipto, encontrou valores de umidade de 27,16% para filmes contendo apenas quitosana, e 24,39% de umidade para filmes com 1% do óleo. Entretanto, Shahbazi et al. (2016), em estudo com filmes de quitosana adicionados de k-carragena, encontraram valores de umidade próximos a 10% quando acondicionados em NaBr (58% UR). Efeito semelhante foi observado por Srinivasa et al. (2003) para filmes contendo somente quitosana.

Tabela 5 – Teor de umidade dos filmes de quitosana incorporados com potássio de sorbato (SP) e nisina (N) à diferentes concentrações.

Agente Antimicrobiano	Umidade (g de água/ 100g de filme)
C_{SP} (mg/g quitosana)	
0,0	23,89±2,31 ^a
2,5	22,57±0,75 ^a
5,0	22,49±0,68 ^a
7,5	23,16±0,64 ^a
10,0	23,63±1,26 ^a
C_N (mg/g quitosana)	
0,0	23,89±2,31 ^a
2,5	24,40±1,19 ^a
5,0	23,81±0,89 ^a
7,5	23,47±0,80 ^a
10,0	23,24±0,55 ^a

C_{SP} = concentração de sorbato de potássio em mg/g de quitosana. C_N= concentração de nisina em mg/g de quitosana. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada agente antimicrobiano, indicam diferença significativa (p<0,05) entre as diferentes concentrações dos agentes. Diferença entre médias obtidas através do teste Tukey, utilizando-se o programa computacional InfoStat.

Em análise de filmes de quitosana, Aljawish et al. (2016) encontrou que, para umidades relativas de acondicionamento de 60%, a umidade relativa dos filmes estava em torno de 20%. Segundo o autor, altos valores de umidade em filmes de quitosana podem ocorrer devido à grande natureza hidrofílica da quitosana e as fortes ligações entre as moléculas de água e seus grupos funcionais (-OH, -NH₂) por pontes de hidrogênio. Valores próximos foram obtidos por Ojagh et al. (2010) em filmes de quitosana adicionados de óleo essencial de canela.

5.1.3 Solubilidade em água

A solubilidade das formulações testadas foi de 100%, independente da presença ou não de agente antimicrobiano, e da concentração utilizada de cada agente.

Este comportamento pode estar relacionado ao elevado grau de desacetilação da quitosana utilizada. Segundo Kasaai (2009) a solubilidade aumenta com o aumento de grupamentos amina livres, e diminuição do grau de acetilação. O grau de desacetilação da quitosana é a característica estrutural chave em que algumas propriedades dependem, como é o caso da solubilidade (DIMZON; KNEPPER, 2015).

No entanto, Hafsa et al. (2016), para filmes de quitosana com grau de desacetilação superior a 75%, reportou valores de 30,92% de solubilidade após 24 horas de agitação em água destilada. Ele cita que filmes de quitosana são muito hidrofílicos e por isso absorvem água rapidamente, o que resulta em um inchamento do filme.

5.1.4 Propriedades mecânicas

Os resultados obtidos de tensão na ruptura (T), alongação (E) e módulo elástico (ME) e espessuras médias para cada formulação, para todas as concentrações de cada agente, e para a solução controle, podem ser observados na Tabela 6.

Notou-se que houve uma diminuição da tensão na ruptura (T) a medida que se aumentou a concentração de cada agente no meio. Para os filmes com sorbato de potássio, a diminuição da tensão na ruptura foi de aproximadamente 45,5%, quando comparada a concentração de 10 mg/g de quitosana com a formulação controle. Já para os filmes com nisina, esta diminuição foi de cerca de 19,4%, decrescendo de 28,35MPa a 22,85MPa, quando em sua concentração mínima e máxima analisadas, respectivamente.

Tabela 6 – Resistência à tensão na ruptura (T), alongação na ruptura (E), módulo elástico (ME) e espessura de filmes de quitosana incorporados com potássio de sorbato e nisina à diferentes concentrações.

Agente Antimicrobiano	Espessura (mm)	T (MPa)	E (%)	ME (MPa)
C_{SP} (mg/g quitosana)				
0,0	0,075±0,005 ^a	29,74±3,53 ^{a,b}	2,69±0,35 ^a	1643,4±233,8 ^b
2,5	0,076±0,004 ^{a,b}	32,21±2,68 ^a	2,48±0,35 ^a	1853,5±194,1 ^a
5,0	0,078±0,004 ^{a,b}	31,36±2,56 ^{a,b}	2,52±0,41 ^a	1691,8±164,4 ^{a,b}
7,5	0,077±0,002 ^{a,b}	28,57±4,69 ^b	2,68±0,88 ^a	1642,1±184,7 ^b
10,0	0,080±0,004 ^b	16,21±1,54 ^c	6,44±1,93 ^b	699,7±205,8 ^c
C_N (mg/g quitosana)				
0,0	0,075±0,005 ^a	29,74±3,53 ^a	2,69±0,35 ^a	1643,4±233,8 ^a
2,5	0,076±0,002 ^{a,b}	28,35±4,00 ^{a,b}	8,48±1,93 ^b	1292,7±151,0 ^b
5,0	0,079±0,001 ^b	26,53±3,98 ^{b,c}	7,57±2,68 ^b	1307,0±153,2 ^b
7,5	0,076±0,001 ^{a,b}	24,08±1,66 ^{c,d}	13,21±2,58 ^c	1168,9±162,1 ^b
10,0	0,078±0,002 ^b	22,85±2,15 ^d	17,44±2,87 ^d	1147,4±130,3 ^b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada agente antimicrobiano, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações dos agentes. Diferença entre médias obtidas através do teste Tukey, utilizando-se o programa computacional InfoStat.

Já os resultados de alongação, que medem a porcentagem de deformação que o filme sofreu quando submetido à tração, apresentaram um aumento para ambos os agentes utilizados, conforme se aumentava sua concentração no meio. Foi observado um aumento de cerca de 259% para o sorbato de potássio, que aumentou de 2,48% para os filmes com baixa concentração do agente, para 6,44% para os filmes contendo a concentração de 10 mg/g quitosana. No caso dos filmes com nisina, este aumento foi de aproximadamente 205,7%, variando de 8,48% à 17,44% para as concentrações de 2,5 mg/g e 10 mg/g de quitosana, respectivamente.

Estes resultados podem estar relacionados às interações entre as cadeias dos agentes antimicrobianos, que podem penetrar com certa facilidade na matriz do filme. Como consequência, ocorre uma maior mobilidade entre as

cadeias, produzindo filmes com menor resistência à tração e maior flexibilidade.

Resultados similares foram apresentados por Pranoto et al (2005), estudando filmes de quitosana adicionados de nisina e sorbato de potássio. Em seus estudos, eles verificaram que o aumento da concentração de sorbato de potássio nos filmes causou uma diminuição na tensão na ruptura de $26,40 \pm 9,72$ MPa para $13,54 \pm 1,11$ MPa, e uma variação de $2,14 \pm 0,77\%$ a $9,97 \pm 2,62\%$ na elongação. Já para os filmes adicionados de nisina, foi reportado uma variação de $23,70 \pm 6,29$ MPa a $13,58 \pm 1,33$ MPa e de $14,13 \pm 2,88\%$ a $30,72 \pm 1,81\%$, nos valores de tensão na ruptura e elongação, respectivamente.

Cagri et al (2001), para filmes com proteína isolada de soro adicionados de ácido sórbico, também reportaram resultados similares relativos a elongação e tensão na ruptura. Eles concluíram que a incorporação de aditivos, que não sejam agentes de reticulação, geralmente diminuem o valor da tensão na ruptura.

Analizando filmes de amido de batata adicionados de sorbato de potássio em diferentes concentrações, Barzegar et al. (2014) reportaram que o sorbato agiu como um plastificante, reduzindo a tensão e aumentando a elongação na ruptura de seus filmes, ocasionado pela diminuição das forças intermoleculares.

Para os resultados de módulo elástico (ME), verificou-se que o aumento da concentração do sorbato de potássio causou uma diminuição do módulo elástico, decrescendo de $1853,5 \pm 194,1$ a $699,7 \pm 205,8$ MPa. Já para a nisina, notou-se que sua adição causou uma diminuição quando comparada com a formulação controle, porém não foi observada diferença estatística entre as diferentes concentrações deste agente ($p > 0,05$).

Resa et al. (2014), em filmes de amido de mandioca adicionados de nisina, encontraram que o aumento da concentração da nisina causou uma diminuição nos valores de módulo elástico pois, segundo os autores, a nisina agiu como um plastificante, afetando a formação das redes de amido, e por

consequência, as propriedades mecânicas dos filmes. Resultado similar foi observado por Basch et al. (2013), em blendas comestíveis de amido de milho e HPMC aditivadas com nisina.

5.2 Ângulo de Contato

A Figura 4 apresenta imagens que representam o comportamento da gota de água após deposição sobre o filme em relação ao tempo. Pode-se observar um aumento no ângulo formado entre a gota e o filme nos primeiros instantes. As imagens foram inicialmente feitas a cada 15 segundos de deposição, e por fim a cada 60 segundos, sendo possível, assim, visualizar seu comportamento durante 5 minutos de ensaio.

Os resultados referentes ao ângulo de contato entre o filme contendo agente antimicrobiano e uma gota de água após 35 segundos, para cada um dos agentes analisados, pode ser encontrado na Tabela 7. Pode-se observar que, tanto para os filmes com adição de sorbato de potássio (SP) quanto para os adicionados com nisina (N), houve diferença significativa entre as amostras e o controle.

Os filmes aditivados de sorbato de potássio apresentaram um aumento significativo do ângulo de contato quando comparados com a formulação sem agente antimicrobiano. A adição do agente causou uma variação de cerca de 10° no ângulo de contato do filme, independente da concentração. Entretanto, não foi observado diferença estatística significativa quando se aumentou a concentração do agente no meio.

Notou-se também que, quando comparado com a solução padrão, a adição da nisina causou efeito semelhante ao sorbato de potássio, onde sua adição causou um aumento no ângulo de contato. Entretanto, quando se aumentou a concentração de nisina no meio, efeito diferente ao do sorbato de potássio foi observado, onde o aumento de sua concentração causou um aumento no ângulo de contato entre a gota e o filme, variando de 104,36° para as concentrações de 2,5 g de nisina/g de quitosana, à 110,12° para a

concentração de 10 mg de nisina/g de quitosana, indicando que a concentração de nisina no meio influencia a hidrofobicidade do filme.

Figura 4 - Imagem de uma gota de água sobre a superfície de filme de quitosana sem adição de agente antimicrobiano, nos tempos de: (a) 0 segundos; (b) 15 s; (c) 30 s; (d) 45 s; (e) 60 s, (f) 90 s; (g) 120 s; (h) 180 s; (i) 240 s; e (j) 300 s.

Tabela 7 - Efeito da variação da concentração de sorbato de potássio (C_{SP}) e da concentração de nisina (C_N) no ângulo de contato de filmes de quitosana, após 35 segundos de deposição.

Agente Antimicrobiano	Ângulo de Contato (°)
C_{SP} (mg/g quitosana)	
0,0	101,42±6,48 ^a
2,5	111,53±2,90 ^b
5,0	110,90±2,96 ^b
7,5	110,44±2,60 ^b
10,0	110,57±3,60 ^b
C_N (mg/g quitosana)	
0,0	101,42±6,48 ^a
2,5	104,36±2,41 ^a
5,0	108,69±1,89 ^b
7,5	110,18±3,06 ^b
10,0	110,12±2,43 ^b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada agente antimicrobiano, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações dos agentes. Diferença entre médias obtidas através do teste Tukey, utilizando-se o programa computacional InfoStat.

Estes resultados, para ambos os agentes antimicrobianos utilizados, podem estar relacionados a uma diminuição da molhabilidade do filme, que pode ser atribuída ao caráter hidrofóbico de parte da cadeia do sorbato de potássio e da nisina.

Em geral, ângulos de contato baixos ($\theta < 65^\circ$) indicam uma superfície hidrofílica, enquanto valores altos ($\theta > 65^\circ$) são características de superfícies hidrofóbicas (VOGLER, 1998).

Segundo Kurek et al. (2014), filmes baseados em quitosana tem um comportamento não-linear, podendo ocorrer alterações como solvatação, hidratação e/ou inchaço. De acordo com o autor, este comportamento pode diferenciar em função do solvente utilizado na formação dos filmes, sendo relatado um inchaço após a deposição da gota no filme, caracterizando um aumento no ângulo de contato formado. Ele ainda ressalta que a presença de

água na superfície de seus filmes resultou em baixas forças de atrito na superfície, além do inchaço ser provavelmente relacionado à fenômeno de plastificação e solubilização parcial das cadeias moleculares da quitosana, sendo considerado uma propriedade desejável para materiais biocompatíveis.

Em filmes de fécula de mandioca, adicionados de nisina e outros compostos, Resa et al. (2014b) reportaram que a adição de compostos antimicrobianos, como a nisina, causam um aumento no ângulo de contato, sendo observado valores de ângulo de contato de aproximadamente 60° para estes tipos de filmes, indicando o aumento da hidrofobicidade dos filmes formados.

Efeito similar foi observado por Hosseini et al. (2016), em filmes de gelatina adicionados de óleo essencial de orégano, onde foi reportado valores variando entre aproximadamente 58°, para filmes sem adição do óleo, a aproximadamente 80°, para filmes contendo 1,2% do óleo, devido à natureza hidrofóbica do agente antimicrobiano adicionado. Resultados similares foram apresentados por Ojagh et al. (2010), que reportaram que a incorporação de óleo essencial de canela em filmes de quitosana resultaram em uma diminuição da hidrofilicidade dos filmes.

Em contrapartida, Shahbazi et al. (2016), em filmes de quitosana adicionados de k-carragena, reportaram valores moderadamente baixos de ângulo de contato ($\theta=39^\circ$) para os filmes apenas com quitosana. A superfície áspera e a cadeia hidrofílica da quitosana provavelmente foram o motivo da alta hidrofilicidade e molhabilidade dos filmes. Porém foi reportado um aumento considerável de 29° no ângulo de contato dos filmes adicionados de k-carragena, resultado do desaparecimento de fissuras nos filmes.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias das superfícies e da estrutura interna, obtidas por criofratura, dos filmes de quitosana com e sem adição do agente microbiano podem ser observadas nas Figuras 5, 6 e 7. Em todas as formulações analisadas, de um modo geral, não é possível observar irregularidade nas

superfícies, com exceção de algumas pequenas partículas que podem ser vistas, porém em baixas quantidades. Estas partículas visíveis são partículas de quitosana que não foram totalmente solubilizadas durante a produção da solução filmogênica.

Com relação aos agentes antimicrobianos adicionados, não é possível observar sua presença nos filmes. Isso ocorre pois, mesmo em concentrações mais altas, a quantidade adicionada de cada agente não é elevada. Outro fator é o fato dos agentes serem totalmente dissolvido antes de sua adição nas soluções, favorecendo a formação de um filme final homogêneo.

Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica dos filmes sem adição de agente antimicrobiano: (a) superfície; (b) criofratura.

Figura 6 - Imagem de microscopia eletrônica dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de sorbato de potássio (C_{SP}) nas seguintes condições: (a) superfície, $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (b) criofratura $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (c) superfície $5,0$ mg/g; (d) criofratura $5,0$ mg/g (e) superfície $7,5$ mg/g; (f) criofratura $7,5$ mg/g (g) superfície $10,0$ mg/g; (h) criofratura $10,0$ mg/g de quitosana.

Figura 7 - Imagem de microscopia eletrônica dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de nisina (C_N) nas seguintes condições: (a) superfície, $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (b) criofratura $C_{SP} = 2,5$ mg/g; (c) superfície 5,0 mg/g; (d) criofratura 5,0 mg/g (e) superfície 7,5 mg/g; (f) criofratura 7,5 mg/g (g) superfície 10,0 mg/g; (h) criofratura 10,0 mg/g de quitosana.

Resultado igual pode ser observado nas imagens das superfícies internas de cada formulação, obtidas através da criofratura dos filmes. Pode-se observar que, tanto as formulações com adição de sorbato de potássio, quanto as formulações com nisina, apresentaram superfície interna homogênea, lisa e sem presença de poros, iguais as obtidas da superfície interna do filme controle. Isso reforça a ideia de que, independentemente da quantidade adicionada, a incorporação de ambos os agentes não afetou a homogeneidade da matriz polimérica.

Yoshida et al. (2010) em filmes de quitosana adicionados de sorbato de potássio, reportaram resultados similares, onde foi observado uma estrutura compacta e coesa, sem a presença de poros ou fissuras, uma vez que as moléculas de sorbato de potássio estavam aprisionadas na matriz do filme.

Da mesma maneira, Wang et al. (2015) observaram filmes homogêneos com superfície lisa e sem presença de fissuras, para filmes de quitosana adicionados de nisina e álcool polivinílico. Este efeito também foi observado por Park et al. (2004) para filmes de quitosana e lisozima.

5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Todos os espectros analisados, tanto para o sorbato de potássio quanto para a nisina, apresentaram padrões similares, com picos característicos em 3400 cm^{-1} e $1030\text{-}1155\text{ cm}^{-1}$. A absorção na primeira região, de 3400 cm^{-1} , indica ligações O-H e N-H, e na região de $1030\text{ a }1155\text{ cm}^{-1}$, ligações C-O. Além disso, os picos de absorção em 2880 cm^{-1} indicam ligações C-H, a região em torno de $1550\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ correspondem aos grupos amina (-NH_2), e a região de 1400 cm^{-1} aos grupos carboxilatos (-COO^-) (PRANOTO et al., 2005).

Os resultados das análises de FTIR são apresentados nas Figura 8 e Figura 9. Pelos resultados obtidos, pode-se observar que não houveram grandes mudanças estruturais nos filmes de quitosana, tanto para os adicionados de sorbato de potássio, quanto para os adicionados de nisina. Porém nos filmes incorporados com sorbato de potássio (Figura 8) pode-se

observar uma pequena mudança entre 1636 e 1652 cm^{-1} , que se torna mais nítido com o aumento da concentração do agente, indicando interação entre o grupo amina da quitosana e do grupo carboxila do sorbato, como também observado por Pranoto et al. (2005), para filmes de quitosana adicionados de sorbato de potássio. O pico em torno de 1402 cm^{-1} , observado com maior nitidez na concentração de 10,0 mg/g de quitosana, pode estar associado a uma acumulação de grupos carboxilatos ($-\text{COO}-$).

Para os filmes adicionados de nisina a diferentes concentrações (Figura 9), pode-se notar que os resultados obtidos são semelhantes aos filmes de quitosana incorporados com sorbato de potássio na maioria das regiões, com presença de picos característicos.

Pranoto et al. (2005) observou, para filmes de quitosana adicionados de nisina, um aumento na banda Amida I entre 1638 cm^{-1} com o aumento da concentração de nisina incorporada. Segundo o autor, isto pode ter ocorrido devido a uma interação entre o grupo amina da quitosana e grupos funcionais contidos em nisina, o que levou a formação de ligações covalentes e, conseqüentemente, um aumento no tamanho do pico. Já para filmes de quitosana adicionados com sorbato, o autor encontrou resultado semelhante ao apresentado.

Para filmes de fécula de batata-doce adicionados de quitosana ou sorbato de potássio, Shen et al. (2010) observaram que todos os filmes mostram padrões semelhantes, com picos entre 3300 - 3400 cm^{-1} , 1414 cm^{-1} e em torno de 1022 cm^{-1} . Segundo o autor, absorções nestas regiões revelam a formação de ligações O-H e N-H no comprimento de 3400 cm^{-1} , deformações simétricas C-H em 1414 cm^{-1} , e ligação C-O em 1022 cm^{-1} , sendo também observado um pico moderado perto de 1649 cm^{-1} devido à ligação C=O (amida I).

Figura 8 - Espectros de absorção de infravermelho de filmes de quitosana em função da concentração de sorbato de potássio adicionado.

Figura 9 - Espectros de absorção de infravermelho de filmes de quitosana em função da concentração de nisina adicionada.

5.5 Difusão de compostos bioativos

A concentração do sorbato de potássio e da nisina foi calculada usando-se a curva de calibração de cada agente, $Abs_{254nm} = 0,9608.C_{SP}$ ($R^2 = 0,9967$); $Abs_{304nm} = 0,9385.C_N$ ($R^2 = 0,9909$), obtidas da diluição de cada agente em água. Após a obtenção da curva padrão, foi feita a análise de liberação do composto em função do tempo, fazendo-se a leitura da absorbância em cada instante de tempo, como proposto na metodologia.

A fração de massa liberada, definida como M_t/M_∞ , onde M_t é a massa do composto antimicrobiano liberada em cada intervalo de tempo, e M_∞ é a massa liberada no tempo infinito, ou seja, a massa final liberada, foi plotado em função do tempo de imersão. As análises foram feitas em triplicata para cada concentração de agente, assim foi possível se determinar o desvio padrão em cada concentração, para cada tempo específico, para uma melhor observação do comportamento de liberação de cada agente. Os resultados obtidos da fração de massa liberada podem ser observados nas Figura 10 e 11.

Pelos gráficos apresentados, notou-se que, tanto para o sorbato de potássio quanto para a nisina, a liberação em água destilada foi gradual e seguiu um modelo exponencial, segundo a Lei de Fick. Assim, foi possível se determinar um modelo matemático que expressasse a liberação de cada composto, em função do tempo de imersão, para cada concentração analisada.

Figura 10 - Curva de liberação de Sorbato de Potássio em função do tempo de imersão nas concentrações de: ● 2,5 mg/g; ■ 5,0 mg/g; ◆ 7,5 mg/g; e ▲ 10,0 mg/g de quitosana.

Figura 11 - Curva de liberação de Nisina em função do tempo de imersão nas concentrações de: ● 2,5 mg/g; ■ 5,0 mg/g; ◆ 7,5 mg/g; e ▲ 10,0 mg/g de quitosana.

Nas figuras a seguir, pode-se observar os modelos ajustados para cada concentração de composto. A Figura 12 representa as modelagens obtidas para as diferentes concentrações de sorbato de potássio, enquanto a Figura 13 representa as modelagens para a Nisina.

A partir dos resultados determinou-se os valores de difusividade efetiva para cada concentração. Na Tabela 8 estão apresentados os valores de espessura média de cada filme utilizado nas modelagens, bem como os valores obtidos das constantes n e k , após cálculo de regressão não-linear, obtidos através da equação 9, e seus respectivos valores de difusividade efetiva (D_{ef}) e R^2 para cada um dos agentes utilizados.

Figura 12 – Curva de liberação de sorbato de potássio (●) e respectiva modelagem (—) em função do tempo nas concentrações de: (a) 2,5 mg/g; (b) 5,0 mg/g; (c) 7,5mg/g e (d) 10mg/g de quitosana.

Figura 13 – Curva de Liberação de nisina (●) e respectiva modelagem (—) em função do tempo nas concentrações de: (a) 2,5 mg/g; (b) 5,0 mg/g; (c) 7,5mg/g e (d) 10mg/g de quitosana.

Pode-se observar pelos gráficos e tabela apresentados que as modelagens se ajustaram bem aos resultados, porém os valores de R^2 para as modelagens dos filmes adicionados de nisina ficaram abaixo do esperado, variando entre 0,6072 e 0,7863. Já para as modelagens do sorbato de potássio, os valores de R^2 variaram entre 0,9310 e 0,9754.

O parâmetro n está relacionado com o mecanismo de liberação do composto ativo, onde valores superiores a 0,5 representam difusão não-Fickiana, e a difusão Fickiana é representada por valores de n até 0,5 (RITGER; PEPPAS, 1987). Sendo assim pode-se dizer que todos os modelos de difusão apresentados, independente do agente antimicrobiano ou da concentração utilizada, apresentaram mecanismo de liberação Fickiana.

Tabela 8 – Parâmetros de modelagem e difusividade efetiva (D_{ef}) determinados por modelo de sólido semi-infinito para a difusão para os filmes de quitosana com diferentes concentrações de sorbato de potássio (C_{SP}) e nisina (C_N) em filmes ativos de quitosana, em meio aquoso.

Agente Antimicrobiano	Espessura média (mm)	n	K	R^2	D_{ef} ($\times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$)
SP (mg/g quitosana)					
2,5	$0,0080 \pm 0,0001^a$	$0,345^a$	$0,175^a$	0,9574	$2,292 \pm 0,067^a$
5,0	$0,0079 \pm 0,0001^a$	$0,286^b$	$0,235^a$	0,9754	$1,909 \pm 0,166^a$
7,5	$0,0080 \pm 0,0001^a$	$0,237^c$	$0,306^{a,b}$	0,9660	$2,282 \pm 0,154^a$
10,0	$0,0079 \pm 0,0002^a$	$0,187^d$	$0,402^b$	0,9310	$2,101 \pm 0,120^a$
N (mg/g quitosana)					
2,5	$0,0079 \pm 0,0001^a$	$0,080^a$	$0,654^a$	0,7863	$1,297 \pm 0,167^a$
5,0	$0,0079 \pm 0,0001^a$	$0,055^{a,b}$	$0,735^{a,b}$	0,6072	$1,347 \pm 0,370^a$
7,5	$0,0080 \pm 0,0002^a$	$0,040^b$	$0,779^b$	0,6250	$1,303 \pm 0,045^a$
10,0	$0,0079 \pm 0,0001^a$	$0,038^b$	$0,816^b$	0,6360	$1,234 \pm 0,125^a$

n é o expoente de difusão do modelo de lei de potência; k é a constante do modelo de lei de potência, D_{ef} é a difusividade efetiva dos agentes. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada agente antimicrobiano, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações dos agentes. Diferença entre médias obtidas através do teste Tukey, utilizando-se o programa computacional InfoStat.

Na Tabela 8 pode-se observar que os valores de difusividade efetiva tanto para o sorbato de potássio quanto para a nisina, não apresentaram diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey. Isso significa que, independente da concentração utilizada na formulação, a difusão entre o agente antimicrobiano e o meio é regida por um mesmo coeficiente, sendo que, para o sorbato de potássio, este valor variou entre $1,909$ e $2,292 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ e para a nisina, variou entre $1,234$ e $1,347 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$.

Resultados semelhantes foram obtidos por Yoshida et al. (2010) em estudo sobre difusão de filmes de quitosana emulsionados com ácido palmítico, cera de abelha ou cera de carnaúba, adicionados sorbato de potássio em meio aquoso, onde foi encontrado boa relação entre a modelagem e os valores obtidos de cada análise. Em seus resultados, os filmes contendo quitosana e sorbato de potássio apresentaram difusividade efetiva de $(1,22 \pm 0,19) \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ e R^2 de 0,9956. Segundo o próprio autor, estes resultados podem estar relacionados ao alto grau de solubilidade em água do sorbato de potássio, que pode ter aumentado a hidrofiliabilidade da matriz de quitosana e facilitado a absorção do solvente quando em contato com meio aquoso.

Choi et al. (2005), em filmes de k-carragena adicionados de sorbato de potássio, também encontraram valores próximos aos apresentados, sendo que para testes feitos em pH de 3,8 o valor de difusividade efetiva foi de $(1,17 \pm 0,60) \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ (R^2 de 0,994). Wang et al. (2015) para blendas de quitosana e poli vinil álcool adicionados de nisina, também encontraram valores de difusividade na ordem de $10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, porém com algumas variações em função da temperatura e da relação entre quitosana e poli(vinil álcool) usada para cada formulação.

6 CONCLUSÕES

A adição dos agentes antimicrobianos sorbato de potássio e nisina provocaram algumas alterações significativas nas propriedades dos filmes. A incorporação de sorbato de potássio ou de nisina provocaram redução da tensão na ruptura e um aumento da elasticidade dos filmes, com o aumento da concentração de cada agente.

A hidrofiliçidade dos filmes também foi afetada com a adição de ambos os agentes antimicrobianos. Estes resultados sugerem uma interação entre os agentes e a quitosana, que foi comprovada pelas análises de espectroscopia de infravermelho e ângulo de contato.

Com relação a umidade e a solubilidade dos filmes, foi constatado que a presença dos compostos não alterou a umidade final do filme, porém, em todas as formulações, inclusive as sem presença do sorbato de potássio e da nisina, foi observado solubilidade total dos filmes, relacionado possivelmente ao alto teor de desacetilação da quitosana usada.

Os resultados de difusão em meio aquoso das amostras demonstraram um comportamento Fickiano para ambos os agentes antimicrobianos, apresentando um coeficiente de difusão na ordem de $10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$. O modelo matemático analisado se adequou melhor ao comportamento de liberação dos compostos da matriz filmogênica adicionada de sorbato de potássio do que os adicionados de nisina, evidenciado pelos valores obtidos dos coeficientes de determinação.

7 REFERÊNCIAS

ABREU, D.A.P.; CRUZ, J.M.; LOSADA, P.P. Active and intelligent packaging for the food industry. **Food Reviews International**, v.28, n.2, p. 146-187, 2012.

AGUIRRE-LOREDO, R.Y.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.I.; MORALES-SÁNCHEZ, E.; GÓMEZ-ALDAPA, C.A.; VELAZQUEZ, G. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. **Food Chemistry**, v.196, p.560-566, 2016.

ALBOOFETILEH, M.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H.; ABDOLLAHI, M. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. **Food Control**, v.36, n.1, p.1–7, 2014.

ALJAWISH, A.; MUNIGLIA, L.; KLOUJ A.; JASNIEWSKI, J. SCHER, J.; DESOBRY, A. Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds. **Food Hydrocolloids**, v.60, p.551-558, 2016.

ALVARENGA, E.S. Characterization and properties of chitosan. In: ELNASHAR, M. (Org.). **Biotechnology of biopolymers**. China, cap.5, p.91-108, 2011.

ANKER, M.; BERNTSEN, J.; HERMANSSON, A.M.; STADING, M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. **Food Science & Emerging Technology**, v.3, p.81–92, 2002.

APPENDINI, P. HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging.

Innovative Food Science & Technologies, v.3, p.113-116, 2002.

ARANAZ, I.; HARRIS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; HERAS, A.; ACOSTA, N.

Chitosan based films as supports for dual antimicrobial release. **Carbohydrate Polymers**, v.146, p.402-410, 2016.

ARANAZ, I.; HARRIS, R.; NAVARRO-GARCÍA, R.; HERAS, A.; ACOSTA, N.

Chitosan based films as supports for dual antimicrobial release. **Carbohydrate Polymers**, v.146, p.402-410, 2016.

ARAÚJO, G.K.P.; SOUZA, S.J.; SILVA, M.V.; YAMASHITA, F.; GONÇALVES,

O.H.; LEIMANN, F.V.; SHIRAI, M.A. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract.

International Journal of Food Science & Technology, v.50, n.9, p.2080–2087, 2015.

ARVANITOYANNIS, I.S. Totally and partially biodegradable polymer blends

based on natural and synthetic macromolecules: preparation, physical properties, and potential as food packaging materials. **Journal of**

Macromolecular Science, v.39, n.2, p.205-271, 1999.

ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting.

Annual Bookds ASTM, D882-10, 2010.

AYANA, B. B.; TURHAN, K. N.; WILEY, J. Use of antimicrobial methylcellulose films to control *Staphylococcus aureus* during storage of kasar cheese.

Packaging Technology and Science, n.22, p. 461–469, 2009.

BAHRAM, S.; REZAEI, M.; SOLTANI, M.; KAMALI, A.; OJAGH, S.M.; ABDOLLAHI, M. Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, n.3, p.1251–1258, 2014.

BALDINO, L.; CARDEA, S.; REVERCHON, E. Production of antimicrobial membranes loaded with potassium sorbate using a supercritical phase separation process. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.34, p.77-85, 2016.

BARZEGAR, H.; AZIZI, M.H.; BARZEGAR, M.; HAMIDI-ESFAHANIM, Z. Effect of potassium sorbate on antimicrobial and physical properties of starch-clay nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v.110, p.26-31, 2014.

BASCH, C.Y.; JAGUS, R.J.; FLORES, S.K. Physical and antimicrobial properties of tapioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p.2419-2428, 2013.

BÉGIN, A.; CALSTEREN, M-R.V. Antimicrobial films produced from chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p.63-67, 1999.

BOYACI, D.; KOREL, F.; YEMENICIOGLU, A. Development of activate-at-home-type edible antimicrobial films: An example pH-triggering mechanism formed for smoked salmon slices using lysozyme in whey protein films. **Food Hydrocolloids**, v.60, p.170-178, 216.

BUTLER, B.L.; VERGANO, P.J.; TESTIN, R.F.; BUNN, J.M.; WILES, J.L. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. **Journal of Food Science**, v.61, p.653-656, 1996.

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

CAO-HOANG, L.; CHAINE, A.; GRÉGORIE, L.; WACHÉ, Y. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. **Food Microbiology**, v.27, n.7, p.940-944, 2010.

CHEN, M-C.; YEH, G.H-C.;CHIANG, B-H. Antimicrobial and physicochemical properties of methyl cellulose and chitosan films containing a preservative. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.20, p.379-390, 1996.

CHENG, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v.24, p.2871-2880, 2003.

CHOI, J.H.; CHOI, W.Y.; CHA, D.S.; CHINNAN, M.J.; PARK, H.J.; LEE, D.S.; PARK, J.M. Diffusivity of potassium in k-carrageen based antimicrobial film. **Lebens-Wissenschaft**, 2005.

CHUNG, Y-C.; KUO, C-L.; CHEN, C-C. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. **Bioresource Technology**, v.96, p.1473-1482, 2005.

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

CONCHA-MEYER, A.; SCHOBITZ, R.; BRITO, C.; FUENTES, R. Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. **Food Control**, v.22, p.485-489, 2011.

COOKSEY, K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.10, p.980-987, 2005.

CORRALES, M.; HAN, J.H.; TAUSCHER, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, n.2, p.425–433, 2009.

COZMUTA, A.M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L.M.; PETER, A.; NICULA, C.; GALIC, N.; BENKOVIC, T. Preparation and

characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils.

Food Hydrocolloids, v.49, p.144-155, 2015.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. London, Oxford University Press, pp.4, 1975.

CUTTER, C.N. Microbial control by packaging: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.42, n.2, p.151-161, 2002.

DAS, M.; CHOWDHURY, T. Heat sealing property of starch based self-supporting edible films. **Food Packaging and Shelf Life**, v.9, p.64-68, 2016.

DASHIPOUR, A.; RAZAVILAR, V.; HOSSEINI, H.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; GERMAN, J.B.; GHANATI, K.; KHAKPOUR, M.; KHAKSAR, R. Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72, p.606–613, 2015.

DIMZON, I.K.D; KNEPPER, T.P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72, p.939-945, 2015.

DOMARD, A.; DOMARD, M. Chitosan: Structure – Properties relationship and biomedical applications. **Polymeric Biomaterials**, v.2, p.187-212, 2002.

DONG, X.; MCCOY, E.; ZHANG, M.; YANG, L. Inhibitory effects of single-walled carbon nanotube sheet on biofilm formation from *Bacillus anthracis* spores. **Journal of Environmental Sciences**, v.26, p.2526-2534, 2014.

EHIVET, F.E.; MIN, B.; PARK, M.K.; OH, J.H. Characterization and antimicrobial activity of sweetpotato starch-based edible film containing qriganum (*Thymus capitatus*) oil. **Journal of Food Science**, v.76, n.1, 2011.

EL-GHAOUTH, A.; PONNAMPALAM, R.; CATAIGNE, F.; ARUL, J. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. **Hortscience**, v.27, n.9, p.1016-1018, 1992.

ELSABEE, M.Z.; ABDOU, E.S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v.33, p.1819-1841, 2013.

EMIROGLU, Z.K.; YEMIS, G.P.; COSKUN, B.K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v.86, n.2, p.283–288, 2010.

FAKHOURI, F.M.; MARTELLI, S.M.; CAON, T.; VELASCO, J.I.; MEI, L.H.I. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.109, p.57-64, 2015.

FAMÁ, L.; ROJAS, A.M.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, p.631-639, 2005.

FLORES, S.; FAMÁ, L.; ROJAS, A.M.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. **Food Research International**, v.40, p.257-265, 2007.

GHASEMLOU, M.; ALIHEIDARI, N.; FAHMI, R.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; KESHAVARZ, B.; CRAN, M. J.; KHAKSAR, R. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils.

Carbohydrate Polymers, v.98, n.1, p.1117–1126, 2013.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ DE LACEY, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation.

Food Microbiology, v.27, n.7, p.889–896, 2010.

GONTARD, N.; DOUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.29, p.39-50, 1994.

GUIMARÃES, I.C.; REIS, K.C.; MENEZES, E.G.T.; RODRIGUES, A.C.; SILVA, T.F.; OLIVEIRA, I.R.N.; BOAS, E.V.B.V. Cellulose microfibrillated suspension of carrots obtained by mechanical defibrillation and their application in edible starch films. **Industrial Crops and Products**, v.89, p.285-294, 2016.

GUTIÉRREZ, T.J.; MORALES, N.J.; TAPIA, M.S.; PÉREZ, E.; FAMÁ, L. Corn starch 80:20 “waxy”: Regular, “native” and phosphated, as bio-matrixes for edible films. **Procedia Materials Science**, v.8, p.304-310, 2015.

HAFSA, J.; SMACH, M.A.; KHEDHER, M.R.B.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties

of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v.68, p.356-364, 2016.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v.54, p.56-65, 2000.

HAN, J.H.; FLOROS, J.D. Casting antimicrobial packaging films and their physical properties and antimicrobial activity. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v.13, p.287–298, 1998.

HANUSOVA, K.; STASTNÁ, M.; VOTAVOVÁ, L.; KLAUDISOVÁ, K.; DOBIÁS, J.; VOLDRICH, M.; MAREK, M. Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. **Journal of Food Engineering**, v.99, p.491-496, 2010.

HAQUE, T.; CHEN, H.; OUYANG, W.; MARTONI, C.; LAWUYI, B.; URBANSKA, A.M.; PRAKASH, S. Superior cell delivery features of poly(ethylene glycol) incorporated alginate, chitosan, and poly-L-lysine microcapsules. **Molecular Pharmaceutics**, v.2, n.1, p.29-36, 2005.

HOSSEINI, S.F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v.194, p.1266–1274, 2016.

HUDSON, S.M.; SMITH, C. Polysaccharides: chitin and chitosan: chemistry and technology of their use as structural materials. In: KAPLAN, D.L. (Org.).

Biopolymers from Renewable Resources. Springer, cap.4, p.96-118, 1998.

IRKIN, R.; ESMER, O.K. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p.6095-6111, 2015.

JIN, T. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in skim milk and liquid egg white by antimicrobial bottle coating with polylactic acid and nisin. **Journal of Food Science**, v.75, n.2, p.83-88, 2010.

JOVANOVIĆ, G.D.; KLAUS, A.S.; MIOMIR, P.N. Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish. **Revista Argentina de Microbiologia**, p.1-9, 2016.

JUCK, G.; NEETOO, H.; CHEN, H. Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, n.3, p.302-308, 2010.

KASAI, M.R. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.1667-1676, 2009.

KIM, H-J.; CHEN, F.; WANG, X.; RAJAPAKSE, N.C. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3696-3701, 2005.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.70, p.337–349, 1988.

KONG, M.; CHEN, X.G.; LIU, C.S.; LIU, C.G.; MENG, X.H.; YU, L.J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v.65, n.2, p.197-202, 2008.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.51-63, 2010.

KUMAR, M.; JAIN, A.K.; GHOSH, M.; GANGULI, A. Potential application of an anti-aeromonas bacteriocin of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* in the preservation of vegetable salad. **Journal of Food Safety**, v.32, n.3, p.369-378, 2012.

KUREK, M.; GUINAULT, A.; VOILLEY, A.; GALIC, K.; DEBEAUFORT, F. Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. **Food Chemistry**, v.144, p.9-17, 2014.

LI, B.;KENNEDY, J.F.; PENG, J.L.; YIE, X.; XIE, B.J. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. **Carbohydrate Polymers**, v.65, p.488-494, 2006.

MARTINS, J.T.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, G.W.S.; AVIDES, M.C.; VICENTE, A.A. Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *listeria monocytogenes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.1884-1891, 2010.

MATTHEWS, V.; MANGALASARY, S.; DARBY, D.; COOKSEY, K. Effectiveness of barrier film with a cellulose coating that carries nisin blends for the inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Packaging and Technology and Science**, v.23, p.267–273, 2010.

MAURIELLO, G. LUCA, E.; STORIA, A.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, n.6, p.464-469, 2005.

MEHYAR, G.F.; AL-QADIRI, H.M.; SWANSON, B.G. Edible coatings and retention of potassium sorbate on apples, tomatoes and cucumbers to improve antifungal activity during refrigerated storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, n.1, p.175-182, 2012.

NAM, S.; SCANLON, M.G; HAN, J.H.; IZIDORCZYK, M.S. Extrusion of pea starch containing lysozyme and determination of antimicrobial activity. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.477-484, 2007.

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.

NOBILE, M.A.D.; CONTE, A.; INCORONATO, A.L.; PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**, v.89, n.1, p.57-63, 2008.

O'CALLAGHAN, K.A.M.; KERRY, J.P. Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures. **Food Control**, v.69, p.256-261, 2016.

OJAGH, S.M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S.H.; HOSSEINI, S.M.H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v.122, n.1, p.161–166, 2010.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; PIETTE, G.; BÉGIN, A.; HOLLEY, R.A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.139-148, 2000.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Film composition effects on diffusion of potassium sorbate through whey protein films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.68, n.2, p.511-516, 2003.

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

PAGNO, C.H.; KLUG, T.V.; COSTA, T.M.H.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; FLÔRES, S.H. Physical and antimicrobial properties of quinoa flour-based films incorporated with essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, v.133, n.16, p.1-9, 2016.

PARK, S.I.; DAESCHEL, M.A.; ZHAO, Y. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. **Journal of Food Science**, v.69, n.8, p.215-221, 2004.

PEREDA, M. ARANGUREN, M.I.; MARCOVICH, N.E. Water vapor absorption and permeability of films based on chitosan and sodium caseinate. **Polymers and Polymer Composites**, v.21, n.7, p.449-456, 2008.

PEREDA, M.; PONCE, A.G.; MARCOVICH, N.E.; RUSECKAITE, R.A.; MARTUCCI, J.F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.5, p.1372-1381, 2011.

PÉREZ, L.M.; PICCIRILLI, G.N.; DELORENZI, N.J.; VERDINI, R.A. Effect of different combinations of glycerol and/or trehalose on physical and structural properties of whey protein concentrate-based edible films. **Food Hydrocolloids**, v.56, p.352-359, 2016.

PONCE, A.G.; ROURA, S.I.; DEL VALLE, C.E.; MOREIRA, M.R. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. **Postharvest Biology and Technology**, v.49, n.2, p.294–300, 2008.

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

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaing in meat industry. **Meat Science**, v.63, p.373-380, 2002.

RABEA, E.I.; BADAWY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, p.1457-1465, 2003.

REDL, A.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Determination of sorbic acid diffusivity in edible wheat gluten and lipid based films. **Journal of Food Science**, v.61, n.1, p.116-120, 1996.

RESA, C.P.O.; GERSCHENSON, L.N.; JAGUS, R.J. Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. **Food Control**, v.44, p.146-151, 2014a.

RESA, C.P.O.; GERSCHENSON, L.N.; JAGUS, R.J. Starch edible film supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port Salut cheese. **Food Control**, v.59, p.737-742, 2016.

RESA, C.P.O.; JAGUS, R.J.; GERSCHENSON, L.N. Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity

of tapioca starch edible films. **Materials Science and Engineering C**, v.40, p.281-287, 2014b.

RICO-PENA, D.; TORRES, J. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.497-499, 1991.

RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v.5, p.23-36, 1987.

RYU, S.Y.; RHIM, J.W.; ROH, H.J.; KIM, S.S. Preparation and Physical Properties of Zein-Coated High-Amylose Corn Starch Film. **LWT - Food Science and Technology**, v.35, p.680-686, 2002.

SADIKOGLU, H.; SEN, D.; OZDEMIR, M. A mathematical model for potassium sorbate diffusion through whey protein films. **Drying Technology**, v.24, p.21–29 2006.

SANTACRUZ, S.; RIVADENEIRA, C.; CASTRO, M. Food Hydrocolloids Edible films based on starch and chitosan . Effect of starch source and concentration , plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**, v.49, p.89-94, 2015.

SAYANJALI, S.; GHANBARZADEH, B.; GHIASSIFAR, S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl

cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus species* in fresh pistachios. **LWT-Food Science and Technology**, v.44, n.4, p.1133-1138, 2011.

SHAHBAZI, M.; RAJABZADEH, G.; ETTELAIE, R.; RAFE, A. Kinetic study of k-carrageenan degradation and its impact on mechanical and structural properties of chitosan/k-carrageenan film. **Carbohydrate Polymers**, v.142, p.167-176, 2016.

SHEN, X.L.; WU, J.M.; CHEN, Y.; ZHAO, G. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. **Food Hydrocolloids**, v.24, n.4, p.285-290, 2010.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, p.139-157, 2001.

SILVA, M. A.; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite film crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 736 – 742, 2009.

SILVA, M.F.; LOPES, P.S.; SILVA, C.F.; YOSHIDA, C.M.P. Active packaging material based on buriti oil – *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) incorporated into chitosan films. **Journal of Applied Polymer Science**, v.133, p.1-9, 2016.

SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v.27, n.1, p.102–108, 2012.

SOAZO, M.; PÉREZ, L.M.; PICCIRILLI, G.N.; DELORENZI, N.J.; VERDINI, R.A. Antimicrobial and physicochemical characterization of whey protein concentrate edible films incorporated with liquid smoke. **LWT - Food Science and Technology**, v.72, p.285-291, 2016.

SOFOS, J.N. Sorbate food preservatives. Florida:CRC. p.248, 1989.

SOUZA, A.C.; GOTO, G.E.O.; MAINARDI, J.A.; COELHO, A.C. V; TADINI, C.C. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. **Food Science and Technology**, v.54, n.2, p.346–352, 2013.

SRINIVASA, P.C.; RAMESH, M.N.; KUMAR, K.R.; THARANATHAN, R.N. Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films. **Carbohydrate Polymers**, v.53, n.4, p.431-438, 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**, Chicago, v.68, n.2, p.408-420, 2003.

TIKHONOV, V.E.; STEPNOVA, E.A.; BABAK, V.G.; YAMSKOV, I.A.; PALMA-GUERRERO, J.; JANSSON, H.B.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; SALINAS, J.; GERASIMENKO, D.V.; AVDIENKO, I.D.; VERLAMOV, V.P. Bactericidal and

antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v.64, n.1, p.66-72, 2006.

TÜRE, H.; GÄLLSTEDT, M.; HEDENQVIST, M.S. Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate. **Food Research International**, v.45, n.1, p.109-115, 2012.

TUTUNCU, M.A.; LABUZA, T.P. Effect of geometry on the effective moisture transfer diffusion coefficient. **Journal of Food Engineering**, v.30, p.433-447, 1996.

VALENCIA-CHAMORRO, S.A.; PALOU, L.; DEL RIO, M.A.; PÉREZ-GAGO, M.A.B. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose– lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n.23, p.11270-11278, 2008.

VANIN, F.M.; SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; CARVALHO, R.A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.899-907, 2005.

VÁSCONEZ, M.B.; FLORES, S.K.; CAMPOS, C.A.; ALVARADO, J.; GERSCHENSON, L. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v.42, p.762-769, 2009.

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

VICENTINI, N.M.; DUPUY, N.; LEITZELMAN, M.; CEREDA, M.P.; SOBRAL, J.A. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. **Spectroscopy Letters**, New York, v. 38, n. 6, p. 749-767, 2005.

VEDMA, P.M.; ERCOLINI, D.; FERROCINO, I.; ABRIQUEL, H.; OMAR, N.B.; LÓPEZ, R.L.; GÁLVEZ, A. Effect of polythene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.514-518, 2010.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.74, p.69-117, 1998.

VOJDANI, F.; TORRES, J.A. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose multi-layer film. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.13, n.6, p.417-430, 1989.

WANG, H.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; JIANG, S.; LIU, H.; SUN, M.; JIANG, S. Kinetics and functional effectiveness of nisin loaded antimicrobial packaging film based on chitosan/poly(vinyl alcohol). **Carbohydrate Polymers**, v.127, p.64-71, 2015.

WURGLER, F.E.; SCHLATTER, J.; MAIER, P. The genotoxicity status of sorbic acid, potassium sorbate and sodium sorbate. **Mutation Research Letters**, v.283, p.107-111, 1992.

XIAO, D. DAVIDSON, P.; ZHONG, Q. Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. **Food Science and Technology**, v.44, p.1977-1985, 2011.

XIE, Y.; LIU, X.; CHEN, Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.142-147, 2007.

YOSHIDA, C.M.P.; BASTOS, C.E.N.; FRANCO, T.T. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. **Food Science and Technology**, v.43, p. 584-589, 2010.

YOSHIDA, C.M.P.; OLIVEIRA-JUNIOR, E.N.; FRANCO, T.T. Chitosan Films: additives effects on barrier and mechanical properties. **Packaging Science and Technology**, 2009.

ZACTITI, E.M.; KIECKBUSCH, T.G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering**, v.77, n.3, p.593-601, 2006.

ZAMORA, M.C.; ZARITZKY, N.E. Potassium Sorbate Inhibition of Microorganisms Growing on Refrigerated Packaged Beef. **Journal of Food Science**, v.52, n.3, p.257-262, 1987.

ZINOVIADOU, K.G.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v.82, n.3, p.338–345, 2009.