UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CARLA GIOVANA LUCIANO

**Desenvolvimento de filmes com atividades antioxidante e
antimicrobiana empregando extrato hidroetanólico de folha de
pitangueira e nisina ou natamicina**

PIRASSUNUNGA

2020

CARLA GIOVANA LUCIANO

**Desenvolvimento de filmes com atividades antioxidante e
antimicrobiana empregando extrato hidroetanólico de folha de
pitangueira e nisina ou natamicina**

(Versão Corrigida)

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

PIRASSUNUNGA

2020

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

L937d Luciano, Carla Giovana
Desenvolvimento de filmes com atividades
antioxidante e antimicrobiana empregando extrato
hidroetanólico de folha de pitangueira e nisina ou
natamicina / Carla Giovana Luciano ; orientador
Paulo José do Amaral Sobral. -- Pirassununga, 2020.
223 f.

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

1. antioxidantes naturais. 2. nisina. 3.
natamicina. 4. agentes antimicrobianos. 5. filmes
biodegradáveis. I. do Amaral Sobral, Paulo José ,
orient. II. Título.

CARLA GIOVANA LUCIANO

Desenvolvimento de filmes com atividades antioxidante e antimicrobiana empregando extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e nisina ou natamicina

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

Aprovada em: 19 de março de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral - Orientador
Instituição: Universidade de São Paulo – USP/FZEA

Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes
Instituição: Universidade de São Paulo – USP/FZEA

Profa. Dra. Milena Martelli Tosi
Instituição: Universidade de São Paulo – USP/FZEA

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo
Instituição: Universidade de São Paulo – USP/FZEA

Prof. Dr. Pedro Esteves Duarte Augusto
Instituição: Universidade de São Paulo – USP/ESALQ

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos
Instituição: Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP

Dedico à minha família.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus.

Agradeço à minha mãe, Neca, por todo o apoio e por me ensinar a ver o lado bom das coisas. Aos meus avós, Sebastião e Luzia e aos meus tios Ângela e Mauro, por compreenderem minha ausência e apoiarem minhas decisões com todo o carinho.

Agradeço aos meus colegas e ex-colegas de laboratório, e à todo o pessoal da pós-graduação: Flávia, Gisele, Tiara, Lucas, Germán, Jeannine, Larissa, Maria Fernanda, Daniel, Ilyes, Luís, Laura, Lía, Paula, David, Josiane, Monique, Vítor, Leandro, Vinícius e Camila... por todos os momentos de aprendizagem e de descontração, e às minhas estagiárias Mariane e Tailine, que trabalharam muito nesse projeto.

Agradeço aos professores Fernando Tonin, Andrezza, Mariza, Milena, Fernanda Vanin, Tonhão, Carmen Trindade, Madeleine Djabourov e Marta por toda a ajuda, pelas dicas e conselhos. Mas especialmente às professoras Rosemary e Bel, por tudo, desde o começo.

Agradeço aos técnicos de laboratório: Sílvia, Camila, Roseli, Carla Lourenço, Alan e Marina pela colaboração. Em especial, agradeço ao técnico Rodrigo Lourenço pelas dicas e palpites nas análises, e à técnica Ana Mônica, pelas ideias brilhantes. São pessoas em quem me inspiro diariamente.

Agradeço ao pessoal da microbiologia por me salvarem todas as vezes que precisei usar a autoclave.

Agradeço à Bruna Bonatto e ao Geraldo Cofcewicz, que me incentivaram e me ajudaram nesse projeto.

Agradeço ao professor Paulo José do Amaral Sobral, que desde sempre ajudou, me ensinou lições valiosas e incentivou minha vida na pesquisa científica. Agradeço pela orientação, pela amizade e pela confiança, que fizeram desses longos anos de trabalho um tempo de alegrias e aprendizados.

Agradeço ao Gilles Maag, pelo carinho, pelo amor, pela compreensão, pelo apoio e por todos os melhores momentos.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. À Danisco pela doação do Nisaplin® e à Prozyn pela doação da natamicina.

Um dia sem risadas é um dia desperdiçado – Charles Chaplin

RESUMO

LUCIANO, C. G. **Desenvolvimento de filmes com atividades antioxidante e antimicrobiana empregando extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e nisina ou natamicina.** 2020. 221f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2020.

Atualmente, existe uma crescente preocupação e uma preferência por alimentos com reduzida incorporação de aditivos e com utilização de compostos naturais em substituição aos sintéticos. Assim, os filmes ativos a base de biopolímeros podem ser uma boa alternativa. Eles podem permitir uma maior vida de prateleira, garantindo a segurança alimentar, sem a incorporação direta de conservantes nos alimentos. O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento e a caracterização de filmes ativos a base de gelatina, com duas camadas, uma camada de gelatina sem aditivo, e uma segunda camada, mais fina, contendo os princípios bioativos: agente antioxidante (extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira, EHFP) e/ou agente antimicrobiano (nisina ou natamicina). Especificamente, pretendeu-se estudar as atividades antioxidante e antimicrobiana dos filmes ativos dupla camada contendo EHFP com, e sem, nisina ou natamicina; estudar as propriedades físicas desses filmes ativos dupla camada a base de gelatina; e aplicar um filme ativo selecionado, contendo EHFP e/ou nisina na segunda camada, na conservação da Copa fatiada. Os filmes ativos foram caracterizados para conhecimento do efeito dos aditivos na segunda camada, sobre suas propriedades físico-químicas, mecânicas, ópticas, microestruturais, térmicas e atividades antimicrobiana e antioxidante. A adição de nisina foi capaz de produzir filmes com atividade antimicrobiana, enquanto a adição do EHFP produziu filmes com atividade antioxidante e antimicrobiana. A adição de ambos aditivos conjuntamente não provocou efeito antagônicos, ou seja, os filmes apresentaram ambas as atividades. Em nenhum dos casos, houve prejuízos às propriedades físicas dos filmes. Por outro lado, a adição de natamicina também produziu filmes ativos contra os fungos estudados, no entanto, a natamicina mostrou um efeito maior nas propriedades físico-químicas dos filmes a base de gelatina quando comparado à nisina ou ao extrato. A adição conjunta do extrato com o agente antimicrobiano permitiu observar que não houve interação entre eles que pudesse diminuir ou inibir a ação de um dos compostos. Ou seja, esses filmes a base de gelatina incorporados com agentes ativos podem ser usados como um potencial material de embalagem ativa para aumentar a vida útil e a segurança dos alimentos. No estudo da aplicação dos filmes a base de gelatina contendo EHFP e nisina

em Copa fatiada, pode-se comprovar a eficiência da incorporação de ambos aditivos na segunda camada do filme em contato com o alimento, na conservação do produto em estocagem a 4 °C por até 120 dias, comparado com o controle. Pode-se então concluir que foi possível desenvolver filmes ativos, com atividades antioxidante e antimicrobiana, com potencial aplicação na conservação de alimentos.

Palavras-chave: Antioxidantes naturais, nisina, natamicina, agentes antimicrobianos, *Eugenia uniflora* L.

ABSTRACT

LUCIANO, C. G. **Development of films with antioxidant and antimicrobial activities employing Pitanga leaf hydroethanolic extract and nisin or natamycin.** 2020. 221 p. PhD Thesis. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2020.

Currently, there is a preference for foods with reduced incorporation of additives and with natural compounds to replace synthetic ones. Thus, biopolymer-based active films can be a good alternative, as they allow longer shelf life and ensure food safety without the direct incorporation of agents in food. The general goal of this thesis was the development and characterization of gelatin-based double-layer active films, the first layer of gelatin being free of additives, while the second (thinner one), contains the bioactive principles: antimicrobial agent (nisin or natamycin) and/or antioxidant agent (Pitanga leaf hydroethanolic extract, PLHE). Specifically, the goal was to study the antimicrobial and antioxidant activities of active double layer films containing nisin or natamycin, with and without PLHE, as well as the physical properties of these films; and to apply a selected active film, containing nisin and/or PLHE in the second layer, to preserve dry cured pork shoulder (coppa). The active films were characterized in order to determine the effect of additives in the second layer on their physical-chemical, mechanical, optical, microstructural, thermal and antimicrobial and antioxidant activities. The addition of nisin was proven to produce films with antimicrobial activity, while the addition of PLHE produced films with antioxidant activity. The addition of both additives together did not cause an antagonistic effect, that is, the films presented both activities. In none of the cases, damage to the physical properties of the films was observed. On the other hand, the addition of natamycin also produced films active against the studied fungi. However, natamycin showed a greater effect on the properties of gelatin films when compared to nisin or to the extract. In the case of joint addition of the extract and the antimicrobial agent, no interaction between them that could decrease or inhibit the action of one of the compounds was observed. That is, these gelatin films incorporated with active agents can be used as a potential active packaging material to increase the shelf life and safety of food. In the study of the application of gelatin films containing nisin and PLHE, in sliced coppa, it is possible to prove the efficiency of incorporating both additives in the second layer of the film in contact with the food in preserving the product in storage at 4 °C for up to 120 days. In conclusion, the possibility of developing active

films, with antioxidant and antimicrobial activities, with potential application in food preservation was proven.

Key-words: Natural antioxidants, nisin, natamycin, antimicrobial agents, biodegradable films.

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura primária da nisina	30
Figura 2: Estrutura da natamicina.	31
Figura 3: Folhas de pitangueira.....	36
Figura 4: Fluxograma do preparo do extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira.	44
Figura 5: Esquema dos filmes dupla camada.....	48
Figura 6: Exemplos de curvas de fluxo das soluções formadora de filmes*.	65
Figura 7: Exemplos de curvas de varredura de deformação das soluções formadoras de filme*: módulo de armazenamento (G') em função da deformação a 50 °C (a) e 5 °C (b).	68
Figura 8: Exemplos de curvas de varredura de temperatura de soluções formadoras de filme*: módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da temperatura..	71
Figura 9: Exemplos de curvas de varredura de frequência (espectro mecânico) das soluções formadoras de filme*: o módulo de armazenamento (G') em preto, e o módulo de perda (G'') em vermelho.	74
Figura 10: Aspectos visuais dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.....	76
Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) representativas dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	83
Figura 12: Imagens 3D representativas das micrografias de superfície dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina obtidos por AFM. ...	85
Figura 13: Relação entre a rugosidade e o brilho dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina, determinados a 60°.	90
Figura 14: Propriedades de barreira UV/Vis dos filmes a base de gelatina com adição de diferentes concentrações de nisina*.....	91
Figura 15: Exemplos de termogramas para filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	95
Figura 16: Exemplos de espectros obtidos por difração de raios X dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.	98
Figura 17: Espectros de absorção de infravermelho dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.....	100
Figura 18 Efeito da rugosidade no ângulo de contato na superfície da segunda camada dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	103

Figura 19. Exemplos de placas do teste de difusão de discos para cepas de: a) <i>S. aureus</i> e b) <i>L. monocytogenes</i> , para filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.....	104
Figura 20: Aspectos visuais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*..	108
Figura 21: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	114
Figura 22: Imagens representativas das seções transversais obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfícies criofraturadas dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	115
Figura 23: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia de força atômica (AFM) da superfície da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	116
Figura 24: Propriedades de barreira UV/Vis dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	122
Figura 25: Termogramas representativos dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	124
Figura 26: Exemplos de espectros obtidos por difração de raios X dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	127
Figura 27: Espectros de infravermelho representativos dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	129
Figura 28: Análise de difusão de disco contra as cepas de: a) <i>S. aureus</i> e b) <i>L. monocytogenes</i> para filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	132
Figura 29: Aspectos visuais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	141
Figura 30: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies da segunda camada dos filmes dupla camada a	

base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	147
Figura 31: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfícies criofraturadas dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	148
Figura 32: Imagens representativas das micrografias 3D obtidas por microscopia de força atômica (AFM) da superfície da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	149
Figura 33: Efeito da rugosidade sobre o brilho, determinado a 60°, da superfície da segunda camada dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina.	153
Figura 34: Propriedades de barreira a luz UV/vis dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	154
Figura 35: Termogramas representativos dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	157
Figura 36: Exemplos de difratogramas de raios X dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	160
Figura 37: Exemplos de espectros de FTIR dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	162
Figura 38: Efeito da rugosidade sobre o ângulo de contato da gota de água com a superfície da segunda camada dos filmes de gelatina adicionados de natamicina*..	165
Figura 39: Cultivo dos fungos <i>Aspergillus niger</i> (esquada) e <i>Penicillium spp</i> (direta) para retirada dos esporos.	165
Figura 40: Exemplos de placas do teste de difusão de discos para cepas de <i>Aspergillus niger</i> (em cima) e <i>Penicillium spp.</i> (embaixo) com os filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina pura e com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	166
Figura 41: Exemplos de fatias de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*, e embaladas à vácuo.	175

Figura 42: pH das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.	177
Figura 43: Umidade das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.	179
Figura 44: Atividade de água das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.....	180
Figura 45: Índice de peróxido das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.....	182
Figura 46: Evolução do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.....	183
Figura 47: Contagem de <i>S. aureus</i> (SA) nas amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.....	189
Figura 48: Contagem bactérias psicrótróficas (BP) nas amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.....	191
Figura 49: Contagem de bactérias ácido-láticas (BAL) nas amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.....	192

Índice de Tabelas

Tabela 1: Amostras da solução formadora de filme (SFF) para os ensaios reológicos*.	46
Tabela 2: Viscosidade e coeficiente de correlação (R^2) das soluções formadoras de filme*.	66
Tabela 3: Temperaturas de transição sol-gel ($T_{\text{sol-gel}}$), gel-sol ($T_{\text{gel-sol}}$) e da histerese (ΔT) de soluções formadoras de filme*.	72
Tabela 4: Umidade e solubilidade dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	78
Tabela 5: Parâmetros do teste de tração dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	80
Tabela 6: Parâmetros do teste de perfuração dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	82
Tabela 7: Valores de rugosidade média (R_m) dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	86
Tabela 8: Parâmetros de cor e opacidade dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina**.	87
Tabela 9: Parâmetros de brilho da superfície de secagem dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	89
Tabela 10: Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	93
Tabela 11: Propriedades térmicas determinadas nas análises térmicas dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.	96
Tabela 12: Ângulo de contato da superfície dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.	102
Tabela 13: Halo de inibição para os filmes a base de gelatina com diferentes concentrações de nisina*.	105
Tabela 14: Umidade e solubilidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	109
Tabela 15: Valores de tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	111
Tabela 16: Valores de força na perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	113

Tabela 17: Valores de rugosidade média (Rm) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	117
Tabela 18: Parâmetros de cor e opacidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada**.....	119
Tabela 19: Brilho da superfície da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	120
Tabela 20: Permeabilidade ao vapor de água dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	123
Tabela 21: Propriedades térmicas determinadas na análise térmica dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	125
Tabela 22: Ângulo de contato da gota de água dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	130
Tabela 23: Halos de inibição dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*..	133
Tabela 24: Capacidade redutora total dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados ou não de compostos ativos obtida pelo método de Folin-Ciocalteu*..	134
Tabela 25: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinada pelo método de captura do radical ABTS•+ *.....	136
Tabela 26: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinada pelo método de captura do radical DPPH• *.....	138
Tabela 27: Compostos redutores totais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada durante armazenamento a 25 °C e 58% de umidade relativa *.....	139
Tabela 28: Umidade e solubilidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	142
Tabela 29: Valores de tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.....	144

Tabela 30: Força na perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	145
Tabela 31: Rugosidade média (Rm) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	150
Tabela 32: Parâmetros de cor e opacidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada**.	151
Tabela 33: Brilho dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinados em 20° e 60° *.	153
Tabela 34: Permeabilidade ao vapor de água dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	156
Tabela 35: Propriedades térmicas obtidas por análise térmica dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	159
Tabela 36: Ângulo de contato dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.	164
Tabela 37: Compostos redutores totais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinados com o método de Folin-Ciocalteu *.	168
Tabela 38: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinada com o método de captura do radical ABTS•+ *.	169
Tabela 39: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, determinados com o método de captura do radical DPPH• *.	171
Tabela 40: Compostos redutores totais (CRT) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada* durante armazenamento a 25 °C e 58% de umidade relativa.	172
Tabela 41: Composição centesimal da copa (base úmida).	176
Tabela 42: Firmeza das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na	

segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias da copa fatiada utilizando a probe Blade set e a probe de perfuração de 3 mm (P3) *. 185

Tabela 43: Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias **. 187

Sumário

1. Introdução.....	23
2. Revisão Bibliográfica	27
2.1 Filmes ativos a base de biopolímeros	27
2.2 Agentes antimicrobianos.....	28
2.2.1 Nisina.....	29
2.2.2 Natamicina.....	31
2.3 Agentes antioxidantes: extrato hidroetanólico de folha de pitangueira	32
2.4 Aplicação de filmes ativos em produtos cárneos: copa	37
3. Objetivos.....	41
4. Hipóteses.....	42
5. Material e métodos	43
5.1 Materiais e reagentes utilizados.....	43
5.2 Preparo do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira	43
5.3 Preparo da solução formadora de filme para testes reológicos	45
5.4 Caracterização reológica das soluções formadoras de filme.....	46
5.4.1 Modo Estacionário: curvas de fluxo.....	46
5.4.2 Modo Oscilatório	47
5.5 Produção dos filmes	47
5.5.1 Filmes monocamada.....	47
5.5.2 Filmes dupla camada	48
5.6 Caracterização dos filmes.....	49
5.6.1 Aspectos visuais e espessura	49
5.6.2 Umidade e solubilidade em água	50
5.6.3 Propriedades mecânicas.....	50
5.6.4 Microestrutura	51
5.6.5 Cor, opacidade e brilho	52
5.6.6 Barreira à luz (UV/VIS).....	53
5.6.7 Permeabilidade ao vapor de água.....	53
5.6.8 Propriedades térmicas	54
5.6.9 Difração de raios X.....	54
5.6.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	55
5.6.11 Ângulo de contato da gota de água.....	55
5.6.12 Atividade antimicrobiana por teste de sensibilidade	55
5.6.13 Atividade antioxidante	56

5.6.13.1 Compostos redutores totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	56
5.6.13.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da captura do radical livre ABTS• ⁺	57
5.6.13.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da captura do radical livre DPPH•.....	57
5.6.14 Estabilidade antioxidante e antimicrobiana dos filmes durante estocagem.....	58
5.7 Aplicação dos filmes ativos na conservação de copa fatiada	58
5.7.1 Análise da composição centesimal da copa fatiada	59
5.7.2 Análises de pH da copa fatiada durante a estocagem refrigerada.....	59
5.7.3 Análises de umidade e atividade de água da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	60
5.7.4 Análise de oxidação de lipídeos da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	60
5.7.5 Análise de textura da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	61
5.7.6 Cor da superfície da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	62
5.7.7 Análises microbiológicas da copa fatiada durante a estocagem refrigerada.....	62
5.8 Análise Estatística.....	63
6. Resultados e discussão	64
6.1 Propriedades reológicas das soluções formadoras de filme (SFF).....	64
6.1.1 Modo Estacionário	64
6.1.2 Modo Oscilatório	67
6.1.2.1 Varredura de deformação	67
6.1.2.2 Varredura de temperatura	70
6.1.2.3 Varredura de frequência.....	73
6.2 Propriedades dos filmes monocamada com diferentes concentrações de nisina ..	76
6.2.1 Aspectos visuais e espessura	76
6.2.2 Umidade e solubilidade em água	77
6.2.3 Propriedades mecânicas.....	79
6.2.4 Microestrutura	82
6.2.5 Cor, opacidade e brilho	87
6.2.6 Propriedades de barreira à luz (UV/Vis)	90
6.2.7 Permeabilidade ao vapor de água.....	92
6.2.8 Propriedades térmicas	94
6.2.9 Difração de Raios X (DRX)	97
6.2.10 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	99
6.2.11 Ângulo de contato da gota de água.....	101
6.2.12 Atividade antimicrobiana por teste de sensibilidade	103

6.3 Características dos filmes produzidos em dupla camada, adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou nisina	107
6.3.1 Aspecto visual e espessura.....	107
6.3.2 Umidade e solubilidade em água	109
6.3.3 Propriedades mecânicas.....	111
6.3.4 Microestrutura	113
6.3.5 Cor, opacidade e brilho	118
6.3.6 Barreira à luz UV/vis	121
6.3.7 Permeabilidade ao vapor de água.....	122
6.3.8 Propriedades térmicas	123
6.3.9 Difração de raios X (DRX).....	126
6.3.10 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	128
6.3.11 Ângulo de contato da gota de água.....	129
6.3.12 Atividade antimicrobiana por teste de sensibilidade	131
6.3.13 Compostos redutores totais e atividade antioxidante	133
6.3.13.1 Compostos redutores totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	134
6.3.13.2 Captura do radical ABTS•+	135
6.3.13.3 Captura do radical DPPH•.....	137
6.3.14 Estabilidade antioxidante e antimicrobiana dos filmes durante estocagem.....	138
6.4 Características dos filmes produzidos em dupla camada adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou natamicina.....	140
6.4.1 Aspecto visual e espessura.....	140
6.4.2 Umidade e solubilidade em água	142
6.4.3 Propriedades mecânicas.....	143
6.4.4 Microestrutura	146
6.4.5 Cor, opacidade e brilho	150
6.4.6 Barreira à luz UV- vis	154
6.4.7 Permeabilidade ao vapor de água.....	155
6.4.8 Propriedades térmicas	157
6.4.9 Difração de raios X (DRX).....	160
6.4.10 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourir (FTIR)	161
6.4.11 Ângulo de contato da gota de água.....	163
6.4.12 Atividade antimicrobiana pelo teste de sensibilidade.....	165
6.4.13 Compostos redutores totais e atividade antioxidante	167
6.4.13.1 Compostos redutores totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	167
6.4.13.2 Captura do radical ABTS•+	168
6.4.13.3 Captura do radical DPPH•.....	170

6.4.14 Estabilidade antioxidante e antimicrobiana dos filmes durante estocagem.....	171
6.5 Aplicação dos filmes ativos na conservação de Copa fatiada	174
6.5.1 Composição centesimal da copa fatiada	175
6.5.2 Análises físico-químicas da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	176
6.5.2.1 pH da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	176
6.5.2.2 Umidade e atividade de água da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	178
6.5.2.3 Oxidação lipídica da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	181
6.5.2.4 Análises de textura da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	184
6.5.2.5 Cor da superfície do produto da copa fatiada durante a estocagem refrigerada	186
6.5.2.6 Análises microbiológicas da copa fatiada durante a estocagem refrigerada..	188
7 Conclusões.....	193
8 Referências	195
ANEXO I – Espectro de infravermelho representativos da nisina em pó.	222
ANEXO II – Espectro de infravermelho representativos do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira em pó.	222
ANEXO III – Espectro de infravermelho representativos da natamicina em pó.	223

1. Introdução

Uma alternativa interessante para a conservação de alimentos é a utilização de embalagens ativas, um conceito amplamente difundido atualmente. Embalagens ativas são capazes de interagir com o produto, ou com o espaço entre a embalagem e o alimento, com atividades que contribuem para a conservação do produto (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002). Dentre essas atividades, as mais interessantes, no contexto desta tese, são as atividades antimicrobiana e antioxidante.

Embalagens ativas podem ser desenvolvidas de várias maneiras, como por exemplo, pela adição de sachês no interior da embalagem, ou pela adesão de componentes bioativos na superfície interna da embalagem. Uma alternativa mais prática é o desenvolvimento de filmes biopoliméricos contendo os princípios bioativos no seu interior, ou seja, como parte da sua formulação. Assim, embalagens produzidas pela incorporação de agentes ativos, como os antimicrobianos, podem implicar em menor quantidade de aditivos no processamento de alimentos (SUNG et al., 2013), e a adição de agentes antioxidantes nos filmes de embalagens promove um novo caminho para manter a qualidade e estender a vida útil de produtos (CAGRI; USTUNOL; RYSER, 2004).

Dentre os compostos com atividade antimicrobiana que podem ser adicionados na formulação de filmes ativos, merecem destaque aqueles produzidos por fermentação bacteriana, como as bacteriocinas, que são compostos peptídicos que apresentam ação bactericida ou bacteriostática, e surgem como uma opção interessante para substituir alguns aditivos sem alterar as características sensoriais dos produtos (GARCÍA et al., 2010), com destaque para a nisina. A nisina possui aprovação pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e é uma bacteriocina com grande potencial para aplicação em alimentos, sendo muito efetiva contra bactérias Gram positivas. Um outro componente importante produzido por fermentação bacteriana é a natamicina, que tem se

apresentado muito eficiente no controle de fungos e leveduras, sendo reconhecida como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (CÉ, 2009).

Além da busca pela substituição dos antimicrobianos sintéticos pelos naturais, é importante ressaltar que o uso de antioxidantes sintéticos também vem sendo questionado, com relação à sua inocuidade (MARCOS et al., 2014), sendo cada vez mais sugerida sua substituição por compostos naturais, como os extratos de plantas.

Muitos estudos sobre atividade antioxidante em extratos de plantas foram conduzidos, e uma planta que tem se destacado no Brasil é a pitangueira, cujo extrato das folhas, além de alto poder antioxidante, possui ainda propriedades antimicrobianas (GARMUS et al., 2014). A folha da pitangueira é conhecida na medicina popular por combater dores estomacais, febres e inflamações (AMORIM et al., 2009) e seu extrato já foi aplicado como agente antioxidante natural em alimentos (VARGAS et al., 2016; LORENZO et al., 2018).

Não se tem conhecimento do desenvolvimento de filmes com ambas as atividades: antimicrobiana e antioxidante, principalmente com atividade antifúngica, produzidos pelo emprego de antimicrobianos naturais conjuntamente com extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira, constituindo assim, a originalidade desta tese.

De um modo geral, os princípios bioativos são adicionados na solução formadora de filmes, fazendo parte de sua estrutura. Para isso, é necessário se promover a dispersão de uma quantidade, devidamente calculada, do componente na matriz biopolimérica. Entretanto, considerando-se que os compostos antimicrobianos naturais são relativamente custosos, uma alternativa para reduzir seu emprego é o desenvolvimento de filmes dupla camada. Os filmes dupla camada vem sendo bastante estudados (MONTES et al., 2019; NOGUEIRA e MARTINS, 2018; MULLER, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ e CHIRALT, 2017; NILSUWAN et al., 2020), contudo, esses filmes são normalmente produzidos com polímeros diferentes e sem adição de compostos ativos. No caso desta tese, as duas camadas de filmes foram produzidas

com o mesmo biopolímero (gelatina), mas a adição dos compostos ativos foi feita em apenas uma delas, que deverá estar em contato com o alimento.

Nesse contexto, esta tese é composta de sete seções:

- **1. Introdução.** Onde se apresenta uma breve introdução à tese, para contextualização do trabalho.
- **2. Revisão Bibliográfica.** Onde são apresentados alguns conceitos importantes para a compreensão desta tese, envolvendo os agentes ativos naturais. Além disso, se apresentam e se discutem dados da literatura sobre algumas pesquisas mais relevantes e atuais na área de filmes ativos.
- **3. Objetivos.** Onde estão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos desta tese.
- **4. Hipótese.** Foram levantadas hipóteses, que porventura, foram confirmadas nesta tese.
- **5. Material e métodos.** Os materiais utilizados na tese, as metodologias usadas nas análises e nos experimentos realizados nesta tese, bem como as análises estatísticas, foram descritas nessa Seção.
- **6. Resultados e discussão.** Nessa seção estão apresentados e discutidos os resultados obtidos nesta tese. Ela está subdividida da seguinte forma:
 - 6.1 Propriedades reológicas das soluções formadoras de filme;
 - 6.2 Estudo da concentração de nisina adicionada em filmes de gelatina monocamada;
 - 6.3 Estudo da adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou nisina na segunda camada de filmes dupla camada a base de gelatina;
 - 6.4 Estudo da adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou natamicina na segunda camada de filmes dupla camada a base de gelatina;
 - 6.5 Aplicação de filmes ativos na conservação de copa fatiada refrigerada.

- **7. Conclusões.** Onde se apresentam as conclusões desta tese de doutorado.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Filmes ativos a base de biopolímeros

A adição direta de agentes ativos (aditivos) em alimentos pode resultar em perda da sua atividade devido a reações cruzadas com outros componentes do alimento, como lipídeos e proteínas (HAN, FLOROS, 1998; HOFFMAN et al., 2001). Assim, o uso de filmes de embalagens contendo agentes ativos poderia ser mais eficiente, pois localizaria os efeitos na superfície dos alimentos, causando um aumento na funcionalidade efetiva sem o aumento relativamente excessivo da concentração de aditivos no alimento (SUNG et al., 2013; GUTTER, 2002; COMA et al., 2001).

Dessa maneira, o conceito de embalagens ativas vem sendo amplamente difundido, e tem ganhado destaque no mercado mundial. Ao contrário do que acontece com as embalagens convencionais, que devem ser inertes, a embalagem ativa é capaz de interagir com o produto ou com o espaço entre a embalagem e o sistema alimentício (*headspace*), com atividades que contribuem para a conservação do produto (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002). Ou seja, além de embalar e proteger o produto, como no caso das embalagens convencionais (passivas), as embalagens ativas têm funções que implicam em algum tipo de tratamento do alimento (QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

Dentre as embalagens ativas, existem aquelas que são produzidas com filmes biopoliméricos contendo componentes ativos (normalmente com atividade antioxidante e/ou antimicrobiana), que podem ser liberados, ou que são capazes de absorver substâncias do alimento ou do ambiente ao redor dele (PEREIRA-ABREU, CRUZ, LOSADA, 2012). A migração controlada de agentes ativos para o alimento permite não somente uma inibição inicial de microrganismos ativos, mas também um tempo maior de atividade residual durante o transporte, distribuição e armazenamento dos alimentos (GUTTER, 2002).

Afim de prevenir e retardar qualquer deterioração na qualidade dos alimentos embalados, embalagens ativas têm mostrado um grande potencial de aumentar a estabilidade ao armazenamento e, conseqüentemente, a vida útil de produtos processados (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; MILTZ et al., 2006). Além disso, sistemas de embalagens ativas tem obtido sucesso quando aplicados com o intuito de fornecer produtos de alta qualidade que são, ao mesmo tempo, frescos e seguros (PEREIRA-ABREU, CRUZ, LOSADA, 2012).

Especificamente no caso das embalagens com atividade antimicrobiana, a liberação de agentes antimicrobianos da embalagem para o produto pode contribuir para estender a fase de latência bacteriana (fase *Lag*), diminuindo, retardando ou inibindo a taxa de crescimento dos microrganismos e mantendo a qualidade e a segurança dos alimentos (GUERRA et al., 2005; APPENDINI; HOTCHKISS, 2002), o que pode implicar na redução de aditivos no seu processamento. Dessa maneira, o uso de embalagens de filmes contendo agentes antimicrobianos tende a ser mais eficiente, não só por permitir uma inibição inicial de microrganismos indesejáveis, mas também por ter um tempo maior de atividade residual (GUTTER, 2002), o que pode ser interessante para embalagens de produtos conservados em geladeira depois de abertas.

No caso de embalagens com atividade antioxidante, a adição de componentes, principalmente naturais, capazes de proteger o alimento contra reações de oxidação que possam deteriorá-lo, é uma alternativa à adição de produtos químicos diretamente nos alimentos (JRIDI et al., 2014), podendo, ainda, melhorar as propriedades mecânicas e funcionais dessas embalagens (BITENCOURT et al., 2014).

2.2 Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos podem ser isolados de diversas fontes, incluindo animais, plantas e microrganismos (SILVA, 2007), e possuem alta especificidade. De acordo com Katzung (1995), os antimicrobianos podem agir sobre os microrganismos

de quatro maneiras diferentes: (i) através da inibição da síntese da parede celular, (ii) da alteração da permeabilidade da membrana celular ou do transporte ativo através da membrana celular, (iii) da inibição da tradução e transcrição do material genético, ou (iv) da inibição da síntese do ácido nucleico.

Dentre os antimicrobianos, as bacteriocinas são compostos de natureza proteica (peptídeos), sintetizadas ribossomicamente por bactérias Gram positivas e negativas, que vem sendo vastamente estudados na área de alimentos e tem demonstrado sua eficiência na redução ou no controle da multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (GÁLVEZ et al., 2007; KRUGER, 2006; BÍSCOLA, 2007; COMA et al., 2001; JIN; ZHANG, 2008). Além de serem naturais, as bacteriocinas são ativas em baixas concentrações e podem ser aplicadas em diversos alimentos (NES, YOON, DIEP, 2007).

Uma bacteriocina de grande importância, produzida por bactérias lácticas (BAL), que já vem sendo amplamente aplicada em alimentos, principalmente em produtos lácteos, é a nisina, que foi aprovada para uso pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 1969. No Brasil, a nisina pode ser utilizada em queijos fundidos, queijos pasteurizados e requeijão, na concentração máxima de até 12,5 mg.kg⁻¹, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1996), e seu emprego pode ser direto (no alimento) ou indireto (em embalagens) (MORI, 2013).

2.2.1 Nisina

A nisina é um agente antimicrobiano produzido por cepas do *Lactococcus lactis* e é classificada como um lantibiótico, uma bacteriocina pequena, com 34 aminoácidos (Figura 1), incluindo resíduos não comumente encontrados, como os aminoácidos lantionina e metil-lantionina. Ela tem massa molar de 3,4 kDa, estrutura policíclica, é

estável ao calor e tolerante ao pH (ROLLEMA et al., 1995; GÁLVEZ et al., 2007; COTTER, HILL, ROSS, 2005).

O efeito inibitório da nisina está relacionado à inibição de células-alvo das bactérias através da formação de poros na membrana celular, que é capaz de desestabilizar e alterar a permeabilidade dessa membrana, resultando no extravasamento do material celular (CLEVELAND et al., 2001; FIELD et al., 2008).

Figura 1: Estrutura primária da nisina

Fonte: Parada et al., 2007.

A nisina possui um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas (GONZÁLEZ et al., 2003; HERMAN et al., 2009) e pode ser utilizada na inibição de bactérias Gram-negativas quando a parede celular dessas bactérias for previamente enfraquecida por lisozimas, NaCl ou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (STEVENS et al., 1992). A utilização da nisina está autorizada pela FDA para seu uso

em produtos lácteos e sopas termo-processadas com estocagem refrigerada, e atualmente sua aplicação em produtos cárneos vem sendo estudada (ZACHAROF; LOVITT, 2012).

No Brasil, a nisina é aprovada para uso como conservante de produtos de natureza biológica, podendo ser utilizada em queijos pasteurizados e na superfície externa de salsichas de diferentes tipos (BRASIL, 1996; SCHNEIDER, WEKMEISTER e PISCHETSRIEDER, 2011).

2.2.2 Natamicina

A natamicina (Figura 2), cuja massa molar é de 666 Da, é um agente antimicrobiano natural, produzido pela ação de enzimas do *Streptomyces natalensis*. Por ser um antibiótico poliênico, a natamicina possui atividade contra fungos e leveduras, mas não é ativa contra bactérias (OBREGON, 2004; MENDES et al., 2001; WELSCHER et al., 2008).

Figura 2: Estrutura da natamicina.

Fonte: Cé, 2009.

A natamicina, também conhecida como pimaricina, é estável na faixa de pH entre 4,5 e 6,5 (FURTADO, 1991). O mecanismo de ação da natamicina, consiste na

distensão da parede celular através da sua ligação com esteróis da membrana citoplasmática. Mais especificamente, a natamicina provoca a ruptura do ergosterol da membrana fúngica, causando perda de seu conteúdo (MENDES et al., 2001).

Nos Estados Unidos, a natamicina é reconhecida como segura, com *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e é aplicada em queijos, iogurtes, temperos de saladas, dentre outros alimentos (THOMAS et al., 2005). No Brasil, ela é amplamente utilizada na superfície de produtos cárneos embutidos e para evitar a contaminação de queijos. Seu uso como conservante é também permitido, com limite máximo, detectado na superfície, de 5 mg/kg, não devendo haver migração para o interior do produto e não sendo detectável a 2 mm de profundidade (BRASIL, 1996). A natamicina é também utilizada em vários alimentos produzidos via fermentação bacteriana, como algumas bebidas, carnes curadas, queijos e linguiças, prevenindo o crescimento de bolores, sem afetar a fermentação ou maturação desses alimentos (DELVES-BROUGHTON, THOMAS, WILLIAMS, 2006).

A natamicina é efetiva contra uma extensa lista de cepas de bolores e leveduras, e, segundo Obrégon (2004), seu uso melhora a estética e a vida útil dos alimentos, reduzindo o risco de produção de micotoxinas sem afetar o sabor, aroma e cor dos alimentos. Ainda, uma vantagem do uso da natamicina, é que os microrganismos não desenvolvem resistência a esse composto devido ao seu mecanismo de ação.

2.3 Agentes antioxidantes: extrato hidroetanólico de folha de pitangueira

Os lipídios, além de conferir valor nutritivo aos alimentos, estão diretamente relacionados com as propriedades organolépticas, o que os torna muito desejáveis (ORDÓÑEZ, 2005). Entretanto, são suscetíveis ao ataque por radicais livres, que leva à reação de oxidação lipídica (ORDÓÑEZ, 2005; SOARES, 2002).

A reação de oxidação lipídica é o principal fenômeno responsável pela formação de sabores estranhos, que reduzem a qualidade e a vida útil dos alimentos, além de

produzir compostos com implicações nutricionais indesejáveis (ANTONIASSI, 2001; RAMALHO; JORGE, 2006). Várias consequências podem decorrer do processo oxidativo em sistemas complexos como os alimentos, no entanto, a reação de oxidação pode ser evitada através da utilização de antioxidantes sintéticos ou naturais (BREWER, 2011).

Os agentes antioxidantes são compostos capazes de reduzir, inibir ou retardar significativamente o processo de oxidação lipídica (ALBU et al., 2004; LOULI; RAGOUSSIS; MAGOULA, 2004; RAMALHO; JORGE, 2006). Esses compostos podem ser encontrados em alguns alimentos, entretanto, são normalmente adicionados durante o processamento afim de evitar a oxidação desses produtos, prolongando sua vida útil, e mantendo sua qualidade (KAUR; KAPOOR, 2001; GERMAN, 2002).

Quando adicionados em alimentos, os antioxidantes são capazes de minimizar a rancidez e retardar o aparecimento de alterações oxidativas, que podem causar mudança de parâmetros como cor, sabor e textura dos produtos, levando à sua deterioração (FUKUMOTO; MAZZA, 2001; ARGOTTI et al., 2011). Dependendo de seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: antioxidantes primários ou do tipo I, que são aqueles que atuam como sequestradores de radicais livres, interrompendo a etapa de iniciação da oxidação; e os secundários ou do tipo II, que atuam diminuindo a taxa de oxidação por diferentes ações, como captura de oxigênio formando compostos estáveis, complexação com íons metálicos que catalisam a oxidação lipídica e decompondo hidroxiperoxídeos formados (REISCHE, LILLARD; EITENMILLER, 2008; RIBEIRO, BERNARDO-GIL; ESQUÍVEL, 2001; DORMAN et al., 2003).

Alguns antioxidantes, comumente utilizados em alimentos, como o BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) e o BHT (2,6-diterc-butil-p-cresol) são antioxidantes fenólicos sintéticos. Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, e apresentam considerável atividade antioxidante por atuarem como captadores de espécies reativas de oxigênio (ANDRADE et al., 2007). Existem

documentados cerca de 5000 fenóis, com destaque para os flavonoides, fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos e tocoferóis (SOARES, 2002; ANGELO, JORGE, 2007; SOUZA et al., 2007). No entanto, o uso de antioxidantes sintéticos é limitado, devido à crescente preocupação do consumidor quanto a sua segurança, uma vez que alguns estudos sugeriram a possibilidade de efeitos tóxicos desses agentes antioxidantes sintéticos (SOARES, 2002).

Dessa maneira, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas no sentido de substituir os antioxidantes sintéticos por novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos (OLIVEIRA et al., 2009; MAKISHI, 2016; POKORNY, YANISHLIEVA, GORDON, 2001). Muitos estudos estão sendo realizados envolvendo diversos tipos de extratos de plantas.

A maioria das plantas possui compostos que podem atuar como antioxidantes naturais, capazes de retardar o processo de rancificação (SHAHIDI, 1997). Assim como os sintéticos, os antioxidantes naturais podem sequestrar radicais livres, absorver luz na região ultravioleta (UV) e quelar metais de transição, evitando o processo oxidativo (BREWER, 2011). Esses componentes bioativos de plantas são encontrados, comercialmente, como óleos essenciais, de difícil dispersão em água, ou na composição de extratos aquosos, ou hidroetanólicos, de partes das plantas, de interesse nesta tese.

Os compostos mais encontrados nos extratos de plantas e que possuem elevada atividade antioxidante são os tocoferóis, ácidos fenólicos, vitaminas C e E, pigmentos, cumarinas, enzimas capazes de remover oxigênio ou compostos reativos de um sistema, como catalase, glucose oxidase e superóxido dismutase, e os flavonoides (RAMALHO; JORGE, 2006; SOUZA et al., 2007). O extrato de algumas ervas e especiarias, usadas como condimentos e temperos, tem demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser usadas como conservantes naturais para alimentos (ZHENG; WANG, 2001).

Atualmente, várias pesquisas vêm sendo conduzidas com antioxidantes naturais na forma de extratos ou óleos essenciais de diversas plantas, tais como gergelim (SOUZA; TERRA, 2008); tomilho (ABDOLLAHZADEH; REZAEI; HOSSEINI, 2014); canela (RAEISI et al., 2016); alecrim (PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017); gengibre (NOSHIRVANI et al., 2017), orégano (GOVARIS et al., 2010). Além desses, merece destaque o extrato da folha da pitangueira, por possuir grande quantidade de quercetina e miricetina, taninos e proantocianidinas (FIUZA et al., 2008; FORTES et al., 2015).

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma planta de frutos comestíveis nativa do Brasil, no entanto, por apresentar uma fácil adaptação, também é bastante encontrada no Uruguai, Paraguai e Argentina (AMORIM et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2007). Essa espécie pertence à família *Myrtaceae*, composta por mais de 130 gêneros e mais de 5000 espécies de arbustos e árvores verdes (SOBEH et al., 2018). Várias partes dessa planta, incluindo frutas, sementes e folhas, têm sido estudadas com grande interesse na produção de extratos com atividade antioxidante (VARGAS et al., 2016; VARGAS et al., 2019).

A família *Myrtaceae* possui várias espécies frutíferas no Brasil, como jabuticabas, cambucís, pitangas, jambolão e outras (CIRQUEIRA, 2006) e tem seu perfil químico bem estabelecido, tanto dos frutos quanto das folhas, sendo que uma gama de fitoquímicos já foram identificados e caracterizados pela presença de vários constituintes importantes, apresentando quantidades elevadas de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos (FORTES et al., 2015; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; AMORIM et al., 2009). As folhas da pitangueira (Figura 3) são conhecidas pelas inúmeras propriedades medicinais, sendo utilizadas no preparo de infusões para o tratamento de inflamações, febres, dores reumáticas, hiperglicemia e problemas estomacais (GARMUS et al., 2014; AURICCHIO e BACCHI, 2003) e seu uso como erva medicinal está previsto na legislação brasileira (ANVISA, 2006).

Figura 3: Folhas de pitangueira.

Fonte: Própria autoria.

O extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira é rico em ácidos hidroxicinâmicos, dentre os quais se destacam os ácidos cinâmico e cafeico; em tirosol; em hidroxycumarinas e em hidroxifenilpropenos (LORENZO et al., 2018). Com relação aos flavonoides, os flavan-3-óis, as flavonas e os flavonóis como a quercetina, a miricetina e a miricitrina são também abundantes, seguidas das antocianinas (LORENZO et al., 2018). Por ser rico em compostos fenólicos, o extrato da folha de pitangueira tem alta capacidade antioxidante, assim como o seu óleo essencial, sendo um ingrediente potencial para reduzir o processo oxidativo de lipídios (VARGAS et al., 2019). Estas substâncias apresentam destaque especial como antioxidantes por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio, além de reduzirem e quelarem íons férricos, que catalisam a peroxidação lipídica (ANDRADE et al., 2007).

Nesse contexto, o extrato de folha de pitangueira vem sendo estudado para sua aplicação como agente antioxidante natural em produtos cárneos refrigerados (VARGAS et al., 2016; LORENZO et al., 2018; CARVALHO et al., 2019), e tem apresentado uma boa redução na oxidação lipídica desses produtos. O extrato de folha

de pitangueira também foi aplicado com sucesso na proteção de óleos vegetais contra a oxidação lipídica, aumentando a estabilidade do óleo de canola sem alterar a sua composição de ácidos graxos (VARGAS et al., 2019).

Além de comprovada ação antioxidante, o extrato das folhas dessa espécie possui ainda atividade antimicrobiana (SANTOS, 2012). Assim, estudar as propriedades do extrato da folha de pitangueira torna-se interessante para sua aplicação como composto ativo na indústria de alimentos.

2.4 Aplicação de filmes ativos em produtos cárneos: copa

Recentemente, produtos prontos para o consumo e em porções individuais tem ganhado popularidade, principalmente produtos cárneos como salame, presunto cozido, presunto cru e copa fatiada. Algumas técnicas de preservação da qualidade desses produtos vêm sendo estudadas com o intuito de aumentar a qualidade e a vida de prateleira desses alimentos. O emprego de embalagem com atmosfera modificada, por não empregar aditivos e conseguir manter a qualidade nutricional, tem sido bastante usado na preservação de produtos cárneos fatiados, ajudando a preservar a cor, textura e as propriedades sensoriais desses produtos. No entanto, esse tipo de embalagem ainda não é totalmente eficaz contra o crescimento microbiano (ESTURK, AYHAN, 2009). Uma vez que a deterioração da carne ocorre basicamente em nível de superfície, a aplicação de filmes ativos na superfície desses produtos pode ser uma boa alternativa para o aumento de sua vida útil (QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

É importante considerar que a embalagem ativa deve, além de retardar a deterioração microbiológica da carne e a oxidação, ter o cuidado de não alterar o sabor, odor e aparência, o que poderia influenciar na compra ou recompra do produto (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006).

Filmes ativos contendo compostos naturais com atividade antimicrobiana e antioxidante vêm sendo bastante estudados para aplicação em carnes e produtos

cárneos. Gómez-Estaca et al. (2010) aplicaram filmes de gelatina e quitosana incorporadas com óleo essencial de cravo na conservação de peixes e observaram uma redução drástica na contagem de microrganismos, especialmente de enterobactérias, durante todo o período de armazenamento.

Zinoviadou, Koutsoumanis e Biliaderis (2009) aplicaram filmes de proteína de soro de leite adicionados de óleo essencial de orégano em cortes de carne bovina *in natura*, e também observaram uma redução significativa na contagem de *Pseudomonas* e uma inibição completa de bactérias ácido lácticas, aumentando a vida útil da carne fresca.

Raeisi et al. (2016) estudaram a aplicação de uma formulação de revestimento de alginato de sódio adicionada de nisina e óleos essenciais de canela e alecrim em carne de frango refrigerada, e observaram um aumento da vida útil do produto, enquanto Matos (2009) estudou a incorporação de soluções de natamicina no recobrimento de salames do tipo Milano para o controle de fungos na superfície e encontrou uma rápida redução no número de colônias, sem prejuízos ou danos às bactérias desejáveis para a fermentação.

Cao, Warner e Fang (2019) estudaram a aplicação de uma cobertura de quitosana adicionada de nisina e de ácido gálico para a conservação de lombo de porco refrigerados e em embalagens com atmosfera modificada com alta concentração de oxigênio. Esses autores observaram um efeito antimicrobiano da nisina e um efeito antimicrobiano e antioxidante do ácido gálico. No entanto, os resultados mais promissores foram aqueles com adição da nisina e do ácido gálico em conjunto, que foram capazes de reduzir a contagem de bactérias totais de 6,83 para 4,67 log UFC/g ao longo de 20 dias de estocagem.

Correa et al. (2017) estudaram a aplicação de filmes de polihidroxibutirato e poliprolactona ativados com nisina na conservação de presunto cozido fatiado. Esses autores observaram que a incorporação de nisina foi eficaz na inibição de *L. plantarum*, com redução de 3,4 ciclos logarítmicos no 21º dia e redução de 2,6 ciclos logarítmicos

no final do experimento (28 dias), e esses materiais ativos foram considerados como materiais potenciais para a aplicação em embalagens de alimentos.

Zhao et al. (2019) também estudaram a conservação de presunto cozido fatiado com a aplicação de filmes a base de amido, adicionado de ácido gálico, quitosana e/ou carvacrol, e observaram que os filmes de amido com quitosana e carvacrol foram os mais eficazes e inibiram completamente o crescimento de *L. monocytogenes* pelas 4 semanas de estocagem.

Kanatt e Makwana (2020) estudaram a aplicação de filmes de carboximetilcelulose e poli(vinil álcool) (CMC-PVA) reticulados com ácido cítrico e incorporados com Aloe Vera na conservação de carne de frango moída e refrigerada. Nesse trabalho, foi observado que o filme ativo foi capaz de retardar a oxidação lipídica e o crescimento bacteriano do produto. Quando as amostras foram embaladas em filmes controle, elas apresentaram um crescimento de 3,9 log UFC/g após 3 dias de armazenamento, sendo que essa contagem só foi atingida após 13 dias de armazenamento para as amostras de carne de frango embaladas em filmes incorporados de Aloe Vera.

Ehsani et al. (2020) estudaram a conservação de hambúrgueres de peixe refrigerados usando filmes ativos biodegradáveis a base de gelatina, quitosana ou alginato e adicionados de lactoperoxidase ou óleo essencial de sálvia e reportaram que os filmes produzidos com quitosana e adicionados de lactoperoxidase foram os mais eficazes na diminuição da oxidação e na supressão do crescimento bacteriano, sendo que a contagem de bactérias psicrótróficas ficou em torno de 5,8 log UFC/g após 20 dias de armazenamento, enquanto o controle ficou em torno de 8,12 log UFC/g nesse mesmo período.

Dentre os produtos cárneos, o de maior interesse para esta tese é a copa, que normalmente é comercializada fatiada. A copa é um produto cárneo elaborado com músculos do pescoço, ou sobrepaleta suína, desossada, condimentada, defumada e maturada em sala de cura (ZANARDI et al., 2009). É considerada um produto de nicho,

voltada para um mercado *gourmet* (ANDRADE et al., 2018), o que justifica a aplicação de uma embalagem produzida com compostos ativos de maior custo.

Por ser comercializada fatiada, existe a possibilidade de contaminação microbiana cruzada no processo de fatiamento, e o fato de apresentar grande superfície específica a torna susceptível ao ataque do oxigênio atmosférico, que promove a oxidação de lipídeos e proteínas. Assim, a escolha de embalagem adequada é indispensável para a manutenção da estabilidade desse produto, garantindo uma preservação efetiva (YAM, TAKHISTOV, MILTZ, 2005; SAHIN et al., 2017).

3. Objetivos

O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento e a caracterização de filmes ativos a base de gelatina, compostos por duas camadas, sendo uma camada de filme de gelatina sem aditivo, e outra camada, mais fina, contendo os princípios bioativos: agente antioxidante (extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira) e/ou agente antimicrobiano (nisina ou natamicina).

Os principais objetivos específicos foram:

Avaliação das propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos filmes dupla camada a base de gelatina, sendo que os compostos ativos (extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira e/ou nisina ou natamicina) foram adicionados na segunda camada.

Estudo das propriedades mecânicas, umidade e solubilidade e propriedades de barreira ao vapor de água e propriedades antioxidantes dos filmes dupla camada a base de gelatina, sendo que os compostos ativos (extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira e/ou nisina ou natamicina) foram adicionados na segunda camada.

Aplicação dos filmes ativos adicionados de extrato hidroetanólico de folha de Pitangueira e/ou nisina na segunda camada, na conservação de copa fatiada refrigerada.

4. Hipóteses

A primeira hipótese considerada nesse projeto foi que a adição de nisina ou natamicina na formulação da solução filmogênica de gelatina, bem como a adição de extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira, produziria filmes com atividade antimicrobiana e/ou antioxidante, possivelmente sem afetar as propriedades físicas desses filmes. Considerando o elevado custo dos agentes antimicrobianos, é sempre interessante tentar reduzir sua quantidade na formulação. Assim, outra hipótese levantada é que a adição dos agentes bioativos apenas em uma fina camada, aplicada sobre uma outra camada mais espessa, produziria filme com atividade antimicrobiana e/ou antioxidante, ou seja, suficiente para proteger o alimento de contaminação microbiológica e/ou oxidação. Em se confirmando essa hipótese, o filme ativo seria produzido utilizando menos princípios ativos em comparação a um filme monocamada.

5. Material e métodos

5.1 Materiais e reagentes utilizados

Para a produção dos filmes ativos, foi utilizada gelatina de pele suína do tipo A (Gelnex, Brasil), como biopolímero, e o glicerol (Synth), como plastificante. Os compostos bioativos foram: nisina, doada pela empresa Danisco (Nisaplin®, Brasil) e natamicina, doada pela empresa Prozyn (Brasil). As folhas de pitangueira, colhidas no *campus* da USP na cidade de Pirassununga, SP, foram utilizadas como fonte de agente antioxidante na forma de extrato hidroetanólico. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, adquiridos de empresas conhecidas.

Para as análises de fenóis totais foram utilizados os reagentes: Folin-Ciocalteu (Merck), carbonato de sódio (Merck), ácido gálico (Sigma Aldrich). Para a determinação de atividade antioxidante pelos métodos de captura de radical livre DPPH• e atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS•+) foram utilizados os reagentes DPPH• (Sigma Aldrich), ABTS•+ (Sigma Aldrich), persulfato de potássio (Merck), etanol anidro (Dinâmica) e Trolox (Sigma Aldrich).

Para as análises microbiológicas de bactérias foram utilizados caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Bacto™) e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), além de ágar *Mueller Hinton* (Acumedia). As cepas utilizadas para as análises microbiológicas foram *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Para a análise de fungos foram utilizados ágar batata-dextrose e as cepas de fungos testadas foram *Penicillium sp* e *Aspergillus niger*.

5.2 Preparo do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira

As folhas de pitangueira foram colhidas, selecionadas, lavadas com água corrente e hipoclorito, e secas em estufa com circulação de ar (40 °C/72 h). Após a secagem, as folhas foram trituradas, uniformizadas por peneiragem (48 *mesh*), e armazenadas a 4 °C, protegidas da luz, até a produção do extrato (Figura 4).

Figura 4: Fluxograma do preparo do extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira.

Fonte: Própria autoria.

As folhas de pitangueira trituradas foram misturadas com solvente hidroetanólico e deixadas 40 minutos em ultrassom, sendo então aquecidas à 80 °C em banho termostático (MA 184 Marconi), na ausência de luz, com agitação mecânica por 30 minutos. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel filtro (Whatman, nº 1) e concentrado com um evaporador rotativo (TE211, Tecnal, Brasil), e liofilizado (VARGAS et al., 2019).

Para a produção dos filmes adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira, inicialmente, uma solução estoque desse extrato foi preparada pela solubilização de 1 g de extrato/ 10 mL de água destilada.

5.3 Preparo da solução formadora de filme para testes reológicos

As soluções formadoras de filme (SFF) foram preparadas de acordo com a metodologia descrita em Sobral et al. (2001). A gelatina (2 g /100 g de SFF) foi previamente pesada, dispersa em água destilada e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos para sua hidratação. Em seguida, a gelatina foi solubilizada em banho termostático (Marconi MA-184, Brasil) à 60 °C por 15 minutos. Para o estudo da influência dos compostos ativos nas soluções formadoras dos filmes, estes foram adicionados em suas respectivas concentrações (Tabela 1), e as soluções foram mantidas em agitação magnética por mais 10 minutos.

As análises foram realizadas imediatamente após o preparo. Para facilitar o entendimento, as amostras de SFF foram denominadas de G: solução contendo apenas gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP); GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina e GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Tabela 1: Amostras da solução formadora de filme (SFF) para os ensaios reológicos*.

Amostra	Gelatina (g/100 g SFF)	Nisina (mg/g gelatina)	Extrato (mg/g gelatina)	Natamicina (mg/g gelatina)
G	2	0	0	0
GN	2	56	0	0
GE	2	0	150	0
GNE	2	56	150	0
GNA	2	0	0	5
GNAE	2	0	150	5

Fonte: Própria autoria.

* G: Solução de gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina; GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

5.4 Caracterização reológica das soluções formadoras de filme

5.4.1 Modo Estacionário: curvas de fluxo

As curvas de fluxo das soluções formadoras de filmes foram obtidas com um reômetro rotacional (AR2000, TA Instruments), com sistema Peltier de controle de temperatura, por teste de cisalhamento em dois ciclos, aumentando a taxa de deformação linearmente de 0 – 250 s⁻¹ em 2 minutos, e imediatamente diminuindo essa taxa até 0 s⁻¹ nos próximos 2 minutos, à temperatura constante de 50 °C, de acordo com a metodologia descrita em Silva-Weiss et al. (2014). A geometria utilizada nesses ensaios foi a de cilindros concêntricos (raio interno de 14 mm, raio externo de 15 mm, altura de 42 mm e “gap” de 1000 µm). As amostras foram analisadas no mínimo em triplicata.

5.4.2 Modo Oscilatório

Foram realizados três ensaios em modo oscilatório utilizando-se a geometria cone-placa (ângulo do cone: 4°, diâmetro da geometria: 60 mm), sempre em triplicata. Em um primeiro momento foi conduzida uma varredura de deformação afim de se estabelecer a região de viscoelasticidade linear (RVL), de acordo com o método descrito em Moraes et al. (2009). A varredura de deformação foi realizada em uma faixa de 0 – 10% a 1,0 Hz de frequência para duas temperaturas (5 °C e 50 °C), garantindo que o teste fosse realizado tanto no estado sol quanto no estado gel da amostra. Em seguida, foi realizada uma varredura de temperatura, mantendo-se constante a frequência de 1,0 Hz e a deformação de 4% (obtida do teste de varredura de deformação). Nesse ensaio as amostras foram resfriadas de 50 – 5 °C e imediatamente aquecidas até 50 °C, a uma taxa de 2 °C/minuto. Foram determinadas as temperaturas de gelificação (temperatura sol-gel) e a temperatura de fusão (temperatura gel-sol), como sendo a temperatura onde o módulo elástico (G') mudou drasticamente (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009).

Finalmente, foram conduzidos ensaios de varredura de frequência em uma faixa de 0,01 – 10 Hz, a uma temperatura constante de 5 °C (domínio gel) e 4 % de deformação (dentro da região de viscoelasticidade linear). Nesse ensaio, os parâmetros viscoelásticos G' (módulo de armazenamento) e G'' (módulo de perda) foram medidos em função da frequência para se obter os espectros mecânicos.

5.5 Produção dos filmes

5.5.1 Filmes monocamada

Os filmes foram produzidos pela técnica *casting*. Em um primeiro momento, para o estudo da concentração de nisina adicionada nos filmes, estes foram produzidos em monocamada, e a nisina foi adicionada em diferentes concentrações (28, 56, 84 e 112

mg / g de gelatina) na solução formadora de filme, produzida de acordo com a seção 5.3, porém, com adição de glicerol como plastificante (30 g/100 g de gelatina).

A solução formadora de filme foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos, e em seguida foi dispersa em placas de Petri e levada à estufa com circulação de ar (Marconi) por 24 horas à 30 °C. Após a secagem em estufa, os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo solução salina de NaBr (58% UR), a 25 °C, por um período de 7 dias, antes de serem analisados.

5.5.2 Filmes dupla camada

Devido ao custo elevado de compostos ativos como a nisina, após os testes preliminares com filmes monocamada, foram desenvolvidos filmes dupla camada (Figura 5), adicionando-se nisina na formulação da solução formadora da segunda camada, ou seja, na superfície do filme que ficaria em contato com o alimento, afim de se utilizar uma quantidade menor desse peptídeo, mas que fosse capaz de produzir um filme igualmente eficaz no controle de bactérias. A concentração de nisina escolhida com base nos resultados apresentados na seção 6.2 foi de 56 mg / g de gelatina.

Figura 5: Esquema dos filmes dupla camada.

Fonte: Própria autoria.

Foram também desenvolvidos filmes de gelatina adicionados de outros compostos ativos, como o extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira, usado como agente antioxidante, e a natamicina, usada como agente antifúngico.

Para os filmes dupla camada foi feito, primeiramente, um filme base, composto apenas de gelatina, e plastificado com glicerol, produzido nos mesmos termos citados acima (seção 5.3). Essa primeira camada foi seca em estufa à 30 °C por 24 horas e, em seguida, foi realizado um segundo *casting* acima desse filme, sem removê-lo da placa de Petri.

A segunda camada, além de gelatina e glicerol, continha também o composto ativo (EHFP e/o nisina ou natamicina) nas mesmas concentrações indicadas na Tabela 1. Após a aplicação da segunda camada de filme, a placa de Petri foi posta novamente para secar em estufa com circulação de ar (Marconi, MA 037, Brasil) (30 °C/ 24h).

Com a finalidade de se comparar o efeito dos compostos adicionados nas propriedades dos filmes, também foi produzido em dupla camada um filme controle, ou seja, sem a adição de compostos ativos.

Após a secagem em estufa, os filmes dupla camada também foram acondicionados em dessecadores contendo NaBr (58% UR), por um período de 7 dias, antes de serem analisados, de acordo com Alves et al. (2011).

5.6 Caracterização dos filmes

5.6.1 Aspectos visuais e espessura

A espessura do filme foi determinada com um micrômetro digital (Mitutoyo, 0,001 mm) com escala de 0-25 mm e probe de 6,4 mm de diâmetro. Para cada amostra, foram realizadas medidas em dez pontos aleatórios, sendo a espessura do filme calculada como a média aritmética dessas medidas (THOMAZINE, CARVALHO, SOBRAL, 2005).

5.6.2 Umidade e solubilidade em água

A umidade dos filmes ativos foi determinada gravimetricamente por secagem em estufa a 105 °C por 24 horas (SOBRAL et al., 2001). Todas as pesagens ($\pm 0,0001\text{g}$) foram realizadas em balança semi-analítica (AS 2000, Exacta).

A solubilidade (S) dos filmes em água foi determinada segundo a metodologia descrita em Gontard, Guilbert e Cuq (1992), após 24 horas de imersão. Amostras de filmes na forma de disco (~2 cm), de peso seco conhecido (m_i), foram imersas em água destilada (50 mL) e mantidas sob agitação mecânica em uma mesa agitadora orbital (MA-141, Marconi, Brasil) à temperatura constante de 25 °C. Após este período, as amostras foram submetidas à secagem (24 horas, 105 °C) para determinação da massa seca final da amostra (m_f). A solubilidade dos filmes, expressa em termos de massa seca dissolvida, foi calculada com a Equação 1.

$$S = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

5.6.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes ativos foram determinadas por ensaios de tração uniaxial e de perfuração, utilizando-se um texturômetro (TA. XT2i, Stable Microsystems, EUA). Para os ensaios de tração, amostras dos filmes de 15 x 80 mm foram tracionadas com velocidade constante de 1,0 mm/s, partindo de uma separação de garras inicial de 80 mm (PASCHOALICK et al., 2003). A tensão na ruptura (T_R , em MPa) e a elongação de ruptura (E, em %) foram calculadas diretamente das curvas de tensão versus deformação, e o módulo elástico (ME, em MPa) foi determinado calculando-se o coeficiente angular da porção linear dessa curva.

Para o teste de perfuração, amostras dos filmes foram cortadas e fixadas em uma célula com 60 mm de diâmetro e submetidas à perfuração com uma sonda de 3 mm de diâmetro, deslocando-se a velocidade de 1 mm/s (GONTARD, GUILBERT, CUQ, 1992). A força na perfuração (F_P , em N) foi determinada diretamente das curvas de força versus deslocamento da sonda, e a deformação na perfuração (D_P , em %) foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$D_P (\%) = \frac{\sqrt{(D^2 + L_o^2)} - L_o}{L_o} \quad (2)$$

Sendo: L_o : o comprimento inicial do filme, igual ao raio da célula (30 mm); e D : o deslocamento da sonda cilíndrica na perfuração (mm).

5.6.4 Microestrutura

A microestrutura superficial da segunda camada dos filmes foi analisada com um microscópio eletrônico de varredura (MEV, TM-3000, HITACHI) com voltagem de 5 kV. As amostras foram armazenadas em sílica gel sob vácuo por 12 horas e posteriormente fixadas em um suporte de alumínio com fita de carbono de dupla face. Adicionalmente, as amostras de filmes produzidos em dupla camada foram crio fraturadas, após congelamento com nitrogênio líquido, para observação de sua estrutura interna. Essas amostras foram examinadas em posições aleatórias utilizando-se voltagem de 15 kV (FLAKER et al., 2015).

Adicionalmente, a superfície externa da segunda camada foi submetida às análises de microscopia de força atômica (AFM) (NT-MDT, Rússia). As amostras foram caracterizadas usando o modo de semi-contato no AFM, com uma frequência de ressonância de 150 kHz, força de contato de 5 N/m, e velocidade de varredura de 0,3

Hz (ARZATE-VÁZQUEZ et al., 2012). A rugosidade média (em nm) foi calculada utilizando-se o *software* do equipamento.

5.6.5 Cor, opacidade e brilho

Os parâmetros de cor na escala CIELab (L^* , a^* , b^*), diferença total de cor (ΔE^*), e opacidade foram determinados utilizando-se um colorímetro HunterLab (Miniscan XE), de acordo com a metodologia descrita por Sobral et al. (2001), com iluminante D65, ângulo de 10° e célula de medida com abertura de 3 cm.

Os parâmetros L^* , a^* e b^* dos filmes foram determinados, sobrepondo-se os filmes sobre um padrão branco, e a diferença total (ΔE^*) de cor foi calculada com a Equação 3 (GENNADIOS et al., 1996). Em todas essas análises, a superfície da segunda camada foi deixada para cima, ou seja, a superfície da primeira camada estava em contato com o padrão.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

Onde: $\Delta L^* = L^*_{\text{padrão}} - L^*_{\text{amostra}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{padrão}} - a^*_{\text{amostra}}$ e $\Delta b^* = b^*_{\text{padrão}} - b^*_{\text{amostra}}$.

A opacidade (Y) foi determinada no mesmo equipamento, de acordo com Sobral (2000), e pode ser descrita, de acordo com a Equação 4, como a relação entre a opacidade do filme sobreposto sobre o padrão preto (Y_P) e sobre o padrão branco (Y_B).

$$Y = \left(\frac{Y_P}{Y_B} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde: Y_P = Opacidade sobre o padrão preto e Y_B = Opacidade sobre o padrão branco.

O brilho da superfície da segunda camada dos filmes ativos foi determinado nos ângulos de 20° e 60°, com um Glossímetro (NGL 20/60), com dez medições aleatórias, sendo registradas como unidades de brilho GU (VILLALOBOS et al., 2005).

5.6.6 Barreira à luz (UV/VIS)

As propriedades de barreira à luz UV/Vis foram determinadas seguindo-se a metodologia descrita em Fang et al. (2002), utilizando-se um espectrofotômetro UV/Visível (Lambda 35, Perkin Elmer, USA), em uma faixa de comprimento de onda de 200 – 800 nm para verificar a transmitância dos filmes. Para esse ensaio, pedaços de filme de aproximadamente 4 cm de comprimento e 1 cm de largura foram cortado e colocados no equipamento no lugar da cubeta de forma que o feixe de luz do aparelho pudesse passar através dos filmes, com a superfície ativa do lado do feixe de luz. Cada formulação dos filmes foi analisada em triplicata.

5.6.7 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes ativos foi determinada segundo o método proposto por Gontard, Guilbert, Cuq (1992). Os filmes foram fixados em células de permeação de alumínio, contendo cerca de 60 g de sílica gel (UR ~ 0%). Essas células de permeação foram acondicionadas em dessecadores contendo água destilada (UR 100%), e mantidos em uma estufa (BOD TE390 TECNAL) com controle de temperatura ($\pm 0,2$ °C), a 25 °C. O ganho de massa do sistema foi determinado gravimetricamente em intervalos de 24 h, por um período de 168 horas (7 dias). A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada de acordo com Equação 5.

$$PVA = \frac{\Delta g}{\Delta t} \left(\frac{d}{A \Delta P} \right) \quad (5)$$

Sendo d : espessura média dos filmes (mm); A : área de permeação (32,17 cm²); ΔP : diferença de pressão de vapor parcial da atmosfera sob sílica gel e água pura (3,1691 kPa, à 25 °C); $\Delta g/\Delta t$: taxa de ganho de água na célula de permeação, calculada como a inclinação da reta da função entre ganho de peso e o tempo (g/h).

5.6.8 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos filmes ativos foram determinadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC TA 2010, TA Instruments, USA). Amostras de filme foram pesadas e colocadas em cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas. As cápsulas foram aquecidas a uma taxa de 5 °C/minuto em uma faixa de temperatura de -110 a 100 °C, e em corrida dupla, sempre após resfriamento com nitrogênio líquido, juntamente com uma cápsula vazia, usada como referência. A entalpia de fusão (ΔH_M), temperatura de transição vítrea (T_G) e temperatura de fusão (T_M), foram calculadas diretamente das curvas usando o *software Universal Analysis V1.7F* (TA Instruments, USA) (SOBRAL, HABITANTE, 2001).

5.6.9 Difração de raios X

As análises de difração de raios X foram realizadas de acordo com o método descrito por Valencia (2017), utilizando-se um difratômetro de raios X (Rigaku Miniflex 600, Japão), operando com 40 kV e corrente de 15 mA. Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente, e amostras de filmes foram analisadas em uma faixa de ângulos entre $2\theta = 2 - 50^\circ$, com velocidade de varredura de $2^\circ / \text{min}$.

5.6.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Análises por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas usando-se um espectrofotômetro (Spectrum-One, Perkin-Elmer, EUA) munido de um acessório UATR. Foram realizadas 20 varreduras na faixa espectral de $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de varredura foram analisados com o *software FTIR Spectrum* (Perkin-Elmer) (BERGO, MORAES, SOBRAL, 2012). A superfície da segunda camada foi aquela atingida pelo laser do espectrofotômetro.

5.6.11 Ângulo de contato da gota de água

O ângulo de contato de uma gota de água foi determinado em ambos os lados do filme dupla camada, utilizando-se um tensiômetro ótico (Optical tensiometer, Finlândia). Os filmes foram fixados no suporte do equipamento e uma gota de água Mili-Q foi colocada sobre a superfície de secagem de cada amostra, utilizando uma seringa de precisão. Foram obtidas imagens a cada segundo, por um período de 30 segundos (VALENCIA, 2017). O ângulo formado entre a superfície e a tangente da gota de água foi determinado utilizando o *software* do próprio equipamento.

5.6.12 Atividade antimicrobiana por teste de sensibilidade

A atividade antimicrobiana dos filmes foi determinada por teste de sensibilidade pelo método de difusão em discos tanto para bactérias quanto para fungos. Foram utilizadas cepas das bactérias Gram (+): *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. A ativação das bactérias foi realizada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) ou em caldo *Mueller Hinton*, em temperatura de 37°C por 24 horas. Em seguida, a solução de caldo com as respectivas bactérias foi diluída para se obter 10^8 UFC/mL, e a suspensão diluída foi semeada em placas contendo ágar *Mueller Hinton*.

Discos de filmes de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram colocados na superfície das placas e incubados a 37 °C por 24 horas (SILVA et al., 2007). Após a incubação, o diâmetro de inibição foi medido.

Para a análise de fungos foram preparadas suspensões de esporos de fungos dos gêneros *Penicillium sp* e *Aspergillus niger*, cultivados em ágar batata dextrose até que houvesse esporulação significativa (em torno de 7 dias). Após a incubação, os conídios foram retirados do ágar, ressuspensos em água ultrapura e ajustados para uma concentração final de $10^4 - 10^5$ esporos / mL (GARCÍA et al., 2011). Os fungos foram semeados no ágar com uma alça *Drigalski* para a realização do ensaio de sensibilidade, também pelo método de difusão de discos (NCCLS, 2002).

5.6.13 Atividade antioxidante

5.6.13.1 Compostos redutores totais pelo método Folin-Ciocalteu

A análise de compostos redutores totais nos filmes foi realizada seguindo o método descrito por Singleton; Rossi Jr. (1965), usando ácido gálico como padrão e o reagente Folin-Ciocalteu. Uma alíquota de 0,5 mL dos filmes previamente solubilizados em água destilada foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos de reação foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio. O tubo foi agitado em um vórtex e mantido em repouso por 2 horas em ambiente escuro antes da leitura em um espectrofotômetro (Lambda 35, Perkin Elmer, USA) à 760 nm. O cálculo dos compostos redutores totais dos filmes foi realizado a partir da curva padrão, elaborada com soluções de ácido gálico em diferentes concentrações.

5.6.13.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da captura do radical livre ABTS•⁺.

O preparo da amostra de filme solubilizado foi realizado conforme descrito na seção 5.6.13.1. A leitura em espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 734 nm (BITENCOURT et al., 2014), após 6 minutos de reação. A capacidade antioxidante foi calculada com a Equação 6.

$$CA (\%) = \left(\frac{Abs_{ABTS} - Abs_{amostra}}{Abs_{ABTS}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde: Abs_{ABTS} é a absorbância da solução de ABTS; Abs_{amostra} é a absorbância da amostra solubilizada.

5.6.13.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da captura do radical livre DPPH•.

Inicialmente, os filmes foram solubilizados (50 mg do filme para 6 mL de água destilada) e aquecidos em banho termostático à 50 °C. Em seguida uma alíquota de 0,5 mL do filme dissolvido foi misturada com 2,5 mL da solução do radical DPPH• em ausência de luz. A leitura em espectrofotômetro foi realizada à 515 nm no tempo zero e após 60 minutos, conforme descrito em Méndez (2017). A capacidade antioxidante foi calculada com a Equação 7.

$$CA (\%) = \left(\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{amostra}}{Abs_{DPPH}} \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde: Abs_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH; Abs_{amostra} é a absorbância da amostra solubilizada.

5.6.14 Estabilidade antioxidante e antimicrobiana dos filmes durante estocagem

Com o intuito de verificar a atividade antioxidante desses filmes ao longo do tempo, estes foram embalados em folha de alumínio e armazenados em câmara incubadora (BOD - MA415, Marconi), por 28 dias, a 25 °C e 58% de umidade relativa, conforme descrito em Tedesco (2018). Durante esse período, os filmes foram avaliados com relação a capacidade redutora total (Folin-Ciocalteu) em intervalos de 7 dias. Adicionalmente, esses filmes também foram testados quanto à sua capacidade antimicrobiana pelo método de difusão de discos.

5.7 Aplicação dos filmes ativos na conservação de copa fatiada

Os filmes ativos utilizados nesta parte da tese foram produzidos conforme descrito na seção 5.5.2, porém utilizando-se a técnica de espalhamento mecânico, com um espalhador de filmes automático (TKB Erichsen, modelo Speed II), com altura fixa em 1,5 mm e velocidade de 35 mm/s, de acordo com Jorge (2012), afim de se obter filmes maiores, facilitando sua aplicação nos produtos.

Os filmes ativos contendo extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou nisina foram escolhidos para aplicação em copa fatiada por apresentarem bons resultados microbiológicos e boa ação antioxidante. Inicialmente peças de copa do mesmo lote e com o mesmo prazo de validade, adquiridas diretamente do distribuidor, foram cortadas (Centermaq, CFI 300 IFM, Brasil) em fatias de espessura de aproximadamente 1,5 mm e dispostas sobre as outras, como na embalagem individual convencional, perfazendo 25 ou 50 g (para experimentos de microbiologia ou físico-químicos, respectivamente, recobertas com os filmes ativos dos dois lados, de maneira que a segunda camada do filme (camada ativa) ficasse em contato com o produto. Adicionalmente, amostras foram embaladas com um filme controle, contendo somente

gelatina e sem filme. Esse sistema (copa + filme) foi embalado à vácuo (1,32 kPa) em embalagens de PVDC/EVA (20 X 10 cm², modelo BB494, CYROVAC, Jaguariuna, Brasil) com espessura entre 48 e 62 µm, taxa de permeabilidade ao oxigênio de 30 cm³.m⁻².dia (1 atm/23 °C/ 0% UR) e permeabilidade ao vapor de água de 10 g.m⁻².dia (1 atm/38 °C/ 90% UR). e mantido sob refrigeração (T= 4 °C), disposto em um expositor com lâmpada fluorescente, simulando as condições de varejo do supermercado. Amostras foram coletadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120, para as análises físico-químicas e microbiológicas.

5.7.1 Análise da composição centesimal da copa fatiada

A composição centesimal da copa foi realizada de acordo com os métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 1996). Foram determinados os teores de umidade, proteínas, lipídios e cinzas das amostras, e o teor de carboidratos foi determinado por diferença de massa. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem.

5.7.2 Análises de pH da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

As análises de pH foram realizadas homogeneizando-se 5 g de amostra com 45 mL de água destilada em um homogeneizador Ultra-Turrax® T25 (IKA, Alemanha) a 5000 rpm durante 2 minutos. Um pH-metro digital (PG1400, Gehaka, Brasil) foi utilizado para fazer as medidas na suspensão obtida, de acordo com a metodologia descrita em Córdoba (2018).

5.7.3 Análises de umidade e atividade de água da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

A umidade das amostras foi determinada gravimetricamente, seguindo-se a metodologia da AOAC (AOAC 950,46, 1991). Adicionalmente, a atividade de água das amostras foi medida utilizando o equipamento para atividade de água AquaLab CX-2 (Decagon Devices, EUA) e mantendo-se a temperatura constante (25 °C).

5.7.4 Análise de oxidação de lipídeos da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

A oxidação lipídica das fatias de copa foi analisada por dois métodos: índice de peróxidos, que avalia os produtos primários da oxidação; e análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), que analisa os produtos secundários da oxidação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A extração da gordura para as análises de índice de peróxidos foi realizada segundo a metodologia descrita em Bligh e Dyer (1959), com algumas modificações. Amostras de copa fatiada de 50 g foram trituradas em um *mixer* e adicionadas de uma mistura de 50 mL:100 mL:40 mL de clorofórmio, metanol e água destilada. Essa solução ficou em agitação por 30 minutos. Em seguida foram adicionados mais 50 mL de clorofórmio e 50 mL de uma solução de sulfato de sódio 1,5% e a solução ficou em agitação por mais 2 minutos. As fases foram separadas de maneira natural e o precipitado foi adicionado de 5 g de sulfato de sódio anidro. Depois de agitada, essa solução foi filtrada em papel *Whatmann 1* e deixada em estufa à 105 °C por 1 h e 30 minutos.

A gordura obtida foi misturada com uma solução 2:3 de clorofórmio e ácido acético e agitada levemente. Em seguida foram adicionados 500 µL de solução saturada de iodeto de potássio (KI) e a solução foi agitada gentilmente e deixada em repouso por

1 minuto. Foram adicionados mais 30 mL de água destilada e 1 mL de solução de amido, usada como indicador. Essa solução foi titulada com tiosulfato de sódio (0,001N) e os resultados encontrados foram expressos em miliequivalentes de índice de peróxido por kg de lipídios.

A análise de TBARs foi baseada na quantificação do malondialdeído (MAD), realizada seguindo a metodologia descrita em Sorensen e Jorgensen (1996) com ligeiras modificações. Inicialmente foi preparada uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5%, propilgalato (PG) 0,1% e EDTA 0,1%. Em seguida, 10 g de copa fatiada foram solubilizadas com 30 mL dessa solução, e foram agitados em homogeneizador Ultra-Turrax® T25 (IKA, Alemanha) a 10000 rpm por 30 segundos. Essa solução foi filtrada em papel *Whatmann 42* e uma alíquota de 5 mL foi misturada com igual volume de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M. Essa mistura foi deixada em banho termostático à 100 °C por 40 minutos. As soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e a leitura da absorbância foi realizada em 532 nm. Os valores de TBARs foram calculados usando uma curva padrão de 1,1-3,3 tetraetoxipropano (TEP), e foram expressos como mg de MAD/kg de amostra.

5.7.5 Análise de textura da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

A análise de textura da copa foi realizada em um texturômetro (TA. XT2i, Stable Microsystems, EUA) utilizando duas *probes* diferentes: uma sonda P3 de 3 mm e uma lâmina (*Blade set*) de cisalhamento, com uma compressão fixa máxima na amostra de 50%, e a velocidade do teste foi fixada em 1 mm/s. A firmeza da amostra foi expressa como a força máxima de corte (N), de acordo com a metodologia descrita em Esturk e Ayhan (2009).

5.7.6 Cor da superfície da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

As medidas de cor foram realizadas em cada ponto do experimento imediatamente após a abertura da embalagem, em três focos diferentes das fatias de copa. Essas medidas foram feitas utilizando-se um colorímetro Miniscan EZ (HunterLab, EUA) com o sistema CIELab, analisando-se os parâmetros L^* , a^* e b^* .

5.7.7 Análises microbiológicas da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

As análises microbiológicas para a Copa fatiada foram realizadas para contagem de psicotróficos, bactérias ácido lácticas e *Staphylococcus aureus*, de acordo com a metodologia descrita em Silva et al. (2007). Amostras de copa (25 g) foram colocadas em sacos estéreis (3M company, Brasil) contendo 225 mL de solução de água peptonada estéril (0,1% m/v) e homogeneizadas em um homogeneizador *stomacher* (Marconi, Brasil), durante 2 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas para cada amostra em tubos estéreis. Uma alíquota de 1 mL dessas diluições foi colocada sobre as placas de ágar seletivo. As placas com ágar seletivo para *S. aureus* (BP) foram incubadas à 37 °C por 24 horas. As placas com ágar seletivo para bactérias psicotróficas (PCA) foram incubadas à 17 °C por 16 horas e posteriormente à 7 °C por 3 dias. As placas com ágar seletivo para bactérias ácido-lácticas (MRS) foram incubadas à 37 °C por 48 horas.

Depois do tempo de incubação de cada placa, foi realizada a contagem, microbiológica, expressa como logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (log UFC/g).

5.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos na caracterização dos filmes foram analisados estatisticamente pela ANOVA (análise de variância) e pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para verificar as diferenças entre as médias dos filmes adicionados dos compostos ativos e/ou do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e do filme controle, utilizando-se o programa STATISTICA 7. Para os ensaios de aplicação dos filmes na Copa fatiada os dados foram submetidos a análises de ANOVA e teste de Tukey em “two-way” utilizando-se o mesmo programa.

6. Resultados e discussão

Os resultados desta tese serão apresentados em 4 seções. Inicialmente, serão apresentados os resultados dos experimentos envolvendo as propriedades reológicas de soluções formadoras de filmes com aditivos; em seguida, serão apresentados os resultados do experimento sobre o desenvolvimento de filmes monocamada contendo diferentes concentrações de nisina; na sequência, em sessões sucessivas, os resultados dos experimentos sobre desenvolvimento de filmes dupla camada a base de gelatina contendo EHFP e/ou nisina ou natamicina, respectivamente; e finalmente, o estudo envolvendo a aplicação de um filme ativo dupla camada contendo EHFP e/ou nisina na conservação de copa fatiada estocada sob refrigeração (4 °C).

6.1 Propriedades reológicas das soluções formadoras de filme (SFF)

Nessa seção, serão apresentados os resultados obtidos em modo estacionário (curva de fluxo) e em modo dinâmico (propriedades viscoelásticas) de SFF contendo EHFP e/ou nisina ou natamicina. Este estudo foi importante para se conhecer eventuais interações entre os aditivos e a gelatina, via seus efeitos nas propriedades reológicas. Além disso, as propriedades reológicas podem servir para ajudar na escolha da técnica de aplicação da SFF no suporte (*casting* ou espalhamento automático).

6.1.1 Modo Estacionário

As propriedades de fluxo são primordiais para a qualidade das SFF (PERESSINI et al., 2003) e são bastante utilizadas para os cálculos de processos que envolvem fluxo de fluidos (STEFFE, 1996). Pode-se observar na Figura 6, que o comportamento das curvas de fluxo foi similar para todas as soluções estudadas, ou seja, independentemente do composto ativo adicionado. Pode-se observar ainda uma

relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, caracterizando um comportamento Newtoniano.

Figura 6: Exemplos de curvas de fluxo das soluções formadora de filmes*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Solução de gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina; GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Um comportamento Newtoniano também foi reportado por Makishi (2016) para soluções de gelatina adicionadas, ou não, de extrato de boldo-do-Chile, sugerindo que esse comportamento foi atribuído à baixa concentração da macromolécula (2%), em que prevaleceram as interações macromolécula-água (MORAES et al., 2009).

Os valores de viscosidade das SFF (Tabela 2) foram calculados por regressão linear, com coeficientes de correlação elevados ($R^2 > 0,8$). A viscosidade das SFF ficou em torno de 2,32 mPa, sendo que não se observou variação significativa nesse parâmetro com a adição dos compostos ativos estudados, provavelmente associado à sua baixa concentração, que não foi capaz de alterar a viscosidade da solução de gelatina.

Tabela 2: Viscosidade e coeficiente de correlação (R^2) das soluções formadoras de filme*.

Amostra	Viscosidade (mPa.s)	R^2
G	$2,35 \pm 0,28^a$	0,999
GN	$2,34 \pm 0,08^a$	0,999
GE	$2,23 \pm 0,20^a$	0,816
GNE	$2,32 \pm 0,09^a$	0,998
GNA	$2,36 \pm 0,41^a$	0,999
GNAE	$2,30 \pm 0,15^a$	0,999

Fonte: Própria autoria.

* G: Solução de gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina; GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Makishi (2016) encontrou valores ligeiramente superiores para a viscosidade da solução de gelatina na concentração de 2% (em torno de 3,8 mPa) e também reportou que a adição de extrato de Boldo-do Chile não teve influência nessa propriedade. Pintado; Ferreira e Souza (2009) observaram uma redução na viscosidade das soluções a base de proteína de soro de leite com a adição de nisina. De acordo com esses autores, a menor viscosidade observada depois da incorporação de nisina pode ser explicada pela competição por ligações intermoleculares, ocorrendo menos interações entre as cadeias de proteína da macromolécula e mais interações da proteína com a nisina (PINTADO; FERREIRA; SOUZA, 2009).

De acordo com DU et al. (2011), a adição de extratos de plantas pode reduzir a viscosidade das SFF de gelatina. Esses autores afirmaram que a redução na viscosidade poderia ter sido provocada pelos grupos OH^- dos polifenóis presentes no extrato, que agiram como espaçadores entre as cadeias poliméricas, aumentando o volume livre e a mobilidade da matriz de gelatina.

Silva-Weiss et al. (2014) estudaram os parâmetros reológicos das soluções de gelatina e carboximetilcelulose e encontraram comportamento não-Newtoniano. De acordo com Silva-Weiss et al. (2014), as interações entre os polifenóis e a gelatina podem ser explicados por quatro diferentes mecanismos: 1) Aumento das interações hidrofóbicas pela formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH dos polifenóis e os grupos COOH da gelatina; 2) A presença de polifenóis glicosídicos que podem afetar a compatibilidade com a gelatina promovendo interações com os grupos OH; 3) Formação de ligações covalentes (C-N) dos polifenóis reagindo com as cadeias laterais da gelatina; 4) A capacidade de precipitação da gelatina pela fração de taninos do extrato.

Bertolo et al. (2020) estudaram o comportamento reológico de soluções formadoras de filme a base de gelatina e quitosana, adicionada de extrato de casca de romã. Para essas amostras, foi observado um comportamento pseudoplástico. Pintado; Ferreira e Souza (2010) estudaram o comportamento reológico de soluções a base de proteína isolada de soro de leite com ácido málico e nisina ou natamicina e também observaram que as soluções estudadas tiveram um comportamento Newtoniano sem influência da adição da natamicina na viscosidade das soluções.

6.1.2 Modo Oscilatório

6.1.2.1 Varredura de deformação

Inicialmente, foram realizados testes de varredura de deformação em duas temperaturas: 50 °C (domínio sol) e 5 °C (domínio gel) para a verificação da região de viscoelasticidade linear das soluções formadoras de filme (SFF) (Figura 7).

Para o domínio sol (50 °C), pode-se considerar que a região de viscoelasticidade linear (RVL), onde as propriedades viscoelásticas não variam com a deformação, correspondeu ao domínio estudado, entre 1 e 10% (Figura 7a), o que está de acordo

com Rasid et al. (2018), que afirmaram que os géis de biopolímeros apresentam regiões de viscoelasticidade linear mais altas (normalmente maiores que 1%).

Figura 7: Exemplos de curvas de varredura de deformação das soluções formadoras de filme*: módulo de armazenamento (G') em função da deformação a 50 °C (a) e 5 °C (b).

Fonte: Própria autoria.

* G: Solução de gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina; GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Para as amostras de solução contendo nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (GN, GE e GNE), observou-se que os valores de G' ficaram constantes após 0,1% de deformação, enquanto para as SFF de gelatina pura ou para aquelas soluções contendo natamicina e natamicina em conjunto com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (G, GNA e GNAE), os valores de G' foram constantes apenas depois de 1% de deformação.

Já para o domínio gel (5 °C), observou-se que os valores de G' foram constantes ao longo de toda a faixa de deformação estudada (0,01 – 10%), independente da amostra (Figura 7b), e que os valores de G' no domínio gel foram bem maiores (~ 100 Pa), provavelmente porque no domínio gel a solução já está mais estruturada. De certa forma, a natamicina afetou a capacidade de rearranjo molecular da matriz de gelatina no estado sol, promovendo soluções coloidais com menor G' (Figura 7a), entretanto, ela melhorou a conformação estrutural da gelatina no estado gel, proporcionando sistema com maiores valores de G' (>100 Pa) (Figura 7b).

Resultados similares foram observados por Makishi (2016) e Valência (2017) para SFF a base de gelatina. Além de fornecer dados sobre o intervalo de viscoelasticidade linear, a varredura de deformação também é importante pois serve como parâmetro de diferenciação de géis fracos e fortes, uma vez que géis fortes podem permanecer na região de viscoelasticidade linear em deformações superiores a géis fracos (STEFFE, 1996).

De acordo com Fadavi et al. (2014), o limite final da região de viscoelasticidade linear é caracterizado pela não linearidade dos módulos G' e G'' sob alta deformação, onde se observa uma queda nesses módulos. No entanto, até 10% de deformação, não foi observado o fim da RVL para as amostras estudadas.

Com base nesses resultados, foi escolhido o valor de 4% de deformação para todos os outros ensaios reológicos realizados no estado oscilatório, afim de se garantir que os testes fossem conduzidos dentro da RVL. É importante se trabalhar nesse domínio para se garantir a reversibilidade do sistema.

6.1.2.2 Varredura de temperatura

Os perfis obtidos no ensaio de varredura de temperatura das SFF (Figura 8) mostraram comportamentos similares entre as SFF, com valores superiores de G' para baixas temperaturas, indicando o estado gel, e valores superiores de G'' para temperaturas mais altas, indicando o estado sol. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Makishi (2016) e por Valencia (2017) para soluções a base de gelatina, e trata-se de um comportamento típico de géis físicos que apresentam transições sol-gel (no resfriamento) e gel-sol (no aquecimento), ou seja, são géis reversíveis (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009).

A formação do gel de gelatina, em nível molecular, envolve a reestruturação da proteína, o que implica na passagem de um estado desordenado para um estado de maior ordem, formado por estruturas tripla-hélice resultantes da formação de junções microcristalinas (ACHET; HE, 1995).

As temperaturas de transição entre os estados sol-gel e gel-sol, determinadas como a temperatura do ponto de inflexão das curvas obtidas no resfriamento e aquecimento, respectivamente, estão apresentadas na Tabela 3.

Figura 8: Exemplos de curvas de varredura de temperatura de soluções formadoras de filme*: módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da temperatura.

Fonte: Própria autoria.

* G: Solução de gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina; GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Tabela 3: Temperaturas de transição sol-gel ($T_{\text{sol-gel}}$), gel-sol ($T_{\text{gel-sol}}$) e da histerese (ΔT) de soluções formadoras de filme*.

Amostra	$T_{\text{sol-gel}}$ (°C)	$T_{\text{gel-sol}}$ (°C)	ΔT (°C)
G	14,1 ± 0,2 ^c	25,4 ± 0,4 ^a	11,3 ± 0,4 ^a
GN	15,3 ± 0,6 ^{b,c}	25,5 ± 0,3 ^a	9,8 ± 0,8 ^b
GE	16,3 ± 0,5 ^{a,b}	26,1 ± 0,2 ^a	9,8 ± 0,3 ^b
GNE	17,5 ± 0,4 ^a	25,6 ± 0,1 ^a	8,1 ± 0,6 ^c
GNA	13,4 ± 0,4 ^{c,d}	24,3 ± 0,6 ^a	11,0 ± 0,8 ^{a,b}
GNAE	12,6 ± 0,7 ^d	25,5 ± 0,3 ^a	12,9 ± 1,0 ^a

Fonte: Própria autoria.

* G: Solução de gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina; GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

A SFF de gelatina sem compostos ativos apresentou valores de $T_{\text{sol-gel}}$ e $T_{\text{gel-sol}}$ em torno de 14 e 25 °C, respectivamente. Esses valores foram inferiores àqueles reportados por Valencia (2017), o que poderia ser explicado pela concentração de gelatina estudada (4 e 8 g/100 g de SFF), uma vez que os valores de G' e G'' incrementam com o aumento da concentração do biopolímero, ou seja, com a proximidade das macromoléculas em uma solução mais concentrada.

A adição de nisina não influenciou a $T_{\text{sol-gel}}$ da SFF (GN= 15,3 ± 0,6 °C), mas a adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira provocou aumento ($p < 0,05$) na $T_{\text{sol-gel}}$ da solução (GE= 16,3 ± 0,5 °C). A adição desses compostos conjuntamente implicou em aumento ($p < 0,05$) da $T_{\text{sol-gel}}$ (GNE= 17,5 ± 0,4 °C) em relação à SFF de gelatina pura e em relação à SFF de gelatina com nisina (Tabela 3). Por outro lado, a natamicina adicionada sozinha não alterou significativamente ($p > 0,05$) a $T_{\text{sol-gel}}$ (13,4 ± 0,4 °C) da SFF em comparação com a SFF de gelatina, mas adicionada em conjunto com o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP), a $T_{\text{sol-gel}}$ diminuiu (GNAE=

12,6 ± 0,7 °C). De maneira geral, sugere-se que houve uma interação sinérgica, no caso da nisina com o EHFP, mas antagônica, no caso da natamicina com o EHFP, e a gelatina, capaz de causar alterações em algumas propriedades reológicas da SFF controle.

Quanto à $T_{\text{gel-sol}}$, não foi observada nenhuma variação significativa ($p>0,05$) com a adição de compostos ativos (Tabela 3), ficando em torno de 25 °C. A diferença entre as temperaturas de transição sol-gel e gel-sol, que corresponde à histerese (ΔT), variou significativamente com a adição de nisina e de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira, sendo maior para a SFF contendo natamicina e EHFP ($GNAE = 12,9 \pm 1,0$ °C) e menor para a SFF contendo nisina e EHFP ($GNE = 8,1 \pm 0,6$ °C).

Makishi (2016) estudou as propriedades reológicas de SFF de gelatina adicionadas de extrato de Boldo-do-Chile, utilizando a mesma taxa de aquecimento e de resfriamento desta tese, e observou que não houve influência do extrato na varredura de temperatura da SFF de gelatina, com valores de $T_{\text{sol-gel}}$ em torno de 13 °C, ligeiramente inferiores aos encontrados nessa tese; com valores de $T_{\text{gel-sol}}$ em torno de 28 °C, e valores de histerese e torno de 15 °C, ambos superiores aos encontrados nessa tese.

Considerando-se os resultados dos testes de varredura de temperatura, sobretudo da $T_{\text{sol-gel}}$, decidiu-se por fixar a temperatura de espalhamento das SFF nos suportes em 25 °C.

6.1.2.3 Varredura de frequência

O espectro mecânico, ou os perfis obtidos nos ensaios de varredura de frequência dentro da RVL, fornece informações sobre a estrutura do material (viscoso ou elástico) e a estabilidade desse material em repouso (SILVA-WEISS et al., 2014). Além disso, de acordo com Ferry (1980), a classificação da estrutura da amostra como gel (forte ou fraco), solução concentrada (rede emaranhada) ou solução diluída, também

pode ser inferida pelo espectro mecânico. As amostras estudadas, independentemente da adição de compostos ativos, apresentaram comportamento de gel físico, caracterizado pelos módulos de armazenamento (G') muito maiores do que os módulos de perda (G''), sendo que ambas as propriedades viscoelásticas mostraram pequena dependência com a frequência (Figura 9).

Figura 9: Exemplos de curvas de varredura de frequência (espectro mecânico) das soluções formadoras de filme*: o módulo de armazenamento (G') em preto, e o módulo de perda (G'') em vermelho.

Fonte: Própria autoria

* G: Solução de gelatina; GN: solução de gelatina adicionada de nisina; GE: solução de gelatina adicionada de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: solução de gelatina adicionada de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNA: solução de gelatina adicionada de natamicina; GNAE: solução de gelatina adicionada de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

De uma maneira geral, pode-se observar que a adição de compostos ativos provocou uma ligeira redução nos valores de G' , exceto para a SFF adicionada de nisina (GN), ficando nessa ordem: $GN > G > GE > GNE > GNAE > GNA$, em todo o espectro estudado. Ou seja, a maior redução de G' foi notada para as SFF adicionadas de natamicina (GNA e GNAE). Em relação à G'' , observou-se que os aditivos praticamente

não influenciaram seu comportamento, que variou suavemente com a frequência imposta, diferentemente do observado com G'.

Pintado; Ferreira e Souza (2009) estudaram as propriedades reológicas de soluções a base de proteínas de soro de leite contendo ácidos orgânicos e nisina, e observaram que a incorporação de nisina reduziu os valores dos módulos viscoelásticos, independente do ácido adicionado. Em um outro trabalho, esses mesmos autores estudaram a influência da adição de natamicina no espectro mecânico de soluções a base de proteína de soro de leite e ácido málico, e reportaram que essas soluções tiveram um comportamento predominantemente viscoso, com o módulo de perda maior do que o módulo de armazenamento, sem mudanças nos módulos viscoelásticos com a incorporação da natamicina (PINTADO; FERREIRA; SOUZA, 2010).

Makishi (2016) também reportou um comportamento de gel forte para soluções de gelatina (8%), com o módulo de armazenamento constante no intervalo de frequência de 0,1 à 10 Hz. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no espectro mecânico dessas soluções com a adição de extrato de boldo-do-Chile. Bertolo et al. (2020) estudaram as propriedades reológicas de soluções de quitosana e gelatina adicionadas de extrato de casca de romã, e também não observaram diferença significativa no espectro mecânico das soluções incorporadas com extrato em comparação com as soluções controle.

Por fim, pode-se sugerir que os resultados desses testes evidenciaram a importância dos estudos de sistemas coloidais com testes dinâmicos: segundo os resultados dos testes estacionários, os aditivos não influenciaram a viscosidade, entretanto, eles influenciaram as propriedades viscoelásticas.

6.2 Propriedades dos filmes monocamada com diferentes concentrações de nisina

Esse estudo consistiu em um piloto para ganhar experiência em experimentos envolvendo um agente antimicrobiano, e para ajudar na escolha da concentração de nisina na SFF, para os próximos experimentos.

6.2.1 Aspectos visuais e espessura

Visualmente, os filmes não apresentaram diferença entre si, sendo transparentes, homogêneos e sem presença de bolhas ou irregularidades, para todas as formulações (Figura 10).

Figura 10: Aspectos visuais dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

* Controle: Filme controle de gelatina (G), sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

A espessura dos filmes ficou em torno de $0,084 \pm 0,013$ mm, não se observando diferença significativa com o aumento da concentração de nisina adicionada. Esse resultado está, provavelmente, associado à baixa quantidade de compostos ativos adicionados, que não foi capaz de provocar alterações significativas nesse parâmetro. Adicionalmente, estes resultados permitem sugerir que as concentrações de nisina estudadas não alteraram a densidade dos filmes (VALENCIA, 2017).

Além disso, não se observaram partículas suspensas ou insolúveis nos filmes, independente da concentração de nisina adicionada, contrariamente ao que foi reportado por Imran et al. (2010), para filmes a base de hidroxipropilmetilcelulose adicionados de nisina. Esses autores observaram filmes não homogêneos com a adição do agente antimicrobiano, além de um aumento na espessura dos filmes, atribuído à formação de cristais de NaCl, excipiente do produto Nisaplin®.

6.2.2 Umidade e solubilidade em água

De acordo com Flores et al. (2007), os agentes antimicrobianos incorporados na matriz polimérica podem interferir no empacotamento das cadeias dos biopolímeros através da formação de interações de hidrogênio entre o biopolímero e o agente antimicrobiano, substituindo as interações biopolímero-biopolímero e inibindo as interações de hidrogênio biopolímero-água, o que resultaria em uma variação na higroscopicidade dos filmes, e portanto, na sua umidade de equilíbrio a dada umidade relativa. No entanto, nesta tese, a umidade dos filmes a base de gelatina não sofreu alteração com a adição de nisina, independente da concentração (Tabela 4), sugerindo que essas interações não ocorreram, ou não foram suficientes para impactarem na umidade dos filmes. A umidade dos filmes ficou em torno de 14%, valor típico para filmes a base de proteínas (ALVES et al., 2011).

Esse mesmo comportamento foi observado anteriormente por Basch; Jagus e Flores (2013) para filmes a base de amido de mandioca com incorporação de

hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e dos agentes antimicrobianos: nisina e sorbato de potássio. Esses autores verificaram que a adição dos agentes antimicrobianos não alterou a umidade dos filmes, enquanto a adição de HPMC foi capaz de reduzir significativamente esse parâmetro.

Tabela 4: Umidade e solubilidade dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra:	Umidade (%)	Solubilidade (%)
G	14,5 ± 0,1 ^a	32,5 ± 0,4 ^c
GN28	14,8 ± 0,2 ^a	41,9 ± 2,1 ^b
GN56	14,7 ± 1,2 ^a	44,0 ± 4,9 ^{a,b}
GN84	14,6 ± 0,3 ^a	46,1 ± 1,1 ^a
GN112	14,3 ± 1,0 ^a	46,1 ± 1,6 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

De acordo com Remédio (2017), a umidade de filmes a base de quitosana também não foi alterada com a adição de nisina em nenhuma concentração estudada (0 – 10 mg de nisina/g de quitosana), ficando em torno de 23%. Por outro lado, para filmes a base de amido de milho, a adição de nisina foi capaz de aumentar ligeiramente a umidade dos filmes, de 12 para 15% (MEIRA et al., 2017).

Com relação à solubilidade dos filmes, foram observados valores em torno de 32% para os filmes controle (G), aumentando com o aumento da concentração de nisina adicionada, chegando a 44-46% com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina, ou mais (Tabela 4). Segundo Basch; Jagus e Flores (2013), os agentes antimicrobianos adicionados ao filme podem gerar uma matriz mais susceptível a interagir com a água, o que causa um aumento na solubilidade do sistema. A solubilidade dos filmes é

consequência, principalmente, da hidrofiliidade do plastificante e da perda da integridade estrutural dos filmes, bem como do grau de desnaturação da proteína utilizada (SOUZA; SOBRAL; MENEGALLI, 2012).

Ainda, alguns autores reportaram que a adição de nisina em filmes de amido pode favorecer a formação de redes menos organizadas, aumentando a região amorfa e, conseqüentemente, aumentando a interação com água, causando um aumento nos valores de solubilidade e uma redução na integridade dos filmes em contato com o solvente (FLORES et al., 2010).

Filmes com alta solubilidade tem o potencial de facilitar a liberação de compostos ativos. No entanto, na prática, as aplicações em alimentos requerem filmes com solubilidade reduzida afim de aumentar a integridade do produto (SHEN et al., 2010). Além disso, é interessante que a liberação dos compostos ativos seja de maneira controlada, afim de que uma alta concentração do agente antimicrobiano seja mantida na zona superficial do alimento em contato com o filme (KAEWPRACHU et al., 2018).

6.2.3 Propriedades mecânicas

No desenvolvimento de filmes a base de biopolímeros para uso como embalagens, é esperado que eles tenham resistência adequada, de preferência, similar às embalagens produzidas com material sintético, e que sejam capazes de manter a integridade dos produtos durante seu manuseio e armazenamento (SIVAROOBAN, HETTIARACHCHY, JOHNSON, 2008). Nestes testes, foram avaliadas a tensão na ruptura (TR), como a medida da força máxima antes do filme romper, a elongação na ruptura (E), como a medida da extensibilidade dos filmes antes da ruptura (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997), e o módulo elástico (ME) dos filmes, que está associado à rigidez do material. Adicionalmente, foram determinadas as propriedades mecânicas dos filmes por testes de perfuração, avaliando-se a força na perfuração (FP) e a deformação na perfuração (DP).

Foi observado, pelo teste de tração (Tabela 5), que os filmes controle, ou seja, produzidos sem nisina, apresentaram tensão na ruptura em torno de 14 MPa, e que a incorporação de nisina nos filmes diminuiu ($p < 0,05$) a tensão para ~12 MPa (GN28 e GN56, $p > 0,05$) e ~5 MPa (GN84 e GN112, $p > 0,05$). Por outro lado, de modo geral, a nisina foi capaz de aumentar a elongação na ruptura dos filmes de 46% (G) para 59% (GN56), indicando que a nisina apresentou um leve efeito plastificante nos filmes de gelatina, o que está de acordo com os resultados de solubilidade em água (Tabela 4). O módulo elástico dos filmes também diminuiu com o aumento da concentração de nisina adicionada, de 4,9 MPa/% (G) para 0,8-2 MPa/% (GN56, GN84, GN112).

Tabela 5: Parâmetros do teste de tração dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra	TR (MPa)	ER (%)	ME (MPa/%)
G	14,3 ± 1,8 ^a	45,8 ± 1,8 ^b	4,9 ± 0,8 ^a
GN28	12,3 ± 1,7 ^a	47,9 ± 5,4 ^{a,b}	4,7 ± 0,8 ^a
GN56	11,6 ± 1,3 ^a	59,1 ± 6,4 ^a	2,0 ± 0,3 ^b
GN84	4,8 ± 2,3 ^b	57,0 ± 3,9 ^{a,b}	0,8 ± 0,1 ^b
GN112	4,9 ± 0,4 ^b	56,2 ± 4,4 ^{a,b}	0,9 ± 0,1 ^b

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Uma outra explicação para o aumento na elongação dos filmes com incorporação do agente ativo é a presença do cloreto de sódio (NaCl), que é um dos excipientes da nisina. De acordo com Nayebyzadeh et al. (2006), o NaCl reduz a repulsão eletrostática entre as moléculas e causa uma microestrutura menos densa na matriz do filme, resultando em uma resposta mecânica mais dúctil.

O módulo elástico dos filmes também diminuiu com o aumento da concentração de nisina adicionada, o que também poderia ser explicado pela presença do cloreto de sódio (MODITSI et al., 2014). De acordo com Meira et al. (2017), a afinidade desse tipo de composto pelo glicerol, usado como plastificante, e pela água, é alto, induzindo a valores menores de ME.

Os resultados encontrados nesse trabalho estão de acordo com os resultados reportados por Ollé Resa; Jagus e Gerschenson (2014), que estudaram a influência da nisina em filmes a base de tapioca. Esses resultados foram similares, ainda, com os resultados encontrados para filmes a base de amido de milho adicionados de nisina (MEIRA et al., 2017).

Os resultados do teste de perfuração estão apresentados na Tabela 6. De maneira geral, esses resultados foram similares ao observado nos testes de tração, embora mais sutis. De fato, não foi possível se observar um efeito mais nítido devido aos elevados valores do desvio padrão para algumas médias. Mas, foi possível se observar que a força na perfuração diminuiu de ~16 N (G) para 9,1 N nos filmes com maior concentração de nisina (GN112). Adicionalmente, foi possível observar que houve um ligeiro aumento da deformação na perfuração, de cerca de 3,4% (G, GN28) para ~5,3%, para concentrações acima de 56 mg de nisina/g de gelatina, o que está de acordo com o comportamento obtido previamente no teste de tração.

Pintado, Ferreira e Sousa (2010) não encontraram diferença significativa nas propriedades mecânicas em testes de perfuração para filmes a base de isolado proteico de soro adicionados de nisina. Porém, ligeira diminuição na força na perfuração já foi previamente reportada por Sivarooban; Hettiarachchy e Johnson (2008), que estudaram a incorporação de nisina em filmes a base de proteína isolada de soja. Esses autores sugeriram que a nisina pode ter enfraquecido as interações fortes entre as moléculas de proteína.

Tabela 6: Parâmetros do teste de perfuração dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra	FP (N)	DP (%)
G	16,4 ± 1,8 ^a	3,1 ± 0,3 ^b
GN28	14,9 ± 4,7 ^{a,b}	3,6 ± 0,1 ^b
GN56	16,4 ± 1,3 ^a	5,1 ± 0,2 ^a
GN84	11,1 ± 2,2 ^{a,b}	5,1 ± 0,3 ^a
GN112	9,1 ± 1,1 ^b	5,8 ± 0,4 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Para filmes a base de amido de castanha d'água com quitosana adicionados de nisina, Mei et al (2013) observaram que a nisina foi capaz de interagir com a quitosana, formando interações de hidrogênio e aumentando o número de ligações cruzadas intermoleculares, estabilizando a estrutura do filme e melhorando suas propriedades mecânicas.

6.2.4 Microestrutura

Não se observaram alterações na microestrutura da superfície dos filmes para as concentrações de nisina estudadas (Figura 11).

De maneira geral, todos os filmes apresentaram uma superfície homogênea e sem presença de poros (Figura 11), indicando que a adição de nisina, independente da concentração, não provocou a formação de uma matriz heterogênea no filme de gelatina. Também não foram observadas irregularidades na superfície dos filmes causadas pelo excipiente da nisina, mesmo do NaCl, que está presente em maior

quantidade. Assim, pode-se sugerir que a dispersão do agente ativo ocorreu de maneira satisfatória durante a preparação do filme.

Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) representativas dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

Diferentemente dos resultados obtidos nessa tese, Meira et al. (2017) estudaram a adição de nisina em filmes de amido e reportaram que a incorporação do agente antimicrobiano causou uma certa irregularidade notável na superfície dos filmes, inclusive com algumas partículas visíveis, o que foi associado aos excipientes da formulação comercial da nisina (lactose e NaCl), que estão presentes em altas concentrações e que podem causar defeitos e irregularidades na superfície dos filmes.

Adicionalmente, os filmes também foram analisados por microscopia de força atômica (AFM) para verificação da influência da adição de nisina na rugosidade da superfície dos filmes. Observou-se, nas micrografias 3D de superfície obtidas pela microscopia de força atômica (Figura 12), que os filmes adicionados de nisina em diferentes concentrações apresentaram algumas diferenças quando comparados ao filme controle (G). A superfície do filme sem nisina (G) apresentou estruturas finas, em escala nanométrica, em relativa alta densidade, isto é, distribuída homogeneamente em toda a superfície. No caso dos filmes com a nisina (GN28-112), observaram-se estruturas mais espessas, de dimensões maiores, e também distribuídas em toda as superfícies. Alguns picos maiores puderam ser observados, podendo serem associados ao excipiente da nisina (NaCl).

Figura 12: Imagens 3D representativas das micrografias de superfície dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina obtidos por AFM.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

Consequentemente, a rugosidade média desses filmes aumentou ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de nisina adicionada (Tabela 7), o que também pode estar relacionado ao NaCl presente no Nisaplin®: ~15 (GN28, GN56, $p > 0,05$) e ~34 nm (GN84 e GN112, $p > 0,05$). Para o filme controle foi observada uma baixa rugosidade, em torno de 3 nm, comparável aos valores reportados por Flaker et al. (2015), para filmes a base de gelatina.

Tabela 7: Valores de rugosidade média (R_m) dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra:	R_m (nm)
G	$3,4 \pm 1,1^c$
GN28	$15,5 \pm 2,0^b$
GN56	$14,9 \pm 1,2^b$
GN84	$33,6 \pm 4,0^a$
GN112	$34,5 \pm 3,4^a$

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

La Stora et al. (2008) também reportaram um aumento na irregularidade da superfície dos filmes de polietileno com a adição de nisina, aumentando, assim, sua rugosidade. Da mesma maneira, Ollé Resa; Jagus e Gerschenson (2014) observaram que a nisina teve uma grande influência no aumento da rugosidade da superfície dos filmes de amido. Meira et al. (2017) estudaram a adição de nisina em filmes de amido e também reportaram que a incorporação do agente antimicrobiano deixou os filmes mais rugosos e com superfícies irregulares.

6.2.5 Cor, opacidade e brilho

A cor dos filmes usados como embalagem é essencial, uma vez que influencia na aceitabilidade do produto (LIU et al., 2017). Os resultados de cor e opacidade dos filmes podem ser observados na Tabela 8. De modo geral, os filmes a base de gelatina apresentaram propriedades ópticas ideais para aplicação em sistemas alimentícios, e a adição de nisina, não influenciou a coloração dos filmes, em termos práticos, apesar de se observar algumas diferenças significativas entre os valores médios de alguns parâmetros de cor. Afinal, a nisina não é conhecida como sendo um pigmento, nem promotor de cor em alimentos.

Tabela 8: Parâmetros de cor e opacidade dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina**.

Amostra	L*	a*	b*	ΔE^*	Opacidade (%)
G	90,3 $\pm$ 0,1 ^a	-0,88 $\pm$ 0,01 ^b	2,1 $\pm$ 0,1 ^c	4,5 $\pm$ 0,1 ^b	0,80 $\pm$ 0,17 ^a
GN28	90,2 $\pm$ 0,3 ^a	-0,85 $\pm$ 0,01 ^{a,b}	2,3 $\pm$ 0,1 ^{b,c}	4,7 $\pm$ 0,1 ^b	0,80 $\pm$ 0,10 ^a
GN56	90,2 $\pm$ 0,1 ^a	-0,81 $\pm$ 0,02 ^{a,b}	2,5 $\pm$ 0,1 ^b	4,6 $\pm$ 0,1 ^b	0,87 $\pm$ 0,23 ^a
GN84	90,3 $\pm$ 0,1 ^a	-0,82 $\pm$ 0,04 ^{a,b}	2,4 $\pm$ 0,1 ^b	4,6 $\pm$ 0,1 ^b	0,90 $\pm$ 0,09 ^a
GN112	89,6 $\pm$ 0,8 ^a	-0,74 $\pm$ 0,01 ^a	2,9 $\pm$ 0,1 ^a	5,3 $\pm$ 0,1 ^a	0,93 $\pm$ 0,06 ^a

Fonte: Própria autoria

** G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Assim, pode-se considerar que todos os filmes estudados apresentaram valores de L* (luminosidade) em torno de 90, o que indica um filme de coloração bastante clara, sendo este valor superior aos valores de luminosidade reportados para o polietileno de alta densidade (PEAD), material vastamente utilizado em embalagens, cuja

luminosidade está em torno de 75 (NORA, 2016). Esse comportamento foi similar aos resultados reportados por Kaewprachu et al. (2018), com valores em torno de 90,6 para filmes de gelatina e 89,2 para filmes de gelatina adicionados de nisina, e aos resultados reportados por Meira et al. (2017), para filmes a base de amido, adicionados de nisina.

Por outro lado, os valores dos parâmetros de cor a^* e b^* variaram entre -0,88 e -0,74 e entre 2,1 e 2,6, respectivamente, o que é muito pouco para provocar mudança visual na cor, ou seja, do ponto de vista prático, essas diferenças são irrelevantes e não são percebidas a olho nu. Valores ligeiramente menores de a^* foram encontrados por Kaewprachu et al. (2018), para filmes de gelatina adicionados de nisina ($\sim -1,3$), e com relação ao parâmetro b^* , esses autores encontraram valores similares aos desse trabalho ($\sim 2,3$). Meira et al. (2017) também reportaram um aumento no parâmetro b^* na cor dos filmes de amido causado pela incorporação de nisina, no entanto, esses autores não observaram variação no parâmetro de cor a^* . Nora (2016) reportou valores menores para o parâmetro a^* ($\sim -1,15$) e para o parâmetro b^* ($\sim -2,6$) para o PEAD.

Como consequência desses parâmetros, a diferença total de cor (ΔE^*), que está associado à coloração do filme, variou também, muito sutilmente, entre 4,5 e 5,3, possibilitando se sugerir que os filmes foram poucos coloridos, típicos de filmes a base de gelatina. Filmes coloridos apresentam maiores valores de ΔE^* , como no caso de filmes de gelatina contendo 10 g de licopeno/100 g de gelatina, cujo $\Delta E^* = 38$ (JANUÁRIO et al., 2009).

Além da cor, a transparência (oposto à opacidade) dos filmes também é uma propriedade de grande relevância, tendo relação direta com a aparência do produto embalado. De maneira geral, os valores de opacidade dos filmes monocamada foram baixos ($\sim 0,86$), ou seja, esses filmes foram extremamente transparentes (opacidade $\rightarrow 0$), típico de filmes de gelatina (OLIVEIRA, 2017), sem influência da adição de nisina. Meira et al. (2017) determinaram valores em torno de 1,8 para a opacidade de filmes de

amido, também considerados baixos, e, corroborando com esta tese, não observaram variação nesse parâmetro com a adição de nisina.

Adicionalmente, os filmes foram analisados para determinação do brilho superficial em função da concentração de nisina adicionada (Tabela 9). O brilho, refletância especular, é uma função do índice de refração da superfície, do ângulo de incidência do feixe de luz e da natureza da luz refletida (TREZZA; KROCHTA, 2001). De fato, ele depende do grau de polimento da superfície, ou seja, uma eventual alteração do brilho pode ser promovida por irregularidades na superfície refletora que afetam a distribuição do fluxo refletido em torno do ângulo especular. Assim, a diminuição do brilho pode ser consequência de uma irregularidade e heterogeneidade da superfície (HONG; LEE; SON, 2005).

Tabela 9: Parâmetros de brilho da superfície de secagem dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra	Brilho 20°	Brilho 60°
G	105,2 ± 20,4 ^{a,b}	147,0 ± 11,4 ^a
GN28	85,3 ± 17,8 ^{a,b}	133,1 ± 12,2 ^{a,b}
GN56	128,4 ± 13,2 ^a	132,4 ± 5,2 ^{a,c}
GN84	130,6 ± 32,3 ^a	115,3 ± 3,6 ^{b,c}
GN112	66,8 ± 24,7 ^b	108,7 ± 9,1 ^c

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

De maneira geral, todas as formulações testadas podem ser consideradas como brilhantes, de acordo com Trezza e Krochta (2001), uma vez que os valores de brilho desses filmes, embora tenham variado com a concentração de nisina adicionada, foram

sempre superiores a 70, exceto no caso dos filmes contendo 112 mg de nisina/g de gelatina, para a medida a 20° (Tabela 9).

Como explicado anteriormente, a redução dos valores do brilho dos filmes com o aumento da concentração da nisina, determinados à 60° (Tabela 9), pode ser associado ao aumento na rugosidade dos respectivos filmes (Tabela 7), como pode ser observado na Figura 13: o brilho diminuiu linearmente ($R^2 = 0,98$) com a rugosidade das superfícies dos filmes. Comportamento similar foi observado por Valencia (2017), para filmes a base de gelatina adicionados de laponita, também capaz de alterar a rugosidade dos filmes.

Figura 13: Relação entre a rugosidade e o brilho dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina, determinados a 60°.

Fonte: Própria autoria.

6.2.6 Propriedades de barreira à luz (UV/Vis)

As substâncias que apresentam grupamentos insaturados intercalados e que possibilitam a transição de elétrons orbitais não ligantes (n) ou ligantes para orbitais antiligantes são denominadas de cromóforas (SKOOG, HOLLER, CROUCH, 2007). Essas substâncias são capazes de absorver a radiação eletromagnética no

comprimento de onda do UV/Vis (de 200 até 700 nm) conferindo, assim, uma barreira à luz. A propriedade de barreira à luz UV/Vis foi testada para os filmes de gelatina, com ou sem nisina (Figura 14).

Figura 14: Propriedades de barreira UV/Vis dos filmes a base de gelatina com adição de diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

De uma maneira geral, observou-se que tanto o filme controle, contendo somente gelatina e glicerol, quanto os filmes ativos, contendo diferentes concentrações de nisina, apresentaram-se com completa barreira à luz ultravioleta, até 250 nm (Figura 14), sendo que, entre 250 e 300 nm, observou-se um nítido efeito da nisina, provocando redução da transmitância à luz UV em função do aumento da sua concentração: GN112 < GN84 < GN56 < GN28 < G. De toda maneira, pode-se considerar que todos os filmes apresentaram alta barreira ($T < 30\%$) à luz UV. Entretanto, na região da luz visível ($>$

300 nm), todos os filmes apresentaram fraca barreira à luz ($T = 80-90\%$) (Figura 14). A alta barreira UV desses filmes é devido à presença de anéis aromáticos de resíduos de aminoácidos da molécula de gelatina (BONILLA; SOBRAL, 2016), mas a nisina contribuiu, entre 250 e 300 nm, muito possivelmente devido a algum resíduo de seus aminoácidos.

Kaewprachu et al. (2018) determinaram resultados semelhantes para filmes a base de gelatina adicionados de nisina e catequina. Esses autores reportaram que os filmes apresentaram uma menor transmissão de luz na faixa do UV do que na faixa do visível, e que a adição de nisina nos filmes não teve grande influência na barreira à luz, ao contrário da catequina, que reduziu significativamente os valores de transmitância. Por outro lado, Imran et al. (2010), trabalhando com filmes a base de HPMC, observaram uma diminuição da transmitância dos filmes com a adição de nisina, indicando um aumento nas propriedades de barreira à luz UV/Vis com relação ao controle (somente com HPMC e glicerol).

6.2.7 Permeabilidade ao vapor de água

Uma das propriedades de maior importância em filmes para embalagens é a permeabilidade ao vapor de água (PVA), sobretudo devido à importância da água nas reações de deterioração, bem como na alteração de textura dos alimentos. Em um material sem defeitos estruturais, o mecanismo de passagem de vapor de água pode ser governado por dois parâmetros: a difusão através desse filme, tendo como força motriz o gradiente de umidade nas superfícies do material, e a solubilidade do solvente no material, que está relacionada com a afinidade entre ambos (SIRACUSA, 2012). Assim, de acordo com Quintavalla e Vicini (2002), filmes a base de proteínas apresentam valores mais altos de PVA devido ao seu caráter hidrofílico, assim como ao plastificante, que é adicionado nesses filmes.

Observou-se que os valores da permeabilidade ao vapor de água (Tabela 10) sofreram um ligeiro aumento ($p < 0,05$) com a adição de nisina, de 0,28 (G) para $\sim 0,37$ g.mm/m².h.kPa para todos os filmes com a nisina, não sendo observado diferença significativa ($p > 0,05$) entre esses. Esses resultados podem estar relacionados com o efeito plastificante da nisina, e corroboram com os resultados obtidos para solubilidade em água dos filmes. Em termos práticos, esses filmes se apresentaram como tendo fraca barreira ao vapor de água, ou seja, com alta permeabilidade ao vapor de água, quando comparados aos materiais sintéticos de embalagem, como o PEAD, cuja permeabilidade ao vapor de água está em torno de 0,006 g.mm/m².h.kPa (CRUZ, 2013), sendo isso também, uma característica de filmes a base de gelatina e plastificados com glicerol (BONILLA et al., 2018).

Tabela 10: Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra:	PVA (g.mm/m².h.kPa)
G	0,28 $\pm$ 0,02 ^b
GN28	0,36 $\pm$ 0,03 ^a
GN56	0,35 $\pm$ 0,01 ^a
GN84	0,36 $\pm$ 0,02 ^a
GN112	0,39 $\pm$ 0,01 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Resultados similares foram reportados por Ko et al. (2001), para filmes a base de glúten de trigo adicionados de nisina. De acordo com esses autores, seria esperado que a nisina fosse capaz de aumentar a barreira ao vapor de água dos filmes por causa

de interações hidrofóbicas com as proteínas constituintes do filme, sendo a própria nisina um peptídeo hidrofóbico. Contudo, as quantidades de nisina adicionadas nos filmes (0,27- 10,67 UI/ mL de solução formadora de filme) não tiveram efeito significativo na PVA.

Esse mesmo comportamento também foi reportado previamente por Grower; Cooksey e Getty (2004) para filmes a base de celulose e diferentes concentrações de nisina, e corroboram com os resultados reportados por Bastarrachea et al. (2010), que não verificaram diferença significativa na permeabilidade ao vapor de água dos filmes a base de poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) com adição de nisina, cujos valores ficaram em torno de 0,13 g.mm/m².h.kPa, muito inferiores aos valores encontrados nesse trabalho.

Por outro lado, Basch; Jagus e Flores (2013) observaram um aumento significativo na permeabilidade ao vapor de água de filmes a base de amido de mandioca com adição de nisina. Esse aumento foi atribuído a uma ruptura da matriz do polissacarídeo produzida pela nisina.

6.2.8 Propriedades térmicas

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) permite a determinação das propriedades térmicas de materiais, notadamente, a temperatura de transição vítrea e a temperatura e entalpia de fusão da fração cristalina dos materiais. A transição vítrea de um polímero está diretamente relacionada com um relaxamento primário, que é resultado de movimentos moleculares segmentados das cadeias poliméricas. A temperatura onde ocorre essa transição influencia não somente as propriedades dos materiais, mas também suas aplicações (TONGNUANCHAN et al., 2016). E, as propriedades relacionadas à fusão dos cristais são importantes sobretudo para o estabelecimento de condições de processamento do material.

As curvas de fluxo de calor da primeira varredura do DSC (Figura 15) foram típicos de materiais parcialmente cristalinos (SOBRAL et al., 2011). Nessas curvas, observaram-se duas transições vítreas, a primeira oscilando entre (T_{G1}) -72 e -77 °C, associada à fase rica em glicerol (SOBRAL et al., 2001), e a outra (T_{G2}), em torno de 45 °C, associada à fase rica em biopolímeros (Tabela 11). Esse comportamento já foi reportado anteriormente e é atribuído à uma separação de fases, uma rica no biopolímero e outra rica no glicerol (VALENCIA, 2017; MAKISHI, 2016).

Figura 15: Exemplos de termogramas para filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

Ainda, na primeira varredura, as amostras apresentaram um pico endotérmico, correspondente à fusão dos cristais da gelatina (T_M). Esse pico endotérmico não foi observado na segunda varredura porque, após a primeira varredura, as amostras foram resfriadas com nitrogênio líquido, ou seja, muito rapidamente, o que não permitiu a formação das junções cristalinas (Figura 15).

Tabela 11: Propriedades térmicas determinadas nas análises térmicas dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.

	Amostra	T_{G1} (°C)	T_{G2} (°C)	T_M (°C)	ΔH_M (J/g)
Varredura 1	G	$-76,7 \pm 2,8^a$	$46,4 \pm 1,1^a$	$71,9 \pm 2,3^a$	$24,8 \pm 1,0^a$
	GN 28	$-75,7 \pm 1,2^a$	$42,9 \pm 2,2^a$	$63,9 \pm 4,6^b$	$20,8 \pm 2,2^b$
	GN 56	$-72,7 \pm 1,1^b$	$44,8 \pm 1,3^a$	$65,3 \pm 1,8^b$	$17,7 \pm 1,3^{b,c}$
	GN 84	$-71,7 \pm 1,5^b$	$45,9 \pm 1,4^a$	$54,2 \pm 0,9^c$	$17,7 \pm 0,3^c$
	GN 112	$-72,2 \pm 1,4^b$	$46,3 \pm 0,5^a$	$51,5 \pm 0,1^c$	$15,4 \pm 1,3^d$
	Amostra	T_{G1} (°C)	T_{G2} (°C)		
Varredura 2	G	$-74,8 \pm 1,9^a$	$35,7 \pm 2,9^a$		
	GN 28	$-75,1 \pm 1,3^a$	$36,0 \pm 1,1^a$		
	GN 56	$-73,8 \pm 4,7^a$	$24,5 \pm 2,5^b$		
	GN 84	$-71,6 \pm 0,5^a$	$28,8 \pm 0,3^{a,b}$		
	GN 112	$-71,5 \pm 2,2^a$	$24,2 \pm 0,2^b$		

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

T_G : Temperatura de transição vítrea; T_M : Temperatura de fusão dos cristais; ΔH_M : Entalpia de fusão dos cristais.

Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

As curvas de fluxo de calor da segunda varredura, por sua vez, foram típicos de materiais completamente amorfos, observando-se apenas as transições vítreas: $T_{G1} \sim$ -

73 °C e $T_{G2} \sim 30$ °C, nesse caso, menor que a determinada na primeira varredura (~ 45 °C), devido à ausência das junções microcristalinas, que normalmente limitam a mobilidade molecular do biopolímero. Esse comportamento não foi observado na fração rica em glicerol porque ela já era completamente amorfa na primeira varredura, ou seja, não houve perda de cristalinidade entre as duas varreduras.

O maior efeito da nisina foi na fusão dos cristais, onde se observou que a temperatura (T_M) foi influenciada pela concentração de nisina, diminuindo de cerca de 71 para cerca de 52 °C (Tabela 11). Comportamento similar foi observado com a entalpia de fusão, que diminuiu de cerca de 25 para cerca de 15 J/g, com o aumento da concentração de nisina. De alguma maneira, a nisina interagiu com as cadeias polipeptídicas da gelatina, diminuindo o grau de liberdade para a formação das junções cristalinas.

Resultados similares foram reportados por Soares (2009), para filmes a base de blendas de galactomanana e amido, incorporados de nisina. A presença do antimicrobiano reduziu ligeiramente os valores de T_G e T_M , indicando que houve interação da nisina com os polímeros da blenda. Wojciechowska et al. (2018) também observaram uma redução nos valores de T_G dos filmes de gelatina com a adição de nisina, sugerindo mudanças estruturais na proteína, induzidas pela formação de novas ligações covalentes. De acordo com esses autores, essa redução na temperatura de transição vítrea também pode ser interpretada como um efeito plastificante causado pela nisina, que provocou um aumento no volume livre, o que está de acordo com as propriedades mecânicas desses filmes (Tabela 5).

6.2.9 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram bastante similares entre si, porém observou-se o aparecimento de alguns novos picos com a adição de nisina, principalmente em concentrações mais altas (Figura 16). O filme controle (G), preparado apenas com

gelatina e glicerol, apresentou dois picos característicos, sendo o primeiro deles em $2\theta = 7^\circ$, normalmente atribuído à estrutura cristalina da tripla hélice da gelatina (YAKIMETS et al., 2007), e o segundo pico em torno de $2\theta = 20^\circ$, característico da fase amorfa dos materiais parcialmente cristalinos (PEREDA et al., 2011). De maneira geral, para os filmes incorporados de nisina, foi possível observar uma diminuição na intensidade dos picos com o a adição da bacteriocina, independente da concentração incorporada. Essa diminuição na intensidade indica que houve uma diminuição na cristalinidade dos filmes, o que corrobora com a redução da entalpia de fusão (Tabela 11). De acordo com Chivrac et al. (2006), esse comportamento indica o quanto uma substância incorporada a um sistema é capaz de impedir a formação de cristais e, conseqüentemente, alterar a cristalinidade final do material.

Figura 16: Exemplos de espectros obtidos por difração de raios X dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

Foi possível observar, ainda, que para concentrações mais baixas de nisina (GN28 e GN56), não houve alteração dos picos característicos do filme de gelatina, podendo ser notados em $2\theta = 7^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$; no entanto, para as amostras com maior concentração de nisina (GN84 e GN112), foi observada uma diminuição no pico correspondente à estrutura de tripla hélice da gelatina ($2\theta = 7^\circ$). Para os filmes adicionados de nisina foram observados ainda dois picos novos, o primeiro mais discreto em torno de $2\theta = 10^\circ$, associado à lactose, uma vez que sólidos do leite podem estar presentes como excipiente no Nisaplin®, e o segundo pico que aparece somente nas amostras com concentração mais alta de nisina (GN84 e GN112) em torno de $2\theta = 31^\circ$, que segundo Thomas (2010), é característico do NaCl, outro excipiente do Nisaplin®.

Resultados similares foram observados por Bastarrachea et al. (2010) e por Zehetmeyer et al. (2016) para filmes a base de PBAT incorporados de diferentes concentrações de nisina. Esses autores encontraram também uma diminuição na intensidade dos picos com a adição de nisina e, assim como nessa tese, a nisina, adicionada em baixas concentrações, também não foi capaz de alterar os picos característicos do biopolímero.

6.2.10 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos filmes a base de gelatina, adicionados ou não, de compostos ativos (Figura 17) foram muito similares, com bandas em torno de 3300 e 3090 cm^{-1} , características do grupo Amida I; em 1635 cm^{-1} , característica da estrutura tripla-hélice, que faz parte da estrutura novelo da gelatina; e em 1540 e 1210 cm^{-1} , que são típicas do grupo Amida II (MORAES et al., 2008).

Foi possível notar que os espectros não foram alterados com a adição de nisina, independente da concentração utilizada, não havendo mudanças estruturais significativas, o que permite sugerir que não foi possível observar a formação de novas ligações químicas. Como a nisina também tem natureza peptídica, suas bandas de absorção são coincidentes com as bandas encontradas na matriz de proteína dos filmes (BOELTER; BRANDELLI, 2016).

Figura 17: Espectros de absorção de infravermelho dos filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

Comportamento similar foi observado por Zehetmeyer et al. (2016), que não encontraram mudanças significativas na estrutura molecular do PBAT com a incorporação de nisina, não havendo mudanças nos picos de intensidade mesmo para as amostras com maior concentração de nisina. Pranoto; Rakshit e Saloke (2005), para filmes de quitosana adicionados de nisina, verificaram um aumento na banda referente a Amida I (em torno de 1640 cm^{-1}) com o aumento da concentração de nisina incorporada, o que pode estar associada a uma possível interação entre os grupos funcionais da nisina e o grupo amina presente na quitosana, com formação de ligações covalentes que ampliaram a intensidade da banda.

Essas bandas e picos característicos da nisina pura podem não ser tão evidentes nos filmes adicionados de nisina por causa das bandas típicas da proteína utilizada (gelatina), que pode englobar os picos da nisina (BOELTER; BRANDELLI, 2016), uma vez que sua estrutura química é muito parecida.

6.2.11 Ângulo de contato da gota de água

Uma propriedade de grande importância, sobretudo para soluções de recobrimento de alimentos, é a hidrofobicidade superficial dos materiais biopoliméricos, relacionada com a molhabilidade. A molhabilidade pode ser definida como a tendência do líquido se espalhar na superfície sólida, e pode ser caracterizada pelo grau de molhagem, que indica até que ponto o líquido umedece a superfície, e a taxa de molhagem, que indica o quão rápido o líquido se espalha na superfície. O principal parâmetro usado para caracterizar a molhabilidade de uma superfície é o ângulo de contato no equilíbrio (θ), sendo que quando $\theta = 0$, tem-se molhabilidade total, e a superfície é hidrofílica; quando $0 < \theta < 90^\circ$, tem-se molhabilidade parcial; e quando $\theta > 90^\circ$ não há molhabilidade e a superfície é considerada como hidrofóbica (ANDRADE et al., 2014). Os resultados de ângulo de contato obtidos com um tensiômetro podem ser

observados na Tabela 12. Observou-se uma diminuição nos valores de ângulo de contato com a adição de nisina (lado ar), indicando um ligeiro aumento na hidrofilicidade dos filmes, o que está de acordo com os resultados encontrados para a solubilidade em água (Tabela 4).

Tabela 12: Ângulo de contato da superfície dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra:	Ângulo de contato (°)	Ângulo de contato (°)
	Placa	Ar
G	85,5 ± 1,2 ^a	86,8 ± 0,8 ^a
GN28	78,4 ± 0,9 ^b	76,2 ± 1,0 ^b
GN56	74,2 ± 1,1 ^c	71,4 ± 0,2 ^c
GN84	71,1 ± 0,6 ^d	70,2 ± 1,7 ^c
GN112	69,8 ± 1,2 ^d	69,7 ± 1,0 ^c

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Além de eventuais explicações químicas ou físico-químicas, sabe-se que o ângulo de contato também pode ser associado à rugosidade da superfície. E, considerando-se que a adição de nisina ocasionou um ligeiro aumento na rugosidade dos filmes (Tabela 7), isso pode ser correlacionado também com o ângulo de contato. Pode-se observar na Figura 18, que o ângulo de contato, determinado na superfície do filme diminuiu linearmente ($R^2 = 0,85$) com o aumento da rugosidade da superfície do filme, como observado por Bico; Thiele e Quéré (2008), e Good; Chaudhury e Yeung (1998).

No sentido contrário ao observado nesta tese, Ollé Resa; Jagus e Gerschenson (2014), trabalhando com filmes a base de amido de tapioca e nisina, observaram uma redução na molhabilidade dos filmes, com consequente aumento no ângulo de contato,

indicando que houve aumento na hidrofobicidade dos filmes e uma diminuição na tendência à sorção de água.

Figura 18 Efeito da rugosidade no ângulo de contato na superfície da segunda camada dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

6.2.12 Atividade antimicrobiana por teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados com cepas das bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e exemplos de resultados dessas análises do teste de sensibilidade (halos de inibição) estão apresentados na Figura 19. Os filmes produzidos apenas com gelatina (G) não formaram zona de inibição, não apresentando efeito antibacteriano, o que já era esperado, uma vez que a gelatina não apresenta propriedades antimicrobianas. Esses resultados estão de acordo com os resultados reportados previamente por Méndez (2017). Foi observado, ainda, que não houve formação de halo para os filmes com concentração mais baixa de nisina (GN 28), indicando que nessa concentração, a nisina não foi suficiente para apresentar atividade contra as cepas estudadas.

Figura 19. Exemplos de placas do teste de difusão de discos para cepas de: a) *S. aureus* e b) *L. monocytogenes*, para filmes a base de gelatina adicionados de diferentes concentrações de nisina*.

Fonte: Própria autoria.

* C +: Controle positivo (Cloranfenicol); C -: Controle negativo (papel filtro com álcool etílico absoluto); G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina.

Para as outras concentrações de nisina estudadas (>28 mg de nisina/g de gelatina), observou-se que foi formado um halo de inibição e que este aumentou ligeiramente em função do aumento da concentração do peptídeo, o que também está de acordo com resultados reportados previamente na literatura. No entanto, para ambas as bactérias testadas, esse aumento deixou de ser significativo para valores acima de 56 mg de nisina/g de gelatina, indicando que essa concentração já é suficiente para garantir a inibição das bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes*. O halo observado para os filmes adicionados de nisina foi bem discreto, apenas um pouco maior do que o diâmetro do disco de filme (Tabela 13).

Tabela 13: Halo de inibição para os filmes a base de gelatina com diferentes concentrações de nisina*.

Amostra:	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
G	*	*
GN28	6,0 ± 0,0 ^b	*
GN56	7,1 ± 0,5 ^a	6,7 ± 0,4 ^a
GN84	7,2 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,2 ^a
GN112	7,2 ± 0,3 ^a	7,2 ± 0,1 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN28: Filme de gelatina com adição de 28 mg de nisina/g de gelatina; GN56: Filme de gelatina com adição de 56 mg de nisina/g de gelatina; GN84: Filme de gelatina com adição de 84 mg de nisina/g de gelatina; GN112: Filme de gelatina com adição de 112 mg de nisina/g de gelatina. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). O símbolo * indica a ausência de halo de inibição.

De acordo com Purwar; Verma e Batra (2019), esse halo de inibição é criado apenas quando o agente antibacteriano é difundido no ágar para fora do filme, o que parece não ter acontecido com a nisina, explicando os halos de inibição pequenos. A atividade antimicrobiana de filmes contendo nisina pode ser explicada pela formação de

poros na membrana celular das bactérias, que alteram a sua permeabilidade causando o extravasamento do material celular, com consequente morte da bactéria (CLEVELAND et al., 2001).

Resultados similares foram reportados por Marvdashti et al. (2019), para filmes a base de poli(vinil álcool) com adição de nisina e goma da semente de *Alyssum homolocarpum*. Esses autores reportaram um aumento no halo de inibição dos filmes contra cepas de *L. innocua* com o aumento da nisina incorporada nos filmes, com valores de halo variando entre 7,7 e 13,3 mm. Cao et al. (2010) também determinaram valores similares de diâmetro de halo para filmes a base de caseinato de sódio adicionados de nisina, demonstrando que esse composto tem efetividade como agente antimicrobiano quando incorporado em filmes compósitos.

Kaewprachu et al. (2018) reportaram valores de halo variando de 12,3 a 13 mm para filmes a base de gelatina incorporados de nisina e catequina contra cepas de *S. aureus*, no entanto, nesse estudo os discos eram maiores, com diâmetro de 12 mm, o que indica que proporcionalmente a inibição das bactérias encontrada nesse tese foi semelhante à reportada nesse trabalho.

Da mesma forma, Zimet et al. (2019) reportaram halos de inibição variando entre 15 e 17 mm para filmes a base de quitosana, carboximetilcelulose e nisina contra cepas de *L. monocytogenes*. Os discos de filme usados nesse estudo também eram maiores do que aqueles utilizados na presente tese (em torno de 12 mm), no entanto esse halo ligeiramente superior também pode estar levando em conta uma contribuição da quitosana, que pode apresentar efeito antimicrobiano.

6.3 Características dos filmes produzidos em dupla camada, adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou nisina

Afim de facilitar o entendimento dessa seção, os filmes foram denominados de G: filme dupla camada de gelatina sem incorporação de compostos ativos; GN: filme dupla camada de gelatina com adição de nisina na segunda camada; GE: filme dupla camada de gelatina com adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP) na segunda camada; GNE: filme dupla camada com adição de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada.

Para esses filmes, a concentração de nisina utilizada foi de 56 mg/g de gelatina, escolhida com base nos resultados anteriores (6.2), e a concentração de EHFP utilizada foi de 150 mg/g de gelatina, escolhida com base em resultados prévios do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FZEA/USP.

A interpretação dos resultados desta parte da tese é, de certa forma, original, pois não se encontraram trabalhos similares. Mas, quando pertinente, se tentou interpretar utilizando o conceito de resistências em série e em paralelo. Assim, quando os testes envolvem medidas através do filme, a interpretação será de resistências em série (RS), mas no caso dos testes mecânicos de tração, a interpretação deve ser de resistências em paralelo (RP).

6.3.1 Aspecto visual e espessura

Os filmes dupla camada a base de gelatina apresentaram, independente da adição de compostos ativos na segunda camada, aspecto homogêneo e facilidade de remoção do suporte. A adição de nisina na segunda camada não alterou as características visuais dos filmes, assim como foi observado na seção anterior, e os filmes dupla camada adicionados de nisina na segunda camada foram visualmente iguais aos filmes controle. Ou seja, não se observou a presença de uma nítida fronteira

entre as duas camadas dos filmes. No entanto, a adição de EHFP, mesmo que na fina camada superior, embora não tenha deixado o filme heterogêneo nem com defeitos na superfície, deixou os filmes de gelatina mais amarelados (Figura 20), o que foi observado nas duas formulações (RS) contendo extrato (GE e GNE).

Figura 20: Aspectos visuais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Com relação à espessura, pode-se assumir que não houve influência da adição de nisina e/ou de EHFP na segunda camada (RS), sendo que a média da espessura dos filmes ficou em torno de $0,088 \pm 0,019$ mm, como era esperado, uma vez que a

massa de solução formadora de filme colocada no suporte foi controlada. A espessura da primeira camada correspondeu a 85% e a da segunda camada, a 15% da espessura total.

6.3.2 Umidade e solubilidade em água

A umidade dos filmes dupla camada a base de gelatina ficou ($p>0,05$) entre 13 e 14%, como era esperado para filmes à base de proteínas (ALVES et al., 2011), e não apresentou variação significativa com a adição de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, nas concentrações estudadas (Tabela 14).

Tabela 14: Umidade e solubilidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*

Amostra	Umidade (%)	Solubilidade (%)
G	14,3 ± 0,2 ^a	37,6 ± 3,6 ^b
GN	15,3 ± 0,6 ^a	42,9 ± 1,1 ^a
GE	14,0 ± 0,4 ^a	36,1 ± 4,1 ^b
GNE	13,2 ± 1,2 ^a	34,8 ± 4,7 ^b

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p<0,05$).

Comparando-se o valor de umidade obtido para o filme controle produzido em dupla camada (Tabela 14), com aquele obtido para o filme controle monocamada (Tabela 4), pode-se considerar que o processo de produção do filme não teve influência na sua umidade. Além disso, sugere-se também, que nem a nisina e nem o EHFP,

adicionados separadamente ou em conjunto, na segunda camada do filme, foram capazes de alterar a higroscopicidade dos filmes como um todo.

Não se encontraram resultados de trabalhos similares na literatura, entretanto, resultados parecidos foram reportados por Oliveira (2017), para filmes monocamada a base de gelatina adicionados de extrato aquoso de folha de pitangueira e por Makishi (2016), também para filmes monocamada a base de gelatina, adicionados de extrato de Boldo-do-Chile. Mas, se em monocamada esses aditivos não alteram a umidade dos filmes de gelatina, eles, presentes na segunda camada, terão menor chance de alterar.

A solubilidade dos filmes (Tabela 14) teve uma ligeira influência da adição de nisina na segunda camada, aumentando de 38 (G) para 43% (GN), aproximadamente. Basch; Jagus e Flores (2013) observaram resultados similares para filmes monocamada a base de amido adicionados de nisina. Esses autores afirmaram que a adição do composto ativo pode ter gerado uma matriz mais susceptível a interagir com a água. Assim, a nisina deve ter influenciado as interações moleculares na segunda camada (RS), e assim, contribuído para o aumento da solubilidade do filme como um todo.

Por outro lado, os valores de solubilidade em água não variaram significativamente ($p > 0,05$) com a adição de EHFP (G, GN e NE ~ 36%), ou seja, qualquer que tenha sido o efeito desses aditivos no comportamento da segunda camada, esse efeito foi desprezível no filme como um todo. Comportamento semelhante foi observado por Oliveira (2017), para filmes monocamada a base de gelatina incorporados de extrato de folha de pitangueira, embora os valores de solubilidade reportados tenham sido superiores (em torno de 45%). Makishi (2016) também não observou a influência da adição de extrato de boldo-do-Chile na solubilidade dos filmes monocamada a base de gelatina.

6.3.3 Propriedades mecânicas

A adição de nisina na segunda camada diminuiu ($p<0,05$) a tensão na ruptura (de $G= 15,8$ para $GN= 8,6$ MPa) e o módulo elástico (de $G= 2,9$ para $GN= 1,3$ MPa/%) dos filmes dupla camada a base de gelatina, e aumentou ($p<0,05$) o valor (de $G= 47,2$ para $GN= 64,7\%$) de alongação na ruptura (RP) (Tabela 15). Esse resultado era, de certa forma, esperado, uma vez que esse comportamento da nisina já havia sido observado nos filmes produzidos em monocamada (Tabela 5), ou seja, o efeito da nisina sobre a segunda camada, que é mais fina que a primeira, representando apenas 15% da espessura total, foi suficiente para influenciar o comportamento do filme dupla camada.

Tabela 15: Valores de tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	TR (MPa)	ER (%)	ME (MPa/%)
G	$15,9 \pm 3,3^a$	$47,2 \pm 7,7^{b,c}$	$2,9 \pm 0,8^{a,b}$
GN	$8,6 \pm 2,9^b$	$64,7 \pm 6,1^a$	$1,3 \pm 0,4^c$
GE	$21,6 \pm 6,2^a$	$23,4 \pm 1,4^d$	$4,3 \pm 0,8^a$
GNE	$12,8 \pm 2,8^{a,b}$	$35,9 \pm 4,6^{c,d}$	$2,8 \pm 0,4^b$

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p<0,05$).

Quanto à adição de EHFP na segunda camada, foi possível observar um importante aumento (embora não significativo, devido aos erros dessas medidas) na TR (~22 MPa) e no ME (~4,3 MPa/%) do filme GE, mas com redução ($p<0,05$) nos valores

de ER (~23,4%), comportamento esse contrário daquele observado com a adição da nisina. Mas, a adição conjunta da nisina e do EHFP (GNE ~ 13 MPa) combinou o efeito de ambos os aditivos e produziu filmes muito similares ao filme controle (G), o mesmo ocorrendo com o ME (Tabela 13), ou seja, a melhoria que o EHFP proporcionou à TR da segunda camada, foi suficiente para impactar o filme como um todo, mas não necessariamente quando conjuntamente com a nisina.

A metodologia de produção dos filmes (mono ou dupla camada) teve uma leve influência nos parâmetros de tração e, comparando-se as Tabelas 5 e 15, os filmes dupla camada apresentaram valores ligeiramente superiores de tensão na ruptura e alongação na ruptura, e valores inferiores de módulo elástico. Pereda et al. (2011) trabalharam com filmes compósitos, dupla camada produzidos a base de gelatina e quitosana, sem aditivos bioativos, e observaram que os filmes produzidos em dupla camada apresentaram valores superiores de tensão na ruptura e valores inferiores de alongação quando comparados aos filmes compósitos produzidos em monocamada, corroborando com os resultados dessa tese.

Os resultados das propriedades mecânicas obtidas por teste de perfuração estão apresentados na Tabela 16. A adição de nisina na segunda camada de filme não teve influência significativa ($p>0,05$) nem na força e nem na deformação na perfuração (RS/RP), que permaneceram em torno de 16 N e 4,7%, respectivamente.

A adição de EHFP sozinho, ou em conjunto, com a nisina, na segunda camada, não deve ter provocado efeito sobre as propriedades mecânicas da segunda camada, que, portanto, não influenciou significativamente os valores de força e deformação na perfuração (Tabela 16) dos filmes como um todo. Resultados similares aos desse trabalho foram obtidos por Oliveira (2017), para filmes monocamada a base de gelatina, adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira, cujos valores ficaram em torno de 14,5 N para a força na perfuração e 5,4% para a deformação na perfuração para os filmes controle, e em torno de 17,3 N para a força na perfuração e 6,5% para a deformação na perfuração para os filmes monocamada a base de gelatina com EHFP.

Tabela 16: Valores de força na perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	FP (N)	DP (%)
G	16,1 ± 1,1 ^a	4,5 ± 0,1 ^a
GN	17,2 ± 0,4 ^a	4,3 ± 0,0 ^a
GE	15,1 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,1 ^a
GNE	16,9 ± 1,2 ^a	5,5 ± 1,0 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

6.3.4 Microestrutura

Pelas análises das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície externa da dupla camada (Figura 21), foi observado que as superfícies do filme controle (G) e contendo apenas a nisina (GN) foram muito homogêneas, sem falhas ou defeitos aparentes, similares ao observado no estudo anterior (Figura 11). De acordo com Bodini et al. (2013), esse comportamento era esperado para filmes de gelatina plastificados com glicerol, devido à presença de fase ordenada e da estrutura de rede homogênea da matriz biopolimérica.

Por outro lado, a adição de EHFP na segunda camada dos filmes (GE e GNE) provocou uma superfície um pouco mais irregular, com presença de pequenos grumos (Figura 21), indicando uma matriz mais heterogênea e com uma certa irregularidade, ainda mais visível em GNE, isso na superfície externa da segunda camada. Esse comportamento foi reportado para filmes monocamada a base de alginato adicionados

de extrato de *ginseng*, que provocou uma heterogeneidade na matriz, além da formação de poros (NORAJIT et al., 2010).

Figura 21: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Oliveira (2017) estudou a incorporação de extrato de folha de pitangueira nos filmes monocamada a base de gelatina e não observaram grandes alterações na morfologia desses filmes.

As imagens da seção transversal dos filmes dupla camada, obtida por crio fratura, não permitiram observar a interface entre as duas camadas dos filmes G e GN, provavelmente por se tratarem do mesmo material base e com a mesma homogeneidade (Figura 22).

Figura 22: Imagens representativas das seções transversais obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfícies crio fraturadas dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Entretanto, no caso dos filmes adicionados de EHFP (GE e GNE) foi possível se observar uma camada mais heterogênea, na parte superior das respectivas imagens,

correspondendo à segunda camada (Figura 22). Embora tenha sido possível se verificar essa diferença microestrutural, as interfaces não foram necessariamente nítidas.

Além da microscopia eletrônica de varredura, as superfícies externas das segundas camadas foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM) (Figura 23).

Figura 23: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia de força atômica (AFM) da superfície da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

As superfícies da segunda camada do filme controle (G) e daquele contendo apenas a nisina, apresentaram estruturas similares (Figura 23) às descritas previamente

(Figura 12). A adição de EHFP, por sua vez, provocou novas estruturas, como pequenos picos nas superfícies desses filmes (GE e GNE). Consequentemente, a rugosidade das superfícies da segunda camada dos filmes contendo os aditivos foram maiores ($p < 0,05$) que a dos filmes controle ($G = 3,2 \text{ nm}$) (Tabela 17), e com um comportamento análogo, mas inverso, ao observado na TR (Tabela 15): o EHFP aumentou a rugosidade dos filmes para $8,4 \text{ nm}$ (GE), enquanto a nisina sozinha, aumentou para $12,1 \text{ nm}$, e na adição de conjunta de ambos aditivos, houve um efeito aditivo (nem sinergismo, nem antagonismo) e a rugosidade aumentou para $10,5 \text{ nm}$ (GNE), em relação aos filmes controle.

Tabela 17: Valores de rugosidade média (R_m) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra:	$R_m \text{ (nm)}$
G	$3,2 \pm 2,9^c$
GN	$12,1 \pm 2,6^a$
GE	$8,4 \pm 1,1^b$
GNE	$10,5 \pm 1,8^{a, b}$

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Esse aumento na rugosidade dos filmes com a adição de nisina ou de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira já foi reportado previamente na literatura (OLLÉ RESA; JAGUS; GERSCHENSON, 2014; OLIVEIRA, 2017). Rambabu et al. (2019) também reportaram um aumento na rugosidade dos filmes a base de quitosana incorporados de extrato de folhas de mangueira.

A incorporação de substâncias adicionais na matriz polimérica parece resultar em filmes com aparência mais irregular e com rugosidade maior (em escala nanométrica). Esse fato pode estar associado à separação de fases dos aditivos na matriz polimérica, que geralmente ocorre durante a secagem do filme quando a substância não é totalmente compatível com o polímero usado (BOELTER; BRANDELLI, 2016).

6.3.5 Cor, opacidade e brilho

De modo geral, os efeitos significativos ($p < 0,05$) observados nos valores de todos os parâmetros de cor foram devidos à adição do EHFP na segunda camada, que é um produto que apresenta coloração típica ($L^* = 31,9$, $a^* = 12,9$ e $b^* = 43,8$, Vargas, 2015), devido aos compostos fenólicos presentes nos extratos, que causam espalhamento e refração da luz (HOPKINS et al., 2015). Por ser um comportamento em série (RS), o efeito do EHFP na segunda camada foi suficiente para alterar a cor do filme como um todo.

Assim, de modo geral, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de todos os parâmetros dos filmes dupla camada G e GN ($p > 0,05$) em relação aos de GE e GNE ($p > 0,05$) (Tabela 18). Os valores de luminosidade (L^*) dos filmes G e GN ficaram em torno de 91, indicando filmes de tonalidade muito clara, enquanto que para os filmes GE e GNE, os valores ficaram em torno de 86,5, ou seja, esses filmes foram um pouco menos claros. Sivarrooban; Hettiarachchy e Johnson (2008) reportaram uma diminuição nos valores de luminosidade dos filmes monocamada de proteína de soja quando foi incorporado o extrato de semente de uva, também associado aos compostos fenólicos desse extrato que contribuíram para deixar o filme mais avermelhado e amarelado.

Quanto aos valores de a^* , foi possível observar que a adição de EHFP reduziu esse parâmetro de -0,87 (G e GN) para -2,90, ou seja, aumentando a coloração

esverdeada nos filmes, enquanto que os valores de b^* aumentaram de 2,4 para 18,7, ou seja, indicando que aumentou expressivamente a coloração amarela dos filmes (Tabela 18). E por fim, observou-se ainda, que a diferença total de cor (ΔE^*) aumentou substancialmente, de 4,6 para 18,7, ou seja, esses filmes foram muito mais coloridos que os filmes sem EHFP. Essa coloração verde-amarelada dos filmes contendo EHFP pode ser explicada pela presença de flavonoides, pigmentos naturais dos vegetais, muito possivelmente presentes no EHFP. Resultados similares foram reportados por Oliveira (2017), para filmes monocamada a base de gelatina adicionados de extrato aquoso de folha de pitangueira.

Tabela 18: Parâmetros de cor e opacidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada**.

Amostra	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade
G	$91,0 \pm 0,2^a$	$-0,85 \pm 0,06^a$	$2,48 \pm 0,09^b$	$4,5 \pm 0,1^b$	$0,84 \pm 0,08^a$
GN	$90,2 \pm 0,1^a$	$-0,88 \pm 0,01^a$	$2,29 \pm 0,10^b$	$4,7 \pm 0,1^b$	$0,89 \pm 0,10^a$
GE	$86,3 \pm 0,6^b$	$-2,95 \pm 0,22^b$	$18,81 \pm 1,15^a$	$18,9 \pm 2,1^a$	$0,73 \pm 0,11^a$
GNE	$86,6 \pm 0,9^b$	$-2,88 \pm 0,18^b$	$18,52 \pm 3,79^a$	$18,5 \pm 2,8^a$	$0,78 \pm 0,12^a$

Fonte: Própria autoria

** G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Quanto à opacidade dos filmes, não se observou variação significativa desse parâmetro com a adição dos compostos ativos estudados, indicando que a incorporação dos compostos ativos na segunda camada não alterou a transparência dos filmes de gelatina (Tabela 18). Todos os filmes foram extremamente transparentes (opacidade $\rightarrow$ 0).

Com relação ao brilho dos filmes dupla camada (Tabela 19), foi possível se observar que a adição de nisina na segunda camada reduziu significativamente o brilho da superfície externa dessa camada dos filmes, nas medidas realizadas em 60°, enquanto a adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira não alterou o valor do brilho quando comparado ao filme controle. A adição conjunta de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira também não alterou o brilho dos filmes para ambos os ângulos estudados.

Tabela 19: Brilho da superfície da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	Brilho (20°)	Brilho (60°)
G	98,3 ± 6,2 ^a	135,1 ± 8,26 ^a
GN	80,1 ± 11,0 ^a	100,5 ± 9,9 ^c
GE	93,9 ± 12,1 ^a	147,4 ± 7,6 ^a
GNE	87,4 ± 8,2 ^a	121,9 ± 2,5 ^{a,b}

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Makishi (2016) e Oliveira (2017) também não encontraram diferenças significativas nos valores de brilho dos filmes monocamada a base de gelatina adicionados de boldo-do-Chile e de extrato de folha de pitangueira, respectivamente. No entanto, os valores reportados por Oliveira (2017) foram ligeiramente superiores aos valores encontrados nesse trabalho. Da mesma maneira, Talón et al. (2017) reportaram que não houve diferença significativa no brilho dos filmes de quitosana e de amido adicionados de extrato de tomilho.

De acordo com Villalobos et al. (2005), a diminuição do brilho superficial dos filmes pode ser causada pelo aumento da rugosidade da superfície desses filmes, o que, nesta parte do estudo, foi verificado apenas para os filmes de gelatina adicionados de nisina (G e GN).

6.3.6 Barreira à luz UV/vis

Muito interessante o fato da presença do EHFP na segunda camada (RS) ter produzido filmes GE e GNE com barreira total à Luz UV (Figura 24), enquanto que os outros dois filmes (G e GN) apresentaram barreira total apenas até 250 nm, similarmente ao observado anteriormente (Figura 14). E, na região da Luz visível, foi possível observar certa redução da transmitância, ou seja, aumento da barreira, no caso dos filmes contendo ambos os aditivos (GNE). Essa redução na transmitância devido ao EHFP está associada aos pigmentos, carotenoides e compostos fenólicos presentes no extrato, como as cumarinas e os taninos, que possuem insaturações-saturações responsáveis pela absorção da luz na faixa estudada (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Esses resultados sugerem que os filmes de gelatina adicionados com EHFP, mesmo que apenas na segunda camada, apresentaram boas propriedades de barreira, o que poderia contribuir para sua atividade antioxidante, uma vez que a melhora nas propriedades de barreira à luz é uma ferramenta contra a oxidação lipídica (OLIVEIRA, 2017).

Resultados semelhantes foram reportados por Bonilla e Sobral (2016), para filmes monocamadas a base de gelatina e/ou quitosana adicionados de extrato de guaraná, boldo-do-Chile, canela e alecrim. Da mesma maneira, Jancikova et al. (2019) também reportaram uma melhora nas propriedades de barreira à Luz UV/visível dos filmes monocamadas a base de gelatina/*furcellaran* (um tipo de alga) quando foi adicionado extrato de alecrim.

Figura 24: Propriedades de barreira UV/Vis dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Tais resultados indicam que os filmes adicionados de extratos de plantas podem impedir a aceleração da oxidação lipídica através da luz, sendo interessantes para aplicação em alimentos.

6.3.7 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) é comandada (RS) principalmente, pelo biopolímero e pela concentração de plastificante utilizada, mas pode ser afetada pela adição de compostos ativos (NAZURAH; HANANI, 2017). Nesta tese, a presença

de ambos os aditivos na segunda camada não foi suficiente para melhorar as propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes de gelatina como um todo, e os valores de PVA permaneceram em torno de 0,34 g.mm/m².h.kPa (Tabela 20). De acordo com Mir et al. (2018), era esperado um aumento na permeabilidade ao vapor de água dos filmes a base de gelatina, uma vez que a incorporação de extratos poderia interromper a estrutura ordenada da gelatina criando vazios ou canais preferenciais. No entanto, a adição da nisina e/ou do extrato somente na segunda camada do filme não foi capaz de provocar tais mudanças, provavelmente por causa da baixa concentração de compostos ativos adicionados.

Tabela 20: Permeabilidade ao vapor de água dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra:	PVA (g. mm/m². h. kPa)
G	0,32 ± 0,01 ^a
GN	0,34 ± 0,02 ^a
GE	0,31 ± 0,02 ^a
GNE	0,40 ± 0,07 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro (p<0,05).

6.3.8 Propriedades térmicas

De maneira geral, os comportamentos observados nas curvas de fluxo de calor da primeira e da segunda varredura do DSC dos filmes de dupla camadas (Figura 25)

foram similares aos observados no estudo anterior, não sendo necessária a repetição de sua descrição detalhada (6.2.8). Foram observadas T_{G1} , T_{G2} e T_M nas curvas das primeiras varreduras, e T_{G1} e T_{G2} , nas de segunda varredura.

Figura 25: Termogramas representativos dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

De maneira geral, segundo os resultados da primeira varredura (Tabela 21), a presença dos aditivos na segunda camada (RS) não influenciou ($p>0,05$) T_{G1} , que permaneceu em torno de -76 °C , e nem T_{G2} , que ficou em torno de 46 °C (Tabela 21).

Tabela 21: Propriedades térmicas determinadas na análise térmica dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

	Amostra	T _{G1} (°C)	T _{G2} (°C)	T _M (°C)	ΔH _M (J/g)
Varredura 1	G	-74,5 ± 2,5 ^a	47,0 ± 1,8 ^a	72,4 ± 1,9 ^a	24,3 ± 1,5 ^a
	GN	-74,0 ± 1,4 ^a	44,9 ± 0,8 ^a	67,3 ± 3,5 ^a	21,2 ± 0,8 ^b
	GE	-78,7 ± 1,9 ^a	46,8 ± 0,7 ^a	68,8 ± 1,9 ^a	21,4 ± 1,9 ^b
	GNE	-75,4 ± 1,8 ^a	46,5 ± 0,6 ^a	63,8 ± 0,7 ^b	18,1 ± 0,7 ^c
	Amostra	T _{G1} (°C)	T _{G2} (°C)		
Varredura 2	G	-75,2 ± 1,7 ^a	35,8 ± 0,7 ^a		
	GN	-75,4 ± 2,4 ^a	29,6 ± 0,2 ^b		
	GE	-74,7 ± 3,5 ^a	32,9 ± 1,8 ^a		
	GNE	-76,8 ± 2,0 ^a	28,0 ± 1,6 ^b		

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. T_G: Temperatura de transição vítrea; T_M: Temperatura de fusão dos cristais; ΔH_M: Entalpia de fusão dos cristais. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro (p<0,05).

Em relação à fusão das junções microcristalinas da gelatina, observou-se uma redução (p<0,05) apenas quando foi adicionado ambos os aditivos (GNE = 63,8 ± 0,7 °C) na segunda camada, sendo que não houve diferença entre os outros valores (G, GN e GE), que permaneceram em torno de 69,5 °C. Porém, se observou mais uma vez, que a entalpia de fusão é sensível à presença de aditivos na matriz biopolimérica, mesmo que apenas na segunda camada. Assim, a entalpia de fusão diminuiu (p<0,05) de 24,3 ± 1,5 J/g (G) para cerca de 21,3 J/g (GN e GE, p>0,05) e para cerca de 18,1 J/g (GNE). Oliveira (2017) também não observaram diferença significativa nos valores de T_G com a adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira em filmes monocamada a base de gelatina, o que está de acordo com os resultados encontrados nessa tese.

Com relação à segunda varredura, observou-se que a T_{G1} também não sofreu efeito dos aditivos, e que foi muito similar àquela da primeira varredura, enquanto a T_{G2} , associada ao biopolímero, além de apresentar valores menores na segunda varredura, fenômeno já explicado nesta tese (6.2.8), também apresentou uma redução com a adição de nisina sozinha ($G_N = 29,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$) ou em conjunto com o EHFP ($G_{NE} = 28,0 \pm 1,6^\circ\text{C}$) em relação ao filme controle ($G = 35,8 \pm 0,7^\circ\text{C}$) e àquele contendo EHFP ($G_E = 32,9 \pm 1,8^\circ\text{C}$) na segunda camada (Tabela 21).

6.3.9 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X obtidos dos filmes dupla camada estão apresentados na Figura 26. No caso do filme controle, foram observados picos em torno de $2\theta = 7^\circ$ e 20° , referentes, respectivamente, à estrutura de formação da tripla hélice da gelatina, e ao pico característico de materiais parcialmente cristalinos (RIVERO, GARCIA, PINOTI, 2010).

A adição de compostos ativos nos filmes de gelatina, mesmo que na fina segunda camada (RS), ocasionou pequenas variações nos difratogramas. Nos filmes adicionados de nisina (G_N) foi possível perceber que a intensidade do pico diminuiu, e um pequeno pico apareceu em torno de 10° , associado à lactose, excipiente do Nisaplin®. Para os filmes adicionados de EHFP (G_E e G_{NE}) também foi observada uma ligeira modificação no difratograma com o aparecimento de um pequeno pico em torno de 18° , que provavelmente está associado a algum microcristal associado a algum composto fenólico presente no extrato.

Para os filmes adicionados de EHFP (G_E) também foi possível notar uma ligeira redução no pico em torno de $2\theta = 7^\circ$, o que poderia indicar uma interação dos compostos presentes no extrato com a matriz polimérica, que resultou em uma alteração na estrutura tripla hélice da gelatina. Não houve diferença no pico em torno de $2\theta = 20^\circ$, indicando que a adição de extrato não modificou a estrutura parcialmente cristalina da

gelatina na dupla camada. Resultados similares foram reportados por Méndez (2017), para filmes monocamada de gelatina adicionados de extrato de própolis vermelha e óleos essenciais.

Figura 26: Exemplos de espectros obtidos por difração de raios X dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Ainda, exceto pelo aparecimento do pico em torno de 18°, o difratograma dos filmes adicionados de nisina em conjunto com o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira foi muito similar ao difratograma do filme controle, sem formação do pico correspondente ao NaCl da nisina e sem alterações importantes na intensidade dos picos.

6.3.10 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para verificar se houve alguma interação intramolecular entre o composto ativo e a matriz polimérica que pudesse ter formado novas ligações químicas ou modificado as ligações químicas já formadas.

Os picos observados para a nisina e o EHFP em pó estão apresentados nos anexos I e II, respectivamente. Os picos observados para os filmes com, ou sem, incorporação de compostos ativos foram muito similares (Figura 27), não havendo modificações ou deslocamentos, e são picos característicos de filmes de gelatina, com bandas de absorção em torno de 3270 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} , que correspondem, respectivamente, às bandas da amida A (estiramento do grupo N-H), amida I (estiramento da ligação C=O), amida II (estiramento do grupo C-N e deformação angular da ligação N-H) e amida III, como já foi previamente reportado na literatura (BERGO; SOBRAL, 2007; PRYSTUPA; DONALD, 1994; BODINI et al., 2013; BITENCOURT, 2013).

Uma possível explicação para a ausência de deslocamento dos picos ou modificações maiores é a quantidade de agente ativo adicionada, uma vez que o composto ativo foi incorporado apenas na fina camada superior dos filmes, chamada de segunda camada. Além disso, como explicado previamente, no caso da nisina, sua estrutura é muito parecida com a da gelatina, e as ligações intermoleculares formadas são praticamente as mesmas, resultando em espectros muito parecidos.

Oliveira (2017) e Makishi (2016) também não encontraram diferenças significativas nos espectros obtidos por FTIR dos filmes de gelatina adicionados de extrato de folha de pitangueira e extrato de Boldo-do-Chile, respectivamente, indicando que não houve interação entre os compostos fenólicos dos extratos e as cadeias polipeptídicas da gelatina.

Figura 27: Espectros de infravermelho representativos dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

6.3.11 Ângulo de contato da gota de água

Os valores de ângulo de contato foram analisados após 20 segundos, em ambas as superfícies dos filmes (superfície inferior, em contato com a placa, correspondente à primeira camada, e superfície superior, de secagem, correspondente à segunda camada, ou camada ativa). Para a superfície inferior, correspondente à primeira camada de filme, as diferenças observadas foram muito pequenas, o que já era esperado, uma

vez que se trata da camada base de gelatina (Tabela 22). Por outro lado, a adição de nisina nos filmes, mesmo somente na fina camada superior, foi capaz de reduzir o ângulo de contato daquela superfície ($GN = 73,1 \pm 1,1^\circ$), o que já era esperado (Tabela 22). Da mesma forma, a adição de EHFP nos filmes de gelatina também influenciou significativamente esse parâmetro, com valores em torno de $81,1^\circ$ (GE) e de $80,0^\circ$ (GNE), menores ($p < 0,05$) que o dos filmes controle ($G = 83,4 \pm 0,3^\circ$) e do filme GN.

Tabela 22: Ângulo de contato da gota de água dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	Superfície inferior	Superfície superior
	Primeira camada ($^\circ$)	Segunda camada ($^\circ$)
G	$85,8 \pm 0,5^{a,b}$	$83,4 \pm 0,3^a$
GN	$84,0 \pm 1,1^b$	$73,1 \pm 1,1^c$
GE	$84,3 \pm 0,7^b$	$81,1 \pm 1,6^b$
GNE	$87,3 \pm 1,4^a$	$80,0 \pm 0,4^b$

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Mir et al. (2018) também encontraram uma redução no ângulo de contato dos filmes a base de carragena quando foi incorporado extrato de semente de uvas. Esse comportamento foi atribuído à natureza hidrofílica do extrato. Os compostos fenólicos presentes nos extratos compreendem grupos polares/hidrofílicos, como as hidroxilas e as carboxilas, que podem aumentar a polaridade da superfície e interagir com a água, levando a uma diminuição do ângulo de contato da superfície estudada. A molhabilidade dos filmes também pode aumentar devido ao aumento da mobilidade das cadeias da

matriz polimérica, causada pela adição do extrato, conforme reportado por Kaya et al. (2018) e Ramírez et al. (2012). Resultados similares foram reportados previamente por Kadam et al. (2015), para filmes de gelatina adicionados de extrato de alga marinha, e por Makishi (2016), para filmes a base de gelatina adicionados de extrato de Boldo-do-Chile.

6.3.12 Atividade antimicrobiana por teste de sensibilidade

As embalagens ativas com função antimicrobiana promovem uma barreira adicional e muito importante capaz de prevenir o crescimento de microrganismos patógenos (CORRALES; HAN; TAUSCHER, 2009). Assim, as análises microbiológicas de sensibilidade foram realizadas pelo teste de difusão de disco afim de se obter o halo de inibição dos filmes dupla camada, com os filmes aplicados com a segunda camada em contato com o meio de cultura, para as cepas de *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Figura 28). Como era esperado, o filme controle (G), produzido apenas com gelatina, não apresentou halo de inibição.

Corroborando com os resultados encontrados na seção 6.2.12, o filme com a nisina (GN) também apresentou halos de inibição (Figura 28) contra as cepas de *S. aureus* e *L. monocytogenes* nos filmes produzidos em dupla camada (Tabela 23), indicando que houve atividade contra tais bactérias e que esse composto foi efetivo mesmo com o aditivo em apenas em uma fina camada do filme, o que confirma a hipótese apresentada nessa tese, uma vez que os halos de inibição obtidos para os filmes dupla camada foram comparáveis àqueles reportados para os filmes monocamada.

Os filmes adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira também apresentaram halo de inibição, embora também discreto, indicando que o extrato também foi capaz de conferir atividade antimicrobiana aos filmes (Figura 28).

Figura 28: Análise de difusão de disco contra as cepas de: a) *S. aureus* e b) *L. monocytogenes* para filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Sabe-se que a incorporação de extrato de plantas nos filmes a base de biopolímeros é capaz de criar materiais com propriedades antimicrobianas, contribuindo para o aumento da vida de prateleira dos alimentos (THEIVENDRAN et al., 2006; NOURI; NAFCHI, 2014, BONILLA; SOBRAL, 2016). Os extratos de plantas possuem capacidade antimicrobiana graças a uma alta porcentagem de compostos fenólicos como a catequina, epicatequina, carvacrol, timol e eugenol (PENG et al., 2019).

O extrato hidroetanólico de folha de pitangueira é mais conhecido por sua atividade antioxidante, no entanto, essa atividade antibacteriana do EHFP já foi reportada na literatura. Lorenzo et al. (2018) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato puro pelo método de poço difusão e observaram a formação de halo de inibição frente as bactérias *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* e *S. aureus*. Posteriormente, esses mesmos autores estudaram a incorporação direta de extrato de folha de pitangueira em hambúrguer de carne suína embalados em atmosfera

modificada e encontraram uma redução significativa na contagem total de bactérias das amostras adicionadas de extrato.

Tabela 23: Halos de inibição dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra:	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. Aureus</i>	<i>L. Monocytogenes</i>
G	-	-
GN	7,2 ± 0,8 ^a	6,5 ± 0,2 ^a
GE	6,9 ± 0,6 ^a	6,7 ± 0,3 ^a
GNE	7,1 ± 0,6 ^a	6,8 ± 0,4 ^a

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina com adição de nisina; GE: Filme de gelatina com adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: filme de gelatina com adição de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). O símbolo * indica que não houve formação de halo de inibição.

A adição conjunta de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira também conferiu atividade antimicrobiana aos filmes de gelatina, indicando que não houve interação antagônica entre esses compostos capaz de inibir sua atividade antimicrobiana, porém não foi observado um aumento significativo no halo de inibição dos filmes GNE comparados aos filmes adicionados de um único composto ativo, indicando que também não houve um efeito sinérgico entre esses componentes.

6.3.13 Compostos redutores totais e atividade antioxidante

Os filmes foram analisados quanto à sua capacidade redutora (compostos redutores totais) pelo método Folin-Ciocalteu. Adicionalmente, as atividades antioxidantes dos filmes foram medidas por testes de captura dos radicais livres ABTS•+

e DPPH•. Por fim, também foi realizado um ensaio de estabilidade do filme durante 28 dias de estocagem a 25 °C e 58% de umidade relativa.

6.3.13.1 Compostos redutores totais pelo método Folin-Ciocalteu

A capacidade redutora, é um parâmetro de muita importância no estudo da capacidade antioxidante total de um material, e tem sido amplamente utilizado para caracterizar a atividade antioxidante dos extratos de plantas (SHAHIDI; ZHONG, 2015; OLIVEIRA, 2017; MIR et al., 2018). Existem vários métodos de quantificação de compostos fenólicos e, nesse estudo, foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu para se determinar a capacidade redutora dos filmes em termos do conteúdo fenólicos totais, expresso em equivalente de ácido gálico (Tabela 24).

Tabela 24: Capacidade redutora total dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados ou não de compostos ativos obtida pelo método de Folin-Ciocalteu*.

Amostra:	Capacidade redutora (mg AG / g filme)
G	0,5 ± 0,3 ^c
GN	1,8 ± 0,1 ^b
GE	7,6 ± 0,9 ^a
GNE	7,4 ± 1,1 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. AG: Ácido gálico. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

O maior conteúdo de compostos fenólicos totais foi observado ($p < 0,05$) nos filmes com a segunda camada adicionada com EHFP (GE e GNE, $p > 0,05$), com valores

em torno de 7,5 mg de ácido gálico/g de filme (Tabela 24), o que deveria ser esperado, uma vez que o EHFP foi a única fonte de compostos fenólicos estudada, seguido do filme com nisina (GN= $1,8 \pm 0,1$ mg de ácido gálico/g de filme) e do filme de gelatina pura (G= $0,5 \pm 0,3$ mg de ácido gálico/g de filme). Esses resultados indicam, no caso dos filmes GNE, que a nisina presente na segunda camada, não inibiu a reação dos compostos fenólicos do extrato com o reagente Folin-Ciocalteu.

Oliveira (2017) estudou filmes monocamadas a base de gelatina e adicionados de extrato de folha de pitangueira na mesma concentração utilizada nessa tese, reportando valores em torno de 1,8 mg de AG/g de filme para o filme controle, e em torno de 11,3 mg de AG/g de filme, para os filmes adicionados de extrato, superiores aos valores encontrados nesta tese (Tabela 24). Uma possível explicação para essa diferença poderia ser o método de produção dos filmes, uma vez que o extrato foi incorporado somente na segunda camada e, portanto, a quantidade de extrato nos filmes foi proporcionalmente menor nessa tese do que a quantidade de extrato utilizada por Oliveira (2017).

6.3.13.2 Captura do radical ABTS•+

A capacidade de inibição do radical ABTS•+, expressa em função da concentração em equivalente de Trolox (TEAC), pode ser observada na Tabela 25. Corroborando com os resultados anteriores (6.3.13.1), observou-se que a adição do EHFP na segunda camada produziu filmes (GE e GNE ~ 0,768 mg trolox/100 g filme, $p > 0,05$) com maior ($p < 0,05$) atividade antioxidante que os filmes sem EHFP (G e GN ~ 0,030 mg trolox/100 g filme, $p > 0,05$). Embora já se tenha observado uma pequena atividade antioxidante em filmes de gelatina sem adição de compostos ativos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009), os filmes estudados nesse trabalho não apresentaram capacidade antioxidante relevante, assim como os filmes adicionados apenas de nisina (G e GN). A atividade antioxidante dos filmes GE e GNE deve estar relacionada com os

compostos fenólicos presentes no EHFP, conforme resultados apresentados em 6.3.13.1.

Tabela 25: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinada pelo método de captura do radical ABTS•+*.

Amostra:	Atividade antioxidante (mg trolox / 100 g filme)
G	0,029 ± 0,004 ^b
GN	0,032 ± 0,006 ^b
GE	0,749 ± 0,032 ^a
GNE	0,787 ± 0,027 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Lorenzo et al. (2018) evidenciaram cerca de 160 compostos presentes no extrato de folha de pitangueira, dentre os quais se destacaram os ácidos hidroxicinâmicos, uma classe de fenilpropanóides, que foram os fenólicos predominantes; o tirosol, as hidroxycumarinas e os hidroxifenilpropenos, dentre outros. Dentro da classe dos ácidos hidroxicinâmicos, os mais abundantes foram os ácidos cinâmico e cafeico, enquanto outros compostos incluíram, ainda, formas conjugadas dos ácidos gálico e hidroxibenzóico. Com relação aos flavonoides, os flavan-3-óis e as flavonas foram as mais abundantes, seguidas das antocianinas (LORENZO et al., 2018). Todos esses compostos encontrados no extrato de folha de pitangueira foram responsáveis pela atividade antioxidante desse extrato (DENARDIM et al., 2015).

Valores superiores de capacidade antioxidante (em torno de 1 mg de trolox/100 g de filme) foram reportados previamente para filmes monocamadas de

gelatina adicionados de extrato de folha de pitangueira (OLIVEIRA, 2017). Essa diferença poderia estar relacionada com o fato de o extrato estar presente somente na fina camada superior dos filmes produzidos nessa tese, ou seja, a concentração de extrato nos filmes dupla camada é inferior a concentração de extrato utilizada por Oliveira (2017). Além disso, alguns outros fatores podem estar relacionados com as diferenças encontradas nos valores de capacidade antioxidante, como as condições de preparo do extrato, as condições climáticas e do solo e a maturidade das folhas (LORENZO et al., 2018).

6.3.13.3 Captura do radical DPPH•

A atividade antioxidante dos filmes também foi analisada pelo método de captura do radical livre DPPH•. Como esperado, os resultados dessa análise (Tabela 26) foram similares aos observados anteriormente (Tabela 25). Os filmes controle (G) e os filmes, com a segunda camada adicionada somente de nisina (GN), apresentaram baixa atividade antioxidante, diferentemente dos filmes onde foi adicionado EHFP. Assim, os filmes GE e GNE apresentaram a maior ($p < 0,05$) atividade antioxidante (~57% de inibição), seguidos ($p < 0,05$) do filme GN ($4,7 \pm 0,1\%$) e do filme controle (G= $2,3 \pm 0,9\%$) (Tabela 26), o que já era esperado, considerando que nem a gelatina e nem a nisina tem propriedades antioxidantes.

Resultados similares foram obtidos por Oliveira (2017), para filmes monocamadas a base de gelatina com adição de EHFP, onde a adição de extrato foi capaz de conferir atividade antioxidante aos filmes, também relacionada com a redução do radical DPPH• pela doação de um H^+ por parte dos compostos fenólicos, passando a DPPH-H e mudando sua coloração púrpura para uma coloração amarelada.

Tabela 26: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinada pelo método de captura do radical DPPH• *.

Amostra:	Inibição da Absorbância (%)
G	2,3 ± 0,9 ^c
GN	4,7 ± 0,1 ^b
GE	58,3 ± 1,5 ^a
GNE	55,7 ± 1,3 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

6.3.14 Estabilidade antioxidante e antimicrobiana dos filmes durante estocagem

A estabilidade dos filmes foi estudada determinando-se os compostos redutores totais dos filmes, acondicionados a 25 °C e 58% de Umidade relativa, durante 28 dias, ao abrigo da luz. De maneira geral não foi observada redução estatisticamente significativa nos compostos redutores totais dos filmes ao longo do tempo estudado, exceto para o filme GE, que foi de 7,59 ± 0,89 mg de ácido gálico/g de filme para 6,80 ± 0,27 mg de ácido gálico/g de filme, na última semana (Tabela 27). Esses resultados permitem indicar que a matriz de gelatina foi capaz de proteger os princípios ativos nas condições estudadas. Deve-se observar que esses filmes, a 25 °C e 58% de umidade relativa, estavam no estado vítreo ($T < T_{g2} \sim 46$ °C, Tabela 21), o que favorece a conservação devido à baixa mobilidade molecular nesse estado.

Tabela 27: Compostos redutores totais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada durante armazenamento a 25 °C e 58% de umidade relativa *.

Compostos redutores totais					
(mg ácido gálico/g de filme)					
Amostra	0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
G	0,78 ± 0,25 ^a	0,73 ± 0,15 ^a	0,75 ± 0,17 ^a	0,71 ± 0,09 ^a	0,74 ± 0,47 ^a
GN	1,77 ± 0,06 ^a	1,42 ± 0,58 ^a	1,50 ± 0,42 ^a	1,64 ± 0,07 ^a	1,62 ± 0,04 ^a
GE	7,59 ± 0,89 ^a	7,44 ± 1,11 ^a	7,39 ± 0,11 ^a	7,31 ± 1,25 ^a	6,80 ± 0,27 ^b
GNE	7,39 ± 1,12 ^a	7,09 ± 0,57 ^a	7,15 ± 0,88 ^a	6,57 ± 1,04 ^a	6,25 ± 1,16 ^a

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GN: Filme de gelatina adicionado de nisina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Filme de gelatina adicionado de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma linha, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Na literatura foram encontrados alguns trabalhos que avaliaram a estabilidade dos filmes com atividade antioxidante. Bodini et al. (2013) reportaram uma ótima estabilidade dos filmes de gelatina adicionados de extrato etanólico de própolis verde armazenados por 177 dias; Méndez (2017) encontrou uma ligeira redução na capacidade redutora dos filmes de gelatina adicionados de extrato de própolis vermelha e óleos essenciais de cravo e manjerição.

Em relação a estabilidade da atividade microbiológica dos filmes durante o acondicionamento, não se observou diferença com relação ao primeiro dia de análise, e embora os halos de inibição tenham sido pequenos desde o início dos testes, pode-se sugerir que os filmes foram estáveis e mantiveram a atividade antimicrobiana durante todo o período testado, com halos de inibição em torno de 6,7 mm; 6,5 mm e 6,3 mm para os filmes GN, GE e GNE, respectivamente. Resultados similares foram observados por Méndez (2017) para filmes de gelatina adicionados de extrato de própolis vermelha e óleo essencial de cravo e manjerição frente às bactérias *S. aureus* e *S. enteritidis*.

6.4 Características dos filmes produzidos em dupla camada adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou natamicina

Afim de facilitar o entendimento dessa seção, os filmes foram denominados de G: filme controle; GE: filme de gelatina dupla camada com adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (EHFP); GNA: filme de gelatina dupla camada com adição de natamicina; GNAE: filme de gelatina dupla camada com adição de natamicina e EHFP.

Nesta parte da tese, a concentração de natamicina na segunda camada dos filmes, foi 5 mg/g de gelatina, escolhida com base em dados da literatura (BALAGUER et al., 2014). A concentração de EHFP utilizada foi a mesma do estudo anterior (6.3), ou seja, 150 mg/g de gelatina. Também nesta parte da tese, a interpretação dos resultados, quando pertinente, foi realizada utilizando-se o conceito de resistências em série ou em paralelo.

6.4.1 Aspecto visual e espessura

Ao contrário do estudo com a nisina, a adição de natamicina causou certa alteração visual nos filmes de gelatina, muito provavelmente por causa de seu excipiente, a lactose, presente em grande quantidade, que pode ter provocado pigmentos tipo base de Schiff após reação com o grupo funcional da lisina presente na gelatina (MARIN et al., 2013) (Figura 29). Os filmes adicionados de natamicina ficaram mais amarelados e com aspecto menos transparente, no entanto, assim como as demais formulações, esses filmes não apresentaram presença de bolhas ou partículas suspensas, e mesmo sendo mais amarelados quando comparados ao filme controle. Esses filmes ainda tiveram coloração mais fraca do que aqueles adicionados de EHFP. Ou seja, a segunda camada foi suficiente para influenciar o aspecto do filme como um todo.

Figura 29: Aspectos visuais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

E, similarmente ao observado na seção anterior (6.3.1), os filmes contendo EHFP na segunda camada apresentaram forte coloração, mas continuaram com bom aspecto visual e homogêneos.

Uma vez que a massa de solução formadora de filme foi controlada na placa de Petri, tanto para a primeira, quanto para a segunda camada, a espessura dos filmes adicionados de natamicina não diferiu ($p > 0,05$) do filme controle, ficando em torno de $0,086 \pm 0,011$ mm. Dessa espessura, em torno de 85% corresponde à primeira camada, e cerca de 15%, à segunda, ou seja, à camada ativa.

6.4.2 Umidade e solubilidade em água

De modo geral, a umidade dos filmes dupla camada não foi influenciada pelos aditivos presentes da segunda camada, permanecendo em torno de 14,2% (Tabela 28), indicando que a umidade dos filmes foi controlada principalmente pelo biopolímero e pelo plastificante utilizados. A natamicina e o EHFP, presentes na segunda camada, não alteraram a higroscopicidade dos filmes de gelatina.

Tabela 28: Umidade e solubilidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	Umidade (%)	Solubilidade (%)
G	14,3 ± 0,2 ^a	37,6 ± 3,6 ^b
GNA	14,0 ± 0,4 ^a	45,9 ± 3,5 ^a
GE	14,0 ± 0,4 ^a	36,1 ± 4,1 ^b
GNAE	14,5 ± 3,3 ^a	38,8 ± 2,8 ^b

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Comportamento semelhante foi reportado por Bierhalz et al. (2012), para filmes monocamadas a base de alginato e para filmes monocamadas a base de blendas de alginato e pectina, adicionados de natamicina. Dessa forma, se não houve efeito em um filme monocamada, menor seria a possibilidade que efeito existisse em um filme dupla camada, uma vez que esse efeito estaria restrito a menor parte (15%) do filme como um todo.

Com relação à solubilidade dos filmes em água, observou-se que a adição de natamicina na segunda camada provocou um aumento de 37,6 ± 3,6% (G) para 45,9 ±

3,5% (GNA), diferente do observado para o EHFP, cuja incorporação não teve influência ($p < 0,05$) na solubilidade ($36,1 \pm 4,1\%$), em comparação com o filme G (Tabela 28). A incorporação conjunta da natamicina e do EHFP na segunda camada não influenciou a solubilidade do filme GNAE ($38,8 \pm 2,8\%$) em comparação com o filme G, mas diminuiu em relação a do filme GNA, ou seja, de certa forma, o EHFP reduziu o efeito da NA. Comportamento similar foi observado para os filmes incorporados de nisina e EHFP (6.3.2). Esses efeitos, devido aos aditivos na segunda camada, foram suficientes para influenciar a solubilidade dos filmes como um todo.

Bierhalz et al. (2012), estudaram filmes monocamada a base de pectina adicionados de natamicina, e também reportaram um aumento na solubilidade em água desses filmes, que foi atribuído à liberação da natamicina durante a imersão em água.

Comportamento contrário ao observado nesta tese foi reportado por Romero et al. (2016), para filmes monocamada a base de farinha de *triticale* adicionados de natamicina. Esses autores observaram uma diminuição significativa nos valores de solubilidade dos filmes com a incorporação da natamicina, sugerindo que a natamicina contribuiu para a formação de uma rede estável nos filmes de farinha de *triticale*.

6.4.3 Propriedades mecânicas

Para o teste de tração, foi possível observar (RP) que a adição de natamicina provocou maior ($p < 0,05$) resistência (TR) nos filmes GNA ($26,3 \pm 3,2$ MPa) e GNAE ($28,3 \pm 4,0$ MPa), que o filme controle (G= $15,9 \pm 3,3$ MPa), sugerindo que os filmes adicionados de natamicina foram mais frágeis. Já para os filmes com EHFP na segunda camada ficaram em situação intermediária (GE= $21,6 \pm 6,2$ MPa) (Tabela 29). Em relação ao módulo elástico (ME), observou-se que todos os aditivos provocaram ($p < 0,05$) aumento de $2,9 \pm 0,8$ (G) para $\sim 4,6$ MPa/% (GNA, GE, GNAE, $p > 0,05$), comportamento similar, mas inverso, ao observado na elongação na ruptura, que

diminuiu ($p < 0,05$) de $47,2 \pm 7,7$ (G) para cerca de 25,7% (GNA, GE, GNAE, $p > 0,05$) (Tabela 29), como consequência da presença dos aditivos.

Tabela 29: Valores de tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	TR (MPa)	ER (%)	ME (MPa/%)
G	$15,9 \pm 3,3^b$	$47,2 \pm 7,7^a$	$2,9 \pm 0,8^b$
GNA	$26,3 \pm 3,2^a$	$27,3 \pm 6,1^b$	$4,6 \pm 2,2^a$
GE	$21,6 \pm 6,2^{a,b}$	$23,5 \pm 1,4^b$	$4,3 \pm 0,8^a$
GNAE	$28,3 \pm 4,0^a$	$26,3 \pm 2,5^b$	$4,8 \pm 1,9^a$

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Resultados similares foram reportados por Ollé Resa; Jagus e Gerschenson (2014), para filmes monocamada a base de amido, adicionados de natamicina, nisina e glicerol. No entanto, diferentemente desta tese, esses autores não encontraram alterações significativas no módulo elástico dos filmes com adição de natamicina. Bierhalz et al. (2012) produziram filmes a base de alginato, pectina e blendas de alginato e pectina, e estudaram a adição de natamicina nesses filmes, encontrando uma redução significativa na TR dos filmes que continham o agente antimicrobiano, enquanto os valores de alongação foram praticamente constantes para todas as matrizes. De acordo com esses autores, essa redução encontrada para a tensão na ruptura poderia estar associada à possíveis modificações na estrutura polimérica, a um excesso de agente antimicrobiano que não foi propriamente incorporado na matriz, ou à *crosslinkings* com íons de cálcio (NORAJIT; KIM; RYU, 2010; BIERHALZ et al., 2012). Assim, é possível

sugerir que esses efeitos, ocorrendo apenas na segunda camada, podem impactar o filme como um todo.

Com relação aos testes de perfuração (Tabela 30), observou-se que a adição de natamicina na segunda camada reduziu ($p < 0,05$) a força na perfuração (FP) dos filmes praticamente pela metade: de $16,1 \pm 1,1$ N (G) para $8,2 \pm 1,3$ N (GNA), sendo que o EHFP não provocou efeito significativo ($p > 0,05$) em GE ($15,1 \pm 0,4$ N). E, o efeito da adição de ambos aditivos conjuntamente, foi aditivo, isto é, provocando valor intermediário (GNAE = $11,7 \pm 1,9$ N) ao dos respectivos filmes com um único aditivo (GNA e GE) (Tabela 30).

Tabela 30: Força na perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	FP (N)	DP (%)
G	$16,1 \pm 1,1^a$	$4,5 \pm 0,1^b$
GNA	$8,2 \pm 1,3^c$	$6,3 \pm 1,9^a$
GE	$15,1 \pm 0,4^a$	$4,5 \pm 0,1^b$
GNAE	$11,7 \pm 1,9^b$	$5,4 \pm 0,8^{a,b}$

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Romero et al. (2016), para filmes monocamada a base de farinha de tritcale, não observaram diferença significativa na FP dos filmes, independente da concentração de natamicina adicionada, sugerindo que a natamicina não desestabilizou a estrutura estável da rede do filme, e não aumentou o volume livre ou a mobilidade das cadeias poliméricas, não alterando, assim, a força na perfuração, diferentemente do observado nesta tese. Os valores de FP determinados para esses filmes ($\sim 1,9$ N) (Romero et al.,

2016) foram inferiores aos desta tese, o que pode sugerir interações diferentes em relação à matriz de gelatina, como neste caso.

A natamicina, presente na segunda camada, também influenciou a deformação na perfuração (DP) dos filmes ($GNA = 6,3 \pm 1,9\%$) que foi maior que a do filme controle ($G = 4,5 \pm 0,1\%$). Mas, o EHFP na segunda camada não provocou efeito ($p > 0,05$) nem quando adicionado sozinho ($GE = 4,5 \pm 0,1\%$), nem quando adicionado com a natamicina ($GNAE = 5,4 \pm 0,8\%$).

6.4.4 Microestrutura

Segundo Liu et al. (2019), a morfologia das amostras determina radicalmente suas propriedades. As micrografias das superfícies da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina, obtidas por MEV, estão apresentadas na Figura 30. O filme controle apresentou uma superfície lisa e sem detalhes, enquanto a adição de EHFP na segunda camada dos filmes causou o aparecimento de pequenos grumos nessa superfície, que também puderam ser vistos nos filmes GNAE, deixando esses filmes com superfície menos regular. Por outro lado, a adição de natamicina na segunda camada, provocou pequenas irregularidades, semelhantes a micro-ondulações na superfície dos filmes, ou seja, da segunda camada. Mas, de modo geral, pode-se observar, para todos os filmes, superfícies homogêneas, livres de poros, grumos ou rachaduras (Figura 30).

Figura 30: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies da segunda camada dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Adicionalmente foram obtidas as micrografias (MEV) da superfície obtida por crio fratura, ou seja, da seção transversal dos filmes, com a finalidade de se observar se houve diferença entre as duas camadas, ou a formação de uma interface (Figura 31). Para o filme controle (G), não foi possível observar uma interface entre as duas camadas. Entretanto, a adição dos aditivos na segunda camada de filme provocou mudanças nas micrografias dos filmes: nos filmes contendo natamicina na segunda camada (GNA e GNAE), foi possível se observar uma nítida interface, embora irregular, separando uma estrutura homogênea (primeira camada) de outra estrutura com

bastante irregularidades (Figura 31). Similarmente ao observado na seção anterior (6.3.4), a adição do EHFP na segunda camada do filme GE, provocou diferença microestrutural entre ambas as camadas, mas sem que uma interface tenha sido observada.

Figura 31: Imagens representativas das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfícies crio fraturadas dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Frost et al., (2009) e Silva; Bierhalz e Kieckbusch (2012) reportaram a presença de cristais de natamicina nas micrografias, tanto na superfície crio fraturada, quanto nas superfícies de filmes monocamadas de diferentes polímeros adicionados de natamicina.

Eles associaram esse fato à baixa solubilidade desse composto ativo. No entanto, nesta tese, foi evidenciada uma boa compatibilidade entre a matriz polimérica e a natamicina, uma vez que não houve formação de cristais que pudessem ser observados nem na superfície dos filmes (Figura 30), e nem nas superfícies crio fraturadas (Figura 31).

As micrografias obtidas por microscopia de força atômica (Figura 32) permitiram observar que os filmes controle (G) apresentaram uma superfície regular, suave e homogênea, com estruturas em escala nanométrica, muito similar à micrografia obtida nos filmes com a adição de EHFP (GE). Por outro lado, a adição de natamicina na segunda camada provocou importantes alterações na topografia dos filmes GNA e GNAE, muito diferentes da do filme controle (G), com grandes picos e depressões relevantes, em escala sub-micrométrica, indicando uma superfície mais rugosa, ou seja, mais irregular e mais heterogênea.

Figura 32: Imagens representativas das micrografias 3D obtidas por microscopia de força atômica (AFM) da superfície da segunda camada dos filmes ativos*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

A rugosidade das superfícies da segunda camada dos filmes foi calculada diretamente das micrografias de força atômica. Observou-se que a natamicina em conjunto com o EHFP provocou a maior ($p < 0,05$) rugosidade dos filmes ($GNAE = 172,9 \pm 16,4$ nm), seguida dos filmes com apenas a natamicina na segunda camada ($GNA = 139,4 \pm 4,1$ nm), e dos filmes contendo apenas o EHFP na segunda camada ($GE = 8,4 \pm 1,1$ nm), superiores à rugosidade dos filmes controle ($G = 3,2 \pm 2,9$) (Tabela 31).

Resultados similares foram apresentados por Ollé Resa; Gerschenson e Jagus (2013), para filmes monocamada a base de amido e adicionados de natamicina. Esses autores reportaram que a natamicina provocou um aumento nas irregularidades dos filmes com consequente aumento na sua rugosidade.

Tabela 31: Rugosidade média (R_m) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra:	R_m (nm)
G	$3,2 \pm 2,9^d$
GNA	$139,4 \pm 4,1^b$
GE	$8,4 \pm 1,1^c$
GNAE	$172,9 \pm 16,4^a$

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

6.4.5 Cor, opacidade e brilho

A adição de natamicina, mesmo em pequena quantidade, e somente na segunda camada dos filmes, teve influência (RS) nos parâmetros de cor e na opacidade dos filmes (Tabela 32). A luminosidade (L^*) não foi influenciada significativamente ($p > 0,05$)

pela adição de natamicina na segunda camada, sendo afetada ($p < 0,05$) apenas pela adição do EHFP: a luminosidade dos filmes diminuiu ($p < 0,05$) de ~90 (G e GNA, $p < 0,05$) para ~85 (GE e GNAE, $p > 0,05$), ou seja, os filmes contendo EHFP na segunda camada apresentaram-se ligeiramente mais escuros que o filme G.

Comportamentos similares foram observados nos valores dos parâmetros a^* e b^* . Enquanto a^* diminuiu ($G = -0,90 \pm 0,04$; $GN = -1,94 \pm 0,05$; $GE = -2,95 \pm 0,22$ e $GNAE = -3,24 \pm 0,20$), b^* aumentou ($G = 2,20 \pm 0,19$; $GN = 6,32 \pm 0,41$; e GE e $GNAE = 19 - 22$) com a incorporação dos aditivos na segunda camada, indicando que esses aditivos tornaram os filmes mais amarelo ($-a^*$) e mais verde ($+b^*$), justamente por ser um fenômeno em serie. Liu et al. (2019) também observaram uma redução no parâmetro a^* e um aumento em b^* dos filmes monocamada a base de gelatina adicionados de natamicina, indicando filmes com tons mais amarelados ou esverdeados, enquanto a luminosidade dos filmes não variou significativamente, corroborando com os resultados encontrados nessa tese.

Tabela 32: Parâmetros de cor e opacidade dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada**.

Amostra	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade
G	$90,5 \pm 0,6^a$	$-0,90 \pm 0,04^a$	$2,20 \pm 0,19^c$	$4,3 \pm 0,6^c$	$0,8 \pm 0,2^c$
GNA	$89,2 \pm 0,3^a$	$-1,94 \pm 0,05^b$	$6,32 \pm 0,41^b$	$6,6 \pm 0,3^b$	$1,5 \pm 0,2^b$
GE	$86,3 \pm 0,6^b$	$-2,95 \pm 0,22^c$	$18,81 \pm 1,15^a$	$18,9 \pm 2,1^a$	$0,9 \pm 0,1^c$
GNAE	$84,4 \pm 1,1^b$	$-3,24 \pm 0,20^c$	$22,35 \pm 3,95^a$	$22,9 \pm 3,9^a$	$3,4 \pm 1,2^a$

Fonte: Própria autoria

** G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Em função dos resultados apresentados anteriormente, sobretudo do b^* , a diferença total de cor (ΔE^*) dos filmes foi influenciada pelos aditivos: os filmes mais coloridos foram aqueles contendo EHFP (GE e GNAE~ 21, $p>0,05$) na segunda camada, seguidos ($p<0,05$) daquele contendo natamicina (GNA= $6,6 \pm 0,3$) e por fim, o menos colorido, o filme G ($4,3 \pm 0,6$). Os filmes contendo natamicina na segunda camada foram um pouco mais coloridos que os filmes contendo nisina (Tabela 18), muito possivelmente devido a formação das bases de *Schiff* provocadas pela lactose, que é um açúcar redutor, no excipiente da natamicina.

Em relação à opacidade, observou-se efeito ($p<0,05$) da natamicina na segunda camada (GNAE= $3,4 \pm 1,2$ e GNA= $1,5 \pm 0,2$, $p<0,05$), sendo que o EHFP não influenciou ($p<0,05$) essa propriedade (GE= $0,9 \pm 0,1$) em comparação ao filme controle (G= $0,8 \pm 0,2$). Entretanto, apesar desse comportamento, pode-se considerar que todos os filmes foram muito transparentes. Nenhum dos aditivos provocou a formação de porções insolúveis na segunda camada que pudesse impedir a passagem da luz.

O brilho dos filmes foi analisado nos ângulos de 20° e 60° e mostraram algumas diferenças entre os filmes ativos e o filme controle (Tabela 33). Para as medidas realizadas no ângulo de 20° , não houve variação significativa ($p>0,05$) no brilho dos filmes com a adição dos compostos ativos na segunda camada, que variou entre 65 e 98. Muito possivelmente, esse comportamento foi provocado por erros de medidas muito elevados, sobretudo nos casos dos filmes GNA e GE (Tabela 33). Por outro lado, segundo os resultados determinados em 60° , os filmes G ($135,1 \pm 8,3^\circ$) e GE ($147,4 \pm 7,6^\circ$), sem diferença ($p>0,05$) entre eles, apresentaram-se com maior ($p<0,05$) brilho que os filmes contendo a natamicina (GNA e GNAE~ 120° , $p>0,05$).

Esses resultados também podem ser explicados pelo efeito dos aditivos na rugosidade da superfície da segunda camada: o brilho determinado a 60° diminuiu linearmente ($R^2=0,77$) com a rugosidade das superfícies da segunda camada dos respectivos filmes (Figura 33). A rugosidade afeta a distribuição do fluxo refletido em torno do ângulo especular (TREZZA; KROCHTA, 2001; LEE, SONG; HONG, 2008).

Tabela 33: Brilho dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinados em 20° e 60° *.

Amostra	Brilho (20°)	Brilho (60°)
G	98,3 ± 6,2 ^a	135,1 ± 8,3 ^a
GNA	65,1 ± 27,9 ^a	118,2 ± 6,2 ^b
GE	93,9 ± 12,1 ^a	147,4 ± 7,6 ^a
GNAE	96,9 ± 8,9 ^a	122,4 ± 3,5 ^b

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Figura 33: Efeito da rugosidade sobre o brilho, determinado a 60°, da superfície da segunda camada dos filmes a base de gelatina adicionados com diferentes concentrações de nisina.

Fonte: Própria autoria.

6.4.6 Barreira à luz UV- vis

As análises de determinação das propriedades de barreira à luz UV/vis demonstraram que a adição de compostos ativos nos filmes pode provocar mudanças nos espectros obtidos (Figura 34).

Figura 34: Propriedades de barreira a luz UV/vis dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

No domínio da Luz UV, observou-se que todos os filmes contendo aditivos (GE, GNA e GNAE) apresentaram barreira total ao UV (até 300 nm), enquanto que o comportamento do filme G foi similar ao explicado em 6.3.6. Além disso, os filmes contendo natamicina na segunda camada (GNA e GNAE) apresentaram importante aumento da barreira à luz visível. No caso dos filmes contendo EHFP na segunda camada essas propriedades foram melhoradas devido à presença dos compostos

fenólicos no extrato. E, a redução na transmitância (ou aumento da barreira) observada nos filmes com natamicina na segunda camada pode ser associado com o aumento da opacidade dos filmes provocados pela natamicina (Tabela 32).

Esse mesmo comportamento foi observado por González-Forte et al. (2019), para filmes monocamada a base de blendas de amido e PVA. Esses autores notaram um aumento na absorbância na região do UV/vis, indicando um aumento nas propriedades de barreira dos filmes com a adição de natamicina. Por outro lado, Ramos et al. (2012), para filmes monocamada a base de proteína isolada de soro de leite adicionados de natamicina, reportaram que não houve diferença significativa na barreira à luz UV/Vis com a adição desse composto ativo.

6.4.7 Permeabilidade ao vapor de água

A influência da natamicina e do EHFP na segunda camada, sobre a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina, pode ser observada na Tabela 34. De maneira geral, a adição de agentes antimicrobianos tem a capacidade de aumentar a permeabilidade ao vapor de água de filmes de diversas matrizes, uma vez que esses agentes contribuem para estender a interação molecular, e ainda podem causar perda de compactação na sua estrutura polimérica. E, esse efeito numa fina porção do filme, pode afetar a propriedade do filme como um todo. Nesta tese, a natamicina, mesmo que adicionada somente em uma fina camada do filme de gelatina, aumentou significativamente ($p < 0,05$) a PVA do filme de dupla camada.

Esses resultados estão de acordo com os resultados reportados por Bierhalz et al. (2012), para filmes monocamada a base de alginato, pectina ou blendas de alginato e pectina e adicionados de natamicina. De acordo com Pranoto; Rakshit e Saloke (2005), o aumento da permeabilidade ao vapor de água dos filmes monocamada pode estar associado a um empacotamento mais frouxo das cadeias proteicas, que ocasionou um aumento no volume livre da estrutura polimérica. Segundo Balaguer et al. (2014), a

lactose, presente na natamicina, também pode contribuir para esse aumento de volume livre e, portanto, para o aumento da PVA. Todos esses efeitos ocorridos sobre a segunda camada contribuíram, de alguma maneira, para o aumento do PVA observado no filme dupla camada.

Tabela 34: Permeabilidade ao vapor de água dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra:	PVA (g.mm/m².h.kPa)
G	0,32 ± 0,01 ^c
GNA	0,42 ± 0,03 ^a
GE	0,31 ± 0,02 ^d
GNAE	0,36 ± 0,04 ^b

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Contrariamente à natamicina, a adição de EHFP na segunda camada foi capaz de diminuir ($p < 0,05$) ligeiramente a permeabilidade ao vapor de água, tanto em relação ao filme controle (G), quanto do filme adicionado de natamicina na segunda camada (GNA e GNAE), indicando que, se houve alguma interação entre o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e a natamicina na segunda camada, ela não atrapalhou a interação dos polifenóis do extrato com as cadeias polipeptídicas da gelatina.

Apesar de terem sido observadas diferenças significativas nos valores de permeabilidade ao vapor de água, pode-se afirmar que na prática, essa diferença é desprezível, ou seja, todos os filmes continuaram sendo considerados como apresentando baixa barreira ao vapor de água, com PVA em torno de 0,35 g.mm/m².h.kPa (Tabela 34), o que, de certa forma, limita sua aplicação.

6.4.8 Propriedades térmicas

As curvas de fluxo de calor da primeira e da segunda varredura do DSC dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou natamicina, podem ser observados na Figura 35.

Figura 35: Termogramas representativos dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Assim como observado em 6.3.8, as curvas de fluxo de calor da primeira varredura dos filmes foram típicos de materiais parcialmente cristalinos (SOBRAL et al., 2011), com duas transições vítreas, correspondentes à fase rica em glicerol (T_{G1}) e à

fase rica em biopolímero (T_{G2}), seguidos de um pico endotérmico, correspondente à fusão dos cristais da gelatina (T_M). As curvas de fluxo de calor da segunda varredura, por sua vez, foram características de materiais completamente amorfos, sendo possível observar somente as duas transições vítreas (Figura 35).

Em relação aos dados da primeira varredura, não se observou efeito ($p>0,05$) dos aditivos sobre as transições vítreas. Assim, a T_{G1} permaneceu em torno de $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, e T_{G2} , ficou em torno de $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabela 35). Entretanto o fenômeno da fusão das junções microcristalinas da gelatina teve influência dos aditivos na segunda camada. As T_M dos filmes controle ($G= 72,4 \pm 1,9\text{ }^{\circ}\text{C}$) e dos filmes contendo ambos os aditivos na segunda camada ($GNAE= 69,1 \pm 3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$), para os quais não foi observada diferença significativa ($p>0,05$), foram maiores ($p<0,05$) que a do filme contendo apenas a natamicina na segunda camada ($GNA= 66,2 \pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Por outro lado, não se observou diferença significativa ($p<0,05$) entre a T_M do filme GE ($68,8 \pm 1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) e as dos filmes GNA e GNAE (Tabela 35). Comportamento similar foi observado nos valores de ΔH_M , que variaram entre 21,4 e 24,3 J/g sobre o efeito dos aditivos.

Liu et al. (2019) também reportaram uma diminuição na T_M dos filmes monocamada produzidos a base de gelatina e adicionados de natamicina, sem reticulação, e atribuíram esses resultados a uma mudança estrutural relacionada com a destruição da transição *hélix-coil* dos filmes de gelatina pela adição da natamicina. Assim, uma alteração numa pequena porção do filme, a segunda camada, pode impactar a propriedade de todo o material.

De uma maneira geral, pode-se observar que a adição do EHFP, sozinho ou conjuntamente com a natamicina, na segunda camada, não provocou mudanças significativas nas propriedades térmicas dos filmes de dupla camada.

Tabela 35: Propriedades térmicas obtidas por análise térmica dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

	Amostra	T _{G1} (°C)	T _{G2} (°C)	T _M (°C)	ΔH _M (J/g)
Varredura 1	G	-74,5 ± 2,5 ^a	46,9 ± 1,8 ^a	72,4 ± 1,9 ^a	24,3 ± 1,5 ^a
	GNA	-76,7 ± 1,5 ^a	46,9 ± 1,2 ^a	66,2 ± 0,4 ^b	21,4 ± 0,5 ^b
	GE	-78,7 ± 0,9 ^a	46,8 ± 0,2 ^a	68,8 ± 1,8 ^{a,b}	21,4 ± 1,9 ^{a,b}
	GNAE	-69,4 ± 11,7 ^a	48,5 ± 2,2 ^a	69,1 ± 3,7 ^a	22,1 ± 1,4 ^{a,b}
	Amostra	T _{G1} (°C)	T _{G2} (°C)		
Varredura 2	G	-75,2 ± 1,7 ^a	35,8 ± 0,7 ^a		
	GNA	-78,1 ± 0,7 ^a	28,6 ± 2,7 ^b		
	GE	-74,7 ± 3,5 ^a	32,9 ± 1,8 ^{a,b}		
	GNAE	-69,0 ± 11,4 ^a	27,3 ± 3,2 ^b		

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. T_G: Temperatura de transição vítrea; T_M: Temperatura de fusão dos cristais; ΔH_M: Entalpia de fusão dos cristais. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro (p<0,05).

Na segunda varredura, não se observou efeito dos aditivos sobre a T_{G1}, que permaneceu em torno de -74 °C, praticamente similar à observada na primeira varredura, como era de se esperar uma vez que o glicerol fica sempre amorfo. Por outro lado, os aditivos influenciaram a transição vítrea relacionada com a fase rica em biopolímero (T_{G2}). A adição da natamicina provocou redução (p<0,05) de 35,8 ± 0,7 °C (G) para cerca de 28 °C (GNA e GNAE, p>0,05), enquanto que o EHFP proporcionou filmes com T_{G2} (GE= 32,9 °C) sem diferença significativa (p>0,05) dos outros (Tabela 35). De novo, como era de se esperar, e como explicado em 6.3.8, as T_{G2} determinadas na segunda varredura foram menores que aquelas determinadas na primeira varredura.

6.4.9 Difração de raios X (DRX)

A análise de difração de raios X foi realizada afim de se avaliar a estrutura cristalina dos filmes. Os filmes controle (G), produzidos apenas com gelatina e glicerol, apresentaram picos em torno de 7° e 20°, assim como os filmes adicionados apenas de EHFP na segunda camada, que apresentaram um difratograma muito semelhante ao filme controle, sem aparecimento de picos importantes (Figura 36).

Figura 36: Exemplos de difratogramas de raios X dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

No entanto, a adição de natamicina na segunda camada, embora não tenha provocado uma redução na intensidade dos picos, modificou significativamente o difratograma dos filmes, provocando o aparecimento de novos picos salientes em torno

de 10°; 14°; 17°; 23° e 31°. Esses novos picos indicam um perfil parcialmente cristalino da natamicina, de acordo com Cevher et al. (2008).

González-Forte et al. (2019), estudando o efeito da adição de natamicina em filmes monocamada de amido de milho, reportaram também o aparecimento de novos picos, principalmente em torno de 14°; 17° e 23°. Os picos em torno de 10° e 31°, observados nesta tese, não foram reportados por esses autores, porém estão relacionados, respectivamente, à lactose e ao NaCl, que são excipientes encontrados na natamicina.

Liu et al. (2019) também reportaram a formação de novos picos no difratograma dos filmes monocamada a base de gelatina com a adição de natamicina. Esses autores estudaram a incorporação de diferentes concentrações de natamicina e sugeriram que esse composto ativo age como um agente de nucleação, sendo responsável pela cristalização. Além disso, esses autores afirmaram que a natamicina aumentou os picos característicos da gelatina, e que o grau de cristalinidade na estrutura dos polímeros é resultado, principalmente, do conteúdo do composto ativo cristalizável e da matriz polimérica.

A combinação natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, apresentou intensidade de pico ligeiramente menor, contudo os picos atribuídos à natamicina ainda estavam presentes nesse difratograma (Figura 36), o que indica que não houveram interações entre a natamicina e o extrato que pudessem modificar a cristalinidade dos filmes ou impedir a formação de cristais.

6.4.10 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia de infravermelho dos filmes a base de gelatina mostraram os mesmos picos e bandas encontrados previamente (6.3.10). E, novamente, se observou que a adição de EHFP na segunda camada não provocou

alterações relevantes nesses espectros (Figura 37). A natamicina, cujo espectro está representado no Anexo III, provocou uma discreta modificação na banda correspondente à Amida I da gelatina, possivelmente indicando uma alteração entre o grupamento amina da gelatina e o grupo carboxila presente na natamicina.

Figura 37: Exemplos de espectros de FTIR dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: Filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Além disso, um aumento no pico em torno de 1450 cm^{-1} pôde ser observado e foi atribuído aos grupos carboxila (COO^-), que existem na gelatina e também na natamicina (Figura 2). Esse comportamento já foi reportado previamente por Cé, Noreña e Brandelli (2012) para filmes a base de quitosana adicionados de natamicina.

González-Forte et al. (2019) observaram que a natamicina apresentou uma banda em torno de 1236 cm^{-1} que corresponde ao seu anel epóxi, e um estiramento da carbonila no éster conjugado ao anel da lactona em torno de 1715 cm^{-1} . Na presente tese, também foram observados picos em torno de 1200 cm^{-1} , porém o estiramento em 1715 cm^{-1} não foi muito aparente. Também foi possível se observar uma banda em torno de 1035 cm^{-1} nos filmes adicionados de natamicina na segunda camada, associada ao estiramento assimétrico da ligação C – OH (GONZÁLES-FORTE et al., 2019).

Essas pequenas mudanças e alterações encontradas nos filmes adicionados de natamicina com, ou sem EHFP (GNA e GNAE), na segunda camada, indicaram que houve certa interação entre esse composto ativo e a matriz polimérica e que a adição do extrato não impediu essa interação, dada a semelhança entre os espectros.

6.4.11 Ângulo de contato da gota de água

O ângulo de contato da água com a superfície inferior dos filmes de gelatina dupla camada, se refere à uma superfície que deve ser idêntica para todos os filmes, pois se trata de filme de gelatina contendo apenas o glicerol. Por isso, não se observou diferença significativa entre esses valores, que permaneceram em torno de 84° (tabela 36). Entretanto, em relação à superfície da segunda camada, ou seja, da camada contendo os aditivos, observou-se que a adição da natamicina provou redução ($p < 0,05$) de cerca de 82° (G e GE, $p > 0,05$) para cerca de 72° (GNAE), quando adicionada conjuntamente com o EHFP, e para cerca de 64° (GNA), quando adicionada sozinha (Tabela 36).

Tabela 36: Ângulo de contato dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*.

Amostra	Superfície inferior	Superfície superior
	Primeira camada (°)	Segunda camada (°)
G	85,8 ± 0,5 ^a	83,4 ± 0,3 ^a
GNA	82,2 ± 2,2 ^a	63,8 ± 0,7 ^c
GE	84,3 ± 0,7 ^a	81,1 ± 1,6 ^a
GNAE	83,1 ± 1,5 ^a	72,2 ± 0,8 ^b

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Vários fatores podem influenciar o ângulo de contato, mas sabe-se também que essa propriedade pode ser consequência do grau de polimento do material. Assim, observou-se uma redução linear ($R^2=0,72$) do ângulo de contato da superfície da segunda camada dos filmes com a respectiva rugosidade (Figura 38).

Comparando os dois agentes antimicrobianos estudados nesta tese (nisina e natamicina), pode-se observar que ambos aumentaram a rugosidade média dos filmes de gelatina, sendo que o efeito da natamicina foi mais pronunciado do que o da nisina, consequentemente, essa maior rugosidade causada pela natamicina refletiu nos valores de ângulo de contato.

Bierhalz et al. (2012) encontraram um comportamento diferente para filmes monocamada a base de alginato incorporados com natamicina. Esses autores reportaram um aumento do ângulo de contato, sinalizando que a tendência de absorver água diminuiu e que a superfície do filme se tornou mais hidrofóbica.

Figura 38: Efeito da rugosidade sobre o ângulo de contato da gota de água com a superfície da segunda camada dos filmes de gelatina adicionados de natamicina*.

Fonte: Própria autoria.

6.4.12 Atividade antimicrobiana pelo teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado pela análise de difusão de discos para os todos filmes dupla camada a base de gelatina estudados, frente a dois tipos de fungo, que: *Aspergillus niger* e *Penicillium spp*, foram cultivados antes dos testes propriamente dito (Figura 39).

Figura 39: Cultivo dos fungos *Aspergillus niger* (esquerda) e *Penicillium spp* (direita) para retirada dos esporos.

Fonte: Própria autoria.

Todos os filmes foram testados, no entanto, nem o filme controle (G) e nem o filme adicionado somente de EHFP na segunda camada (GE), apresentaram halo de inibição em relação a ambos fungos, uma vez que nem a gelatina e nem o extrato utilizado possuem ação antifúngica. Por outro lado, os filmes adicionados de natamicina ou natamicina e EHFP, na segunda camada, apresentaram um pequeno halo de inibição contra os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium spp* (Figura 40).

Figura 40: Exemplos de placas do teste de difusão de discos para cepas de *Aspergillus niger* (em cima) e *Penicillium spp.* (embaixo) com os filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina pura e com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*

Fonte: Própria autoria.

* C+: Controle positivo (Itraconazol); GNA: Filme de gelatina adicionado de natamicina; GNAE: Filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Apesar de não apresentarem halos muito grandes, a eficiência da natamicina como agente antifúngico tem sido vastamente reportada (BALAGUER et al., 2014; OLLÉ

RESA; JAGUS; GERSCHENSON, 2014; GONZÁLEZ-FORTE et al., 2019; LIU et al., 2019; BIERHALZ et al., 2012). De acordo com Davidson e Harrison (2002), a natamicina tem uma difusão muito limitada, e tende a ficar na superfície do produto, o que poderia explicar o tamanho dos halos formados.

Ainda, esses ensaios indicam que não houve interação entre a natamicina e o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira, na segunda camada, que pudesse impedir a ação antifúngica da natamicina, uma vez que não houve diferença significativa nos halos dos filmes GNA e GNAE. Esse resultado é interessante porque confirma a possibilidade de utilização conjunta desses dois compostos ativos sem que um cause prejuízos na funcionalidade do outro.

6.4.13 Compostos redutores totais e atividade antioxidante

Os filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou EHFP na segunda camada também foram analisados para determinação do conteúdo de compostos redutores totais, pelo método Folin-Ciocalteu e pelo teste de captura dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], afim de se estabelecer se houve alguma interação entre o EHFP e a natamicina, que pudesse impedir essa atividade antioxidante dos filmes.

6.4.13.1 Compostos redutores totais pelo método Folin-Ciocalteu

Segundo resultados das análises de compostos redutores totais, os filmes G ($0,78 \pm 0,25$ mg AG/g de filme) e GNA ($0,86 \pm 0,19$ mg AG/g de filme) apresentaram baixos valores de compostos redutores totais (Tabela 37), uma vez nem a gelatina e nem a natamicina possuem esses compostos em suas composições, e muito menores ($p < 0,05$) que o observado nos filmes com EHFP ($GE = 7,59 \pm 0,89$ e $GNE = 7,21 \pm 0,44$ mg AG/g de filme, $p > 0,05$), uma vez que o EHFP é rico nesses compostos. De acordo com Lorenzo et al. (2018) e Martinez-Correa et al. (2011), o extrato hidroetanólico da

folha da pitangueira tem um alto teor de compostos redutores totais (51- 229 mg de equivalente ácido gálico/g de extrato seco).

Tabela 37: Compostos redutores totais dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinados com o método de Folin-Ciocalteu *.

Amostra:	Compostos redutores totais
	(mg AG/g filme)
G	0,78 ± 0,25 ^b
GNA	0,86 ± 0,19 ^b
GE	7,59 ± 0,89 ^a
GNAE	7,21 ± 0,44 ^a

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. AG: ácido gálico. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Considerando que não se observou diferença significativa entre os valores de compostos redutores totais (CRT) dos filmes adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (GE) ou em conjunto com a natamicina (GNAE), na segunda camada, pode-se sugerir que a presença da natamicina não prejudicou a composição em termos de CRT, ou seja, ambos os compostos ativos podem ser utilizados juntos sem prejuízo de suas funções.

6.4.13.2 Captura do radical ABTS•+

Os resultados das análises de capacidade de redução do radical ABTS•+ (Tabela 38) permitiram se observar que os filmes sem EHFP na segunda camada ($G = 0,029 \pm 0,004$ e $GNA = 0,020 \pm 0,011$ mg trolox/100 g filme, $p > 0,05$), praticamente não

apresentaram atividade antioxidante, como era de se esperar em virtude dos resultados de CFT (Tabela 37), com valores muito menores ($p < 0,05$) que os dos filmes contendo o EHFP na segunda camada ($GE = 0,749 \pm 0,032$ e $GNAE = 0,796 \pm 0,019$ mg trolox/100 g filme, $p > 0,05$).

Tabela 38: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada determinada com o método de captura do radical ABTS•+ *.

Amostra:	Capacidade antioxidante (mg trolox/100 g filme)
G	$0,029 \pm 0,004^b$
GNA	$0,020 \pm 0,011^b$
GE	$0,749 \pm 0,032^a$
GNAE	$0,796 \pm 0,019^a$

Fonte: Própria autoria

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

De maneira geral, extratos de plantas apresentam alta atividade antioxidante, mas que pode, eventualmente, ser reduzida quando estes são incorporados nas soluções formadoras de filme (MATTA; TAVERA-QUIROZ; BERTOLA, 2019). Assim, pode-se sugerir que, se houve perdas no processamento dos filmes dupla camada, essas perdas não foram suficientes para eliminar a atividade antioxidantes dos filmes estudados nesta tese, recordando que se trata da atividade antioxidante associada à segunda camada do filme.

Considerando que não se observou diferença significativa entre os valores dos filmes GE e GNAE, pode-se inferir que os dois compostos ativos podem, efetivamente, serem utilizados juntos em um material de embalagem.

Zhang et al. (2019) observaram um aumento considerável da atividade antioxidante dos filmes a base de quitosana adicionados de extrato de casca de amendoim e associaram esses resultados com a composição complexa dos extratos de plantas estudados. Ju e Song (2019) também observaram atividade antioxidante de filmes a base de amido e adicionados de extrato de camu-camu (*Myrciaria dubia*), associada aos compostos fenólicos e outros compostos antioxidantes presentes no camu-camu.

6.4.13.3 Captura do radical DPPH•

Os resultados das análises da capacidade de redução do radical DPPH• (Tabela 39) apresentaram comportamentos similares daqueles determinados com o método de captura do radical ABTS•+ (Tabela 38): os valores determinados nos filmes contendo EHFP na segunda camada ($GE = 58,3 \pm 1,5$ e $GNAE = 61,4 \pm 2,6\%$ de inibição, $p > 0,05$) foram muito maiores ($p < 0,05$) do que aqueles dos filmes sem EHFP ($G = 4,3 \pm 0,9$ e $GNA = 3,8 \pm 0,8\%$ de inibição). Como explicado anteriormente, esses resultados foram devido à presença dos CFT no EHFP, e sem eventual interferência negativa (antagonismo) pela natamicina. Novamente, se observou que a presença dos compostos ativos em apenas uma pequena parcela do filme (segunda camada) foi suficiente para produzir um filme ativo.

Ma et al. (2019) reportaram valores de inibição da absorbância aumentando de 0 - 22 % para filmes a base de proteína de soja com diferentes concentrações de extrato de *Cortex Phellodendri*, uma planta medicinal tradicional chinesa. Da mesma forma, Zhang et al. (2019) reportaram valores de inibição da absorbância superiores aos reportados nessa tese, em torno de 63,3 – 87,6% para filmes a base de quitosana adicionados de extrato de casca de amendoim de diferentes variedades. Até o momento, não foram encontrados estudos demonstrando a atividade antioxidante de

filmes adicionados de extratos de plantas em conjunto com a natamicina, muito menos, em filmes dupla camada.

Tabela 39: Atividade antioxidante dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, determinados com o método de captura do radical DPPH• *.

Amostra:	Inibição da Absorbância (%)
G	4,3 ± 0,9 ^b
GNA	3,8 ± 0,8 ^b
GE	58,3 ± 1,5 ^a
GNAE	61,4 ± 2,6 ^a

Fonte: Própria autoria.

* G: Filme controle de gelatina, sem adição de nisina; GNA: filme de gelatina adicionado de natamicina; GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

6.4.14 Estabilidade antioxidante e antimicrobiana dos filmes durante estocagem

Os filmes adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira também foram avaliados quanto a sua estabilidade antioxidante e antimicrobiana por um período de 28 dias, a 25 °C e 58% de umidade relativa, sendo determinado os compostos redutores totais durante esse período. Pode-se observar na Tabela 40, que os filmes G e GNA apresentaram total estabilidade durante o período de acondicionamento, com valores de CFT permanecendo ($p < 0,05$) em torno de 0,75 e 0,82 mg ácido gálico/g de filme, respectivamente (Tabela 40). Por outro lado, observou-se que houve uma pequena redução ($p < 0,05$) nos valores de CFT, de ~7,4 para 6,43

mg ácido gálico/g de filme GE, e de ~7,21 para 6,01 mg ácido gálico/g de filme GNAE (Tabela 40). Entretanto, esses filmes foram estáveis por até 21 dias. Similarmente ao explicado em 6.3.14, essa estabilidade dos filmes ativos dupla camada pode estar associada ao fato desses materiais se encontrarem no estado vítreo, uma vez que foram acondicionados em temperatura (25 °C) menor que a T_{G2} (~47 °C, Tabela 35).

Tabela 40: Compostos redutores totais (CRT) dos filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de natamicina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada* durante armazenamento a 25 °C e 58% de umidade relativa.

Amostra:	CRT (mg ácido gálico/g de filme)				
	0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
G	0,78 ± 0,25 ^a	0,76 ± 0,11 ^a	0,80 ± 0,09 ^a	0,75 ± 0,15 ^a	0,73 ± 0,14 ^a
GNA	0,86 ± 0,19 ^a	0,79 ± 0,21 ^a	0,83 ± 0,08 ^a	0,81 ± 0,06 ^a	0,82 ± 0,11 ^a
GE	7,59 ± 0,89 ^a	7,35 ± 1,02 ^a	7,40 ± 0,18 ^a	7,15 ± 0,95 ^a	6,43 ± 0,44 ^b
GNAE	7,21 ± 0,44 ^a	7,05 ± 0,54 ^a	6,92 ± 1,20 ^a	6,34 ± 0,33 ^a	6,01 ± 0,87 ^b

Fonte: Própria autoria.

* GE: filme de gelatina adicionado de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNAE: filme de gelatina adicionado de natamicina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma linha, seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Adicionalmente, foram realizados testes de sensibilidade para se verificar a atividade antifúngica dos filmes contra os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium ssp* ao longo do tempo de acondicionamento. Não foram observadas diferenças nos halos provocados pelos filmes, até 28 dias de armazenamento, para ambos os fungos, o que permite sugerir que os filmes apresentaram boa estabilidade durante os 28 dias de acondicionamento. Os halos de inibição encontrados para as amostras de filmes adicionados de natamicina ficaram em torno de 9 mm, ligeiramente maiores do que o diâmetro do disco de filme utilizado (6 mm). Para os filmes adicionados de natamicina e

extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, observou-se que esses halos de inibição foram similares (em torno de 8,5 mm).

Esses resultados obtidos no teste de estabilidade indicaram que os filmes mantiveram a atividade antifúngica da natamicina ao longo do período estudado, e que o extrato teve sua capacidade redutora ligeiramente diminuída depois de 28 dias de armazenamento.

6.5 Aplicação dos filmes ativos na conservação de Copa fatiada

Para a aplicação dos filmes ativos na conservação de copa fatiada foram escolhidos os filmes contendo nisina (56 mg/g gelatina), extrato hidroetanólico de folha de pitangueira (150 mg EHFP/g de gelatina) e ambos os aditivos juntos, aplicados como carreadores de compostos ativos juntos do produto, embalado em uma embalagem convencional. Essa escolha teve como base os resultados microbiológicos e de atividade antioxidante desses filmes, encontrados nessa tese, uma vez que para concentrações acima de 56 mg de nisina/g de gelatina não houve diferença significativa no tamanho dos halos de inibição formados.

Ao todo foram preparados 5 tratamentos, denominados SF: Amostra de copa fatiada e acondicionada sem filme ativo; G: Amostra de copa fatiada acondicionada com filme de gelatina; GN: Amostra de copa fatiada acondicionada com filme de gelatina contendo nisina na segunda camada; GE: Amostra de copa fatiada acondicionada com filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada; GNE: Amostra de copa fatiada acondicionada com filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada (Figura 41), que foram mantidas em um expositor, à 4 °C, por um período total de 120 dias.

Seis amostras eram retiradas a cada 30 dias, sendo que três amostras eram destinadas às análises microbiológicas, e as outras três, destinadas às análises físico-químicas.

Figura 41: Exemplos de fatias de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada*, e embaladas à vácuo.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina cm nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

6.5.1 Composição centesimal da copa fatiada

A composição centesimal da copa fatiada pode ser observada na Tabela 41. Observou-se que os principais compostos da copa são a água (~41,8%), a proteína (~17,6%) e os lipídeos (~22%). Por ser rica em lipídeos, a copa é um produto susceptível

à deterioração por oxidação, daí a importância de uma embalagem com atividade antioxidante. Os valores de lipídeos estão de acordo com valores reportados na literatura para copa (ZANARDI et al., 2000; ZANARDI et al., 2009). O teor de proteínas da copa é comparável aos encontrados por Zanardi et al. (2000).

Tabela 41: Composição centesimal da copa (base úmida).

Componente:	Teor (%)
Umidade	41,8 ± 0,7
Proteína	27,6 ± 0,6
Lípido	22,0 ± 1,2
Cinzas	6,1 ± 0,4
Carboidratos	2,5 ± 0,6

Fonte: Própria autoria.

Zanardi et al. (2000) estudaram três produtos distintos: salame Milano, copa e presunto Parma, e concluíram que a composição centesimal da copa era mais variável e por vezes mais difícil de ser comparada com outros estudos, devido à estrutura anatômica dos músculos utilizados para seu processamento, tratando-se, na realidade, de vários músculos separados por depósitos de gordura intermuscular, conforme descrito por Schivazappa et al. (1997).

6.5.2 Análises físico-químicas da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

6.5.2.1 pH da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

Com relação ao pH das amostras de copa (Figura 42), observou-se que nem o tempo de armazenamento e nem as diferentes formulações de filmes utilizadas

influenciaram ($p>0,05$) esse parâmetro. Os valores de pH das amostras de copa fatiada variaram de 6,32 e 6,91, sem diferenças significativas.

Figura 42: pH das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Comportamento similar foi observado por Sahin et al. (2017) para “*sucuk*” (um tipo de salame seco e apimentado, originário da Turquia) fatiado recoberto com solução de quitosana. No entanto o *sucuk* tem um valor de pH menor do que o da copa. Esses autores reportaram que o pH inicial do *sucuk* estava em torno de 4,32 e que não diferiu nem com relação aos diferentes grupos de amostra, nem ao longo do experimento, que durou 3 meses.

De acordo com Busconi; Zacconi e Scolari (2014), a copa tem um pH característico que varia entre 5,7 e 6,8, de acordo com o estágio de maturação, que pode demorar de 6 – 12 meses, no entanto, o fatiamento poderia ser um fator crítico.

Assim, os valores encontrados nesse trabalho estão dentro da faixa de pH normal reportada para esse tipo de produto.

Valores similares de pH também foram reportados por Zanardi et al. (2000). Esses autores encontraram valores de pH em torno de 6,2 para copa fatiada, ligeiramente superior ao pH encontrado para o salame italiano e o presunto Parma.

6.5.2.2 Umidade e atividade de água da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

A umidade da copa recém fatiada (~43,6%), diminuiu ao longo do tempo (Figura 43), independente da formulação de filme utilizada. A amostra embalada diretamente à vácuo, sem o filme de gelatina, apresentou uma diminuição menos pronunciada da umidade, variando de 43,6 a 37,9% ao final dos 120 dias de teste, assim como as amostras embaladas em filmes de gelatina com nisina na segunda camada (GN), que conseguiram manter a umidade próxima à do controle SF até os 90 dias do experimento, com uma queda acentuada da umidade depois de 120 dias.

Essa redução na umidade de produtos cárneos fatiados já foi reportada previamente em salame (GARCIA et al., 2000; CAMPAGNOL et al., 2007) e *sucuk* fatiado (SAHIN et al., 2017), no entanto, a influência do filme a base de gelatina na umidade dos filmes ficou evidenciada, com valores de umidade bem mais reduzidos ao longo de todo o experimento, dando a impressão que uma parcela da umidade da copa migrou para os filmes.

Figura 43: Umidade das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Com relação à atividade de água (Figura 44), foi observada uma redução para todas as amostras nos primeiros 30 dias de armazenamento, sendo que após esse período os valores de atividade de água permaneceram muito próximos, sem variação significativa desse parâmetro ao longo do tempo ou com relação às diferentes formulações de filme utilizadas. Os valores de atividade de água reportados previamente na literatura para esse tipo de produto variam entre 0,84 e 0,94, e também estão relacionados com o estado de maturação da copa e o seu fatiamento e armazenamento (ZANARDI et al., 2000).

Os valores iniciais de atividade de água encontrados para a copa fatiada ficaram em torno de 0,88, dentro da faixa reportada na literatura, e o menor valor de atividade

de água foi reportado para as amostras envolvidas em filmes contendo nisina e EHFP, que chegou a 0,81, aos 90 dias de experimento.

Figura 44: Atividade de água das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

A atividade de água está fortemente ligada às alterações que podem ocorrer nos alimentos, tanto com relação às reações químicas quanto com relação ao crescimento microbiano (SUN et al., 2002). Assim, a medida de atividade de água de um produto serve para prever ou justificar possíveis variações que ocorrem em um alimento (SHERWIN; LABUZA, 2006). A deterioração microbiológica tem maior significância em produtos com atividade de água mais alta ($A_w \geq 0,9$).

Córdoba (2018) avaliou a variação da atividade de água de mortadela ao longo do seu armazenamento e também observou uma redução nesse parâmetro, que foi

associada à alta capacidade de hidratação dos filmes a base de quitosana e gelatina utilizados entre as fatias de mortadela, que poderiam absorver umidade do produto, reduzindo, assim sua atividade de água.

6.5.2.3 Oxidação lipídica da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

De acordo com Papuc et al. (2017), o processo oxidativo que ocorre em ambas as frações (lipídica e proteica) da carne durante o armazenamento está entre as maiores causas de alterações nos parâmetros de qualidade desses produtos, podendo levar ao desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis, mudanças de cor e até a formação de compostos tóxicos. Assim, a oxidação lipídica de um produto embalado pode ser vista como um índice para a qualidade dos alimentos (LI et al., 2015)

Observou-se que o índice de peróxido das amostras de copa fatiada (Figura 45) aumentou durante o tempo de estocagem, sendo que os maiores aumentos foram para as amostras SF, G e GN; e os menores para as amostras que continham o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada (GE e GNE). Nas amostras SF, G e GN, o índice de peróxidos atingiu o valor de 80,3 meq O_2 /kg após 120 dias de estocagem. E, nas melhores condições, amostras GE e GNE, o índice de peróxido foi aproximadamente a metade, atingindo ~40 meq O_2 /kg. Logo, pode-se sugerir que o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira foi capaz de retardar o processo de oxidação da copa.

O limite aceitável de índice de peróxidos para carne está em torno de 20 meq O_2 /kg, depois disso já é possível detectar o odor de rancidez, de acordo com Bellaver e Zanotto (2004). Assim, as amostras GE e GNE estariam dentro do limite aceitável até os 60 dias de teste, diferentemente das outras amostras, que após os primeiros 30 dias de teste já começaram a apresentar um índice de peróxidos mais alto do que o valor aceitável, embora não tenha protegido o produto em todo o tempo de estocagem.

Figura 45: Índice de peróxido das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Bonilla et al. (2018) aplicaram filmes monocamada a base de quitosana contendo óleo essencial de manjeriço e de tomilho como embalagens de gordura fresca de porco, e obtiveram como resultado a mesma tendência reportada nessa tese. Lekjing et al. (2016) estudaram a estabilidade de salsichas de porco embaladas em quitosana adicionada de óleo essencial de alho e observaram um comportamento similar ao reportado nessa tese, com um aumento nos valores de índice de peróxido ao longo do tempo, mas com um efeito pronunciado dos compostos ativos presentes no filme.

Para as medidas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) observou-se que todas as amostras apresentaram um aumento desse parâmetro ao longo do tempo de armazenamento (Figura 46).

Figura 46: Evolução do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Os valores iniciais de TBARS da copa ficaram em torno de 0,05 mg de MDA (Malondialdeído)/kg de copa, ligeiramente inferiores aos valores reportados por Zanardi et al. (2009), em torno de 0,085 mg de MDA/ kg de copa, o que está dentro da variação esperada, dada a heterogeneidade desse produto. Ao longo do experimento (120 dias) houve uma diferença significativa para as amostras cujo filme continha EHFP (GE e GNE), o que já era esperado, uma vez que já foi comprovada a atividade antioxidante desse extrato, no entanto, esses testes serviram para comprovar a eficácia da adição do extrato na embalagem, e não diretamente no produto. Ainda, serviu para mostrar que a adição de uma quantidade menor de extrato apenas na camada superior do filme que

está em contato com a copa já foi suficiente para reduzir a oxidação lipídica das amostras.

Apesar de ser notável a eficácia do EHFP na preservação da oxidação da gordura da copa, as amostras de copa embaladas nos filmes GE e GNE apresentaram valores de TBARS superiores a 0,5 mg de MDA/kg, após 120 dias, que é considerado o limite de detecção do sabor rançoso pelos consumidores (CHOI et al., 2010).

Tendência similar já foi previamente reportada na literatura para hambúrguer de porco adicionado de extrato de folha de pitangueira (LORENZO et al., 2018). Esses autores reportaram que o extrato de folha de pitangueira adicionado diretamente na carne teve o mesmo desempenho do antioxidante sintético BHT, e foi capaz de manter a estabilidade lipídica da carne pelos 18 dias de armazenamento, enquanto as amostras controle, que não tiveram adição de nenhum antioxidante, apresentaram um aumento crescente do TBARS, chegando a 3,89 mg de MDA/kg de carne.

6.5.2.4 Análises de textura da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

A textura das amostras de copa fatiada foi analisada com duas *probes* diferentes (*Blade set* e *probe* de perfuração de 3 mm) para a determinação da firmeza desse produto ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 42).

Considerando-se que foram observadas diferenças nos valores de umidade da copa fatiada, esperava-se encontrar uma diferença também nos parâmetros de textura. De acordo com Monin et al. (1997), mudanças na textura, principalmente no parâmetro dureza de produtos cárneos curados durante a maturação pode ser atribuídas à umidade e ao estado das proteínas.

Essas mudanças podem continuar durante o período de armazenamento, se houver desidratação do produto, por exemplo. Contudo, contrariamente ao esperado, não se observou diferença significativa na firmeza das amostras ao longo do tempo e nem em relação aos diferentes tipos de embalagem utilizadas. Todas as amostras

apresentaram dureza em torno de 16 N, para os testes com a sonda *Blade set*, e em torno de 5 N, para os testes com a sonda P3, durante todo o período de estocagem.

Tabela 42: Firmeza das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias da copa fatiada utilizando a probe *Blade set* e a probe de perfuração de 3 mm (P3) *.

Dia	Testes usando a sonda <i>Blade set</i> (N)				
	SF	G	GN	GE	GNE
0	16,2 ± 0,8 ^{A,a}	16,2 ± 0,8 ^{A,a}	16,2 ± 0,8 ^{A,a}	16,2 ± 0,8 ^{A,a}	16,2 ± 0,8 ^{A,a}
30	14,5 ± 2,0 ^{A,a}	17,4 ± 1,8 ^{A,a}	13,6 ± 3,4 ^{A,a}	14,1 ± 0,9 ^{A,a}	15,7 ± 1,2 ^{A,a}
60	14,8 ± 5,2 ^{A,a}	17,7 ± 4,2 ^{A,a}	17,4 ± 4,0 ^{A,a}	15,1 ± 2,5 ^{A,a}	16,2 ± 1,4 ^{A,a}
90	17,7 ± 2,2 ^{A,a}	16,5 ± 2,7 ^{A,a}	16,0 ± 4,8 ^{A,a}	16,7 ± 2,9 ^{A,a}	18,2 ± 4,7 ^{A,a}
120	15,0 ± 1,4 ^{A,a}	15,2 ± 2,9 ^{A,a}	14,7 ± 1,3 ^{A,a}	14,5 ± 0,3 ^{A,a}	15,1 ± 1,9 ^{A,a}

Dia	Testes usando a sonda P3 (N)				
	SF	G	GN	GE	GNE
0	6,0 ± 0,3 ^{A,a}	6,0 ± 0,3 ^{A,a}	6,0 ± 0,3 ^{A,a}	6,0 ± 0,3 ^{A,a}	6,0 ± 0,3 ^{A,a}
30	4,8 ± 0,9 ^{A,a}	7,3 ± 1,1 ^{A,a}	5,8 ± 0,9 ^{A,a}	6,6 ± 2,6 ^{A,a}	5,4 ± 0,7 ^{A,a}
60	4,4 ± 1,5 ^{A,a}	6,4 ± 2,3 ^{A,a}	5,8 ± 0,5 ^{A,a}	4,1 ± 1,4 ^{A,a}	5,2 ± 0,4 ^{A,a}
90	4,9 ± 0,4 ^{A,a}	6,6 ± 0,8 ^{A,a}	5,1 ± 1,9 ^{A,a}	4,9 ± 1,7 ^{A,a}	5,8 ± 1,6 ^{A,a}
120	5,4 ± 1,7 ^{A,a}	7,2 ± 1,9 ^{A,a}	5,4 ± 1,7 ^{A,a}	6,8 ± 2,2 ^{A,a}	4,4 ± 2,1 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ao longo do tempo, e médias em uma mesma linha seguida por letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro para diferentes filmes ($p < 0,05$).

Esturk et al. (2009) estudaram as variações na textura de salame fatiado e armazenado em embalagens com atmosfera modificada e diferentes tipos de composição gasosa ao longo do tempo (10 dias). Esses autores encontraram algumas pequenas diferenças na firmeza do salame, sendo que a maior firmeza foi reportada para as amostras que estavam embaladas à vácuo (em torno de 10,8 N).

6.5.2.5 Cor da superfície do produto da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

De maneira geral, não houve influência nem do tempo e nem das formulações da segunda camada dos filmes utilizados na embalagem da copa fatiada sobre a luminosidade (L^*) das amostras, que ficaram muito semelhantes à amostra controle, embalada sem filme, com exceção da amostra GN, que nos dias 90 e 120 do ensaio, apresentou valores ligeiramente menores de L^* , em torno de 35 e 33, respectivamente (Tabela 43).

Essa redução na luminosidade já foi reportada previamente por Pérez-Alvarez et al. (1999) para salsichas curadas do tipo espanhola, que associaram esse resultado a um ressecamento das amostras, que diminuiria os valores de L^* por causa da concentração dos sólidos no produto devido à desidratação. Ruiz et al. (2014) também observaram uma redução na luminosidade de salame italiano, atribuído ao processo de cura, secagem e maturação das amostras.

Por outro lado, Lekjing (2016) encontrou um aumento nos valores de L^* para salsichas de porco em embalagem de quitosana com óleo essencial de alho. Esses autores associaram o aumento da luminosidade das amostras com o aumento nos valores de TBARs e índice de peróxido, sugerindo que o aumento na oxidação deixou as amostras com uma coloração mais suave.

Tabela 43: Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) das amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias **.

	Dia	Amostra				
		SF	G	GN	GE	GNE
L*	0	42,6 ± 1,4 ^{A,a}	42,6 ± 1,4 ^{A,a}	42,6 ± 1,4 ^{A,a}	42,6 ± 1,4 ^{A,a}	42,6 ± 1,4 ^{A,a}
	30	40,1 ± 2,4 ^{A,a}	42,2 ± 3,0 ^{A,a}	37,2 ± 3,3 ^{A,a}	40,2 ± 2,9 ^{A,a}	43,9 ± 3,8 ^{A,a}
	60	39,4 ± 2,7 ^{A,a}	38,5 ± 1,2 ^{A,a}	38,1 ± 1,9 ^{A,a}	41,9 ± 3,8 ^{A,a}	43,7 ± 1,2 ^{A,a}
	90	41,3 ± 1,2 ^{A,a}	35,0 ± 1,6 ^{B,b}	40,4 ± 0,4 ^{A,a}	39,1 ± 2,1 ^{A,a}	41,8 ± 0,9 ^{A,a}
	120	41,0 ± 1,1 ^{A,a}	33,3 ± 1,6 ^{B,b}	43,9 ± 4,1 ^{A,a}	38,4 ± 1,9 ^{A,a}	40,9 ± 0,8 ^{A,a}
a*	0	28,9 ± 1,4 ^{A,a}	28,9 ± 1,4 ^{A,a}	28,9 ± 1,4 ^{A,a}	28,9 ± 1,4 ^{A,a}	28,9 ± 1,4 ^{A,a}
	30	16,5 ± 1,8 ^{B,a}	15,6 ± 1,0 ^{B,a}	16,5 ± 0,6 ^{B,a}	11,2 ± 1,7 ^{C,b}	12,8 ± 1,5 ^{B,b}
	60	15,0 ± 2,2 ^{B,a}	16,5 ± 0,3 ^{B,a}	16,6 ± 0,9 ^{B,a}	13,9 ± 1,2 ^{C,a}	15,0 ± 1,4 ^{B,a}
	90	18,2 ± 1,3 ^{B,a}	15,4 ± 0,4 ^{B,b}	15,8 ± 0,5 ^{B,b}	12,2 ± 1,8 ^{C,b}	15,3 ± 0,7 ^{B,b}
	120	17,7 ± 1,1 ^{B,a}	15,1 ± 0,2 ^{B,a}	14,1 ± 0,6 ^{B,b}	16,8 ± 1,5 ^{B,a}	16,8 ± 4,0 ^{B,a}
b*	0	23,4 ± 1,5 ^{A,a}	23,4 ± 1,5 ^{A,a}	23,4 ± 1,5 ^{A,a}	23,4 ± 1,5 ^{A,a}	23,4 ± 1,5 ^{A,a}
	30	10,1 ± 2,3 ^{B,a}	10,1 ± 1,7 ^{C,a}	11,5 ± 1,5 ^{C,a}	11,0 ± 1,1 ^{C,a}	10,9 ± 2,1 ^{B,a}
	60	12,7 ± 0,4 ^{B,a}	11,5 ± 0,9 ^{B,a}	12,8 ± 1,6 ^{B,a}	11,8 ± 0,1 ^{C,a}	10,5 ± 0,4 ^{B,a}
	90	12,1 ± 0,3 ^{B,a}	13,7 ± 0,9 ^{B,a}	14,4 ± 0,8 ^{B,a}	15,2 ± 1,0 ^{B,a}	13,0 ± 0,6 ^{B,a}
	120	15,5 ± 3,4 ^{B,a}	14,1 ± 2,0 ^{B,a}	15,5 ± 4,1 ^{B,a}	16,1 ± 0,5 ^{B,a}	17,8 ± 6,4 ^{B,a}

Fonte: Própria autoria.

** SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina cm nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira. Médias em uma mesma coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro ao longo do tempo, e médias em uma mesma linha seguida por letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa para um mesmo parâmetro para diferentes filmes ($p < 0,05$).

Com relação ao parâmetro a^* , observou-se que esses valores sofreram uma redução significativa durante os primeiros 30 dias de armazenamento para todas as formulações estudadas, sendo que nos demais pontos experimentais esse valor continuou estável. Ainda foi observado que, de maneira geral, as amostras GE e GNE apresentaram valores menores de a^* quando comparadas às outras formulações. Essa

redução em a^* indicou que a cor das amostras ficou menos avermelhada na estocagem, e esse comportamento já foi reportado previamente para outros produtos cárneos.

Fernández-López et al. (2005) estudaram os parâmetros de cor da superfície de mortadela e verificaram que também houve uma redução em a^* das amostras ao longo do tempo, o que poderia estar relacionada com a integridade estrutural da mortadela, ou com o conteúdo e a disposição de pigmentos hidro ou lipossolúveis e pela disponibilidade de água na superfície.

O parâmetro b^* teve um comportamento muito similar ao a^* , com uma redução desses valores ao longo do tempo para todas as amostras. No entanto, para esse parâmetro, não houve diferença entre as formulações de filme utilizadas na embalagem, sendo o tempo de estocagem, o único fator que apresentou diferença significativa. Esses resultados (L^* , a^* e b^*) indicam que houve certo escurecimento das amostras de copa durante a estocagem, que pode ter ocorrido devido a perda de umidade das amostras (Figura 43), mas também devido a oxidação em algumas amostras (Figuras 45 e 46).

Lekjing (2016) também observou uma redução em a^* e b^* para salsichas de porco embaladas em quitosana incorporada de óleo essencial de alho e associaram esses resultados às mudanças ocorridas na carne por causa da oxidação, que causou uma cor pálida nas amostras.

6.5.2.6 Análises microbiológicas da copa fatiada durante a estocagem refrigerada

As análises microbiológicas foram realizadas na copa fatiada para se estudar a efetividade dos filmes ativos contra as cepas de *S. aureus*, bactérias ácido-láticas (BAL) e bactérias psicrotróficas. Foi observado, na contagem das bactérias *S. aureus* (Figura 47), que as amostras embaladas com o filme controle (G) não foram diferentes das amostras embaladas sem filme (SF), mas que estas foram significativamente

diferentes das amostras embaladas com filmes ativos (GN, GE e GNE). Para as amostras SF e G houve um aumento contínuo na contagem de *S. aureus* até o final do experimento. Já para as amostras GN, GE e GNE, embora a contagem também tenha aumentado ao longo do período de armazenamento, observou-se que esse aumento foi bem inferior, sugerindo que os filmes de gelatina adicionados de compostos ativos foram capazes de reduzir significativamente a contagem de *S. aureus*, o que está de acordo com os resultados apresentados previamente na caracterização dos filmes. Ainda, pode-se sugerir que os compostos ativos presentes no filme não perderam a eficiência em contato com a superfície do produto ao longo do tempo estudado.

Figura 47: Contagem de *S. aureus* (SA) nas amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Ao longo do armazenamento, o filme GNE apresentou maior eficácia antimicrobiana, embora os filmes GE e GN também tenham apresentado desempenho notável. Esse resultado permitiu inferir que houve um efeito bactericida sinérgico entre esses agentes ativos.

De acordo com a legislação (ANVISA, 2001), o limite aceitável para contagem de *S. aureus* em produtos cárneos maturados e fatiados como a copa é de 4 log UFC/g de produto, o que permite inferir que a adição de nisina em conjunto com o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira nos filmes foi capaz de garantir a qualidade microbiológica da copa fatiada até o final do experimento (120 dias).

Uma mesma tendência foi observada para as cepas de bactérias psicotróficas (Figura 48), cuja contagem foi similar para os diferentes filmes utilizados nos primeiros dias de armazenamento, diferenciando-se logo depois para os filmes ativos (GN, GE e GNE). Ao final de 120 dias de armazenamento observou-se uma contagem em torno de 6 Log UFC/g para as amostras SF e G contra 4 Log UFC/g para as amostras GN, GE e GNE, comprovando mais uma vez a eficiência da nisina e do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na conservação microbiológica de produtos cárneos.

É interessante observar também que na análise de bactérias psicotróficas as amostras GE e GNE apresentaram valores um pouco menores de colônia do que as amostras GN, o que poderia estar relacionado com o fato de haver bactérias Gram negativas no grupo das psicotróficas, sendo que a nisina tem maior efetividade para bactérias Gram positivas.

Cao et al. (2019) estudaram o efeito de filmes monocamada de quitosana adicionados de nisina e ácido gálico para conservação de carne de porco e reportaram, ao longo de 20 dias de armazenamento, um efeito inibitório significativo para amostras envolvidas em filmes ativos em comparação com as amostras controle.

Resultados similares também foram reportados por Lorenzo et al. (2018) para hambúrguer de porco com adição direta de extrato hidroetanólico de folha de

pitangueira. Esses autores reportaram uma redução na contagem de bactérias totais para as amostras com extrato em comparação ao controle.

Figura 48: Contagem bactérias psicrotróficas (BP) nas amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina cm nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Finalmente, as amostras foram testadas para bactérias ácido-láticas (BAL) e os resultados podem ser observados na Figura 49.

O comportamento das amostras foi muito similar àqueles reportados anteriormente, com uma diferença significativa entre as amostras controle (SF e G) e as amostras adicionadas de compostos ativos. Contudo, para as BAL foi possível observar que após o dia 30 os valores foram praticamente constantes.

Figura 49: Contagem de bactérias ácido-láticas (BAL) nas amostras de copa cobertas com filmes dupla camada a base de gelatina adicionados de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada, e embaladas à vácuo, durante estocagem a 4 °C por 120 dias *.

Fonte: Própria autoria.

* SF: Amostra embalada sem filme; G: Amostra embalada em filme de gelatina; GN: Amostra embalada em filme de gelatina cm nisina; GE: Amostra embalada em filme de gelatina com extrato hidroetanólico de folha de pitangueira; GNE: Amostra embalada em filme de gelatina com nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira.

Embora seja possível notar tanto o efeito da nisina quanto do extrato na inibição das bactérias ácido-láticas, a nisina se mostrou ligeiramente mais efetiva, provavelmente por se tratar de bactérias Gram positivas. De acordo com Samelis e Georgiadou (2000), esse tipo de bactéria é a maior causa de deterioração de carnes refrigeradas. Lorenzo et al. (2018) também reportaram uma redução na contagem de BAL em hambúrgueres de porco adicionados de diferentes concentrações de extrato de folha de pitangueira, o que corrobora com a hipótese de que o EHFP tem atividade antioxidante e antimicrobiana.

7 Conclusões

Analisando os resultados obtidos nesta tese, concluiu-se que a incorporação de agentes ativos como a nisina, a natamicina e o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira podem ser adicionados nos filmes sem prejuízo nas propriedades do filme de gelatina. Ainda, é possível inferir que a adição conjunta de agentes antimicrobianos com o extrato hidroetanólico de folha de pitangueira é viável, sendo que um composto ativo não interfere na efetividade do outro.

Concluiu-se também que a produção de filmes dupla camada é viável e que a adição dos agentes ativos apenas em uma fina camada na superfície dos filmes foi suficiente para conferir atividades antimicrobiana e antioxidante nesses materiais, sugerindo que esses compostos, geralmente de alto custo, podem ser usados em quantidades bem pequenas e apresentar o mesmo desempenho, o que comprova as hipóteses dessa tese.

Algumas propriedades dos filmes de gelatina sofreram ligeiras alterações com a adição de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e/ou nisina, como as propriedades mecânicas, a solubilidade e o ângulo de contato, enquanto esses compostos ativos não causaram alteração significativa nos parâmetros dos espectros de FTIR, indicando que não foram formadas novas ligações químicas, nas propriedades térmicas, na umidade dos filmes e na permeabilidade ao vapor de água.

A adição de natamicina mostrou um efeito maior nas propriedades dos filmes de gelatina, quando comparada com a adição de nisina, com alterações mais visíveis principalmente nas propriedades mecânicas e estruturais dos filmes, no ângulo de contato, na rugosidade e na solubilidade em água, mas também não alterou a permeabilidade ao vapor de água e nem apresentou formação de novas ligações, levando em conta os espectros de FTIR obtidos.

As propriedades de barreira à luz UV/Visível foram influenciadas tanto pela adição dos agentes antimicrobianos (nisina e natamicina), quanto pela adição do agente

antioxidante (extrato hidroetanólico de folha de pitangueira), sendo que a maior redução da transmitância na região do visível ocorreu para os filmes adicionados de natamicina, provavelmente por causa do aumento da opacidade dos filmes de gelatina, ocasionada pela adição de composto ativo. Esses resultados sugerem que os filmes ativos produzidos poderiam ser utilizados para diminuir a oxidação lipídica de produtos alimentícios, uma vez que oferecem barreira à luz. Além disso, o aumento no teor de compostos redutores totais e a atividade antioxidante determinada nos filmes adicionados de extrato hidroetanólico de folha de pitangueira permitiram inferir que os filmes adicionados de extrato apresentaram boa atividade antioxidante e que também são passíveis de aplicação em produtos com alto teor de gorduras, com a finalidade de reduzir ou retardar a oxidação desses produtos.

A aplicação dos filmes dupla camada de nisina e/ou extrato hidroetanólico de folha de pitangueira como carregadores de compostos ativos na conservação de Copa fatiada, mantida sob refrigeração permitiu uma menor evolução da oxidação do produto e da contagem de bactérias ao longo do período de estocagem, sendo que o tratamento que mais se destacou na conservação da copa fatiada foi aquele que teve adição conjunta de nisina e extrato hidroetanólico de folha de pitangueira na segunda camada (GNE), por apresentar um valor menor do que o valor limite de TBARS ao longo de 90 dias de armazenamento refrigerado, além de ter sido o tratamento capaz de manter a contagem de bactérias menor do que o limite estabelecido na legislação ao longo de todo o tempo estudado. Tais resultados são promissores, uma vez que a adição de compostos ativos na embalagem pode reduzir a adição direta de compostos ativos nos alimentos.

8 Referências

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, p. 177-183, 2014.
- Achet, D. C.; He, X. W. Determination of the renaturation level in gelatin films. **Polymer**, v. 36, p.787-791, 1995.
- Albu, S. et al. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 261–265, 2004.
- Alves, P. M. A. et al. Development of films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1751-1757, 2011.
- Amorim, A. C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia Uniflora* L. (*Brazilian Pitanga*). **Phytomedicine: International Journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 16, p. 923-928, 2009.
- Andrade, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, *Leguminosae-mimosoideae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, v. 17, p. 231-235, 2007.
- Andrade, R. et al. Wettability of gelatin coating formulations containing cellulose nanofibers on banana and eggplant epicarps. **LWT – Food Science and Technology**, v. 58, p. 158-165, 2014.
- Andrade, J. C. et al. Consumer sensory and hedonic perception of sheep meat coppa under blind and informed conditions. **Meat Science**, v. 137, p. 201-210, 2018.

Angelo, P. M.; Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão.

Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 66, p. 232-240, 2007.

Antoniassi, R. Métodos de Avaliação da Estabilidade Oxidativa de Óleos e Gorduras.

Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos – B. CEPPA, v. 19, p. 353-380, 2001.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 12.2001 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, 2001.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 267. 22 de setembro de 2006. Regulamento técnico de vegetais para o prepare de chás, 2006.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. AOAC Official method of analysis, 1996.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. AOAC Official method of analysis, 950, 46, moisture in meat, 1991.

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

Argotti, J. C. et al. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2399-2406, 2011.

Arzate-Vázquez, I. et al. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 289-299, 2012.

Auricchio, M. T., Bacchi, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades fármaco-botânicas, químicas e farmacológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 62, p. 55 - 61, 2003.

Balaguer, M. P. et al. Functional properties and antifungal activity of films based on gliadins containing cinnamaldehyde and natamycin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 62-71, 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 Bioprocess Technology**, v. 6, 2419-2428, 2013.
- Bastarrachea, L. et al. Biodegradable Poly (butylene adipate-co-terephthalate) films incorporated with nisin: characterization and effectiveness against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 215-224, 2010.
- Bellaver, C. e Zanotto, D. L. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal. In: Conferencia Apinco de Ciencia e Tecnologia Avícolas, Santos, SP. **FACTA**, v.1, p.79-102, 2004.
- Bergo, P., Moraes, I. C. F., Sobral, P. J. A. Effects of moisture and content on structural and dielectric properties of cassava starch films. **Starch**, v. 64, p. 835-839, 2012.
- Bergo, P.; Sobral, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1285-1289, 2007.
- Bertolo, M. R. V. et al. Rheological and antioxidant properties of chitosan/gelatin-based materials functionalized by pomegranate peel extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, e115386, 2020.
- Bico, J.; Thiele, U.; Quéré, D. Wetting of textured surfaces. **Colloids Surface**, v. 206, p. 41-46, 2008.
- Bierhalz, A. C. K.; Silva, M. A.; Kieckbusch, T. G. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 18-25, 2012.
- Bíscola, V. **Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos**. 2007. 74f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo. 2007.
- Bitencourt, C. M. **Desenvolvimento e aplicação de filmes à base de gelatina aditivados com extrato etanólico de cúrcuma (*Curcuma longa* L.)**. 2013. 108f.

- Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2013.
- Bitencourt, C. M. et al. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 145–152, 2014.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- Bodini, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT- Food Science and Technology**, v. 51, p. 104-110, 2013.
- Boelter, J. F.; Brandelli, A. Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 740-747, 2016.
- Bonilla, J. et al. Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. **Food Bioscience**, v. 23, p. 107-114, 2018.
- Bonilla, J.; Sobral, P. J. A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Food Bioscience**, v. 16, p. 17-25, 2016.
- Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Portaria DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Diário Oficial da União, Poder, de 22 de janeiro de 1996. Disponível em: www.anvisa.gov.br, 1996.
- Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC Nº. 28 de 23 de fevereiro de 2001. Aprova a extensão de uso da Natamicina (Pimaricina) (INS 235). Regulamento Técnico para Padrões. Brasília-DF, 2001.
- Brewer, M. S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.

- Busconi, M.; Zacconi, C.; Scolari, G. Bacterial ecology of PDO Coppa and Pancetta Piacentina at the end of ripening and after MAP storage of sliced product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 13-20, 2014.
- Cagri, A.; Ustunol, Z.; Ryser, E. T. Antimicrobial edible films and coatings. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 833-848, 2004.
- Campagnol, P. C. B. et al. Salami sausage prepared with *Lactobacillus plantarum* fermented in porcine plasma culture medium. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 883-889, 2007.
- Cao, L. et al. Importance and efficiency of indepth antimicrobial activity for the control of *Listeria* development with nisin incorporated sodium caseinate films. **Food Control**, v. 21, p. 1227-1233, 2010.
- Cao, Y.; Warner, R. D.; Fang, Z. Effect of chitosan/nisin/gallic acid coating on preservation of pork loin in high oxygen modified atmosphere packaging. **Food Control**, v. 101, p. 9-16, 2019.
- Carvalho, F. A. L. et al. Effect of guaraná (*Paullinia cupana*) seed and pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaf extracts on lamb burgers with fat replacement by chia oil emulsion during shelf life storage at 2 °C. **Food Research International**, v. 125, 108554, 2019.
- Cé, N. **Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis e morangos minimamente processados**. 2009. 95f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre, 2009.
- Cé, N.; Noreña, C. P. Z.; Brandelli, A. Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. **CyTA – Journal of Food**, v. 10, p. 21-26, 2012.
- Cervher, E. et al. Preparation and characterization of natamycin: gamma-cyclodextrin inclusion complex and its evaluation in vaginal mucoadhesive formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 4319–4335, 2008.

- Chivrac, F. et al. Aromatic copolyester-based nano-biocomposites: Elaboration, structural characterization and properties. **Journal of Polymer Environ**, v. 14, p. 393-401, 2006.
- Choi, Y. S. et al. Effects of replacing pork back fat with vegetable oils and rice bran fiber on the quality of reduced-fat frankfurters. **Meat Science**, v. 84, p. 557–563, 2010.
- Cirqueira, R. T. **Efeitos dos extratos aquosos de jambolão (*Eugenia jambolana* Lamark) e pitanga (*Eugenia uniflora* Linnaeus) sobre os parâmetros renais e a pressão arterial em ratos *wistar***. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2006.
- Cleveland, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobial for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.
- Coma, V. et al. Antimicrobial Edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 470-475, 2001.
- Córdoba, L. J. P. **Filmes a base de blenda de gelatina-quitosana com agentes ativos nanoemulsificados: desenvolvimento, caracterização e aplicação na conservação de mortadela fatiada refrigerada**. 2018. 223f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2018.
- Corrales, M.; Han, J. H.; Tauscher, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation onto pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 425-433, 2009.
- Correa, J. P. et al. Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin. **Food packaging and shelf life**, v. 11, p. 31-39, 2017.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-778, 2005.

- Cruz, C. V. M. **Estudo das propriedades de barreira em filmes de nanocompósitos obtidos de blendas de PEAD/PEBDL com montmorilonita organofílica**. 2013. 119f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas. 2013.
- Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. **Química dos Alimentos de Fennema**, Ed 4. Porto Alegre. Artmed, 2010.
- Davidson, P. M.; Harrison, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. **Food Technology**, v. 56, p. 69–78, 2002.
- Delves-Broughton, J.; Thomas, L. V.; Williams, G. Natamycin as an antimycotic preservative on cheese and fermented sausages. **Food Australia**, v. 58, p. 19-21, 2006.
- Denardim, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drugs Analysis**. V. 23, p. 387-398, 2015.
- Dorman, H. J. D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 51, p. 4563-4569, 2003.
- Du, W. X. et al. Physical and antibacterial properties of edible films formulated with apple skin polyphenols. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 149-155, 2011.
- Ehsani, A. et al. Effect of different types of active biodegradable films containing lactoperoxidase system or sage essential oil on the shelf life of fish burger during refrigerated storage. **LWT- Food Science and Technology**, v. 117, 108633, 2020.
- Esturk, O.; Ayhan, Z. Effect of modified atmosphere packaging and storage time on physical and sensory properties of sliced salami. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 114-125, 2009.
- Fadavi, G. et al. Composition and physicochemical properties of Zedo gum exudates from *Amygdalus scoparia*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1074–1080, 2014.
- Fang, Y. et al. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 188-193, 2002.

- Fernández-López, et al. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: Application in beef meatballs. **Meat Science**, v. 69, p. 371-380, 2005.
- Ferry, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**, Ed 3. New York. John Wiley & Sons, 1980.
- Field, D. et al. The generation of nisin variants with enhanced activity against specific Gram-positive pathogens. **Molecular Microbiology**, v. 69, p. 218-230, 2008.
- Fiuza, T. S. et al. caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 01-11, 2008.
- Flaker, C. H. C. et al. Gelatin-based nanocomposite films: a study on montmorillonite dispersion and concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 65-70, 2015.
- Flores, S. et al. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. **Food Research International**, v. 40, p. 257-265, 2007.
- Flores, S. K., Gerschenson, L. N., Jagus, R. J., Sanjurjo, K. J. **Strategies for extending shelf life of foods using antimicrobial edible films**. In B. Siegler (Ed.), Focus in food engineering. Series food science and technology (pp. 69–99). New York: Nova Science Publishers Inc, 2010.
- Fortes, G. A. C. et al. Antioxidant activities of hydrolysable tannis and flavonoid glycosides isolated from *Eugenia uniflora* L. **Records of Natural products**. Gebze-Kocaeli, v. 2, p. 251-256, 2015.
- Fraga, A., Williams, R. J. J. Thermal properties of gelatin films. **Polymer**, v. 26, p. 113-118, 1985.
- Franchetti, S. M. M.; Marconato, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade de resíduos plástico. **Química Nova**, v. 29, p. 811-816, 2006.
- Frost, K. et al. Crystallinity and structure of starch using wide angle X-ray scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 543–548, 2009.

- Fukumoto, L. R.; Mazza, G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3597-3604, 2001.
- Furtado, M. M. A arte e a ciência do queijo. 2. ed. São Paulo: **Globo**, 1991.
- Gálvez, A. et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.
- García, D. et al. Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts. **Food Control**, v. 22, p. 1378-1384, 2011.
- Garcia, F. T.; Gagleazzi, U. A.; Sobral, P. J. A. Variation of physical and chemical properties of Italian salami during fermentation and drying. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 151-158, 2000.
- García, P. et al. Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 373-382, 2010.
- Garmus, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4-14, 2014.
- Gennadios, A. et al. Mechanical properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, v.61, p. 585-589, 1996.
- German, J. B. Antioxidants. In: Thorngate, J. H., Salminen, S., Branen, L. A., Davidosn, M. P. (Ed). **Food Aditives**, CRC Press, 2002.
- Gómez-Estaca, J. et al. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, v. 112, p. 18-28, 2009.
- Gómez-Estaca, J. et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 27, p. 889-896, 2010.

- Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J. L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 190-195, 1992.
- González-Forte, L. S. et al. Effect of natamycin on the physicochemical properties of corn starch-based films and their effect on *Penicillium spp.* Activity. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 24, p. 63-74, 2019.
- González, R. D. et al. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. **Food Microbiology**, v. 20 p. 601-604, 2003.
- Good, R.; Chaudhury, M.; Yeung, C. A new approach for determining roughness by means of contact angles on solids. **First International Congress on Adhesion Science and Technology**, p. 181-197, 1998.
- Govarís, A. et al. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 175-180, 2010.
- Grower, J. L.; Cooksey, K.; Getty, K. J. K. Development and characterization of an antimicrobial packaging film coating containing nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 475-479, 2004.
- Guerra, N. P. et al. Development of a bioactive packaging celofane using Nisaplin as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 106-110, 2005.
- Gutter, C. N. Microbial control by packaging: A review. **Food of Science Nutrition**, v. 42, p. 151-161, 2002.
- 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.
- Herman, C. et al. Effect of temperature, pH and NaCl on nisin activity against *Lactobacillus fructivorans*. **The Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 97, p. 11-18, 2009.

- Hoffman, A. et al. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotic. **Il Farmaco**, v. 57, p. 658-691, 2001.
- Hong, S. I.; Lee, J. W.; Son, S. M. Properties of polysaccharide-coated polypropylene films as affected by biopolymer and plasticizer types. **Packaging Technology and Science**, v. 18, p. 1-9, 2005.
- Hopkins, E. J. et al. Effects of flaxseed oil concentration on the performance of a soy protein isolate-based emulsion-type film. **Food Research International**, v. 67, p. 418-425, 2015.
- Imran, M. et al. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physicochemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 219-225, 2010.
- Jancikova, S. et al. Furcellaran/gelatin hydrolysate/Rosemary extract composite films as active and intelligent packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 19-28, 2019.
- Januário, M. M. S. et al. Gelatin films with lycopene: mechanical, water vapor barrier, color, and light barrier properties. **Italian Journal of Food Science**, V. Special, p. 126-129, 2009.
- Jin, T., Zhang, H. Biodegradable Polylactic Acid Polymer with Nisin for Use in Antimicrobial Food Packaging. **Food Microbiology and Safety**, v. 73, p. 127-134, 2008.
- Jorge, M. F. C. **Caracterização de filmes nanocompósitos biodegradáveis a base de gelatina produzidos com um aplicador automático de filmes**. 2012. 159f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2012.
- Ju, A.; Song, K. B. Development of teff starch films containing camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) extract as an antioxidant packaging material. **Industrial Crops and Products**, v. 141, 111737, 2019.

- Jridi, M. et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, 67, 373–379, 2014.
- Kaewprachu, P. et al. Gelatin films with nisin and catechin for minced pork preservation. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, p. 173-183, 2018.
- Kadam, S. U. et al. Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 6, p. 68-74, 2015.
- Kanatt, S. R.; Makwana, S. H. Development of active, water-resistant carboxymethyl cellulose-poly vinyl alcohol-*Aloe vera* packaging film. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, 115303, 2020.
- Kanatt, S. R. et al. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 290-297, 2012.
- Katzung, B. G. Farmacologia básica e clínica. 4 ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 1995.
- Kaur, C.; Kapoor, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – The millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 703-725, 2001.
- Kaya, M. et al. Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina's* fruit extract and seed oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 287-297, 2018.
- Kerry J. P., O'Grady M. N., Hogan S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v. 74, p. 113-130, 2006.
- Ko, S. et al. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their actions against *Listeria Monocytogenes*. **Food Microbiology and Safety**, v. 66, p. 1006-1011, 2001.
- Krochta, J. M., and de Mulder-Johnston, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, p. 61-74, 1997.

- Kruger, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégãos e nisina**. 2006. 70 f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2006.
- La Stora, A. et al. Characterization of bacteriocin-coated antimicrobial polyethylene films by atomic force microscopy. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 48-54, 2008.
- Lee, C. H. et al. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 323-329, 2004.
- Lee, J. W.; Son, S. M.; Hong, S. I. Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 484-493, 2008.
- Lekjing, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat Science**, v. 111, p. 192-197, 2016.
- Li, J. H. et al. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 166-173, 2014.
- Li, X. et al. Fabrication of gelatin-laponite composite films: Effect of the concentration of laponite on physical properties and the freshness of meat during storage. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 390-398, 2015.
- Liu, Q. et al. Influence of natamycin loading on the performance of transglutaminase-induced crosslinked gelatin composite films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 2425-2436, 2019.
- Liu, Y. et al. Properties of soy protein isolate antimicrobial films and its application in preservation of meat. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 29, p. 589-600, 2017.
- Lorenzo, J. M. et al. Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. **Food Research International**, v. 114, p. 47-54, 2018.

- Louli, V.; Ragoussis, N.; Magoulas, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 201–208, 2004.
- Ma, Q.; Liang, S.; Xu, S.; Li, J.; Wang, L. Characterization of antioxidant properties of soy bean protein-based films with *Cortex Phellodendri* extract in extending the shelf life of lipid. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, 100413, 2019.
- Makishi, G. L. A. **Propriedades de soluções filmogênicas de gelatina ou colágeno com extratos de boldo-do-Chile**. 2016. 157f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2016.
- Marcos, B. et al. Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing α -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 1, p. 140-150, 2014.
- Marin, L. et al. Antifungal vanillin-imino-chitosan biodynamic films. **Journal of Materials Chemistry B**, e20558. DOI: 10.1039/c3tb20558d, 2013.
- Martinez-Correa, H. A. et al. Extracts from Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 998–1006, 2011.
- Marvdashti, L. M.; Yavarmanesh, M.; Koocheki, A. Controlled release of nisin from polyvinyl alcohol – *Alyssum homolocarpum* seed gum composite films: Nisin kinetics. **Food Bioscience**, v. 28, p. 133-139, 2019.
- Matos, C. R. **Parahidroxifenilsalicilamida e natamicina no controle de fungos na superfície de salames tipo milano**. 2009. 85f. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Santa Catarina, 2009.
- Matta, E.; Tavera-Quiroz, M. J.; Bertola, N. Active edible films of methylcellulose with extracts of green apple (*Granny Smith*) skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1292-1298, 2019.

- Mei, J. et al. Characterization and antimicrobial properties of water chestnut starch-chitosan edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 169-174, 2013.
- Meira, S. M. M., Zehetmeyer, G., Werner, J. O., Brandelli, A. A novel active packaging material based on starch-halloysite nanocomposites incorporating antimicrobial peptides. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 561-570, 2017.
- Mendes, M. V. et al. Engineered Biosynthesis of Novel Polyenes: A Pimaricin Derivative Produced by Targeted Gene Disruption in *Streptomyces natalensis*. **Chemistry & Biology**, v. 8, p. 635-644, 2001.
- Méndez, L. M. R. **Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de manjerição (*Ocimum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) ou hortelã (*Mentha piperita*)**. 2017. 159f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2017.
- Miltz, J. et al. Potency Evaluation of a Dermaseptin S4 Derivative for antimicrobial food packaging applications. **Packaging technology and science**, v. 19, p. 345-354, 2006.
- Mir, S. A. et al. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science and Technology**, v. 80, p. 141-154, 2018.
- Moditsi, M.; Lazaridou, A.; Moschakis, T.; Biliaderis, C. G. Modifying the physical properties for dairy protein films form controlled release of antifungal agents. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 195-203, 2014.
- Monin, G. et al. Chemical and structural changes in dry-cured hams (*Bayonne Hams*) during processing and effects of dehairing technique. **Meat Science**, v. 47, p. 29–47, 1997.
- Montes, M. L. I.; Luzi, F.; Domicini, F.; Torre, L.; Cyras, V. P.; Manfredi, L. B.; Puglia, D. Design and characterization of PLA bilayer containing lignina and cellulose

- nanostructure in combination with umbelliferone as active ingredient. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, doi: 10.3389/fchem.201900157, 2019.
- Moraes, I. C. F. et al. Influência do grau de hidrólise do poli(vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli(vinil álcool) plastificados com glicerol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 739-745, 2008.
- Moraes, I. C. F. et al. Film forming solution based on gelatin and poly(vinyl alcohol) blends: Thermal and rheological characterizations. **Journal of Food Engineering**, v. 2009, p. 585 – 596, 2009.
- Mori, M. T. S. S. **Aplicação de nisina em envoltório celulósico para mortadela**. 2013. 84f. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia. Escola de Engenharia de Mauá. São Caetano do Sul, 2013.
- Muller, J.; González-Martínez, C.; Chiralt, A. Poly(lactic) acid (PLA) and starch bilayerfilms, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. **European Polymer Journal**, v. 95, p. 56-70, 2017.
- Nayebzadeh, K., Chen, J. S., Dickinson, E., Moschakis, T. Surface structure smoothing effect of polysaccharide on a heat-set protein particle gel. **Langmuir**, v. 22, p. 8873 - 8880, 2006.
- Nazurah, R. N. F.; Hanani, Z. A. N. Physicochemical characterization of kappa-carrageenan (*Eucheima cottoni*) based films incorporated with various plant oils. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1479-1487, 2017.
- NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
- Nes, I. F., Yoon, S. S., Diep, D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A Review. **Food Science Biotechnology**, v. 15, p. 675-690, 2007.

- Nilsuwan, K.; Guerrero, P.; Caba, K.; Benjakul, S.; Prodpran, T. Properties and application of bilayer films based on poly (lactic acid) and fish gelatin containing epigallocatechin gallate fabricated by thermo-compression molding. **Food Hydrocolloids**, v. 105, 105792, 2020.
- Nogueira, D.; Martins, V. G. Biodegradable bilayer film prepared from individual films of different proteins. **Journal of Applied Polymer Science**, 2018. DOI: 10.1002/app.46721.
- Nora, T. B. D. **Influência da adição de *masterbatch* nas propriedades de peças injetadas de PEAD**. 2016. 56f. Trabalho de Conclusão de curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia de Materiais. Porto Alegre. 2016.
- Norajit, K.; Kim, K. M.; Ryu, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 377-384, 2010.
- Noshirvani, N. et al. Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 36-45, 2017.
- Nouri, L.; Nafchi, A. M. Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 254-259, 2014.
- Obregón A. C. Métodos de Conservación em Cárnicos y Lácteos. **Mundo Lácteo e Cárnico**, p. 24. 2004.
- Oliveira, T. G. **Caracterização de filmes à base de gelatina aditivados com extratos vegetais**. 2017. 119f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2017.
- Oliveira, T. M. et al. Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation. **Packaging Technology and Science**, v. 20, p. 147-153, 2007.

- Oliveira, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.
- Ollé Resa, C. P.; Jagus, R. J.; Gerschenson, L. N. Effect of 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, 2014.
- Ollé Resa, C. P.; Gerschenson, L. N.; Jagus, R. J. Effect of natamycin on physical properties of starch edible films and their effect on *Saccharomyces cerevisiae* activity. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 3124-3133, 2013.
- Ordóñez, J. A. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, p. 33-49, 2005.
- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., Nicorescu, V. Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity induced by postprandial degradation products: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 96–123, 2017.
- Parada, J. L. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as preservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 521-542, 2007.
- Paschoalick, T. M. et al. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 419-427. 2003.
- Peng, Y. et al. Optimization and release evaluation for tea polyphenols and chitosan composite films with regulation of glycerol and Tween. **Food Science and Technology**, p. 1-9, 2019.
- Pereda, M. et al. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1372-1381, 2011.
- Pereira-Abreu, D. A., Cruz, J. M.; Losada, P. P. Active and intelligent packaging for the food industry. **Food Reviews International**, v. 28, p. 46–187, 2012.

- Peressini, D. et al. Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 25-32, 2003.
- Pérez-Alvarez, J. A. et al. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, v. 32, p. 599-607, 1999.
- Pintado, C. M. B. S.; Ferreira, M. A. S. S; Sousa, I. Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1891-1896, 2009.
- Pintado, C. M. B. S.; Ferreira, M. A. S. S; Sousa, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. 21, p. 240-246, 2010.
- Piñeros-Hernandez, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488-495, 2017.
- Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. **Antioxidants in foods: practical applications**. 1st Edition. Cambridge: CRC Press LLC and Woodhead Publishing, p. 1-373, 2001.
- Ponce, A. G. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 294-300, 2008.
- Pranoto, Y.; Rakshit, S. K.; Saloke, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT**, v. 38, p. 859-865, 2005.
- Prystupa, D. A.; Donald, A. M. Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. **Polymers Gels and Networks**, v. 4, p. 87, 1996.
- Purwar, R.; Verman, A.; Batra, R. Antimicrobial gelatin/sericin/clay films for packaging of hygiene products. **Journal of Polymer Engineering**, v. 39, p. 744-751, 2019.
- Quintavalla, S.; Vicini, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 373-380, 2002.

- Raeisi, M. et al. Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 139-145, 2016.
- Ramvalho, V. C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- Rambabu, K. et al. Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1234-1243, 2019.
- Ramírez, C.; Gallegos, I.; Ihl, M.; Bifani, V. Study of contact angle, wettability and water vapor permeability in carboxymethylcellulose (CMC) based film with murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) extract. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 424-429, 2012.
- Ramos, O. L. et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, v. 45, p. 351-361, 2012.
- Rasid, N. A. M. et al. Rheological, functional and antioxidant properties of films forming solution and active gelatin films incorporated with *Centella asiatica* (L.) urban extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, p. 115-124, 2018.
- Reische, D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R. Antioxidants. In: Akohn, C. C., Min, D. B. (Ed). Food Lipids – Chemistry, nutrition and biotechnology, p. 409-433, 3rd Edition, **CRC Press**, 2008.
- Remedio, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de quitosana como veículo dos agentes antimicrobianos sorbato de potássio e nisina**. 2017. 84f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2017.

- Ribeiro, M. A.; Bernardo-Gil, M. G.; Esquível, M. M. Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, p. 51–60, 2001.
- Rivero, S., Garcia, M. A., Pinotti, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 369-375, 2010.
- Rollema, H. S. et al. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2873-2878, 1995.
- Romero, V. et al. Biodegradable films obtained from triticale (x Triticosecale Wittmack) flour activated with natamycin for cheese packaging. **Food packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 54-59, 2016.
- Ruiz, J. N. et al. Physicochemical, microbiological and sensory assessments of Italian salami sausages with probiotic potential. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 204-2011, 2014.
- Sahin, A. et al. Chitosan edible coating and oxygen scavenger effects on modified atmosphere packaged sliced sucuk. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, e13213, 2017.
- Samelis, J.; Georgiadou, K. The microbial association of Greek taverna sausage stored at 4 and 10 °C in air, vacuum or 100% carbon dioxide, and its spoilage potential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 58–68, 2000.
- Santos, D. N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2012. 98 f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2012.
- Schivazappa, C., Virgili, R., Soresi Bordini, C. Investigation into the functional and analytical properties of Italian coppa. **Industria Conserve**, v. 72, p. 13-18, 1997.

- Schmeda-Hirschmann, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 183-186, 1987.
- Schneider, N.; Werkmeister, K.; Pischetsrieder, M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. **Food Chemistry**, v. 127, p. 847-854, 2011.
- Schmitt, H. et al. Preparation and properties of novel melt-blended halloysite nanotubes/wheat starch nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v 89, p. 920-927, 2012.
- Shahidi, F. Natural Oxidants: An Overview. In: Shahidi, F. (Ed). Natural oxidants: Chemistry, health effects, and applications, p. 1-11. **The American Oil Chemists Society**, 1997.
- Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.
- 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, p. 285–290, 2010.
- Sherwin C, Labuza TP. **Beyond water activity and glass transition: a broad perspective on the manner by which moisture can influence reaction rates in foods**. In: Buera MP, Corti HR, Welt-Chanes J, Lillford PJ, editors. Water properties of food, pharmaceutical, and biological materials. New York: CRC Taylor & Francis. p 343–76, 2006.
- Silva, J. P. L. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella* Enteritidis em salada de legumes com maionese**. 2007. 90f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2007.
- Silva, M. A.; Bierhalz, A. C. K.; Kieckbusch, T. G. Modelling natamycin release from alginate/chitosan active films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 740–746, 2012.

- Silva, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3. Ed. São Paulo: Varela, 109 p., 2007.
- Silva-Weiss, A. et al. Polyphenol-rich extract from murta leaves on rheological properties of film forming solution based on different hydrocolloid blends. **Journal of Food Engineering**, v. 140, p. 28-38, 2014.
- Singleton, V. L.; Rossi Jr., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Phenolics Determination**, p. 144-158, 1965.
- Siracusa, V. Food packaging permeability behaviour: A report. **International Journal of Polymer Science**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. **Food Research International**, v. 41, p. 781 – 785, 2008.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**, Ed. 6. USA: Thomson Brooks Cole, 2007.
- Soares, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- Soares, C. E. A. **Caracterização estrutural e potencial da galactomanana de *Adenantha pavonina* L. como matéria-prima para produção de filmes comestíveis bioativos**. 2009. 262f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- Sobeh, M. et al. High resolution UPLC-MS/MS profiling of polyphenolics in the methanol extract of *Syzygium samarangense* leaves and its hepatoprotective activity in rats with CCl₄-induced hepatic damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 145-153, 2018.
- Sobral, P. J. A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes a base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1251-1259, 2000.

- Sobral, P. J. A. et al. Phase transitions in biodegradable films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 372-379, 2011.
- Sobral, P. J. A.; Habitante, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 377-382, 2001.
- Sobral, P. J. A. et al. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 423-432, 2001.
- Sorensen, G., Jorgensen, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 202, p. 205-210, 1996.
- Souza, C. M. M. et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.
- Souza, M. A. de A.; Terra, N. N. Antioxidant activities of sesame seed extracts in chicken thighs. **Fleischwirtschaft International**, v. 23, p. 75-78, 2008.
- Souza, S. M. A.; Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C. Physical properties of edible films based on bovine myofibril proteins. **Ciências Agrárias**, v. 33, p. 283-296, 2012.
- Steffe, J. F. Rheological methods in food process engineering. **Michigan: 2a ed., Freeman Press**, 148 p., 1996.
- Stevens, K. A. et al. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1786-1788, 1992.
- Sun, Q.; Senecal, A.; Chinachoti, P.; Faustman, C. Effect of water activity on lipid oxidation and protein solubility in freeze-dried beef during storage. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2512-2516, 2002.
- Sung, S. Y. et al. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, p. 110-123, 2013.
- Talón, E. et al. Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1153-1161, 2017.

- Tedesco, M. P. **Filmes de desintegração oral produzidos por *tape-casting* – perspectiva para veiculação de compostos ativos extraídos do resíduo industrial de acerola**. 2018. 107f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2018.
- Theivendran, S.; Hettiarachchy, N. S.; Johnson, M. G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 39-44, 2006.
- Thomas, L. V. et al. Natamycin Control of Yeast Spoilage of Wine. **International Association for Food Protection - Food Protection Trends**, v. 25, p. 510-517, 2005.
- Thomas, N. W. A new approach to calculating powder diffraction patterns based on the Debye scattering equation. **Acta Crystallogr Sect A**, v. 66, p. 64-77, 2010.
- Thomazine, M.; Carvalho, R. A.; Sobral, P. J. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 172-176, 2005.
- Tongnuanchan, P. et al. Mechanical, thermal and heat-sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 93-107, 2016.
- Trezza, T. A.; Krochta, J. M. Specular reflection, gloss, roughness and surface heterogeneity of biopolymer coatings. **J. Appl. Polym. Sci**, v. 79, p. 2221–2229, 2001.
- Valencia, G. A. **Propriedades físicas de filmes à base de biopolímeros reforçados com laponita**. 2017. 143f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga. 2017.
- Vargas, F. C. **Caracterização de extratos aquosos de Pitanga (*Eugenia uniflora* L), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sua aplicação para promover a estabilidade da carne bovina refrigerada**. 2015. 125

- f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- Vargas, F. C. et al. Rosemary and pitanga aqueous leaf extracts on beef patties stability under sold storage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, e16160139, 2016.
- Vargas, F. C.; Gómez, B.; Khaneghah, A. M.; Strozzi, I.; Gavahian, M.; Barba, F. J.; Sobral, P. J. A; Lorenzo, J. M. ssessment of the Suitability of Pitanga Leaf Extract as a Natural Antioxidant for Enhancing Canola Oil Stability: Monitoring Lipid Oxidation Parameters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, p. 1-8, 2019.
- Villalobos, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 53-61, 2005.
- Welscher, Y. M. et al. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. **Journal of Biological Chemistry** v. 283, p. 6393-6401, 2008.
- Wojciechowska, P. et al. Antimicrobial activity of organic-inorganic hybrid films based on gelatin and organomodified silicones. **Advances in Polymer Technology**, v. 37, p. 2958-2970, 2018.
- Yakimets, I. et al. Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: A comparative study. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1710-1722, 2007.
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., Miltz, J. Intelligent packaging: Concepts and applications. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 1-10, 2005.
- Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50-56, 2012.
- Zanardi, E. et al. Lipid oxidation of irradiated pork products. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1301-1307, 2009.

- Zanardi, E. et al. Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. **Meat Science**, v. 55, p. 169-175, 2000.
- Zehetmeyer, G. et al. Influence of melt processing on biodegradable nisin-PBAT films intended for active food packaging applications. **Journal of Applied Polymer Science**, DOI: 10.1002/app.43212, 2016.
- Zhang, X. et al. Plant extracts such as pine nut shell, peanut shell and jujube leaf improved the antioxidant ability and gas permeability of chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**. *In Press*. BIOMAC – 13889, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.108.
- Zhao, Y. et al. Antimicrobial activity of bioactive starch packaging films against *Listeria monocytogenes* and reconstituted meat microbiota on ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 305, 108253, 2019.
- Zheng, W.; Wang, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165- 5170, 2001.
- Zimet, P. et al. Physico-chemical and antilisterial properties of nisin-incorporated chitosan/carboxymethyl chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 334-343, 2019.
- Zinoviadou, K. G.; Koutsoumanis, K. P.; Biliaderis, C. G. Physicochemical 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.

ANEXO I – Espectro de infravermelho representativos da nisina em pó.

Fonte: Própria autoria.

ANEXO II – Espectro de infravermelho representativos do extrato hidroetanólico de folha de pitangueira em pó.

Fonte: Própria autoria.

ANEXO III – Espectro de infravermelho representativos da natamicina em pó.

Fonte: Própria autoria.